

**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ**  
**МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ**  
**КАТЕДРА ПО ПЕДИАТРИЯ**

---

**Д-р АНИ ВАЛЕНТИНОВА АРОЙО**

**МНОЖЕСТВЕН ТРОПЕН ДЕФИЦИТ:  
МУТАЦИОНЕН СКРИНИНГ НА ХИПОФИЗАРНИ  
ТРАНСКРИПЦИОННИ ФАКТОРИ, КОРЕЛАЦИИ  
ГЕНОТИП-ФЕНОТИП**

**ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД**  
**ЗА ПРИСЪЖДАНЕ НА ОБРАЗОВАТЕЛНА И**  
**НАУЧНА СТЕПЕН “ДОКТОР”**

Област на висше образование: „Здравеопазване и спорт“

Шифър 7.1

Професионално направление: „Медицина“

Научна специалност: „Педиатрия“

**НАУЧЕН РЪКОВОДИТЕЛ**  
**ПРОФ. Д-Р ИВА ХРИСТОВА СТОЕВА, ДМ**

**София 2018**

# СЪДЪРЖАНИЕ

СПИСЪК НА ТАБЛИЦИТЕ .....	vi
СПИСЪК НА ФИГУРИТЕ .....	viii
СПИСЪК НА ПРИЛОЖЕНИЯТА .....	x
СПИСЪК НА СЪКРАЩЕНИЯТА .....	xi
ВЪВЕДЕНИЕ .....	14
ГЛАВА ПЪРВА ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР .....	18
I. Нормален и нисък ръст .....	18
1. Нормален ръст: определение, фази на растеж, оценка на ръста .....	18
2. Нисък ръст .....	20
3. Множествен тропен дефицит .....	22
II. Ембриология .....	24
1. Основни принципи на ембриогенезата .....	24
2. Кратка анатомия на хипофизата .....	25
3. Ембриология на хипофизата .....	27
3.1. Сигнални молекули, които регулират формирането на джоба на Rathke и детерминацията на хипофизарните клетъчни линии .....	30
3.1.1. Sonic Hedgehog (Shh) .....	30
3.1.2. BMP .....	31
3.1.3. FGFs .....	32
3.1.4. Notchs .....	33
3.1.5. Wnts .....	35
3.2. Транскрипционни фактори .....	36
3.2.1. Ранни транскрипционни фактори .....	36
3.2.1.1. SOX .....	36
3.2.1.2. Otx2 .....	42
3.2.1.3. Pitx семейство .....	44
3.2.1.4. Hesx1 .....	46
3.2.1.5. Септо-оптична дисплазия .....	50
3.2.1.6. Lhx3 .....	51

3.2.1.7.	Lhx4.....	54
3.2.2.	Късни транскрипционни фактори .....	56
3.2.2.1.	Prop 1.....	56
3.2.2.2.	Pou1f1 (Pit1) .....	60
3.2.3.	Нови гени, включени в етиологията на вродения хипопитуитаризъм	64
3.2.3.1.	IGSF1 .....	64
III.	Предишни български изследвания.....	65
IV.	Промяна на критериите и стратегията.....	66
ГЛАВА ВТОРА ЦЕЛ И ЗАДАЧИ.....		68
I.	Цели.....	68
II.	Задачи.....	68
ГЛАВА ТРЕТА МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ НА ИЗСЛЕДВАНЕ.....		69
I.	Материал.....	69
1.	Дизайн на проучването .....	69
2.	Изследвани пациенти .....	70
3.	Подбор на кандидати. Критерии за включване и изключване .....	70
3.1.	Задължителен критерий за включване в проучването .....	70
3.2.	Допълнителни критерии за включване в проучването .....	71
3.3.	Критерии за изключване от изследването.....	73
4.	Методи.....	73
4.1.	Ендокринна диагностика.....	73
4.1.1.	Определяне на базални серумни нива.....	73
4.1.2.	Функционална ендокринна диагностика .....	76
4.2.	Молекулярно-генетични изследвания .....	78
4.2.1.	Изолиране на ДНК .....	78
4.2.2.	Мутационен скрининг за PROP1 .....	79
4.2.3.	Мутационен скрининг за POU1F1, HESX1, SOX3, SOX2 .....	81
4.2.4.	Изолиране на ДНК за сравнителна геномна хибридизация.....	83
4.2.5.	Сравнителна геномна хибридизация.....	83
4.3.	Статистически методи.....	85

ГЛАВА ЧЕТВЪРТА РЕЗУЛТАТИ.....	86
I.  Фенотипна характеристика на групите пациенти .....	86
1.  Фенотипна характеристика на пациентите, анализирани за <i>PROP1</i> гена..	86
2.  Фенотипна характеристика на пациентите, анализирани за <i>POU1F1</i> гена	94
3.  Фенотипна характеристика на пациентите, анализирани за <i>SOX3</i> гена....	96
4.  Фенотипна характеристика на пациентите, анализирани за <i>SOX2</i> гена....	98
5.  Фенотипна характеристика на пациентите, анализирани за <i>HESX1</i> гена	100
II. Молекулярно-генетичен анализ на гена <i>PROP1</i> .....	102
1.  Първа стъпка: <i>Vcg1</i> рестриктазна реакция .....	102
2.  Втора стъпка: директно секвениране .....	103
1.  Фенотип на пациенти с мутация в <i>PROP1</i> гена.....	105
1.1. Пациент 1.....	105
1.2. Пациент 2.....	106
1.3. Пациент 3.....	107
1.4. Съпоставка на фенотипа на пациентите с доказана <i>PROP1</i> мутация ...	108
2.  Въвеждане на молекулярно-генетичния анализ на <i>PROP1</i> в рутинния диагностичен алгоритъм при пациенти с вроден хипосоматотропизъм, със или без съпътстващи дефицити.....	111
3.  Оформяне на група пациенти за молекулярно-генетичен анализ на други кандидат-гени, кодиращи хипофизарни транскрипционни фактори .....	112
3.1. <i>POU1F1</i> .....	112
3.2. <i>SOX3</i> .....	112
3.3. <i>SOX2</i> .....	112
3.4. <i>HESX1</i> .....	113
3.5. <i>IGSF1</i> .....	113
3.6. Цялостно геномно изследване.....	116
3.6.1. Пациент 7: В.Д.Г. ....	116
3.6.2. Пациент 8: Б.Г.Г. ....	117
ГЛАВА ПЕТА ОБСЪЖДАНЕ .....	120
I.  Подбор на кандидати за молекулярно-генетичен анализ на <i>PROP1</i> .....	120

II. Установяване на общата честота на мутациите в гена кодиращ PROP1, както и най-честата мутация при български пациенти с хипосоматотропизъм.....	120
III. Анализ на корелациите генотип-фенотип при пациенти с доказана PROP1 мутация .....	125
1. Неонатални прояви.....	125
2. Фамилна анамнеза .....	125
3. Ендокринен фенотип.....	126
3.1. Дефицит на растежен хормон.....	126
3.1.1. TSH .....	127
3.1.2. Гонадотропини .....	128
3.1.3. АСТН.....	133
3.2. Морфология на хипофизната жлеза.....	135
IV. Ревизия на използваната стратегия на провеждане на молекулярно-генетичен анализ на PROP1 гена.....	137
V. Въвеждане на молекулярно-генетичния анализ на PROP1 в рутинния диагностичен алгоритъм при пациенти с вроден хипосоматотропизъм .....	138
VI. Оформяне на група пациенти за молекулярно-генетичен анализ на други кандидат-гени, кодиращи хипофизарни транскрипционни фактори .....	139
VII. Изследване на цялостния геном при пациенти с комплексен фенотип.....	144
ГЛАВА ШЕСТА ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	152
ГЛАВА СЕДМА ИЗВОДИ И ПРИНОС НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....	155
ПРИЛОЖЕНИЯ .....	158
БИБЛИОГРАФИЯ .....	176

## СПИСЪК НА ТАБЛИЦИТЕ

Таблица 1. Диференциална диагноза на ниския ръст .....	21
Таблица 2. Клинична изява на хипопитуитаризъм в зависимост от възрастта .....	23
Таблица 3. Лабораторните и хормонални изследвания .....	23
Таблица 4. Възрастово и полово разпределение на изследваните пациенти.....	70
Таблица 5. Описание на използваните тестове за стимулация секретията на РХ .....	77
Таблица 6. Използвани праймери за амплификационна реакция на PROP1 .....	79
Таблица 7. Използвани праймери за амплификационна реакция на <i>POU1F1</i> , <i>HESX1</i> , <i>SOX3</i> , <i>SOX2</i> .....	81
Таблица 8. Неонатални симптоми на ДРХ сред изследваните пациенти.....	86
Таблица 9. Нормални стойности на АМН за възрастни и пубертетни стадии. <b>Error!</b> <b>Bookmark not defined.</b>	87
Таблица 10. Норми за inhibin b за възрастни и пубертетни стадий. <b>Error! Bookmark</b> <b>not defined.</b>	88
Таблица 11. Нормални стойности на АМН за възрастни и пубертетни стадии <b>Error!</b> <b>Bookmark not defined.</b>	89
Таблица 12 Нормални стойности на inhibin b за възрастни и пубертетни стадии ...	90
Таблица 13. Клиника в неонаталния период при изследваните пациенти.....	95
Таблица 14. Клиника в неонаталния период при изследваните пациент.....	96
Таблица 15. Алелна честота на откритите мутации и полиморфизми в PROP1. ....	104
Таблица 16. Клинична изява на МТД в неонаталния период при пациенти с доказан дефект в PROP1 гена .....	109
Таблица 17. Аукологични данни и резултати отпроведените стимулационни тестове за РХ.....	110
Таблица 18. Възраст на изява на допълнителни хипофизарни дефицити.....	110
Таблица 19. Сравнение на възрастта на начало на изоставането, поставяне на генетична и етиологична диагноза и начало на лечението.....	111
Таблица 20. Находка от ЯМР на хипоталмо-хипофизарна област при пациентите с доказана PROP1 мутация .....	111
Таблица 21. Офталмологичен фенотип при изследваните пациенти .....	112
Таблица 22. Гени включени в 7q23.11 микродупликацията при пациент 8 .....	118

<b>Таблица 23.</b> Разпределение на PROP1 мутациите в Европа.....	121
<b>Таблица 24.</b> Регулация на експресия на гените SU, Lhb, Fshb.....	128
<b>Таблица 25.</b> Съпоставка на находката от ЯМР при пациенти с PROP1 мутация.....	135
<b>Таблица 26.</b> . Разпределение на POU1F1 мутации в Европа.....	140
<b>Таблица 27.</b> Разпределение на NESX1 мутации в Европа.....	142
<b>Таблица 28.</b> Съпоставка на фенотипа на пациента със синдрома на дефицит на IGSF1 .....	143
<b>Таблица 29.</b> Сравнение на фенотипните характеристики при пациент 7 и пациенти с доказана микроделеция 17q21.31 .....	147
<b>Таблица 30.</b> Сравнение между фенотипа на пациент 8 и фенотипа при 7q11.23 микродупликационен синдром.....	151

## СПИСЪК НА ФИГУРИТЕ

<b>Фигура 1.</b> Математически ICP модел .....	18
<b>Фигура 2.</b> Устройство на хипофизата и разпределение на хипофизарните клетъчни линии.....	26
<b>Фигура 3.</b> Ембрионален произход на хипофизата.....	27
<b>Фигура 4.</b> Регулация на ембрионалното развитие на хипофизата .....	29
<b>Фигура 5.</b> Антагонизъм между Shh и Vmp сигналните молекули .....	31
<b>Фигура 6.</b> Структура на протеина SOX2 и известни мутации при хора .....	39
<b>Фигура 7.</b> Структура на гена и протеина OTX2 и известните мутации при човек ....	42
<b>Фигура 8.</b> Структура на гена и протеина на LHX4 с известните мутации .....	52
<b>Фигура 9.</b> Структура на гена и протеина на LHX4 с известните мутации .....	54
<b>Фигура 10.</b> Структура на гена и протеина на <i>PROPI</i> с известните мутации .....	57
<b>Фигура 11.</b> Структура на гена и протеина на <i>POU1F1</i> с известните мутации.....	60
<b>Фигура 12.</b> Регулация на експресията на гена <i>Pou1f1</i> .....	61
<b>Фигура 13.</b> Структура на протеина IGSF1 с местоположението на известните мутации (по Tijama, 2014). В червено е отбелязана откритата в настоящото проучване мутация.....	64
<b>Фигура 14.</b> Нарушена TRN сигнална трансдукция при мутация в IGSF1 .....	65
<b>Фигура 15.</b> Алгоритъм за подбор на кандидати за изследване на определен ген. ....	78
<b>Фигура 16.</b> Визуализация на микрочип .....	84
<b>Фигура 17.</b> Схематично представяне на метода сравнителна геномна хибридизация .....	85
<b>Фигура 18.</b> Съпоставка на възрастта на пациентите и SDSH(P) при поставяне на диагнозата.....	87
<b>Фигура 19.</b> Съпоставка на ръста на пациентите със среднородителския ръст.....	87
<b>Фигура 20.</b> Сравнение между хронологичната и костната възраст на пациентите при поставяне на диагнозата. ....	88
<b>Фигура 21.</b> Индивидуален анализ на серумните нива на TSH и FT4 преди започване на лечение с rhGH. ....	89
<b>Фигура 22.</b> Базални стойности на полови хормони.....	89
<b>Фигура 23.</b> Комбинация от дефицити на хипофизарни хормони в брой пациенти ...	94
<b>Фигура 24.</b> Находка от ЯМР на хипоталамо-хипофизарната област.....	94

<b>Фигура 25.</b> Сравнение на SDS на ръста с хронологичната възраст при поставяне на диагнозата на пациентите .....	95
<b>Фигура 26.</b> Патологични находки от ЯМР на хипоталамо-хипофизарната област ...	96
<b>Фигура 27.</b> Сравнение на SDS на ръста с хронологичната възраст при поставяне на диагнозата на пациентите. ....	97
<b>Фигура 28.</b> Разпределение на различните дефицити на хипофизарни хормони .....	97
<b>Фигура 29.</b> Патологични находки от ЯМР на хипоталамо-хипофизарната област ...	98
<b>Фигура 30.</b> Клиника в неонаталния период по брой пациенти .....	99
<b>Фигура 31.</b> Сравнение на SDS на ръста с хронологичната възраст при поставяне на диагнозата на пациентите .....	99
<b>Фигура 32.</b> Разпределение на различните дефицити на хипофизарни хормони .....	100
<b>Фигура 33.</b> Патологични находки от ЯМР на хипоталамо-хипофизарната област .	100
<b>Фигура 34.</b> Разпределение симптомите на МТД в неонатална възраст .....	101
<b>Фигура 35.</b> Съпоставяне на SDSh(P) и възрастта на пациентите при поставяне на диагнозата.....	101
<b>Фигура 36.</b> Разпределение на хипофизарните дефицити по брой пациенти .....	101
<b>Фигура 37.</b> Находка от ЯМР на хипоталамо-хипофизарна област .....	102
<b>Фигура 38.</b> Резултат от молекулярно-генетичен анализ на пациент 1. ....	103
<b>Фигура 39.</b> А) Секвенционен анализ на пациент 2, показващ хомозиготна 150delA мутация и В) нормална секвенция .....	103
<b>Фигура 40.</b> А) Секвенционен анализ на пациент 3, показващо хомозиготна 150delA мутация и В) нормална секвенция .....	104
<b>Фигура 41.</b> Растежни криви на пациент 1 .....	106
<b>Фигура 42.</b> Растежна крива 1-18 години на пациент 2.....	107
<b>Фигура 43.</b> Растежна крива 1-18 години на пациент 3.....	108
<b>Фигура 44.</b> А) Динамика на секрецията на РХ на различна възраст, при ендогенна и фармакологична стимулация; В) Растежна крива на пациента 1-18 години .....	114
<b>Фигура 45.</b> А) Проследяване на пубертетен статус и базални серумни нива на полови хормони; В) Ехография на тестиси; С) Лонгитудинално проследяване на тестикуларния обем в SDS .....	115
<b>Фигура 46.</b> ЯМР на хипоталамо-хипофизарна област .....	115
<b>Фигура 47.</b> Патологичните хромозомни аберации наблюдавани при пациент 7 .....	116
<b>Фигура 48.</b> Ембрионално развитие на окото при човека. ....	169

## СПИСЪК НА ПРИЛОЖЕНИЯТА

<b>Приложение 1.</b> Класификации за нисък ръст .....	158
<b>Приложение 2.</b> Известни мутации в гени, кодиращи хипофизарни транскрипционни фактори .....	163
<b>Приложение 3.</b> Ембриология на зрителния анализатор.....	169
<b>Приложение 4.</b> Ембрионално развитие на мозъка .....	170
<b>Приложение 5.</b> Информирано съгласие за пациента за анализиране на гените POUF-1 (PIT-1), HESX1, SOX3 при вроден хипосоматотропизъм.....	172
<b>Приложение 6.</b> Информирано съгласие за пациента за провеждане на анализ чрез сравнителна геномна хибридизация при хипосоматотропизъм.....	174

## СПИСЪК НА СЪКРАЩЕНИЯТА

АК	аминокисеселини
АКТХ	аденокортикотропен хормон
АМХ	антимюлеров хормон
АХ	аденохипофиза
г.с.	гестационна седмица
ДНК	дезоксирибунуклеинова киселина
ДРХ	дефицит на растежен хормон
ЕНС	ентералната нервна система
ИДРХ	изолиран дефицит на растежен хормон
ИИХ	инсулин индуцирана хипогликемия
КВ	костна възраст
ЛХ	лутеинизиращ хормон
ЛХ-РХ	лутеинизиращ хормон освобождаващ хормон
МТД	множествен тропен дефицит
НПК	невропрогениторната клетка
НПР	нервно-психическо развитие
НХ	неврохипофиза
ПР	прицелен ръст
ПРЛ	пролактин
РНК	рибонуклеинова киселина
РХ	растежен хормон
СОД	септо-оптична дисплазия
СРР	среднородителски ръст
СТХ	соматотропен хормон
ТСХ	тиреостимулиращ хормон
ТФ	транскрипционен фактор
ФСХ	фоликулостимулиращ хормон
ХХ	хипогонадотропен хипогонадизъм
ЦНС	Централна нервна система
ЯМР	ядрено-магнитен резонанс
АСТН	Adrenocorticotropic hormone

AMH	Anti-Mullerian Hormone
Atbf1	Zinc finger homeobox protein 3
$\alpha$ -GSU	$\alpha$ -гликопротеиновата субединица
BMP4	Bone Morphogenetic Protein 4
Dll1	Delta-like Protein 1
EE	Early enhancer
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FGF	Fibroblast Growth Factor
FSH	Follicle-Stimulating Hormone
EGR1	Early Growth Response Protein 1
ER	Estrogen Receptor
ERF	Est-2 repressor factor
HESX1	Homeobox Gene Expressed in ES Cells
HMG	High Mobiliy Group
HPE	холопрозенцефалия
IGF1	Insulin-Like Growth Factor
IGFBP	Insulin-Like Growth Factor Binding Protein
IGSF1	Immunoglobulin Superfamily Member 1
IRMA	Immunoradiometric Assay
KDVS	Koolen-de Vries syndrome
LH	Luteinizing Hormone
LH-RH	Luteinizing Hormone Releasing Hormone
LHX3/4	LIM/homeobox protein 3/4
LIM	Акроним от първите три члена на семейството ТФ: Lin11, Isl-1, Mec-3
GH	Growth Hormone
GHF	Growth Hormone Factor
Gli 1/2/3	GLI family zinc finger 1/2/3
GnRHR	Gonadotropin-releasing hormone receptor
GR	Glucocorticoid Receptor
GSU	G <sub>s</sub> alpha subunit
MPH	Midparental height
Nkx	Homeobox protein Nkx-2.5
Oct-3/4	Octamer-binding transcription factor 4

OTX2	Orthodenticle homeobox 2
PITX1/2	Paired-like homeodomain transcription factor 1/2
POMC	проопиомеланокортин
POU1F1 (POU1F1)	Pituitary-Specific Transcription Factor 1
PRL	Prolactin
PROK1	Prokineticin 1
PROP1	Prophet of POU1F1
Ptc1	Patched1
RAR	Retinoid acid receptor
Rbp-J	Recombining binding protein suppressor of hairless
RXR	Retinoid X Receptor
SDS	Standard Deviation Score / индекс на стандартно отклонение
SF1	Steroidogenic factor 1
Six3	SIX Homeobox 3
SOX2	SRY (sex determining region Y)-box 2
SOX3	SRY (sex determining region Y)-box 3
Shh	Sonic Hedgehog
SRY	Sex Determining Region Y
STH	Somatotropic Hormone
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor- $\beta$
Tbx2	T-box transcription factor 2
TLE1	Transducin-like enhancer protein 1
TR	тироиден рецептор
TRH	Thyrotropin-releasing hormone
TSH	Thyroid-Stimulating Hormone
VDR	Vitamin D Receptor
WNT	Wingless-related integration site

## ВЪВЕДЕНИЕ

Хипоталамусът е основната структура в мозъка, която регулира телесната хомеостазата. Той контролира секрецията на хормони от различните хипофизарни клетки. От своя страна хипофизата е централен регулатор на жизнени процеси като метаболизъм, отговор на стрес, растеж, пубертет, репродукция и лактация.

Хипофизната жлеза е изградена от преден и заден лоб. Предният дял на хипофизата, (аденохипофиза), се състои от пет вида хормон-секретиращи клетки: соматотрофи (произвеждат растежен хормон и пролактин), тиреотрофи (тиреостимулиращ хормон), гонадотрофи (лутеинизиращ и фуликулостимулиращ хормон) и кортикотрофи (адренкортикотропен хормон). Задният дял на хипофизата (неврохипофиза) отделя антидиуретичен хормон и окситоцин, секретирани и транспортирани от паравентрикуларното и супраоптичното ядро на хипоталамуса.

Хипофизата и хипоталамусът са свързани чрез хипофизарната дръжка, наречена инфундибулум. Регулацията на синтеза и секрецията на хипофизарните хормони се извършва на принципа на обратната връзка. Инфундибулумът съдържа съдови и нервни връзки, които предават информацията между двете структури.

Всяко нарушение в развитието на хипофизата води до различна по тежест вродена форма на хипопитуитаризъм. Нарушенията в органогенезата на хипофизата са в основата на разнообразния фенотип на пациенти с хипопитуитаризъм и съответно в основата на нашето изследване.

Двата дяла на хипофизата имат освен различна структура и функция, и различен ембрионален произход. Аденохипофизата се заражда от тавана на устната кухина, докато неврохипофизата от невроепителни клетки в първичния диенцефалон. Детерминацията, пролиферацията и крайната диференциация на специфичните хипофизарни клетъчни линии се контролира от сложна каскада от сигнални молекули и транскрипционни фактори, които се експресират в строго определен времеви и пространствен порядък. Детерминацията на клетъчните типове се определя от сигналните молекули. Те се експресират във вентралния и дорзалния диенцефалон, както и с оралната ектодерма, създавайки концентрационни градиенти. Техни таргетни гени са ранните и късни транскрипционни фактори. Те, от своя страна,

контролират пролиферацията и крайната диференциация на питуитарните хормон-продуциращи клетки.

Хипопитуитаризъм или множествен тропен дефицит се определя като дефицит или липса на два или повече хипофизарни хормона. В зависимост от нивото на генетичен дефект в каскадата, клиничната изява може да бъде много разнообразна. При засягане на късни ТФ като *PROP1* и *POU1F1* се нарушава пролиферацията, миграцията и крайната диференциация на различни хормон-продуциращи клетки. Мутации в *PROP1* гена предизвикват хипоплазия на аденохипофизата и дефицит на всички пет хормона, секретирани от нея. Фенотипната изява е вариабилна. Може да се прояви още в неонатална възраст с неспецифични симптоми като хипогликемия, пролонгирана неонатална жълтеница, микропенис и крипторхизъм при момчетата. По-нататък клиниката зависи от спектъра на хормоналните дефицити и се характеризира с прогресивно развитие във времето. Най-чест е ДРХ, при който се наблюдава изоставане в растежа, предилекционно натрупване на мастна тъкан по трункуса, акромикрия, кукленски фациес с изпъкнало чело и хипоплазия на срединните структури. Дефицитът на TSH се изявява с лесна уморяемост, чувство на студ, увеличаване на теллото, брадикардия, брадипсихия, хипотония. При тежки случаи на не-диагностициран и не-лекуван вроден централен хипотиреоидизъм може да се стигне до изоставане в растежа, забавено костно съзряване. Често се диагностицира XX или отключен пубертет, който в последствие затихва. Дефицитът на АСТН обикновено се диагностицира през трета или четвърта декада на живота. Въпреки това, вече има много проучвания, включително и настоящото, които съобщават за ранно начало на АСТН дефицит. Симптомите са хипокортизолизим, невиреене, гадене, повръщане, хипогликемия, анемия, хипонатриемия. Първоначално тези симптоми може да се проявяват само по време на стресови ситуации като спортуване, инфекции, хирургични интервенции и др. При липса или неадекватно лечение дефицитът на АСТН би могъл да доведе дори до смърт.

Поради по-широката им експресия, мутации в гени, кодиращи сигнални молекули или ранни ТФ (например *SHH*, *FGF8*, *PROK1*, *HESX1*, *SOX2/3*, *LhX3/4* и др.), предизвикват комплексен фенотип, който се характеризира с хипо- или аплазия на аденохипофизата, ектопична неврохипофиза, прекъснат, изтънен инфундибулум. Могат да бъдат засегнати и други мозъчни структури като зрителните нерви, оптичната хиазма, corpus callosum, hippocampus. Екстрапитуитарните промени

включват засягане на срединните структури като вродена цепка на устната и небцето, аномалии на сърдечно съдовата, дихателната, храносмилателната, уро-гениталната и опорна-двигателната системи.

Хетерогенната етиология и прогресиращата клинична картина на заболяването, както и евентуалната опасност от летален изход, изискват продължително проследяване и лечение. Подходът трябва да е мултидисциплинарен. Генетичните изследвания и поставянето на точната етиологична диагноза са от изключително значение за ранното диагностициране и лечение на:

- Дефицит на TSH при пациенти с ДРХ и нормална TSH-T4 ос при диагноза;
- ХХ при пациенти в пубертетна възраст;
- Риск от развитие на АСТН дефицит с риск за живота на пациента.
- Диагностициране на екстрапитуитарни аномалии.

Ранната етиологична диагноза е предпоставка за оптимално лечение и подобряване продължителността и качеството на живот на тези пациенти. Трябва да се подчертае, че всеки един пациент с вроден хипосоматотропизъм представлява уникален естествен модел за проучване на сложните процеси, лежащи в основата на ембриогенезата на хипоталамо-хипофизарната единица.

Първите мутации с хипофизарни ТФ са открити в началото на 90те години на миналия век. От тогава насам неимоверно са се увеличили както броят на съобщените мутации, така и ТФ, които имат отношение към етиологията на заболяването. Въпреки това само около 10% от пациентите с МТД имат генетична диагноза.

При пациенти с хипопитуитаризъм без екстрапитуитарни аномалии, предизвикани най-често от мутации в гените *PROPI* и *POUIF1* (около 50%), класически подход на кандидат-гените е най-бърз и достъпен. Поради вариабилната и прогресивно разгръщаща се клинична картина, обаче, този подход показва някои ограничения.

При пациенти с комплексен фенотип по-достъпен метод е скриниране на целия геном чрез сравнителна геномна хибридизация или секвениране на целия геном. Използването на тези нови методи може да доведе както до откриването на нови патологични региони или гени, участващи в етиологията на МТД с екстрапитуитарни аномалии, така и до разширяване на фенотипната характеристика на познати синдромни заболявания.

Настоящото проучване цели да подобри диагностиката и лечението на български пациенти с хипопитуитаризъм чрез: 1. Въвеждане на мутационен скрининг на панел от хипофизарни транскрипционни фактори в рутинната диагностика; и 2. Определяне на най-честите мутации сред българската кохорта от пациенти с хипопитуитаризъм. По този начин може да се прецизира стратегията на молекулярно-генетичен анализ в бъдеще.

# ГЛАВА ПЪРВА

## ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

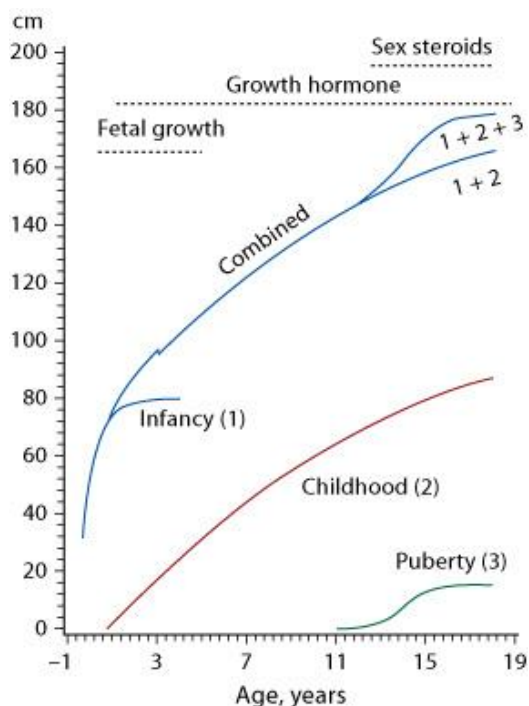
### I. НОРМАЛЕН И НИСЪК РЪСТ

#### 1. Нормален ръст: определение, фази на растеж (ICP-модел), оценка на ръста

Растежът е основен биологичен процес, характерен за детския организъм. Представлява увеличаване на размера на тъканите в организма чрез хиперплазия (увеличаване на броя на клетките), хипертрофия (увеличаване на размера на клетките) и апоптоза (програмирана клетъчна смърт) (Brook, 2005). Растежът е многофакторен процес и се влияе както от ендогенни фактори: генетични, хормонални, регулацията от нервната система, метаболизъм, чувствителност на периферните тъкани към РХ и IGF-1, така и от екзогенни фактори: хранене, екологични, социално-битови условия, хронични заболявания.

Растежът преминава през няколко възрастови етапа, по време на които влиянието на отделните фактори е различно, детето се развива с различен темп, което би могло да повлияе на интерпретацията. Тези особености са представени в математически модел, наречен „Infancy, Childhood and Pubertal model (ICP-model) (фиг. 1).

**Фигура 1.** Математически ICP модел (по Karlberg, 89). С този модел линеарният растеж на детския организъм се разделя на три компонента: кърмачески период, детство и пубертет. Всеки компонент представлява отделна биологична фаза от растежа. Своя роля в растежа и развитието на организма имат и хормоните. По време на вътреутробното развитие основно влияние има инсулина и IGF1. Соматотропния хормон, IGF1 и рецепторите, ангажирани в оста GH- IGF, заедно с щитовидните хормони, имат значение от раждането до достигане на пубертетна възраст. След 4 годишна възраст тяхното влияние се увеличава и става водещо над екзогенните фактори. Именно в този период се проявява клинично дисфункцията на GH-IGF оста. Оста хипоталамус-хипофиза-надбъбрек-гонади се отключва около  $10\pm 2$  години за момичета и  $12\pm 2$  години за момчета и се наблюдава т. нар. пубертетен растежен скок. През този период момичетата растат средно с 18-20 см (6-7 см/ година), а момчетата с 20-23 см (8-10 см/година). Сравнително по-късното начало на пубертета при момчета обуславя по-продължителния растежен скок и крайна височина около 13 см повече от тази на момичетата.



Оценката на степента на физическо развитие се прави по количествените показатели на растежа (ръст, растежна скорост, тегло, обиколка на глава и гърди, телесни пропорции) и качествени показатели на съзряването (костна възраст, интерпретирана по атласа на Greulich/Pyle <sup>(Greulich/Pyle)</sup>, дентиция и пубертетен стадий по Tanner). За надеждно оценяване на растежа е необходимо да се проследяват редовно поне 3 телесни размера: ръст, тегло, обиколка глава.

*Ръстът и теглото* се оценяват спрямо съответния пол и възраст в дадената популация чрез индекс на стандартно отклонение SDS<sup>1</sup>. В клиничната практика се използват и перцентилни криви <sup>(Prader)</sup>. За определянето на генетичния потенциал на детето и собствения му растежен канал се използват *среднородителски и прогностичен ръст*<sup>2</sup>. Всяко еднократно измерване на ръста се интерпретира, не само спрямо предходното, но и спрямо генетичния потенциал на детето. Ето защо растът на деца с ниски родители, растящи съгласно генетичния си потенциал без отклонения могат да бъдат без патология. Обратно, деца на много високи родители (между 75<sup>-ти</sup> и 90<sup>-ти</sup> перцентил например), които растат под генетичната прогноза могат да бъдат с патология. При оценка на растежните стандарти трябва да се има предвид и явлението

<sup>1</sup>  $SDS = \frac{a-x}{SD}$ , където „a” е измерената величина, „x” - стандартната стойност в нормативни таблици, а „SD” - стандартното отклонение.

<sup>2</sup> Изчисляване на среднородителския (CPP) и прицелния ръст (ПР):  $CPP = P_{\text{майка}} + P_{\text{баща}} / 2$ ; ПР момчета =  $CPP + 6.5$  и ПР момичета =  $CPP - 6.5$ .

акцелерация. То води до по-висок краен ръст и настъпване на по-ранно съзряване в следващите поколения.

## 2. Нисък ръст

За нисък ръст се счита всеки, който се отклонява с повече от  $-2$  SD от средната стойност или изоставането е под 3<sup>-ти</sup> перцентил от растежната крива. Честотата по дефиниция е сравнително висока – около 3% от детската популация (Rappold, 2002).

Ръстът е чувствителен индикатор за здравето на едно дете. Причините за изоставане в растежа могат да бъдат първични (засягане на растежната плака) или вторични (засягане на оста GH-IGF1); неендокринни (системни заболявания на сърдечносъдовата, дихателната, отделителната система, малнутриция, чернодробни заболявания) или ендокринни (засягане на оста GH-IGF1, хипотиреоидизъм, хипопитуитаризъм). Съществуват различни класификации на ниския ръст (приложение 1: класификация по Cowell, класификация на ESPE).

Приблизително 2 % от пациентите с нисък ръст остават с неизяснена причина за изоставането в линеарния растеж. Тази група се означава с термина „*Идиопатичен нисък ръст*” (Ranke, 1995). Касае е се за състояние, при което изоставането е не по-малко от  $-2.5$  SD и са изключени други причини за изоставане в растежа: пренатални фактори и родени с ниско тегло; костни дисплазии; хромозомни заболявания; хронични заболявания на различни системи; психични и емоционални нарушения; малнутриция, ендокринни заболявания. На табл. 1 е представена обобщена диференциалната диагноза на ниския ръст, дължащ се на конституционални варианти, идиопатични причини и ДРХ.

**Таблица 1.** Диференциална диагноза на ниския ръст

	Конституционално Изоставане (Пенева, 2003, Peneva, 85, Hindmarsh)	Фамилен нисък ръст (Solans, 92, Пенева, 2003)	Идиопатичен нисък ръст (Ranke, 95, Wit, 99)	ДРХ (Ranke, 2011)
Честота (% от децата с нисък ръст)	3.4	23.1	2	
Тегло/дължина при раждането	норма	норма	норма	норма
Степен на изоставане в растежа (SDS)	до -2	до -2	>-2.5	>-2.5
Растежна скорост	0-0.8 SDS	0-0.8 SDS	под 2.5 SDS	под 3cm/год
КВ	под 2-2.5 год от календарната	Съответства на календарната	изостава	под 3 год от календарната
Стимулиран отговор на РХ	над 10 ng/ml	над 10 ng/ml	>7.5-10 ng/ml >15-20 IU/ml	Частичен – 7.5-10 ng/ml Тежък – 3-7.5 ng/ml Абсолютен - <3 ng/ml
Пубертет	късен	норма	късен	ИДРХ – норма МТД - късен
Краен ръст	3-5 cm под CPP -1SDS под ПР	До 2.1 cm под CPP, (Hindmarsh, 99)	Нисък спрямо таргетния	Нисък спрямо таргетния
Фамилност	+	+	+/-	+/-
Вероятен механизъм	Преходен ХХ, съчетан с частичен ДРХ (Hounich, 98)	Периферна нечувствителност към РХ (Bellone, 2002), биологично неактивен РХ (Thomson, 1992)	Нарушена регулация на секреция на РХ	Липса/намалена на синтеза и секрецията на РХ

Последните данни за честотата и разпределението на ниския ръст в отделни групи в България са обобщени в докторската дисертация на Л. Пенева, защитена през 1984г (Пенева, 1984).

1. Честота: 6.82 / 100 000 - 1: 19 000 новородени;
2. Клинична характеристика: обособяване на 4 групи въз основа на:
  - a) причинните фактори
    - **“идиопатичен” хипосоматотропизъм: 62.9% от изследваните деца**
      - от тях 67% са с перинатални рискови фактори, като 50% от тях са със седалищно раждане
      - с органични проблеми: 18.6%
      - **фамилен: 14.3%**
      - други: 4.3%
  - b) хормоналния дефицит
    - **мултихормонален: 73%; момчета: момичета 2:1**
    - изолиран: 26.5% ; момчета: момичета 1:1 (Л. Пенева, 1984)

Анализът на тези данни обективизира преобладаване на „идиопатичните форми”, с множествен тропен дефицит над 70% и по-често засягане на мъжкия пол.

След 30 години интензивни проучвания, относителният дял на т.н. идиопатични форми е намалял драматично. Причината се крие в неимоверно нарастналите възможности за поставяне на етиологична диагноза, т.е. в разкриването на съответния генетичен дефект и неговото въздействие върху функцията на протеини, регулиращи диференциацията на определени хипофизарни клетъчни линии (МТД) или на соматотропен хормон и IGF1 (ИДРХ, респ. нечувствителност към ендогенния РХ). В последните години се прибавят и нарушенията в трансдукцията на хормоналния сигнал (Brook, 2005). Ранната етиологична диагноза е предпоставка за оптимално лечение и подобряване продължителността и качеството на живот на тези пациенти. Трябва да се подчертае, че всеки един пациент с вроден хипосоматотропизъм представлява уникален естествен модел за проучване на сложните процеси, лежащи в основата на ембриогенезата на хипоталамо-хипофизарната единица.

### 3. Множествен тропен дефицит

**Множественият тропен дефицит (МТД)**, или хипопитуитаризъм, се характеризира с дефицит или липсата на два или повече хипофизарни хормона. Честотата на хипосоматотропизма е от 1:4000 (Woods, 2005) до 1:8000 (Halás, 2006) новородени.

Хипопитуитаризмът може да бъде вроден или придобит. Придобитата форма на заболяването се дължи на травма, неоплазма, възпаление, автоимунно заболяване. При вродената форма, най-често първо се манифестира дефицитът на РХ (Kelberman, 2009; Pfaeffle, 2011), или в съчетание с дефицит на TSH. При вродената форма на заболяването често се наблюдава фамилност.

Признаци на заболяването могат да бъдат наблюдавани още при раждането. Някои автори смятат, че сред пациентите с хипосоматотропизъм има по-висока честота на седалищно предлежание и асфиксия по време на раждането (Пенева, 84). В зависимост от причината и тежестта на дефицита, пациентите може да са с нормално тегло и дължина на раждане (мутация в *PROPI*, *POUIF1* и др.) или МГВ (напр. IGF1, с-м на Laron (Йотова, 2012)). Симптоми, които насочват към диагнозата са пролонгиран иктер, директна хипербилирубинемия, епизоди на хипогликемия, крипторхизъм и/или микропенис при момчетата.

Изоставането в растежа при хипосоматотропизъм се забелязва от родителите най-често след 3-4 годишна възраст. Това не изключва начало на изоставането още в кърмаческа възраст. Има корелация между степента на изоставането и календарната възраст. Обикновено SDS на ръста надхвърля -2; линейният ръст е несъответно нисък спрямо СРР, растежната скорост намалява, настъпва децелерация и се сменя растежният канал към по-нисък. Фактори, които влияят на несъответствието между КВ и хронологичната възраст са възраст при поставяне на диагноза, степен на количествен ДРХ, наличието на съпътстващ тропен дефицит, най-често централен хипотиреоидизъм. На табл. 2 е представена обобщена информация относно най-честите симптоми в зависимост от фактора «възраст».

**Таблица 2.** Клинична изява на хипопитуитаризъм в зависимост от възрастта (по Romero, 2009)

Възраст	Признаци
<i>Новородено/кърмаче</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Хипогликемия</li> <li>• Микропенис</li> <li>• Конюгирана хипербилирубинемия</li> <li>• Адренална криза /електролитни отклонения</li> <li>• Неврологични отклонения /вкл. СОД, холопрозенцефалия</li> <li>• Дефекти на срединната линия /цепки/</li> <li>• Невиреене</li> </ul>
<i>Дете/юноша</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Намалена скорост на растеж/нисък ръст</li> <li>• Забавен пубертет/липса на спонтанно отключване</li> <li>• Централно/трупно затлъстяване</li> <li>• Изпъкнало чело</li> <li>• Забавена дентиция</li> <li>• Умора/загуба на апетит</li> </ul>

Лабораторните и хормонални изследвания, необходими за изключване на заболявания с нисък ръст и верифициране на диагнозата хипосоматотропизъм са синтезирани в табл. 3.

**Таблица 3.** Лабораторните и хормонални изследвания (по Pedicelli, 2009)

Лабораторен тест	Интерпретация
<b>Кръвни изследвания</b>	
Hemoglobin	Хронична анемия
Creatinin, albumin, Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> , Ca <sup>2+</sup> , P <sup>3-</sup> , alkaline phosphatase	Бъбречно заболяване, рахит, малабсорбция
IgA anti-endomysium, IgA anti-transglutaminase, total IgA	Глутинова ентеропатия
fT4, TSH	Хипотиреоидизъм
FSH, кариотип	Синдром на Турнер при момичета
IGF1, IGF1-BP3	Първи скрининг за ДРХ или резистентност към РХ
КАС (0-2 години)	Ренална тубулна ацидоза
<b>Урина</b>	
pH, белтък, глюкоза, кръв	Бъбречни заболявания

За анализирането на размера и структурата на хипофизата и срединните мозъчни структури, през последните години се е наложил ЯМР на хипоталамо-хипофизарна област. Интерес представляват положението, размерът и структурата на аденохипофизата, неврохипофизата, инфундибулума, sella turcica, hiasma opticum, corpus callosum, hippocampus.

Етиологията и протичането могат да бъдат различни (Nesi-Franca, 2009). Именно поради това, през последните години се изтъква хетерогеността на „синдрома хипопитуитаризъм“ (Стоева, 2005; Voutetakis, 2004). Най-често вроденият хипопитуитаризъм се дължи на дефекти в развитието на хипофизата, предизвикани от мутации в гени, кодиращи ТФ, които регулират нейната органогенеза, пролиферацията на различните клетъчни линии и тяхната диференциация (Стоева, 2004, Turton, 2005; Wu, 98).

Спектърът на фенотипната проява на тези мутации е много широк и непрекъснато се разширява със съобщения за нови фенотипни характеристики при пациенти с доказани мутации във вече познати гени. При промяна в ТФ, които се включват на по-късен етап от ембриогенезата (като *PROPI*, *POUIF1*), обикновено се засяга изолирано хипофизата – нейният размер, архитектоника, хормонална продукция (Bach, 2009). От друга страна мутации в ранните ТФ (*HESX1*, *SOX2*, *SOX3*, *LHX3/4* и др.) предизвикват комплексен фенотип с наличие на екстрапитуитарни аномалии като дефекти в развитието на мозъчни структури, септо-оптична дисплазия, ограничена подвижност на врата, аномалии на слуховия и зрителния анализатор и/или хранопровода, урогениталната система (Bakrania, 2007, Carvalho, 2003, Netchine, 2000, Sajdi, 2008, Taira, 2003).

Настоящият обзор цели да предостави съвременна информация за ембриогенезата на хипофизата, значението на различните хипофизарни транскрипционни фактори, най-честите мутации и фенотипните характеристики на пациентите, диагностични възможности и някои резултати от наши проучвания.

## II. ЕМБРИОЛОГИЯ

### 1. Основни принципи на ембриогенезата

През последните десетилетия, с въвеждането на много нови технологии бяха разкрити голяма част от молекулните механизми, както за нормалното, така и за патологичното ембрионално развитие. Едно от най-важните открития в областта на ембриологията

бе консерватизмът на гените, управляващи развитието. Тези консервативни гени се срещат във видове вариращи от *Drosophila* до човека. Сега вече е известно, че един и същи ген може да бъде активен в различни периоди на развитието и в различни органи. Освен това определени гени могат да бъдат експресирани както преди, така и след раждането, и да участват в нормални и патологични процеси.

Основните процеси, протичащи по време на ембриогенезата са пролиферация, миграция, клетъчно диференциране и апоптоза.

От функционална гледна точка, молекулите, които регулират ембрионалното развитие се делят на сигнални молекули и транскрипционни фактори.

*Сигналните молекули* напускат продуциращата ги клетка и оказват влияние както върху съседни (паракринно действие) или отдалечени клетки (ендокринно действие), така и върху самите себе си (автокринно действие). Те се свързват със специфични повърхностни клетъчни рецептори, отключват серия от реакции, предават сигналите до ядрото на прицелната клетка и така променят активността на клетъчните гени. Резултатът е променено развитие на съответната клетка. Пример за две големи семейства от сигналните молекули са transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) и fibroblast growth factor (FGF).

*Транскрипционните фактори (ТФ)* действат автокринно. Те притежават домейн, свързващ се със специфичен ДНК-участък, промотор или усилвател (enhancer) на определен ген. Притежават и домейн, който взаимодейства с РНК-полимераза II или други ТФ. По този начин се променя транскрипционната активност на гена. Някои ТФ се откриват във всички клетки на тялото. Други са специфични за определени клетъчни линии и етапи на развитие.

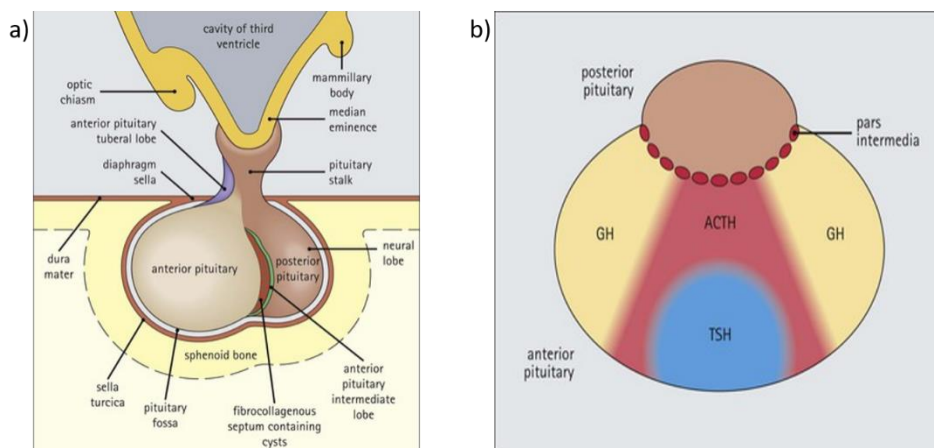
## **2. Кратка анатомия на хипофизата**

Хипофизата е разположена в хипофизарната ямка на sella turcica. Жлезата се състои от две части, различаващи се по топография, произход и функции: преден дял или аденохипофиза и заден дял или неврохипофиза. Към аденохипофизата принадлежат три части (фиг. 2a). Първата е pars distalis, която представлява около 75% от тялото на жлезата. В нея се намират пет хормон-продуциращи клетъчни линии: соматотрофи (STH); лактотрофи (PRL), тиреотрофи (TSH), гонадотрофи (FSH и LH), кортикотрофи (ACTH) (фиг. 2b). При хора, за разлика от мишките, интермедиерният лоб почти

напълно изчезва по време на ембриогенезата. Остава рудиментарно образувание, наречено *pars intermedia*. Тази част се състои от тънка клетъчна пластинка, прилепена плътно до неврохипофизата, и е съставена от меланоцити. Механизмът, отговорен за тази разлика между видовете е все още неизвестен. Третата част на аденохипофизата е *pars tuberalis* и представлява тънък клетъчен слой в предната част на *tuber cinereum*. Задният лоб на хипофизата се състои от терминални аксонални разклонения на магноцелуларните неврони от паравентрикуларното и супраоптичното ядро на хипоталамуса, както и от специализирана астроглия, обграждаща аксоналните разклонения. Магноцелуларните неврони синтезират окситоцин и аргинин вазопресин (антидиуретичен хормон). Тези пептидни хормони се транспортират до крайните аксонални разклонения в задния лоб на хипофизата чрез аксонален транспорт. Хипоталамичните освобождаващи и инхибиращи хормони се пренасят до аденохипофизата чрез хипофизарна портална система. Те регулират синтеза и освобождаването на хормони от различните клетъчни линии. Нервните връзки и кръвоносните съдове преминават през структура, наречена инфундибулум, която свързва анатомично хипоталамуса и хипофизата, и опосредства пренасянето на информация между тях (Келберманн, 2009, Учебник Анатомия, 2008).

Устройството на хипофизата, както и разпределението на клетъчните линии са представени във фиг. 2.

**Фигура 2.** Устройство на хипофизата и разпределение на хипофизарните клетъчни линии. а) Устройство на хипофизата б) разпределение на хипофизарните клетъчни линии  
<https://basicmedicalkey.com/endocrine-system-3/>

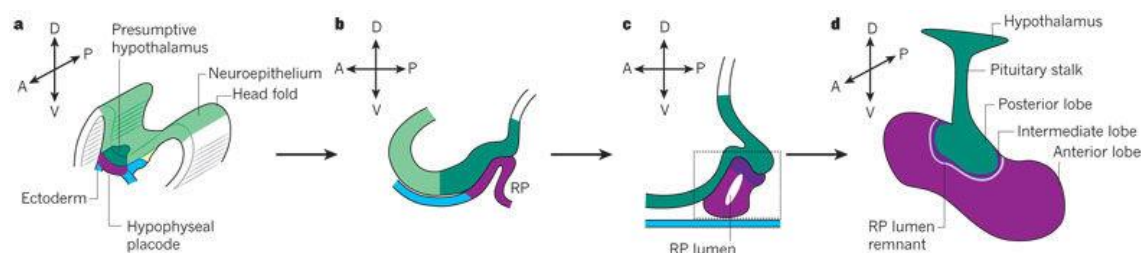


### 3. Ембриология на хипофизата

Изследвания върху ембриогенезата на хипофизната жлеза са правени при различни видове животни. Общите принципи на органо-, морфогенеза и молекулярни механизми, участващи в развитието на хипофизата са валидни за всички гръбначни животни (Kawamura, 2002; Kouki, 1991; Pogoda, 2007). Най-добре проучени са тези процеси при мишки. Те са сходни с тези при човека (Kelbermann, 2007). Поради това настоящият обзор разглежда органогенезата на хипофизата при мишки.

Хипофизата е орган с двоен ембрионален произход. Предният и интермедиерният дялове произхождат от така наречената хипофизарна плака в оралната ектодерма. Задният дял, обаче, произхожда от невроектодермата. (Zhu 2007, Sorson, 96) Този процес е представен във фиг. 3 по-долу.

**Фигура 3.** Ембрионален произход на хипофизата (Rizzoti, 2011)



Първи белег от развитието на хипофизата е задебеление на срединната линия на предния неврален хребет, т.нар. хипофизарна плака, която се появява около ембрионален ден 7.5 (E7.5) (Sorson, 1996). Тя взаимодейства с бъдещия хипоталамус, разположен в непосредствена близост зад нея. През следващите 24 часа, при нарастването и затварянето на предната неврална тръба, хипофизарната плака се измества във вентрална посока в ектодермата на тавана на бъдещата устна кухина (Kelberman, 2007). При нарушение в този етап от ембриогенезата на хипофизата (например мутация в ранните ТФ), е налице хипопитуитаризъм, придружен от дефекти по срединната линия (хипоплазия на очни нерви, хипоплазия/агенезия на corpus callosum, septum pellucidum, цепка на устната и небцето и др.). Фенотипът е комплексен.

Същинското развитие на аденохипофизата започва около E9, когато хипофизарната плака инвагинира към вентралния диенцефалон и формира зачатъка на джоба на Rathke (Kelberman, 2007). Почти едновременно, ограничена част от вентралния диенцефалон, намираща се над джоба на Rathke, евагинира и образува инфундибулум,

от който по-нататък се развива неврохипофизата. Същинската хипофизна жлеза е резултат от сливането джоба на Rathke и инфундибулума. Доказано е, че взаимодействието между тези тъкани е от изключително значение за по-нататъшното правилно развитие на хипофизната жлеза. Това е така, тъй като от инфундибулума се секретират сигнални молекули, които стимулират синтеза на различни хипофизарни ТФ. До E10.5 джобът на Rathke се развива напълно, а до E12.5 се отделя от подлежащата орална ектодерма (Rizzoti, 2005). Луменът в джоба на Rathke персистира като цепка, разделяща предния и интермедиерния лоб (фиг. 3). В перилуменалната зона на развития джоб на Rathke се намира пролиферативна зона, съставена от прогениторни клетки. Миграцията им е съпроводена с диференцирането в специфични хормон-продуциращи клетки (Sarson, 1996).

Най-ранният белег на диференциация в предния дял на хипофизата е експресията на *Sga* гена, който кодира  $\alpha$ -гликопротеиновата субединица ( $\alpha$ -GSU). Това се забелязва в малка група от клетки във вентралната част на джоба на Rathke около E11.5. Тези  $\alpha$ -GSU-позитивни клетки експресират и *Islet-1 (Isl1)* гена, специфичен за бъдещите тиреотрофи. Тяхната диференциация започва след началото на експресията на *Tshb*, около E12.5. Тази ранна популация от тиреотрофи, обаче, има кратък живот и изчезва след раждането. Диференцирани тиреотрофи се наблюдават през E14.5 в ограничен брой клетки в предния дял на хипофизата (Simmons, 1990; Kelberman, 2007).

През E12.5 ден започва и диференциацията на кортикотрофите в регион, намиращ се непосредствено зад тиреотрофите (фиг. 2b). Кортикотрофите произвеждат проопиомеланокортин (ПОМС). С по-нататъшното развитие *Pomc*-експресиращи клетки започват да се откриват в интермедиерния лоб, като постепенно се увеличава експресията му в меланотрофите (Lemonis, 2001; Kelberman, 2007).

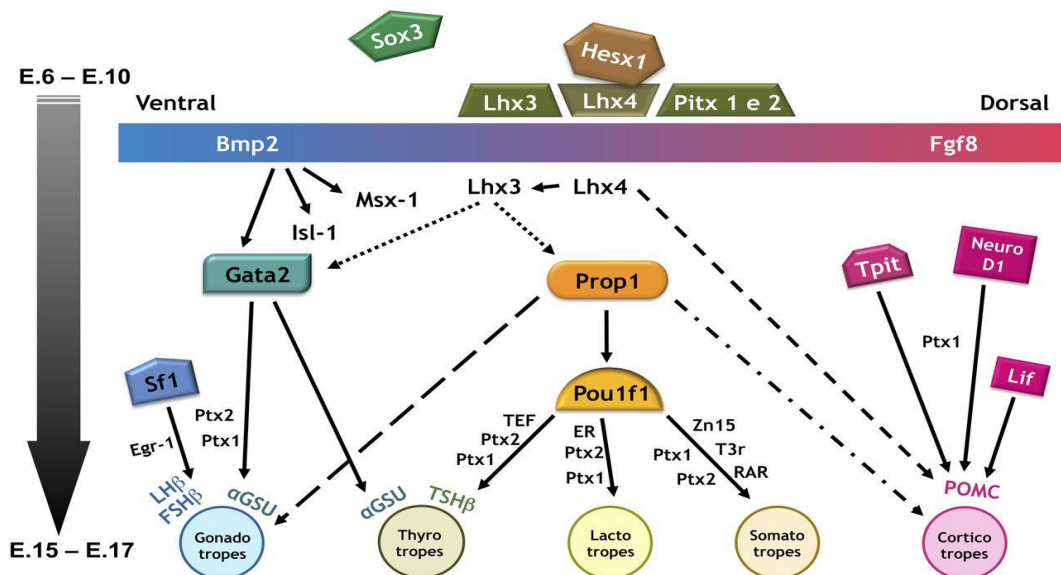
Експресията на *Gh* и *Prl* гени през E15.5 отбелязва началото на диференциацията на соматотрофите и лактотрофите. Броят на соматотрофите се увеличава значително и те се разпростират в централната и латералната повърхност на предния лоб. Лактотрофите остават локализирани в ограничена срединна зона, до вентралната повърхност на интермедиерния лоб (Kelberman, 2007).

Най-късно започва диференциацията на гонадотрофите, с експресията на *Lhb* ген през E16.5, последвана от експресията на *Fshb* ген един ден по-късно в най-предно-вентралната част на аденохипофизата (Kelberman, 2007).

Тези процеси на ембрионално развитие на жлезата и диференциация на хормон-продуциращите клетки се координират от множество сигнални молекули и ТФ, синтезирани от вентралния диенцефалон, оралната ектодерма и джоба на Rathke, в строго определен пространствен и времеви период (порядък). Сигналните молекули създават концентрационни градиенти, като стимулират или инхибират таргетни гени – ТФ, участващи в детерминацията, диференциацията и миграцията на хипофизарните клетъчни линии. Началният тласък на развитието на хипофизната жлеза зависи от капацитета (възможността) на оралната ектодерма да отговори на индуктивните сигнали на вентралния диенцефалон (Laurie, 2002).

Според Treier et al. в развитието на хипофизата се различават три фази. Първата фаза е свързана със синтеза на сигнални молекули от вентралния диенцефалон, които индуцират формирането на джоба на Rathke. Тук основна роля играе BMP4. Втората фаза се състои в детерминация на различните клетъчни линии и загубата на зависимостта от стимулите на вентралния диенцефалон. Основно значение имат BMP2, FGF8, FGF10, WNT4, чиито таргетни гени са ТФ, регулиращи диференциацията и миграцията на хипофизарните клетъчни линии. Третата фаза е терминална диференциация на хормон-продуциращи клетки, под контрола на ТФ (Treier, 1998).

**Фигура 4.** Регулация на ембрионалното развитие на хипофизата (Morales, 2013)



### ***3.1. Сигнални молекули, които регулират формирането на джоба на Rathke и детерминацията на хипофизарните клетъчни линии***

Сигналните молекули, участващи във формирането на джоба на Rathke и детерминацията на хормон-продуциращите клетки (първа и втора фаза от ембриогенезата на хипофизата) регулират развитието и на много други тъкани и органи. Такива са Shh, както и различни членове на семействата FGF, BMP, Notch Wnt (Dessaud, 2010, Zhu, 2007).

#### ***3.1.1. Sonic Hedgehog (Shh)***

Shh играе важна роля в развитието на ембриона, контрола на пролиферацията и детерминацията на различни клетъчни типове (Treier, 2001). Има ключово значение за развитието на вентралната нервна тръба, хипоталамуса, очните мехурчета, хипофиза (Zhu, 2007), което определя и фенотипа при нарушения в експресията му.

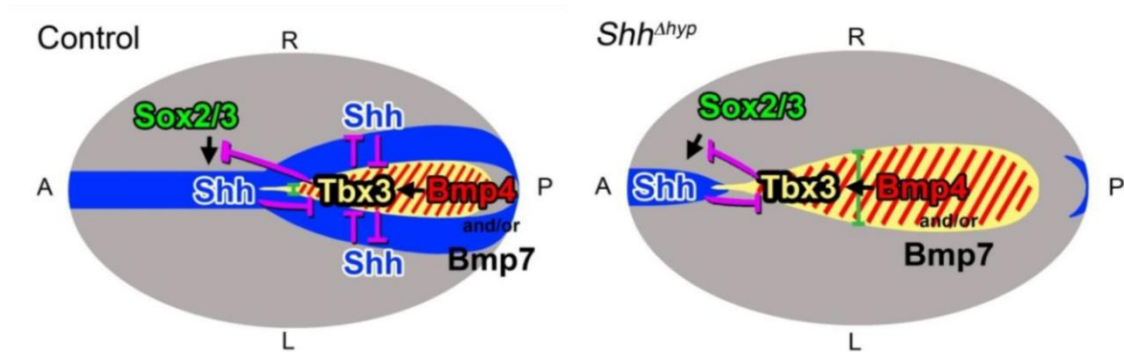
Shh се залавя за трансмембранен рецептор Patched1 (Ptc1), който активира друг трансмембранен протеин smoothed (Smo), премества в цитоплазмата и регулира ТФ Gli: Gli1, -2 и -3. Техните таргетни гени са ТФ, които регулират експресионния профил и идентичността на прогениторите. Създава се концентрационен градиент като нивото на Shh намалява от вентрална към дорзална посока (Zevallos, 2011). Във вентралните части на предния мозък, се експресират предимно Gli1 и Gli2 (Zia Choudhry, 2014). В дорзалните части на невралната тръба Ptc1 не активира Smo, Gli2 и Gli3 се подлагат на частично разрушаване, образуват се скъсените репресорни форми Gli2R и Gli3R, които инхибират експресията на Shh (Persson, 2002).

Важен източник на Shh е прехордалната плака. Експресията му продължава само около 24 часа – от E7.5 до E8.5, когато трябва да бъдат изпълнени следните три събития в надлежащия невроепител: 1. бифуркация на теленцефалните мехурчета; 2. индукция на развитието на хипоталамуса и 3. формиране на билатерални очни мехурчета (Zevallos, 2011).

Вторичен източник на Shh е хипоталамусът (Dale 1997, Ohyama, 2005). Посредством Nkx2.1, Shh стимулира експресията на Vmp4 и Fgf8, -10 във вентралния хипоталамус, критични за развитието на хипофизата и детерминацията на клетъчните линии. От своя страна, Vmp4 активира Tbx2, който инхибира Shh (Manning, 2006). Така около E9.5, Shh във вентралния мозък е подтиснат от срединната линия на каудалния хипоталамус като се формират две странични линии. По този начин експресията на Shh в

хипоталамуса е ограничена в каудалната част на вентралния хипоталамус (фиг. 3) (Ohyama, 2008).

**Фигура 5.** Антагонизъм между Shh и Bmp сигналните молекули, които медираат развитието на вентралния диенцефалон (Zevallos, 2011).



Shh се експресира не само в хипоталамуса, но и по цялото протежение на оралната ектодерма, освен в хипофизарната плака или джоба на Rathke. Shh стимулира експресията на Bmp2 в джоба на Rathke, като създава рязка граница с ограждащата го орална ектодерма. (Treier, 2001).

Аблация на прехордалната плака при миши модели предизвиква алобарна холопрозенцефалия (HPE). Този тежък дефект по срединната линия включва липса на разделяне на мозъчните полукълба, очи, назални плаки и други кранио-фациални структури. Мутации в Shh при хора имат подобен фенотип (Solomon, 2010). Делеция на *Shh* гена предизвикват холопрозенцефалия, септо-оптична дисплазия, липса на джоб на Rathke. Мутации в ТФ Gli2, който се експресира във вентралния диенцефалон и джоба на Rathke, води до различна степен на хипопитуитаризъм, а делеция на *Gli1* и *Gli2* гените води до пълна липса на хипофизна жлеза (Park et al., 2000; Treier et al., 2001). Ефектът на нарушена Shh сигнална трансдукция върху развитието на хипофизата, обаче, показва, че е следствие по-скоро на липса на стимулиращи сигнали от хипоталамуса, отколкото на дефект в самата хипофиза (Wang, 2010). Свръхекспресията на Shh предизвиква лека хиперплазия и експанзия на вентралните тирео- и гонадотрофи.

### 3.1.2. BMP

От изключително значение за ембриогенезата на хипоталамуса и предния дял на хипофизата са Bmp4 и Bmp2 (Laurie, 2002; Zhu, 2007).

Експресията на Bmp4 започва между E7.75 и 8.75 и през E11.5 затихва. Bmp4 от вентралния диенцефалон индуцира инвагинацията на джоба на Rathke от оралната

ектодерма около E9-E9.5 (Takuma, 1998). По това време ТФ от семейството LIM – Isl1 се експресира във всички клетки на джоба на Rathke. По-късно, около E11.5 заедно с Vmp4, експресията на Isl1 намалява и се ограничава в най-вентралната част на джоба на Rathke. По-нататък експресията на Isl1 се поддържа от Vmp2, който стимулира и  $\alpha$ GSU и детерминира клетките като тиреотрофи (Ericson, 98). Вече е известно, че секретираниите от вентралния хипоталамус Vmp4 и Fgf8 стимулират експресията на Lhx3 в джоба на Rathke (Treier, 98).

Установяването на вентрална молекулна граница между Shh-експресиращ и -неекспресиращ домейн в орална ектодерма създава функционален център, който отключва секрецията на Vmp2 в джоба на Rathke (Treier, 98). Той се експресира от E10.5 във вентралната част на джоба на Rathke, а до E13.5-14 експресията му започва да затихва (Ericson, 98). Vmp2 контролира детерминацията на вентралните клетъчни типове, като увеличава експресията на  $\alpha$ -GSU и Isl1, характерни за тиреотрофите и гонадотрофите, и инхибира експресията на АСТН. Вентро-дорзалният градиент на Vmp2 и дорзо-вентралният градиент на Fgf8 създават съответни противоположни градиенти на експресията на ТФ, отговорни за терминалната диференциация на питуитарните клетъчни линии (Ericson, 98; Treier, 98; Zhu, 2007; Zoller, 2011).

Забележително е, че докато Vmp2 е есенциален фактор за първоначалната детерминация на клетъчните линии, затихването на експресията му е необходимо за крайната диференциация на хормон-продуциращите клетки. По-продължителната експресия на Vmp2 води до липса на  $\alpha$ GSU, TSH $\beta$ , P $\chi$  и пролактин, докато АСТН-продуциращите клетки са незасегнати (Treier, 98). Въпреки известната хиперпластичност на жлезата, маркерите за начална детерминация Pou1f1, Isl1, GATA-2 са на лице. Наред с тях, експресията на Msx1 също се увеличава под влияние на Vmp2. Msx1 е potentен инхибитор на диференциацията и Treier смята, че това е най-вероятният механизъм за наблюдавания фенотип (Treier, 98).

### 3.1.3. FGFs

Различни членове на семейството на FGF играят основна роля в ембриогенезата и клетъчната диференциация в целия организъм, включително и на аденохипофизата (Zhu, 2007). До сега са известни поне три члена на това семейство – FGF8, -10 и -18, които се откриват първоначално във вентралния диенцефалон, а по-късно и в задния лоб на хипофизата (Maruoka, 98; Xu, 2000).

Fgf10 играе основна роля в клетъчното оцеляване. При мишки, загубата на Fgf10 или неговия рецептор FGF2IIIb води до бърза и ексцесивна апоптоза на формиращия джоб на Rathke и агенезия на аденохипофизата до E14.5 (Zhu, 2007).

Експресията на Fgf8 започва около E9.5 в дорзалния хипоталамус (Treier, 98; Ericson, 98). Той потиска Wnt4/2-индуцирания Isl1, който по това време се експресира във всички клетки на джоба на Rathke и постепенно, до E11.5 се ограничава в най-вентралната част, където се експресира и  $\alpha$ -GSU. След E11.5 тези клетки стават рефрактерни на инхибиращите сигнали на Fgf8 и се развиват като тиреотрофи (Ericson, 98).

Друга роля на Fgf8 е инициацията на експресията на Lhx3, първоначално в дорзалната част на джоба на Rathke, а по-късно, около E10.5-11.5 по цялото му протежение. До E12.5 се оформя дорзо-вентрален концентрационен градиент. Fgf8 стимулира диференциацията на кортикотрофи в интермедиерния домейн на джоба на Rathke, дорзално от тиреотрофите (Treier, 98; Ericson, 98). За сметка на това, в дорзалната част развитието на кортикотрофите е потиснато и клетките не излизат от клетъчния си цикъл. Fgf8 играе основна роля и в поддържането на пула от прогениторни клетки в дорзалната част на джоба на Rathke (Treier, 98).

Свърхекспресия на Fgf8 води до ектопична индукция на Lhx3 с хиперплазия на хипофизата и драматична експанзия на POMC-продуциращи клетки, като същевременно развитието на останалите клетъчни линии е потиснато. Обратно, липса на Fgf8 се проявява с пълна агенезия на хипофизата поради невъзможността да се индуцира експресията на Lhx3 и Lhx4 (Treier, 98, 2001). Подобно на Fgf10, първоначалната инвагинация на оралната ектодерма в джоб на Rathke претърпява бърза и ексцесивна апоптоза (Ohuchi, 2000).

Така сигналните молекули от Wnt- и Fgf- семействата определят времево и пространствено развитието на ранните тиреотрофи, дорзално разположените кортикотрофи, както и на останалите клетъчни линии. Същевременно Fgfs сигналните молекули поддържат пролиферацията на прогениторните клетки.

#### 3.1.4. *Notch* сигнални молекули

Сигналната каскада Notch е еволюционно консервативен механизъм, който участва в регулацията на пролиферацията, апоптозата и клетъчната детерминация (Zhu, 2007). В тази каскада участват различни Notch рецептори (Notch 1, -2, -3 и -4) и лиганди (Delta-

like1, -2, -3, -4 и Jagged1, -2), които са трансмембранны протеини и взаимодействат помежду си. Интрацелуларният домейн на рецептора се отделя и пренася в ядрото, формира се комплекс с Rbp-J свързващ протеин и се индуцира транскрипцията на таргетни гени като Hes1 и Hes5 (Hairy enhancer of split family) (Reaztman, 2004, 2006, Zhu, 2006).

В ранните фази на органогенеза на хипофизата участват рецепторите Notch2 и Notch3, техните лиганди Dll1 и Jag1, както и таргетните гени Hes1 и Hey1. Експресията им започва около E9.5 в инвагиниращата орална ектодерма и по-късно във всички клетки на джоба на Rathke. Изключение прави Hes1, който се ограничава във вентралния регион (Zhu, 2007). До E13.5, обаче, експресията им се ограничава в перилуменалната зона, а тази на Jag1 – само до мезенхимните клетки, ограждащи джоба на Rathke. Това затихване на активността на Notch-каскадата е в съответствие с инхибиращата ѝ роля в регулацията на крайната диференциация, както и с поддържането на пролиферацията (Zhu, 2006).

Липсата на активност на Notch каскадата (Rbp-J<sup>-/-</sup> мишки; Hes<sup>-/-</sup> мишки) в развиващата се хипофиза води до спиране на пролиферацията, като такава се наблюдава само в перилуменалната зона. До E12.5 вентрално разположените прогенитори излизат от клетъчния си цикъл и се диференцират като кортикотрофи (Reaztman, 2004, 2006).

През E13.5 започва експресията на *Pou1f1* и диференциацията на контролираните от него клетъчни линии (соматотрофи, лакотрофи и тиреотрофи). При Rbp-J<sup>-/-</sup> мишки *Pou1f1*-линиите не се развиват, а преминават в кортикотрофи. Гонадотрофите не са значимо засегнати (Zhu, 2007). При Hes<sup>-/-</sup> мишки не се наблюдава подобен фенотип. Това най-вероятно се дължи на значителното потискане на *Prop1* през E12.5, когато нормално се наблюдава пик в секрецията му. Rbp-J се свързва с еволюционно консервативна нуклеотидна последователност в интрон 1 на гена, кодиращ *Prop1*. Началната експресия на *Prop1* през E11.5, когато нивата му са все още ниски, е незасегната. Това говори, че Notch каскадата регулира транскрипцията на *Prop1* и поддържа високи нива на експресия, но не я инициира (Zhu, 2007).

В по-късните фази на питуитарното развитие активността на Notch каскадата се понижава значително и това е от основно значение за крайната диференциация на различните клетъчни линии. Свр̀хекспресия на постоянно активна форма на рецептора Notch1 води до пълен блок в диференциацията на Pou1f1-зависимите

линии. Подобно, свръхекспресия на постоянно активна форма на Notch2 в гонадо- и тиреотрофите води до дефект в тяхната диференциация (Zhu, 2006).

Notch каскадата е необходима за възникването на различните прогениторни пулове, а съотношението на концентрация и продължителност на експозиция играят ключова роля в детермирането на хипофизарните клетъчни линии.

### 3.1.5. *Wnts*

Групата на Wnt сигналните пътища се състои от три сигнални пътя: Wnt-класически, -некласически planar cell polarity, и -некласически Wnt/Ca<sup>2+</sup> път. Всеки един се активира след захващане на лиганд за рецептор от семейството Frizzled, който предава сигнала на вътреклетъчен протеин Dishevelled (Willert, 2012). Активирането на класическия Wnt/ $\beta$ -catenin път води до стабилизиране на нивата на  $\beta$ -catenin в клетката, което позволява транслокацията му в ядрото. Той е ко-активатор на семейство от ТФ Lef/Tcf като премахва хистондеацетилаза (HDAC) и TLE корепресорните комплекси. (Zhu, 2007). По време на ембрионалното развитие на хипофизата класическият Wnt/ $\beta$ -catenin път е активен от E11.5 до E15.5.  $\beta$ -catenin взаимодейства директно с Prop1. Комплексът Prop1/ $\beta$ -catenin от една страна действа като ранен енхансер на *Pou1f1* гена, а от друга – като транскрипционен репресор на *Hesx1*. Времевият контрол на комплекса Wnt/ $\beta$ -catenin е от изключително значение за правилното развитие на хипофизата. Преждевременната индукция на  $\beta$ -catenin води до инхибиция на *Hesx1* и агенезия на хипофизата до E13.5 (Osion, 2006), липсата на Wnt/ $\beta$ -catenin води до хипоплазия на жлезата и липса на експресия на Pou1f1-зависимите клетъчни линии, както и намален брой гонадотропи (DiMattia, 97).

Wnt5a се експресира във вентралния диенцефалон и инфундибулума от E9.5, докато Wnt4 се експресира в джоба на Rathke до около E14.5 (Treier, 98). При Wnt<sup>-/-</sup> мишки се наблюдава хипоплазия на аденохипофизата с намален брой сомато-, тирео- и гонадотрофи, но не и кортикотрофи. При Wnt5a<sup>-/-</sup> мишки интермедиерният лоб е уголемен, както и броят на POMC<sup>+</sup> клетки в интермедиерния и предния лоб. При липса и на двата гена се наблюдава комбиниран фенотип с хиперплазия на интермедиерния лоб, хипоплазия на предния, увеличен брой на кортикотрофите и липса на останалите клетъчни линии. Това показва, че двата фактора влияят на отделни, неприпокриващи се популации от питуитарни прекурсори. Те играят роля по-скоро в експанзията на

ендокринни клетъчни типове, а не в спецификацията на определени клетъчни линии (Zhu, 2007).

### 3.2. Транскрипционни фактори

#### 3.2.1. Ранни транскрипционни фактори

##### 3.2.1.1. SOX

Едни от най-ранните ТФ, SOX2 и SOX3, играят ключова роля в началните етапи на ембрионално развитие на хипофизата. Те са част от семейството ТФ-и SOX (SRY-related high mobility group (HMG) box), което се характеризира с наличието на висококонсервативен HMG ДНК-свързващ домейн от 79-АК, подобен на този в гена SRY (sex determining gene) (Gubbay, 1990, Denny, 92). Въз основа на хомологията си с HMG-домейна, SOX протеините се делят на 8 групи (от А до Н). SOX2 и SOX3, заедно със SOX1, образуват група SOXB1 и имат някои общи характеристики (Kelberman (2008):

- *Ранна и широка експресия* в ембрионалните стволови клетки и прогениторни клетки<sup>3</sup>. SOX2 и SOX3 играят основна роля както в поддържането на плюрипотентността, така и детерминация на клетката към неврогенеза. Вече е известно, че *Sox2* се експресира в ембрионалните стволови клетки като инициращ (първоначален) ТФ или ТФ-пионер, който установява транскрипционна компетентност за невро-диференциация на клетката. *Sox1* и *Sox3* се присъединяват към него в невропрогениторната клетка (НПК). Имат основно участие и в развитието на пола, хондрогенезата и хемопоезата (Wegner, 2011).
- *Степенно припокриване на експресията и функцията между ТФ в тази група.* Проучвания при миши модели с делетирани алели на *Sox2* и *Sox3* гените показват неочаквано лек фенотип. Това се дължи на известно припокриване на част от функциите на трите ТФ (Wegner, 2011; Hoffman, 2014).
- *Нисък афинитет на свързване с ДНК*, поради което изискват взаимодействие с ТФ-партньор. Един от най-важните партньори за *Sox2* е ТФ Oct-3/4, член на семейството на октамер свързващите протеини, притежаващи

---

<sup>3</sup> Стволови клетки – недиференцирани клетки, които могат да тръгнат по пътя на диференциация в специализирана клетка или да продължат митотично делене, увеличавайки броя си. Ембрионалните стволови клетки могат да се диференцират в плюрипотентни клетки от ектодермата, мезодермата и ендодермата. Прогениторната клетка притежава способността да се диференцира в точно определен вид клетка. За разлика от стволовите клетки, прогениторните могат да се делят ограничен брой пъти.

висококонсервативен *POU* домен от 150-160 АК. Установено е, че в регулаторните участъци на много гени, включително и самите *Sox2* и *Oct-3/4*, съществуват *HMG/POU* комплекси, съдържащи едновременно залавните места и за двата ТФ (Rizzino, 2009, Archer, 2011). По този начин те контролират както собствената си експресията (*положителна обратна връзка*), така и на цяла мрежа от гени, необходими за ембриогенезата (напр. *FGF-4*; *UTF-1*; *Nanog*) и осигуряват поддържането на плурипотентните ембрионални стволови клетки (Rizzino, 2009). Малки промени в нивата на *Sox2* или *Oct-3/4* водят до промяна в диференциацията на ембрионалните стволови клетки (Rizzino, 2009). При свръх-експресия на *Sox2* неговата транскрипционна активност в ембрионалните стволови клетки намалява (*отрицателна обратна връзка*). Заедно с това се намалява и експресията на таргетните му гени и клетката тръгва по път на диференциация. Експресията на *Sox2* в ретината и лещата на окоото се стимулира от ТФ *Six3* (Lagutin, 2003; Liu, 2006, Zhu, 2002). През последните години стана известно, че *Six3* активира *Sox2* и в развиващия се преден мозък, включително и хипоталамуса и хипофизата.

**SOX3** е първият представител на това семейство ТФ-и, асоцииран с хипопитуитаризъм при човека. Генът му се състои от един екзон с 1.3 kb и се намира на X хромозомата (Xq27). Протеинът се състои от N-терминален участък от 66 аминокиселини (АК) с неизвеснта функция, HMG ДНК-свързващ домейн от 79 АК и C-терминален участък, състоящ се от 4 полиаланинови разклонения, който играе ролята на трансакивиращ домейн (Stevanovich, 1993).

Експресията на *Sox3* започва от E6.5 по протежение на целия епибласт и в граничната зона между ембрионалните и екстраембрионалните тъкани. По-късно се ограничава до предната част на епибласта и заден домейн, непосредствено до примитивната бразда. До E9.5 се експресира предимно в невроектодермата, олфакторните плаки и оптичните мехурчета. През E11.5 *Sox3* се експресира само в мозъка, включително вентралния диенцефалон и инфундибулума, а до E13.5 само в епендимния слой, където недиференцираните прогениторни клетки все още се делят активно. При възрастните индивиди се запазва експресия на *Sox3* в субвентрикуларната и субгрануларната зона на хипокампа, клетките на Purkinje в малкия мозък и вентро-медиалния хипоталамус (Alatzoglou, 2009; Wang, 2006).

Експресията на *Sox3* в хипоталамо-хипофизарната област е изследвана от Rizzoti et al. през 2004 година. През E11.5 *Sox3* се експресира във вентралния диенцефалон и

инфундибулума, но не и в джоба на Rathke. Хистологично, при миши модел с делетиран *Sox3* ген, между E11.5 и E16.5 се наблюдават следните промени в хипоталамо-хипофизарната област:

- по-слабо изразена евагинация на инфундибулума, като бъдещият хипоталамус изглежда изтънен и скъсен;
- разширяване на диенцефалната плака, както и площта на експресия на *Vmp4* и *Fgf8*;
- удължаване и бифуркация на джоба на Rathke, като по-късно през E16.5 се наблюдават допълнителни лумени на Rathke.

Те установяват вариабилен ендокринен дефицит (дефицит на РХ, гонадоропни хормони, TSH), който корелира с телесното тегло. Фенотипът включва нисък ръст и намалена фертилност, лицев дисморфизъм. Наблюдава се хипоплазия на хипофизата с нарушена граница между преден и интермедиерен лоб; дефекти по срединната линия (дисгенезия на *corpus callosum*, хипоплазия на хипокампа и др.). Смята се, че наблюдаваният фенотип е резултат от промените в морфологията и функцията на вентралния диенцефалон и инфундибулума, включващи разширяване на площта на експресия на сигналните молекули, отговорни за инициацията на развитието на предния дял на хипофизата (Rizzoti, 2004). Подобен фенотип е описан и при мутации в *Hesx1* (Dattani, 1998), *Wnt5a* (Cha, 2004, Potok, 2008) и *Sox2* гените (Kelberman, 2006). *Sox3* оказва директно инхибиращо влияние върху експресията на *Fgf8* (Kuo, 2013). Експресията на *Sox3* се запазва постнатално в група от клетки във вентралния хипоталамус и *eminentia mediana*, структура, от която започват нервни и съдови връзки между хипоталамуса и хипофизата. Според Rizzoti нарушаването на тези връзки при липса на експресия на *Sox3* би могло да допринесе за фенотипа на хипопитуитаризъм (Rizzoti, 2004).

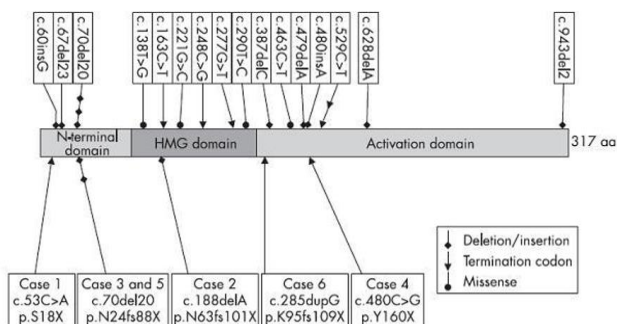
При хора са доказани както дупликации на *SOX3* гена, така и loss-of-function мутации, причинени от различно по дължина увеличаване на полиаланиновите израстъци (Hamel, 1996, Lagerstrom-Fermer, 1997, Hol, 2000, Solomon, 2002, 2004; Woods, 2005). И двата вида мутации предизвикват подобен фенотип, включващ предимно хипоплазия на инфундибулума и различно засягане на *corpus callosum*. Наблюдава се както хипоплазия на предния дял на хипофизата с вариабилен хипопитуитаризъм, така и недесцендирал/ектопичен заден дял. Класически нарушената експресия на *SOX3* гена (свърх или липса на експресия) се свързва с X-свързан хипопитуитаризъм и умствено изоставане при момчета. Събират се все повече данни за пациенти с мутация в *SOX3* гена без

интелектуално засягане (Woods, 2005). В последните години има и съобщения за пациенти от женски пол с или без умствено изоставане.

Подобният фенотип както при повишена (свръхекспресия, причинена от дупликация на *SOX3* гена), така и при загуба на функцията на протеина (удължаване на РА израстъци) говорят за дозозависим ефект на *SOX3*, който е критичен за нормалното развитие на диенцефалона и инфундибулума при хора.

*SOX2* генът се намира в дългото рамо на 3<sup>-та</sup> хромозома (3q26-3q27). Състои се от един екзон и кодира протеин от 317 аминокиселини (АК), в чиято структура влизат NH<sub>2</sub>-терминален участък с неустановена функция, ДНК-свързващ HMG-домен и активиращ транскрипцията СООН-терминален домен (фиг.6) (Kelberman, 2006).

Фигура 6. Структура на протеина SOX2 и известни мутации при хора (Bakrania, 2007)



При мишки *SOX2* се експресира силно в ембрионалните клетки на ниво морула като в следствие се ограничава във вътрешния слой клетки на бластоциста. След имплантацията *SOX2* се експресира много широко: по протежение на целия епибласт и екстраембрионална ектодерма, в мултипотентните прекурсори на всички ембрионални и трофобластни клетки. По-късно експресията на гена е силно ограничена до бъдещата предна неврална ектодерма и е представена основно в централната нервна система (ЦНС), сензорните плаки, бронхиалните дъги, стомашната и чревната ендодерма, както и в развиващия се хранопровод (Kelberman, 2006, 2008, Fantes, 2003).

През 2008 година Kelberman, D. et al. (Kelberman, 2008) за първи път са изследвали експресията на *SOX2* при хора от 4.5<sup>та</sup> до 9<sup>та</sup> гестационна седмица (г.с.). Тяхното проучване показва, че моделът на експресия на *SOX2* при човека до голяма степен съвпада с този при мишките. Експресията по протежение на ЦНС е представена през целия изследван период, основно в предния мозък (кора, невроепител на латералните

вентрикули), джоба на Rathke, предния дял на хипофизата, както и покриващите ги хипоталамус и неврална ектодерма, но не и в неврохипофизата. Силна активност на SOX2 гена се наблюдава в региона на примордиалния хипокамп, в средния и заден мозък.

SOX2 играе основна роля в невrogenезата и е необходим TF за персистирането както на невралните стволони клетки, така и на диференцираните неврони (в централната и периферната нервна система). Той превръща пролиферираща невробласт в прогениторна клетка. SOX2 е един от главните регулатори на ембриогенезата на вътрешното ухо (Peligilla, 2010), както и на ентeралната нервна система (ЕНС) (Heanue, 2010).

Доказано е, че SOX2 играе важна роля и в развитието на лещеното и очното мехурче (на мозъчната ретина и по-малко на периферните части на мехурчето), както и в очния нерв. Установена е експресия на SOX2 в епитела, покриващ носната кухина, в областта на разделяне на трахеята и хранопровода, в ембрионалните бели дробове, в стомашно-чревния тракт, както и в развиващите се мъжки и женски гонади (Kelberman, 2006).

SOX2 се експресира и в някои тъкани у възрастния човек, като играе основна роля в поддържането на прогениторните клетки в различни тъкани (Fauquier, 2008). Такива са намерени в различни части на мозъка, хипофизата, ретината, лещата, хранопровода, жлезистата част на стомаха, трахеята и бронхиалния епител (Driessens, 2011; Kelberman, 2008).

Създадени са различни миши модели с мутации в SOX2, които показват неговата значимост за развитието на ЦНС. Миши ембриони с хомозиготна делеция на двата алела на SOX2 (*SOX2<sup>-/-</sup>*) гена изглеждат незасегнати до ниво бластоцист, но умират скоро след имплантацията (Kelberman, 2006). При хетерозиготни мишки фенотипът е вариабилен в зависимост от количествената промяна в експресията на SOX2 гена. Съобщава се за повишена перинатална смъртност, изоставане в растежа и намаление на мъжката потентност, като степента на изразеност зависи от количественото намаление на SOX2 (Kelberman, 2006; Rizotti, 2004). При съчетана хетерозиготност фенотипът (изоставане в растежа, епилепсия, увеличена смъртност) е по-силно изразен. При анализ на функцията на хипофизата се установява вариабилен фенотип, засягащ размера и архитектурата на жлезата, както и значително намалени нива на хипофизарни тропни хормони: растежен, лутеинизиращ, адренкортикотропен и тиреостимулиращ хормон (Kelberman, 2006).

Досега са доказани над 40 различни мутации в гена, кодиращ *SOX2* при повече от 60 пациенти, като по-голямата част са спорадични. Унаследяват се по автосомно-доминантен начин. Най-често се касае за нуклеотидна замяна, делеция или инсерция, които причиняват изместване на рамката на четене, missense, nonsense мутации и водят до синтеза на скъсен протеин с намалена функция (Schneider, 2009). Мутациите засягат ДНК-свързващия домен и домена за активиране на транскрипцията. Според направената литературна справка не се съобщава за hot spot мутация в *SOX2* гена.

Фенотипът на пациентите с мутации в *SOX2* е изключително разнообразен, което се дължи на много ранната и широка експресия на този транскрипционен фактор (Kelberman, 2006). Хетерозиготни мутации в *SOX2* се асоциират с двустранни очни изменения, най-често анофталмия/микрофталмия. Очният фенотип може да включва и други вродени дефекти: колобома (Wang, 2008), вродена катаракта, микрокорнея, хипоплазия на ириса, нистагъм, билатерална хипоплазия/аплазия на очния нерв, рефракционни изменения. Развитието на предния дял на хипофизата може да бъде засегнато от мутации в *SOX2* гена, (Kelberman, 2006; Smith, 2000). Това се проявява фенотипно с хипоплазия или нормален размер на аденохипофизата и дефицит на един или повече тропни хормони- растежен (PX), тиреостимулиращ (TSH), лутеинизиращ (LH), фоликулостимулиращ (FSH), адренкортикотропен (ACTH). Най-честите съобщени дефицити са на PX, комбиниран с хипогонадотропен хипогонадизъм (XX) и изолиран дефицит на гонадотропни хормони. При тези пациенти се диагностицират крипторхидизъм, микропенис, намален размер на тестисите. Други фенотипни прояви на мутации в *SOX2* гена включват: намаление на слуха/глухота от нервно-сензорен тип, аномалии в хипокампуса, корпус калозум, септум пелуцидум, хамартоми в областта на хипоталамуса, поренцефална киста (Kelberman, 2006).

Съобщава се също така и за изоставане в растежа, различно по степен изоставане в развитието, спастична диплегия, атрезия на хранопровода.

Според Schneider et al. (Schneider, 2009), missense мутациите се асоциират с по-лек фенотип, от nonsense и мутациите с изместване на рамката на четене. Някои пациенти с такива мутации са с едностранна анофталмия/микрофталмия и нормално развито контралатерално око. В допълнение на това, 33% от пациентите с missense мутации имат анофталмия/микрофталмия и 33% имат по-леки изменения или нормално развитие на очите. При пациентите с друг вид мутации това съотношение е 89%

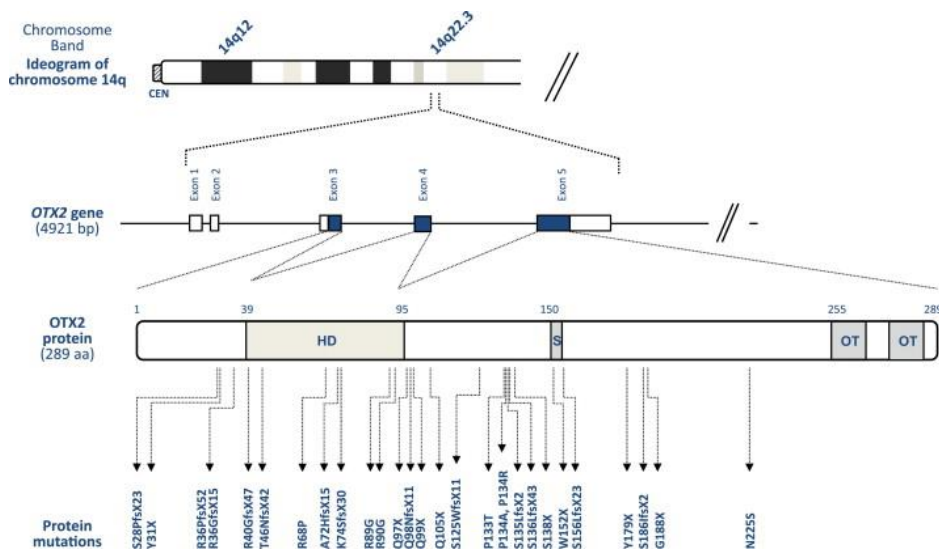
анофталмия/микрофталмия и 11% по-леки изменения или нормално развитие на очите.

Голямата фенотипна вариабилност и сравнително по-лекият фенотип, който се наблюдава при missense мутациите би могъл да бъде обяснен с ниския афинитет на захващане за ДНК и необходимостта от допълнителни фактори, които да улеснят тази взаимовръзка като увеличат афинитета и специфичността на ДНК-свързване.

### 3.2.1.2. Otx2

Otx2 е чифтен bicoid транскрипционен фактор от homeobox семейството (Simeone, 1992). Генът се намира в хромозома 14(q22.3) (Kastury, 94; Wyatt, 2008) и се състои от пет екзона, от които само три са кодиращи (Dateki, 2010). Протеинът е изграден от 297 аминокиселини и е съставен от ДНК-свързващ хомеодомейн, разположен в аминокрая, SIWSPA консервативен мотив, участващ във взаимодействието протеин-протеин, и карбокситерминален трансактивиращ домейн с два Otx тандемни мотива. Чрез алтернативно снаждане на границата на интрон 3 и екзон 4, синтезира и втора изоформа на протеина – Otx2b, състояща се от 289 АК. Тя се експресира по-силно в хипофизата, таламуса, хипоталамуса, предния, задния, средния мозък (Dateki, 2010).

**Фигура 7.** Структура на гена и протеина OTX2 и известните мутации при човек (Bebi, 2013)



Генът *Otx2* е един от най-важните за развитието на предния мозък и диенцефалона. При миши ембриони той се открива още в стадий на морула, а по-късно по протежение на целия епибласт. В по-нататъшното развитие експресията му се ограничава в предната част на ембриона (Ang, 1996, Simeone, 93), в дорзалните и по-голяма част от

вентралните участъци от развиващите се теленцефалон, диенцефалон и мезенцефалон (Boncinelli, 93). *Otx2* играе основна роля в установяването на граница между средния и задния мозък. Експресира се също и в сензорни тъкани, включващи олфакторения епител, вътрешното ухо, ретина (Acampora, 1995; Matsuo, 1995; Ang, 1996). Той е основен регулатор на развитието на фоторецепторите, както и на епифизата, като дефицит на *Otx2* води до пълна липса на пинеалоцити (Nishida, 2003; Martinez-Morales, 2003). Необходим и за правилното ембрионално развитие на предния дял на хипофизата. Той се залавя за промотора на гена *Hesx1* (Spieler, 2004), промотора на гена *Pou1f1* (Dateki, 2008), както и за проксималния промотор на *GnRH* гена в хипоталамуса (Kelly, 2000).

При мишки пълната делеция на *Otx2* гена води до смърт поради липса на предна невроектодерма, от която се развиват предния, средния и част от задния мозък (Acampora, 95). Отсъствието само на един алел се свързва с изключително вариабилен фенотип, включващ както ацефалия, хилопрозенцефалия, къс нос, ан-/микрофталмия, агнатия/микрогнатия, така и нормален фенотип (Matsuo, 1995).

Първата мутация на *Otx2* гена при хора е описана от Rieger през 2005 година. От тогава са открити още 27 мутации в този ген, унаследяващи се автосомно доминантно. По-голямата част от мутациите са nonsense или frameshift, предизвикващи появата на преждевременен стоп-кодон и синтеза на скъсен протеин с намалена трансактивираща функция. В някои случаи се открива missense мутация със синтез на протеин с нарушена функция с или без доминантно негативен ефект и инхибиране на експресията на друг ген (Diaczok, 2008). Очните изменения при *Otx2* мутациите са разнообразни и включват анофталмия/микрофталмия, хипоплазия на зрителен нерв или хиазма, колобома, ретинална дистрофия (Leber congenital amaurosis). Често срещани са агенезия на corpus callosum и други аномалии на мозъка, които водят до гърчов синдром и изоставане в НПП в различна степен. При около 30% от пациентите с *Otx2* мутация се открива аномалия в развитието на хипофизата (Beby, 2013). Наблюдава се хипоплазия на аденохипофизата, ектопична неврохипофиза, изтънен или прекъснат инфундибулум. Това води до дефицит на различни хипофизарни хормони – от ИДРХ до панхипопитуитаризъм.

### 3.2.1.3. Pitx семейство

Два представителя на PITX (Paired-like homeodomain transcription factor) семейството – Pitx1 и Pitx2, имат важна роля в контрола на ембрионалното развитие на хипофизата (Gage, 99).

*Pitx1* (pituitary homeobox 1) се намира в 5-та хромозома (5q31) и се състои от три екзона (Crowford, 97). През 1996 година Lamonerie и колеги го определят като ТФ, който активира транскрипцията на гена, кодиращ проопиомеланокортин (Lamonerie, 1996).

*Pitx2* (pituitary homeobox 2) се намира в 4-та хромозома (4q25) и се състои от 7 екзона, включително и алтернативни 4a и 4b екзони (Cox, 2002; Semina, 96). Той участва в различни аспекти на ембрионалното развитие като ляво-дясната асиметрия (Cox, 2002) и има важна роля в детерминирането и диференцирането на хипофизарните клетъчни линии.

*Pitx1* (pituitary homeobox 1) е характеризирани от Lamonerie и колеги през 1996 година като ТФ, който активира транскрипцията на гена, кодиращ проопиомеланокортин. Генът *Pitx1* се намира в 5-та хромозома (5q31) и се състои от три екзона (Crowford, 97).

*Pitx2* (pituitary homeobox 2) участва в различни аспекти на ембрионалното развитие като ляво-дясната асиметрия (Cox, 2002). Има важна роля в детерминирането и диференцирането на хипофизарните клетъчни линии. Генът *Pitx2* се намира в 4-та хромозома (4q25) и се състои от 7 екзона, включително и алтернативни 4a и 4b екзони (Cox, 2002; Semina, 96).

*Pitx1* и *Pitx2* имат почти идентични трансактивиращ корбокси-край и ДНК-свързващ хомеодомейн. Амино-терминалният участък има участие във взаимодействието протеин-протеин. Експресират се по цялото протежение на джоба на Rathke и предния дял на хипофизата, а Pitx1 и в интермедиерния лоб, по време на ембрионалното развитие и във възрастни индивиди (Gage, 99).

И двата ТФ могат да се залавят и да активират промотери на гените, кодиращи повечето хипофизарни хормони, включително  *$\alpha$ Gsu*, *Tsh $\beta$* , *Lh $\beta$* , *Fsh $\beta$* , *Gh*, *Prl*, *Pomc*, както и *GnRHR* (Tremblay, 2000).

Създадени са *Pitx1*<sup>-/-</sup> и *Pitx2*<sup>-/-</sup> миши модели, като наблюдаваният фенотип е комплексен. При *Pitx1*<sup>-/-</sup> се откриват тежки дефекти в развитието на долните крайници, цепка на устната и небцето и смърт скоро след раждането. Засягането на хипофизата при тези мутантни мишки е леко, като се наблюдава слабо намален брой на

диференцираните клетъчни линии. Липсата на *Pitx1* гена води до разширяване на зоната на експресия на *Lhx3* (Charles, 2006, Suh, 2002).

Мутации в *Pitx1* гена са описани при пациенти с различни аномалии в развитието на долните крайници (Gurnett, 2008), изолирана високостепенна полидактилия и/или тибиална хемимелия (Klopocki, 2012), но с нормално развити горни крайници. Синдромът на Liebenberg (аномалия на горните крайници, при която се наблюдават морфологични белези на долен крайник) се свързва с геномно преразпределение (транслокация 5:18 и 2 големи делеции), което включва 3 енхансера на *Pitx1* гена. Това води до експресия на *Pitx1* на нетипично място и трансформация на горния крайник в долен (Spielmann, 2012). До момента не са описани аномалии в развитието на хипофизата при тези пациенти и не се съобщава за изследване на ендокринен статус.

*Pitx2*<sup>-/-</sup> мишка загива в ранен етап на ембриогенезата поради тежки сърдечни малформации. При изследване на хипофизата се установява, че джоб на Rathke се образува, но не успява да нарасне и развие предния дял на хипофизата. Това най-вероятно се дължи на увеличено ниво на апоптоза, намалена пролиферация и невъзможност за активиране на експресията на *Prop1* и *Hesx1*. При *Pitx2*<sup>+/-</sup> мишките се наблюдават множествени дефекти в развитието на очите, зъбите, пъпа и сърцето, както и някои случаи на ИДРХ, но оцеляват до раждането. При изследването на хипофизата се установява липса на гонадотрофи и намален брой сомато- и тиреотрофи, докато кортикотрофите не са засегнати. Транскрипционни фактори, специфични за гонадотрофите – GATA2, EGR1, SF1 не се експресират при тези мишки. Както размерът на хипофизата, така и диференциацията на клетъчните линии са зависими от дозата на експресия на *Pitx2*. Suh и колеги смятат, че развитието на хипофизата зависи от комбинирания ефект на *Pitx1* и *Pitx2* (Suh, 2001).

При хора мутациите в *Pitx2* гена се свързват със синдрома на Rieger. Това е автозомно-доминантно заболяване, при което се открива вариабилен фенотип, включващ аномалии на предната камера на окото, дентална хипоплазия, умбиликална херния, умствено изоставане, хипоплазия на аденохипофизата. Като ендокринен дефицит най-често се проявява ДРХ, но може да бъде съчетан с хипотиреоидизъм и хипогонадизъм. До момента са открити около 20 мутации, които причиняват синдром на Rieger (Semina, 96).

#### 3.2.1.4. *Hesx1*

*Hesx1* (*Homeobox gene expressed in the Embryonic Stem cells 1*), известен още като *Rpx1* (*Rathcke's Pouch Homeobox gene*) е член на чифтните хомеобокс гени (paired-like homeobox genes). Открит е от Hermesz и колеги през 1996 година. Тогава те съобщават за нов хомеобокс ген, който се експресира изключително в предната част на развиващата се нервна система и играе основна роля в образуването на диенцефалона и хипофизната жлеза (Hermesz, 96). Две години по-късно, през 1998 година, Dattani и колеги изолират, клонират и секвенират човешки *HESX1*. Генът, кодиращ *Hesx1* се намира в 3p21.2-p21.1 и има 4 кодиращи екзона. Белтъкът притежава 185 АК и е високо консервативен, сравнен с миши и *Xenopus* секвенции (Dattani, 98). Протеинът е изграден от аминокислотен участък, който играе роля във взаимодействията протеин-протеин, димеризацията и транскрипцията; ДНК-свързващ хомеодомейн и карбокси-терминален участък (Hermesz, 96).

*Hesx1* се експресира първоначално в малък брой клетки в предната срединна висцерална *ендодерма* около E6.5 (Hermesz, 1996, Thomas and Beddington, 1996, Dattani, 1998) и остава така ограничен до пълното формиране на първичната ивица (приложение 3). Около 24 часа по-късно (E7.5) транскрипти на *Hesx1* се появяват и в прилежащата *ектодерма*, от която се развива вентралният прозенцефалон. След това нивото на експресия се увеличава и се разпространява латерално докато се образува диенцефалонът (E9), а от него инфундибулумът и задният дял на хипофизата. Освен в невроектодермата, ко-експресия на *Hesx1* се наблюдава и в роstralната част на предната чревна *ендодерма* (E7.5), а по-късно и в оралната *ектодерма* (E9), от която произлиза джобът на Rathke и предният дял на хипофизата. Около E9.5 експресията на *Hesx1* се ограничава само в джоба на Rathke. През E11.5, когато джоба на Rathke се отделя от оралната *ектодерма*, *Hesx1* се експресира във всичките му клетки (Hermesz, 1996, Thomas and Beddington, 1996, Dattani, 1998). Един ден по-късно, през E12.5, започва диференциацията на хипофизарните клетъчни линии в определен пространствен и времеви порядък:

- E12.5 – диференциация на кортикотрофите във вентралната част на АХ
- E13.5 – диференциация на тиреотрофите по роstralния връх
- E14.5 – диференциация на меланотрофите около инфундибулума
- E15.5-E16.5 – диференциация на соматотрофите, лакотрофите и гонадотрофите.

Затихването на експресията на *Hesx1* съвпада по време и място с диференциацията на тези хипофизарни клетъчни типове. През 1996 Hermesz изказва мнение, че *Hesx1* е най-ранният ТФ в хипофизарния примордиум и предполага, че има роля в ранната детерминация или диференциация на хипофизата (Hermesz, 1996). Предполага, че е въввлечен и в първоначалната детерминация на предния (прехордален) регион на ембриона.

Рано в ембриогенезата, още преди формирането на джоба на Rathke, *Hesx1* упражнява потискащо действие върху експресията на *Fgf8/10* в определени зони на вентралния диенцефалон. По този начин, чрез установяване на границите на експресия на *Fgf8/10*, се определя домейнът на развитие на хипофизата. Делеция на гена, кодиращ *Hesx1* води до разпространение на експресията на *Fgf8/10* във вентралния диенцефалон, последвано от ектопична експресия на *Lhx3* и формирането на множествени питуитарни зачатъци. Това затвърждава твърдението, че сигналните молекули *Fgf8/10* са необходими и достатъчни за индуциране на развитието на джоба на Rathke от оралната ектодерма (Treier, 2001). От друга страна, по време на появата на различните клетъчни линии, когато е достигнат пикът на секрецията на сигналните молекули *Fgf8/10*, те също упражняват репресионно действие върху *Hesx1*, водещо до постепенно затихване на експресията му (Treier, 2001).

*Hesx1* заедно с друг представител на семейството на чифтните ТФ-и *Prop1* (Prophet of *Pou1f1*) се залавят за една и съща палиндромна последователност (Wilson, 1993). За разлика от *Hesx1*, обаче, *Prop1* изпълнява ролята на транскрипционен активатор (Sornson, 1996). *Hesx1* може не само да потисне експресията на *Prop1*, но и да инхибира активиращата му функция. Експресията на *Hesx1* започва да намалява около E11.5-E12 и става недоловима до E13.5. Обратно, експресията на *Prop1* започва около E11, достига своя максимум през E12.5 и остава недоловима до E14.5-E15.5. Чрез тази реципрочна секреция на инхибиращ и активиращ ТФ се определя времето и мястото на началната детерминацията и диференциацията на PIT-зависимите клетъчни линии и гонадотрофите (Sornson, 1996).

*Hesx1* притежава два репресионни домейна – в N-терминалния участък и хомеодомейна, чрез които изпълнява своята потискаща функция. За да увеличи активността си, обаче, тези два домейна се свързват с различни репресорни комплекси. Ортолог на *Grunch* при бозайниците TLE1 се свързва с N-края на *Hesx1* (Brickman, 2001, Dasen, 2001). При миши експерименти е доказано, че *Hesx1* самостоятелно

може само частично да потисне функцията на *Prop1*, в присъствието на TLE тя напълно се инхибира (Sarson, 1996).

Хомеодомейнът притежава репресорна активност и свързването му с ко-репресорни комплекси не е облигатно. Все пак, за увеличаване на ефективността е необходимо свързване с N-CoR/Sin3/HDAC(1/2) комплекс. И двата репресорни комплекса осъществяват функцията си чрез промяна в структурата на хистоновите белтъци. Интересно е, че захващането на N-края на *Hesx1* с TLE дава възможност за кооперативно свързване на N-CoR, Sin3, HDAC за хомеодомейна (Brickman, 2001, Dasen, 2001).

Dattani и колеги създават миши модел с изцяло премахнат *Hesx1* ген, за да проучат морфологичните и хистологичните промени в различни етапи на развитието. Първоначално морфологични промени се наблюдават през E8.5 – силно редуциране на тъканта, от която се развива предният мозък и липса на развиващи се очни мехурчета. Често едната страна е била по-засегната от другата. След E9.5 наблюдаваният фенотип е вариabilен, поради което мутантните ембриони са разделени в два класа:

- Клас I (около 5%):
  - Морфологично този клас ембриони са по-силно засегнати: липса или значително намалени теленцефални мехурчета, очи, олфакторни плаки и фронтонезална маса.
  - След раждането: значително намален размер на главата, къс нос, анофтальмия или тежка микрофтальмия и смърт скоро след раждането.
  - Хистологично: през E12.5 се наблюдава силно редуциране на предния мозък, липса на теленцефалон и инфундибулум. Очните чашки и ектодермалните производни леща, олфакторни плаки и джоб на Rathke не са развити.
- Клас II (около 95%):
  - Морфологично този клас е по-леко засегнат: отново се наблюдава известна редукция на предния мозък с ляво-дясна асиметрия и нарушено развитие на теленцефалона, очните мехурчета и олфакторните плаки. Не са открити промени в по-каудално разположените структури.

- След раждането: по-лека краниофациална дисплазия, като често е засегнато само едното око. Перинаталната смъртност е по-ниска, като някои от мутантните мишки достигат фертилна възраст и имат поколение.
- Хистологично: между E11.5 и E12.5 се наблюдава известна тънкост на невроепитела на предния мозък, което говори за ретардация в развитието на просенцефалона. Намалени размери на теленцефалните мехурчета, вентрални срединни дефекти в хипоталамуса и нарушена морфогенеза на джоба на Rathke. Подът на диенцефалона е увеличен (в съответствие с разпространената експресия на *Fgf8/10* и *Lhx3*) и се наблюдава бифуркация на джоба на Rathke.

Хистологичният анализ на мутантни мишки в неонаталния период и възрастни показва допълнителни аномалии. Откриват се хипопластична назална кухина, олфакторен епител и луковици. Дефектите в развитието на очите варират от различна степен на микрофтальмия до анофтальмия. Когато очна ябълка е налице, тя се намира дълбоко в орбитата и не успява да излезе на повърхността. Наблюдават се и нарушения в срединните структури в крайния мозък: при около 25% липсва *septum pellucidum*; предната комисура и *corpus callosum* липсват при около 75% от мутантните мишки; липса на дорзалната и вентралната комисури на хипокампа се среща по-рядко. Намалени размери на предния дял на хипофизата, както и нарушена връзка със задния дял се наблюдава при всички изследвани мутантни мишки. Някои изследвания върху мишки предполагат, че питуитарната тъкан е по-чувствителна на промени в дозата на *Hesx1* от окото и предния мозък, както и че *Hesx1* може да потисне *Wnt* сигналния път в предния мозък. Описаният фенотип се свързва с този при СОД при хора <sup>(Dattani, 1998)</sup>.

Първата мутация в *Hesx1* при хора (R160C) е открита от Dattani и сътр. През 1998, при двама сибси със СОД от кръвнородствен брак, описани преди това от Wales и Quarrell през 1996г. По-късно са открити 12 автозомно-доминантни или рецесивни мутации, водещи до изключително вариабилен фенотип – от изолиран дефицит на растежен хормон (ИДРХ) без дефекти по срединната линия и очите до панхипопитуитаризъм и СОД. До момента няма описани генотип-фенотип корелации. В по-общ план хетерозиготните мутации предизвикват по-лек фенотип с ИДРХ и ектопична неврохипофиза, въпреки че манифестацията може да бъде твърде различна и са описани и дефекти по срединната линия. Пенетрантността е много

различна. До момента мутация в гена, кодиращ *Hesx1*, е доказана само при 1% от пациентите със СОД, което етиологичното влияние на други гени или фактори от околната среда (Webb, 2010)

### 3.2.1.5. Септо-оптична дисплазия

Септо-оптичната дисплазия (СОД), известна още като синдром на de Morsier, е изключително хетерогенно състояние. Описана е за първи път от Reeves през 1941 година при пациент с агенезия на septum pellucidum, съчетана с аномалии на зрителния нерв. По-късно Hoyt и колеги свързват състоянието и с хипоплазия на хипофизата. Клиничната диагноза СОД се поставя при наличието на поне две от следните: 1. хипоплазия/агенезия на зрителните нерви/хиазмата; 2. дефекти по срединната линия (хипоплазия/агенезия на corpus callosum, septum pellucidum и др.) и 3. хипопитуитаризъм вследствие на хипоплазия на хипофизата. Съобщаваната честота на СОД е 1 на 10000 живородени деца, като разпределението по пол е 1:1.

СОД е фенотипно хетерогенно състояние. Класическата триада се разгръща напълно само в около 30% от всички случаи на СОД (Moroshima, Aronoff). Най-често първи признак на заболяването е хипоплазията на зрителните нерви, която се среща в около 75-80% от случаите, по-често е билатерална (88%), отколкото унилатерална (12%). В по-редки случаи се среща нистагъм, отлепване на ретината или по-тежки очни аномалии като анофтальмия и микрофтальмия (Webb, 2010).

Неврологичният дефицит е чест, като варира от цялостно изоставане в ННР до фокални огнища на епилепсия или хемипареза. Дефектите по срединната линия като липса на septum pellucidum, хипоплазия на corpus callosum и др., се срещат в около 60% от случаите. По-рядко се съобщава за хипоплазия на церебелума, сливане на церебеларните хемисфери (rhombencephalosynapsis), агенезия на вермикса, хидроцефалия, шизенцефалия, прозенцефалия, аплазия на форникса (Webb, 2010, Kelbermann, 2008).

Хипоплазия на хипофизата, причиняваща прогресивна загуба на хипофизарни хормони, се среща в около 62% от случаите на СОД. Най-честата ендокринопатия е дефицитът на РХ, следван от дефицит на ТSH и АСТН. Абнормна гонадотропна секреция, вследствие на нарушена хипоталамична регулация, може да причини преждевременно или забавено пубертетно развитие. По-рядко се срещат и хипогликемия и инсипиден диабет (Webb, 2010, Kelbermann, 2008).

Фенотипът може да включва още забавяне в НПП, гърчов синдром, инсомния, затлъстяване, аносмия, сензорно-неврална глухота, сърдечни, дихателни, уринарни и мускулоскелетни аномалии (Webb, 2010, Kelbermann, 2008).

Развитието на ЦНС е изключително сложен процес, който започва много рано в ембриогенезата на човека – от 4 до 6 гестационна седмица (приложение 3). Всяко нарушение в този критичен период може да предизвика белези на СОД. Етиологията на СОД е разнообразна като значение има както влиянието на околната среда, така и генетични фактори. Първоначално етиологията е свързана с млада възраст на майките (средно 22 години). Има съобщения за концентриране на случаи на СОД в бедни квартали с висок процент бременности сред юношите. Известни са случаи на СОД вследствие на тератогенния ефект на медикаменти, приемани по време на критичния за формирането на нервната система период от 4 до 6 гестационна седмица (Dattani, 1998, Webb, 2010, Kelbermann, 2008).

Обикновено СОД се свързва с мутации в *HESX1* гена, но клиничната диагноза СОД вече се свързва с все повече гени като *SOX2* (Dattani, 1998, Kelbermann, 2008, Webb, 2010), *SOX3* (Stagi, 2014, Kelbermann, 2008, Webb, 2010), *FGF8* (fibroblast growth factor 8), *FGFR1* (Fukami, 2013, McCabe, 2011), *PROK1*, *PROKR* (McCabe, 2013), *SHH* (Zhao, 2012). Последният ген е известен като един от причинителите на холопрозенцефалия. Това показва, че тези състояния са генетично свързани и припокриващи се (Raivio, 2012).

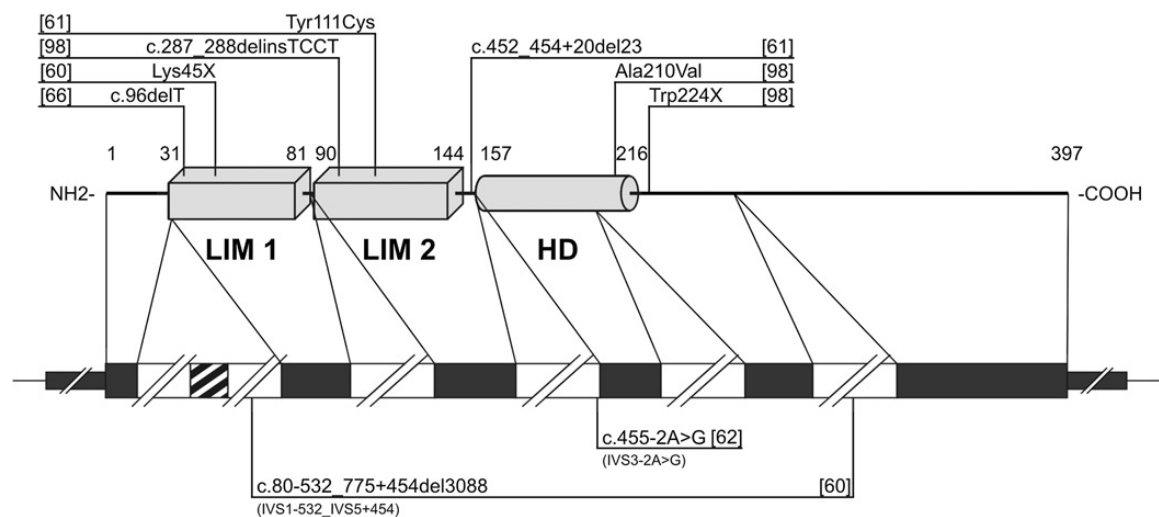
Най-често СОД е спорадично заболяване. Поради тази причина, при липса на фамилен анамнез за СОД, вероятността за засягане на сибси е под 1%. При консангвинитет в семейството вероятността за рецесивно унаследяване на мутацията е значително по-висока – 25% (Dattani, 2010). Генетичното консултиране се затруднява и от вариабилните пенетрантност и фенотипна изява на доминантните *HESX1* мутации.

### 3.2.1.6. Lhx3

Транскрипционният фактор Lhx3 (LIM Homeobox 3) е член на LIM-homeodomain семейство от ТФ-и (Hunter and Rhodes, 2005; Mullen, 2007). Протеините от това семейство притежават два LIM домейна, разположени в аминотерминалния участък и участващи в протеин-протеин взаимоотношенията; централно разположен ДНК-свързващ хомеодомейн и С-терминален трансактивиращ участък. Наименованието на семейството идва от първите членове на това семейство: *Lin-11* (Freyd, 1990), *Islet-1 (Isl-1)* (Karlson, 1990) и *Mec-3* (Wey and Chafli, 1988). Генът, кодиращ *Lhx3* се намира в 9-та хромозома

(9q34.3) (Sloop, 2000) и се състои от 6 екзона (Zhadanov, 1995; Netchine, 2000). Чрез алтернативно снаждане в екзон 1 се генерират две изоформи на протеина – Lhx3a и Lhx3b. Те са идентични, с изключение на част от секвенцията в аминотерминалния участък преди LIM домейните. Това води до различна трансактивация на таргетните им гени в хипофизата (Sloop, 1999).

**Фигура 8.** Структура на гена и протеина на LHX4 с известните мутации (Pfeaffle, 2011)



През 1994 година Zhadanov и колеги изследват експресионния профил на *Lhx3* по време на хипофизарното ембрионално развитие при мишки. Експресията на *Lhx3a* започва през E8.5. Около E9.5 двете изоформи на *Lhx3* се експресират по цялото протежение на джоба на Rathke и в затварящата се неврална тръба. Високите нива на експресия се задържат до E16.5, когато *Lhx3* се открива предимно в предния и интермедиерния лоб на хипофизата, но не и в задния лоб. От E9.5 нататък експресия на този TF се наблюдава и в развиващия се гръбначен стълб, различни части на главния мозък, както и в сензорния епител на развиващото се вътрешно ухо (Rajab, 2008). При възрастни индивиди ниски нива на *Lhx3* експресия се запазва в предния и интермедиерния лоб на хипофизата, ограничени участъци от окоето и главния мозък (Taira, 1993).

*Lhx3* разпознава подобен AT-богат регион, наречен *Lhx3-binding consensus* (LBC) в промоторните и енхансерните участъци на таргетните гени. Доказано е, че *Lhx3* стимулира експресията на  $\alpha$ -GSU (обща субединица за TSH, LH и FSH) (Zhadanov, 95), FSH- $\beta$  (West, 2004); LH- $\beta$ , TSH- $\beta$  (Rhodes, 93; Bach, 95); GH, PRL, GnRH, както и на *Pou1f1* (Bach, 1995, Mullen, 2007). *Lhx3a* се свързва и активира репортерен ген, който съдържа промоторен и енхансерен участък на *Pou1f1*.

При хомозиготни *Lhx3* knockout мишки се наблюдава задръжка в ранното ембрионално развитие на хипофизата. Питуитарна плака или джоб на Rathke се формира, но не успява да инвагинира и претърпява обратно развитие. Причината за тези морфологични дефекти е намалена пролиферация и диференциация, както и повишена апоптоза (Sheng, 96; 97; Ellsworth, 2008; Zhao, 2006). При тези мишки се манифестира липса на транскрипти на всички питуитарни хормони (GH, PRL, TSH, FSH и LH), с изключение на РОМК. Наблюдават се и дефекти в развитието на централната и периферната нервна система както и намалена подвижност на врата, вследствие на нарушено развитие на моторните неврони.

По-лек фенотип се наблюдава при мутацията *Lhx3*<sup>w227ter/w227ter</sup> (Prince, 2013), предизвикваща липса на трансактивиращия С-терминален участък. При тях предният лоб на хипофизата е хипопластичен, като се отчита намалена диференциация. В някои от случаите се наблюдава бифуркация на джоба на Rathke. При *Lhx3*<sup>w227ter/w227ter</sup> мишки от различен генетичен произход задният дял на хипофизата не е засегнат и не се наблюдават неврологичните дефекти, свързани с мутации в този ген. Този по-лек фенотип показва, че карбокси-краят е най-потентният трансактивиращ участък, но не е единственият. LIM-домейните също изпълняват активираща транскрипционна функция. Освен това е възможно други гени, като *Lhx4*, да компенсират част от загубената активност на мутантния протеин.

Първата мутация в гена, кодиращ *LHX3* при хора е описана през 2000 година от Netchine и колеги при трима сибси с хипопитуитаризъм, хипоплазия на аденохипофизата и ограничена вратна подвижност. До момента са описани 13 мутации в този ген, включително и делеция на целия ген, при повече от 22 пациента от 15 семейства. Смята се, че няма определена “hot spot” мутация, тъй като при почти всички семейства са намерени различни мутации. При всички пациенти с мутация в гена, кодиращ *LHX3* се диагностицира дефицит на поне 5 хипофизарни хормона – PRL, TSH, LH, FSH. При някои от тях се наблюдава пълна липса или намалени нива на АСТН с последващо развитие на недостатъчност, въпреки че не е известно *LHX3* да участва в развитието на адренокортикотрофите. Подобно отпадане на АСТН секрецията в хода на заболяването се наблюдава при пациенти с *PROPI* мутации. Това налага насочено проследяване на пациента в тази насока.

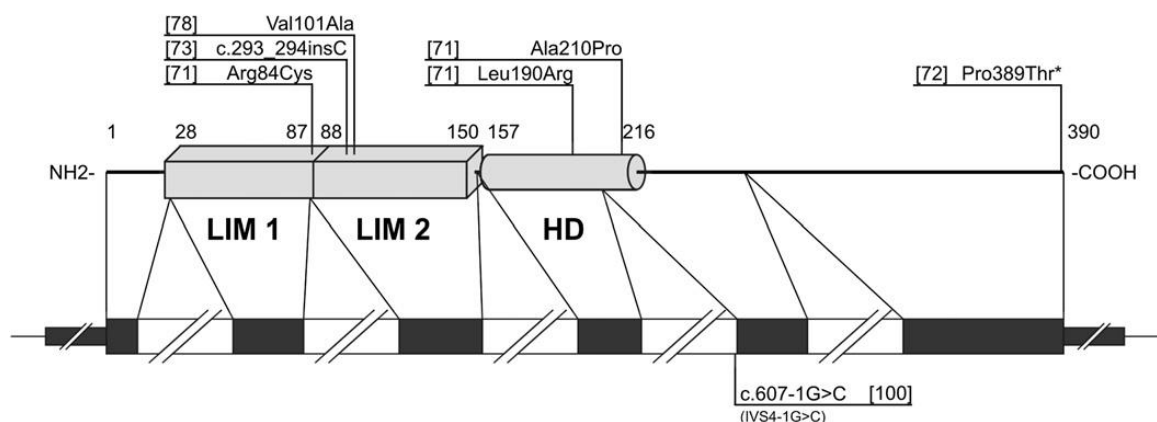
Отново по подобие на фенотипа при мутации в гена, кодиращ *PROPI*, при пациенти с мутации в *LHX3*-гена се наблюдава хипо- или хиперплазия на аденохипофизата, без засягане на задния дял или инфундибулума.

Както при мишки, така и при хора с мутации в *LHX3*-гена се наблюдава ограничена вратна подвижност вследствие на абнормно развитие на мотоневроните. Открити са известни генотипни-фенотипни корелации по отношение на този признак. При мишки и пациенти с мутации, засягащи LIM-домейните или хомеодомейна се наблюдава както засягане на хипофизарното развитие, така и в това на НС. Обратно, при засягане на карбокси-края на *LHX3*-гена (p.W224Ter) има степенно по-леко засягане на хипофизата и нормално развитие на НС. Това говори, че отпадане на трансактивиращата функция на карбокси-края е критична за хипофизарното развитие, докато остатъчната функция на LIM-домейна е достатъчна за формиране на нервната система и на мотоневроните в частност (Pfeaffle, 2007).

### 3.2.1.7. *Lhx4*

Друг ген – *Lhx4*, член на LIM-Номеобох семейството, участва в ранните етапи на ембрионално развитие на хипофизата. Също като останалите протеини от това семейство, *Lhx4* се състои от ДНК-свързващ хомеодомейн, разположен в аминокрая; два централно разположени LIM-домейна, които имат трансактивираща функция и участват във взаимодействията протеин-протеин и трансактивиращ карбокси-край. Генът, кодиращ *Lhx4* се намира в хромозома 1 (1q25) и се състои от 6 екзона.

**Фигура 9.** Структура на гена и протеина на LHX4 с известните мутации (Pfeaffle, 2011)



През 1997 Sheng и колеги откриват, че *Lhx4* се експресира по цялото протежение на джоба на Rathke още през E9.5. След това до E12.5, за разлика от *Lhx3*, експресията

му се ограничава само до региона на бъдещия преден лоб на хипофизата, а до E15.5 намалява значително и за запазва на много ниско ниво и при възрастни индивиди. Аналогично на *Lhx3*, *Lhx4* се експресира в развиващите се мотоневрони, гръбначен и заден мозък.

За да изследват ролята на *Lhx4* в хипофизарното развитие, Sheng и колеги създават и *Lhx4*<sup>-/-</sup> мишка. Характерно при нея, както и при *Lhx3*<sup>-/-</sup>, е че джоб на Rathke се формира. На лице са всички питуитарни клетъчни линии, но се наблюдава значително намален клетъчен брой, вследствие както на намалена пролиферация, така и повишена апоптоза. *Lhx4* се свързва с гените, кодиращи αGSU, TSH-β, LH-β, FSH-β, както и с промотора на *Pou1f1*. Единствено меланотрофите в интермедиерния лоб са незасегнати. Това води до хипоплазия на аденохипофизата с дефицит на всички питуитарни хормони.

От проведените изследвания върху *Lhx4* и *Lhx3* става ясно, че двата транскрипционни фактора нямат участие във формирането на примордиума на джоба на Rathke. Те, обаче, определят развитието му в дефинитивен джоб на Rathke като контролират пролиферацията на клетките от една страна и апоптозата, от друга. Според Sheng и колеги, дефектът в пролиферацията при мутации в *Lhx3* и *Lhx4* гените е дозозависим и тежестта му се увеличава както следва:  $Lhx3^{-/-}/Lhx4^{-/-} > Lhx3^{-/-}/Lhx4^{-/+} > Lhx3^{-/-}/Lhx4^{+/+} > Lhx3^{+/-}/Lhx4^{-/-} > Lhx3^{+/-}/Lhx4^{-/+} > Lhx3^{+/-}/Lhx4^{+/+}$ . При *Lhx3*<sup>-/-</sup> мишки пролиферацията е прекратена още преди началото на експресията на специфичните клетъчни маркери, поради което те липсват. При *Lhx4*<sup>-/-</sup> мишки обаче, се наблюдава силно редуциран брой питуитарни клетки, което води до хипоплазия на предния лоб, със слабо засягане на интермедиерния лоб.

По-нататъшното развитие на органа и формирането на различните хормон-продуциращи клетки зависи основно от *Lhx3*. В по-късните етапи на хипофизарното развитие *Lhx3* и *Lhx4* имат различни и не-припокриващи се функции.

Първата мутация в гена, кодиращ *Lhx4* при хора е открита от Machinis и колеги през 2001 година. Те описват пациент с дефицит на GH, TSH и АСТН (не се съобщават стойностите на пролактин и гонадотропини). ЯМР на хипоталамо-хипофизарната област са показали хипоплазия на аденохипофизата, ектопична неврохипофиза, хипоплазия на sella turcica, както и наличие на малформация на Chiari. От тогава са описани още 11 хетерозиготни мутации при 19 пациента, които засягат интронните и

екзонните части на гена, включително и пълна делеция. До момента не са установени ясни корелации генотип-фенотип. Има различно клинично представяне при пациенти, носещи една и съща мутация. Pfaeffle и колеги описват семейство (2 сестри и баща), носещи една и съща хетерозиготна мутация p.A210P. При едното момиче се наблюдава дефицит на GH, TSH, LH, FSH и АСТН, докато при другата сестра и бащата е доказан ИДРХ. Находката от ЯМР на главен мозък също се различава значително, като не се наблюдава корелация между тежестта на ендокринния фенотип и находката от ЯМР. Докато при двете сестри се намира хипоплазия на аденохипофизата, ектопична неврохипофиза, кистично образуване в хипофизата и малформация на Chiari, при бащата няма патологична находка.

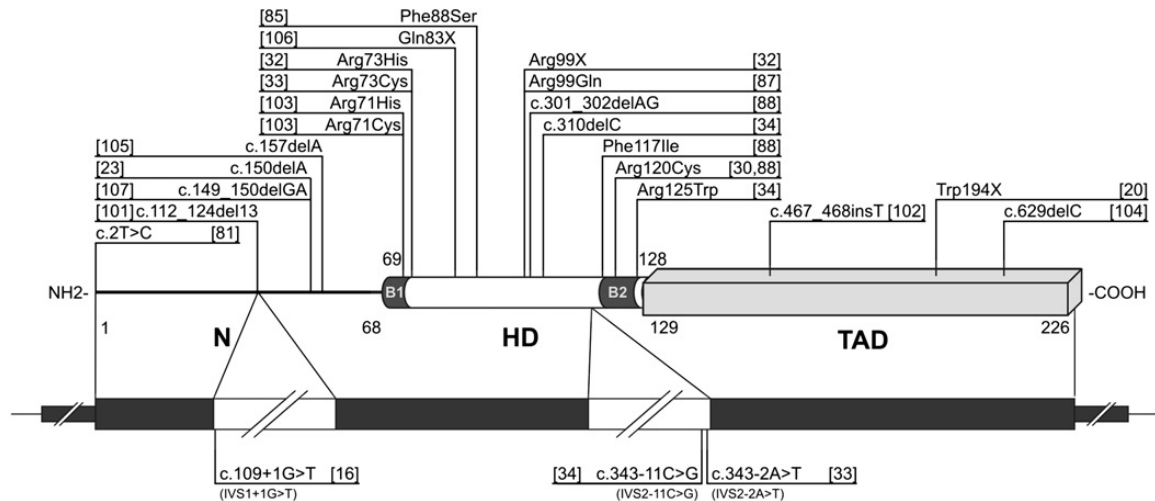
Хипоплазията на аденохипофизата, съчетана с хипоплазия на sella turcica, с или без ектопична неврохипофиза се свързва мутация в *Lhx4* гена. Вече са известни пациенти, при които се намира хипоплазия, хиперплазия или нормален размер на аденохипофизата, без засягане на sella turcica или малък мозък. От друга страна има пациенти с този фенотип, при които са открити мутации в други ТФ.

### 3.2.2. Късни транскрипционни фактори

#### 3.2.2.1. Prop 1

*Prop1* (Prophet of *Pou1f1*) е член на чифтните хомеобокс гени (paired-like homeobox genes). Открит е от Sorson и колеги през 1996 година. Те съобщават за специфичен за хипофизата ТФ, който играе основна роля в пролиферацията и диференциацията на *Pou1f1*-зависимите соматотрофи, лактотрофи и тиреотрофи. Две години по-късно Duquesnoy и колеги клонират и секвенират човешки *PROP1*. Намира се в хромозома 5 (5q35.3), състои се от 3 екзона и кодира белтък от 226 АК, който притежава висококонсервативни трансактивиращ карбокситерминален участък и ДНК-свързващ хомеодомейн. Аминотерминалният край на Prop1 протеина е с неизяснена функция и известна дивергентност в аминокиселинната последователност.

**Фигура 10.** Структура на гена и протеина на *PROP1* с известните мутации (Pfeaffle, 2011)



През E9.5 експресията на *Prop1* е представена много слабо, само в ограничена територия – в дорзалната част на жлезата. През E10-10.5 нивата на експресия са вече високи, а до E12 тя достига своя максимум в цялата каудо-медиална зона на жлезата. По-късно (E13.5), това е зоната на експресия на *Pou1f1*.

Функцията на ТФ *Prop1* е дълбоко проучена благодарение на спонтанно възникнала *Prop1* мутация при мишки с нанизъм, наречени Ames. В своето проучване Sorson и колеги търсят генния дефект, който причинява нанизма при мишките Ames. Доказват спонтанно възниканала нуклеотидна замяна на цитозин с тимин, довела до замяна на серин с пролин (S83P) в първата  $\alpha$ -спирала на хомеодомейна на протеина. Това предизвиква намаление на ДНК-свързващата способност на протеина с около осем пъти по-ниска от wild type (див щам) и силно намалена трансактивираща способност. Мутантният протеин не успява да активира експресията на таргетния му ген *Pou1f1* и детерминацията на зависимите от него питуитарни клетъчни линии – соматотрофи, лактотрофи и тиреотрофи. При изследването на хипофизите на хомозиготни индивиди се наблюдава високостепенна хипоплазия на предния дял на хипофизата със запазени от 0.001 до 1% от *Pou1f1*-зависимите клетъчни линии. Допълнително, експресията на гонадотрофите е редуцирана. При възрастните индивиди се наблюдава съответно тежък дефицит на СТН, Прl и ТШН и намалени нива на LH и FSH.

*Prop1* играе ключова роля в пролиферацията и диференциацията на *Pou1f1*-зависимите клетъчни линии. Освен това той е отговорен за тяхната миграция от зоната на пролиферация на прогениторните клетки – перилуменната зона към развиващия се преден лоб на хипофизата (Sorson, 1995, Word, 2001, Rizzoti, 2015).

*Prop1* се свързва като хомо- или хетеродимер към промотерните елементи съдържащи палиндромната ТААТ АТТА последователност, отделена от 2 или 3 нуклеотидни двойки. Този тип елемент се разпознава от други чифтни хомеобокс протеини, включително и от репресионния ТФ *Hesx1*.

Първите *PROPI* мутации при хора са съобщени през 1998 от Wu и сътр (Wu, 1998). Пациентите от четирите семейства са били с дефицит на GH, TSH, Prl, гонадотропини и не са отключили спонтанен пубертет. Идентифицирани са над 22 различни мутации, пръснати и в трите екзона на гена, с най-често засягане на екзон 2 (фиг.10). Броят на пациентите с доказани мутации надхвърля 170. Мутации на *PROPI* са най-честата причина за множествен тропен дефицит и представляват около 50% от фамилно срещаните форми (Cogan, 1998, Deladoey, 1999, Fluck, 1998). Честотата им при спорадичните форми е по-ниска (Turton, 2005). Всички засегнати индивиди са с автозомно-рецесивно унаследяване. Повечето мутации засягат строго консервирания, свързващ се с ДНК хомеодомейн. В повечето случаи настъпва загуба на протеиновата функция, тъй като е невъзможно свързването с ДНК и транскрипцията. При *in vitro* условия някои от мутациите са със запазена остатъчна активност (Wu, 1998, Reynaud, 2004, Deladoey, 1999). Най-честата мутация (50-72% от всички фамилни *PROPI* мутации (Deladoey, 1999, Cogan, 1998, Vallete-Kasic, 2001)) открита в множество семейства, несвързани помежду си и от различни страни, представлява делеция на 2 бази сред 3 повтарящи се последователно тандем GA<sup>(296 –GAGAGAG-302)</sup> в екзон 2. Тя предизвиква промяна в рамката на четене (frameshift) в кодон 101 и въвеждане на стоп кодон на позиция 109. Най-вероятно се касае за мутационен “hot spot” в рамките на гена, а не за единична обща мутация, т.нар. founder mutation (Cogan, 1998). Reynaud et al. (Reynaud, 2004) съобщават за първата мутация надолу, след хомеодомейна със заместване на триптофан от стопкодон на позиция 194 (W194X) в трансактивационния домен. Мутантният протеин е с 34% активност при сравнение с wild type *PROPI*.

Фенотипната на изява на мутациите в *PROPI* гена е изключително вариабилна. Това включва времето за начална изява и тежестта на хормоналните нарушения, морфологичните промени на аденохипофизата. При повечето пациенти първа клинична проява на заболяването е изоставане в растежа, в резултат на дефицит на РХ. Съобщава се обаче и за незасегнат растеж в ранна детска възраст, при пациент, достигнал краен ръст в рамките на здравите, без да е получавал заместително лечение с растежен хормон (Argojo, 2002). Дефицитът на TSH също има вариабилна изява –

понякога е пръв симптом, но изявата може да е и по-късно, с постепенно развитие (Deladoey, 1999, Fluck, 1998, Vallete-Kasic, 2001, Mendonca, 1999), много след раждането.

Обичайно през ранните фази от живота, секретията на АСТН и кортизол е в рамките на нормата. Постепенно се появява и кортизоловият дефицит. Характерна е корелацията между постепенното намаляване до отпадане на кортизоловата секреция и напредването на възрастта (Mendonca, 1999, Asteria, 2000, Pernasetti, 2000, Riepe, 2001, Bottner, 2004). Съществуват и изключения: съобщава се за пациенти на възраст 6-7 години с вторичен хипокортицизъм (Bottner, 2006, Agarwal, 2000).

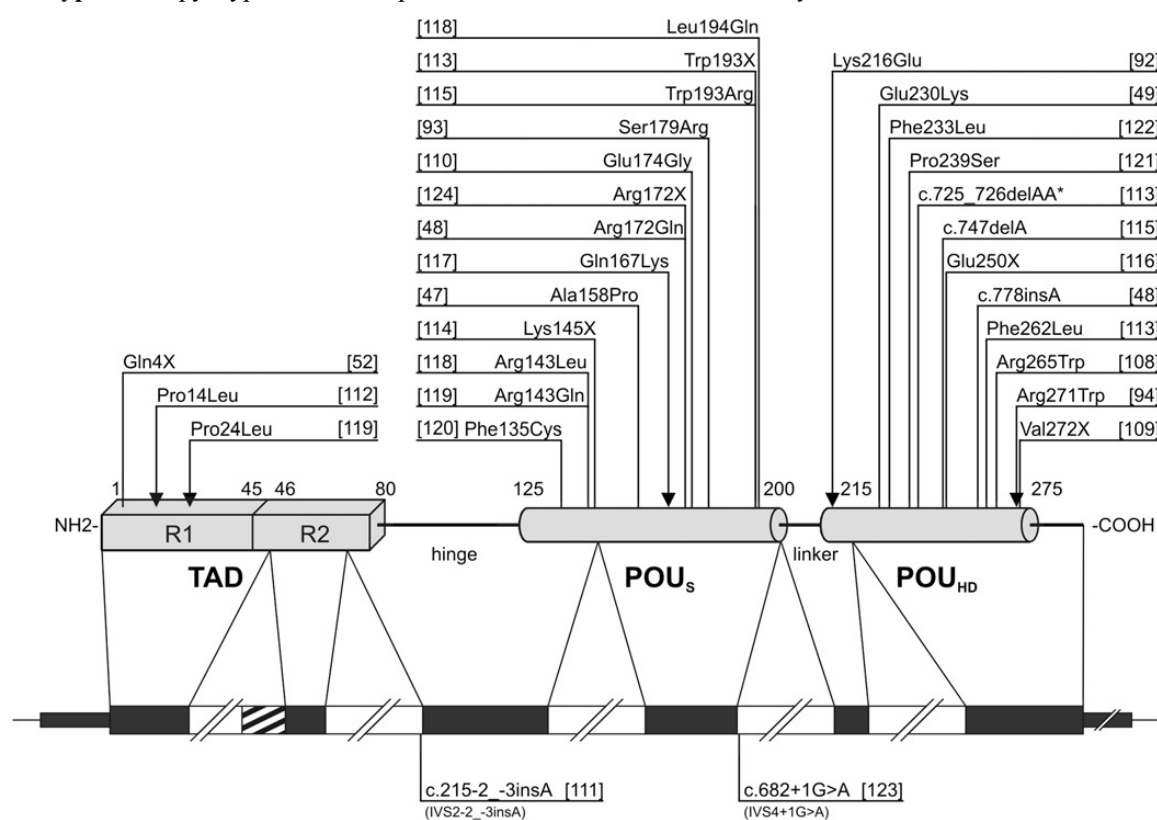
Въпреки неясната роля на *PROPI* за диференциацията на феталните гонадотрофи, при пациентите е налице екстремно вариабилен спектър на гонадотропен дефицит. Възможна е както пълна липса на каквото и да е пубертетно развитие, така и спонтанно отключване, което често е забавено. Необходимостта от хормонална заместителна терапия поради постепенно настъпващ хипогонадотропен хипогонадизъм изисква щателно проследяване на всеки пациент с множествен тропен дефицит и/или доказана мутация на *PROPI* (Deladoey, 1999, Fluck, 1998, Vallete-Kasic, 2001, Pernasetti, 2000).

Подобно на хормоналните дефицити и тук картината е вариабилна: повечето пациенти с доказани мутации са с непрекъснат инфундибулум и еутопична неврохипофиза при изследването с ЯМР. Аденохипофизата е малка, хипопластична. Обаче, не са малко съобщенията в литературата за аденохипофиза с увеличени размери (Wu, 1998, Mendonca, 1999, Fofanova, 1998). При лонгитудиналното проследяване на размерите на аденохипофизата се открива като първи етап, в по-ранната възраст, увеличаване на размерите ѝ. Впоследствие, аденохипофизата претърпява инволюция. Резултат от регресията ѝ е обективизираната хипоплазия при по-възрастните пациенти (Riepe, 2001, Bottner, 2004, Agarwal, 2000, Fofanova, 1998, Voutetakakis, 2004). Увеличените размери на хипофизата се дължат на заемаща пространството лезия между задния и предния лоб, най-вероятно произхождаща от интермедиерния лоб (Voutetakakis, 2004). Според Turton 2005 тази маса е способна да намалява и нараства преди окончателната инволюция. Подлежащият механизъм остава недобре проучен. Съществува едно съобщение за биопсия на „тумора“ с неспецифична хистология, наличие на аморфен материал без признаци на апоптоза и разпознаваеми клетъчни линии (Parks, 2000, Cushman, 2001).

### 3.2.2.2. *Pou1f1* (*Pit1*)

*Pou1f1* (Pituitary-specific transcription factor 1), известен още като *Ghfl* (Growth Hormone Factor 1) и *Pit1*, е специфичен за хипофизарната тъкан транскрипционен фактор (Ingraham, 1988, Castrillo, 1989). Той принадлежи към POU-семейството от транскрипционни фактори, чието име идва от първите три идентифицирани члена: *Pou1f1*, *Oct1* и *Ung-86* (Herr, 1988). Протеинът притежава два функционални домейна – N-терминален трансактивиращ домейн и POU-домейн (POU-специфичен и POU-хомеодомейн), отговорен за високо-афинитетното свързване с ДНК, взаимодействията протеин-протеин.

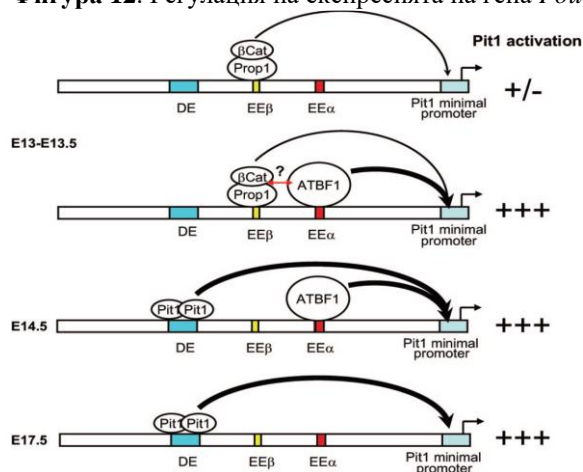
**Фигура 11.** Структура на гена и протеина на POU1F1 с известните мутации (Pfeaffle, 2011)



Генът, кодиращ *Pou1f1*, се намира в хромозома 3p11 при хора и в хромозома 16 при мишки. (Camper, 1990, Ohta, 1992, Phillips, 1990, 1994) Състои се от 6 екзона. Експресията на *Pou1f1* започва през E13.5 в ограничена територия в каудомедиалната част на развиващата се аденохипофиза. Това става под контрола на поне три специфични енхансери: ранни енхансери EEβ и EEα, отговорни за първоначалната активация на гена, и дистален енхансер, отговорен за последващата му авторегулация. EEβ се намира на -8.3 kb преди старт-кодона. *Prop1*, заедно с β-catenin в ролята на ко-активатор, се залавя за EEβ (Olson, 2006, Zhu, 2007, Yoshida, 2009). Това е необходима, но недостатъчна стъпка за

инициацията на експресията на *Pou1f1* гена. Важна е едновременната активация и на *EEα*, чрез свързването му с *Atbf1* (фиг Qi, 2008). При миши модели с мутантен *Atbf1* ген се наблюдава значително намаление на *Pou1f1* транскриптите. Въпреки това няма влияние върху диференциацията на различните клетъчни линии или архитектуриката на жлезата. Профилът на експресията на *Atbf1* също показва ролята му в регулацията на *Pou1f1* гена. Тя започва през E12.5, достига пик през E13.5 (началото на експресия на *Pou1f1*) и затихва след E14.5 (Qi, 2008). По това време значение за поддържането на нивото на експресия на *Pou1f1* има дисталният енхансер. Той съдържа три функционални захващащи места за *Pou1f1*, което доказва авторегулацията на гена след E14.5 (Ho, 2015). Освен това дисталният енхансер притежава захващащи места и за нуклеарни хормонални рецептори като тиреоидния рецептор (TR), retinoid X receptor (RXR), retinoid acid receptor (RAR), vitamin D receptor (VDR), estrogen receptor (ER), glucocorticoid receptor (GR), Lhx4 (Machinis, 2005). Тези протеини могат да повлияват в различна степен експресията на *Pou1f1* (Qi, 2008).

**Фигура 12.** Регулация на експресията на гена *Pou1f1* (Qi, 2007)



Функцията на *Pou1f1* в ембрионалното развитие на хипофизата е подробно изучена благодарение на спонтанно възникнали мутации в този ген при мишки Snell (Camper, 1990) и Jackson (Li, 1990). Първата линия мишки носи миссенс мутация - 783G>T в POU-хормеодомехна, която води замяна на триптофан с цистеин на позиция 261 (W261C). При втората линия мишки се наблюдава синтез на скъсен протеин и води да загуба на способността за свързване с ДНК. Фенотипно двете линии мишки се характеризират с хипоплазия на аденохипофизата, вследствие на намален брой соматотрофи, лактотрофи и тиреотрофи (с изключение на *Pit1*-независимите роstralно разположени тиреотрофи) и липса на експресия на гените на GH, PRL и TSH-β. (Andersen,

2005, the Ames dwarf gene is required for *Pou1f1* gene activation). *Pou1f1* е отговорен за крайна диференциация на соматотрофите, лактотрофите и тиреотрофите (Cohen, 1996). Експресия на гените, кодиращи *STH*, *PRL*, *TSH- $\beta$* , в съответните клетки се иницира *Pou1f1*, чрез свързване АТ-богати участъци в техните промотори. Активирането на *STH*-гена само в соматотрофите, както и *PRL* и *TSH- $\beta$*  в лактотрофите и тиреотрофите, съответно, се осъществява чрез комплексни синергично взаимодействие на *Pou1f1* с други протеини (Scully, 2000). *N-cog* (Horlein, 2005, Laherty, 1998), *CRE* (Xu, 1998, Zanger, 1999, Kishimoto, 2002).

Промоторът на *GH*-гена има свързващи места за *RXR*, *RAR*, *TR*, които взаимодействат с *Pou1f1* и потенцират неговата функция в различна степен (Chang, 1996, Palomino, 1998, Schaufele, 1992, Zhu, 2007). Най-силно е това действие при *RXR*. Други ТФ-и, чието действие е необходимо за активирането на транскрипцията на *PX* са *Zn-15* ТФ, *C/EBP $\alpha$*  (Gordan, 1997). Освен това, *Pou1f1* стимулира транскрипцията на *PXPX*.

Промоторът на *PRL*-гена е под контрола на естроген само когато е свързан едновременно с *Pou1f1* и естрогеновия рецептор (*ER*) (Day, 1990, Kakizawa, 1999, Simmons, 1990, Ying, 1999). Директното взаимодействие между тях е естроген-зависимо (Ying, 1999). Синергично действие между *Pou1f1* и друг ТФ *Est1* е необходимо за основната активация и медирането на сигналите от *MAPK*-сигнален път (Bradford, 1997, 2000). Други протеини, които взаимодействат с *Pou1f1* и стимулират експресията на *PRL* са *Pitx1*, *Pitx2*, *Lhx3*, *VDR* (Castillo, 1999, Gordan, 1997, Szeto, 1997, 1999, Tremblay, 1997, Amendt, 1999, Bach, 1995). От друга страна *Est-2* repressor factor (*ERF*) има потискаща роля върху промотора на *PRL*-гена. Инхибиращо действие имат, също така, допаминът и *GR* (Nalda, 1997).

За активацията на *TSH- $\beta$*  промотора е необходимо функционалното взаимодействие на *Pou1f1* и *AP-1*, когато и двата ТФ са захванати за ДНК. Основно значение за експресията на *TSH- $\beta$*  гена има и ТФ *GATA-2* (Dasen, 1999, Gordan, 1997). Този ТФ е отговорен както за развитието на тиреотрофи, така и на гонадотрофи и може да бъде модулиран от *Pou1f1*. При наличие на *Pou1f1* в гонадотрофите, той блокира захващането на *GATA-2* за таргетни гени на *SF-1* и експресията на *LH* и *FSH*. От друга страна, в тиреотрофите се наблюдава синергично действие при стимулацията на промотори, съдържащи едновременно свързващи места за двата ТФ, като *TSH- $\beta$* .

Освен контрола на терминалната диференциация на трите питуитарни клетъчни линии, *Pou1f1* играе роля и в тяхната пролиферация. Смята се, че това става по три начина. Първо, предполага се, че *Pou1f1* може директно да регулира ДНК

репликацията. Второ, *Pou1f1* директно регулира IЕ-гените, участващи в инициацията на клетъчния цикъл. Такъв е, например, *c-fos*-генът (Gaiddon, 1999). Трето, *Pou1f1* активира експресията на GHRH, който стимулира пролиферацията на соматотрофите. Описани са свързващи места за *Pou1f1* и с гена на TRH рецептора, което предполага роля в пролиферацията на тиреотрофите.

Мутации в гена, кодиращ *POUIF1* се наблюдават и при хора. През 1992 година четири независими изследователски екипа съобщават за мутация в *POUIF1* гена при пациенти с хипопитуитаризъм (Tatsumi, Pfaeffle, Radovic, Ohata). От тогава са открити поне 28 различни мутации в този ген, като 23 от тях са автозомно-рецесивни, включително и пълна делеция на *POUIF1*-гена, а 5 имат автозомно-доминантен път на унаследяване. Докладвани са и пациенти със съчетана хетерозиготност, подобно на мутации в *PROPI*-гена. Повечето мутации се намират в екзони 4 и 6, като засягат *POU*-домейните и препятстват свързването с ДНК, но се срещат и мутации, които намаляват транскриптивращата функция или намаляват стабилността на протеина. Най-честата мутация в този ген, определена като hot-spot мутация в p.R271W, открита при пациенти от различен етнически произход. Съобщаваната честота на мутации в този ген между 3.8 и 5.7% за спорадични случаи и 18% за фамилни (Turton, 2005).

Макар и с различно изразена тежест, фенотипът при пациенти с мутации в *POUIF1* гена прилича на този при мишите модели. Най-често спорадичните случаи се диагностицират след 4 годишна възраст, като първата манифестация е изоставане в растежа вследствие на дефицит на РХ. При по-малко от половината пациенти се открива дефицит на TSH като първи признак на заболяването. Известен е пациент, при който TSH дефицит се развива след 25-годишна възраст (Aroyo, 2013). Освен това, за разлика от дефицита на РХ и PRL, степенно TSH-дефицита е твърде различно изразен при отделните пациенти. При пациенти с мутация в *POUIF1* гена се наблюдава липсващо/забавено адренархе, а при момичета и липсващо/забавено пубархе, на фона на нормални серумни АСТН нива (Taha, 2005, Arnhold, 1998). Поради широката експресия на PRL рецептора по протежение на кората на надбъбречната жлеза, от една страна, и увеличеното освобождаване на хипоталамичен кортикостероид освобождаващ хормон (КРХ) под действието на PRL, от друга, Таһа и колеги смятат, че дефицитът на PRL стои в основата на забавеното/липсващо адренархе/пубархе. По отношение на размера на предния дял на хипофизата също се наблюдава вариабилност при различните пациенти. При изследване на хипоталамо-хипофизарната област може да

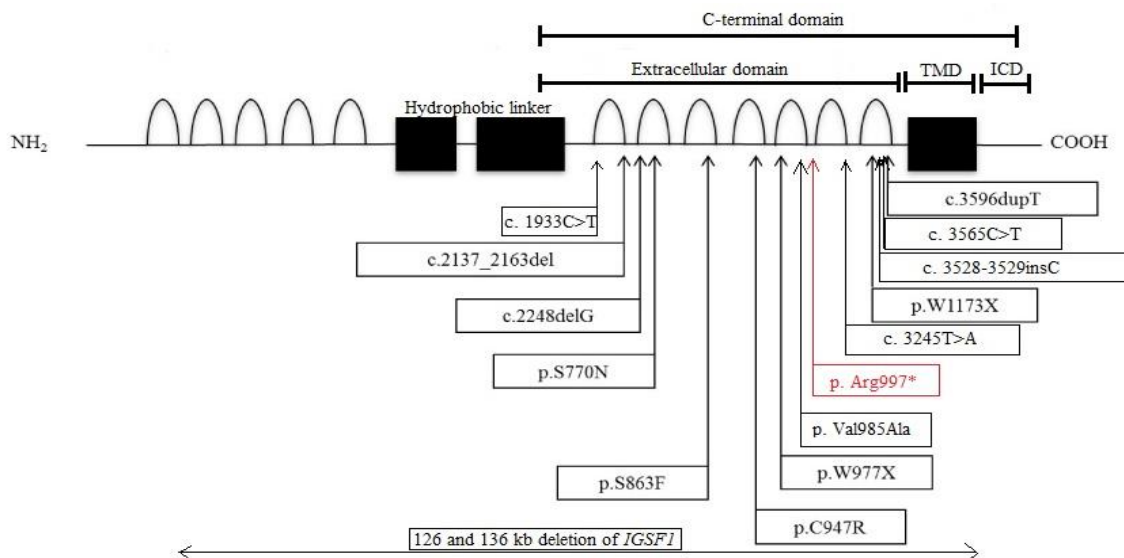
се открие както високостепенна хипоплазия, така и гранични или нормални размери на аденохипофизата.

### 3.2.3. Нови гени, включени в етиологията на вродения хипопитуитаризъм

#### 3.2.3.1. *IGSF1*

Генът *IGSF1* (*Immunoglobulin Superfamily Member 1*; OMIM 300137) се намира в X-хромозомата (Xq25) и съдържа 19 екзона (Frattini, 98). Кодира гликопротеин, приналежащ към Plasma membrane immunoglobulin superfamily. Екстрацелуларната част на протеина *IGSF1* съдържа 12 имуноглобулин (Ig)-подобни бримки от типа C2. Следва трансмембранен домейн и къса интрацелуларна част в карбокси-края. Протеинът подлежи на посттранслационна протеолиза между бримка 5 и 6, вследствие на което карбокси-краят заедно с бримки 6-12 преминава плазмената мембрана (Маззарелла, 98; Фратини, 98).

**Фигура 13.** Структура на протеина *IGSF1* с местоположението на известните мутации (по Tijama, 2014). В червено е отбелязана откритата в настоящото проучване мутация

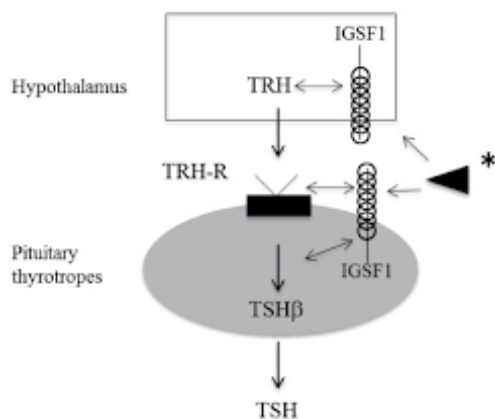


През 2012 година Sun и колеги изследват функцията на хипофизната и щитовидната жлеза при мутантни миши модели от мъжки пол. Те откриват признаци на централен хипотиреоидизъм: значително намалени серумни и питуитарни нива на TSH, ниски нива на T3, за разлика от T4 или FT4, които са съпоставими с тези на контролите. Гените, кодиращи питуитарни хормони, включително и *Tshb*, се експресират нормално. Доказани са, обаче, понижени нива на експресия на рецептора на Trh в хипофизата, в съчетание с повишени нива на Trh в хипоталамуса. Нивата на GnRh-рецептора в

хипофизата са били нормални. В допълнение, мутантните мишки са били по-тежки, но с нормален размер на тестисите и фертилни.

**Фигура 14.** Нарушена TRH сигнална трансдукция при мутация в IGSF1

(Тіјана, 2014)



Sun и колеги доказват и експресия на *IGSF1* гена в джоба на Rathke, зряла хипофиза и тестис при човек. Те откриват 8 различни мутации при 11 различни семейства от Холандия, Дания, Англия и Италия. Съобщени са и поне 7 пациента от Япония. Основните клинични характеристики на т.нар. синдром на дефицит на IGSF1, са вроден централен хипотиреоидизъм и макроорхидизъм. При изследваните пациенти се намират с различна честота и допълнителни белези на синдрома като дефицит на PRL (69%), частичен и транзитoren дефицит на PХ (22%); дисхармонично пубертетно развитие – нарастване на тестикуларния обем в нормалната за това възраст, съчетано със забавено покачване на серумния тестостерон; затлъстяване (90%). Има съобщения за изключения от описания фенотип: много ранно начало на увеличаване на обема на тестисите (3 години и 6 месеца) при двама братя от Холандия и пациент от Япония, при когото се открива нормален обем на тестисите. Asakura и колеги, 2015 година, обобщават фенотипно описаните пациенти от Япония и откриват, че всички са родени големи за гестационната възраст. Те изказват предположението, че феталният свръх-растеж е специфичен белег на синдрома на дефицит на IGSF1. От образно изследване на главен мозък се откриват както нормална находка, така и разнообразна патология, включваща фронтопариетална хигрома, хипоплазия на corpus callosum, изтънен или прекъснат инфундибулум и ектопична неврохипофиза при един пациент.

### III. ПРЕДИШНИ БЪЛГАРСКИ ИЗСЛЕДВАНИЯ

Лечението с PХ при пациенти с хипосоматотропизъм в България е въведено в края на 60-те години на миналия век от педиатри-ендокринолози (Пенева, 1984). Богатият им

опит е обобщен през 1984г. с фокус върху честотата на хипосоматотропизма, клиничната и хормоналната му характеристика, критериите за диагноза и оценка от резултатите лечението с чРХ. Включени са 140 деца и юноши с хипофизарен нанизъм на възраст от 1 до 24 години.

В България понастоящем се реимбурсира напълно лечението с рекомбинантен растежен хормон при пациенти до 18 години със следните диагнози: хипопитуитаризъм, синдром на Turner, синдром на Prader-Willi, хронична бъбречна недостатъчност. Дългогодишният опит е обобщен в редица дисертационни трудове /Стефанова, Митева, Тинчева, Стоева, Авджиева/. Във фокуса на ИДРХ тип II е дисертацията на Д. Илиев, 2005 г.

Лечението с rhGH се е провеждало централизирано в СБАЛДБ, София до 2012 г. Покъсно са се оформили три центъра за лечение с rhGH: СБАЛДБ-София, болница „Св. Марина“, Варна за пациенти под 18 години, и УСБАЛЕ „Акад. Иван Пенчев“, София за пациенти над 18 годишна възраст с вродени форми на хипопитуитаризъм, диагностицирани и лекувани още преди навършване на 18 години /Узунова, Кирилов/.

През 2001 година е проведено проучване от И. Стоева за установяване на честотата на мутации на *PROPI* гена сред 41 български пациенти с МТД. В изследването са били заложили два задължителни критерии на включване: 1. хипосоматотропизъм с поне един съпътстващ хипофизарен дефицит и 2. патологична находка от ЯМР на хипоталамус-хипофизарна област. Молекулярно-генетичният анализ на *PROPI* гена е проведен в три стъпки: 1. Bcg1 рестриктазна реакция като скрининг за известната като мутационен “hot-spot” в Европа 301-302delAG; 2. SSCP; 3. директно секвениране на трите екзона на *PROPI* гена в последователност – екзон 2, последван от екзон 1 и 3.

Един от изводите на проучването е, че най-честата *PROPI* мутация в България се различава от съобщаваната за мутационен “hot-spot” в Европа 301-302delAG.

#### **IV. ПРОМЯНА НА КРИТЕРИИТЕ И СТРАТЕГИЯТА**

Българската популация се характеризира с изключителна генотипна хетерогенност, поради което предполагаме, че съществува възможност за разкриване на по-широк спектър от мутации в *PROPI* гена. В зависимост от алелната им честота се създава възможност за изработване на променена, по-ефективна стратегия на молекулярно-генетичен анализ на *PROPI* гена при български пациенти. Освен това разширяването на

фенотипа, изразяващо се във включване на пациенти с изолиран ДРХ или нормална находка от ЯМР на хипоталамо-хипофизарната област, би могло да повиши процента на откриване на пациенти с мутация в този ген, още преди клиничната изява на съпътстващите хипофизарни дефицити.

Във връзка с това, в настоящото проучване бе заложен единствен задължителен критерий на включване: хипосоматотропизъм. Премина се от три-стъпална към дву-стъпална стратегия на провеждане на молекулярно-генетичен анализ на *PROPI* гена: 1. *Vsg1* рестриктазна реакция като скрининг за мутацията 301-302delAG и 2. директно секвениране на трите екзона на *PROPI* гена в последователност – екзон 2, последван от екзон 1 и 3. В съответствие с подход, базиран на фенотипа, при пациентите без доказана мутация в *PROPI* гена се премина към изследване на следващите кандидат-гени: *POU1F1*, *HESX1*, *SOX2* и *SOX3*.

Двама от пациентите с комплексен фенотип, при които не се откри мутация в нито един от секвенираните гени, се подложиха на цялостен геномен скрининг чрез сравнителна геномна хибридизация. При тях се доказаха синдромни заболявания, чиито фенотипни характеристики бяха разширени чрез нашето проучване. Също така се доказаха нови етиологични причини на хипосоматотропизъм като част от СОД.

# ГЛАВА ВТОРА

## ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

### I. ЦЕЛИ

1. Проучване на участието на хипофизарни транскрипционни фактори в етиологията на множествения тропен дефицит при български пациенти.
2. Анализ на взаимоотношенията генотип-фенотип при български пациенти с доказана *PROPI* мутация.

### II. ЗАДАЧИ

1. Подбор на кандидати за молекулярно-генетичен анализ на *PROPI* въз основа на разширен фенотип със задължителен критерий – степенно различен дефицит на РХ.
2. Установяване на общата честота и разпределението на мутациите в гена кодиращ *PROPI* сред български пациенти с хипосоматотропизъм.
3. Анализирание на клиничния фенотип спрямо доказанния *PROPI* генотип.
4. Ревизия на използваната стратегия на провеждане на молекулярно-генетичен анализ на *PROPI* гена.
5. Въвеждане на молекулярно-генетичния анализ на *PROPI* в рутинния диагностичен алгоритъм при пациенти с вроден хипосоматотропизъм, с или без съпътстващи дефицити.
6. Оформяне на група пациенти за молекулярно-генетичен анализ на други кандидат-гени, кодиращи хипофизарни транскрипционни фактори: *POUIF1*, *HESX1*, *SOX2*, *SOX3*, *IGSF1* при пациенти без установена *PROPI* мутация.
7. Изследване на цялостния геном при пациенти с комплексен фенотип, включващ екстрапитуитарни аномалии.

# ГЛАВА ТРЕТА

## МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ НА ИЗСЛЕДВАНЕ

### I. МАТЕРИАЛ

#### 1. Дизайн на проучването

Проучването се проведе в три основни етапа:

- Първи етап: Молекулярно-генетичен анализ на пациенти, селектирани за *PROPI* гена

Този етап бе осъществен в две стъпки: 1. в рамките на проект „Грант“ №57/2011, по линия на Медицински Университет София, в сътрудничество с Национална Генетична Лаборатория бяха включени 40 пациенти; 2. след включването на молекулярно-генетичен анализ на *PROPI* гена в рутинната диагностика, бяха изследвани още 16 пациента.

- Втори етап: Молекулярно-генетичен анализ на пациенти, селектирани за гените *POUIF1*, *HESX1*, *SOX3*, *SOX2*, *IGSF1*, при отрицателен резултат от скрининга на *PROPI* гена или комплексен фенотип.
  - Гените *POUIF1*, *HESX1* и *SOX3* бяха изследвани в рамките на проект „Грант“ №58/2012 към Медицински Университет София, в сътрудничество с Център по Молекулярна Медицина, катедра Биохимия, Медицински Университет София.
  - Генът *SOX2* бе изследван по проект „Млад изследовател“ №27-Д, по линия на Медицински Университет София, в сътрудничество с Център по Молекулярна Медицина, катедра Биохимия, Медицински Университет София.
  - Генът *IGSF1* бе изследван в сътрудничество с J.M. Wit генетична лаборатория Лайден, Холандия.
- Трети етап: Скрининг на цялостния геном при пациенти с комплексен фенотип, с отрицателни резултати от скрининга на питуитарни транскрипционни фактори.

Изследването на цялостния геном чрез сравнителна геномна хибридизация бе осъществено в рамките на проект „Млад изследовател“ №41-Д, по линия на

Медицински Университет София, в сътрудничество с Център по Молекулярна Медицина, катедра Биохимия, Медицински Университет София.

## 2. Изследвани пациенти

В изследването бяха включени общо 67 пациенти с доказан хипосоматотропизъм от 66 отделни семейства. Двама от пациентите са родственици от първа степен (брат и сестра). При едно от семействата има известен консангвинитет (родителите са 3<sup>ти</sup> братовчеди).

В проучването се включиха както пациенти в детска възраст, така бивши пациенти на клиниката по Ендокринология, диабет и генетика в СБАЛДБ София, които вече се проследяват от специалисти ендокринолози. Разпределението по пол и възраст представено в табл.4

Таблица 4. Възрастово и полово разпределение на изследваните пациенти. Възрастта е посочена в десимали.

	Общо пациенти	Момчета под 18 години	Момчета под 18 години	Жени над 18 години	Мъже над18 години
Брой	67	18	34	5	10
Средна възраст	14.5	11.6	11.5	27.2	26.6
Медиана	12.0	10.2	11.2	26.0	26.0
Обхват	0.08-39.6	1.88-17.6	0.08-17.6	23-30.2	19-39.6

## 3. Подбор на кандидати въз основа на фенотипната характеристика, преди започването на лечение с рекомбинантен човешки растежен хормон. Критерии за включване и изключване от изследването

### 3.1. Задължителен критерий за включване в проучването: доказан хипосоматотропизъм

- Фенотипни белези на дефицит на растежен хормон (РХ): пропорционален нисък ръст, миловидно лице с изпъкнало чело, изгладена основа на носа, хипоплазия на срединните лицеви структури, преразпределение на мастната тъкан с предилекционно натрупване по трункуса, акромикрия, крипторхизъм и/или микропенис при момчета, без засягане на интелекта.
- Ауксология: Ръстът се анализира по два метода: 1. върху перцентилни криви; 2. като индекс на стандартно отклонение (SDS), като интерпретацията е направена според лонгитудиналните нормативи на

Prader<sup>(Prader, 52)</sup>, тъй като съществуващите български нормативи за линейрен ръст са резултат от трансверзални проучвания<sup>(Станимирова, 97)</sup>. Нисък ръст и/или изоставане в растежа се приемат при:

- SDS  $\leq$  -2; съответно под трети перцентил;
  - ръст, несъответно по-нисък от среднородителския;
  - Децелерация на линейрния ръст със смяна на растежен канал към по-нисък.
- Костна възраст (КВ), изоставаща от календарната с повече от 1 година: изследва се чрез рентгенография на лява китка, като интерпретацията се извършва по атласа на Greulich и Pyle<sup>(Greulich, 86)</sup>.
  - Изследвания, насочени към изключване на не-ендокринни заболявания, причини за нисък ръст.
  - Ендокринна диагностика:
    - Изключване на централен хипотиреоидизъм;
    - Изследване на инсулиноподобен растежен фактор (IGF1) и неговия свързващ протеин 3 (IGFBP3);
    - Функционални тестове за стимулиране секрецията на растежен хормон с фармакологични субстанции: глюкагон, инсулин, аргинин хидрохлорид, както и с физическо натоварване. За диагностициране на дефицит на РХ са проведени най-малко два теста, най-често един фармакологичен тест с Insulin и/или Arginin HCL, и физическо натоварване (табл. 5).

### *3.2. Допълнителни критерии за включване в проучването*

- Централен хипотиреоидизъм:

Насочващи симптоми са суха, иктерична кожа, сънливост, брадикардия, брадипсихия, разреждащи се дефекации и др. Решаващи за диагнозата са ниските серумни нива на периферните тиреоидни хормони. Базалните нива на TSH могат да бъдат повишени,

понижени или нормални, а стимулираният отговор към TRX може да бъде различен (вторичен и третичен хипотиреоидизъм).

- Нарушения в секрецията на пролактин.

При децата с генетична форма на хипопитуитаризъм няма клиничен корелат на пролактиновия дефицит.

- Дефицит на гонадотропни хормони:

Към диагнозата хипогонадотропен хипогонадизъм (XX) насочват някои данни от анамнезата като крипторхизъм и микропенис, забавяне на растежната скорост в пубертетна възраст в съчетание с липсата на вторични полови белези. Вече отключен пубертет, който не прогресира също насочва към XX.

Доказателно за XX е серумната хормонална констелация от ниски периферни нива на полови хормони (тестостерон/естрадиол) и ниски, респективно недоловими нива на гонадотропни хормони, доказват XX. Поради липса на LH-RH в страната, освен дългодействащи агонисти, стимулационни тестове за обективно доказване на XX не са провеждани при повечето пациенти с хипосоматотропизъм. По литературни данни стимулационният тест с LH-RH би могъл да бъде заместен с измерване на базални нива на антимюлеров хормон (АМН) и инхибин b, в съчетание с базални нива на гонадотропни и периферни полови хормони (Grinspon, 2011, Coutant, 2010). Този подход прави по-лесна диагнозата на XX в неонатална и предпубертетна възраст. В тази връзка изследвахме базални стойности на АМН и инхибин b при 44 от пациентите с хипосоматотропизъм в различна възраст.

- Дефицит на АСТН:

Съмнение за вторичен хипокортицизъм е налице при анамнеза за отпадналост, гадене, коремни болки, повръщане, хипогликемии, хипотензия, засилване на симптомите при стрес като инфекции, операции, травми и др. Ниските нива на кортизол в серум и слюнка, понижена 24-часова кортизолова екскреция, доказват вторичен хипокортицизъм. Стимулационни тестове с кортиколиберин не са провеждани поради липсващо разпространение в аптечната мрежа на страната. При провеждане на тест с ИИХ може да се изследва стимулираната секреция на кортизол.

- Патологична находка от ЯМР на хипоталамо-хипофизарна област:

Патологичната находка в съчетание с ДРХ има ключово значение за поставяне на диагнозата, лечението и подбора на кандидати. Най-голямо значение за интерпретацията имат:

- Размер и структура на аденохипофизата
- Размер и разположение на неврохипофизата;
- Размер и структура на инфундибулума;
- Характеристика на очната хиазма и зрителните нерви.
- Участие на срединните мозъчни структури, като septum pellucidum, corpus callosum, corpus callosum, corpus callosum и др.

При част от пациентите се обективизира нормална ЯМР находка на хипоталамо-хипофизарната област. При някои от пациентите не бе налично ЯМР изследване за интерпретация.

### *3.3. Критерии за изключване от изследването*

- Придобит хипопитуитаризъм в резултат на тумор, възпаление, травма;
- Липса на информирано съгласие.

## **4. Методи**

### *4.1. Ендокринна диагностика*

Серумът на пациентите е отделен след престой на пробите на стайна температура за един час и последващо центрофугиране на 5000 оборота. Всички проби са съхранявани на температура -20 градуса докато бъдат подложени на анализ според инструкциите на производителя.

#### *4.1.1. Определяне на базални серумни нива*

- РХ

За определянето на серумните нива на РХ е DELFIA® (PerkinElmer, Finland) флуоримунометричен анализ, базиран на директен „сандвич“ метод. Анализът е калибриран по международния стандарт на Световната здравна организация (WHO) 80/505. Кръстосана реактивност с hLH е 0.1 %, hTSH, hFSH - < 0.001 %. Коефициентът

на вариация за inter assay е 4.9 %, а за intra assay – 3.7 %. Обхватът на теста е от 0.1 mU/l до 100 mU/l. Коефициент на превръщане – 1 ng/ml = 2.6 mU/l.

- IGF1

- Имуноензимен анализ с блокиране на IGF1-свързващите протеини (IGF-I – ELISA; Mediagnost, Germany), калибриран по международния стандарт WHO NIBSC 02/254. Извършва се дисоциация на IGF1 и IGF1-свързващите протеини чрез подкисляване (pH<3.1), последвана от неутрализиция (pH=7), при която свободните свързващи протеини се захващат за IGF II. Методът се базира на принципа на индиректната „сандвич“ ELISA. Кръстосаната реактивност с IGF-II е „екстремно ниска“, а за тази с растежен хормон и инсулин не се предоставят данни. Коефициентът на вариация за inter assay в 6.8%, а за intra assay 6.7%. Обхватът на теста е от 42 ng/ml до 1050 ng/ml.

- Имуноензимен метод с етанолна екстракция (IGF1-ELISA, Diasource ImmunoAssays S.A.), калибриран по международния стандарт WHO NIBSC 02/254. Извършва се дисоциация на IGF1 и неговите свързващи протеини с кисело-етанолен буфер (William Daughaday, 1980) и преципитация на свързващите протеини. Принципът на анализа е директната конкурентна ELISA. Кръстосаната реактивност с IGFII е 0.7%, а за тази с растежен хормон и инсулин не се предоставят данни. Коефициентът на вариация за inter assay в 6.1%, а за intra assay 12.9%. Стандартната крива обхваща концентрации от 10 ng/ml до 760 ng/ml.

- IGFBP3

Имуноензимен метод (IGFBP-3-ELISA, Diasource ImmunoAssays S.A.), калибриран по международния стандарт WHO NIBSC 93/560. Анализът се извършва на принципа на директната „сандвич“ ELISA. Кръстосаната реактивност с IGF1, IGF-II, IGFBP1, IGFBP2, IGFBP4-6 не се установява. Коефициентът на вариация за inter assay в 6.2%, а за intra assay 5.1%. Стандартната крива обхваща концентрации от 460 ng/ml до 16070 ng/ml.

- TSH – отложена във времето имунофлуориметрия DELFIA® (PerkinElmer, Finland)

Тестът е базиран на директен „сандвич“ метод. Анализът е калибриран по международния стандарт на WHO NIBSC 81/565. Кръстосана реактивност с hLH е 0.03

%, hCG, hFSH - < 0.005 %. Коефициентът на вариация за inter assay в 3.1 %, а за intra assay 2.1 %. Обхватът на теста е от 0.03 mU/l до 100 mU/l.

- Свободен T4 – отложена във времето имунофлуориметрия DELFIA® (PerkinElmer, Finland)

Тестът е базиран на принципа на обратното титруване. Анализът е калибриран по международния стандарт на WHO 80/505. Кръстосана реактивност с D-Thyroxine 30.1%; LT3 – 0.9%; DT3 – 0.4% Коефициентът на вариация за inter assay в 4.1%, а за intra assay 3.0 %. Обхватът на теста е от 2.8 mU/l до 80 mU/l.

- Свободен T3 – отложена във времето имунофлуориметрия DELFIA® (PerkinElmer, Finland)

Принципът на теста е аналогичен на този на FT4. Анализът е калибриран по международния стандарт на WHO 80/505. Кръстосана реактивност с Triiodothyroacetic acid - 103%; T3 – 100%. Коефициентът на вариация за inter assay в 5.6%, а за intra assay 6.8 %. Обхватът на теста е от 2.7 mU/l до 75 mU/l.

- FSH – отложена във времето имунофлуориметрия DELFIA® (PerkinElmer, Finland)

Тестът е базиран на директен „сандвич“ метод. Анализът е калибриран по международния стандарт на WHO 80/505. Кръстосана реактивност с hLH <0.2 %, hTSH < 0.7 %. Коефициентът на вариация за inter assay в 2.0 %, а за intra assay 2.8 %. Обхватът на теста е от 1 U/l до 256 U/l.

- Естрадиол – отложена във времето имунофлуориметрия DELFIA® (PerkinElmer, Finland)

Тестът е базиран на директен „сандвич“ метод. Анализът е калибриран по международния стандарт на WHO 80/505. Кръстосана реактивност с 16-Oxoestradiol е 0.9%; Estrone – 0.75%; Estriol – 0.4%. Коефициентът на вариация за inter assay в 5.1 %, а за intra assay 5.0 %. Обхватът на теста е от 13.6 pg/ml до 4086 pg/ml.

- Антимюлеров хормон – „сандвич“ ELISA (AMH Gen II, Beckman Culter)

AMH от пациентските проби се свързва с имобилизирани анти-AMH антитела. Прибавя се специфично антитяло, белязано с биотин, както и стрептавидин-

пероксидаза-ензим конюгат, който се залавя за комплексите АТ-АГ-АТ. Чрез добавянето на субстрат на ензима протича цветна реакция и се измерва абсорбцията. Обхватът на теста е от 0.16 ng/ml до 22.5 ng/ml. Изчислен intra assay CV 9.3%. Фактор на превръщане 1 ng/ml = 7.14 pmol/ml.

- Инхибин b - „сандвич” ELISA (Inhibin B Gen II, Beckman Culter)

Инхибин b от пациентските проби се свързва с имобилизирани анти-Activin B антитела. Прибавя се специфично анти-инхибин  $\alpha$  антитяло, белязано с биотин, както и стрептавидин-пероксидаза-ензим конюгат, който се залавя за комплексите АТ-АГ-АТ. Чрез добавянето на субстрат на ензима протича цветна реакция и се измерва абсорбцията. Обхватът на теста е от 10 pg/ml до 1000 pg/ml. Изчислен intra assay CV 9.6%.

- Определяне на кортизол в серум:

Тестът се базира на директна конкурентна ELISA (DIAsource Immuno assays SA, Belgium). Анализът е калибриран по международния стандарт на WHO 80/505. Кръстосана реактивност с Prednisolone 13.6%; Corticosterone – 7.6%; Deoxicorticosterone – 7.2%; Prednisone – 5.6%; Dexamethasone – 1.6%. Коефициентът на вариация за inter assay в 5.0%, а за intra assay 5.0%. Обхватът на теста е от 0.5  $\mu$ g/dl до 60  $\mu$ g/dl.

#### 4.1.2. Функционална ендокринна диагностика

- Тестове за стимулиране секрецията на РХ.

При деца под 1-годишна възраст серумните нива на РХ се изследват при спонтанна хипогликемия, без провеждане на стимулационен тест.

**Таблица 5.** Описание на използваните тестове за стимулация секретията на РХ (базирана на Ranke, 2005).

Стимул	ИИХ	Arginin HCL	Glucagon	Физическо натоварване
<b>Подготовка</b>	1. Гладуване поне 12 часа преди започване на теста. 2. Поставяне на абокат 30 минути преди взимане на проба 0'; 3. Постоянен покой по време на подготовката и провеждането на теста			
<b>Механизъм на стимулация на секретията на РХ</b>	Чрез инхибиране на GHRH, както и потискане на $\alpha$ -адренергичните рецептори	Посредством $\alpha$ -адренергични рецептори и последващо освобождаване на GHRH	Посредством $\alpha$ -адренергични рецептори	Предполагат се адренергични механизми
<b>Процедура</b>	Инфузия на бързодействащ инсулин 0.05-0.15 IU/kg т.м.	Инфузия на 10% Arg HCL в 0.9% NaCl за 30 мин. Доза 0.5 g/kg т.м. (max 30 g)	0.1 mg/kg т.м. i.m или s.c.	Форсирано изкачване на стълби за 10 мин
<b>Пробовзимане</b>	-30,0, 15,30, 45,60, 90, 120	-30, 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120	-30, 0,60, 90, 120, 150, 180	0, 10-20
<b>Очакван пик в секретията на РХ</b>	Пик на РХ ~60'; най-ниското ниво на КЗ ~30'	~ 60' от началото на инфузията	~120' от поставянето на инжекцията	15-20 от началото на натоварването
<b>Странични ефекти</b>	Хипогликемия хипокалиемия	Възможно е гадене при побърза от 30' инфузия	При мускулни инжекции може да се наблюдава гадене, повръщане, абдоминални болки	В зависимост от физическото състояние на детето; не се очакват
<b>Забележка</b>	За необходимата стимулация на РХ е необходимо поне 50% спадане на изходното ниво на КЗ			

- Тест за стимулация на TSH.

Секретията на TSH се стимулира чрез болусна интравенозна инжекция на 5-7  $\mu\text{g/kg}$  TRH. Проби за измерване на нивото на TSH се взимат на минута -30, 0, 30, 60, 120 от началото на теста. Подготовката за теста вж табл. 1.

Ако има нарушена секреция на TSH се наблюдава малка или липса на стимулация на секретията с платовидна крива. Ако нарушението е хипоталамично (третичен хипотиреоидизъм) се очаква късен пик в секретията на TSH на или след 60<sup>та</sup> минута (Ranke, 2011). При провеждане на теста може да се изследва и динамиката на стимулация на PRL.

- GnRH стимулационен тест

Секретията на гонадотропини се стимулира от болусна инжекция на 100  $\mu\text{g}$  на GnRH. Проби за измерване на гонадотропини се взимат на -15 и 0 минута (базални нива),

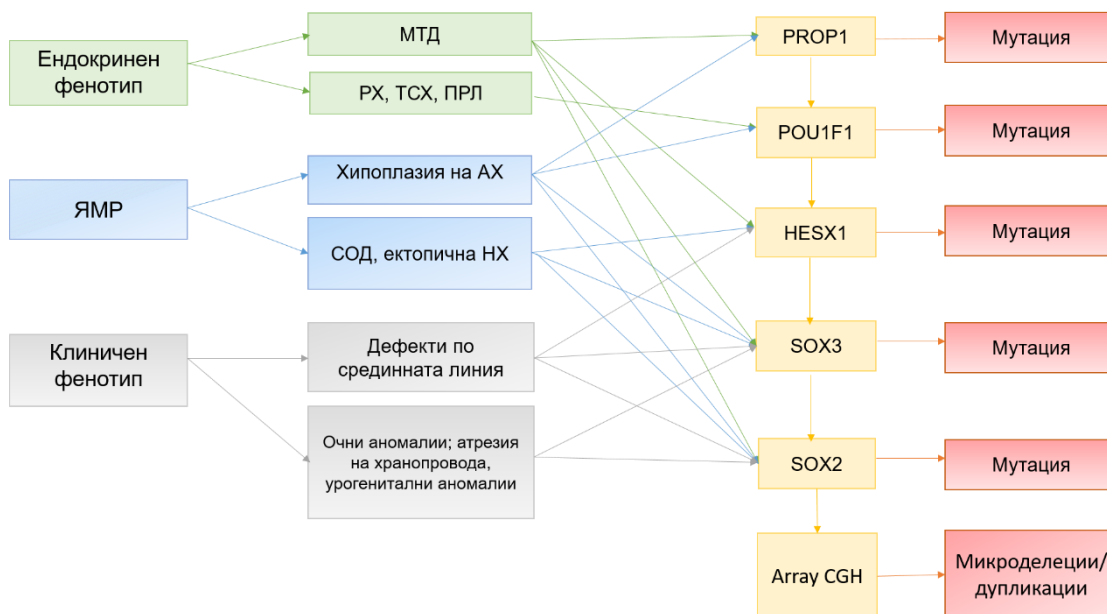
последвани от 15, 30, 45, 60, 90 и 120 минута от началото на теста. Подготовката за теста вж табл. 1 (Ranke, 2011).

- Тест с Pregnyl. 3x500E
- Прайминг с полови стероиди

#### 4.2. Молекулярно-генетични изследвания

Алгоритъмът за подбор на кандидатите за молекулярно-генетично изследване на определен ген се основава на клиничен фенотип, ендокринната констелация и находката от ЯМР. При наличие на хипосоматотропизъм с или без съпътстващ дефицит, в съчетание с хипоплазия на аденохипофизата първият кандидат-ген е PROP1. Ако не се установи мутация, следващият кандидат-ген е POU1F1. При хипоплазията на аденохипофизата, съчетана с ектопична или липсваща неврохипофиза, септооптична дисплазия, дефекти по срединната линия, кандидат-гени са HESX1, SOX2, SOX3.

**Фигура 15.** Алгоритъм за подбор на кандидати за изследване на определен ген. МТД – множествен тропен дефицит, СОД – септооптична дисплазия, АХ – аденохипофиза, НХ – неврохипофиза



##### 4.2.1. Изолиране на ДНК

След информирано съгласие, геномна ДНК се изолира от левкоцити в периферна кръв, чрез кит за изолиране на ДНК NucleoSpin Blood, MACHEREY-NAGEL (Dueren, Germany), според инструкциите на производителя. Концентрацията на добитата ДНК 40-80 ng/ml.

#### 4.2.2. Мутационен скрининг за PROP1

Всички пациенти са подложени най-напред на молекулярно-генетичен анализ на екзон 2 на PROP1, състоящ се от две стъпки: 1. BcgI рестрикционна реакция като скрининг тест за най-честата мутация 301-302 delAG и 2. директно секвениране. В случай, че не се докаже мутация се преминава към директно секвениране на екзон 1 и екзон 3. Използваните праймери за амплифициране на екзоните на PROP1 са показани в табл. 6.

**Таблица 6.** Използвани праймери за PCR на PROP1

	Праймери	Tm [°C]	Източник
Екзон 1	F1- TTCAGAGACAGAGTCCCAGA	60	Deladoey, 98
	R1- CTCCTAACCTTCTTCATGGA		
Екзон 2	F2- GCACATGTGGTCCA	60	Deladoey, 98
	R2- AGGCCTGTGTCTGGTGACCA		
Екзон 3	F3- CTCTTGTCATTGGAGTAGGGTGTCA	60	Voutetakis, 204
	R3- CAGACTTCCTCCACTAATCACCCCA		

- Амплифициране на екзон 2:

Условията на реакцията са:

	PROP1								
	Exon 2			Exon 1			Exon 3		
DNA	4 µl			4 µl			4 µl		
Buffer (Prime)	10 µl			10 µl			10 µl		
dNTP (Prime)	0.6 µl			0.6 µl			0.6 µl		
Primer forward	0.6 µl			0.6 µl			0.6 µl		
Primer reverse	0.6 µl			0.6 µl			0.6 µl		
Taq polymerase (Prime)	0.06 µl			0.06 µl			0.06 µl		
dH2O	4.74 µl			4.74 µl			4.74 µl		
volume	20 µl			20 µl			20 µl		
Denaturation	94 °	5 min	35 cycles	94 °	5 min	35 cycles	94 °	5 min	35 cycles
Denaturation	94 °	40 sec		94 °	40 sec		94 °	40 sec	
Annealing	60 °	30 sec		60 °	30 sec		60 °	30 sec	
Extention	72 °	40 sec		72 °	40 sec		72 °	40 sec	
Final extention	72 °	5 min		72 °	5 min		72 °	5 min	

- Ензимен рестрикционен анализ с Bcg1:

Реакцията се извършва с 12.5 µl амплификационен продукт, 2 µl буфер, 2 µl рестрикционен ензим Bcg1, 1 µl Sandenosylmethlonine, 2.5 µl дестилирана вода. Миксът се поставя на 37° за 10 часа. Резултатът се визуализира на UV светлина след електрофореза на 4% агарозен гел.

Секвенционната реакция на всички екзони на PROP1 се извърши при едни и същи условия, според инструкциите на производителя на секвенатора (ABI Prism 310 Genetic Analyser; Applied Biosystems, Boston, MA), използвайки същите прав или обратен праймер. Изследването протича в четири етапа: пречистване, амплификация, преутаяване и капилярна електрофореза. Пречистването на амплификационен продукт 1.5 µl, ExoSap (Fermentas) 0.6 µl, TE буфер 0.6 ml, които се поставят за 30 минути на 37°, последвани от 15 минути на 80°. Към пречистения продукт се прибавя прав праймер за амплификация при следните условия: 5' начална денатурация на 90°C, 30 цикъла на: денатурация за 30'' на 95°C, анийлинг за 40'' на 62°C, елонгация за 30'' на 72°C и крайна елонгация за 5' на 72°C.

#### 4.2.3. Мутационен скрининг за *POU1F1*, *HESX1*, *SOX3*, *SOX2*

Използваните праймери са представени в табл. 7.

**Таблица 7.** Използвани праймери за амплификационна реакция на *POU1F1*, *HESX1*, *SOX3*, *SOX2*

	Праймери	Температура на хибридизация	Източник
<b><i>POU1F1</i></b>			
Екзон 1	F1- ATCGGCCCTTTGAGACAGTAA	58 °	Miyata, 2006
	R1- CCCGGTCATATGTAAACTG		
Екзон 2	F2- TTTCTCGGTGACAACGTTG	58 °	Miyata, 2006
	R2- GTGTCCCCAAATTCAATAAC		
Екзон 3	F3- AAGGAGAATGACAAATGGTC	62 °	Miyata, 2006
	R3- AAGTTCTTTTCCTGTTGCC		
Екзон 4	F4- AAAGTTGGAGCTGATGGTC	58 °	Miyata, 2006
	R4- CACAGCCTTCAGAGACAC		
Екзон 5	F5- TTTGTAATTATCTCTTTTCC	58 °	Miyata, 2006
	R5- TACACTCAAATGCTCATTCC		
Екзон 6	F6- AATTTCACCCCCTATGTCC	58 °	Miyata, 2006
	R6- GAAACGGGAGAAAAAGGCT		
<b><i>HESX1</i></b>			
Екзон 1	F1- AGCTGTTGCTCTGTGCAGACCACGAGA	63 °	Cruz, 2010
	R1- ACAAAGAATTGAAACAATTAAGCTGTGGCA		
Екзон 2	F2- TTGACCATCTAAGACAGGGC	63 °	Cruz, 2010
	R2- AAGTGAGTGGGCTTTTGCTC		
Екзон 3+4	F3- GAGCAAAAGCCCACACTCACTT	63 °	Cruz, 2010
	R3- CCACTGATTCTTCATGCTCT		
<b><i>SOX3</i></b>			
Участък 1	F1- TCACTGCGAACCTGTCAATC	64,3	Собствени
	R1- GCTTGTGTGGGTGTCCCTAC		
Участък 2	F2- GGAGACTGAACTCAAGAACC	60,8	Собствени
	R2- CTCCTGCACCAGCGAGTA		
Участък 3	F3- AACCCCAAGATGCACAATTC	60,0	Собствени
	R3- CTCCTGCACCAGCGAGTA		
Участък 4	F4- AACCCCAAGATGCACAATTC	60,0	Собствени
	R4- GGTGGCAGGTACATGCTGAT		
<b><i>SOX2</i></b>			
Участък 1	F1- CTGATTTTCCTCGCGGAGC	56	Wang, 2008
	R1- ATGCTGATCATGTCCCGGA		
Участък 2	F2- CAAGACGCTCATGAAGAAGG	62	Wang, 2008
	R2- ATGCTGATCATGTCCCGGA		
Участък 3	F3- ATGCACCGCTACGACGTGA	61	Wang, 2008
	R3- CCATGCTGTTTCTTACTCTCC		

Амплификационната реакция за всички екзони на *POU1F1*, както и всички екзони на *HESX1* се проведе при едни и същи условия:

	POU1F1			HESX1		
DNA,	2 µl			2 µl		
Buffer (Prime)	1 µl			1 µl		
dNTP (Prime)	0.4 µl			0.4 µl		
Primer forward	0.4 µl			0.4 µl		
Primer reverse	0.4 µl			0.4 µl		
Taq polymerase (Prime)	0.05 µl			0.05 µl		
dH <sub>2</sub> O	5.75 µl			5.75 µl		
volume	10 µl			10 µl		
Denaturation	94 °	10 min		94 °	10 min	
Denaturation	94 °	45 sec	35 cycles	94 °	45 sec	35 cycles
Annealing	63 °	35 sec		t °	35 sec	
Elongation	72 °	50 sec		72 °	50 sec	
Final extention	72 °	10 min		72 °	10 min	

Генът, кодиращ *SOX3* се състои от един екзон дълъг 1200 нуклеотидни бази. Поради големината му при провеждането на молекулярно-генетичния анализ генът се раздели на четири участъка, които обхващат цялата му дължина. В участък 3 и 4 има струпване на CG-богати участъци, което затруднява протичането на амплификационната реакция поради намалено свързване на полимеразата. Това наложи използването на допълнителни реактиви DMSO и betain. Останалите условия не бяха променени. Генът на *SOX2*, по подобие на този на *SOX3*, се състои само от 1 екзон. Поради голямата му дължина, бе разделен на 3 участъка. Амплификационната реакция се проведе при следните условия:

	SOX3						SOX2					
	Участък 1		Участък 2		Участък 3 и 4		Участък 1, 2, 3					
DNA	2 µl		2 µl		2 µl		2 µl					
Buffer (Prime)	1 µl		1 µl		1 µl		1 µl					
dNTP (Prime)	0.4 µl		0.4 µl		0.4 µl		0.4 µl					
Primer forward	0.4 µl		0.4 µl		0.4 µl		0.4 µl					
Primer reverse	0.4 µl		0.4 µl		0.4 µl		0.4 µl					
Taq polymerase (Prime)	0.05 µl		0.05 µl		0.05 µl		0.05 µl					
DMSO	-		0.5		0.5		-					
Betain	-		-		2.6		-					
dH <sub>2</sub> O	5.75 µl		5.25 µl		2.65 µl		5.75 µl					
volume	10 µl		10 µl		10 µl		10 µl					
Denaturation	94 °	10 min		94 °	10 min		94 °	10 min		94 °	10 min	
Denaturation	94 °	45 sec	35 cycles	94 °	40 sec	35 cycles	94 °	40 sec	35 cycles	94 °	45 sec	35 cycles
Annealing	t °	35 sec		t °	40 sec		t °	40 sec				
Elongation	72 °	50 sec		72 °	50 sec		72 °	50 sec				
Final extention	72 °	10 min		72 °	10 min		72 °	10 min		72 °	10 min	

Секвенционната реакция на всички анализирани гени се извърши според инструкциите на производителя на секвенатора (ABI 3130XL Genetic Analyser; Applied Biosystems, Thermo scientific), използвайки същите прав или обратен праймер. Ензимното пречистване на амплификационен продукт от 1.5 µl беше направено с помощта на 0.6 µl ExoSap микс (Fermentas) и 0.6 µl дестилирана вода за 30 минути на 37°, последвани от 15 минути на 80° за инактивиране на ензимите. Към пречистения продукт се прибавят прав или обратен праймер за амплификация при следните условия: 5' начална денатурация на 95°C, 30 цикъла на: денатурация за 20'' на 95°C, анийлинг за 20'' на 57°C, елонгация за 2' на 72°C и крайна елонгация за 5' на 72°C.

#### *4.2.4. Изолране на ДНК за сравнителна геномна хибридизация*

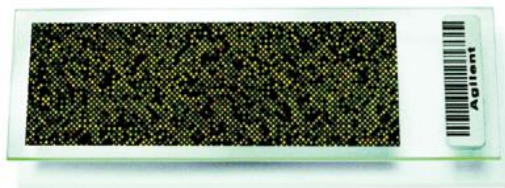
ДНК от всеки от пациентите бе изолирана от венозна кръв, с помощта на автоматична система Chemagen, по протокол и с консумативи на производителя (PerkinElmer). Отделянето на ДНК молекулите от останалите клетъчни компоненти става с помощта на магнитни частици, които се свързват с ДНК молекулите в пробата.

#### *4.2.5. Сравнителна геномна хибридизация*

Сравнителната геномна хибридизация е молекулно-цитогенетичен метод за детекция на малки (не по-малки от 100 kb) хромозомни аберации в целия геном с висока резолюция. Чрез този метод се сравнява геномът на пациента с референтен, идентифицират разликите между двата и се локализируют евентуални небалансирани промени.

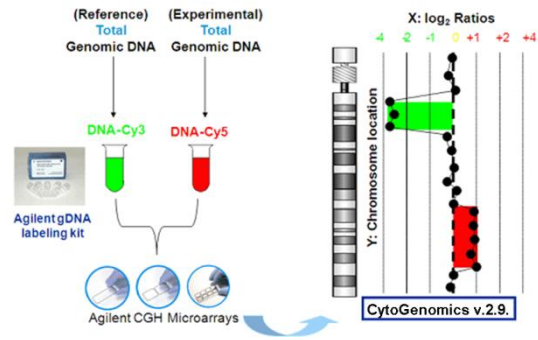
Сравнителната геномна хибридизация беше извършена с консумативи, реактиви, апарати (хибридизационна камера и скенер) и по протокол на производителя Agilent (<http://www.agilent.com/>). Използвани бяха човешки олигонуклеотидни ДНК микрочипове–SurePrint G3 Unrestricted CGH с формат 1x1M (Agilent, Санта Клара,САЩ), съвместими с Agilent скенер и софтуер, и с гъстота 974,016 секвенции, покриващи целия геном с резолюция 2,1 Кб (килобази). При настоящата работа срещу всяка ДНК на пациент е хибридизирана нормална ДНК от индивид от същия пол. Контролната проба бе ДНК от здрави индивиди от европейски произход и пол съответстващ на този на съответния пациент, осигурена от производителя Promega. Всеки микрочип е принтиран върху страната на стъклото притежаващо надписа „Agilent” и има уникален баркод в долната част на стъклото. Тази страна се нарича

„активна”. Страната от стъклото с изписан баркод върху него е „неактивната” страна на микрочипа (фиг.1).



**Фигура 16.** Визуализация на микрочип с резолюция 1x1M след проведена хибридизацията на ДНК пробите и сканиране интензитета на флуорохромиите

Подбраните пациенти бяха изследвани за наличие на големи геномни реорганизации - дупликации, делеции или инверсии благодарение прилагането на микрочиповата сравнителна геномна хибридизация. Този метод се основава на конкурентна хибридизация на алтернативно белязани с различни флуорохроми ДНК от болни индивиди и здрави контроли със синтетично синтезирани 60-мерни олигонуклетидни ДНК секвенции комплементарни на кодиращи и не-кодиращи секвенции от генома. Белязането на ДНК пробите (референтна и на пациента) беше осъществено с помощта на кита SureTag Complete DNA Labeling Kit на фирмата производител Agilent, спазвайки неговия протокол. Пречистването на белязаните ДНК проби беше осъществено с помощта на MinElute PCR Purification Кит. С помощта на използвания кит намножените ДНК фрагменти с дължина варираща от 70 bp до 4 Kb, се пречистват сместа от праймери, нуклеотиди, полимераза и соли налични в PCR реакционната смес. Пречистените и белязани с флуорохроми ДНК бяха смесени – всяка ДНК проба със съответната ѝ по пол референтната ДНК. Благодарение на кита Oligo aCGH Hybridization Kit, включващ хибридизационен буфер и блокиращ реагент, бяха хибридизирани на 57°C за 40 часа в хибридизационната камера. На четиридесетия час беше извършено промиването на чипа от нехибридизиралите ДНК-и и останалите компоненти на хибридизационната смес (фиг. 2).



**Фигура 17.** Схематично представяне на метода сравнителна геномна хибридизация

С помощта на скенираща система се документират и анализират получените данни за интензитета на светене на двата различни флуорохрома – Cy5 за пациента и Cy3 за референтната проба.

#### 4.3. Статистически методи

Прилагани са вариационен (t-тест на Student-Fisher), корелационен и графичен анализ. За статистически значима разлика се приема  $p < 0.05$ . Данните са обработени на софтуерна програма SPSS 16.

## ГЛАВА ЧЕТВЪРТА РЕЗУЛТАТИ

### I. ФЕНОТИПНА ХАРАКТЕРИСТИКА НА ГРУПИТЕ ПАЦИЕНТИ

#### 1. Фенотипна характеристика на пациентите, анализирани за *PROPI* гена

След подбор по фенотип от общата група пациенти, 56 пациенти с доказан хипосоматотропизъм от 55 отделни семейства, бяха изследвани за мутации в *PROPI* гена. Двама от пациентите са родственици от първа степен (брат и сестра). При едно от семействата има консангвинитет (родителите са 3<sup>ти</sup> братовчеди). Средната възраст на пациентите е 14.46 години (децимали), медиана 12 години (от 0.08 до 39.6 години). От тях са 44 момчета (средна възраст 14.4 години, медиана 11.87 години, обхват от 0.88 до 39.6 години) и 23 са момичета (средна възраст 14.5 години, медиана 11.56 години, обхват от 1.88 до 30.24 години).

- Симптоми на ДРХ в неонаталния период

При 24 от изследваните пациенти е документирано нормално протекло раждане и неонатален период. При 25 от останалите пациенти се съобщава моносимптоматична изява, а при 18 – различна комбинация от изброените симптоми на ДРХ (табл. 8).

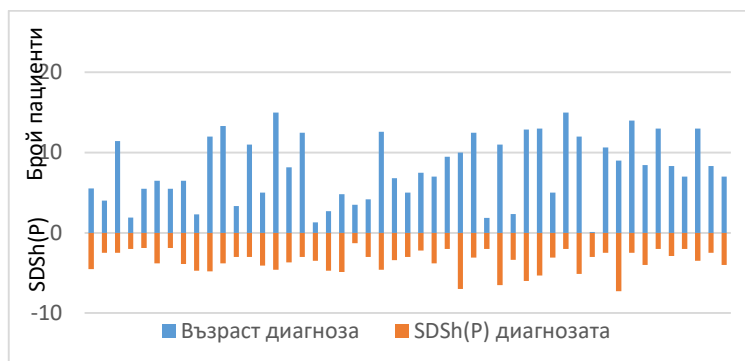
Таблица 8. Неонатална симптоми на ДРХ сред изследваните пациенти

Симптоми	Брой пациенти
Без симптоми	24
Седалищно раждане	9
МГВ	8
Хипогликемия	1
Пролонгирана жълтеница	4
Асфиксия	9
Крипторхизъм	6
Микропенис	6
<b>Моносимптоматични</b>	<b>25</b>
<b>Множество симптоми</b>	<b>18</b>

- Ауксология
  - Основен критерий за поставяне на диагноза ДРХ е SDS на ръста по Prader ( $SDS_h(P)) \leq -2$ . Изключение от това правило се прави при бързо спадащ темп на растеж или несъответствие със среднородителския ръст. Поради това в

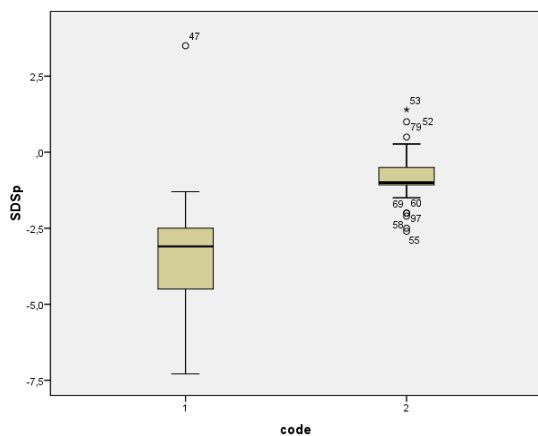
изследването са включени и пет пациента с  $SDSh(P)$  между -1.5 и -1.9 (фиг. 18).

**Фигура 18.** Съпоставка на възрастта на пациентите и  $SDSh(P)$  при поставяне на диагнозата



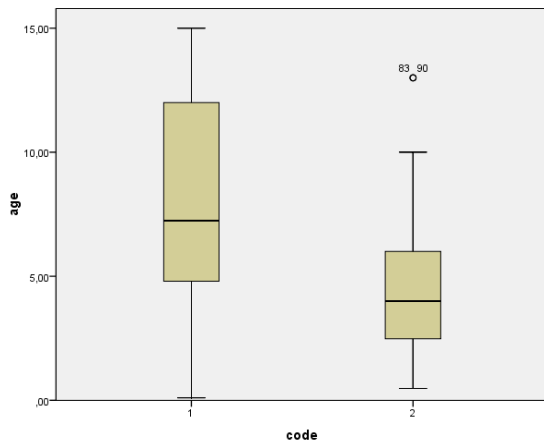
- Анализът на ръста на пациентите се прави според прицелната височина и среднородителския ръст, което определя и генетичния им потенциал. Ръстът, изразен в SDS, на родителите на изследваните пациенти не се различава от средния на популацията. Средният  $SDSh(P)$  на пациентите е значимо по-нисък от среднородителския ( $\chi=-3.5$ , vs -1;  $p<0.0001$ ) (фиг. 19).

**Фигура 19.** Съпоставка на ръста на пациентите със среднородителския ръст, изразени в  $SDSh(P)$ . На графиката код 1 –  $SDSh(P)$  на пациентите; код 2 - среднородителски  $SDSh(P)$ .



- Костна възраст, интерпретирана по метода на Greulich и Pyle. Костната възраст при поставяне на диагноза е значимо по-ниска от календарната ( $\chi=7.8$ , vs 4.8,  $p<0.001$ ) (фиг.20).

**Фигура 20.** Сравнение между хронологичната и костната възраст на пациентите при поставяне на диагнозата. На графиката код 1 – хронологична възраст; код 2 – костна възраст.



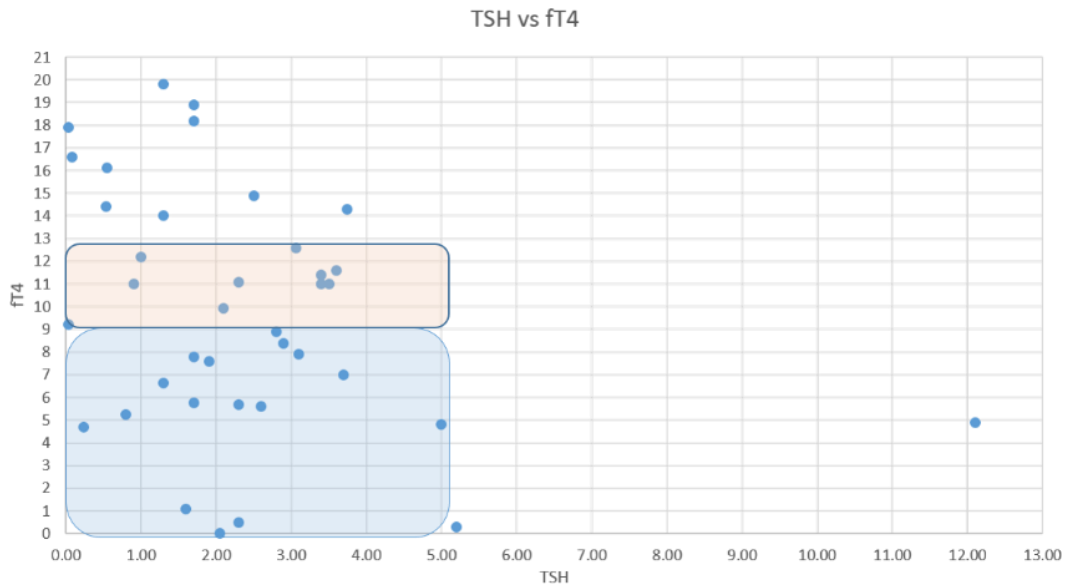
- Функционални тестове за стимулиране секрецията на растежен хормон с фармакологични субстанции: глюкагон, инсулин, аргинин хидрохлорид, както и с физическо натоварване. За обективизирането на дефицит на РХ са проведени най-малко два теста, най-често един фармакологичен тест и физическо натоварване.

#### *Допълнителни критерии за включване в проучването*

- Централен хипотиреоидизъм

При 44 от изследваните пациенти е доказан централен хипотиреоидизъм, като първа изява на МТД или в хода на заболяването. Най-често се открива в комбинация с дефицит на РХ или панхипопитуитаризъм (фиг. 23). Средната концентрация на TSH при поставяне на диагнозата е 2.4 mU/l, (медиана±SD 2.1±2.1; норма 0.3-4.7 mU/l). Средната стойност на FT4 е 9.9 pmol/l, (медиана±SD 9.1±5.1, норма 8.4 -20.2 pmol/l). На фиг. 21 са показани индивидуалните стойности на концентрацията на TSH и FT4.

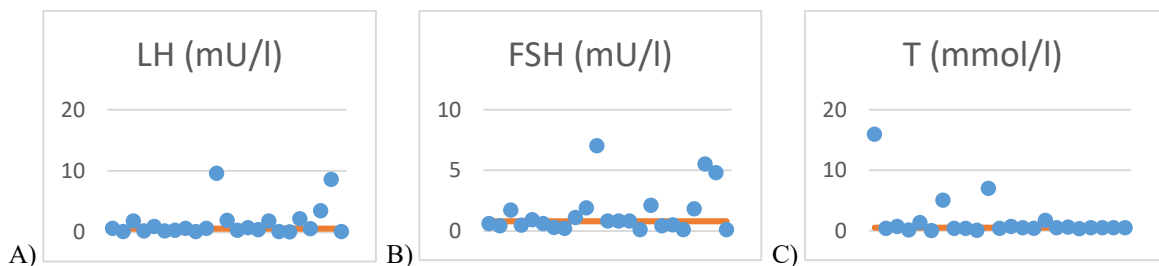
**Фигура 21.** Индивидуален анализ на серумните нива на TSH и FT4 преди започване на лечение с rhGH. В синьо са показани пациенти с констелация за централен хипотиреоидизъм, в оранжево – пациенти, рискови за развитие на централен хипотиреоидизъм.



- Хипогонадотропен хипогонадизъм

Гонадотропен дефицит е открит при 24 от пациентите, в комбинация с дефицит на РХ и TSH или панхипопитуитаризъм. (фиг. 23). Средната стойност на LH, получена при поставяне на диагнозата е 1.53 mU/l,  $0.6 \pm 2.6$ , норма. Средната стойност на FSH, получена при поставяне на диагнозата хипогонадотропен хипогонадизъм е 1.43 mU/l, медиана  $0.8 \pm 1.8$ . Средната стойност на тестостерона, отчетена при поставяне на диагнозата 2.08 nmol/l, медиана  $0.4 \pm 4.1$  (фиг. 22).

**Фигура 22.** Базални стойности на полови хормони: А) LH, В) FSH и С) тестостерон, с показана медиана.



АМН се изследва при 22 момчета на средна възраст 12.2 години (десимали), медиана  $12.2 \pm 5.3$ , от 0.08 до 25.6 години. В таблица 9 са представени резултатите за АМН на всички пациенти спрямо календарна възраст и пубертетен стадий (по Tanner) и са сравнени с нормите от проучването на Aksglaede и сътрудници от 2010 година (табл. 9) (Aksglaede, 2010).

Таблица 9. Нормални стойности за възрастови и пубертетни стадии по Aksglaede и резултати на изследваните пациенти. Пациенти с доказан ХХ са маркирани с удебелени и наклонени букви. с (Т) са означени пациентите, лекуващи се с тестостеронов препарат.

Норми за възрастови и пубертетни стадии			Изследвани пациенти, групирани според пубертетния стадий			
n	Норма AMX (pmol/l) Медиана (5-95 <sup>ти</sup> перцентил)	Възраст (min-max)	Възрастови/пубертетни периоди	Собствени пациенти		AMX (pmol/l)
				Име	Год.	
82	148 (53-340)	0	Раждане	-	-	-
72	1047 (749-1930)	0.2-0.5	Мини-пубертет	М.И.Г	0.08	207.2↓
117	1082 (395-1397)	0.9-1.3	12 месеца	-	-	-
116	755 (395-1335)	4.5-5.8	Детство	<b>М.Н.С.</b>	4.72	28.8↓↓
129	697 (321-1218)	6.1-8.9	G1a	К.К.Ц	6.16	208.6↓
				<b>К.А.Ф.</b>	7.16	152.5↓
204	585 (297-1113)	9.0-13.2	G1b	<b>И.И.Б.</b>	8.8	195.3↓
				<b>Б.Н.К.</b>	13	170.6↓
				<b>К.И.К</b>	<b>10</b>	5.3↓↓
				<b>С.Б.М</b>	<b>14.4</b>	195.9↓
83	235 (46-1120)	10.5-14.8	G2	М.С.И.	9.48	206
				А.Р.К.	11.08	189.6
				Д.П.У.	11.24	213.8
				Л.С.Т	12	216.8
				Б.Г.Г	12.48	219.8
				<b>Р.С.Р (Т)</b>	15	163.1
				<b>Ж.М.М (Т)</b>	<b>16.48</b>	206.1
27	66 (22-734)	11.1-14.4	G3	<b>Х.Г.Х (Т)</b>	<b>17</b>	172.6
				М.М.Н.	12.48	51.4
				Р.Ц.Б.	15	151.4
				С.Х.К.	15.56	141.5
24	43 (15-112)	11.7-15.8	G4	-	-	-
135	49 (23-128)	12.1-19.8	G5	Н.Я.М	16.48	61.6
150	42(13-98)	21.6-64.4	Възрастни	Ш.А.И.	25.6	32.4

Въз основа на нивата на AMH, смятаме че 11 пациенти са с данни за ХХ. Осем от тях са до 14.4 години, без признаци за отключен пубертет. Четири от момчетата с доказан ХХ са с нормални нива на AMH, но са на лечение с тестостеронов препарат. При двама от пациентите нивата на AMH са под медианата, между 5-10 перцентил.

В таблица 10 са представени резултатите за инхибин b на всички пациенти от мъжки пол спрямо календарна възраст и пубертетен стадий (по Tanner) и са сравнени с нормите от проучването на Andersson и сътрудници от 1997 година (Andersson, 1997).

Таблица 10. Норми за възрастни и пубертетни стадий, анализирани спрямо нормите на Andersson и сътр., 1997.

Норми за възрастни и пубертетни стадий		Изследвани пациенти, групирани според пубертетния стадий			
n	Норма инхибин b (pg/ml) Средна (5-95 <sup>ти</sup> перцентил)	Възрастни/пубертетни периоди	Собствени пациенти		Инхибин b (pg/ml)
			Име	Год.	
72	459 (266-742)	Мини-пубертет	М.И.Г	0.08	99 ↓
116	78 (32-182)	Детство	<b>М.Н.С.</b>	4.72	9.5↓↓
156	78(35-182)	G1a	К.К.Ц	6.16	113.7
			<b>К.А.Ф.</b>	7.16	26.5 ↓↓
			<b>К.И.К</b>	<b>10</b>	9.2 ↓↓
			<b>С.Б.М</b>	<b>14.4</b>	33.2 ↓↓
204	78 (32-182)	G1b	<b>И.И.Б.</b>	8.8	114.9
			<b>Б.Н.К.</b>	13	64.9
47	195 (62-338)	G2	М.С.И.	9.48	64.3
			А.Р.К.	11.08	188.1
			Д.П.У.	11.24	379.2 ↑
			Л.С.Т	12	102.5
			Б.Г.Г	12.48	205
			<b>Р.С.Р.</b>	15	13.9 ↓↓
			<b>Ж.М.М</b>	<b>16.48</b>	63.6
27	163 (78-323)	G3	<b>Х.Г.Х.</b>	<b>17</b>	15.8 ↓↓
			М.М.Н.	12.48	157.8
			Р.Ц.Б.	15	14.4↓↓
			С.Х.К.	15.56	16.3 ↓↓
			<b>С.Л.И.</b>	<b>19.24</b>	12.7 ↓↓
31	188 (67-304)	G4	-	-	-
131	187 (95-323)	G5	Н.Я.М	16.48	18.5 ↓↓
150	187 (95-323)	Възрастни	Ш.А.И.	25.6	163.4
Българска контролна група					
12	166.7±42.3 (med±SD)	21.4 години			

Общо при 13 пациенти от всички възрастни групи, включително и при тези, които са на лечение с тестостеронови препарати, се откриха ниски стойности на inhibin b. В сравнение с АМН, Inhibin B, се установява в по-ниски концентрации, при по-голяма част от пациентите от мъжки пол с хипосоматотропизъм. Особено пациентите, които са на заместително лечение с тестостеронови препарати показват дисоциация между нивата на АМН и inhibin b (табл. 9-10).

Нашата контролна група се състои от млади възрастни мъже, получените резултати отговарят на публикуваните референтни нива в литературата. Това ни дава основание да приемем, че можем да съпоставим концентрациите на българските пациенти от по-ниските възрастни групи с тези на Aksglaede (АМН) и Andersson (Inhibin B).

При 3 от 16-те пациентки установихме ниски концентрации на АМН. Допълнително при две от пациентките концентрациите бяха в долно-граничния диапазон за възрастовата норма (табл. 11)

**Таблица 11.** Резултати на АМН при момичета, сравнени с норми по Hagen, 2010.

Норми за възрастни и пубертетни стадии	Възрастни/пубертетни периоди	Изследвани пациенти, групирани според пубертетния стадий			
		Собствени пациенти		АМН (pmol/l)	интерпретация
Норма АМН (pmol/l) Средна (2.5-97.5 <sup>ти</sup> перцентил)		Име	Год.		
2-15.5	0-3 месеца	-	-	-	-
15 (4.5-29.5)	4-6 месеца	-	-	-	-
8 (3-18.9)	6-12 месеца				
10.9 (1.9-39.2)	1-4 години	Х.И.Б.	1.32	3.5	норма
		П.Л.В.	4.0	2.4	норма
20.4 (5.5-57.1)	4-8 години	М.И.А.	7.64	41.3	норма
19.9 (4.7-60.1)	I	Г.С.П.	9.48	17.5	норма
		В.В.П.	10.88	22.7	норма
		Л.Ц.Я.	15.0	4.5	Нисък
		С.И.Й.	16.6	34.8	Норма
19.9 (4.7-60.1)	II	Д.И.С.	11.24	59.4	Норма
		М.К.М.	11.4	6.2	Ниска норма
		Ф.Х.Д.	12.0	16.8	Норма
19.9 (4.7-60.1)	III	-	-	-	-
19.9 (4.7-60.1)	IV	В.Д.Г.	14.88	2.4	Нисък
19.9 (4.7-60.1)	V	В.Г.Р.	13.16	9.2	Ниска норма
		М.М.Р.	16.8	12.7	Норма
19.9 (4.7-60.1)	Възрастни	Р.С.М.	25.8	6.7	Ниска норма
		Б.В.Ш.	26.0	10.9	Норма
		В.З.В.	32.0	1.1	Нисък

Много по-големи са колебанията в концентрациите на Inhibin B при пациентките в сравнение с тези на АМН. Срещат се концентрации основно извън референтните граници- както повишени /2 пациентки/, така и понижени /9 пациентки/. Само при 3 пациентки нивата на Inhibin B са в референтни граници. Дисоциацията между АМН Inhibin B е много по-изразена от тази при пациентите от мъжки пол с хипосоматотропизъм.

Таблица 12. Резултати от inhibin b при момичета, сравнени с норми по Sehested, 2000.

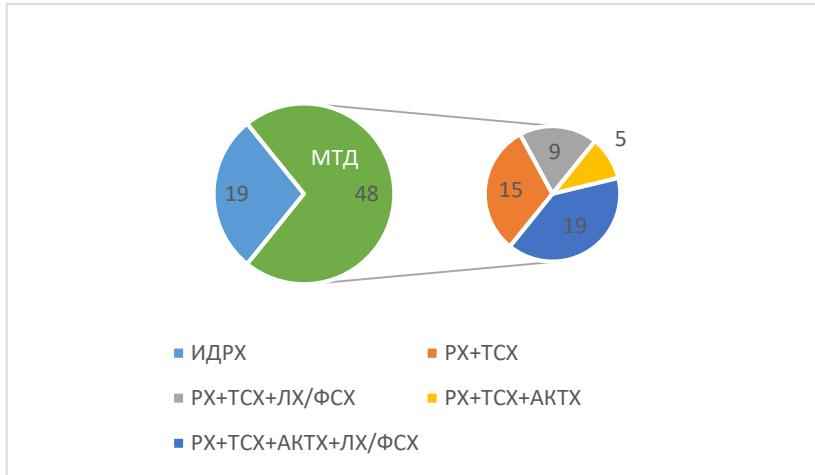
Норми за възрастни и пубертетни стадии	Възрастни/пубертетни периоди	Изследвани пациенти, групирани според пубертетния стадий			
		Собствени пациенти		Inhibin b (pmol/l)	интерпретация
Норма AMX (pmol/l)	Средна (5-95 <sup>th</sup> перцентил)	Име	Год.		
		0-3 месеца	-	-	-
	4-6 месеца	-	-	-	-
<b>22.0±3.4</b>	6-12 месеца				
<b>22.0±3.4</b>	1-4 години	Х.И.Б.	1.32	38.7	Висок
		П.Л.В.	4.0	10.9	Нисък
<b>23.2±2.7</b>	4-8 години	М.И.А.	7.64	29.5	Висок
<b>26.5 (20-100)</b>		I	Г.С.П.	9.48	11.7
	В.В.П.		10.88	12.4	Нисък
	Л.Ц.Я.		15.0	9.5	Нисък
	С.И.Й.		16.6	10.6	Нисък
<b>51 (20-240)</b>	II	Д.И.С.	11.24	48.3	Норма
		М.К.М.	11.4	9.7	Нисък
		Ф.Х.Д.	12.0	58.1	Норма
	III	-	-	-	-
<b>94 (20-205)</b>	IV	В.Д.Г.	14.88	13.5	Нисък
<b>75 (20-177)</b>	V	В.Г.Р.	13.16	28.1	Ниска норма
		М.М.Р.	16.8	11.8	Нисък
<b>49 (20-385)</b>	Възрастни	Р.С.М.	25.8	9.4	Нисък
		Б.В.Ш.	26.0	9.6	Нисък
		В.З.В.	32.0	34.3	Норма

- Дефицит на АСТН:

Двадесет и двама от пациентите са на хормоналнозаместително лечение. При част от тях липсва документация за сутрешни кортизолови нива и кортизол в урината преди започване на лечението. При 8 от пациентите са установени ниски кортизолови нива: средната стойност на кортизола, получен при поставяне на диагнозата е 37.4, медиана 28.1.

Разпределението на хипофизарните дефицити при различните пациенти е представено на фиг. 23.

**Фигура 23.** Комбинация от дефицити на хипофизарни хормони в брой пациенти



- Патологична находка от ЯМР на хипоталамо-хипофизарна област:

Образното изследване на хипоталамо-питуитарната област е основна част от алгоритъма при поставяне на диагнозата. При 68.7% от пациентите се доказва хипоплазия или аплазия на хипофизата. Патология на задния дял на хипофизата (8.9%), инфундибулума (17.9%) и хиазмата (4.4%) се откриха при малка част от пациентите (фиг. 24). Нормална ЯМР находка на хипоталамо-хипофизарната област се обективизира само при двама пациенти.

**Фигура 24.** Находка от ЯМР на хипоталамо-хипофизарната област по брой пациенти



## 2. Фенотипна характеристика на пациентите, анализирани за POU1F1 гена

За анализиране на този ген бяха избрани 49 пациенти с доказан вроден хипосоматотропизъм. Средната възраст на пациентите е  $16.1 \pm 10.3$  години, медиана 13.2 години, от 0.16 до 39.8 години. От тях 15 са момичета (средна възраст  $14.7 \pm 9.2$

години, медиана 12.9 години, от 1.88 до 30.2 години) и 34 момчета (средна възраст  $16.8 \pm 10.4$  години, медиана 13.8 години, от 0.16 до 39.8 години).

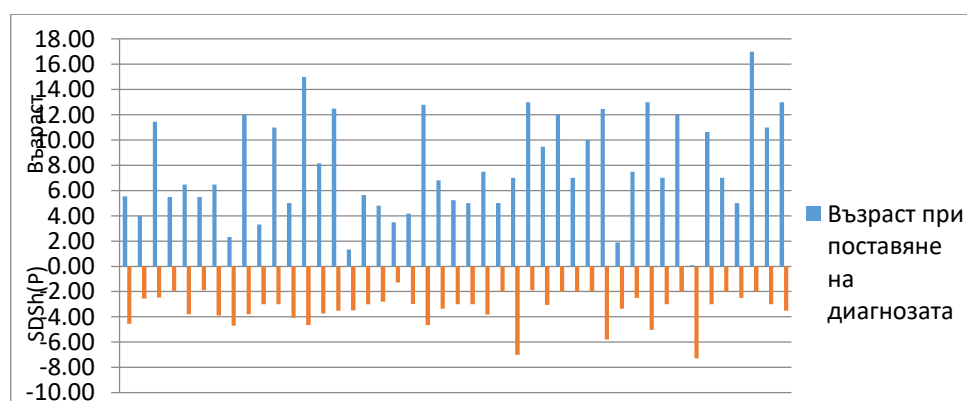
При 25 от изследваните 49 пациенти са документирани седалищно предлежание, хипогликемия, неонатална жълтеница, асфиксия (табл. 13), като само 7 от тези пациенти са били моносимптоматични. При 23 от тях няма документирана клинична изява в неонаталния период.

**Таблица 13.** Клинична изява в неонаталния период при изследваните пациенти

Симптоми	Брой пациенти
<b>Без симптоми</b>	<b>23</b>
Седалищно раждане	9
МГВ	6
Хипогликемия	2
Пролонгирана жълтеница	3
Асфиксия	6
Крипторхизъм	4
Микропенис	4
<b>Моносимптоматични</b>	<b>7</b>
<b>Множество симптоми</b>	<b>19</b>

Средната стойност на среднородителския ръст при изследваните пациенти, представен в SDS е  $-0.62 \pm 1.22$ , медиана  $-0.51$ . Средната стойност на показателя SDS на ръста при изследваната група пациенти е  $-4.02$ , медиана  $-3.4$ . На фиг. 25 е представена съпоставка между възрастта и SDS на ръста при поставяне на диагнозата на пациентите.

**Фигура 25.** Сравнение на SDS на ръста с хронологичната възраст при поставяне на диагнозата на пациентите



Средната стойност на календарната възраст е значимо по-висока от костната при поставяне на диагнозата: 7.5 спрямо 4.2, съответно ( $p < 0.001$ ).

Вроден хипосоматотропизъм е диагностициран при всички 49 от изследваните пациенти. Дефицит на TSH бе диагностициран при 35 от пациентите, а на гонадотропни хормони при 16 пациента. Дефицит на АСТН беше доказан при 15 от изследваните пациенти.

ЯМР бе налице при 39 от 49 пациенти (Фиг. 26). При останалите проведените образни изследвания на хипоталамо-хипофизарната област не бяха налични за оценка и интерпретация.

**Фигура 26.** Патологични находки от ЯМР на хипоталамо-хипофизарната област по брой пациенти



### 3. Фенотипна характеристика на пациентите, анализирани за SOX3 гена

Изследвани са 23 пациенти на средна възраст  $14.7 \pm 9.8$  години (в десимали), медиана 12.0 години, от 1.8 до 39.8 години. От тях 9 са момичета (средна възраст  $14.7 \pm 9.8$  години, медиана 12.0 години, от 1.88 до 23 години) и 14 момчета (средна възраст  $15. \pm 9.76$  години, медиана 14.0 години, от 12.0 до 39.8 години).

*Клинична изява в неонаталния период.* При малка част от пациентите, изследвани за SOX3 са документирани симптоми в неонаталната възраст (табл. 14).

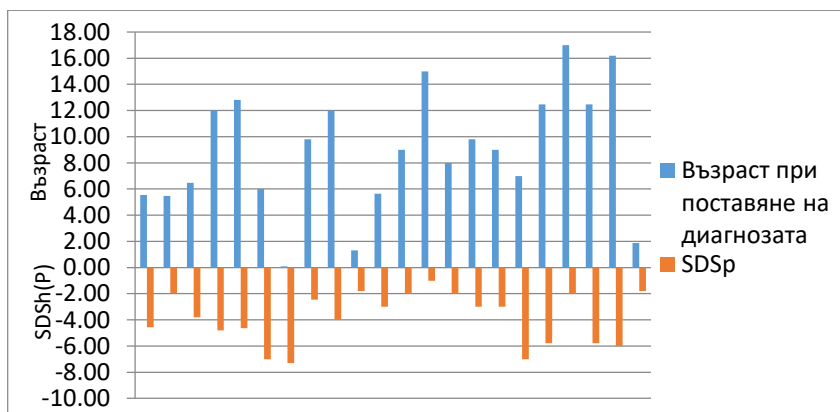
**Таблица 14.** Клинична изява в неонаталния период при изследваните пациент

Симптоми	Брой пациенти
<b>Без симптоми</b>	<b>8</b>
Седалищно раждане	4
МГВ	2
Пролонгирана жълтеница	1
Асфиксия	3
Крипторхизъм	2
Микропенис	2
<b>Моносимптоматични</b>	<b>5</b>
<b>Множество симптоми</b>	<b>9</b>

Средната стойност на среднородителския ръст при изследваните пациенти, представен в SDS е -0.5, медиана -0.3.

Средната стойност на показателя SDS на ръста при изследваната група пациенти е -4.5, медиана -4.9. На фиг. 27 е представена съпоставка между възрастта и SDS на ръста при поставяне на диагнозата на пациентите.

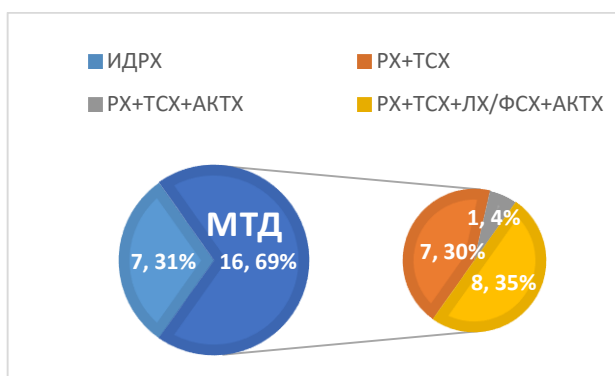
**Фигура 27.** Сравнение на SDS на ръста с хронологичната възраст при поставяне на диагнозата на пациентите.



*Костна възраст:* средната стойност на календарната възраст е значимо по-висока от костната при поставяне на диагнозата: 9.2 спрямо 5.9, съответно ( $p < 0.01$ ).

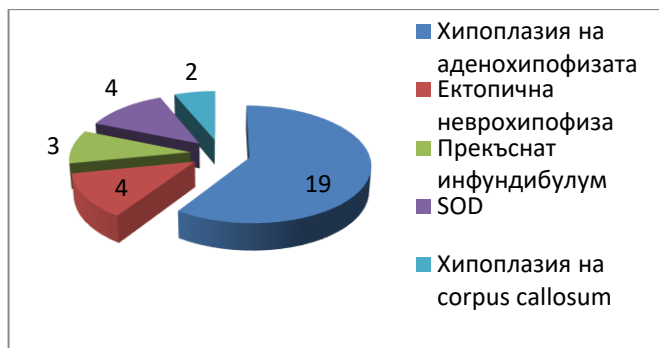
*Ендокринна характеристика:* Вроден хипосоматотропизъм е диагностициран при 23 от изследваните пациенти. Хипогонадотропен хипогонадизъм се доказва при 8 от изследваните пациенти. Централен хипотиреоидизъм се доказва при 15 от изследваните пациенти. Дефицит на АСТН беше доказан при 7 от изследваните пациенти. На фиг. 28 е представено разпределението на пациентите в зависимост от тропните дефицити, установени при поставяне на диагнозата и през периода на проследяване.

**Фигура 28.** Разпределение на различните дефицити на хипофизарни хормони по брой пациенти



ЯМР бе налице при 21 от 23 пациента (фиг. 29). При останалите проведените образни изследвания на хипоталамо-хипофизарната област не бяха налични за оценка и интерпретация.

**Фигура 29.** Патологични находки от ЯМР на хипоталамо-хипофизарната област по брой пациенти



#### 4. Фенотипна характеристика на пациентите, анализирани за SOX2 гена

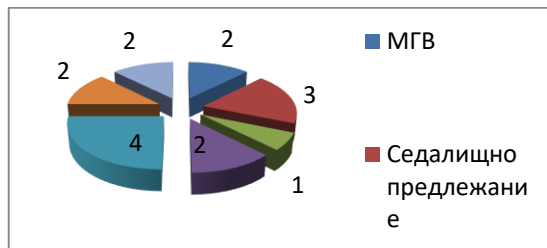
Подборът на кандидати за молекулярно-генетичен анализ бе направен по две направления:

- Пациенти с изоставане в растежа, доказан дефицит на STH, хипогонадотропен хипогонадизъм, панхипопитуитаризъм (СБАЛДБ-София);
- Пациенти с установени очни аномалии от Детска очна клиника – Александровска болница.

Анализираните бяха 22 пациенти, като 19 от тях са с доказан вроден хипопитуитаризъм, а останалите 3 са насочени от офталмологична клиника по повод вродени очни аномалии. Средната възраст на пациентите е 12.9 години (в десимали), медиана 10.23 години, от 1.9 до 39.8 години. От тях 13 са момичета (средна възраст 12.7 години, медиана 9.3 години, от 1.88 до 26 години) и 9 момчета (средна възраст 13.1 години, медиана 9.32 години, от 4.1 до 39.8 години).

Голяма част от пациентите (n=16) с хипосоматотропизъм имат клинична изява още в неонатална възраст, като само 3-ма от тях са моносимтоматични (фиг. 30).

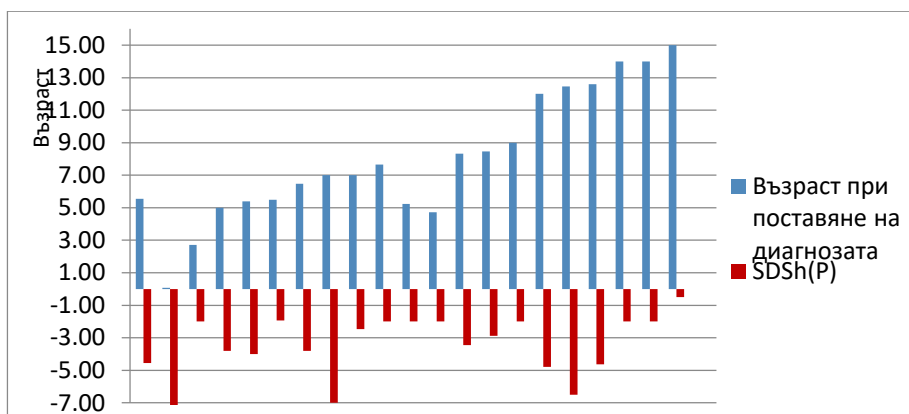
**Фигура 30.** Клинична изява в неонаталния период по брой пациенти



Средната стойност на среднородителския ръст при изследваните пациенти, представен в SDS е -0.96, медиана -0.75.

Средната стойност на показателя SDS на ръста при изследваната група пациенти е -3.48, медиана -3.2 (фиг. 31).

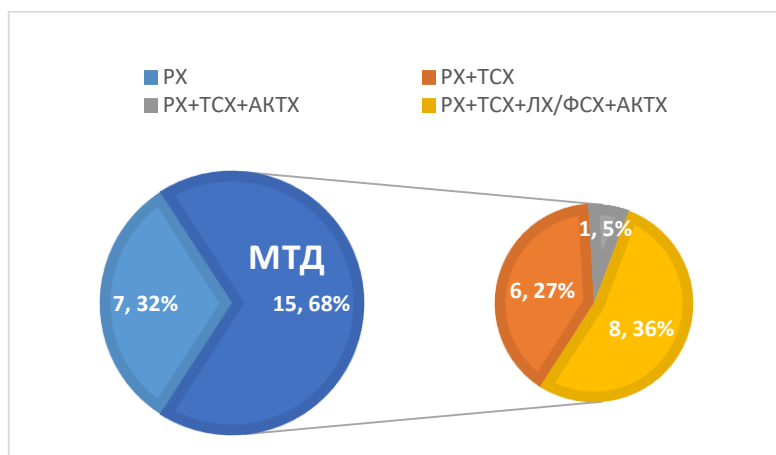
**Фигура 31.** Сравнение на SDS на ръста с хронологичната възраст при поставяне на диагнозата на пациентите



*Костна възраст:* Средната стойност на календарната възраст е значимо по-висока от костната при поставяне на диагнозата: 8.3 спрямо 6.0, съответно ( $p < 0.01$ ).

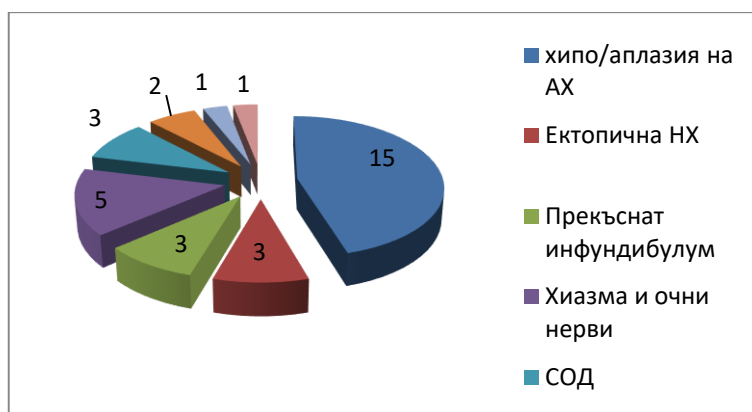
*Ендокринна характеристика:* вроден хипосоматотропизъм бе диагностициран при 19 от изследваните пациенти; хипогонадотропен хипогонадизъм се доказва при 8 от изследваните пациенти; централен хипотиреоидизъм – при 14 от изследваните пациенти; дефицит на АСТН – при 8 от изследваните пациенти. На фиг. 32 е представено разпределението на пациентите в зависимост от тропните дефицити, установени при поставяне на диагнозата и през периода на проследяване.

**Фигура 32.** Разпределение на различните дефицити на хипофизарни хормони



ЯМР бе налице при 18 от 22 пациента (Фиг. 33). При останалите проведените образни изследвания на хипоталамо-хипофизарната област не бяха налични за оценка и интерпретация.

**Фигура 33.** Патологични находки от ЯМР на хипоталамо-хипофизарната област по брой пациенти



Всички пациенти, включени в проекта, са прегледани от детски офталмолог, като внимание се обръща на: рефракция, зрителна острота, очна цепка, размер на очната ябълка, преден очен сегмент, заден очен сегмент, окуломотрен апарат.

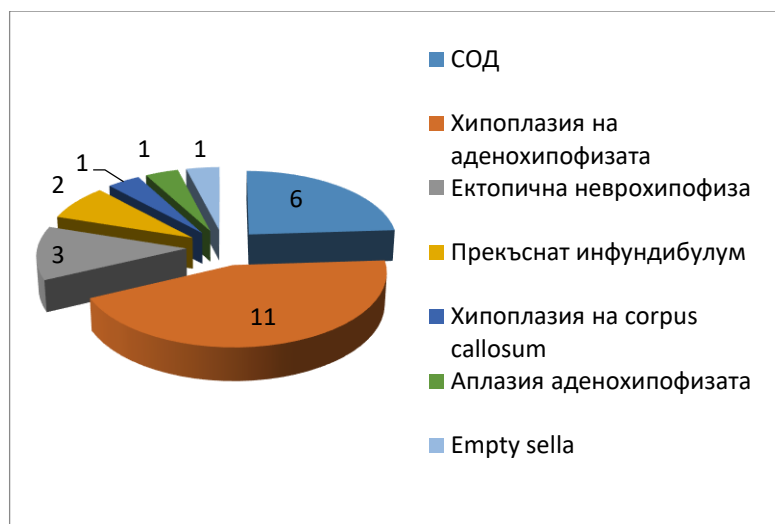
## 5. Фенотипна характеристика на пациентите, анализирани за *HESX1* гена

Изследвани бяха 16 пациента на възраст от 1.88 до 39.8 години, средната възраст  $15.4 \pm 11.1$  години, медиана 14 години. От тях 10 са от женски пол (на възраст от 1.88 до 23 години, средна  $15.4 \pm 11.1$ , медиана 14 години) и 6 момчета (обхват 12-39.8 години, средна  $17.6 \pm 12.3$  години, медиана 16 години).



Находката от ЯМР на хипоталамо-хипофизарната област на пациентите, включени в тази група е представена на фиг. 37. Шест от пациентите са диагностицирани с класическа форма на СОД. При един от тях се откри съчетание на хипоплазия на аденохипофизата и corpus callosum. При други двама се наблюдава изолирана хипоплазия на аденохипофизата, но в съчетание с дефект по срединната линия – вродена цепка на устната и небцето. При трима от пациентите е налице ектопична неврохипофиза, при други двама се наблюдава синдром на прекъснат инфундибулум, а при един Empty sella синдром.

**Фигура 37.** Находка от ЯМР на хипоталамо-хипофизарна област по брой пациенти

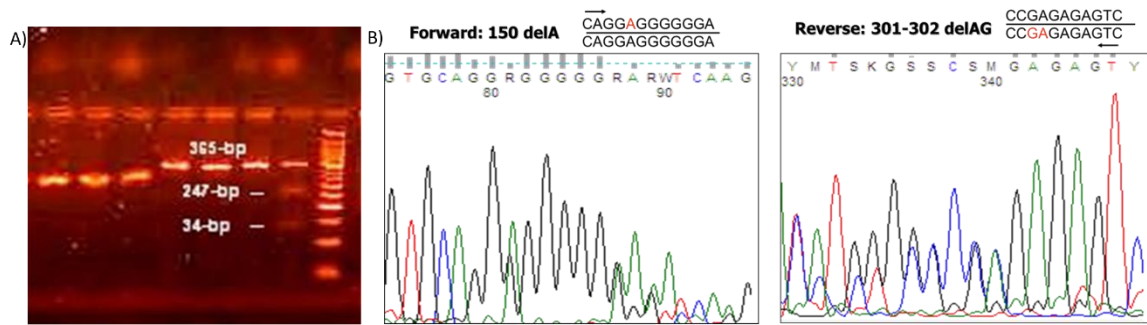


## II. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕН АНАЛИЗ НА ГЕНА PROP1

1. Първа стъпка: Vcg1 рестриктазна реакция, като скрининг за мутацията 301-302delAG

Vcg1 рестриктазната реакция показва патологична електрофоретична подвижност на получените при реакцията фрагменти, която съответства на *хетерозиготна мутация* 301-302delAG, при един пациент. На агарозния гел се визуализираха четири различни ДНК фрагмента – 34-bp, 133-bp и 247-bp, както и фрагмент от около 365-bp, отговарящ на нормален екзон 2 на PROP1 (фиг. 38А). За потвърждаване на резултата, както и за откриване на облигатната втора мутация (автозомно-рецесивен ход на заболяването), при пациента се приложи директно секвениране. Доказа се съчетана хетерозиготност на мутацията 301-302delAG/150delA (фиг. 38В).

**Фигура 38.** Резултат от молекулярно-генетичен анализ на пациент 1: А) *VcgI* рестриктазна реакция и В) секвенция на съчетана хетерозиготна 301-302delAG/150delA мутация.



Анализът на ДНК от майката на пациента показва нормална електрофоретична подвижност (липса на мутацията 301-302delAG) и носителство на мутацията 150delA в хетерозиготно състояние.

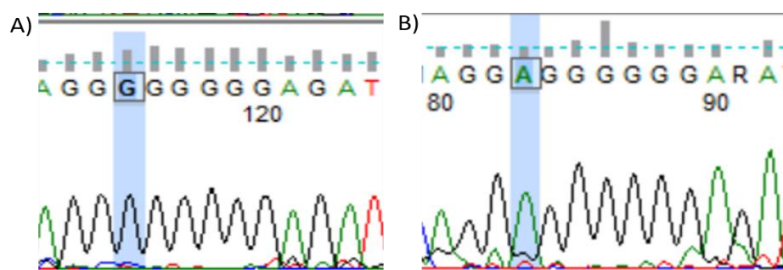
Генетичен материал от бащата на пациента не бе наличен, поради отказ от изследване.

## 2. Втора стъпка: директно секвениране

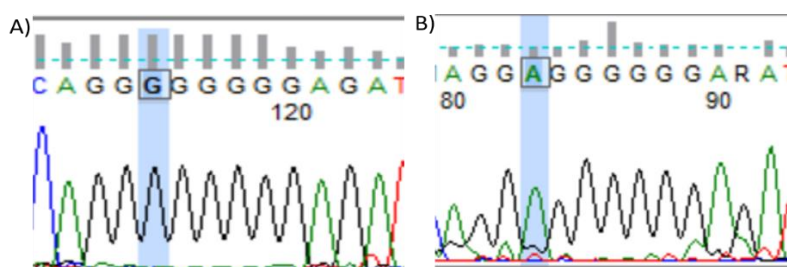
### ○ Екзон 2

Доказаха се 5 пациенти с патогенни мутации в екзон 2 на *PROPI*, като един е със съчетана хетерозиготна мутация 301-302delAG/150delA, а останалите четирима са с хомозиготна мутация 150delA (табл. 15). При изследването на наличния генетичен материал от родители на пациенти с уточнен генотип, се намериха четирима хетерозиготни носители на мутацията 150delA (фиг. 39, 40). Поради невъзможността за цялостно установяване на генотипа на всички членове на семействата (отказ на двама родители), в общата алелна честота са включени само пациентите.

**Фигура 39.** А) Секвенционен анализ на пациент 2, показващ хомозиготна 150delA мутация и В) нормална секвенция



Фигура 40. А) Секвенционен анализ на пациент 3, показващо хомозиготна 150delA мутация и В) нормална секвенция



При изследваните пациенти не се установиха полиморфични варианти в екзон 2.

○ Екзон 1

Секвенционният анализ на екзон 1 на *PROPI* гена на всички изследвани пациенти не показва мутации в този участък. Откриха се три полиморфни варианти с висока алелна честота, представени в таблица 15.

○ Екзон 3

Секвенционният анализ на екзон 3 на *PROPI* гена на всички изследвани пациенти не доказа мутации в този участък. Откриха се шест полиморфни варианти, представени в таблица 15.

**Таблица 15.** Алелна честота на откритите мутации и полиморфизми в *PROPI*.

	Полиморфизъм	Алелна честота (%)	Мутация	Алелна честота (%)
Екзон 1	27 T>C	43.9	-	-
	59 A>G	90.2	-	-
	109+3 G>A	37.8	-	-
Екзон 2	-	-	150 delA	8.0%
	-	-	301-302 delAG	0.9%
Екзон 3	424 G>A	19.5	-	-
	425 C>T	2.2	-	-
	616 T>C	90.2	-	-
	*52 G>A	1.2	-	-
	*120 CC>T	1.2	-	-
	*123 T>C	1.2	-	-

Представените полиморфните варианти в екзон 1 и 3 бяха открити в съчетание по два или повече при всеки един пациент.

Откритите мутации са вече известни и техният ефект е изяснен (Wu, 98, Reipe, 2001, Cirik, 98).

**Общата алелна честота на *PROPI* мутации сред изследваните пациенти е 12.5%. Най-честата мутация, намерена сред изследваната кохорта български пациенти, е 150 delA в екзон 2 на *PROPI*, с алелна честота 11%.**

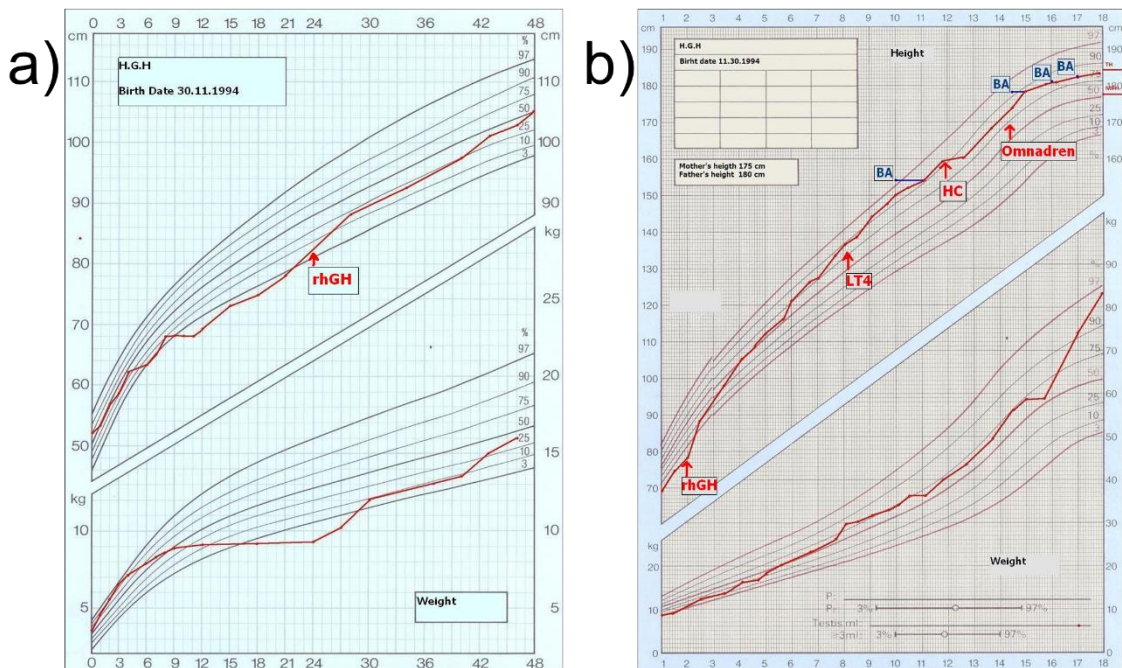
## 1. Фенотип на пациенти с мутация в PROP1 гена

### 1.1. Пациент 1

Момче, родено от първа, нормално протекла бременност и раждане, с тегло 3450 г. (50<sup>ти</sup> перцентил) и дължина 52 см (75<sup>ти</sup> перцентил). По време на неонаталния период са установени пролонгирана жълтеница, микропенис, хипоспадия и крипторхизъм. Липсва фамилна анамнеза за ендокринни заболявания. SDS на среднородителския ръст 1.40 (по Prader) и на прицелния ръст 1.04 (по Prader).

Изоставането в растежа е забелязано от майката на **6 месечна възраст**. При първия преглед от детски ендокринолог на **1 година и 11 месеца** се установява:  $SDS_{h(Prader)} = -1.94$  (несъответстващ на генетичния потенциал), депресия на носната основа, изоставане в КВ с една година, съотношение КВ/ХВ 0.4, тежък дефицит на РХ (пик 3.2 ng/ml). Започната терапия с човешки рекомбинантен РХ на 2 годишна възраст. По време на рутинното проследяване от детски ендокринолог се наблюдава последователно отпадане на хормоналната секреция на останалите питуитарни клетъчни линии. На **8 год. 2 мес.** се поставя диагноза централен хипотиреоидизъм (TSH 0.9 IU/ml, fT4 4.9 pmol/l) и се започва лечение с L-thyroxin. На възраст **11 год. 11 мес.**, на фона на отпадналост, липса на апетит и често боледуване се откриват ниски стойности на серумния кортизол в 8 часа сутрин и ниска екскреция на кортизол в 24-часова урина. Започва се терапия с Hydrocortisone, първоначално по време на стрес, а впоследствие и постоянно лечение. На 12 год. 10 мес. се установява липса на пубертетни белези, ниски базални стойности на гонадотропните хормони. Провежда се тест с Pregnyl и се установява централен хипогонадизъм. Започва се лечение Omnadren на 14 год. 4 мес. Дозите на заместителното лечение се адаптират според серумните хормонални нива и клиничните показатели на пациента. Образно изследване на хипоталамо-хипофизарната област е направено на 11 год.: хипоплазия на аденохипофизата. Крайният ръст на пациента е 183 см ( $SDS_{h(Prader)}=1.0$ ), съответстващ на генетичния потенциал. След навършване на 18 годишна възраст, пациентът е насочен към специализиран център по ендокринология и репродукция, където да продължи наблюдението и доживотна хормон-заместваща терапия.

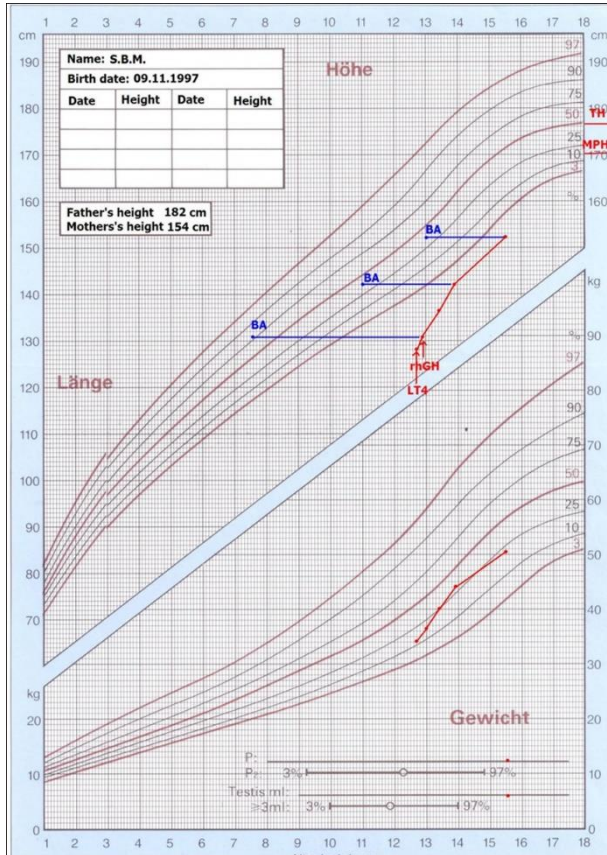
Фигура 41. Растежни криви на пациент 1: а) 0-4 години; б) 1-18 години



## 1.2. Пациент 2

Момче родено по естествен път след първа патологична бременност, с тегло 3200 г. (50<sup>ти</sup> перцентил) и дължина 53 см (75<sup>ти</sup> перцентил). След раждането е регистрирана асфиксия и микропенис. Липсва фамилна анамнеза за ендокринни заболявания.  $SDS_{(Prader)}$  на среднородителския ръст е -0.41, а на прицелния ръст -0.31. За първи път изоставане в растежа е забелязано от майката на **6 годишна възраст**. Първа консултация с детски ендокринолог е направена на 12 год. 8 мес. Обективизирани са  $SDS_{(Prader)}$  на ръста -3.8, изпъкване на челото, депресия на носната основа, КВ изоставаща от хронологичната с 5 години, съотношение КВ/ХВ 0.5. Ниски нива на fT4 на фона на нормални серумни нива на TSH. Започнато е лечение с L-Thyroxin. След компенсиране на централния хипотиреоидизъм се доказва и дефицит на растежен хормон (пик). Започнато е лечение с рекомбинантен човешки РХ. Поради липса на пубертетни белези и ниски стойност на гонадотропните хормони, на 16г. е започнато лечение с Omnadren. До момента няма белези на дефицит на АСТН. Образно изследване на хипоталамо-хипофизарната област е проведено на 12 год и 11 мес.: **нормално изображение на преден и заден дял на хипофизата, както и на инфундибулума.**

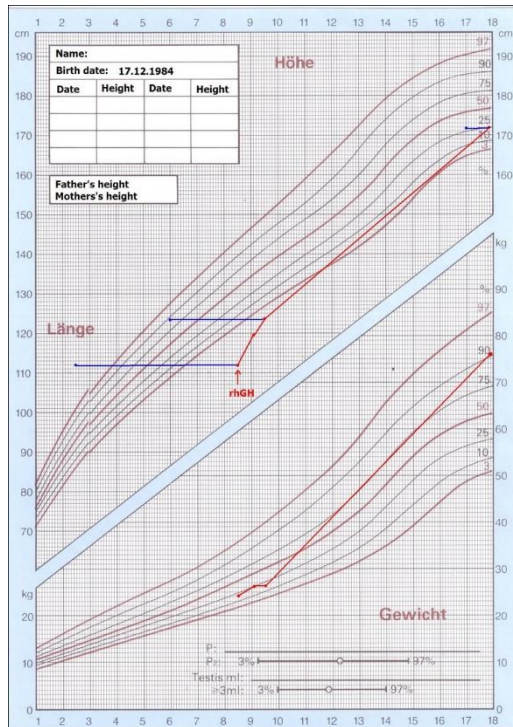
Фигура 42. Растежна крива 1-18 години на пациент 2



### 1.3. Пациент 3

Мъж, роден от втора нормално протекла бременност и раждане с тегло 4150 г (75<sup>ти</sup> перцентил) и дължина 52 см (75<sup>ти</sup> перцентил). След раждането са наблюдавани асфиксия, арефлексия, микропенис, крипторхизъм. Няма данни за ендокринни заболявания в семейството.  $SDS_{(Prader)}$  на среднородителски ръст 1.40, а на прицелния 1.04. За първи път изоставането в растежа е забелязано от майката на 6 годишна възраст. Първа консултация с детски ендокринолог е направена на 8 год 3 мес., обективизират се  $SDS_{(Prader)}$  на ръста -2.6, KB изоставаща от хронологичната с 6 години, съотношение KB/XB 0.3. Диагностициран тежък дефицит на PX (пик 3.2 ng/ml). Доказан централен хипотиреоидизъм чрез TRH-стимуляционен тест. Започнато лечение с човешки рекомбинантен PX и L-Thyroxin.

Фигура 43. Растежна крива 1-18 години на пациент 3



#### 1.4. Съпоставка на фенотипа на пациентите с доказана PROP1 мутация

Фенотипните характеристики при всички пациенти с открит дефект в PROP1 гена са събирани лонгитудинално при контролните прегледи, провеждани от лекуващия лекар. Интерес представляват следните данни: перинатална анамнеза – гестационна седмица, механизъм на раждане, тегло и дължина при раждане, усложнения в неонаталния период като пролонгирана жълтеница, епизоди на хипогликемия, крипторхизъм, микропенис; ръст на родителите; начало на изоставането в растежа, забелязано от родителите; хронологична и костна възраст при поставяне на диагнозата ДРХ; пик на РХ при стимуляционен тест; допълнителни дефицити на хипофизарни хормони, изявени по-късно при проследяването на пациента.

Четирима от пациентите с мутация в PROP1 са от мъжки пол на възраст от 14.88 години (в десимали) до 28 години, средна възраст 20.0 години и един пациент от женски пол на възраст 16 години.

- Ръст на родителите (генетичен потенциал за растеж)

Средният ръст, изразен в SDS, на майките ( $-0.84 \pm 1.25$ ; медиана  $-0.73$ ) и на бащите на пациентите ( $-1.20 \pm 1.29$ , медиана  $-1.14$ ) не се различават значимо от средните за популацията.

- *Характеристики на неонаталния период*

Всички пациенти са родени в 39<sup>та</sup> гестационна седмица (г.с.). Раждането е по нормален механизъм с главично предлежание. При един от пациентите е документирано травматично раждане. Средното тегло при раждане е 3450 г. Средната дължина при раждане е 52 см или 0.8 SDS<sub>Prader</sub>. Няма пациенти с епизоди на хипогликемия в неонаталния период. При един от пациентите е документирана пролонгирана жълтеница (табл. 16), станала причина за задържането му в НО до 8-ми ден след раждането. Всички пациенти от мъжки пол са диагностицирани с крипторхизъм и микропенис от неонатална възраст (табл. 16).

**Таблица 16.** Клинична изява на МТД в неонаталния период при пациенти с даказан дефект в PROP1 гена

	Х.Г.Х.	С.Б.И.	Х.И.Д	Н.Х.Ч.	С.С.Г.
Гестационна седмица	39	39	39	доносено	41
Механизъм на раждане	Нормален	Нормален	Нормален	Нормален	Нормален
Предлежание	Главично	Главично	Главично	Главично	Главично
Тегло	3450	3200	4150	доносено	54
Дължина (SDS)	0.59	1.04	0.59	доносено	3400
Жълтеница	+	-	-	-	+
Хипогликемия	-	-	-	-	-
Крипторхизъм	+	+	+	-	+
Микропенис	+	+	+	-	+

- *Ендокринен фенотип*

Всички пациенти страдат от ДРХ. Средната възраст на начало на изоставането в растежа спрямо връстниците, забелязано от родителите е  $4.8 \pm 4.2$  години. Средната възраст на поставяне на диагнозата ДРХ е  $7.7 \pm 5.5$  години, медиана 8 години, а средната възраст на започване на лечението с човешки рекомбинантен РХ е  $9.4 \pm 5.3$  години, медиана 8 години. Средният ръст на пациентите при поставяне на диагнозата в SDS е -2.6. Костната възраст изостава от календарната средно с 5 години, а средното съотношение на костна и календарна възраст е 0.4.

**Таблица 17.** Ауксологични данни и резултати отпроведените стимулационни тестове за РХ

	Х.Г.Х	С.Б.М.	Х.И.Д.	Н.Х.Ч.	С.С.Г.
Начало на изоставането в растежа (децимали)	0.48	9	5	Няма данни	3
Възраст диагноза (децимали)	1.88	12.88	8.0	16	8
Фармакологичен стимулационен тест за РХ	Глюкагон	Глюкагон	Инсулин	-	Инсулин
Пик на РХ (ng/ml)	3.2	1.3	4.5	-	1.8
Изходен ръст (SDS)	-2	-3.2	112	-	-3.5
Костна/календарна възраст	0.46	0.54	0,31	-	0.31

Най-често е съчетанието хипосоматотропизъм с централен хипотиреоидизъм. Средната възраст на диагностицирането му е 9.66 години. При четири от петте пациента той се диагностицира едновременно с дефицита на растежен хормон. Поради това не може да се установи кой от тях има първа изява. При пациента Х.Г.Х., дефицитът на TSH се диагностицира при рутинните контролни изследвания 7 години по-късно от ДРХ.

Хипогонадотропен хиподонадизъм се установява при петимата пациенти на средна възраст 14.7 години. Изявата на дефицит на адренкортикотропен хормон е в различна възраст. При един от пациентите, носител на съчетана хетерозиготна мутация, този дефицит се изявява в началото на втората декада да живота (11 години). При пациента Х.И.Д. този дефицит не е изявен в детска възраст. При проследяването от интернисти-ендокринолози, на 28 годишна възраст се установява гадене, повръщане, повишен апетит към солени храни, нисък серумен кортизол и АСТН и се поставя диагноза централен хипокортицизъм. При пациент С.Б.М. все още няма диагностициран дефицит на АСТН, но се наблюдават постепенно спадане на серумното ниво на кортизол (изследван кортизолов ритъм), както и на нивото му на отделяне в урината, като те все още остават в нормални граници за възрастта.

**Таблица 18.** Възраст на изява на допълнителни хипофизарни дефицити

Дефицит	Х.Г.Х	С.Б.М.	Х.И.Д.	Н.Х.Ч.	С.С.Г.
TSH	8.16 <sup>с</sup>	12.88	8	16	8
Гонадотропини	12.8	15.48	16.0	16	14.8
АСТН	11.88	-	28.0	Няма данни	-
PRL	-	-	28.0	-	14.8*

\*Липсва клиника при хипопрولاктинемия, установена е в хода на теста с TRH.

**Таблица 19.** Сравнение на възрастта на начало на изоставането, поставяне на генетична и етиологична диагноза и начало на лечението

	Х.Г.Х	С.Б.М.	Х.И.Д.	Н.Х.Ч.	Ч.Х.Ч
Начало на изоставането в растежа	0.48	9	5	Няма данни	3
Възраст при поставяне на диагнозата	1.88	12.8	8	16	8
Възраст при започване на лечението	2	13	8	-	8
Възраст на молекулярно-генетичен анализ	17.16	14.88	28	16	8

- *Находка от ЯМР на хипоталамо-хипофизарна област*

При четирима пациенти се установява хипоплазия на предния дял на хипофизата. При един от пациентите изследването показва нормално развитие на аденохипофизата. Патологични находки на неврохипофизата, инфундибулима, хиазмата и зрителните нерви, както и останалите структури на мозъка не се откриват.

**Таблица 20.** Находка от ЯМР на хипоталамо-хипофизарна област при пациентите с доказана PROP1 мутация

	Х.Г.Х	С.Б.М.	Х.И.Д.	Н.Х.Ч.	брат
Аденохипофиза	Хипоплазия	Норма	Хипоплазия	Хипоплазия	Хипоплазия
Неврохипофиза	Норма	Норма	Норма	Норма	Норма
Инфундибулум	Норма	Норма	Норма	Норма	Норма
Хиазма/зрителни нерви	Норма	Норма	Норма	Норма	Норма
Други структури на мозъка	Норма	Норма	Норма	Норма	Норма

## **2. Въвеждане на молекулярно-генетичния анализ на PROP1 в рутинния диагностичен алгоритъм при пациенти с вроден хипосоматотропизъм, с или без съпътстващи дефицити**

След изпълнението на проект «Грант» №58 по линия на Медицински Университет София, в сътрудничество с Национална Генетична Лаборатория, като част от настоящия дисертационен труд, молекулярно-генетичен анализ на трите екзона на PROP1 гена бе въведен в рутинната практика. Към такъв анализ се насочват пациенти, които отговарят на горепосочените критерии.

### 3. Оформяне на група пациенти за молекулярно-генетичен анализ на други кандидат-гени, кодиращи хипофизарни транскрипционни фактори, при пациенти без установена PROP1 мутация

#### 3.1. POU1F1

При анализа на всички шест екзона на гена *POU1F1* не се доказаха мутации или полиморфизми при нито един от изследваните 49 пациента. Интронните части на гена не бяха анализирани.

#### 3.2. SOX3

При молекулярно-генетичния анализ на избраната група пациенти не се откриха мутации или полиморфизми в *SOX3* гена. Анализирани бяха само кодиращите части от гена.

#### 3.3. SOX2

Офталмологичният статус бе основен критерий при фенотипната селекция на пациентите за анализ на *SOX2*. При голяма част от тях очните аномалии се откриват в различни комбинации. Само трима от пациентите са моносимптоматични (табл. 21).

**Таблица 21.** Офталмологичен фенотип при изследваните пациенти

	Аномалия	Брой пациенти
Рефракционни аномалии	Миопия	3
	Хиперметропия	2
Размер на очната ябълка	Микрофталмия	2
Преден очен сегмент	Вродена катаракта	1
	Едностранна колобома на ириса	2
	Двустранна колобома на ириса	1
Заден очен сегмент	Фонова ретинопатия	3
	Хипоплазия на макулата	2
	Двустранна колобома на макулата	1
Зрителни нерви	Едностранна хипотрофия	4
	Двустранна хипотрофия	1
Окуломоторен апарат	Хоризонтален нистагъм	1
	Страбизъм	2
	Намалено периферно зрение	3
	Хипертелоризъм	2

При четирима от пациентите не се откриха отклонения в офталмологичния статус. При тях, освен хипопитуитаризъм, бяха налице други фенотипни белези, насочващи към мутация в *SOX2* гена: епилепсия, цепка на устната и небцето, стеноза на пилора, невросензорна глухота, генитални аномалии, проблеми със заучаването и аутистично поведение.

При молекулярно-генетичния анализ на избраната група пациенти не се откриха мутации или полиморфизми в *SOX2* гена. Анализирани бяха само кодиращите части от гена.

### 3.4. *HESX1*

При молекулярно-генетичен анализ на всички 4 екзона на гена *HESX1* не се доказаха полиморфизми и мутации при нито един от изследваните 16 пациента. Интронните части на гена не бяха анализирани.

### 3.5. *IGSF1*

Момче, родено от първа нормално протекла бременност и раждане, с тегло 3300 гр. и дължина 51 см. Без фамилен анамнез за ендокринни заболявания и нисък ръст. Изоставане в растежа и забавена вторична дентиция са забелязани от майката на 6 годишна възраст. Първа консултация с детски ендокринолог е проведена на 7 год. 5 мес. Установени са: ръст 117 см (3<sup>ти</sup> перцентил), КВ изоставаща с 2.5 години, нормално TSH, на фона на долнограничен свободен T4, обем на щитовидната жлеза 2.13 мл. Пролактин – 66.4 mIU/L (64-340 mIU/L). Започнато лечение с Еутирокс в начална доза 25 µg/24h, с постепенно повишаване до 75 µg/24h. Въпреки това не се наблюдава растеж на наваксване и акцелерация на КВ до 11 годишна възраст. Поради това временно се преустановява лечението с Еутирокс. Секрецията на РХ е изследвана многократно във времето и показва нормален отговор на ендогенни стимули (нощен ритъм) и слаб отговор на фармакологични стимули. Диагнозата частичен ДРХ се поставя на 12 години 9 месеца и се започва лечение с рекомбинантен човешки РХ. Тогава се възобновява и лечението с Еутирокс, поради постепенно спадане на нивото на свободен T4.

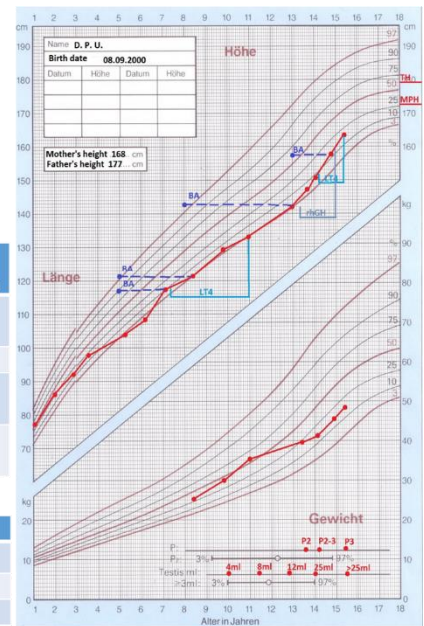
**Фигура 44.** А) Динамика на секрецията на РХ на различна възраст, при ендогенна и фармакологична стимулация; В) Растежна крива на пациента 1-18 години

Възраст	Ръст/SDS	Физическо натоварване			
7г9м	120/-0.7	Минути	0'	15'	20'
		PX (mU/l)	0.6	0.5	0.5

Възраст	Ръст/SDS	Нощен ритъм				
8г4м	121.5/-1.4	Минути	0'	15'	30'	45'
		PX (mU/l)	25.8	41.3	34.8	22.3

Възраст	Ръст/SDS	Insulin 0.1 IU/kg							Физическо натоварване		
12г10м	140/-1.8	-30'	0'	30'	60'	90'	120'	0'	10'		
		PX (mU/l)	0.7	0.3	0.2	7.8	5.7	2.4	2.4	4.6	
		КЗ (mmol/l)	4.0	4.2	1.6	2.3	3.4	3.8			
		Кортизол (nmol/l)	259.6	376.4	268.4	762.4	749.4	489.5			

Възраст	Ръст/SDS	IGF1 генерационен тест			
12г10м	140/-1.8			Преди	След 4 дни
		IGF1 ng/ml (141-419)		195.3	382.2
		IGFBP3 ng/ml (2190-4620)		2924	3924



По време на теста с инсулинова хипогликемия са изследвани и нивата на кортизол. Отговорът на хипогликемия е нормален.

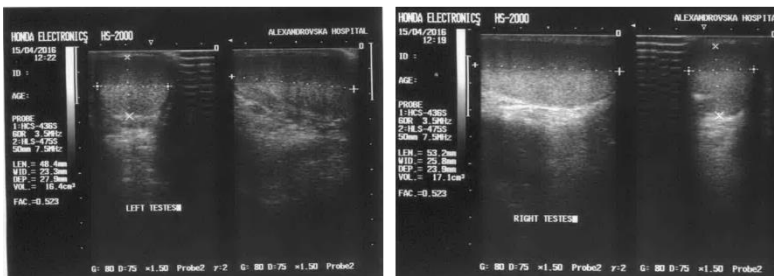
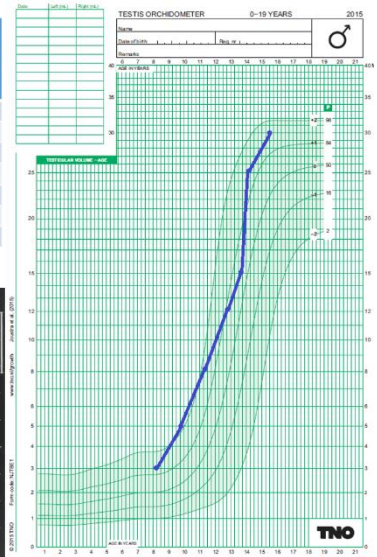
При проследяването на пубертетния статус на пациента се констатира рано и сравнително бързо увеличаване на тестикуларния обем, предшестващо повишаването на серумните нива на гонадотропини и тестостерон. По-късно се наблюдава и дисоциация на гонадотропните хормони, с превалиране на FSH.

Отчетено е и нарушено адrenaрхе с липса на аксиларно и слабо пубисно окосмяване, ниски серумни нива на DHEA-S.

Изследвани са липиден статус и HbA1c – в границите на нормата, според референтните стойности на лабораторията.

**Фигура 45.** А) Проследяване на пубертетен статус и базални серумни нива на полови хормони; В) Ехография на тестиси на 15г7м: ляв тестис: 48.5/23.3/28 mm, 16.5 ml; десен тестис: 54/26/24 mm, 17.5 ml; формула:  $p/6 \cdot \text{length} \cdot \text{width} \cdot \text{height}$  (Joustra, 2015); С) Лонгитудинално проследяване на тестикуларния обем в SDS (норми по Joustra, 2015)

възраст	Пубертетен статус (Tanner)	Тестикуларен обем (Prader)	ЛХ (mU/l) (1.7-8.6)	ФСХ (mU/l) (1.5-12.4)	Тестостерон (nmol/l) (0.98-38.5)	Инхибин b (ng/l) (150-400)	Инхибин b/FSH (15-30/3)	DHEA-S (µmol/l) (0.5-4.1)
8г1м	P1	3 ml						
9г10м	P1	4-6 ml						
11г3м	P1	8ml	0.16	1.25	<<0.37			0.34
12г10м	P1	12 ml	0.34	2.3	0.087	379.2	164.9	
13г5м	P2	15 ml	0.6	3.5	1.5			
14г1м	P2-3	25 ml	0.4	4.9	<0.37			
15г4м	P3	>25 ml	1.5	8.6	16.38			



При пациента е проведен ЯМР на хипоталамо-хипофизарната област: данни за хипоплазия на хипофизата.

**Фигура 46.** ЯМР на хипоталамо-хипофизарна област



При молекулярно генетичния анализ на пациента се доказва нова хемизиготна мутация с.2989C>T, p.Arg997\*. Тя предизвиква преждевременната поява на стоп кодон и синтеза на скъсена екстрацелуларна част на протеина.

### 3.6. Цялостно геномно изследване чрез сравнителна геномна хибридизация (array CGH) на двама пациенти с комплексен фенотип.

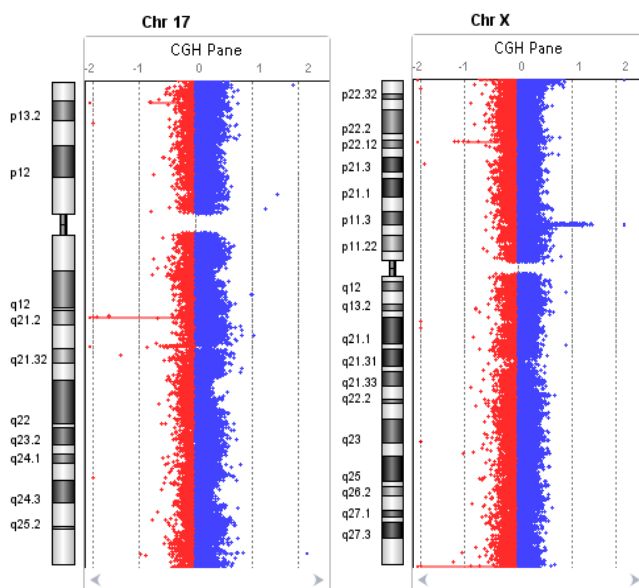
#### 3.6.1. Пациент 7: В.Д.Г.

При молекулярно-генетичния анализ бяха открити различни аберации (делеции и дупликации) в 17 хромозомни участъка, които включват 59 гена. Анализът на хромозомните участъци и гените, намиращи се в тях, както и тяхната функция бе извършен чрез проверка в публични бази данни (Database of Genomic Variants, NCBI /Gene, OMIM, HomoloGene, PubMed). Гени с известна функция, но без отношение към фенотипа на пациента, както и всички псевдогени, бяха изключени от анализа. Откриха се два патогенни аберантни участъка.

**Първият** патогенен участък се намира в хромозома 17:17q21.31(44188501-44787179)x1[hg19]. Тази *делеция* е с размер 599 kb и включва 2 гена: *KANSL1* и един от които псевдоген, което съответства на известния *17q21.31 микроделеционен синдром* или *синдром на Koolen-De Vries*.

**Вторият** потенциално аберантен участък е *дупликация* в хромозома X: (p11.3p11.3)(45838699-46389900)x3 [hg19]. Големината му е 551 kb и съдържа 2 гена: *ZNF673* и *ZNF674*. Дупликацията на *ZNF674* (не и на *ZNF673*) попада в рамките на Xp11.2 дупликационен синдром.

**Фигура 47.** Патологичните хромозомни аберации наблюдавани при пациент 7: отляво – делеция в 17q21.31; отдясно – дупликация в Xp11.3



### 3.6.2. Пациент 8: Б.Г.Г.

При молекулярно-генетичния анализ бяха открити различни аберации (делеции и дупликации) в 13 хромозомни участъка, които включват 108 гена. Анализът на хромозомните участъци и гените, намиращи се в тях, както и тяхната функция бе извършен чрез проверка в публични бази данни (Database of Genomic Variants, NCBI /Gene, OMIM, HomoloGene, PubMed, DECIPHER vs8.5; UCSC Genome Browser). Гените, с известна функция, които нямат отношение към фенотипа на пациента, както и всички псевдогени, бяха изключени от анализа. Откриха се три патогенни аберацни участъци, които вероятно предизвикват фенотипа на пациента.

**Първата** от тях е *дупликация в първа хромозома 1p36.13*, която включва висококонсервативния ген *SPEN* (spen family transcriptional repressor). Той има функцията на транскрипционен репресор, който като част от транскрипционен репресионен комплекс, намалява активността на Notch сигналната система. Той играе важна роля в детерминацията на прогениторните клетки по време на ембрионалното развитие. Описани са мутации при мишки като е засегнато развитието на еритропоетичните клетки, тимуса и ЦНС, но до момента не са открити мутации при хора.

**Втори** потенциално патогенен участък се намира в десета хромозома: *10p14-p13*. Големината на *дупликацията* е *698 kb*. В публичните бази данни има съобщение за двама пациенти с дупликации, припокриващи се с региона у изследвания пациент. Фенотипът частично се припокрива: лекостепенно умствено изоставане, затруднения в заучаването.

В тази хромозома има и втори потенциално патогенен участък *10q21.3-q22.1*. Големината на *дупликацията* е *629 kb* и включва гените *DNA2*, *STOX1* и *KIAA1279*. Има докладван пациент с цепка на устната и небцето, но при него дупликацията е значително по-голяма – *12.23 Mb*. Поради тази причина смятаме, че приносът на тези две аберации за наблюдавания фенотип, ако има такъв, е малък.

**Третият** патологичен участък е дупликация в хромозома 7: *(q11.23q11.23)(72366111-75663082)x3 [hg19]*. Размерът на дупликацията е *3.297 Mb* и включва 62 гена. От тях 13 са псевдогени, останалите 49 са гени с известна функция.

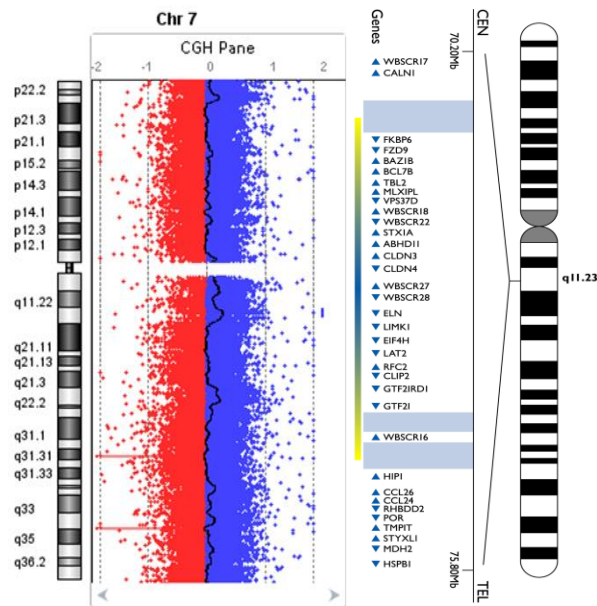
В литературата съществува описан автозомно доминантен синдром – *7q11.23* микродупликационен синдром, в чийто локус попада дуплицираният участък на

изследвания пациент. При анализа на гените, които попадат в аберантния участък на изследвания пациент се установи, че 26 гени от известните 30 съвпадат, или има 87% припокриване (табл. 22). В този участък при пациента се намират още 22 гена, с различна функция (табл.22).

Таблица 22. Гени включени в 7q23.11 микродупликацията при пациент 8

Цито-лента	Гени, влизащи в 7q11.23 микродупликационен синдром		Допълнителни гени, делетирани при пациент 1	
	Гени	Наименование	Гени	Наименование
7q11.23	HIP1	huntingtin interacting protein 1	GTF2IRD2B,	GTF2I repeat domain containing 2B
	WBSCR16	Williams-Beuren syndrome chromosome region 16	TRIM73	tripartite motif containing 73
	GTF2I	general transcription factor Ii	GATSL2	GATS protein-like 2
	GTF2IRD1	general transcription factor II I repeat domain-containing 1	GATSL1	GATS protein-like 1
	CLIP2	CAP-GLY domain containing linker protein 2	STAG3L2	stromal antigen 3-like 2
	LAT2	linker for activation of T cells family, member 2	NCF1	neutrophil cytosolic factor 1
	EIF4H	eukaryotic translation initiation factor 4H	GTF2IRD2	GTF2I repeat domain containing 2
	WBSCR28	Williams-Beuren syndrome chromosome region 28	MIR590	microRNA 590
	RFC2	eplication factor C (activator 1) 2, 40kDa	WBSCR26	Williams-Beuren syndrome chromosome region 26
	ELN	elastin	MIR4284	microRNA 4284
	LIMK1	LIM-domain containing, protein kinase	TBL2	transducin (beta)-like 2
	WBSCR27	Williams-Beuren syndrome chromosome region 27	BAZ1B	bromodomain adjacent to zinc finger domain, 1B
	CLDN4	claudin 4	FKBP6	FK506 binding protein 6, 36kDa
	ABHD11	abhydrolase domain containing 11	TRIM50	tripartite motif containing 50
	CLDN3	Claudin 3	NSUN5	NOP2/Sun domain family, member 5
	WBSCR22	Williams-Beuren syndrome chromosome region 22	POM121	POM121 transmembrane nucleoporin
	WBSCR18	Williams-Beuren syndrome chromosome region 18	BCL7B	B-cell CLL/lymphoma 7B
	STX1A	syntaxin 1A	TRIM74	tripartite motif containing 74
	VPS37D	vacuolar protein sorting 37 homolog D	POM121C	POM121 transmembrane nucleoporin C
	MLXIPL	MLX interacting protein-like	TMEM120A	transmembrane protein 120A
	POR	P450 (cytochrome) oxidoreductase	SPDYE5	speedy/RINGO cell cycle regulator family member E5
	FZD9	frizzled class receptor 9	SNORA14A	small nucleolar RNA, H/ACA box 14A
CCL24	chemokine (C-C motif) ligand 24			
CCL26	chemokine (C-C motif) ligand 26			
RHBDD2	rhomboid domain containing 2			

**Фиг. 27.** Патологичните хромозомни аберации наблюдавани при пациент 7: отляво – делеция в 7q11.23; отдясно – гени, включени в 7q11.23.



Доказа се високостепенно припокриване (87%) на гените, които се намират в аберантния участък при пациента и съобщените при 7q11.23 микроделеционен синдром. Освен това наблюдаваният при този синдром фенотип до голяма степен съвпада с този на изследвания пациент. Това ни дава основание, с голяма степен на сигурност, да заключим, че етиологичната диагноза на изследвания пациент е 7q11.23 микроделеционен синдром.

# ГЛАВА ПЕТА

## ОБСЪЖДАНЕ

### I. ПОДБОР НА КАНДИДАТИ ЗА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕН АНАЛИЗ НА *PROPI*

Подборът на кандидати бе направен по разширен в две направления фенотип, спрямо предходно българско изследване (Stoeva, Rome, 2010).

- Единствен задължителен критерий бе ДРХ. В изследването бяха включени пациенти в предпубертетна и пубертетна възраст и с ИДРХ, поради възможността за по-нататъшно развитие на допълнителни хипофизарни дефицити (Pfeaffle, 2011).
- Наличието на структурна аномалия на аденохипофизата не бе задължителен критерий. В изследването бяха включени и пациенти с нормална находка от ЯМР на хипоталамо-хипофизарна област. По литературни данни, при пациенти с мутация в *PROPI* гена структурата на хипофизата би могла да се променя с възрастта. Описани са пациенти, при които първоначално е открита хиперпластична аденохипофиза, която инволюира с времето (Voutetakis, 2004, Riepe, 2001).

След подбор по фенотип от общата група пациенти, 56 пациенти с доказан хипосоматотропизъм от 55 отделни семейства, бяха изследвани за мутации в *PROPI* гена. Двама от пациентите са родственици от първа степен (брат и сестра). При едно от семействата има консангвинитет (родителите са 3<sup>th</sup> братовчеди).

### II. УСТАНОВЯВАНЕ НА ОБЩАТА ЧЕСТОТА НА МУТАЦИИТЕ В ГЕНА КОДИРАЩ *PROPI*, КАКТО И НАЙ-ЧЕСТАТА МУТАЦИЯ ПРИ БЪЛГАРСКИ ПАЦИЕНТИ С ХИПОСОМАТОТРОПИЗЪМ

Настоящото проучване се проведе с разширен фенотип, като се включиха 56 пациенти с МТД или ИДРХ. При молекулярно-генетичния анализ се доказаха две мутации в *PROPI* гена при 5 пациента: 301-302delAG и 150delA, като изчислената алелна честота на *PROPI* мутации от 8.9% бе по-ниска от тази в предходното проучване с МТД (Stoeva, 2003). Обединената група от пациенти с хипосоматотропизъм включва 107 пациенти и обща честота на *PROPI* мутации в гена сред български пациенти с хипосоматотропизъм е 12.5%. Българската група пациенти е една от най-големите

(табл. 23), като алелната честота е по-ниска от установената в Североизточна и Централна Европа. Липсват *PROPI* мутации като етиологична причина в Австралия, Азия и Северна Европа. Съобщаваната честотата на *PROPI* мутации е 11-22% в различните проучвания (Viera, 2007;Raynoud, 2006; Lemos, 2006; Rainbow 2005; Crus 2010), а при фамилните форми на МТД може да достигне до 30-50% (Cogan, 1998; Deladoey, 98; Fofanova, 98; Torton, 2005). Най-висока честота (70%) се съобщава сред пациенти с МТД в Литва (Navardauskaite, 2014) (табл. 23). Смятаме, че ниската честота на *PROPI* мутации в нашето проучване се дължи от една страна на разширения фенотип, от друга страна на преобладаването на спорадичните форми – само 1 семейство с фамилна форма на МТД.

**Таблица 23.** Разпределение на *PROPI* мутациите в Европа

Държава	Диагноза	Спорадични/ фамилни	Брой пациенти	Брой пациенти с мутация	% пациенти с мутация	Източник
Литва	МТД	смесени	67	47	70.2	Navardauskaite, 2014
Русия	МТД	спорадични	14	8	57.1	Fofanova, 98
Унгария	МТД		35	15	42.9	Halas, 2006
Португалия	МТД		46	19	41.3	Lemos, 2006
Румъния	МТД	смесени	26	10 (7/3)	38 (100/16)	Lazea, 2015
Чехия	МТД		74	18	24.3	Lebl, 2005
Турция	МТД	Смесени	76	12	21.8 (58.8/5.3)	Bas, 2015
Турция	МТД	Смесени	53	2	3.8	Kandemir, 2012
Турция	МТД	Смесени	70	2	1.4	Bertko, 2017
Германия	МТД	Смесени	46	9	19.6	Bottner, 2004
България	МТД	смесени	41	5	12.9	Steova, 2003
България	ИДРХ МТД	Спорадични	56	5	8.9	Настояще проучване
Испания	МТД		26	2	7.7	Fernandez-Rodriguez, 2011
Ирак	МТД	смесени	70	1	0.7	Bertko, 2017
Холандия	МТД	спорадични	71	0	0	De Graaff, 2010
Англия	МТД	смесе	27	0	0	Rainbow, 2005
Бразилия	МТД	Смесени	77	38	49.4	Vieira, 2007
Индия	МТД	Смесени	51			Brila, 2016
Чили	МТД	Спорадични	16	0	0	Lammoglia, 2008
Корея	МТД	Спорадични	12	0	0	Kim, 2003
Корея	МТД	спорадични	27	0	0	Choi, 2017
Япония	МТД	спорадични	71	0	0	Dateki, 2010
Австралия	МТД	спорадични	33	0	0	McLennan, 2003

Първата доказана *PROPI* мутация в настоящето проучване е 301-302delAG в екзон 2. Доказа се само в хетерозиготно състояние при един от изследваните пациенти първо

чрез Bcg1 рестриктазна реакция. Ендонуклеазният ензим Bcg1 е изолиран от *Bacillus coagulans* от Huimin Kong и сътрудници през 1993 година (Kong, 1993). Той разпознава консервативна последователност от CGAN 6 TGC, като срязва и двете комплементарни ДНК вериги и по този начин освобождава участък от 34 двойки бази. За реакцията са необходими  $Mg^{2+}$  и Sandenosylmethylonine. При нормална последователност на екзон 2, ензимът Bcg1 няма рестрикционно място. След делеция на две нуклеотидни бази AG или GA се образува специфичното за Bcg1 ензима място. По този начин, в случай на възникнала мутация рестрикционният ензим реже на две места ДНК молекулата, образувайки три фрагмента: 247bp, 133bp и 34bp. Визуализацията им става на 4% агарозен гел с етидиев бромид под ултравиолетова светлина.

Мутацията бе потвърдена чрез директно секвениране и се намери облигатната втора мутация 150delA. Не се доказаха пациенти, които носят мутацията в хомозиготно състояние. *Изчислената алелна честота на мутацията 301-302delAG сред изследваната кохорта е 0.9%*. Това е една от най-ниските честоти съобщавани за тази мутация в Европа. Тази мутация е открита за първи път от Wu и колеги през 1998 година при трима пациенти с МТД. Впоследствие са описани над 90 пациента от различен етнически произход, носители на мутацията (Cogan, 1999; Mendoca, 1999; Lee, 2004; Pernessatti, 2000; Viera, 2001; Vallette-Kasic, 2001). Тя се открива при повече от 50% от фамилените случаи на мутация в *PROPI* гена и е смятана за мутационен "hot-spot" (Deladoey, 1999). В нашата кохорта от пациенти има само един случай на фамилна форма на МТД. Това е вероятна причина за ниската честота.

Делецията на две нуклеотидни бази от кодон 101 предизвиква изместване на рамката на четене и появата на стоп-кодон само 7 бази по-нататък, в кодон 108 (Wu, 1998). Синтезираният протеин е скъсен, с липса на хомеодомейн и трансактивиращ домейн, поради което е загубена ДНК-свързващата и трансактивираща способност (Lamesch, 2002).

Втората мутация, открита в проведеното от нас изследване е делеция на аденин в кодон 50 от екзон 2 на *PROPI* (150delA) в хомозиготно състояние при четирима пациенти и в хетерозиготно при един. *Алелната честота на мутацията 150delA сред изследваната кохорта от Български пациенти с хипосоматотропизъм е 8% и е сравнима със съобщените в други изследвания в Европа. Мутацията 150delA е най-често срещаната PROPI мутация сред български пациенти с хипосоматотропизъм.*

Тази делеция предизвиква изместване на рамката на четене и води до възникване на преждевременен стоп-сигнал в кодон 164. Синтезира се протеин от 163 АК, при който липсват и трите  $\alpha$ -спирали на ДНК-свързващия хомеодомейн, както и карбокси-терминалният участък. Това води до липса на ДНК-свързваща или трансактивираща способност (Riepe, 2001).

За първи път тази мутация е описана от Kržišnik и колеги през 1999 год. При шест пациенти с нанизъм от изолирания остров Крк в адриатическо море (Kržišnik, 1999). Kržišnik и неговият екип откриват, че те произхождат от род с наследствен нанизъм, който датира от 1874 година и от тогава насам са документирани 24 пациента с нанизъм, които имат роднинска връзка помежду си (Kržišnik, 2010). Те разказват за няколко екипа от изследователи, които са документирали тези пациенти. През 1971 година Zergolern прави заключението, че наследственият нанизъм се дължи на автозомно-рецесивна форма на панхипопитуитаризъм. При всички изследвани пациенти се открива дефицит на GH, TSH, PRL, LH и FSH, проявени в различна възраст и степен. Въпреки че голяма част от пациентите са приемали лечението на хипотиреоидизма нередовно, или въобще не са се лекували, интелектуално изоставане се наблюдава само при една от пациентките. Документирана е продължителност на живота по-дълга от средната за острова. Независимо от дълголетието на тези пациенти, при нито един от тях не се открива АСТН дефицит.

През 2001 година Riepe и колеги за първи път описват 150delA/301-302delAG в съчетана хетерозиготност при двама братя от немски произход. Те са с ранно изявен (на 3.7 год. и 1.0 год.) множествен тропен дефицит, включващ PRL, TSH и АСТН и последващо отпадане на LH и FSH и хипоплазия на аденохипофиза (Riepe, 2001). През 2005 година Lebl и колеги доказват тази мутация при 9 пациента от чешки произход, с алелна честота сред изследваната кохорта от 13.3% (Lebl, 2005). През 2011 година Obermannova и колеги съобщават за още 15 пациента със съчетана хетерозиготна мутация в *PROPI* гена, като 8 от тях са от Чехия, 5 от Германия, и по един пациент от Литва и Русия (Obretenova, 2011).

В скорошно проучване на Dusatkova и Lebl изследват 237 пациенти от 21 различни държави по целия свят, за да установят дали високата алелна честота на описаните мутации е резултат на мутационен "hot-spot" или се дължи на т.нар. ефект на

основателя (the founder effect)<sup>4</sup> (Dusatkova, 2015). Пациентите са носители на 301-301delAG/301-302delAG; 150delA/150delA или 150delA/301-302delAG. При пациентите с 301-301delAG се откриват два общи хаплотипа – първият при пациенти от Европа, води началото си преди около 101 поколения, а вторият при пациенти от Иберийския полуостров, датира преди около 23.3 поколения. Впоследствие и двата хаплотипа са пренесени в Южна Америка. При пациенти, носители на 150delA също се открива общ хаплотип, който води началото си 43.7 поколения назад. Това дава основание на авторите да заключат, че най-честите *PROPI* мутации – 150delA и 301-302delAG, са резултат от ефект на основателя, а не на мутационен “hot-spot”.

В изследваната група пациенти бе доказана висока честота на полиморфизми в екзон 1 и 3 на *PROPI* гена. Този резултат съответства на други проучвания, при които не се доказва *PROPI* мутация, но се открива висока честота на полиморфизми. Rainbow и колеги скринират 27 пациента с МТД за *PROPI* мутация. Откриват полиморфизъм 27T>C с алелна честота 52% (43.9% в нашето проучване); 109+3G>A с честота 46 % (37.8% в нашето проучване) и 424G>A в екзон 3 с честота 22% (19.5% в нашето проучване) (Rainbow, 2005). Авторите обясняват този резултат с етническия произход на пациентите и възможен ефект на основателя в определен район, поради който се наблюдава голям брой засегнати индивиди. Въпреки това не може да се изключи възможността някои от откритите полиморфизми или комбинация от тях да има връзка с неоткрита болестотворна мутация в регулаторен регион или интрон.

Въпреки по-ниската алелна честота *PROPI* мутации спрямо предходното проучване, се запазва разпределението на отделните мутации. Все още най-честа в България е мутацията 150delA. Не изключваме в бъдеще тази генетична характеристика да се промени, с включване на допълнителни пациенти с хипосоматотропизъм, подходящи за генетичен анализ.

**Извод: Общата алелна честота на *PROPI* мутации в изследваната втора група от български пациенти е 8.9%. Най-честата *PROPI* мутация сред български пациенти с хипосоматотропизъм остава е 150delA с алелна честота 8%.**

---

<sup>4</sup> ефект на основаване се разбира загубата на генетична изменчивост тогава, когато се основава нова колония от много малък брой индивиди от по-голяма популация. За пръв път е напълно описан от Мауер през 1952 г. (Mayer, 52), който стъпва на вече наличната теоретична основа от трудовете на Сюъл Райт. В резултат на загубата на генетична изменчивост, новата популация може да бъде видимо различна - и в генотипно, и във фенотипно отношение - от майчината популация, от която произлиза. В крайни случаи, ефектът на основаването се счита за начало на видообразуване и последваща еволюция на нов вид. Ефектът на основаване може да се наблюдава и при меметичната еволюция.

### III. АНАЛИЗ НА КОРЕЛАЦИИТЕ ГЕНОТИП-ФЕНОТИП ПРИ ПАЦИЕНТИ С ДОКАЗАНА *PROPI* МУТАЦИЯ

#### 1. Неонатални прояви

В нашето изследване, установените средно тегло при раждане на пациентите с доказана *PROPI* мутация (3450 гр.), и SDS на дължината при раждане (0.8) съответстват на средните норми за популацията <sup>(Станимирова, 2007)</sup>. Пренаталната фаза на растеж се влияе предимно от инсулин и IGF1 <sup>(Karlberg model)</sup>. Известно е, че теглото и дължината при раждането на пациентите с хипосоматотропизъм съответстват на средните норми за популацията. Lebl и сътр., при анализа на пациентите с доказани *PROPI* мутации, наблюдават дискретно несъответствие – относително по-високо тегло за ръста <sup>(Lebl, 2005)</sup>. Според тях, *PROPI* оказва не голямо влияние върху пренаталната фаза на растеж. Прогресивната загуба на хипофизарни хормони при пациентите с хипопитуитаризъм предполага, че секрецията на РХ е частично запазена по време на интраутеринното развитие <sup>(Lebl, 2005)</sup>.

Често при пациенти с *PROPI* мутация се наблюдава клинична изява на заболяването още в неонаталния период. Тя може да се изяви с един или комбинация от множество симптоми <sup>(Brook's, 5th edition, Ranke, 2013)</sup>. Всички наши пациенти са родени по нормален механизъм, доносени, с главично предлежание. Крипторхизъм и микропенис при раждането са документирани и при четиримата пациенти от мъжки пол. Допълнителна патология се наблюдава при двама пациенти (един със съчетана хетерозиготност и един с хомозиготна 150delA): травматично раждане, интензивна неонатална жълтеница, наложила фототерапия.

За разлика от нас, Lebl и сътрудници, които откриват 18 пациента с мутация в *PROPI* гена сред 73 пациента с хипитуитаризъм, крипторхизъм и микропенис се откриват едва при 20% от пациентите, а хипогликемични епизоди се наблюдават само при 5% от пациентите.

#### 2. Фамилна анамнеза

В настоящето проучване средният ръст, изразен в SDS, на майките (-0.84±1.25; медиана -0.73) и на бащите (-1.20±1.29, медиана -1.14) на пациентите не се различават от средните стойности за популацията. Само двама от пациентите с доказана *PROPI*

мутация са брат и сестра, но в семейството се отрича наличие на други роднини с изоставане в растежа. При останалите пациенти няма данни за роднини с изоставане в растежа. Относително късно менархе на 16 години се наблюдава само при една майка, хетерозиготна носителка на 150delA.

### 3. Ендокринен фенотип

#### *3.1. Дефицит на растежен хормон*

*Начало на изоставането в растежа.* Обикновено изоставането в растежа при ДРХ се забелязва за първи път от родителите около 3-4 годишна възраст (Brook's Pediatric Endocrinology). При нашите пациенти с хомозиготна мутация 150delA това изоставане е забелязано между 5 и 9 години. За разлика от тях обаче, при пациента със съчетана хетерозиготна мутация 301-302delAG/150delA това изоставане се забелязва значително по-рано, още на 6-месечна възраст. Аналогично, възрастта при поставяне на диагноза ДРХ при пациентите с хомозиготна 150delA е между 8 и 16 години, докато тази на пациента с 301-302delAG/150delA е 1 година и 11 месеца. Възрастта на започване на лечение съвпада с тази на поставяне на диагнозата.

*Степен на изоставането в растежа.* Степента на изоставане в растежа варира между пациентите с различни мутации. Средният SDS на ръста на пациентите с хомозиготна 150delA мутация е -3.1, докато при този със съчетана хетерозиготност е -1.9. Разликата в степента на изоставане най-вероятно се дължи по-ранната възраст на поставяне на диагнозата у пациента със съчетана хетерозиготност.

#### *Съотношение костна възраст/хронологична възраст (KB/XB)*

При всички пациенти е изследвана костната възраст при поставяне на диагнозата чрез рентгенография на лява китка. Отчита се различно по степен изоставане на костната спрямо хронологичната възраст. Сред пациентите с хомозиготна 150delA мутация изоставането се засилва с напредване на хронологичната възраст. При тях дефицитът на РХ и ТSH се диагностицират едновременно и това би могло да обясни по-изразеното изоставане в KB.

При пациента Х.Г.Х. се наблюдава изоставане на костната спрямо хронологичната възраст, отговарящо на това на пациент С.Б.М., въпреки малката възраст и липсата на централен хипотиреоидизъм през първите 6 години от заболяването. Това най-

вероятно се дължи на по-ранно настъпилия и по-тежък количествен дефицит на РХ и IGF1, довели до значително по-бавно съзряване.

### 3.1.1. TSH

При пациенти с мутация в *PROPI* гена се наблюдава прогресивно отпадане на хипофизарните клетъчни линии (Kelberman, 2007; Pfaeffle, 2011). Възрастта на поява на съответните хормонални дефицити варира в широки граници. До момента, тежестта или възрастта на поява на централния хипотиреоидизъм не могат да бъдат свързани с определена мутация в *PROPI* гена. Централният хипотиреоидизъм най-често съпътства дефицита на РХ, като понякога може да бъде и първа изява от МТД.

Тиреостимулиращият хормон се състои от общата за TSH, LH и FSH  $\alpha$ -гликопротеинова субединица ( $\alpha$ GSU) и специфичната  $\beta$ -TSH субединица. Синтеза на  $\alpha$ GSU е първият белег на диференциация по време на ембриогенезата на хипофизата (Jorgensen, 2004). Експресията на  $\alpha$ GSU започва през e10.5 и се регулира от ТФ като Lhx3, USF, Pitx1/2, GATA2, TH, PROPI (Zhu, 2006). Експресията на гена, кодиращ хормон-специфичната субединица *TSHb* се стимулира основно от Pou1f1, който се залавя за поне три места от промотора на гена (Lin, 1994). Освен този ТФ, обаче, роля играят и много по-ранни ТФ-и като Lhx3 и Gata2, които обуславят ранната и временна поява на Pou1f1-независимите каудално разположени тиреотрофи (Bach, 1995; Charles, 2006; Dasen, 99; Gordon, 1997).

У пациента със съчетана хетерозиготност 301-302delAG/150delA се наблюдава сравнително голям период от 6 години между диагнозата на ДРХ (1 година и 11 месеца) и проявите на вторичен хипотиреоидизъм (8 години и 2 месеца). Този факт е интересен, но все още не може да бъде обяснен. При около 88% от описаните в литературата пациенти с хомозиготна мутация 301-302delAG/301-302delAG, или със съчетана хетерозиготност 301-302delAG/150delA, се диагностицират едновременно дефицит на РХ и TSH (Riepe, 2001; Lebl, 2005; Obretenova, 2011; Wu, 98; Cogan, 99; Mendoca, 99; Lee, 2004; Pernessatti, 2000; Viera, 2007; Vallette-Kacik, 2004).

При всички наши пациенти с хомозиготна 150delA/150delA мутация се диагностицират едновременно хипосоматотропизъм и централен хипотиреоидизъм между 8 и 12 годишна възраст. Следователно, това е възрастта на поява на централният хипотиреоидизъм, което корелира и с описаните в литературата случаи (Krzisnik, 91, Doknic, 2011).

### 3.1.2. Гонадотропини

При голяма част от пациентите с мутация в *PROPI* гена, които достигат пубертетна възраст се наблюдава липса на пубертетни белези. Има съобщения и за пациенти, със спонтанно отключен пубертет, който впоследствие не прогресира<sup>(Fluck, 99)</sup>. При *Prop1* мутантните мишки Ames, освен липса на *Pou1f1*-зависимите линии (соматотрофи, лактотрофи и тиреотрофи) се откриват и намалени нива на гонадотропни хормони (Tang, 93).

Гонадотрофите са последната от петте хипофизарни клетъчни линии, които се появяват по време на ембриогенезата. Тяхната диференциация протича стъпаловидно, като включва първоначалното активиране на експресията на общата  $\alpha$ -субединица  $\alpha$ GSU през e11.5, последвано от началото на експресията на ТФ SF1 през e13.5 и на *Gnrhr* през e14.5. В тази каскада последно се инициира експресията на специфичните  $\beta$ -субединици *Fshb* и *Lhb*. Регулацията на тези стъпки е комплексна и включва както тъканно-специфични, така и широко разпространени ТФ.

**Таблица 24.** Регулация на експресия на гените SU, Lhb, Fshb

Гени	Транскрипционни фактори
<i><math>\alpha</math>GSU</i>	<i>Lhx3, Usf, Pitx1/2, Gata2, Prop1</i>
<i>Lhb</i>	<i>p8, Ney, Pitx1, Otx, Sfl, Sp1, Egr1*</i>
<i>Fshb</i>	<i>Lhx3, Sfl, Ney, Pitx1/2, Prop1</i>

\*ТФ-и, представени с плътни букви, се контролират от GnRH.

Доказано е, че *Prop1* участва в регулацията на експресията на  *$\alpha$ GSU* и *Fshb*. През 2006 година Sato и колеги откриват, че *Prop1* се захваща за поне шест участъка от проксималния промотер на  *$\alpha$ GSU*-гена. Три от тях са споделени от ТФ от семействата на LIM, GATA и JRE-свързващи протеини. Sato и колеги изказват предположение, че *Prop1* не само участва в регулацията на експресията на  *$\alpha$ GSU*, но е и достатъчен за стимулирането ѝ.

Aikawa и колеги доказват, че *PROPI* директно регулира експресията на *Fshb*, както и че в гонадотрофите се откриват високи нива *PROPI*. За сметка на това, обаче, не откриват пряка или косвена връзка на *PROPI* с *Lhb*. Този резултат обяснява наблюдаваното от Tang и колеги по-слабо засягане на LH в сравнение с FSH при мутантните мишки Ames.

При доказаните в настоящето проучване пет пациента с мутация в *PROPI* гена се открива хипогонадотропен хипогонадизъм. Средната възраст на поставяне на диагнозата е  $15.1 \pm 1.3$ , медиана 15.7 години. Диагнозата е поставена на базата на клинични (липса на пубертетни белези при навлизане в пубертетна възраст) и лабораторни показатели (ниски или недоловими стойности на гонадотропни и полови

хормони. Поради това не можем да съдим за времето на поява или тежестта на гонадотропен дефицит в зависимост от вида на мутация в *PROPI* гена.

При нито един от откритите в това проучване пациенти не се наблюдава спонтанен пубертет. Стимулационен тест с LH-RH е проведен при един от пациентите с хомозиготна мутация 150delA/150delA, като се наблюдава липса на отговор от страна на гонадотропните и половите хормони. При останалите четири пациента не е проведен стимулационен тест поради липса на медикамента в аптечната мрежа.

Като част от настоящото проучване се проведе изследване базални серумни нива на АМН и inhibin b при 22 момчета и 15 момичета с хипосоматотропизъм. Целта бе да се проучи значението на тези два хормона в диагнозата на ХХ още в кърмаческа и предпубертетна възраст. Съществено предимство в диагностиката на ХХ би било избягването на стимулационните тестове, чието провеждане и интерпретация е свързана с разнообразни проблеми.

- АМН и inhibin b при момчета

**АМН** е хомодимерен гликопротеин, принадлежащ към семейството на TGF  $\beta$ , чиято основна функция е да инхибира развитието на мюлеровите структури в мъжкия ембрион. Секрецията му започва през 7-8-та г.с., от незрели СК, стимулира се от плацентарния hCG, впоследствие и от FSH, а се подтиска от *интратестикуларния* тестостерон (Grinspon 2010, Grinspon, 2011). Първоначално се секретира под формата на прекурсор, следва разцепване в два хомодимера /110 kDa N-terminal и 25-kDa C-terminal/, които остават заедно в биологично активен нековалентен комплекс до свързването си с тип II АМН рецептора. Именно тази дисоциация е важна за придобиване на биологична активност /по N. Josso/. Нивата му се повишават постепенно по време на вътреутробния живот и достигат максимални концентрации 3-6 месеца след раждането (в рамките на така наречения мини-пубертет, характеризиращ се с по-високи концентрации на гонадотропините и тестостерона). През този период СК все още не притежават андрогенни рецептори, поради което повишеното ниво на тестостерон не може да подтисне секрецията на АМН. През периода на детството настъпва бавно спадане на нивата на АМН, а след навлизане в пубертета – бързо намаляване на серумната концентрация, под влияние на стръмно повишаващия се интратестикуларен тестостерон (Grinspon 2010, Grinspon, 2011). Характерни за възрастта след навършване на 6 месеца до настъпване на пубертета са много ниските нива на гонадотропините и тестостерона, поради което използването им като надеждни показатели за функционалния капацитет на хипоталамо-хипофизо-

гонадната ос при момчета е силно ограничено. Сертолиевите клетки обаче, остават активни при кърмачетата и по време на ранното детство, поради което АМН достоверно отразява наличието и функционалната активност на тестиса при предпубертетни момчета.

По литературни данни АМН е надежден маркер за диагноза на ХХ още в неонатална и предпубертетна възраст. С голяма чувствителност може да диференцира конституционално изоставане в растежа от вроден хипогонадотропен хипогонадизъм (изолиран и в съчетание с други тропни дефицити) (Grinspon 2010, Grinspon, 2011, Harrington, 2012).

По тази причина в проучването са включени пациенти в неонатална, предпубертетна, пубертетна възраст и възрастни. При пациента в неонатална възраст се отчетоха ниски за възрастта стойности на АМН. В неонатална възраст FSH стимулира секрецията на АМН. При вроден ХХ в този възрастов период се откриват ниски нива на АМН поради липсата на стимулация на гонадотропините (Grumbach, 2005). При започване на лечение с рекомбинантен човешки FSH се наблюдава не само повишаване на нивата на АМН, но и на обема на тестикуларната тъкан. През първата година от живота липсва експресия на андрогенни рецептори в СК. Поради това повишените нива на FSH стимулират пролиферацията на СК и повишена секреция на АМН. Това би подобрило по-нататъшната прогноза на пациента по отношение на тестикуларната функция (Grumbach, 2005, Soumi, 2006).

При всички 6 пациента в предпубертетна възраст се доказаха ниски нива на АМН, спрямо нормите за възрастта. Това показва недостатъчна стимулация от FSH по време на вътреутробното развитие. Може да се прогнозира развитието на ХХ в процеса на проследяване на тези пациенти (Fraietta, 2013, Grinspon 2010, Grinspon, 2011). При двама от тях нивата на АМН бяха екстремно ниски, което показва наличието на гонадна дисгенезия. При двама пациенти достигнали пубертетна възраст (на 13 и 14.4 години) се откриха стойности на АМН, отговарящи на ХХ. В пубертетна възраст нивата на АМН се понижават под действието на интратестикуларния тестостерон. При пациенти в пубертетна възраст и конституционално изоставане в растежа и пубертетното развитие, серумната концентрация на АМН остава висока. При нелекувани пациенти с вроден ХХ, обаче, АМН е *повишен спрямо нормите за възрастта* тъй като серумният тестостерон остава на предпубертетни нива и не оказва инхибиращото си влияние, но *понижен спрямо пубертетния статус*, поради липса на стимулация от FSH (Grinspon 2010, Grinspon, 2011).

Липсва подтискане на АМН при лечение на пациенти с екзогенен тестостерон. При четиримата наши пациенти с доказан ХХ и лечение с тестостеронов препарат се намериха стойности на АМН в референтни граници.

**Inhibin b** е гликопротеин, състоящ се от  $\alpha$ - и  $\beta$ -субединица. Секретира се от СК. Подобно на АМН, пикът в секрецията му достига през 3-6 месец след раждането, под влияние на повишените нива на FSH. Следва бързо спадане на серумната концентрация през периода на детството и отново стръмно повишаване при навлизане в пубертета. Достига нивата на полово зрял мъж около пубертетен стадий II-III по Tanner (Andersson, 1997). Основната функция на инхибин b е да подтиска секрецията на гонадотропините, по-специално на FSH. Съществува силна положителна корелация между inhibin b и броя сперматозоиди, хистологичния стадий на сперматогенеза и тестикуларния обем (Anderson, 1997, Jensen, 1997, Eckardstein, 1999, Luisi, 2004).

По литературни данни, инхибин b е надежден маркер при анализирането на функцията на хипофизо-гонадната ос (Jensen, 1997, Eckardstein, 1999, Luisi, 2004).

К. Kubini и сътр. доказват сигнификантна връзка между базалните нива на inhibin b и стимулирания от hCG тестостерон при 54 предпубертетни момчета с различна гонадна патология. Базално измерване на инхибин b може с достатъчно голяма чувствителност да разграничи конституционално изоставане в пубертета от ХХ (изолиран или в рамките на МТД). През 2010г. Coutant и сътр. определят тази чувствителност – 93% при базална стойност на инхибин b под 35 pg/ml. Чувствителността достига 100%, ако е налице тестикуларен обем под 3 ml или предпубертетни стойности на гонадотропините и тестостерона (Coutant, 2010). Adam и сътр. 2010г. приемат значително по-висок праг на инхибин b – 100 pg/ml, което води до значително намаляване на чувствителността – 73% (Adan, 2010). В нашето изследване сме използвали критериите на Coutant от 2010г.

При нашия пациент в неонатална възраст се доказаха ниски стойности на inhibin b, съответно и на АМН. Двама от пациентите с хипогонадизъм имат екстремно ниски стойности както на inhibin b, така и на АМН. Само при един от пациентите, в пубертетна възраст (14.4 години) и ниски нива на АМН, се отчете и много ниска концентрация на inhibin b.

При двама от пациентите в предпубертетна възраст (К.К.Ц. на 6.16 и И.Б.Л. на 8.8 години) се наблюдава несъответствие – ниски стойности на АМН на фона на inhibin b в референтен за възрастта диапазон. Ниските стойности на АМН се дължат по-скоро на повишаване на интратестикуларния тестостерон, достатъчен да подтисне

секрецията на АМН, но недостатъчен за да увеличи серумната концентрация на тестостерон. При липса на стимулация от FSH, inhibin b, би бил под границата на нормата за възрастта. По този начин се изключва ХХ при тези пациенти. Това е възрастов прозорец, в който е възможно припокриване на стойностите и изследването на двата показателя дава по-висока дискриминативна способност за потвърждаване или отхвърляне на диагнозата ХХ.

При трима от четиримата пациенти на хормонално заместително лечение се отчетоха ниски нива на inhibin b, несъответно на АМН. Това дава основание да се заключи, че базалните стойности на inhibin b са по-чувствителен показател за наличието на ХХ и биха могли да заместят стимулационен тест с LH-RH. Допълнително, именно концентрациите на inhibin b в динамика биха могли да послужат при проследяване на ефекта от лечението.

Несъответствие между стойностите на АМН и инхибин b се наблюдава при един пациент с МТД (Н.Я.М на 16.48 години), достигнал пубертетен стадий G5: високи стойности на АМН, на фона на екстремно ниски нива на инхибин b, според нормите за пубертетния статус. И двата показателя показват спонтанно отключен пубертет, но впоследствие затихнала тестикуларна хормонална продукция.

- АМН и inhibin b при момичета

При момичета АМН се синтезира от гранулозните клетки на първичните и преантралните фоликули. Той инхибира първичното селектиране на фоликули и FSH-зависимия растеж на фоликула (Hagen, 2010). Серумните нива на АМН са доловими от 36 г.с. (Yoo, 2011) През първите 3 месеца от живота концентрацията на АМН се увеличава стръмно, в рамките на мини-пубертета. След това се наблюдава плавно спадане до 4 годишна възраст. Между 4 и 8 годишна възраст се наблюдава покачване на серумните нива на АМН. Вариацията в концентрацията му по време на различните фази на менструалния цикъл е малка. АМН се използва като маркер за овариалния резерв на възрастните жени, както и на пациенти със синдром на Turner, пациентите с поликистозни яйчници. Напоследък се използва все повече при преболели злокачествени заболявания момичета, също като индикатор за яйчниковия резерв. По време на менопаузата се наблюдава постепенно спадане на серумната концентрация (Hagen, 2010, Владимирова, 2006)

Установените при три от нашите пациентки ниски концентрации на АМН могат да бъдат интерпретирани като показател за намален яйчников резерв. Необяснима е нормалната концентрация на АМН при пациентка навършила 16 години без вторични полови белези.

При момичета inhibin b се синтезира от гранулозните клетки на растящия фоликул. Профилът му на секреция е подобен на този на АМН, но се наблюдават значителни вариации в серумната концентрация. Първият пик е през 3-<sup>ти</sup> месец след раждането. Следва плавно спадане до 2 годишна възраст (Sehested, 2000). Нивата му остават ниски или недоловими в предпубертетни момичета и започват да нарастват стръмно през пубертетен стадий II (по Tanner). Достигат максимални концентрации по време на пубертетен стадий III и започват да намаляват през стадии IV и V, което се свързва с появата на менструален цикъл. За разлика от АМН, вариацията в серумната концентрация на inhibin b по време на менструалния цикъл е значителна. Тя е максимална в ранна фоликуларна фаза и чувствително намалява в късната фоликуларна фаза, преди овулация. Достига най-ниски стойности в средата на лутеалната фаза. Поради това inhibin b е информативен маркер за овариалния резерв и директен маркер за прогнозиране на яйчниковия отговор при стимулация с гонаготропини.

Доскоро, методични затруднения не разрешаваха добра дискриминация между двете форми на инхибин – а и b. Установените при нашите пациентки големи разлики в концентрациите на inhibin b спрямо нивата на АМН не винаги могат да бъдат обяснени. Възможно е, inhibin b да е по-чувствителен показател от АМН. Тъй като inhibin b участва в отрицателната обратна връзка и регулация в по-голяма степен на FSH секрецията от хипофизата, повишените концентрации на inhibin b при някои от пациентките биха могли да бъдат свързани с ниски нива на FSH и да се очаква нисък или липсващ отговор след стимулация с LH-RH. За разлика от момчетата, при момичетата, публикациите върху диагностичните предимства на двата показателя в базални условия при хипогонадотропен хипогонадизъм са оскъдни. Би било полезно в бъдещи проучвания у пациентките в пубертетна възраст на лечение с рекомбинантен растежен хормон да се съпостави хормоналният профил /базална и стимулирана секреция/ с данните от УЗ на яйчниците в динамика.

### 3.1.3. АСТН

При *Prop1* мутантните мишки Ames не се наблюдава засягане на първите три клетъчни линии, които се появяват в ембриогенезата на хипофизата –

кортикотрофите, ростралните тиреотрофи и гонадотрофите (Sarson, 96). Според някои автори този факт показва, че *Prop1* няма роля в детерминацията на тези клетъчни линии (Sarson, 96). Освен това дефицит на АСТН при мутантните мишки не се доказва. Въпреки това, при част от пациентите с мутация в *PROPI* гена се открива АСТН дефицит. Най-често той се появява около трета-четвърта декада от живота (Pernessatti, 2000; Mendoca, 99; Wu, 98; Vallette-Kasic, 2001; Asteria, 2001), но има описани случаи още през първа и втора декада (Agarwal, 2000; Torton, 2000).

В настоящето проучване, от четири пациента с хомозиготна мутация 150delA, само един е развил частичен дефицит на АСТН на сравнително ранна възраст – 28 години. При пациента със съчетана хетерозиготност се диагностицира АСТН дефицит още в началото на втората декада на живота – на 11 годишна възраст. Това е в съответствие с общото по-тежко протичане на заболяването при този пациент.

До момента няма известна корелация между възрастта на отключване или тежестта на дефицита с вида на *PROPI* мутацията. От направената литературна справка, обаче, прави впечатление, че само 11.7% от описаните пациенти, носители на хомозиготна 150delA/150delA мутация развиват АСТН дефицит, и то след 40-50 годишна възраст (средна възраст 48 години). Само един от съобщените пациенти е на 19 години при поставяне на диагнозата вторичен хипокортицизъм (Krzisnik, 99, 2010). За разлика от тях, 63% от пациентите със съчетана хетерозиготност 301-302delAG/150delA или с хомозиготна мутация 301-302delAG/301-302delAG, развиват АСТН дефицит (Riepe, 2001, Lebl, 2005, Obretenova, 2011; Wu, 98; Cogan, 99; Mendoca, 99; Lee, 2004; Pernessatti, 2000; Viera, 2007; Vallette-Kacic, 2004).

Възрастта на поставяне на диагнозата варира в широки граници – от 1 година до над 50 годишна възраст, като средната възраст (24 години) е значително по-малка от тази при хомозиготи по 150delA/150delA.

Механизмът на възникване на АСТН дефицит е все още неизяснен. Кортикотрофите са първата клетъчна линия, която се появява около E12.5 от ембриогенезата на хипофизата. Детерминацията и диференциацията на кортикотрофите се регулира основно от ТФ *Tpit*, чиято експресия започва през E11.5 (Naiche, 2005, Lamolet, 2001; Lui, 2011). Синергично действие имат *Pitx1* и *NeuroD1* (Lamolet, 2001). *Prop1* няма пряка роля в ембрионалното развитие на кортикотрофите. Някои автори смятат, че той оказва влияние върху оцеляването на клетките. Според други автори късното начало АСТН дефицита при пациенти с мутация в *PROPI* гена може да се обясни с нарушено кръвоснабдяване. АСТН-продуциращите клетки се намират около инфундибулума, зона с най-богато оксигенирана кръв. За разлика от тях гонадотрофите, които се

намират в каудо-медиалната част на предния лоб, са по-застрашени от исхемичен стрес (Lamecsh, 2002). Според други изследователи, причината за много късното начало на АСТН дефицита е в прогресивна апоптоза на диференцираните клетки (Perna setti, 2000).

### 3.2. Морфология на хипофизната жлеза

В настоящето проучване се анализира морфологията на хипофизата при четири от петте пациента с мутация в *PROP1* гена. При един пациент липсва съгласие на родителите за провеждане на образно изследване.

Резултатите от образното изследване са показани в табл. 25. При нито един от пациентите не се доказва хиперплазия на хипофизата, но при един от тях се наблюдава нормална находка. Засягане на инфундибулума, задния дял на хипофизата или други мозъчни структури не се доказва. Това наблюдение съответства на публикуваните случаи в литературата.

Таблица 25. Съпоставка на находката от ЯМР при пациенти с *PROP1* мутация

Пациент	Възраст (години)	ЯМР	Мутация
Х.Г.Х	11	ХАХ	301-302delAG/150delA
С.Б.М	13	<b>Норма</b>	150delA/150delA
Х.И.Д	28	ХАХ	150delA/150delA
Х.Х.Ч	8	ХАХ	150delA/150delA

Смята се, че откриването на хиперплазирала аденохипофиза или такава с нормален размер съответства на по-ранна възраст на провеждане на изследването, като се наблюдава спонтанна регресия на различна възраст. При представените пациенти прави впечатление, че находката от ЯМР изследването не зависи от възрастта, мутацията или тежестта на протичане.

Сред пациентите с хомозиготна 150delA мутация се открива както нормален, така и намален размер на предния дял на хипофизата. При най-младия пациент, обаче, се наблюдава хипоплазия на жлезата.

От друга страна, при пациента със съчетана хетерозиготност се открива тежка хипоплазия на сравнително малка възраст, в сравнение с останалите пациенти. Това съответства на по-тежкото протичане на заболяването при него.

Не можем да изключим, че предният дял на хипофизата при всички пациенти е бил увеличен в известна степен и впоследствие е намалил размерите си, поради намалените нива на пролиферация в съчетание с повишени нива на апоптоза.

Налага се контролно изследване и на пациент 2 С.Б.М с цел да се установи наличие на регресия на предния дял на хипофизата до хипоплазия.

Морфологията на хипофизната жлеза при пациенти с мутация в *PROP1* гена варира. При по-голяма част от пациентите се намира нормален или намален размер на предния дял на хипофизата. Описани са, обаче, много случаи на хиперплазия на хипофизата с отвеждане на инфундибулума в предна посока с последваща спонтанна регресия на увеличената хипофиза и връщане на инфундибулума в нормална позиция. Възрастта на тази инволюция е различна, но се счита, че при по-млади пациенти се намира нормална или хиперплазирала хипофиза, докато при по-възрастни пациенти се открива различна степен на хипоплазия на аденохипофизата. Засягане на неврохипофизата или други мозъчни структури при пациенти с мутация в *PROP1* гена не е описано до момента.

Причината на първоначалната хиперплазия на хипофизата и последващата спонтанна регресия все още не е напълно изяснен. Според Voutetakis et al. (Voutetakis, 2004) хиперплазирала маса произхожда от интермедиерния лоб.

Ward и колеги правят задълбочено хистологично и имунохистохимично изследване на ембриони от Ames мишки на различна възраст, за да открият точния механизъм на първоначалната хипофизарна хиперплазия с последваща инволюция. Те откриват, че до E12.5 (пик в секрецията на *PROP1*) няма забележима разлика във формата на хипофизата, клетъчната пролиферация и апоптозата между мутантните и контролните мишки. По-късно, обаче, обемът на предния лоб започва да намалява в сравнение с този на контролни мишки, а дорзалната част на джоба на Rathke – да хиперплазира. До E17.5 (експресията на *Prop1* е преустановена) перилуменалните клетки покриват задния лоб почти изцяло и причиняват колапс на лумена. Word и колеги доказват, че това се дължи на дефекти в миграцията и клетъчния цикъл. В отсъствието на активен *Prop1* протеин, питуитарните прогенитори не успяват да активират *Notch2* експресията, поради което експресията на *cyclin D2* е преждевременно прекратена. Голяма част от активно делящите се клетки са задържани с перилуменалната пролиферативна зона на джоба на Rathke и не успяват да мигрират до развиващия се преден лоб. Освен това, по-малка част от тях напускат клетъчния цикъл и тръгват по пътя на диференциация.

След раждането се наблюдава прогресивно намаление на размера на хипофизата при мутантните мишки. Според Ward и колеги това се дължи на значително намалено ниво на пролиферацията след раждането и повишено ниво на апоптоза на недиференцираните клетки, задържани в перилуменалната зона.

Предполага се, че това прекомерно разрастване на джоба на Rathke е аналогично на първоначалната хиперплазия на хипофизата, наблюдавано при част от пациентите с мутация в *PROP1* гена. Липсата на пролиферативна активност и високото ниво на апоптоза, наблюдавани при Ames мишки, биха могли да обяснят прогресивното намаление на размера на хипофизата при тези пациенти.

**Извод: Ясна корелация генотип-фенотип при пациентите с доказани мутации в *PROP1* гена не може да се направи. Прави впечатление, обаче, по-тежкото протичане при наличие на мутацията 301-302delAG в съчетано хетерозиготно състояние. Това включва изключително ранно начало на изоставането в растежа (6 месечна възраст), ранна проява на АСТН дефицит (още в началото на втората декада на живота), тежка хипоплазия на хипофизата, при сравнително по-ранно провеждане на образно изследване. Нормален образ на аденохипофизата не изключва *PROP1* мутации. Ектопичната неврохипофиза не може да бъде свързана с фенотипа при *PROP1* мутации.**

#### **IV. РЕВИЗИЯ НА ИЗПОЛЗВАНАТА СТРАТЕГИЯ НА ПРОВЕЖДАНЕ НА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕН АНАЛИЗ НА *PROP1* ГЕНА**

В предишно молекулярно-генетично изследване на *PROP1* гена, проведено през 2001 година от Стоева и сътр., са изследвани пациенти с хипосоматотропизъм и поне един съпътстващ хипофизарен дефицит, както и структурна аномалия на хипофизата като два задължителни критерии. Стратегията на молекулярно-генетичен анализ на гена е била три-стъпална: 1. Vcg1 рестриктазна реакция като скрининг за мутационния hot spot 301-302 delAG; 2. SSCP и 3. Директно секвениране на гена <sup>(Stoeva, 2010)</sup>.

В настоящето проучване имаше единствен задължителен критерий – хипосоматотропизъм. Всички пациенти бяха подложени най-напред на молекулярно-генетичен анализ на екзон 2 на *PROP1*, състоящ се от *две стъпки*: 1. VcgI рестрикционна реакция като скрининг тест за най-честата мутация 301-302 delAG и 2.

Директно секвениране. В случай, че не се докаже мутация се преминава към директно секвениране на екзон 1, последван от екзон 3.

Резултатът от настоящето изследване потвърждава този от предходното: 1. Най-честата мутация сред български пациенти с хипосоматотропизъм е 150delA и 2. Честотата на мутацията 301-302delAG сред българските пациенти е много по-ниска от съобщаваната в Европа. Поради това стратегията за подбор на пациенти и молекулярно-генетичен анализ на *PROP1* гена се променя както следва:

- Единствен задължителен критерии – ДРХ. Допълнителните дефицити биха могли да се развият след голям период от време. Пример за това е пациент 1, при когото вторият хипофизарен дефицит се е изявил 8 години след първия.
- Структурна аномалия на хипофизата не е задължителен критерий. В подкрепа на тази мярка е нормалната находка от ЯМР на хипоталамо-хипофизарна област на пациент 2 (С.Б.М.), както и множество съобщения в световната литература за пациенти с доказана *PROP1* мутация и нормална находка от ЯМР на главен мозък.
- Мутационният скрининг се извършва в две стъпки:
  - *Bcg1* рестриктазна реакция. Въпреки че най-честата мутация в България е 150delA и тя не може да се установи чрез *Bcg1* рестриктазна реакция, тази стъпка не се смята за излишна. В подкрепа на това е и доказването на хетерозиготно носителство на 301-302delAG при един от пациентите.
  - Директно секвениране на екзон 2, последван от екзони 1 и 3.

#### **V. ВЪВЕЖДАНЕ НА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИЯ АНАЛИЗ НА *PROP1* В РУТИННИЯ ДИАГНОСТИЧЕН АЛГОРИТЪМ ПРИ ПАЦИЕНТИ С ВРОДЕН ХИПОСОМАТОТРОПИЗЪМ, С ИЛИ БЕЗ СЪПЪТСТВАЩИ ДЕФИЦИТИ**

След изпълнението на проект «Грант» №58 по линия на Медицински Университет София, в сътрудничество с Национална Генетична Лаборатория, като част от настоящия дисертационен труд, молекулярно-генетичен анализ на трите екзона на *PROP1* гена беше въведен в рутинната практика. Към такъв анализ се насочват пациенти, които отговарят на горепосочените критерии.

## **VI. ОФОРМЯНЕ НА ГРУПА ПАЦИЕНТИ ЗА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕН АНАЛИЗ НА ДРУГИ КАНДИДАТ-ГЕНИ, КОДИРАЩИ ХИПОФИЗАРНИ ТРАНСКРИПЦИОННИ ФАКТОРИ, ПРИ ПАЦИЕНТИ БЕЗ УСТАНОВЕНА *PROP1* МУТАЦИЯ**

Алгоритъмът за подбор на кандидатите за молекулярно-генетично изследване на определен ген се основава на клиничен фенотип, ендокринната констелация и находката от ЯМР. При наличие на хипосоматотропизъм с или без съпътстващ дефицит, в съчетание с хипоплазия на аденохипофизата първият кандидат-ген е *PROP1*. Ако не се установи мутация, следващият кандидат-ген е *POU1F1*. При хипоплазията на аденохипофизата, съчетана с ектопична или липсваща неврохипофиза, септооптична дисплазия, дефекти по срединната линия, кандидат-гени са *HESX1*, *SOX2*, *SOX3* (фиг. 15).

### *POU1F1*

За молекулярно-генетичен анализ на гена *POU1F1* бяха селектирани 49 пациенти, които отговарят тясно на класическия фенотип (дефицит на *PX*, *TSH* и *PRL*, съчетан с хипоплазия на хипофизата) или, по подобие на анализа на *PROP1* гена, са с разширен фенотип (дефицит на гонадотропни хормони и/или *ACTH*; анатомичен дефект в неврохипофизата и/или хиазмата). Не открихме полиморфизми или мутации при изследваните пациенти.

Подобни резултати се съобщават и в други европейски държави (табл. 26). Съобщаваната честота на *POU1F1* мутации е до 11.3%, като честотата на мутацията се увеличава при фамилна форма. Vas и колеги съобщават за пациент от мъжки пол с мутация в гена на *POU1F1*, с особена клинична изява: централен преждевременен пубертет. Мутации в гена, кодиращ *POU1F1* са рядка причина за вроден МТД.

Таблица 26. . Разпределение на POU1F1 мутации в Европа

Държава	Диагноза	Спорадични/ фамилни	Брой пациенти	Брой пациенти с мутация	Пациенти с мутация в %	Източник
Русия	МТД	смесени	14	0	0	Fofanova
Холандия	МТД	спорадични	78	1	1.2	De Graaff 2010
Чехия	МТД	спорадични	74	1	1.4	Lebl, 2005
Турция	МТД	смесени	76	4	5.3	Bas, 2015
Турция	МТД	смистени	70	1	0.7	Bertko, 2017
Смесена кохорта	МТД	смесени	17	1	5.9	Reynaud
Англия	МТД	спорадични	27	2	7.4	Rainbow
Европа	МТД	смесени	80	9	11.3	Turton
Индия	МТД	смесени	51			Brila, 2016
Бразилия	МТД	смесени	26	0	0	Vieira, 2007
Чили	МТД	спорадични	16	0	0	Lammoglia, 2008
Корея	МТД	спорадични	12	0	0	Kim, 2003
Корея	МТД	спорадични	27	0	0	Chio, 2017
Австралия	МТД	спорадични	33 (4)	2	1.3 (50)	McLeman,
България	МТД	спорадични	49	0	0	Настоящо проучване

### SOX3

В кохортата от пациенти, включени в изследването се наблюдава преобладаване на мъжкия пол. Поради това, X-свързаният хипопитуитаризъм е взет под внимание и *SOX3* включен в панела от анализирани хипофизарни ТФ. В групата бяха включени и подходящи кандидати от женски пол. Въпреки придържането към фенотипа, описан при мутации в *SOX3* в световната литература, мутации или полиморфизми не бяха открити.

Класическия фенотип, свързан с мутации в този ТФ включва X-свързано умствено изоставане, съчетано с дефицит на РХ. По-рядко се съобщава за съпътстващи хипофизарни дефицити. Вече са описани, обаче, много случаи на леко изразено умствено изоставане или липса на такова, X-свързан дефицит на РХ, изолиран или съчетан с други тропни дефицити, дори и панхипопитуитаризъм. В допълнение, въпреки че по-често се засягат момчета, поради X-свързаното унаследяване, има съобщения и за момичета диагностицирани с мутация в *SOX3*.

### SOX2

Пациенти, кандидати за изследване на *SOX2* гена се набираха по две направления. Първата група бяха пациенти с доказана ендокринопатия, съчетана с екстрапитуитарно засягане (очни аномалии, СОД, вродена цепка на устната и небцето, атрезия на хранопровода), при които се направи оценка от офталмолог. Втората група бяха пациенти с очни аномалии (ан/микрофталмия, вродена колобома, вродена

катаракта), насочени от Очна Клиника на Александровска Болница за ендокринологична оценка. Въпреки двустранният подход и сътрудничеството с Очна клиника, не се откриха мутации или полиморфизми в *SOX2* гена при селектираните пациенти.

### *HESX1*

Фенотипно мутациите в *HESX1* се асоциират с изключително вариабилен фенотип. Ендокринните дефицити при отделните пациенти варират от ИДРХ до панхипопитуитаризъм. Находката от ЯМР на хипоталамо-хипофизарната област също варира в широки граници. Sajedi и колеги сравняват фенотипните прояви при миши модели с 2 отделни мутации в *HESX1*. Те установяват, че при хомозиготна замяна във високо консервативен участък – изолевцин на позиция 26 с треонин (I26T) се асоциира с хипоплазия на предния дял на хипофизата, без дефекти по срединната линия или окото. От друга страна, при хомозиготна замяна на аргинин на позиция 160 с цистеин се наблюдава хипоплазия на зрителните нерви, аномалии по срединната линия на предния мозък и хипоплазия на хипофизата с вариабилен хипопитуитаризъм (Sajedi, 2008). Подобен фенотип при посочените мутации се наблюдава и при хора (Dattani, 1998, Carvalho, 2003). През последните години, обаче, се увеличават съобщенията за пациенти с мутацията p.R160C с панхипопитуитаризъм, аплазия на аденохипофизата, но без дефекти в задния дял на хипофизата, структурите по срединната линия и зрителните нерви (Fang, 2016, Durmaz, 2011)

Поради тази причина в изследването бяха включени пациенти както с класическа форма на СОД, така и с хипоплазия на хипофизата, съчетана с вродена цепка на устната и небцето, ектопична хипофиза, синдром на прекъснатия инфундибулум, синдром на empty sella или изолирана хипоплазия на хипофизата. Въпреки разширения фенотип, патологични мутации не бяха доказани. Този резултат корелира с други големи скринингови изследвания, при които мутациите в *HESX1* са рядка причина за развитието на СОД. До момента около 1% от пациентите са със СОД имат поставена генетична диагноза (Datani, 2010). В етиологията на СОД вече са въввлечени много гени на транскрипционни фактори, сигнални молекули и техните рецептори, като *SOX2*, *SOX3*, *FGF8*, *FGFR1*, *PROK1*, *PROK1R*, *SHH*, *OTX2* и др.

Таблица 27. Разпределение на HESX1 мутации в Европа

Държава	Диагноза	Спорадични/ фамилни	Брой пациенти	Брой пациенти с мутация	Пациенти с мутация в %	Източник
Холандия	МТД	спорадични	78	0	0	De Graaff, 2010
Чехия	МТД	Спорадични	74	0	0	Lebl, 2005
Англия	МТД	спорадични	23	0	0	Rainbow
Европа	СОД	смесени	16	0	0	Reynoud
Словения	МТД СОД	смесени	22	1	4.5	Stefanija, 2015
Бразилия	МТД	смесени	40	0	0	Vieira, 2007
Чили	МТД	спорадични	16	0	0	Lammoglia, 2008
Корея	МТД	спорадични	12	0	0	Kim, 2003
Корея	МТД	Спорадични	27	1	0.3	Chio, 2017
България	МТД, СОД	спорадични	16	0	0	Настоящо проучване

### *IGSF1*

Един от пациентите в изследваната кохорта се отличаваше с диагностични и терапевтични трудности: пациент 6, Д.П.У.

Поради наличието на дефицит на РХ и TSH, нисък пролактин, както и хипоплазия на хипофизата, той бе насочен за анализ на *PROPI* и *POUIF1*, но мутации не бяха открити. За откриването на следващия кандидат-ген, направихме обстоен анализ на фенотипа на пациента. Откривме няколко особености:

- При пациента са провеждани няколко теста за секреция на РХ на различна възраст. Наблюдава се различен отговор на ендогенни и фармакологични стимули (фиг.44 А). При изследването на нощния ритъм на секреция на РХ, се откриват високи серумни нива на РХ (пик 48.1 mIU/l). При провеждането на тест с инсулинова хипогликемия, има слаб отговор на стимулацията (пик 7.8 mIU/l).
- Тиреоидна функция, която флукутира между ниска и нормална.
- Нехармонично пубертетно развитие, характеризиращо се с бързо нарастващ тестикуларен обем на фона на нисък серумен тестостерон, превалиране на FSH над LH, късно адренархе с липса на пубично и аксиларно окосмяване.

Въз основа на посочените фенотипни особености, пациентът бе насочен към изследване на гена *IGSF1*. Намерена бе нова хемизиготна мутация (**c.2989C<T, p.Arg997\***), несъобщавана до момента в литературата. Мутацията предизвиква появата на преждевременен стоп-кодон и синтеза на протеин със скъсен

екстрацелуларен домейн. До момента в България не е описан друг пациент с мутация в гена *IGSF1*.

*IGSF1* (Immunoglobulin Superfamily 1 member) gene се намира на X-хромозомата – Xq26.1. експресира се в джоба на Rathke при мишка и човек, в зряла хипофиза и тестиса при човека. Мутациите в този ген причиняват нарушена сигнализация на TRH, като се наблюдават намалени нива на хипофизарна *Trhr* mRNA, повишени нива на хипоталамична *Trh* mRNA, водещи до намалени хипофизарни и серумни нива на TSH с нормална експресия на *Tshb*, нормални нива на T4/свободен T4, но ниски серумни нива на T3. Механизмът на засягане на тестиса все още не е установен. До момента са описани над 20 семейства, 70 пациента и 56 носители на 18 различни мутации. Заболяването вече е известно като синдром на дефицит на IGSF1. В табл. 28 е представена съпоставка на фенотипните характеристики на описаните в литературата пациенти и нашия пациент.

**Таблица 28.** Съпоставка на фенотипа на пациента със синдрома на дефицит на IGSF1

Симптоми	Описани пациенти със синдром на дефицит на IGSF1	Пациент 6
Централен хипотиреоидизъм	100%	+
Ниски-нормални нива на тестостерон при възрастен	88%	?
Макроорхидизъм при възрастен	88%	?
Късно повишаване на серумния тестостерон, но ранно/нормално увеличаване на тестикуларния обем	75%	+
Лек дефицит на внимание	75%	+
Малка тиреоидна жлеза	74%	+
Повишена коремна обиколка при възрастни	59%	?
Дефицит на пролактин	61%	+
Късно биохимично адренархе	50%	+
Повишена коремна обиколка при деца	57%	+
Понижен DHEA при възрастни	40%	?
Доброкачествена външна хидроцефалия	33%	-
Повишено тегло при раждане	26%	-
Хипокортицизъм в кърмачески период	21%	-
Повишени нива на IGF1 при възрастни	20%	?
Голяма обиколка глава	20%	+
ДРХ в детството	16%	+

Освен характерните за синдрома клинични белези, при нашия пациент се наблюдават и някои особености, като *флукутираща тиреоидна функция; разминаване между нормална спонтанна секреция на РХ и нисък отговор на фармакологична стимулация, на фона на нормален/нисък-нормален IGF1; хипоплазия на аденохипофизата*. Тези клинични особености не са съобщавани до момента при пациенти с мутация в *IGSF1* гена. Това обогатява фенотипа на синдрома.

**При момчета с централен хипотиреоидизъм първи кандидат-ген трябва да е *IGSF1* генът.**

## **VII. ИЗСЛЕДВАНЕ НА ЦЯЛОСТНИЯ ГЕНОМ ПРИ ПАЦИЕНТИ С КОМПЛЕКСЕН ФЕНОТИП, ВКЛЮЧВАЩ ЕКСТРАПИТУИТАРНИ АНОМАЛИИ**

На цялостно геномно изследване чрез сравнителна геномна хибридизация бяха подложени двама пациенти.

Първата пациентка клинично изпълва основните критерии от триадата, характеризираща СОД: хипоплазия на очните нерви и макулата, агенезия на *septum relucidum* и хидроцефалия, както и хипоплазия на аденохипофизата, причиняваща множествен тропен дефицит, включващ дефицит на РХ и ТSH. Тази клинична картина насочи към молекулярно-генетичен анализ чрез секвениране на най-честите гени, участващи в етиологията на СОД: *HESX1*, *SOX2* и *SOX3*. Не бяха доказани мутации или полиморфизми в тези гени. С цел откриване на нови патологични региони или гени, участващи в етиологията на заболявания с комплексен фенотип, включващ очни, мозъчни аномалии и хипопитуитаризъм, се изследва цялостният геном на пациентката чрез сравнителна геномна хибридизация (array CGH). Доказаха се аберации в 2 хромозомни региона.

**Първият** участък е делеция на 599 kb в хромозома 17: *17q21.31*, която включва един псевдоген *LOC644246* и един ген *KANSL1*, отговорен за синдрома на Koolen-de Vries. През последните години чрез метода сравнителна геномна хибридизация са открити много хромозомни аберации, причиняващи синдроми със сравнително лека фенотипна изява (Ballif, 2008; Sharp, 2007), уточнени са критични райони на известни генетични болести (Vissers, 2004), освен това клиничната характеристика на много хромозомни заболявания бе значително разширена и допълнена (Cytrynbaum, 2005). Така, чрез изследване на огромни кохорти от пациенти с умствено изоставане, през 2006 год. три независими един от друг изследователски екипа идентифицират нов синдром на Koolen de Vries или *17q21.31* микроделеционен синдром (Koolen, 2006; Sharp, 2006; Shaw-Smith, 2006). Той се характеризира с неонатална мускулна хипотония, затруднения в храненето, леко до средно изоставане в ННР, умствено изоставане и специфичен лицев дисморфизъм, включващ високо и широко чело, епикантни гънки, широка брадичка, големи или клепнали уши, издължено лице. Изчислената честота на синдрома е 1:16000 живородени (Koolen, 2008). До момента са известни поне 60 пациенти

от мъжки и женски пол със 17q21.31 микроделеционен синдром<sup>(Koolen, 2012)</sup>. В България има един описан случай на синдром на Koolen de Vries <sup>(Avdjieva, 2014)</sup>

Генетично синдромът се характеризира с рекурентна хетерозиготна делеция от 500-650 kb на хромозома 17q21.31. Предполага се, че подлежащият механизъм е неалелна хомоложна рекомбинация, медирана от разположени в края на протеина къси повтори от нуклеотидни последователности <sup>(Koolen, 2008)</sup>. Първоначално критичният район на делецията е определен като загуба на 424 kb, включващи шест гена: *C17orf69*, *CRHR1*, *SPPL2C*, *MAPT*, *STH* and *KANSL1*. По-късно при пациенти, диагностицирани със синдром на Koolen de Vries се доказват по-малки по размер делеции и критичният регион е стеснен до 160-274 kb, обхващащ само три гена: *MAPT*, *STH*, *KANSL1* <sup>(Dobourg, 2011)</sup>. През 2012 година, независимо един от друг, Koolen и колеги и Zollino и колеги описват пациенти със синдром на Koolen de Vries, но без характерната 17q21.31 делеция. Вместо нея те откриват точкови мутации в *KANSL1* гена. Поради това те заключват, че синдромът се дължи на аберация в един единствен ген и той е необходим и достатъчен да предизвика патологичния фенотип. В подкрепа на това говори и фактът, че всички описани до сега пациенти със синдром на Koolen de Vries имат делеции, обхващащи и *KANSL1* гена. Този ген кодира нуклеарен протеин KANSL1 (KAT8 regulatory NSL complex subunit 1), състоящ се от 1105 АК. Той е част от протеинов комплекс, наречен NSL, който играе основна роля в модификацията на хроматина, и по-специално H4 и H5, чрез директно взаимодействие с него. По този начин регулира транскрипционната активност на таргетни гени. Генът *KANSL1* показва висока консервативност при сравнение между различни видове – от *Drosophila* до човек. При хора се експресира във всички ембрионални тъкани, но експресията е особено висока в централната нервна система<sup>(Nagase, 1999)</sup>.

Делецията намерена при нашия пациент обхваща *KANSL1* гена, както и *LOC644246*, известен като псевдоген, поради което най-вероятно не допринася за описания фенотип.

Клинично 17q21.31 микроделеционният синдром се характеризира с разпознаваем фенотип: ниско тегло за гестационната възраст (МГВ), мускулна хипотония, затруднения с храненето в неонаталния период, изоставане в НПП в кърмаческия период, закъсняло проговаряне (между 2 и 5 години) и трудности в изговора на думите, затруднения в заучаването, леко до средно умствено изоставане, приятелско поведение <sup>(Koolen 2008)</sup>. При изследвания пациент се откриват част от тези стигми: МГВ,

анамнеза за неонатална мускулна хипотония и затруднения с храненето. Тези симптоми, обаче са често съобщавани и при пациенти със СОД. Първоначално 17q21.31 микроделеционният синдром се открива при пациенти с умствено изоставане и се свързва с него от тогава насам. При изследваната пациентка има известно изоставане в ННР (сравнително късно прохождение и проговаряне), приятелско поведение, но умственият ѝ потенциал е оценен на по-висок от средния за страната (IQ=112 по Raven). Това е първият описан случай на 17q21.31 микроделеционен синдром без умствено изоставане.

При пациентите с Koolen de Vries синдром се среща характерен лицев дисморфизъм, който включва издължено лице, високо и широко чело, епикант, тубуларен нос или с форма на круша, булбозен назален връх, големи проминиращи уши, специфичен цвят и структурирана косата (Koolen, 2008, Dobourg, 2011). При някои пациенти са описани голяма и увиснала долна устна с макроглия. В периода преди започване на лечението с рекомбинантен човешки растежен хормон, при нашата пациентка се откриват високо и широко чело, булбозен връх на носа с депресия на назалната основа, хипоплазия на средната част на лицето. Тези стигми, обаче, са често срещани при пациенти с дефицит на растежен хормон. След започване на лечението с растежен хормон на 9 години и 8 месеца се наблюдава значителна промяна в чертите на лицето и структурата на косата на пациентката. Лицето ѝ става по-дълго, носът придобива форма на круша, а брадичката се разширява, косата става по-здрава, къдрава и тъмна. Част от тези промени на лицето и косата най-вероятно се дължат на лечението с растежен хормон. От друга страна, Koolen и колеги описват издължаване на лицето и носа, разширяване на брадичката, както и подобна промяна на косата с възрастта при техните пациенти (Koolen, 2008).

Допълнителни симптоми при пациенти с Koolen de Vries синдром са дълги пръсти, крипторхизъм, епилепсия, rectus excavatum, вродени сърдечни аномалии, аномалии на отделителната система, луксация на тазобедрена става, деформации на гръбначния стълб (Koolen, 2008, Tan, 2009). Освен това, при 25% от пациентите се описва нисък ръст. При тях обаче не се съобщава за ендокринологично обследване на причината за ниския ръст и може само да се спекулира дали е с питуитарен произход. При пациентката се съобщава за сколиоза, открита в училище, която обаче не е клинично изследвана. Посещавала е изправителна гимнастика.

Очни изменения като хиперметропия и страбизъм се срещат при 30% от пациентите. Описан е един пациент с вродена глаукома (Авджиева, 2014). При изследвания пациент очният фенотип е по-тежък и включва хипоплазия на зрителен нерв и макула, нистагъм и страбизъм. Според направената литературна справка тези симптоми не са описани до момента при пациент с Koolen de Vries синдром (Koolen, 2008, Tan, 2009).

Аномалии на главния мозък са описани при 30% от пациентите със 17q21.31 микроделеционен синдром. Те включват хидроцефалия, агенезия/хипоплазия на corpus callosum, диспластичен хипокамп, малформация на Chiari (Terrone, 2012). Има само един описан случай на момче с хипопитуитаризъм като част от синдром на прекъснат инфундибулум (PSIS) и 17q21.31 микроделеционен синдром (Chehadeh-Djebbar, 2011). При представения пациент са изпълнени трите основни критерия от класическата триада на СОД: хипоплазия на очен нерв, дефекти по срединната линия (липса на septum pellucidum) и хипопитуитаризъм вследствие на хипоплазия на аденохипофизата. Освен това при нея се наблюдава и хидроцефалия, срещана при 30% от пациентите. Това е първият пациент в света, при който е описана СОД като част от Koolen de Vries синдром.

**Таблица 29.** Сравнение на фенотипните характеристики при пациент 7 и пациенти с доказана микроделеция 17q21.31

Симптоми	17q21.31 микроделеционен синдром	Пациент 7
Лицев дисморфизъм	~100%	+
Мускулна хипотония в кърмаческа възраст	~100%	+
Затруднено хранене в кърмаческа възраст	~100%	+
Късно проговаряне и трудности с изговарянето и формулирането	~100%	+/-
Леко до средно умствено изоставане	~100%	-
Изоставане в НПП	~100%	+
Нисък ръст	20%	+
Крипторхизъм	70%	-
Структурни аномалии на мозъка	20-30%	+
Дисплазия на тазобедрената става	20%	-
Бъбречни аномалии	30%	-
Гърчов синдром	20%	-
Кардиологични проблеми	50%	-
Офталмологични аномалии	30%	+

При пациентката има частично припокриване както на генотипа, така и на фенотипа. Известно е, обаче, че делетираният при нея ген KANSL1 е достатъчен, за да предизвика тази клинична проява. По отношение на фенотипа, при пациентката липсва характерното за синдрома умствено изоставане, но голяма част от симптомите могат да се обяснят с тази аберация, например хипопититаризъм и нисък ръст,

мозъчни аномалии, офталмологични промени, забавено НПП, известен лицев дисморфизъм. Поради това смятаме, че генетичната диагноза на пациентката е 17q21.31 микроделеционен синдром или синдром на Koolen-De Vries.

**Вторият** потенциално аберентен участък е *дупликация в хромозома X: (p11.3p11.3)(45838699-46389900)x3 [hg19]*. Големината му е 551 kb и съдържа 2 гена: *ZNF673* и *ZNF674*. От направената литературна справка, в този участък се съобщава по-често за делеция на тези гени, свързани с умствено изоставане, ретинална дистрофия и нисък ръст. При тези пациенти не се коментира причината за ниския ръст и не се съобщава за ендокринологично обследване. Поради това може само да се спекулира за вероятността тези гени да причинят хипопитуитаризъм. Само един автор (Ramaswamy, 2010) описва и дупликация на двата гена, отново свързана с умствено изоставане и забавено нервно-психическо развитие, без асоциирани офталмологични, мозъчни или други аномалии. Наличието както на делеции, така и на дупликации говори, че ефектът на гена е дозо-зависим.

Известни са други гени в X хромозомата, участващи в етиологията на СОД, мутации, в които причиняват умствено изоставане и различна степен на хипопитуитаризъм. Такъв ген е *SOX3* (Xq27.1). При него също са описани както делеции, така и дупликации с подобен фенотип, което води до заключението за дозо-зависимият му ефект. В последните години, обаче се съобщават все повече случаи на мутация в *SOX3* при пациенти с хипопитуитаризъм, но без умствено изоставане. Спрямо тази аналогия, теоретично, поради подобния механизъм на действие *ZNF674* и *ZNF673* биха могли да са отговорни за възникналия фенотип.

Известен Xp11.2 дупликационен синдром, в който според някои източници попада и *ZNF674* (Xp11.23), но не и *ZNF673*. За синдрома са характерни забавено НПП, трудности със заучаването, затруднения с проговарянето, ранен пубертет, нисък ръст и наднормено тегло, аномалии в краката и/или стъпалата, гърчов синдром. Част от тези характеристики се припокриват с фенотипа на пациентката.

Това ни дава основание да заключим, че дупликацията Xp11.3, намерена при пациентката, би могла да допринесе за наблюдавания фенотип, но не и да ги обуслови изцяло.

### *Пациент със 7q11.23 микродупликационен синдром*

Фенотипът на пациента е комплексен и включва частичен дефицит на растежен хормон на базата на хипоплазия на аденохипофизата, както и наличие на дефект по срединната линия (вродена двустранна цепка на устната и небцето). Поради отрицателните резултати от секвенционно изследване на *HESX1*, *SOX2* и *SOX3*, пациентът бе насочен за изследване на цялостния геном чрез array CGH. Доказаха се 3 аберантни участъка.

**Първият** от тях е *дупликация в първа хромозома 1p36.13*, която включва гена *SPEN* (spen family transcriptional repressor). Той се открива при много видове, от *Drosophila* до човек, като показва висока консервативност. Има функцията на транскрипционен репресор, който играе важна роля в детерминацията на прогениторните клетки по време на ембрионалното развитие. Взаимодейства директно с HDAC (Histone deacetylase). Той е част от транскрипционен репресионен комплекс, взаимодействащ с Notch сигналната система (чрез Rbp-J), като намалява нейната активност. Освен това взаимодейства и с NCoR (nuclear receptor corepressor 1). Този рецептор е част от комплекса HESX1/TLE/NCoR, който повишава репресионната активност на HESX1 и осигурява неговата функция. Описани са мутации при мишки като е засегнато развитието на еритропоетичните клетки, тимуса и ЦНС.

Според направената литературна справка няма изследвания на експресията на SPEN при хора, нито са съобщени открити мутации и техния фенотип. Теоретично, поради влиянието върху Hesx1 и Notch сигналната система, SPEN би могъл да предизвика описания фенотип при пациента. При него са наблюдава дупликация. При дрозофила са описани gain-of-function мутации, които засягат развитието на нервната система. Може да се предположи, че е важна дозата на гена, по подобие на X-свързаните SOX3 и ZNF674.

**Втори** потенциално патогенен участък се намира в десета хромозома: *10p14-p13*. Големината на *дупликацията е 698 kb*. В достъпните бази данни има съобщение за двама пациенти с дупликации, припокриващи се с региона у изследвания пациент. Фенотипът частично се припокрива: лекостепенно умствено изоставане, затруднения в заучаването.

В тази хромозома има и втори потенциално патогенен участък *10q21.3-q22.1*. Големината на *дупликацията е 629 kb* и включва гените *DNA2*, *STOX1* и *KIAA1279*. Има докладван пациент с цепка на устната и небцето, но при него дупликацията е

значително по-голяма – 12.23 Мб. Поради тази причина смятаме, че приносът на тези 2 аберации за наблюдавания фенотип, ако има такъв, е малък.

**Третият** патологичен участък е дупликация в хромозома 7: (*q11.23q11.23*)(72366111-75663082) $\times 3$  [*hg19*]. Размерът на дупликацията е 3.297 Мб и включва 62 гена. От тях 13 са псевдогени, останалите 49 са гени с известна функция.

В литературата съществува описан автозомно доминантен синдром – 7q11.23 микродупликационен синдром, в чийто локус попада дублицираният участък на изследвания пациент. Първият публикуван случай на 7q11.23 микродупликационен синдром е от Somerville et al. през 2005 година. От тогава до момента са описани около 50 пациента с тази хромозомна аберация в целия свят. Съобщаваната честота е 1:12 000 живородени деца. По литературни данни големината на дупликацията е 1.5Мб и включва между 25 и 30 гена, изброени на фиг. 4. По-често срещан е 7q11.23 микроделеционният синдром на William-Beuren, с честота 1:7500 живородени.

При анализа на гените, които попадат в аберантния участък на изследвания пациент се установи, че 26 гени от известните 30 съвпадат, или има 87% припокриване (табл. 3). В този участък при пациента се намират още 22 гена, с различна функция (табл. 3). Фенотипните прояви на синдрома са вариабилни, но най-често срещаните белези са:

- Дискретни лицеви малформативни стигми: коси и близко разположени вежди, дълбоко разположени очи, широка основа на носа, къс филтрум, широко изпъкнало чело. Възможна е известна асиметрия на лицето и макроцефалия;
- Късно проговаряне и трудности с изговарянето и формулирането;
- Слух – може да бъде и намален, като с възрастта се подобрява (glue ear).
- Леко до средно умствено изоставане;
- Изоставане в нервно-психическото развитие;
- Обикновено нормален ръст, но се съобщава за пациенти с изоставане в растежа както пре-, така и постнатално;
- Крипторхизъм;
- При 11% от пациентите се наблюдава цепка на устната или небцето;
- Мускулна хипотония при 70% от децата;
- Поведение от аутистичния спектър, включващо липса на контакт с очите и социални връзки и повтарящи се интереси. Характерни са изключителна срамежливост, своенравност и избухливост;

- Около 25% от пациентите са с гърчов синдром;
- Около 20% с кардиологични проблеми като персистиращ дуктус артериозус, междукамерен дефект; междупредсърден дефект;
- 27% имат офталмологични проблеми, най-често рефракционни аномалии (хиперметропия и астигматизъм), страбизъм и синдром на Дюан.

**Таблица 30.** Сравнение между фенотипа на пациент 8 и фенотипа при 7q11.23 микродупликационен синдром

Симптоми	7q11.23 микродупликационен синдром	Пациент 8
Лицев дисморфизъм	~100%	+
Късно проговаряне и трудности с изговарянето и формулирането	~100%	+
Намален слух	25%	+
Леко до средно умствено изоставане	83%	+
Изоставане в НПП	70%	+
Нисък ръст	10-15%	+
Крипторхизъм	25%	+
Цепка на устната и небцето	11%	+
Мускулна хипотония	70%	-
Поведенчески промени	~100%	+
Гърчов синдром	25%	-
Кардиологични проблеми	20%	-
Офталмологични аномалии	27%	+
Констипация	75%	-

Доказа се високостепенно припокриване (87%) на гените, които се намират в аберантния участък при пациента и съобщените при 7q11.23 микроделеционен синдром. Освен това наблюдаваният при този синдром фенотип до голяма степен съвпада с този на изследвания пациент. Това ни дава основание, с голяма степен на сигурност, да заключим, че етиологичната диагноза на изследвания пациент е 7q11.23 микроделеционен синдром.

Наблюдават се известни разлики във фенотипа. Те могат да се обяснят с това, че дупликацията, доказана при пациента (3.297 Mb) е по-голяма от описаната (1.5Mb) и включва 22 допълнителни гена с различни функции. Останалите описани патогенни аберации, открити при този пациент също биха могли да допринесат за клиничната изява.

## ГЛАВА ШЕСТА

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

През последните 30 години познанията за ембриогенезата на хипофизата неимоверно се увеличиха. Етиологията на МТД непрекъснато се разширява с нови гени и мутации. Въпреки това над 85% от пациентите с МТД все още остават без етиологична диагноза. До момента в България е правено едно генетично проучване за *PROPI* на 41 пациенти с МТД.

Ние си поставихме за цел да разширим панела от хипофизарни ТФ, анализирани при по-голям брой пациенти с хипосоматотропизъм, като въведем този мутационен скрининг в рутинната диагностична практика.

В изследването бяха включени 67 пациенти с единствен задължителен критерий ДРХ. Фенотипната характеристика бе извършена въз основа на клинични и аукологични показатели, ендокринни дефицити и находка от образно изследване на хипоталамо-хипофизарна област. В мутационната стратегия бе използван класическия подход на „кандидат-гените“. Транскрипционният панел обхваща ранни (*HESX1*, *SOX2*, *SOX3*) и късни (*PROPI*, *POUIF1*) ТФ. При двама пациенти с комплексен фенотип, след отрицателен резултата за *HESX1*, *SOX2*, *SOX3*, се проведе изследване на цялосния геном чрез СГХ. Пациентът с централен хипотиреоидизъм, хипосоматотропизъм, хипопрولاктинемия и макроорхидизъм бе изследван за *IGSF1*.

Използвайки този подход поставихме етиологична диагноза при осем пациенти (11.9%). Пет от тях са с мутация в *PROPI* гена (8.9% от изследваните пациенти). Следователно, най-честата причина за хипосоматотропизъм при МТД в България се пада на мутации в *PROPI* гена. Сред нашите пациенти най-разпространена е мутацията 150delA (8% от изследваните пациенти). Разпределението на *PROPI* мутации в Европа е твърде различно. В страните от Западна и Северна Европа мутации в *PROPI* гена не са водеща причина за МТД, за сметка на мутациите в *POUIF1*. Освен това, в страните с чести *PROPI* мутации в Източна и Централна Европа съществуват разлики по отношение на честота на две мутации: 150delA и 301-302delAG. В Латвия, за разлика от България, над 70% от установените *PROPI* мутации се дължат на 301-302delAG.

При анализа на взаимоотношенията клиничен фенотип и генотип не се установиха ясни корелации. Единственият пациент със съчетана хетерозиготна мутация 301-302delAG/150delA показва по-тежко клинично протичане в сравнение с хомозиготните 150delA пациенти. При него изоставането в растежа е с изключително ранно начало (на шест-месечна възраст), прогресивно отпада хормоналната продукция на всички питуитарни клетъчни линии, включително и АСТН дефицит в началото на втората декада от живота. Установените в голям процент полиморфизми, локализирани в екзон 1 и екзон 3 в различни комбинации при всички изследвани пациенти съответства на данните от литературата. Тяхното влияние върху фенотипа на пациентите остава неясно.

Мутации в гените *POU1F1*, *HESX1*, *SOX2* и *SOX3* не бяха открити. Следователно, сред българските пациенти с МТД и СОД, те са изключително рядка етиологична причина.

Откри се един пациент, носител на нова, несъобщавана до сега, хемизиготна мутация в X-свързания ген *IGSF1*. При пациента се установиха симптоми, типични за синдрома на дефицит на *IGSF1*: централен хипотиреоидизъм, частичен ДРХ, макроорхидизъм, късно биохимично адренархе. Клиничната картина на синдрома се обогати с някои особености при пациента: хипоплазия на аденохипофизата, флуктоиращ централен хипотиреоидизъм, несъответствие на отговора на РХ при ендогенна и фармакологична стимулация на секрецията. Това е първият пациент с мутация в *IGSF1*, съобщен в България. Този синдром е открит не отдавна от Sun и сътр. през 2012 год, но броят на пациентите в световен мащаб расте бързо. Водещи са страните с Т4/ТSH скринингова стратегия, при които е възможно верифицирането му още в неонатална възраст. За България е от важно практическо значение, че при момчета с централен хипотиреоидизъм това е първият кандидат-ген при етиологичното изясняване.

Пациенти с комплексен фенотип, включващ хипосоматотропизъм, асоцииран с дефекти по срединната линия, аномалии в уро-гениталната и храносмилателната системи, бяха анализирани за дефекти в ранните хипофизарни ТФ *HESX1*, *SOX2* и *SOX3*. Не се откриха мутации или полиморфизми. В търсене на нова етиологична причина за сложния фенотип, при двама пациенти се пристъпи към анализ на цялостния геном.

При един от тях се доказва патогенен участък в хромозома 17:17q21.31(44188501-44787179)x1[hg19]. Делецията е с размер 599 kb и включва 2 гена: *KANSL1* и един псевдоген, което съответства на известния *17q21.31* микроделеционен синдром или синдром на *Koolen-De Vries*. Фенотипната характеристика на синдрома се разшири в няколко направления. Това е първата пациентка с KDVS в света без умствено изоставане. До момента няма други съобщени пациенти със СОД като част от KDVS.

При втория пациент се доказва дупликация в хромозома 7: (q11.23q11.23)(72366111-75663082)x3 [hg19] с размер 3.297 Mb, която включва 62 гена. От тях 13 са псевдогени, останалите 49 са гени с известна функция. Находката съответства на известния автозомно доминантен синдром – 7q11.23 микродупликационен синдром. При анализа на гените, които попадат в аберантния участък на изследвания пациент се установи, че 26 гени от известните 30 съвпадат (87% припокриване). В този участък при пациента се намират още 22 гена, с различна функция и неясно влияние върху фенотипа. За първи път се описва пациент със 7q11.23 микродупликационен синдром и засягане на хипофизата. Според направената литературна справка това е първият описан пациент със 7q11.23 микродупликационен синдром в България.

Планираме да продължим настоящата работа в няколко насоки:

1. Оформяне на група от пациенти с ИДРХ, кандидати за молекулярно-генетичен анализ на гените от оста GH-IGF1.
2. Изследване на цялостния геном на неизяснените пациенти и тези с комплексен фенотип чрез сравнителна геномна хибридизация и секвениране от ново поколение (next generation sequencing).
3. Създаване на национална програма за антропометрични измервания на децата в предучилищна и училищна възраст и формулиране на критерии за насочване към детски ендокринолог, с цел селекция и ранна диагностика на деца с изоставане в растежа.

## ГЛАВА СЕДМА

### ИЗВОДИ И ПРИНОС НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

#### 1. Изводи

- 1.1. Поставена бе етиологична диагноза при 8 пациенти (11.9% от изследваните пациенти) с хипосоматотропизъм.
- 1.2. Общата алелна честота на *PROPI* мутации в изследваната група български пациенти е 8.9%. Най-честата *PROPI* мутация сред български пациенти с хипосоматотропизъм, различна от тази в Североизточна Европа, е 150delA с алелна честота 8%.
- 1.3. Ясна корелация генотип-фенотип при пациентите с доказани мутации в *PROPI* гена не може да се направи. Прави впечатление, обаче, по-тежкото протичане при наличие на мутацията 301-302delAG в хомозиготно и съчетано хетерозиготно състояние. Това включва изключително ранно начало на изоставането в растежа (6 месечна възраст), ранна проява на АСТН дефицит (още в началото на втората декада на живота), тежка хипоплазия на хипофизата, при сравнително по-ранно провеждане на образно изследване.
- 1.4. Пациенти с ИДРХ или нормална находка от образно изследване на хипоталамо-хипофизарна област, не трябва да се изключват от молекулярно-генетичен анализ на *PROPI* гена.
- 1.5. Мутационният скрининг на хипофизарни транскрипционни фактори трябва да започва с двустъпален анализ на *PROPI* гена, последван от останалите гени, включени в хипофизарния панел. Това би довело до поставяне на по-ранна, бърза и достъпна диагноза, както и по-ефективно проследяване на пациентите.
- 1.6. Пациенти от мъжки пол с централен хипотиреоидизъм трябва да бъдат изследвани за мутация в *IGSF1*.
- 1.7. Избраният изследователски метод има определени недостатъци – анализирани са само кодиращите части на гена. Поради липсата на етиологична диагноза, при тези пациенти трябва да се премине към по-съвременни методи, вече навлизащи и в България – пълно екзомно секвениране „от ново поколение“.

## 2. Приноси с научен характер

- 2.1. Характеризира се участието на панел от ТФ в етиологията на хипосоматотропизма сред български пациенти, като се доказва единствено за *PROPI* значението му като етиологичен фактор.
- 2.2. Установи се общата честота на мутации в гена *PROPI*, както и най-често срещаната сред български пациенти е 150delA.
- 2.3. Описа се първият пациент с мутация в гена *IGSF1* в България. Фенотипът на синдрома на дефицит на *IGSF1* се обогати с нови клинични белези, неописани до момента в световната литература.
- 2.4. Представиха се първи резултати от изследване на цялостния геном на пациенти с редки синдромни форми на вроден хипопитуитаризъм.
  - 2.4.1. За първи път се описва пациент със СОД като част от синдрома на Koolen de Vries, без интелектуално засягане.
  - 2.4.2. За първи път се описва пациент със 7q11.23 микродупликационен синдром и засягане на хипофизата. Според направената литературна справка това е първият описан пациент със 7q11.23 микродупликационен синдром в България.
- 2.5. За първи път се изследваха серумните нива на АМН и инхибин b при пациенти в предпубертетна и пубертетна възраст, с различни диагнози. Доказа се значението на тези два показателя както за поставяне на диагнозата ХХ още в неонатална и предпубертетна възраст, без провеждането на стимулационни тестове, така и за проследяване на лечението при пациенти с доказан ХХ.

## 3. Приноси с приложен характер

- 3.1. Молекулярно-генетичният анализ на панел от хипофизарни ТФ (*PROPI*, *POU1F1*, *HESX1*, *SOX2*, *SOX3*) се въведе в рутинната диагностика на пациенти с хипосоматотропизъм.
- 3.2. Подборът на пациенти се прави по разширен фенотип с единствен задължителен критерий остава ДРХ.
- 3.3. Предлага се следната мутационна-скринингова стратегия:
  - 3.3.1. Пациенти с хипосоматотропизъм (ИДРХ, МТД) без асоциирани аномалии се насочват към анализиране на *PROPI/GH-IGF1* ос. При отрицателен резултат се предлага секвениране от ново поколение.

3.3.2. Пациенти със СОД и екстрапитуитарни аномалии се насочват към анализ на ранни хиподизарни ТФ. При отрицателен резултат се предлага сравнителна геномна хибридизация и/или секвениране от ново поколение.

# ПРИЛОЖЕНИЯ

## Приложение 1. Класификации за нисък ръст

- I. Класификация по Cowell, в която са взети предвид няколко важни показателя: пренатално и постнатално развитие, пропорционалност, възможност за нормални варианти на ниския ръст.



## II. Класификация на ESPE

1A	PRIMARY GROWTH FAILURE
1A.1	<b>Clinically defined syndromes</b>
1A.1a	Syndromes classified elsewhere:
	<i>45,X/46,XY disorder of sex development (4A.1)</i>
	<i>45,X and variants with female phenotype ((Ulrich)-Turner syndrome) (14A.5)</i>
	<i>Phenotypic male with X/XY mosaicism (14A.4)</i>
	<i>18q deletion syndrome (14A.1)</i>
	<i>Aarskog-Scott syndrome (14B.1)</i>
	<i>Bloom syndrome (14B.6)</i>
	<i>Cornelia de Lange syndrome (14B.9)</i>
	<i>DiGeorge syndrome (velocardiofacial syndrome) (14B.10)</i>
	<i>Down syndrome (14A.2)</i>
	<i>Kabuki makeup syndrome (14C.4f)</i>
	<i>Noonan syndrome (14B.24)</i>

	<i>Prader-Willi-Labhart syndrome</i> (14B.25)
	<i>Von Recklinghausen's disease (neurofibromatosis type 1)</i> (14B.27)
	<i>Rubinstein-Taybi syndrome</i> (14B.29)
	<i>Silver-Russell syndrome</i> (14B.31)
	<i>Williams-Beuren syndrome</i> (14B.37)
1A.1y	Other specified syndromes, e.g. Three M slender-boned dwarfism, Seckel syndrome, Mulibrey nanism
1A.1z	Other syndromes associated with short stature, unspecified
<b>1A.2</b>	<b>Small for gestational age (SGA) with failure of catch-up growth P05.1</b>
1A.2a	Disorders classified elsewhere:
	<i>IGF-I deficiency</i> (1B.4e)
	<i>IGF resistance</i> (1B.4f)
1A.2y	Due to known cause (specify), e.g. prenatal infection, drugs, smoking, alcohol P00.2–4
1A.2z	Idiopathic
<b>1A.3</b>	<b>Skeletal dysplasias (constitutional disorders of bone) Q77, Q78</b>
1A.3a	Achondroplasia group (group 1)
1A.3a.1	Achondroplasia
1A.3a.2	Hypochondroplasia
1A.3a.8	Other specified disorders included in this group (thanatophoric dysplasia, SADDAN)
1A.3b	Type II collagenopathies (COL2A1 defects) (group 8)
1A.3b.1	Spondyloepiphyseal dysplasia congenita
1A.3b.8	Other specified disorders in this group
1A.3c	Mesomelic dysplasias (group 16)
1A.3c.1	Dyschondrosteosis (Leri-Weill and other defects in the SHOX gene, e.g. in children without dysmorphic features) [primary: 14B.19]
1A.3c.2	Langer type (homozygous dyschondrosteosis)
1A.3c.8	Other specified disorders included in this group
1A.3d	Dysostosis multiplex group (group 22)
1A.3d.1	Mucopolysaccharidosis (type IH, IS, II–VII) E76
1A.3d.2	Mucopolidosis (type II and III) #252500 E77.0
1A.3d.8	Other specified disorders included in this group
1A.3e	Dysplasias with decreased bone density (group 24)
1A.3e.1	Osteogenesis imperfecta I–VI [primary: 12D.1b]
1A.3e.8	Other specified disorders included in this group
1A.3f	Dysplasias with defective mineralisation (group 25)
1A.3f.1	Hypophosphatasia
1A.3f.2	Hypophosphataemic rickets [primary 12C.2]
1A.3f.8	Other specified disorders included in this group
1A.3y	Disorders included in other groups (2–7, 9–15, 17–21, 23, 26–33)
1A.3z	Other skeletal dysplasia, unspecified

<b>1B</b>	<b>SECONDARY GROWTH FAILURE</b>
<b>1B.1</b>	<b>Insufficient nutrient intake (malnutrition) E40–46</b>
<b>1B.2</b>	<b>Disorders in organ systems</b>
1B.2a	Cardiac disorders Q20–28
1B.2b	Pulmonary disorders, e.g. cystic fibrosis J40–99 (E84)
1B.2c	Liver disorders K70–77
1B.2d	Intestinal disorders, e.g. Crohn’s disease, malabsorption syndromes, short bowel syndrome K50–52 K90–93
1B.2e	Renal disorders, e.g. Fanconi syndrome, renal acidosis N10–19 N25–29
1B.2f	Chronic anaemia D50–64
1B.2g	Multiorgan disorders
1B.2h	Muscular and neurological disorders, e.g. Duchenne muscular dystrophy, congenital myotonia G71–73
1B.2i	Connective tissue diseases, e.g. juvenile arthritis M08
1B.2y	Other specified organ or systemic disorders
<b>1B.3</b>	<b>Growth hormone deficiency (secondary IGF deficiency)5 E23.0</b> <i>In case of multiple pituitary deficiencies, classify the various deficiencies separately:</i> <i>ACTH deficiency (6A.1)</i> <i>TSH deficiency (6A.2)</i> <i>Gonadotropin deficiency (6A.3)</i> <i>Prolactin deficiency (6A.4)</i> <i>Vasopressin deficiency (diabetes insipidus) (13A.1)</i>
1B.3a	Congenital growth hormone deficiency E23.0
1B.3a.0	Disorders classified elsewhere: <i>Associated with complex syndromes: Fanconi renotubular syndrome (14B.13)</i> <i>Rieger syndrome (14B.28)</i> <i>Kabuki make-up syndrome (14C.4f)</i>
1B.3a.1	Associated with other complex syndromes: ectodactyly-ectodermal dysplasia clefting syndrome E23.0
1B.3a.2	Known genetic defects E23.0
1B.3a.2a	HESX1 *601802
1B.3a.2b	LHX3 *600577
1B.3a.2c	LHX4 *602146
1B.3a.2d	PROP1 *601538
1B.3a.2e	POU1F1 *173110
1B.3a.2f	GHRHR *139191
1B.3a.2g	GH +139250
1B.3a.2y	Other specified genetic defects
1B.3a.3	Associated with cerebral or facial malformations, e.g. septo-optic dysplasia [primary 6E.1a], empty sella syndrome, solitary central maxillary incisor syndrome, mid-line palatal cleft, arachnoid cyst, congenital hydrocephalus, hypoplastic anterior

	pituitary + missing stalk + ectopic posterior pituitary (HME) Q04.4 Q37.9 O35.0 <i>Excluded:</i> Known genetic defects (1B.3a.2)
1B.3a.4	Associated with prenatal infection, e.g. rubella P35.0
1B.3a.8	Associated with other specified disorders E23.0
1B.3a.9	Idiopathic E23.0
1B.3a.9a	‘Classical’ idiopathic growth hormone deficiency <sup>6</sup>
1B.3a.9b	Neurosecretory dysfunction <sup>7</sup>
1B.3b	Acquired growth hormone deficiency E23.0
1B.3b.1	Craniopharyngioma D44.4
1B.3b.2	Other pituitary tumours, e.g. germinoma, hamartoma M9064/3
1B.3b.3	Cranial tumours distant from the pituitary/hypothalamic area, e.g. astrocytoma, ependymoma, glioma, medulloblastoma, nasopharyngeal tumour C71 M9400/3 M9391/3 M9380/3 M9470/3
1B.3b.4	Tumours outside the cranium, e.g. leukaemia, lymphoma C91–96
1B.3b.5	Head trauma S06
1B.3b.6	Central nervous system infection G01–08
1B.3b.7	Granulomatous diseases, e.g. histiocytosis D76
1B.3b.8	Vascular anomaly Q28
1B.3b.9	Other causes, unspecified E23.0
<b>1B.4</b>	<b>Other disorders of the growth hormone-IGF axis (primary IGF-I deficiency and resistance)</b>
1B.4a	Bio-inactive growth hormone (Kowarski syndrome) <sup>8</sup> #262650 E34.3
1B.4b	Abnormalities of the growth hormone receptor (growth hormone insensitivity syndrome, Laron syndrome) #262500 E34.3
1B.4c	Abnormalities of GH signal transduction, e.g. STAT5B defect #245590 E34.3
1B.4d	ALS (acid-labile subunit) deficiency +601489 E34.3
1B.4e	IGF-I deficiency #608747 E34.3
1B.4f	IGF resistance (IGF1R defects, postreceptor defects) #270450 E34.3
1B.4z	Other disorders, unspecified
<b>1B.5</b>	<b>Other endocrine disorders</b>
1B.5a	Disorders classified elsewhere: <i>Cushing syndrome</i> (8C.1) <i>Hypothyroidism</i> (7A) <i>Leprechaunism</i> (11A.3b.2) <i>Poorly controlled diabetes mellitus, Mauriac syndrome</i> (14C.2)
1B.5b	Short adult stature caused by accelerated bone maturation, e.g. precocious puberty (3A), hyperthyroidism (7B), congenital adrenal hyperplasia (8A.1), exogenous estrogens or androgens (3A.2d)
1B.5y	Other specified disorders E34.3
<b>1B.6</b>	<b>Metabolic disorders</b>
1B.6a	Disorders classified elsewhere:

	<i>Disorders of calcium and phosphorus metabolism (1A.3 and 12)</i>
1B.6b	Disorders of carbohydrate metabolism E74
1B.6c	Disorders of lipid metabolism E75
1B.6d	Disorders of protein metabolism E70–72
1B.6y	Other specified metabolic disorders E76–83
1B.6z	Other metabolic disorders, unspecified E88
<b>1B.7</b>	<b>Psychosocial E34.3</b>
1B.7a	Psychosocial (emotional) deprivation <sup>9</sup> T74
1B.7b	Anorexia nervosa F50
1B.7c	Depression F32.9
1B.7y	Other specified psychosocial causes E34.3
<b>1B.8</b>	<b>Iatrogenic</b>
1B.8a	Systemic glucocorticoid therapy [primary 8C.1c] T38.0
1B.8b	Local glucocorticoid therapy (inhalation, intestinal, other) T49.0
1B.8c	Other medication T36–50
1B.8d	Treatment of childhood malignancy
1B.8d.1	Total body irradiation T66
1B.8d.2	Chemotherapy T45.1
1B.8y	Other specified iatrogenic causes T78.9
<b>1C</b>	<b>IDIOPATHIC SHORT STATURE E34.3</b>
<b>1C.1</b>	<b>Familial (idiopathic) short stature E34.3</b>
1C.1a	With normal pubertal onset
1C.1b	With delayed pubertal onset
1C.1c	Onset of puberty not yet known
1C.1d	Onset of puberty unknown
<b>1C.2</b>	<b>Non-familial (idiopathic) short stature E34.3</b>
1C.2a	With normal pubertal onset
1C.2b	With delayed pubertal onset (constitutional delay in growth and puberty, or constitutional delay in growth and adolescence)
1C.2c	Onset of puberty not yet known
1C.2d	Onset of puberty unknown

**Приложение 2.** Известни мутации в гени, кодиращи хипофизарни транскрипционни фактори

Известни мутации в гена *OTX2* при човек

Мутация	Ендокринопатия	ЯМР на хипофизата	Очни изменения	Допълнителни аномалии	Ефект върху протеина	Източник
c.81delC		НД	Двустранна микрофталмия и ХОН	НД	Frameshift и скъсен протеин със загуба на функцията	Ragge 2005
c.93C>G		НД	Унилатерална микрофталмия	НД	Миссенс мутация	Wyatt 2008
c.106dupC		НД	Унилатерална микрофталмия	Леко умствено изоставане	Frameshift и скъсен протеин	Wyatt 2008
c.106delC		НД	НД	отоцефалия	Frameshift и скъсен протеин	Chassaign 2012
c.117_118delCC		НД	Двустранна микрофталмия и ХОН	Хипоплазия на предната комисура и изоставане в НПП	Frameshift и скъсен протеин със загуба на функция	Ragge 2005
c.136dupA		НД	Двустранна микрофталмия и ХОН	микроцефалия	Frameshift и скъсен протеин	Schilter 2011
c.203G>C		НД	Унилатерална микрофталмия/ан офталмия и ХОН; vitreous, opacities	НД	Миссенс, намалена трансактивираща функция	You 2012
c.214_217 delCGAinsCA	норма	Норма	Билатерална микрофталмия	НД	Frameshift и скъсен протеин с намалена трансактивираща функция	Dateki, 2010
c.221_236del16	ИДРХ	ХАХ; ЕНХ	Унилатерална анофталмия. микрофталмия	Забавено НПП	Frameshift и скъсен протеин с намалена трансактивираща функция	Dateki, 2010
c.265C>G	НД	НД	Билатерална микрофталмия и ХОН	-	Хомеодомайн, загуба на 75% от активността	Ragge 2005
c.270A>T	ИДРХ	ХАХ; ЕНХ; прекъснат инфундибулум	Унилатерална анофталмия	-	Загуба на ДНК-свързващата активност и трансактивиращата	Ashkenazi-Hoffnung 2010
c.289C>T	НД	НД	Колобома на ириса и ретината; микрофталмия	НД	Намалена трансактивираща функция	Wyatt, 2008
c.292delC	НД	НД	Микро/анофталмия	Умствено изоставане	Frameshift и скъсен протеин	Chassaign 2012
c.295C>T	НД	НД	Билатерална анофталмия и ХОН	Гърчов с-м, хипоплазия на хипокампа, хидроцефалия	Нонсенс и загуба на функцията	Ragge 2005
c.313C>T	НД	НД	Билатерална анофталмия и ХОН	Аутизъм, умствено изоставане	Нонсенс и загуба на функцията	Schilter 2012
c.371_372delAG	НД	НД	Билатерална анофталмия	Леко изоставане в НПП	Frameshift и скъсен протеин с намалена	Wyatt, 2008

					трансактивираща функция	
c.397C>A	НД	НД	Билатерална микрофталмия, отлепване на ретината и склерокорнеа	НД	Миссенс, нормална трансактивираща функция	Ragge 2005
c.400C>G	НД	НД	Унилатерална анофталмия	Брахицефалия, диспластични уши	Миссенс, нормална трансактивираща функция	Ragge 2005
c.402_403insC	Частичен ДРХ	Норма	Билатерална анофталмия и ХОН	Забавено НПП	Загуба на функция	Dateki 2008
c.405_406insCT	панхипопитуитаризъм	ХАХ, ЕНХ	Билатерална анофталмия и ХОН	Забавено НПП, малформация на Chiari	Загуба на функция	Tijama 2009
c.413C>G	панхипопитуитаризъм	НД	Болест на Leber	-	нонсенс	Henderson 2009
c.456_457delGAinsAT	панхипопитуитаризъм	НД	Ан/микрофталмия, ХОН	микроцефалия	нонсенс	Schilter 2011
c.464insGC	НД	НД	Ан/микрофталмия, ХОН, отлепване и колобома на ретината	Хипоплазия на хипокампа, трудности със заучаването	нонсенс	Ragge 2005
c.537T>A	НД	НД	Микрофталмия, колобома на ириса, болест на Leber	Забавено НПП, гърчове, трусти със заучаването	Frameshift и скъсен протеин със загуба на функция	Ragge 2005
c.556_557insTATA	НД	ХАХ, липса на НХ	Билатерална микрофталмия, ХОН	микроцефалия	Frameshift и скъсен протеин	Schilter 2011
c.562G>T	панхипопитуитаризъм	ХАХ, ЕНХ	Билатерална микрофталмия	НД	Frameshift и скъсен протеин	Dateki 2010
c.674A>G	панхипопитуитаризъм	ХАХ, ЕНХ	НД	НД	Доминантно негативен ефект	Diaczko 2008

Известни мутации в гена *HESX1* при човек

Мутация	Унаследяване	Ендокринен дефицит	Неврорадиология	Източник
<b>Q6H</b>	АД	РХ, ТСХ, ЛХ, ФСХ, АКТХ	АПХ, ектопична НХ	Thomas, 2001
<b>Q117P</b>	АД	РХ, ТСХ, ЛХ, ФСХ, АКТХ	АПХ, ектопична НХ	
<b>E149K</b>	АД	РХ	АПХ, ектопична НХ, хипоплазия на инфундибулума	McNay, 2007
<b>S170L</b>	АД	РХ	Ектопична НХ, хипоплазия на ОН и СС	Thomas, 2001
<b>K176T</b>	АД	РХ, ТСХ, АКТХ	Ектопична НХ	
<b>T181A</b>	АД	РХ	АПХ, липса на НХ	Thomas, 2001
<b>g.1684delG</b>	АД	РХ	АПХ, липса на НХ, хипоплазия на ОН, агенезия на СС	Cohen, 2003

<b>c.306_307insAG</b>	АД	РХ, ТСХ, ЛХ, ФСХ	АПХ, хипоплазия на ОН	Tajima, 2003
<b>R160C</b>	АР	РХ, ТСХ, ЛХ, ФСХ, АКТХ	АПХ, ектопична НХ, Хипоплазия на ОН, , агенезия на СС	Dattani, 1998
<b>I26T</b>	АР	РХ, ТСХ, ЛХ, ФСХ, АКТХ	АПХ, ектопична НХ	Carvalho, 2003
<b>c.357+2T&gt;C</b>	АР	РХ, ТСХ, АКТХ, ПРЛ	АПХ	Sobrier, 2006
<b>Alu ins (exon3)</b>	АР	РХ, ТСХ, ЛХ, ФСХ, АКТХ, ПРЛ	АПХ	
<b>c.449_450delCA</b>	АР	РХ, ТСХ, АКТХ	АП апласия, хипоплазия на СС, хидроцефалия	Sobrier, 2006

Известни мутации в гена *LHX3* при човек

Мутация	Ендокринопатия	Морфология на хипофизата	Вратна ригидност	Допълнителни аномалии	Засегнат участък от протеина	Източник
p.Y111C	GH, TSH, PRL, LH, FSH	Хипоплазия на АХ	Да	Леко до средно намаление на слуха	LIM 2 домейн	Netchi ne, 2000; Rajab, 2008
23-bp del	GH, TSH, PRL, LH, FSH	Увеличена АХ	да	Глухота, тежко умствено изоставане	множествени	Netchi ne, 2000; Rajab, 2008
g.159delT	GH, TSH, PRL, LH, FSH	Хипоинтезна питуитарна лезия	да	Леко умствено изоставане	множествени	Bhang oo, 2006
p.A210V	GH, TSH, PRL, LH, FSH, ACTH	Увеличена АХ	да	Не се съобщава	ХД	Pfaeffl e, 2007
p.E173Ter	GH, TSH, PRL, LH, FSH, ACTH	Хипоплазия на АХ	да	Не се съобщава	множествени	Pfaeffl e, 2007
p.W224Ter	GH, TSH, PRL, LH, FSH	Хипоплазия на АХ	не	Не се съобщава	Загуба на карбокси-край	Pfaeffl e, 2007
Gene deletion	GH, TSH, PRL, LH, FSH	Хипоплазия на АХ	да	Тежко изоставане в ННР	множествени	Pfaeffl e, 2007
p.K50Ter	GH, TSH, PRL, LH, FSH, ACTH	Хипоплазия на АХ	Да	Сензорноневрална глухота	множествени	Rajab, 2008
Intragenic deletion of 3,088bp	GH, TSH, PRL, LH, FSH, ACTH	Хипоплазия на АХ	Да	Сензорноневрална глухота	множествени	Rajab, 2008
A>G splice mutation in intron 3	GH, TSH, PRL, LH, FSH, ACTH	Хипоплазия на АХ	Да	Сензорноневрална глухота	множествени	Kristro m, 2009
p.R77Ter	GH, TSH, PRL, LH, FSH, ACTH	Хипоплазия на АХ	Да	Сензорноневрална глухота	множествени	Bonfig, 2011
p.T194R	GH, TSH, PRL, LH, FSH, ACTH	Хипоплазия на АХ	да	Сензорноневрална глухота	ХД	Bechto ld, 2011
c.252-3C>G/	GH, TSH, PRL, LH, FSH, ACTH		не	Тежка сколиоза	Загуба на LIM домейн	Sobrier , 2012

p.Cys118T yr						
-----------------	--	--	--	--	--	--

Известни мутации в гена *LHX4* при човек

Мутация	Ендокринопатия	ЯМР	Допълнителни аномалии	Ефект върху протеина	Източник
c.C607-7G>C (intron 4)	PX, ТСХ, АКТХ	AXX, ЕНХ; хипопластична sella turcica	Chiari malformation	Невъзможност за свързване с проксималния промотер на PIT1	Machinis, 2001
p.A210P (homeodomein)	PX/PX, ЛХ, АКТХ, ТСХ, ФСХ,	AXX, ЕНХ	Питуитарно кистично образувание	Нарушено ДНК-свързване и липса на активация на промоторите на PIT1, $\alpha$ -GSU; TSH- $\beta$	Pfaeffle, 2008
p. L190R (homeodomein)	PX, ТСХ, АКТХ	AXX	-	Нарушено ДНК-свързване и липса на активация на промоторите на PIT1, $\alpha$ -GSU; TSH- $\beta$	Pfaeffle, 2008
p.R84C (LIM domein)	PX, ТСХ, ЛХ, ФСХ	AXX	-	Нестабилност на протеина	Pfaeffle, 2008
c.293_294insC	PX, ТСХ / ЛЕ, ФСХ	AXX, ЕНХ; хипопластична sella turcica / норма		Преждевременен стоп-кодон и скъсен протеин със загуба на трансактивираща функция	Castinetti, 2008
p.P389T	PX, ПРЛ, ТСХ, ЛХ, ФСХ, АКТХ	AXX, ЕНХ; хипопластична sella turcica	Chiari malformation		Tijama, 2012
p.V101A	PX, ТСХ, ЛХ, ФСХ, АКТХ	AXX, ЕНХ	Chiari malformation	Загуба на трансактивираща функция	Tijama, 2012
LHX4 gene deletion	PX, ПРЛ, ТСХ, ЛХ, ФСХ	AXX, ЕНХ; хипопластична sella turcica	Питуитарна киста	Липса на протеин	Dateki, 2010
1q25.2-25.3 micro-deletion	PX, ПРЛ, ТСХ, ЛХ, ФСХ, АКТХ	AXX, ЕНХ; хипопластична sella turcica	Сърдечна недостатъчност, РДС	Липса на протеин	Filges
c.249-1G>A	PX, АКТХ	AXX, ЕНХ	-		Takagi, 2012
p.V75I	PX, ТАХ, ЛХ, ПРЛ	AXX, ЕНХ; хипопластична sella turcica	-	Загуба на трансактивираща функция	Takagi, 2012
W204X	PX, ТСХ, АКТХ (късно начало)	AXX, ЕНХ, прекъснат инфундибулум	-	Дефектен хомеодомейн и загуба на ДНК-свързващата способност	Rochette, 2015

Известни мутации в гена *POU1F1* при човек

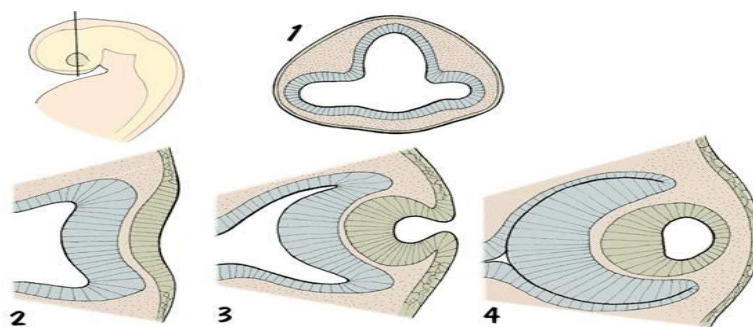
Мутация	Ендокринопатия	ЯМР	Ефект върху протеина	Източник
p.Q4X	PX, ПРЛ, ТСХ	XAX	Възникване на стоп-кодон в екзон 1	Salemi, 2003
p.P14L	PX, ПРЛ, ТСХ	XAX		Fofanova, 1998
p.P24L	PX, ПРЛ, ТСХ	XAX		Ohta, 1992
p.F135C	PX, ПРЛ, ТСХ	XAX	Засягане на ROU-специфичния домейн и загуба на ДНК-свързващата способност	Pellegrini-Bouiller, 1996
p.R143Q	PX, ПРЛ, ТСХ	XAX		Ohta, 1992
p.R143L	PX, ПРЛ, ТСХ	XAX		McLennan, 2003
p.K145X	PX, ПРЛ, ТСХ	XAX	Засягане на ROU-специфичния домейн и загуба на ДНК-свързващата способност	Hashimoto, 2003
p.A158P	PX, ПРЛ, ТСХ	XAX	Засягане на ROU-специфичния домейн и загуба на ДНК-свързващата способност	Wit, 1989
p.Q167K	PX, ПРЛ, ТСХ	норма	Засягане на ROU-специфичния домейн и загуба на ДНК-свързващата способност. Доминантно-негативен ефект	Malvagia, 2003
p.R172Q	PX, ПРЛ, ТСХ	XAX	Засягане на ROU-специфичния домейн и загуба на ДНК-свързващата способност и трансактивиращата способност.	Turton, 2005
p.R172X	PX, ПРЛ, ТСХ	XAX	Засягане на ROU-специфичния домейн и загуба на ДНК-свързващата способност	Tatsumi, 1992
p.E174G	PX, ПРЛ, ТСХ	XAX	Засягане на ROU-специфичния домейн и загуба на ДНК-свързващата способност	Brown, 1998
p.W193R	PX, ПРЛ, ТСХ	XAX	Скъсен протеин, водещ до загуба на ROU-хомеодомейна и ДНК-свързващата способност	Hendriks-Stegeman, 2001
p.W193X	PX, ПРЛ, ТСХ	XAX	Засягане на ROU-хомеодомейна и ДНК-свързващата способност	Gat-Yablonski, 2002
p.L194Q	PX, ПРЛ, ТСХ	XAX		McLennan, 2003
c.682 + 1G>A	PX, ПРЛ, ТСХ	XAX	Интрон 4, води до промяна в снаждането	Snabboon, 2008
p.K216E	PX, ПРЛ, ТСХ	XAX		Cohen, 1999
p.E230K	PX, ПРЛ, ТСХ	XAX	Засягане на ROU-хомеодомейна и ДНК-свързващата способност	Gat-Yablonski, 2005
p.F233L	PX, ПРЛ, ТСХ	XAX	Засягане на ROU-хомеодомейна и ДНК-свързващата способност	Rainbow, 2005
p.P239S	PX, ПРЛ, ТСХ	XAX	Липса на трансактивираща функция	Pernasetti, 1998
Q242R	PX, ПРЛ, ТСХ	XAX		Gat-Yablonski, 2005
c.747delA	PX, ПРЛ, ТСХ	XAX	Скъсен протеин с липса на ROU-хомеодомейн и ДНК-свързващата способност	Hendriks-Stegeman, 2001
p.E250X	PX, ПРЛ, ТСХ	XAX	Засягане на ROU-хомеодомейна и загуба на ДНК-свързващата способност и трансактивиращата способност	Irie, 1995
c.778insA	PX, ПРЛ, ТСХ	XAX	Засягане на ROU-хомеодомейна и загуба на ДНК-свързващата способност и трансактивиращата способност	Turton, 2005

p.F262L	PX, ПРЛ, ТСХ	XAX		Gat-Yablonski, 2005
p.R271W	PX, ПРЛ, ТСХ	XAX	Доминантно-негативен ефект на мутатния алел върху нормалния	Radovick, 1992
p.V272X	PX, ПРЛ, ТСХ	XAX		Sheng, 1999
IVS1+3nt(A>G)	PX, ПРЛ, ТСХ	XAX	Неправилно снаждане	Turton, 2012
R265W	PX, ПРЛ, ТСХ	XAX	Намалена стабилност на протеина и загуба ба функцията	Turton, 2012

### Приложение 3. Ембриология на зрителния анализатор

Зрителният анализатор започва своето развитие около 4<sup>та</sup> г.с. от т. нар. очно мехурче, образувано в следствие на инвагинация в прозенцефалона (Фиг. 47). От крачето, което свързва очното мехурче с мозъка, впоследствие се развива зрителния нерв. Една популация от прогениторни клетки в очното мехурче получава сигнали от повърхностната ектодерма, при което външната му половина се вгъва навътре и образува двуслойната очна чашка, двата ръба ѝ се сливат и дават началото на непигментния епител на цилиарното тяло и вътрешния епител на ириса. Външния слой на очната чашка остава по-слабо развит и образува пигментната част на ретината. Клетките във вътрешния слой на очната чашка се диференцират в светлочувствителни (пръчици и конусчета), неврони и подпорни клетки, като образуват мозъчната част на ретината. Лещата на окото се образува от задебеление на кожната ектодерма, което се прищъпва и образува лещено мехурче (Фиг. 47.4).

**Фигура 48.** Ембрионално развитие на окото при човека. **1.** Инвагинация в прозенцефалона и образуване на очно мехурче. **2.** двуслойна очна чашка. **3.** Задебеление в ектодермата и **4.** образуване на лещено мехурче. [http://www.bionalogy.com/eye\\_and\\_ear\\_files/image002.jpg](http://www.bionalogy.com/eye_and_ear_files/image002.jpg)

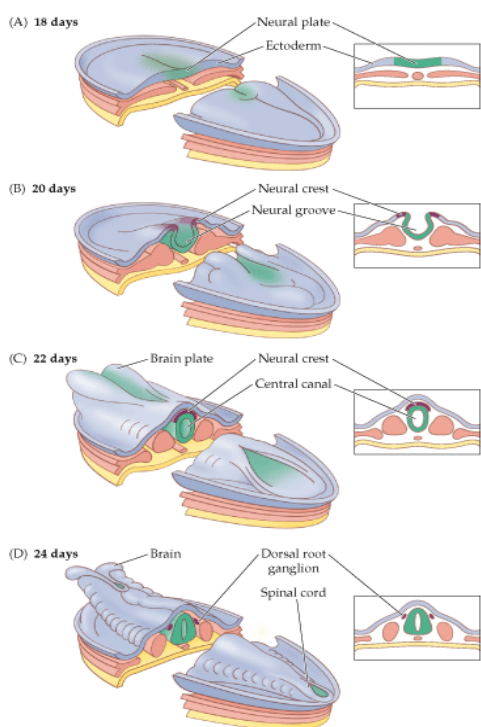


Този процес се управлява от различни ТФ и сигнални молекули. Основна роля играят SOX2 и PAX6. Тези два ТФ се експресират в предната неврална плака и по цялото протежение на очното мехурче още преди формирането на очната чашка. По-късно, след нейното образуване, експресията им е териториално разделена. Основна част от SOX2-експресиращи клетки са струпани в центъра на очната чашка, като от тях в бъдеще се развива нервната ретина, и по-малко в периферията, от където се развива пигментния слой на ретината и цилиарния епител. Експресията на PAX6 е противоположна. SOX2 е основен регулатор и на развитието на лещата.

#### Приложение 4. Ембрионално развитие на мозъка

Ембрионалното развитие на мозъка започва през втората гестационна седмица (г.с.) с формирането на прехордалната плака и нотохордата, разположена вентрално под бъдещата неврална тръба. Прехордалната плака е есенциална за по-нататъшното развитие на предния мозък. Индуктивни сигнали от нотохордата изпълняват няколко ключови функции: 1. стимулира превръщането на надлежащата ектодерма в неврална тъкан; 2. определя идентичността на някои кетки в ранната нервна система; 3. трансформира част от клетките в сомитите в тела на прешлените; и 4. стимулира най-ранните стъпки от развитието на дорзалния панкреас.

Молекули, които изпълняват тези функции: FGF8, който се синтезира от клетките на примитивната ивица <sup>i</sup> контролира миграцията и спецификацията на клетките. Сигнални молекули като *Noggin*, *Follistatin* и *Chordin* (активирани от *Goosecoid*), секретирани от примитивния възел и нотохордата потиснат експресията на BMP4. В негово отсъствие дорзалната ектодерма се развива в нервна тъкан по подразбиране. Сигналната молекула SHH и ТФ HNF-3 $\beta$  също от основно значение за формирането на нервната система и в установяването на ляво-дясна асиметрия.



В началото на трета г.с., под влиянието на нотохордата и прехордалната мезодерма, започва същинското развитие на нервната система с образуването на задебеление, наречено невралната тръба в надлежащата ектодерма (neurulation).

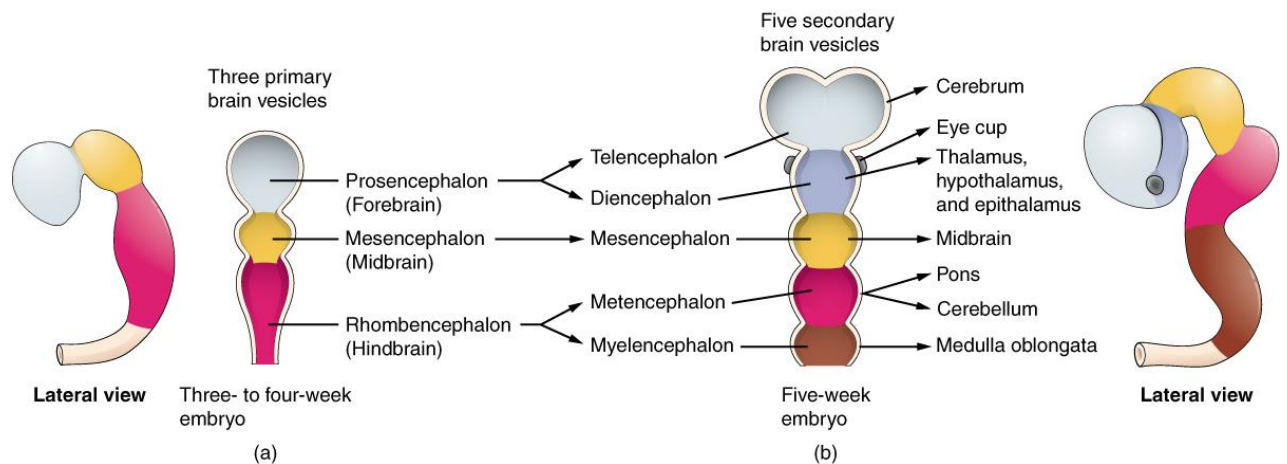
До края на 3-та г.с. латералните ѝ краища се надигат и образуват неврални гънки и неврална бразда.

Двете неврални гънки се сливат дорзално, затварят неврален канал и се отделят от ектодермата. Над него се образува невралният гребен, от който се развива периферната нервна

система.

Остатъци от нотохордата персистират като nucleus pulposus в интервертебралните дискове.

Скоро след образуването на невралната тръба, областта на бъдещия главен мозък бива подложена на поредица от големи промени. Сегментирането настъпва на 2 етапа. При ранното сегментиране има три големи мехурчета: преден (prosencephalon), среден (mesencephalon) и заден мозък (rhombencephalon). По-късно предният мозък се разделя на telencephalon и diencephalon, а задният мозък съответно на metencephalon и myelencephalon. Индукционни сигнали от нотохордата, прехордалната плака и anteriорната висцерална мезодерма разделят новообразуваната нервна тръба на presencephalon/mesencephalon и rhombencephalon/гръбначен мозък сегменти. В граничната област на presencephalon/mesencephalon се експресира OTX2, докато на границата rhombencephalon/гръбначен мозък се експресира GBX 2 (gastrulation brain homeobox 2).



**Приложение 5.** Информирано съгласие за пациента за анализиране на гените POUF-1 (PIT-1), HESX1, SOX3 при вроден хипосоматотропизъм

по проект: 58/2013 **Информирано съгласие за генетични изследвания**

“ Въвеждане на мутационен скрининг за транскрипционните фактори POUF-1 (PIT-1), HESX1, SOX3 при пациенти с вроден хипосоматотропизъм: пилотен проект”.

Водещ изследовател доц. д-р Ива Стоева, дм, лаборатория „Скрининг и функционална ендокринна диагностика” УСБАЛДБ „Проф. Иван Митев” в сътрудничество с Център по молекулна медицина, МУ-София.

Трите имена на пациента:		
Дата на раждане: мъжки	Граждански пол:  женски	
Дата на пробовзимане:	вид на пробата: кръв	
Име на родителя (настойник): (ако пациента няма пълнолетие)		
Адрес:		
e-mail:	тел:	моб. тел:

1. Участието ми в настоящото изследване е напълно доброволно;
2. Съгласието или отказът ми да участвам в изследването по-никакъв начин няма да повлияе на лечението ми;
3. Имам право да прекратя участието си в изследването по всяко време, като информирам писмено водещия изследовател по проекта;
4. Съгласен(на) съм да ми бъде взета 5-6 мл венозна кръв по установения метод, както при всички медицински изследвания;
5. Съгласен(на) съм ако материалът се окаже некачествен или недостатъчен, отново да дам кръв;
6. Съгласен(на) съм кръвта да бъде използвана само за изолиране на ДНК, като пробата бъде обозначена с код, който гарантира анонимността ми. Моето име и историята на заболяването ми ще бъдат достъпни само за насочващия лекар и изследователския екип на проекта, които носят отговорност за запазване на пълна конфиденциалност;
7. Разбирам, че генетичния анализ може да даде информация, която би била от полза за диагностиката на моето заболяване (или заболяването на член от семейството ми) и резултатът от изследването ще ми бъде предоставен лично в писмен вид от Водещия изследовател;
8. Наясно съм, че наличните ДНК методи могат да бъдат неинформативни за мен и моето семейство;
9. Взетите проби могат да бъдат използвани за други научни цели и разработки, въвеждане на нови диагностични методи и като контрола при други изследвания;
10. Генетичната информация, получена в хода на изследването може да бъде оповестена в анонимизиран вид в академичната среда, но няма да бъде достъпна в публични бази данни;
11. Получих подробна информация за значението, задачите, методите и очакваните резултати от изследването, представени в приложение “Информация за родственици и пациенти” и ми бе отговорено на всички въпроси;

12. Моят подпис по долу потвърждава доброволното ми участие в проекта, но по никакъв начин не освобождава изследователския екип от професионалната етика и отговорност към мен.

**Получих копие от това съгласие**

Подпис:

Дата:

Изследовател: Обясних същността на изследването на горепосочения. Отговорих на всичките му въпроси и взех информирано съгласие от донора или неговия родител/настойник.

Име:

Дата:

Подпис:

Документа е изготвен от Хормонална лаборатория „Скрининг и функционална ендокринна диагностика“ към СБАЛДМ „Професор Иван Митев“-ЕАД София, бул. „Акад. Иван Гешов 11“ София 1606; в съгласие с етичните принципи за извършване на генетични изследвания към Комисията по етика на научните изследвания, Медицински Университет- София; *телефон: 02/ 8154 323; e-mail: stoeva\_iva@abv.bg*

**Приложение 6.** Информирано съгласие за пациента за провеждане на анализ чрез сравнителна геномна хибридизация при хипосоматотропизъм

по проект: 41- **Информирано съгласие за генетични изследвания**

Д/2013 “Възможности на сравнителната геномна хибридизация за разкриване на етиологията на вродения хипопитуитаризъм, асоцииран с дефицит на аденокортикотропен хормон, очни, костни и урогенитални аномалии”.

Водещ изследовател д-р Ани Аройо, лаборатория „Скрининг и функционална ендокринна диагностика” УСБАЛДБ „Проф. Иван Митев” в сътрудничество с Център по молекулна медицина, МУ-София.

Трите имена на пациента:		
Дата на раждане: мъжки	Граждански пол:	
женски		
Дата на пробовзимане:	вид на пробата: кръв	
Име на родителя (настойник): (ако пациента няма пълнолетие)		
Адрес:		
e-mail:	тел:	моб. тел:

1. Участието ми в настоящото изследване е напълно доброволно;
2. Съгласието или отказът ми да участвам в изследването по-никакъв начин няма да повлияе на лечението ми;
3. Имам право да прекратя участието си в изследването по всяко време, като информирам писмено водещия изследовател по проекта;
4. Съгласен(на) съм да ми бъде взета 5-6 мл венозна кръв по установеният метод, както при всички медицински изследвания;
5. Съгласен(на) съм ако материалът се окаже некачествен или недостатъчен, отново да дам кръв;
6. Съгласен(на) съм кръвта да бъде използвана само за изолиране на ДНК, като пробата бъде обозначена с код, който гарантира анонимността ми. Моето име и историята на заболяването ми ще бъдат достъпни само за насочващия лекар и изследователския екип на проекта, които носят отговорност за запазване на пълна конфиденциалност;
7. Разбирам, че генетичния анализ може да даде информация, която би била от полза за диагностиката на моето заболяване (или заболяването на член от семейството ми) и резултатът от изследването ще ми бъде предоставен лично в писмен вид от Водещия изследовател;
8. Наясно съм, че наличните ДНК методи могат да бъдат неинформативни за мен и моето семейство;
9. Взетите проби могат да бъдат използвани за други научни цели и разработки, въвеждане на нови диагностични методи и като контрола при други изследвания;
10. Генетичната информация, получена в хода на изследването може да бъде оповестена в анонимизиран вид в академичната среда, но няма да бъде достъпна в публични бази данни;
11. Получих подробна информация за значението, задачите, методите и очакваните резултати от изследването, представени в приложение “Информация за родственици и пациенти” и ми бе отговорено на всички въпроси;
12. Моят подпис по долу потвърждава доброволното ми участие в проекта, но по никакъв начин не освобождава изследователския екип от професионалната етика и отговорност към мен.

**Получих копие от това съгласие**

Подпис:

Дата:

Изследовател: Обясних същността на изследването на горепосочения. Отговорих на всичките му въпроси и взех информирано съгласие от донора или неговия родител/настойник.

Име:

Дата:

Подпис:

Документа е изготвен от Хормонална лаборатория „Скрининг и функционална ендокринна диагностика“ към СБАЛДМ „Професор Иван Митев“-ЕАД София, бул. „Акад. Иван Гешов 11“ София 1606; в съгласие с етичните принципи за извършване на генетични изследвания към Комисията по етика на научните изследвания, Медицински Университет- София; *телефон: 02/ 8154 323; e-mail: aniaroyo@yahoo.com*

## БИБЛИОГРАФИЯ

1. Авджиева, Д., С. Хаджидекова, А. Кадъм и др. Синдром на Koolen de Vries – 17q.21.32 микроделеция. Педиатрия *Pediatrics*, 2014, 3, 55-56.
2. Аройо, А., И. Стоева. Синдроми, свързани с мутации в SOX2: клинична картина и възможности за диагноза. Педиатрия, LII, 2012, суплемент 1, 50-55
3. Аройо, А., И. Стоева, Д. Дачева и др. Хипосоматотропизъм, съчетан с вродени аномалии: фенотипно описание на двама пациенти и техните резултати от мутационния транскрипционен скрининг. Педиатрия, LX, 2015, 2, 26-32.
4. Боянов, М. Ендокринни заболявания на хипоталмуса и хипофизата – клинични основи. Дисертация, София, ЦМБ, 2017.
5. Владимиров, Я., Д. Тачева, К. Калинов и др. Определяне на базалните „Inhibin b” нива при жени от българската популация във фертилна възраст. Акушерство и гинекология, 5, 2004, 39-43.
6. Владимиров, Я., Д. Тачева, К. Калинов и др. Определяне на базалните нива на анти-мюлеров хормон при жени от българската популация във фертилна възраст. Акушерство и гинекология, 1, 2006, 32-35.
7. Въндева, С. и С. Захариева. Дефицит на растежен хормон при възрастни. Наука ендокринолог., 2009, 5, 205-209.
8. Грозева, В. и М. Боянов. Хипопитуитаризъм в резултат на агенезия на хипофизната дръжка – литературни данни и описание на клиничен случай. Бълг. мед. журнал, 7, 2013, 1, 68-72.
9. Илиев, Д. и А. Куртев. Изоставане в растежа, дължащо се на дефицит на растежен хормон – клинични и молекулярно-генетични данни за нарушена регулация в секрецията на растежен хормон. Педиатрия, 48, 2008, 3, 7-10.
10. Йонова, Д. и В. Иванов. Хипопитуитаризъм при пациент с empty sella синдром. Военна мед., 60, 2008, 3, 59-62.
11. Йотова, В. Децата, родени малки за гестационната си възраст – защо е необходимо разпознаването им в ежедневната практика. Педиатрия, 51, 2011, суплемент 1, 59-63.
12. Йотова, В. Общо и абдоминално затлъстяване – пренатални и постнатални влияния. Значение за повишения рисков профил от детска възраст. Варна, 2012.
13. Казакова, К. и А. Куртев. Лечение с растежен хормон. Практик. педиатрия, 5, 2004, 4, 17-18.

14. Казакова, К., Л. Пенева, Е. Стефанова и др. Краен ръст при деца с хипофизарен нанизъм, лекувани с rh-GH. Педиатрия, 43, 2003, 4, 23-28.
15. Куртев, А., Г. Петрова, Л. Пенева и др. Структура на изоставането в растежа по материали на Ендокринната клиника при Университетска детска болница – София. Педиатрия, 45, 2005, 4, 26-30.
16. Митева, П. Оценка и лечение на нисък ръст при деца с хронична бъбречна недостатъчност. Педиатрия, 59, 2014, supliment 1, 18-20.
17. Митева-Шумналиева, П. Лечение с рекомбинантен човешки растежен хормон на деца с хронично бъбречно заболяване и изоставане в растежа. Дисертация. С., МУ-София, 2016, 135.
18. Мондал, Д., Б. Василева, С. Ташкова и др. Изолирана вродена аплазия на хипофизата у момиче. Педиатрия, 34, 1995, 3, 44-47.
19. Пенева, Л. Идиопатичен нисък ръст. Педиатрия, 43, 2003, 2, 6-7.
20. Пенева, Л. Изоставане в растежа. Практ педиатрия, 5, 2004, 4, 2-5.
21. Пенева, Л. Дефицит на растежен хормон – диагноза и лечение. Педиатрия, 43, 2003, 4, 17-22.
22. Пенева, Л. Диференциална диагноза на изоставането в растежа. Педиатрия, 43, 2003, supliment 1, 27-29.
23. Пенева, Л. Ендокринни заболявания в детската възраст, които изискват спешна диагноза и лечение. Педиатрия, 50, 2010, supliment 1, 7-12.
24. Пенева, Л. Лечение на хипосоматотропизъм с рекомбинантен човешки растежен хормон. Педиатрия, 50, 2010, 3, 43-44.
25. Пенева, Л. Нисък ръст при нарушение на калциево-фосфорната обмяна. Практ. педиатрия, 5, 2004, 4, 8-10.
26. Пенева, Л. Нормални варианти на ниския ръст. Педиатрия, 43, 2003, 3, 9-11.
27. Пенева, Л. Хипосоматотропизъм в детската и юношеската възраст. Дисертация, София, 1984.
28. Пенева, Л. и И. Стоева. Фактори, определящи диференцирането и функцията на хипофизата. Педиатрия, 44, 2004, 1, 11-13.
29. Пенева, Л. Регулация на костния растеж. Растежни фактори. Растежен хрущял – физиология и патология. Педиатрия, 54, 2014, 2, 8-14.
30. Пенева, Л., К. Казакова, Е. Стефанова и др. Лечение на деца с хипосоматотропизъм с рекомбинантен човешки растежен хормон NORDITROPIN. Педиатрия, 35, 1996, 1, 36-41.

31. Проданова, А., П. Попиванов, М. Боянов и др. Дефицитът на растежен хормон при възрастните – диагностика и лечение. *Ендокринология*, 4, 1999, 2, 4-11.
32. Станчев, З. Генетични фактори за растежа и развитието. *Педиатрия*, 43, 2003, 3, 6-8.
33. Стефанова, Елисавета. Лечение на изоставането в растежа при момичетата със синдром на Turner с рекомбинантен човешки растежен хормон. Дисертация. С., МУ-София, 2012.
34. Стоева, И. Хипоталамо-хипофизарни взаимоотношения при гонадна дисгенезия (Синдром на Шерешевский-Turner). Дисертация, София, 1988.
35. Стоева, И., В. Йотова, А. Иванов и др. Случай на септооптична дисплазия (СОД), комбинирана с единичен максиларен инцизор с хипосоматотропизъм. *Педиатрия*, 41, 2001, 3, 24-27.
36. Стоева, И., Л. Желева, Г. Динева. Първи резултати от определянето на IGF-1 и IGFBP-3 при деца с хипосоматотропизъм. *Педиатрия*, 3, 2003, 21-25.
37. Стоева, И. Възможности за молекулярногенетична диагноза при деца с хипосоматотропизъм в България. *Практ. педиатрия*, 4, 2004, 16.
38. Стоева, И., А. Иванов. Синдром на хипосоматотропизъм с принос на 4 случая. *Педиатрия*, XLV, 2005, 4, 53-58.
39. Стоева, И. Върху някои аспекти преди организирането и провеждането на скрининг за изоставане в растежа при деца. *Педиатрия*, LI, 2011, суплемент 1, 37-41.
40. Стоева, И., А. Аройо. Множествен тропен дефицит и транскрипционния фактор профет на PIT-1 (PROP-1). *Ендокринология*, XVII, 2012, 4, 219-232
41. Станимирова, Н., Л. Пенева, Ц. Балтова. Физическо и пубертетно развитие на български деца от 0 до 18 годишна възраст: Норми и стандартни криви. Дисертация, София, 2007, 118.
42. Узунова, И., Г. Киров, С. Захариева и др. Честота и характеристики на метаболитния синдром при възрастни пациенти с дефицит на растежен хормон – сравнително проучване. *Ендокринология*, 18, 2013, 4, 178-187.
43. Узунова, И., Г. Киров, С. Захариева и др. Асиметричен диметиларгинин като маркер за ендотелна дисфункция при хипосоматотропизъм. *Наука Ендокринол.*, 9, 2015, 3, 113-118.

44. Acampora, D., S. Mazan, Y. Lallemand, et al. Forebrain and Midbrain Regions Are Deleted in *Otx2*<sup>-/-</sup> mutants Due to a Defective Anterior Neuroectoderm Specification During Gastrulation. *Development*, 121, 1995, 121, 3279-90.
45. Adan L, P. Lechevalier, AC. Couto-Silva, et al. Plasma inhibin B and antimullerian hormone concentrations in boys: discriminating between congenital delay hypogonadotropic hypogonadism and constitutional pubertal. *Med Sci Monit*, 16, 2010, 511–517.
46. Agarwal, G., V. Bhatia, Sh. Cook, et al. Adrenocorticotropin Deficiency in Combined Pituitary Hormone Deficiency Patients Homozygous for a Novel PROP1 Deletion. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 85, 2000, 4556-4561.
47. Aksglaede, L., K. Sorensen, M. Boas, et al. Changes in Anti-Mu<sup>llerian</sup> Hormone (AMH) throughout the Life Span: A Population-Based Study of 1027 Healthy Males from Birth (Cord Blood) to the Age of 69 Years. *Clin Endocrinol Metab*, 95, 2010, 5357–5364.
48. Allegri, A., M. Acquaviva, N. Di Iorgi. NGS (Next Generation Sequencing) in Congenital Hypopituitarism and Midline Deffects. 10<sup>th</sup> International Meeting of Pediatric Endocrinology, 2017, 1766, P1-1000.
49. Alt, C., M. Shevel, C. Poulin, et al. Clinical and Radiologic Spectrum of Septo-optic Dysplasia: Review of 17 Cases. *J Child Neurol.*, 32, 2017, 9:797-803.
50. Amendt, B., L. Sutherland, A. Russo. Multifunctional Role of the Pitx2 Homeodomain Protein C-terminal Tail. *Mol. Cell Biol.*, 19, 1999, 10, 7001–7010.
51. Anderson, R., A. Lawrence, R. Stottmann, et al. Chordin and noggin promote organizing centers of forebrain development in the mouse. *Development*, 129, 2002, 21, 4975-4987.
52. Andersson A. M., A. Juul, JH. Petersen, et al. Serum Inhibin B in Healthy Pubertal and Adolescent Boys: Relation to Age, Stage of Puberty, and Follicle- Stimulating Hormone, Luteinizing Hormone, Testosterone, and Estradiol Levels. *J Clin Endocrinol Metab*, 82, 1997, 3976–3981.
53. Ang, S., O. Jin, M. Rhinn, et al. A targeted mouse *Otx2* mutation leads to severe defects in gastrulation and formation of axial mesoderm and to deletion of rostral brain. *Development*, 1996, 122, 243-52.
54. Archer, T., J. Jin, E. Casey. Interaction of Sox1, Sox2, Sox3 and Oct4 during primary neurogenesis. *Dev Biol*, 350, 2011, 2, 429–440.

55. Aroyo, A., I. Stoeva, D. Dacheva et al. Screening for SOX2 Mutations in Bulgarian Patients with Congenital Hyposomatotropism: First Results. *Horm Res Paediatr*, 82, 2014, suppl 1, 436.
56. Aroyo, A., I. Stoeva, Sh. Pashova et al. Congenital sporadic panhypopituitarism and pituitary hypoplasia in a prepubertal boy without PROP1 mutation. *Horm Res Paediatr*, 78, 2012, Suppl 1, 307.
57. Aroyo, A., I. Stoeva, D. Dacheva et al. Screening for POU1F1 mutations among Bulgarian patients with congenital hyposomatotropism. *Horm Res Paediatr.*, 80, 2013, suppl 1, 317-318.
58. Aroyo, A., I. Stoeva, G. Stancheva et al. Isolated Growth Hormone Deficiency (IGHD) associated with 7q11.23 Duplication Syndrome – a Case report. *Horm Res Paediatr.*, 84, 2015, suppl 1, 519.
59. Ashkenazi-Hoffnung, L., Y. Lebenthal, AW. Wyatt, et al. A novel loss-of-function mutation in OTX2 in a patient with anophthalmia and isolated growth hormone deficiency. *Hum Genet.*, 2010, 127, 721.
60. Asteria C., JH. Oliveira, J. Abucham, et al. Central hypocortisolism as part of combined pituitary hormone deficiency due to mutations of PROP-1 gene. *European J Endocrinol*, 143, 2000, 3, 347-52
61. Bach, I., S. Rhodes, I. Pearse, et al. P-Lim, a LIM homeodomain factor, is expressed during pituitary organ and cell commitment and synergizes with Pit-1. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 1995, 92, 2720–2724
62. Bakrania, P., D. Robinson, D. Bunyan et al. SOX2 anophthalmia syndrome: 12 new cases demonstrating broader phenotype and high frequency of large gene deletions. *Br J Ophthalmol*, 2007, 91, 1471-1476
63. Balasubramanian, R., A. Bui, Q. Ding, et al. Expression of LIM-homeodomain transcription factors in the developing and mature mouse retina. *Gene Expr Patterns*, 14, 2014, 1, 1-8
64. Ballerini, M., D. Braslavsky, G. Gotta. The role of basal biochemical tests in the diagnostic work-out of growth hormone deficiency (GHD) in the newborn period. 10<sup>th</sup> International Meeting of Pediatric Endocrinology, 2017, 886, P2-804
65. Ballif, B., A. Theisen, D. McDonald-McGinn, et al. Identification of a previously unrecognised microdeletion syndrome of 16q11.2q12.2. *Clin Genet.*, 2008, 74, 69-75

66. Baş, F., Z. Uyguner, F. Darendeliler, et al. Molecular analysis of PROP1, POU1F1, LHX3, and HESX1 in Turkish patients with combined pituitary hormone deficiency: a multicenter study. *Endocrine*, 2015, 49, 2, 479-91
67. Beby, F., T. Lamonerie. The homeobox gene Otx2 in development and disease. *Exp Eye Res* 2013, Jun,111, 9-16
68. Beck, L., C. Leroy, C. Salau, et al. Identification of a novel function of PiT1 critical for cell proliferation and independent of its phosphate transport activity. *J Biol Chem*, 2009, 284, 31363–31374.
69. Bellone, S., G. Corneli, J. Bellone, et al. Short children with familial short stature show enhancement of somatotroph secretion but normal IGF1 levels. *J. Endocrinol. Invest.*, 25, 2002, 426-430.
70. Blum, W., C. Child, J. Klammt et al. Genetic screening of patients with congenital GH deficiency in the genesis observational program: clinical indicators for identification of mutations. 10<sup>th</sup> International Meeting of Pediatric Endocrinology, 396, 2017, P1-810.
71. Bottner, A., E. Keller, J. Kratzch. PROP1 Mutations Cause Progressive Deterioration of Anterior Pituitary Function including Adrenal Insufficiency: A Longitudinal Analysis. *J Clin Endocrinol Metab.*, 89, 2004, 5256–5265.
72. Bradford, A, C. Wasylyk, B. Wasylyk, et al. Interaction of Ets-1 and the POU-homeodomain protein GHF-1/ Pit-1 reconstitutes pituitary-specific gene expression. *Mol Cell Biol.*, 17, 1997, 3, 1065–1074.
73. Bradford, A, K. Brodsky, S. Diamond, et al. The pit-1 homeodomain and b-domain interact with ets-1 and modulate synergistic activation of the rat prolactin promoter. *J Biol Chem.*, 275, 2000, 5, 3100–3106.
74. Birla S., R. Khadgawat, V. Jyotsna, et al. Identification of Novel PROP1 and POU1F1 Mutations in Patients with Combined Pituitary Hormone Deficiency. *Horm Metab Res.*, 2016, 48, 12, 822-827.
75. Brinkmeier, M, M. Potok, S. Davis, et al. TCF4 deficiency expands ventral diencephalon signaling and increases induction of pituitary progenitors. *Dev. Biol.*, 311, 2007, 2, 396-407.
76. Brook, C., P. Clayton, R. Brown. Brook's clinical pediatric endocrinology. 5<sup>th</sup> edition, Chapter 5. Normal and disordered growth. Oxford, Blackwell publishing, 2005, 90-112.

77. Brown, M., J. Parks, M. Adess, et al. Central hypothyroidism reveals compound heterozygous mutations in the Pit-1 gene. *Horm Res*, 49, 1998, 98–102.
78. Camper, S., T. Saunders, R. Katz, et al. The Pit-1 transcription factor gene is a candidate for the murine Snell dwarf mutation. *Genomics*, 8, 1990, 3, 586-590.
79. Carvalho, L., K. Woods, B. Mendonca, et al. A homozygous mutation in HESX1 is associated with evolving hypopituitarism due to impaired repressor-corepressor interaction. *J. Clin. Invest.*, 112, 2003, 1192–1201.
80. Castillo, A., A. Jimenez-Lara, R. Tolon, et al. Synergistic activation of the prolactin promoter by vitamin D receptor and GHF-1: role of the coactivators, CREB-binding protein and Steroid Hormone Receptor Coactivator-1 (SRC-1). *Mol. Endocrinol.*, 13, 1999, 7, 1141-1154.
81. Castinetti, F., R. Reynaud, A. Saveanu. Mechanisms in endocrinology: An update in the genetic aetiologies of combined pituitary hormone deficiency. *Eur J Endocrinol.*, 174, 2016, 6, 239-47.
82. Castinetti, F., A. Saveanu, R. Reynaud, et al. A novel dysfunctional LHX4 mutation with high phenotypical variability in patients with hypopituitarism. *J Clin Endocrinol Metab.*, 93, 2008, 7: 2790-9.
83. Castrillo, J., M. Bodner, M. Karin. Purification of growth hormone-specific transcription factor GHF-1 containing homeobox. *Science*, 243, 1989, 4892, 814-817.
84. Cavallaro, M., J. Mariani, C. Lancini, et al. Impaired generation of mature neurons by neural stem cells from hypomorphic Sox2 mutants. *Development*, 135, 2008, 3, 541-547.
85. Cha, K., K. Douglas, M. Potok, et al. WNT5A signaling affects pituitary gland shape. *Mechan Dev*, 121, 2004, 2, 183–194.
86. Chada, M., R. Prusa, J. Bronsky, et al. Inhibin B, Follicle Stimulating Hormone, Luteinizing Hormone, and Estradiol and Their Relationship to the Regulation of Follicle Development in Girls during Childhood And Puberty *Physiol. Res.*, 52, 2003, 341-346.
87. Chang, W., W. Zhou, L. Theill, et al. An activation function in Pit-1 required selectively for synergistic transcription. *J. Biol. Chem.*, 271, 1996, 30, 17733–17738.
88. Charles, M., T. Saunders, W. Wood, et al. Pituitary-specific Gata2 knockout: effects on gonadotrope and thyrotrope function. *Mol Endocrinol*, 20, 2006, 1366–1377.
89. Chassaing, N., S. Sorrentino, E. Davis, et al. OTX2 mutations contribute to the otocephaly-dysgnathia complex. *J. Med. Genet.*, 49, 2012, 373-379.

90. Chehadeh-Djebbar, S., P. Callier, A. Masurel-Paulet. 17q21.31 microdeletion in a patient with pituitary stalk interruption syndrome. *Eur. J. Med. Genet.*, 54, 2011, 369-373.
91. Chellakooty, M., IM. Schmidt, AM. Haavisto, et al. Inhibin A, Inhibin B, Follicle-Stimulating Hormone, Luteinizing Hormone, Estradiol, and Sex Hormone-Binding Globulin Levels in 473 Healthy Infant Girls. *J Clin Endocrinol Metab*, 88, 2003, 3515–3520.
92. Choi J.H., C.W. Jung, E. Kang, et al. Rare Frequency of Mutations in Pituitary Transcription Factor Genes in Combined Pituitary Hormone or Isolated Growth Hormone Deficiencies in Korea. *Yonsei Med J.*, 2017, 58, 3, 527-532.
93. Cogan, J., W. Wu, J. Phillips et al. The PROP1 2-Base Pair Deletion Is a Common Cause of Combined Pituitary Hormone Deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.*, 1998, 83, 3346–3349.
94. Cohen, L., S. Radovick. Molecular Basis of Combined Pituitary Hormone Deficiencies. *Endocr. Rev.*, 23, 2002, 4, 431–442.
95. Cohen, L., F. Wondisford, S. Radovick. Role of Pit-1 in the gene expression of growth hormone, prolactin, and thyrotropin. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.*, 25, 1996, 3, 523-540.
96. Cohen, L., K. Zanger, T. Brue, et al. Defective retinoic acid regulation of the Pit-1 gene enhancer: a novel mechanism of combined pituitary hormone deficiency. *Mol Endocrinol.*, 13, 1999, 476–484.
97. Coutant, R., E. Biette-Demeneix, C. Bouvattier, et al. Baseline Inhibin B and Anti-Mullerian Hormone Measurements for Diagnosis of Hypogonadotropic Hypogonadism (HH) in Boys with Delayed Puberty. *J Clin Endocrinol Metab*, 95, 2010.
98. Cowell, C. Short Stature. *Brook's clinical pediatric endocrinology*, 3<sup>rd</sup> edition, Oxford, Blackwell publishing, 1995, 136-173.
99. Cox, CJ., HM. Espinoza, B. McWilliams B, et al. Differential regulation of gene expression by PITX2 isoforms. *J Biol Chem.*, 277, 2002, 28, 25001-10.
100. Crawford, MJ., C. Lanctot, JJ. Tremblay, et al. Human and murine PTX1/Ptx1 gene maps to the region for Treacher Collins syndrome. *Mamm Genome.*, 8, 1997, 11, 841-5.

101. Cruz, J., V. Nunes, S. Clara. Molecular analysis of the PROP1 and HESX1 genes in patients with septo-optic dysplasia and/or pituitary hormone deficiency. *Arq Bras Endocrinol Metab*, 54, 2010, 482-487.
102. Cushman LJ, SA. Camper. Molecular basis of pituitary dysfunction in mouse and human. *Mamm Genome.*, 12, 2001, 7, 485-94.
103. Cytrynbaum, C., A. Smith, T. Rubin, et al. Advances of overgrowth syndromes: clinical classification to molecular delineation in Sotos syndrome and Bechwith-Wiedemann syndrome. *Curr Opin Pediatr.*, 17, 2005, 740-746.
104. Dale, J, C. Vesque, T. Lints, et al. Cooperation of BMP7 and SHH in the induction of forebrain ventral midline cells by prechordal mesoderm. *Cell*, 90, 1997, 2, 257-269.
105. Dasen, J., S. O'Connell, S. Flynn et al. Reciprocal interactions of Pit1 and GATA2 mediate signaling gradient-induced determination of pituitary cell types. *Cell*, 97, 1999, 5, 587-598.
106. Dasen, J., M. Rosenfeld. Signaling and transcriptional mechanisms in pituitary development. *Annu Rev Neurosci*, 24, 2001, 327-355.
107. Dateki, S., M. Fukami, N. Sato et al. OTX2 mutation in a patient with anophthalmia, short stature, and partial growth hormone deficiency: functional studies using the IRBP, HESX1, and POU1F1 promoters. *J. Clin. Endocr. Metab.*, 2008, 93, 3697-3702.
108. Dateki, S., K. Kosaka, K. Hasegawa, et al. Heterozygous orthodenticle homeobox 2 mutations are associated with variable pituitary phenotype. *J. Clin. Endocr. Metab.*, 95, 2010, 756-764.
109. Dattani, M., J. Martinez-Barbera, P. Thomas, et al. Mutations in the homeobox gene HESX1/Hesx1 associated with septo-optic dysplasia in human and mouse. *Nat Genet.*, 19, 1998, 2, 125-133.
110. Day, R., S. Koike, M. Sakai, et al. Both Pit-1 and the estrogen receptor are required for estrogen responsiveness of the rat prolactin gene. *Mol. Endocrinol.*, 12, 1990, 1964-1971.
111. Deladoëy, J., C. Flück, A. Büyükgebiz, et al. "Hot Spot" in the PROP1 Gene Responsible for Combined Pituitary Hormone Deficiency. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 84, 1999, 1645-1650.
112. Denny, P., S. Swift, N. Brand, et al. A conserved family of genes related to the testis determining gene, SRY. *Nucleic Acids Res.*, 20, 1992, 11, 2887.
113. Dessaud, E, L. Yang, K. Hill, et al. Interpretation of the sonic hedgehog morphogen gradient by a temporal adaptation mechanism. *Nature*, 450, 2007, 7170, 717-720.

114. Dessaud, E., V. Ribes, N. Balaskas, et al. Dynamic Assignment and Maintenance of Positional Identity in the Ventral Neural tube by the Morphogen Sonic Hedgehog. *PLoS Biol.*, 8, 2010, 6, e1000382.
115. Di, W., G. Chunxiu, F. Guoshuang. Analysis of effect of growth hormone treatment on idiopathic short stature children to near-adult height. 10<sup>th</sup> International Meeting of Pediatric Endocrinology, 2017, 1282, P3-815.
116. Diaczok, D., C. Romero, J. Zunich et al. A novel dominant negative mutation of OTX2 associated with combined pituitary hormone deficiency. *J. Clin. Endocr. Metab.*, 2008, 93, 4351-4359.
117. DiMattia, G, S. Rhodes, A. Krones, et al. The Pit-1 gene is regulated by distinct early and late pituitary-specific enhancers. *Dev. Biol.*, 182, 1997, 1, 180–190.
118. Doknic M., S. Pekic, M. Covicic, et al. Clinical case seminar. Peculiar prolactinomas in patients with pituitary developmental gene mutations: from an adult endocrinologist prospective. *Hormons*, 11, 2012, 2, 189-198.
119. Douglas, K, M. Brinkmeier, J. Kennell et al. Wnt signaling pathway in the embryonic pituitary gland. *Mamm. Genome*, 12, 2001, 11, 843–851.
120. Driessens, G., C. Blanpain. Long live sox2: sox2 lasts a lifetime. *Cell Stem Cell*, 9, 2011, 4, 283-284.
121. Dubourg, C., D. Sanlaville, M. Doco-Fenzy. Clinical and molecular characterization of 17q21.31 microdeletion syndrome in 14 French patients with intellectual disability. *Eur. J. Med. Genet.*, 54, 2011, 144-151.
122. Durmaz, B., O. Cogulu, C. Dizdarer, et al. A novel homozygous HESX1 mutation causes panhypopituitarism without midline defects and optic nerve anomalies. *J Pediatr Endocrinol Metab.*, 24, 2011, 9-10, 779-82.
123. Dusatkova, P., R. Pfaeffle, MR. Brown et al. Genesis of two most prevalent PROP1 gene variants causing combined pituitary hormone deficiency in 21 populations. *Eur J Hum Genet.*, 2015, 1038, 1-6.
124. Fabie, N., L. Saadeh, D. Taha. Clinical and endocrinological characteristics of patients with septo-optic displasia at the children’s hospital of Michogan. 10<sup>th</sup> International Meeting of Pediatric Endocrinology, 2017, 600, P1-1002.
125. Fang, Q., A. Benedetti, Q. Ma. HESX1 mutations in patients with congenital hypopituitarism: variable phenotypes with the same genotype. *Clin Endocrinol (Oxf.)*, 85, 2016, 3, 408-14.

126. Fantès, J., N. Ragge, S. Lynch, et al. Mutations in SOX2 cause anophthalmia. *Nat. Genet.*, 33, 2003, 4, 461-463.
127. Fauquier, T., K. Rizzoti, M. Dattani, et al. SOX2-expressing progenitor cells generate all of the major cell types in the adult mouse pituitary gland. *Proc. Nat. Acad. Sci. U S A*, 105, 2008, 8, 2907-2912.
128. Fofanova, O., N. Takamura, E. Kinoshita, et al. Compound heterozygous deletion of the PROP-1 gene in children with combined pituitary hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*, 83, 1998, 7, 2601-4.
129. Fofanova, O., N. Takamura, E. Kinoshita, et al. Rarity of PIT1 involvement in children from Russia with combined pituitary hormone deficiency. *Am J Med Genet.*, 77, 1998, 5, 360-5.
130. Gage, P.J., H. Suh, S.A. Camper. The bicoid-related Pitx gene family in development. *Mamm Genome*, 10, 1999, 197-200.
131. Gaiddon, C., M. de Tapia, J.-P. Loeffler. The Tissue-Specific transcription Factor Pit-1/GHF-1 Binds to the c-fos Serum Response Element and Activates c-fos transcription. *Molecul. Endocrinol.*, 13, 1999, 5, 742-751.
132. Gangat, M., S. Radovick. Pituitary Hypoplasia. *Endocrinol Metab Clin North Am.*, 46, 2017, 2, 247-257.
133. Garrahy, A., A. Agha. How should we interrogate the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in patients with suspected hypopituitarism? *BMC Endocr Disord.*, 16, 2016, 1, 36.
134. Gat-Yablonski, G., A. Klar, D. Hirsch, et al. Three novel mutations in POU1F1 in Israeli patients with combined pituitary hormone deficiency. *J Pediatr Endocrinol Metab.*, 2005, 18, 385-393.
135. Gat-Yablonski, G., L. Lazar, A. Pertzalan, et al. A novel mutation in PIT-1: phenotypic variability in familial combined pituitary hormone deficiencies. *J Pediatr Endocrinol Metab.*, 2002, 15, 325-330.
136. Gavrilova, A., E. Nagaeva, T. Shiryaeva. A Novel heterozygous mutation in POU1F1 is associated with combined pituitary hormone deficiency. 10<sup>th</sup> International Meeting of Pediatric Endocrinology, 1249, 2017, P3-842.
137. Giordano, M. Genetic causes of isolated and combined pituitary hormone deficiency. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.*, 30, 2016, 6, 679-691.
138. Gordon, D., S. Lewis, B. Haugen, et al. Pit-1 and GATA-2 Interact and Functionally Cooperate to Activate the Thyrotropin b-Subunit Promoter. *J. Biol. Chem.*, 272, 1997, 39, 24339-24347.

139. Grandone, A., A. Torella, A. Festa. Target gene sequencing to identify cause of short stature. 10<sup>th</sup> International Meeting of Pediatric Endocrinology, 2017, 494, P3-804.
140. Gregory, L., M. Mocabe, K. Alatzoglou, et al. Identification of genetic variants in a large cohort of patient with congenital hypothalamo-pituitary disorders. 10<sup>th</sup> International Meeting of Pediatric Endocrinology, 2017, 1280, FC76.
141. Greulich WW., SI. Pyle. Radiographic atlas of skeletal development of hand and wrist, ed 2. Stanford, Stanford University Press, 1959.
142. Grinspon, RP., N. Loreti, D. Braslavsky, et al. Spreading the clinical window for diagnosing fetal-onset hypogonadism in boys. *Front. Endocrinol.*, 5, 2014, 51, 1-14.
143. Grinspon, R., R. Rey. New Perspectives in the Diagnosis of Pediatric Male Hypogonadism: the Importance of AMH as a Sertoli Cell Marker, *Arq Bras Endocrinol Metab*, 55, 2011, 512-519.
144. Grinspon, R., R. Rey. Anti-Mullerian Hormone and Sertoli Cell Function in Paediatric Male Hypogonadism, *Horm Res Paediatr*, 73 2010, 81–92.
145. Gubbay, J., J. Collignon, P. Koopman, et al. A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature*, 346, 1990, 6281, 245–250.
146. Grumbach M. COMMENTARY: A Window of Opportunity: The Diagnosis of Gonadotropin Deficiency in the Male Infant. *J Clin Endocrinol Metab*, 90, 2005, 5, 3122–3127.
147. Hagen, CP., L. Aksglaede, K. Sorensen, et al. Serum Levels of Anti-Mullerian Hormone as a Marker of Ovarian Function in 926 Healthy Females from Birth to Adulthood and in 172 Turner Syndrome Patients. *J Clin Endocrinol Metab*, 95, 2010, 5003–5010.
148. Halás, Z., T. Toke, A. Patócs, et al. High Prevalence of PROP1 Gene Mutations in Hungarian Patients with Childhood-Onset Combined Anterior Pituitary Hormone Deficiency. *Endocrine*, 30, 2006, 3, 255–260.
149. Hamel, B., A. Smits, B. Otten, et al. Familial X-linked mental retardation and isolated growth hormone deficiency: clinical and molecular findings. *Am. J. Med. Gen.*, 64, 1996, 1, 35–41.
150. Hashimoto, Y., M. Cisternino, L. Cohen. A novel nonsense mutation in the Pit-1 gene: evidence for a gene dosage effect. *J Clin Endocrinol Metab.*, 88, 2003, 1241–1247.

151. Hattori, A., H. Shima, Y. Katoh-Fukui. Screening of monogenic mutations in patients with idiopathic short stature. 10<sup>th</sup> International Meeting of Pediatric Endocrinology, 227, 2017, P3-818.
152. Heanue, T., V. Pachnis. Prospective Identification and Isolation of Enteric Nervous System Progenitors Using SOX2. *Stem Cells*, 2011, 1, 128-140.
153. Henderson, R., K. Williamson, J. Kennedy, et al. A rare de novo nonsense mutation in OTX2 causes early onset retinal dystrophy and pituitary dysfunction. *Molec. Vision*, 2009, 15, 2442-2447.
154. Hendriks-Stegeman, B., K. Augustin, B. Bakker, et al. Combined Pituitary Hormone Deficiency Caused by Compound Heterozygosity for Two Novel Mutations in the POU Domain of the PIT1/POU1F1 Gene. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 86, 2001, 4, 1545–1550.
155. Hindmarsh, P. C. Is there a role of GH-therapy in short normal children. Ed. J. P. Monson. *Growth hormone therapy*, London, 1999, 64-77.
156. Ho, Y., N. Cooke, S. Liebhaber. An autoregulatory pathway establishes the definitive chromatin conformation at the pit-1 locus. *Mol. Cell. Biol.*, 35, 2015, 9, 1523-1532.
157. Hoffmann, S., D. Hos, M. Küspert et al. Stem cell factor Sox2 and its close relative Sox3 have differentiation functions in oligodendrocytes. *Development*, 2014, 141, 39-50.
158. Hol, F., M. Schepens, S. van Beersum, et al. Identification and characterization of an Xq26–q27 duplication in a family with spina bifida and panhypopituitarism suggests the involvement of two distinct genes. *Genomics*, 69, 2000, 2, 174–181.
159. Horlein, A., A. Naar, T. Heinzl, et al. Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature*, 377, 1995, 6548, 397–404.
160. Houchin, L. and A. Rogol. Androgen replacement in children with constitutional delay of puberty. *Baillieres Clin. Endocrinol. Metab.*, 12, 1998, 3, 427-440.
161. Iliev, DI., NE. Wittekindt, MB. Ranke, et al. Structural Analysis of Human Growth Hormone with Respect to the Dominant Expression of Growth Hormone (GH) Mutations in Isolated GH Deficiency Type II. *Endocrinology*, 146, 2005, 1411–1417.
162. Ingraham, H., R. Chen, H. Mangalam, et al. A tissue-specific transcription factor containing a homeodomain specifies a pituitary phenotype. *Cell.*, 1988, 4, 519-529.
163. Irie, Y., K. Tatsumi, M. Ogawa et al. A novel E250X mutation of the PIT1 gene in a patient with combined pituitary hormone deficiency. *Endocr J.*, 42, 1995, 351–354.

164. Johnson JR. Normal ovarian function and assessment of ovarian reserve in children and young people. In *Diagnostics of endocrine function in children and adolescents*, ed. by Ranke, MB. Mullis, PE. Basel, Karger, 2011, 331-349.
165. Johansen, ML., CP. Hagen, TH. Johannsen. Et al. Anti-Müllerian Hormone and Its Clinical Use in Pediatrics with Special Emphasis on Disorders of Sex Development. *Int J Endocrinol.*, 2013, 1-10.
166. Jorgensen, J., C. Quirk, J. Nilsson. Multiple and overlapping combinatorial codes orchestrate hormonal responsiveness and dictate cell-specific expression of the genes encoding luteinizing hormone. *Endocr Rev.*, 2004, 25, 521-542.
167. Josso, N., RA. Rey, JY. Picard. Anti-Müllerian Hormone: A Valuable Addition to the Toolbox of the Pediatric Endocrinologist. *Int J Endocrinol*, 2013, 1-12.
168. Kakizawa, T., T. Miyamoto, K. Ichikawa, et al. Functional interaction between Oct-1 and retinoid X receptor. *J. Biol. Chem.*, 274, 1999, 27, 19103–19108.
169. Karlberg, J. A biologically-oriented mathematical model (ICP) for human growth. *Acta Paediatr. Scand. Suppl.*, 1989, 350, 70-94.
170. Kastury, K., T. Druck, K. Huebner, et al. Chromosome locations of human EMX and OTX genes. *Genomics*, 22, 1994, 41-45.
171. Kathleen, S., E. Jacobson, Kr. Jepsen, et al. Allosteric Effects of Pit-1 DNA Sites on Long-Term Repression in Cell Type Specification. *Science*, 290, 2000, 1127-1131.
172. Kawamura, K., T. Kouki, G. Kawahara, et al. Hypophyseal development in vertebrates from amphibians to mammals. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 126, 2002, 2, 130–135.
173. Kelberman, D., K. Rizzoti, R. Lovell-Badge, et al. Genetic regulation of pituitary gland development in human and mouse. *Endocr. Rev.*, 30, 2009, 7, 790-829.
174. Kelberman, D., L. Islam, S. Holder et al. Digenic inheritance of mutations in FOXC1 and PITX2 : correlating transcription factor function and Axenfeld-Rieger disease severity. *Hum Mutat.*, 32, 2011, 10, 1144-52.
175. Kelberman, D., SC de Castro, S. Huang et al. SOX2 plays a critical role in the pituitary, forebrain, and eye during human embryonic development. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 93, 2008, 5, 1865-1873.
176. Kelberman, D., K. Rizzoti, A. Avilion, et al. Mutations within Sox2/SOX2 are associated with abnormalities in the hypothalamo-pituitary-gonadal axis in mice and humans. *J. Clin. Invest.*, 11, 2006, 9, 2442-2455.
177. Kelberman, D., M. Dattani. Hypopituitarism Oddities: Congenital Causes. *Horm Res.*, 68, 2007, suppl 5, 138–144.

178. Kelberman, D., M. Dattani. Septo-optic dysplasia: novel insights into the aetiology. *Horm Res.*, 69, 2008, 5, 257-265.
179. Kelley, C., G. Lavorgna, M. Clark, et al. The Otx2 homeoprotein regulates expression from the gonadotropin-releasing hormone proximal promoter. *Molec. Endocr.*, 14, 2000, 1246-1256.
180. Kelsey, TW., P. Wright, SM. Nelson, et al. A Validated Model of Serum Anti-Mullerian Hormone from Conception to Menopause. *Plosone*, 6, 2011, 7, 1-7.
181. Kim S., Y. Kim, Y. Shin, et al. Clinical characteristics and molecular analysis of PIT1, PROP1, LHX3, and HESX1 in combined pituitary hormone deficiency patients with abnormal pituitary MR imaging. *Horm Res.*, 2003, 60, 277-283.
182. Kioussi C., P. Briata, S. Baek, et al. Identification of a Wnt/Dvl/beta-Catenin3Pitx2 pathway mediating cell-type-specific proliferation during development. *Cell*, 111, 2002, 673–685.
183. Kishimoto, M., Y. Okimura, K. Yagita, et al. Novel function of the transactivation domain of a pituitary-specific transcription factor, Pit-1. *J. Biol. Chem.*, 277, 2002, 47, 4541-4548.
184. Koizumi, M., S. Ida, Y. Shoji, et al. Endocrine status of patients with septo-optic dysplasia: fourteen Japanese cases. *Clin Pediatr Endocrinol.*, 26, 2017, 2, 89–98.
185. Kong, H., R. Morgan, R. Maunus, et al. A unique restriction endonuclease, BcgI, from *Bacillus coagulans*. *Nucleic Acids Res.*, 25, 1993, 21, 4, 987-91.
186. Koolen, D, J. Kramer, K. Neveling, et al. Mutation in the chromatin modifier gene KANSL1 cause the 17q21.31 microdeletion syndrome. *Nat Genet.*, 44, 2012, 639-641.
187. Koolen, D, A. Sharp, J. Hurst, et al. Clinical and molecular delineation of the 17q21.31 microdeletion syndrome. *J Med Genet.*, 45, 2008, 710–720.
188. Koolen, D., L. Vissers, R. Pfundt, et al. A new chromosome 17q21.31 microdeletion syndrome associated with a common inversion polymorphism. *Nat Genet.*, 38, 2006, 999-1001.
189. Kouki, T., H. Imai, K. Aoto, et al. Developmental origin of the rat adenohypophysis prior to the formation of Rathke’s pouch. *Development*, 128, 2001, 959–963.
190. Krzisnik, C., Z. Kolacio, T. Battelino, et al. The “Little people” of the island of Krk – Revisited. Etiology of hypopituitarism revealed. *J Endocrin Genet*, 1999, 1, 9-19.
191. Krzisnik, C., S. Grguric, K. Cvijovic et al. Longevity of the hypopituitary patients from the island Krk: a follow-up study. *Endocrinol Rev.*, 2010, 7, 4, 357-362.

192. Kubini, K., M. Zachmann, NJ. Albers, et al. Basal inhibin B and the testosterone response to human chorionic gonadotropin correlate in prepubertal boys. *Clin Endocrinol Metab.*, 85, 2000, 1, 134-8.
193. Lagerstrom-Fermer, M., M. Sundvall, E. Johnsen, et al. X-linked recessive panhypopituitarism associated with a regional duplication in Xq25–q26. *Am. J. Hum. Gen.*, 60, 1997, 910–916.
194. Laherty, C., A. Billin, R. Lavinsky, et al. SAP30, a component of the mSin3 corepressor complex involved in N-CoR-mediated repression by specific transcription factors. *Mol. Cell.*, 2, 1998, 1, 33–42.
195. Lamesch, C., S. Neumann, R. Pfaffle et al. Adenocorticotrope deficiency with clinical evidence for late onset on combined pituitary hormone deficiency caused by homozygous 301-302delAG mutation of PROP1 gene. *Pituitary*, 2002, 5, 163-168.
196. Lammoglia J., F. Eyzaguirre, N. Unanue et al. Congenital hypopituitarism: report of 23 cases. *Rev Med Chil*, 136, 2008, 996-1006.
197. Lamolet, B., A. Pulichino, T. Lamonerie, et al. A pituitary cell-restricted T box factor, Tpit, activates POMC transcription in cooperation with Pitx homeoproteins. *Cell*, 2001, 104, 849–859.
198. Laumonier, F., N. Ronce, B. Hamel, et al. Transcription factor SOX3 is involved in X-linked mental retardation with growth hormone deficiency. *Am. J. Hum. Gen.*, 71, 2002, 1450–1455.
199. Lazea, C., P. Grigorescu-Sido, R. Popp, et al. The c.301\_302delAG PROP1 gene mutation in Romanian patients with multiple pituitary hormone deficiency. *J Pediatr Endocrinol Metab.*, 2015, 28, 9-10, 993-8
200. Lebl, J., J. Vosařlo, R. Pfaeffle et al. Auxological and endocrine phenotype in a population-based cohort of patients with PROP1 gene defects. *European Journal of Endocrinology*, 153, 2005, 389–396.
201. Lee, J., Y. Zhu, J. Cordero, et al. Long-Term Growth Hormone Therapy in Adulthood Results in Significant Linear Growth in siblings with a PROP-1 Gene Mutation. *J Clin Endocrinol Metab*, 89, 2004, 4850–4856.
202. Lin, S., S. Li, D. Drolet, et al. Pituitary ontogeny of the Snell dwarf mouse reveals Pit-1-independent and Pit-1-dependent origins of the thyrotrope. *Development*, 120, 1994, 515–522.
203. Liu, J., C. Lin, A. Gleiberman, et al. Tbx19, a tissue-selective regulator of POMC gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98, 2001, 8674–8679.

204. Lorin, E., J. Tollkuhn, C. Scafoglio, et al. Homeodomain-Mediated b-Catenin-Dependent Switching Events Dictate Cell-Lineage. Determination. *Cell.*, 125, 2006, 3, 593–605.
205. Luisi S., P. Florio, F. Reis, et al. Inhibins in female and male reproductive physiology: role in gametogenesis, conception, implantation and early pregnancy. *Human Reproduction Update*, 11, 2005, 2, 123–135.
206. Macchiaroli, A., D. Kelberman, R. Auriemma, et al. A novel heterozygous SOX2 mutation causing congenital bilateral anophthalmia, hypogonadotropic hypogonadism and growth hormone deficiency. *Gene*, 534, 2014, 2, 282-5.
207. Machinis, K., S. Amselem. Functional relationship between LHX4 and POU1F1 in light of the LHX4 mutation identified in patients with pituitary defects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 90, 2005, 5456-62.
208. Madeira, L., M. Nishi, M. Nakaguma. Molecular analysis of brazilian patients with combined pituitary hormone deficiency and orthotopic posterior pituitary lobe reveals eight different PROP1 alterations with three novel mutations. *Clin Endocrinol (Oxf)*., 2017, 22.
209. Main, KM., J. Toppari, AM Suomi, et al. Larger Testes and Higher Inhibin B Levels in Finnish than in Danish Newborn Boys. *J Clin Endocrinol Metab*, 91, 2006, 2732–2737.
210. Malvagia, S., G. Poggi, E. Pasquini, et al. The de novo Q167K mutation in the POU1F1 gene leads to combined pituitary hormone deficiency in an Italian patient. *Pediatr Res.*, 54, 2003, 635–640.
211. Manning, L., K. Ohyama, B. Saeger, et al. Regional morphogenesis in the hypothalamus: a BMP-Tbx2 pathway coordinates fate and proliferation through Shh downregulation. *Dev. cell*, 11, 2006, 6, 873-885.
212. Martinez-Morales, J. R., V. Dolez, I. Rodrigo, et al. OTX2 activates the molecular network underlying retina pigment epithelium differentiation. *J Biol Chem.*, 278, 2003, 24, 21721-31.
213. Matise, M., D. Epstein, H. Park, et al. Gli2 is required for induction of floor plate and adjacent cells, but not most ventral neurons in the mouse central nervous system. *Development*, 12, 1998, 125, 15, 2759-2770.
214. Matsuo, I., S. Kuratani, C. Kimura, et al. Mouse Otx2 functions in the formation and patterning of rostral head. *Genes Dev*, 1995, 9, 2646-58.

215. Matuszczak E., A. Hermanowicz, M. Komarowska, et al. Serum AMH in Physiology and Pathology of Male Gonads. *Int J Endocrinol*, 2013, 1-6.
216. McCabe, M., C. Gaston-Massuet, L. Gregory et al. Variations in PROKR2, but not PROK2, are associated with hypopituitarism and septo-optic dysplasia. *J Clin Endocrinol Metab*, 2013, 98, 547–557.
217. McCabe, M., C. Gaston-Massuet, V. Tziaferi et al. Novel FGF8 mutations associated with recessive holoprosencephaly, craniofacial defects, and hypothalamo-pituitary dysfunction. *J Clin Endocrinol Metab*, 2011, 96, 1709–1718.
218. McLennan K., Y. Jeske, A. Cotterill, et al. Combined pituitary hormone deficiency in Australian children: clinical and genetic correlates. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2003, 58, 785–794.
219. Mendonca, B., M. Osorio, A. Latronico, et al. Longitudinal Hormonal and Pituitary Imaging Changes in Two Females with Combined Pituitary Hormone Deficiency due to Deletion of A301, G302 in the PROP1 Gene. *J Clin Endocrinol Metab*, 84, 1999, 942–945.
220. Miras, M., L. Castro, S. Martin. Pituitary stalk interruption syndrome, clinical, biochemical and neuroradiological relationships. 10th International Meeting of Pediatric Endocrinology, 2017. 1129, P1-827.
221. Mladenov V. Anti-Müllerian hormone - A hormone with narrow spectrum of action and broad spectrum of clinical significance. *Scripta Scientifica Medica*, 46, 2014, 3, 24-28.
222. Nagase, T, K. Ishikawa, R. Kikuno, et al. Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XV. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which code for large proteins in vitro. *DNA Res.*, 6, 1999, 337-345.
223. Naiche, LA, Z. Harrelson, RG. Kelly, et al. T-box genes in vertebrate development. *Annu Rev Genet*, 39, 2005, 219–239.
224. Nalda, A., J. Martial, M. Muller. The glucocorticoid receptor inhibits the human prolactin gene expression by interference with Pit-1 activity. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 134, 1997, 2, 129–137.
225. Nesi-Franca, C., S. Radovick. The molecular basis of hypopituitarism. *Trends Endocrinol Metab*, 20, 2009, 10, 506-516.
226. Netchine, I., M. Sobrier, H. Krude et al. Mutations in LHX3 result in a new syndrome revealed by combined pituitary hormone deficiency. *Nat Genet.*, 2, 2000, 25, 182-186.

227. Nishida, A., A. Furukawa, C. Koike. Otx2 homeobox gene controls retinal photoreceptor cell fate and pineal gland development. *Nat Neurosci.* 6, 2003, 12, 1255-63.
228. Norlin, S, U. Nordstrom, T. Edlund. Fibroblast growth factor signaling is required for the proliferation and patterning of progenitor cells in the developing anterior pituitary. *Mech. Dev.*, 96, 2000, 2, 175–182.
229. Obretenova, B., R. Pfaeffle, A. Zygmunt-Gorska, et al. Mutations and Pituitary morphology in a series of 82 patients with PROP1 gene defects. *Horm Res Peadiatr*, 76, 2011, 348-358.
230. Ohkubo, Y, C. Chiang, J. Rubenstein. Coordinate regulation and synergistic actions of BMP4, SHH and FGF8 in the rostral prosencephalon regulate morphogenesis of the telencephalic and optic vesicles. *Neuroscience*, 111, 2002, 1 1-17.
231. Ohta, K, Nobukuni Y, Mitsubuchi H, et al. Mutations in the Pit-1 gene in children with combined pituitary hormone deficiency. *Biochem Biophys Res Commun.* 189, 1992, 851–855.
232. Ohuchi, H., Y. Hori, M. Yamasaki, et al. FGF10 acts as a major ligand for FGF receptor 2 IIIb in mouse multi-organ development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 277, 2000, 3, 643–649.
233. Ohyama, K, P. Ellis, S. Kimura, et al. Directed differentiation of neural cells to hypothalamic dopaminergic neurons. *Development*, 132, 2005, 23, 5185-5197.
234. Ohyama, K, R. Das, M. Placzek. Temporal progression of hypothalamic patterning by a dualaction of BMP. *Development*, 135, 2008, 20: 3325-3331.
235. Ouarezki, Y., A. Ladjouze, A. Djermane. Pituitary imaging in 189 patients with congenital growth hormone deficiency. 10<sup>th</sup> International Meeting of Pediatric Endocrinology, 1561, 2017, P1-1007.
236. Palomino, T, A. Sanchez-Pacheco, P. Pena, et al. A direct protein-protein interaction is involved in the cooperation between thyroid hormone and retinoic acid receptors and the transcription factor GHF-1. *FASEB J.*, 12, 1998, 12, 1201–1209.
237. Park, H., C. Bai, K. Platt, et al. Mouse Gli1 mutants are viable but have defects in SHH signaling in combination with a Gli2mutation. *Development*, 127, 2000, 8, 1593-1605.
238. Pellegrini-Bouiller, I., P. Bélicar, A. Barlier, et al. A new mutation of the gene encoding the transcription factor Pit-1 is responsible for combined pituitary hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 81, 1996, 2790–2796.

239. Pena-Almazan, S., J. Buchlis, S. Miller, et al. Linear growth characteristics of congenitally GH-deficient infants from birth to one year of age. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 86, 2001, 5691–5694.
240. Peneva, L., N. Stanimirova. Auxology of constitutional delay of growth and puberty. *Exp. Clin. Endocrinol.*, 86, 1985, 121-122.
241. Pernasetti, F, RD. Milner, AA. al Ashwal, et al. Pro239Ser: a novel recessive mutation of the Pit-1 gene in seven Middle Eastern children with growth hormone, prolactin, and thyrotropin deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 83, 1998, 2079–2083.
242. Pernasetti, F, SP. Toledo, VV. Vasilyev, et al. Impaired adrenocorticotropin-adrenal axis in combined pituitary hormone deficiency caused by a twobase pair deletion (301-302delAG) in the prophet of Pit-1 gene. *J Clin Endocrinol Metab*, 85, 2000, 1, 390-397.
243. Pfaeffle, R., C. Land, E. Schoenau. The genetics and neuroendocrinology of short-stature International study (Genesis): Data from 15 years of surveillance of growth hormone therapy in Germany, France and USA. 10<sup>th</sup> International Meeting of Pediatric Endocrinology, 922, 2017, P3-830.
244. Pfäffle, R., J. Klammt. Pituitary transcription factors in the aetiology of combined pituitary hormone deficiency. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 25, 2011, 43–60.
245. Pfäffle, R., O. Blankenstein, S. Wüller, et al. Combined pituitary hormone deficiency: role of Pit-1 and Prop-1. *Acta Paediatr.*, 88, 1999, Suppl., 433-441.
246. Pierce, M., L. Madison. Evaluation and Initial Management of Hypopituitarism. *Pediatr Rev.*, 37, 2016, 9, 370-6.
247. Pogoda, H., M. Hammerschmidt. Molecular genetics of pituitary development in zebrafish. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 18, 2007, 4, 543–558.
248. Potok, M., K. Cha, A. Hunt, et al. WNT signaling affects gene expression in the ventral diencephalon and pituitary gland growth. *Dev. dynam.*, 237, 2008, 4, 1006-1020.
249. Puligilla, C., A. Dabdoub, S. Brenowitz et al. Sox2 induces neuronal formation in the developing mammalian cochlea. *Neurosci.*, 30, 2010, 2, 714-22.
250. Qi, Y., JA. Ranish, X. Zhu, et al. Atbf1 is required for the Pit1 gene early activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 19, 2008, 105, 7, 2481-6.
251. Quantien, M., A. Barlier, J. Franc, et al. Pituitary transcription factors: from congenital deficiencies to gene therapy. *Neuroendocrinol.*, 18, 2006, 9, 633-42.

252. Radovick, S, M. Nations, Y. Du, et al. A mutation in the POU-homeodomain of Pit-1 responsible for combined pituitary hormone deficiency. *Science*. 257, 1992, 1115–1118.
253. Raetzman, L., B. Wheeler, S. Ross, et al. Persistent expression of Notch2 delays gonadotrope differentiation. *Mol. Endocrinol.* 20, 2006, 11, 2898–2908.
254. Raetzman, L., S. Ross, S. Cook, et al. Developmental regulation of Notch signaling genes in the embryonic pituitary: Prop1 deficiency affects Notch2 expression. *Dev. Biol.*, 265, 2004, 2, 329–340.
255. Ragge, NK., AG. Brown, CM. Poloschek, et al. Heterozygous mutations of OTX2 cause severe ocular malformations. *Am. J. Hum. Genet.*, 76, 2005, 1008-1022.
256. Rainbow, L, SA. Rees, MG. Shaikh, et al. Mutation analysis of POUF-1, PROP-1 and HESX-1 show low frequency of mutations in children with sporadic forms of combined pituitary hormone deficiency and septo-optic dysplasia. *Clin Endocrinol (Oxf)*., 62, 2005, 163–168.
257. Ranke, MB. Towards a consensus on the children with idiopathic short stature. *Horm. Res*, 1996, 46, Suppl. 2, 64-67.
258. Ranke MB, A. Lindberg, KIGS International Board. Prediction models for short children born small for gestational age (SGA) covering the total growth phase. Analyses based on data from KIGS (Pfizer International Growth Database). *BMC Med Inform Decis Mak.* 2011, 11, 38.
259. Ranke, M.B., P.E. Mullis P.-E. *Diagnostics of Endocrine Function in Children and Adolescents*. Basel, Karger, 2011.
260. Rappold, G. A, M. Fukami, B. Niesler, et al. Deletion of the homeobox gene SHOX are an important cause of growth failure in children with short stature. *J. Clin. Endocrinol.Metab.*, 87, 2002, 1402-06.
261. Reynaud, R, M. Gueydan, A. Saveanu, et al. Genetic screening of combined pituitary hormone deficiency: experience in 195 patients. *J Clin Endocrinol Metab*, 91, 2006, 9, 3329-36.
262. Riepe, F., C. Partsch, O. Blankenstein et al. Longitudinal Imaging Reveals Pituitary Enlargement Preceding Hypoplasia in Two Brothers with Combined Pituitary Hormone Deficiency Attributable to PROP1 Mutation. *J Clin Endocrinol Metab*, 86, 2001, 4353–4357.

263. Rizzoti, A., Sox2 and Oct-3/4: a versatile pair of master regulators that orchestrate the self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, 1, 2009, 2, 228-36.
264. Rizzoti, K, S. Brunelli, D. Carmignac et al. SOX3 is required during the formation of the hypothalamo-pituitary axis. *Nature genetics*, 36, 2004,247-255.
265. Rizzoti, K, R. Lovell-Badge. Early development of the pituitary gland: induction and shaping of Rathke's pouch. *Rev Endocr Metab Disord*, 6, 2005,161–172.
266. Rizzoti K., R. Lovell-Badge. Regenerative Medicine: Organ recital in a dish. *Nature*, 480, 2011, 44–46.
267. Romero, CJ., E. Pine-Twaddell, S. Radovick. Novel mutations associated with combined pituitary hormone deficiency. *J Mol Endocrinol.*, 46, 2011, 93-102.
268. Romero, CJ., S. Nesi-Franca, S. Radovik. The molecular basis of hypopituitarism. *Trends Endocrinol Metab*, 20, 2009, 10, 506-516.
269. Rosenfeld, M. Pituitary development: regulatory codes in mammalian organogenesis. *Science*, 295, 2002, 2231-2235.
270. Salemi, S, A. Besson, A. Eblé, et al. New N-terminal located mutation (Q4ter) within the POU1F1-gene (PIT-1) causes recessive combined pituitary hormone deficiency and variable phenotype. *Growth Horm IGF Res.*, 2003, 13,264–268.
271. Savage, MO, WF. Blum, MB. Ranke, et al. Clinical features and endocrine status in patients with growth hormone insensitivity (Laron syndrome). *J Clin Endocrinol Metab*, 77, 1993, 1465–1471.
272. Schaufele, F, BL. West, JD. Baxter. Synergistic activation of the rat growth hormone promoter by Pit-1 and the thyroid hormone receptor. *Mol Endocrinol.*, 6, 1992, 656–665.
273. Schilter, KF., A. Schneider, T. Bardakjian. OTX2 microphthalmia syndrome: four novel mutations and delineation of a phenotype. *Clin Genet.*, 79, 2011, 2, 158-168.
274. Schneider, A., T. Bardakjian, L. Reis et al. Novel SOX2 mutations and genotype-phenotype correlation in anophthalmia and microphthalmia. *Am J Med Genet A*, 149A, 2009. 12, 2706-2715.
275. Sehested A., A. Juul, AM. Andersson, et al. Serum Inhibin A and Inhibin B in Healthy Prepubertal, Pubertal, and Adolescent Girls and Adult Women: Relation to Age, Stage of Puberty, Menstrual Cycle, Follicle-Stimulating Hormone, Luteinizing Hormone, and Estradiol Levels. *Clin Endocrinol Metab*, 85, 2000, 1634–1640.

276. Semina, EV., R. Reiter, NJ. Leysens, et al. Cloning and characterization of a novel bicoid-related homeobox transcription factor gene, RIEG, involved in Rieger syndrome. *Nat Genet*, 14, 1996, 392–399.
277. Sharp, A., S. Hansen, R. Selzer, et al. Discovery of previously unidentified genomic disorders from the duplication architecture of the human genome. *Nat Genet*. 38, 2006,1038-1042.
278. Shaw-Smith, C., A. Pittman, J. Willatt. et al. Microdeletion encompassing MAPT at chromosome 17q21.3 is associated with developmental delay and learning disability. *Nat Genet*. 38, 2006, 1032-1037.
279. Sheng, HZ, H. Westphal. Early steps in pituitary organogenesis. *Trends Genet.*, 15, 1999, 236–240
280. Simeone, A, D. Acampora, A. Mallamaci, et al. A vertebrate gene related to orthodenticle contains a homeodomain of the bicoid class and demarcates anterior neuroectoderm in the gastrulating mouse embryo. *EMBO J*, 12, 1993, 2735-47.
281. Simeone, A., D. Acampora, M. Gulisano, et al. Nested expression domains of four homeobox genes in developing rostral brain. *Nature*, 358, 1992, 687-690.
282. Simmons, DM, JW. Voss, HA. Ingraham, et al. Pituitary cell phenotypes involve cell-specific Pit-1 mRNA translation and synergistic interactions with other classes of transcription factors. *Genes Dev*, 4, 1990, 695–711.
283. Smith, AN., L. Miller, G. Radice et al., Stage-dependent modes of Pax6-Sox2 epistasis regulate lens development and eye morphogenesis. *Development*, 136, 2009, 17: 2977-2985.
284. Snabboon, T, W. Plengpanich, P. Buranasupkajorn, et al. A novel germline mutation, IVS4+1G>A, of the POU1F1 gene underlying combined pituitary hormone deficiency. *Horm Res*. 2008, 69, 60–64.
285. Solans, CV., F. Liftshits. Body weight progression and nutritional status in patient with familial short stature with and without constitutional delay in growth. *Am. J. Dis, Child*, 1992, 146, 296-302.
286. Soliman, A., A. Adel, M. Alzyoud. Peak growth hormone after Glucagon stimulation test correlates better with IGF-I levels in short children. 10<sup>th</sup> International Meeting of Pediatric Endocrinology, 2017, 699, P1-838.
287. Solomon, BD, S. Mercier, JI. Velez, et al. Analysis of genotype-phenotype correlations in human holoprosencephaly. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, 2010, 154, 133-141.

288. Solomon, NM, S. Nouri, GL. Warne, et al. Increased gene dosage at Xq26–q27 is associated with X-linked hypopituitarism. *Genomics*, 79, 2002, 553–559.
289. Solomon, NM, SA. Ross, T. Morgan, et al. Array comparative genomic hybridisation analysis of boys with X linked hypopituitarism identifies a 3.9 Mb duplicated critical region at Xq27 containing SOX3. *J Med Genet*, 41, 2004, 669–678.
290. Sornson, M., W. Wu, J. Dasen et al. Pituitary lineage determination by the Prophet of Pit-1 homeodomain factor defective in Ames dwarfism. *Nature*, 384, 1996, 327-333.
291. Spieler, D1, N. Bäumer, J. Stebler, et al. Involvement of Pax6 and Otx2 in the forebrain-specific regulation of the vertebrate homeobox gene ANF/Hesx1. *Dev Biol.*, 296, 2004, 2, 567-79.
292. Stagi, S., E. Lapi, M. Pantaleo, et al. A SOX3 (Xq26.3-27.3) duplication in a boy with growth hormone deficiency, ocular dyspraxia, and intellectual disability: A long-term follow-up and literature review. *HORMONES*, 13, 2014, 4, 552-560.
293. Stefanija AM, P. Kotnik, MN. Bratanič, et al. Novel Mutations in HESX1 and PROP1 Genes in Combined Pituitary Hormone Deficiency. *Horm Res Paediatr.*, 84, 2015, 3,153-158.
294. Stevanovic, M, R. Lovell-Badge, J. Collignon, et al. SOX3 is an X-linked gene related to SRY. *Human Molecular Genetics*, 1993, 2, 2013–2018.
295. Stoeva, I., G. Dineva, A. Savov, et al. First results of the PROP-1 mutational screening in Bulgarian patients with combined pituitary hormone deficiency (CPHD). *Horm Res.*, 60, 2003, suppl 2, 66.
296. Stoeva, I., A. Kostova, S. Agova-Hadjidekova, et al. Growth hormone deficiency, associated with solitary median maxillary central incisor (SMMCI), skeletal deformities and ocular anomalies. *Horm Res*, 78, 2012, suppl 1, 306.
297. Stoeva, I, S. Agova-Hadjidekova, R. Grosdanova, et al. Coexistence of holoprosencephaly 5 (HPE5) and chromosome 22q13.3 deletion syndrome in a boy with growth retardation. *Horm Res Paediatr*, 78, 2012, Suppl 1, 213-214.
298. Stoeva, I., A. Aroyo, S. Andonova, et al. Congenital hypopituitarism and early onset of ACTH deficiency in a boy with 301-302delAG/150delA mutation of PROP1. *Horm Res Paediatr.*, 80, 2013, suppl1, 320.
299. Stoeva, I., A. Aroyo, S. Andonova, et al. PROP1 mutations among Bulgarian patients with combined pituitary hormone deficiency. Genotype-Phenotype correlations. II-nd Postgraduate Course “Contemporary Diabetes”, Varna, April 25-27, 2013

300. Stoeva, I., A. Aroyo, R. Emilova, et al. Serum IGF-1 levels measured by different ELISA assays and IRMA – a comparability study. *Scripta scientifica medica*, 47, 2015, 1, 39-46.
301. Stoeva, I., A. Aroyo, G. Stancheva, et al. Septo-optic dysplasia (SOD) associated with Koolen-de Vries syndrome (KDVS): a case report. *Horm Res Paediatr.*, 84, 2015, suppl1, 137.
302. Szeto, DP., AK. Ryan, SM. O’Connell, et al. P-OTX: a PIT-1-interacting homeodomain factor expressed during anterior pituitary gland development. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996, 93, 7706–7710.
303. Szeto, DP., C. Rodriguez-Esteban, AK. Ryan, et al. Role of the bicoid-related homeodomain factor Pitx1 in specifying hindlimb morphogenesis and pituitary development. *Genes Dev.*, 13, 1999, 484–494.
304. Suh, H., PJ. Gage, J. Drouin, et al. Pitx2 is required at multiple stages of pituitary organogenesis: pituitary primordium formation and cell specification. *Development*, 129, 2002, 329–337.
305. Suomi AM., KM. Main, M. Kaleva, et al. Hormonal Changes in 3-Month-Old Cryptorchid Boys. *J Clin Endocrinol Metab*, 91, 2006, 953–958.
306. Taha, D., PE. Mullis, L. Ibanez, et al. Absent or delayed adrenarche in Pit-1/POU1F1 deficiency. *Horm res.*, 2005, 64, 175-179.
307. Tajima, T., A. Ohtake, M. Hoshino, et al. OTX2 loss of function mutation causes anophthalmia and combined pituitary hormone deficiency with a small anterior and ectopic posterior pituitary. *J ClinEndocrinol Metab*, 2009, 94, 314-319.
308. Takuma, N., HZ. Sheng, Y. Furuta et al. Formation of Rathke’s pouch requires dual induction from the diencephalons. *Development*, 125, 1998, 23, 4835-4840.
309. Tan, T, S. Aftimos, L Worgan, et al. Phenotypic expansion and further characterisation of the 17q21.31 microdeletion syndrome. *J Med Genet*, 46, 2009, 480-489.
310. Tatsumi, K, K. Miyai, T. Notomi, et al. Cretinism with combined hormone deficiency caused by a mutation in the PIT1 gene. *Nat Genet*. 1992, 1, 56–58.
311. Tatsumi, K., N. Amino, PIT1 abnormality. *Growth Horm IGF Res.*, 1999, Suppl B: 18-22.
312. Tenenbaum-Rakover, Y., ML. Sobrier, S. Amselem. A novel POU1F1 mutation (p.Thr168IlefsX7) associated with an early and severe form of combined pituitary hormone deficiency: functional analysis and follow-up from infancy to adulthood. *Clin Endocrinol (Oxf)*., 75, 2011, 2, 214-9.

313. Terrone, G, D. A. D'Amico, F. Imperati, et al. A further contribution to the delineation of the 17q21.31 microdeletion syndrome: Central nervous involvement in two Italian patients. *Eur J Med Genet.*, 55, 2012, 466-471.
314. Thomson, K., DP. Dempsher, DM. Bier et al. Low prevalence of autoantibodies to the IGF1-receptor in children with short stature. *Pediatr. Res.*, 32, 1992, 455-459.
315. Treier, M., A. Gleiberman, M. O'Connell et al. Multistep signaling requirements for pituitary organogenesis in vivo. *Gen. Dev.*, 12, 1998, 15, 1691–1704.
316. Tremblay, JJ, C. Lanctot, J. Drouin. The pan-pituitary activator of transcription, Ptx1 (pituitary homeobox 1), acts in synergy with SF-1 and Pit1 and is an upstream regulator of the Lim-homeodomain gene Lim3/Lhx3. *Mol Endocrinol.* 12, 1998, 428–441.
317. Tritos, NA, A. Klibanski. Effects of Growth Hormone on Bone. *Prog Mol Biol Transl Sci.*, 138, 2016, 193-211.
318. Turton, JP, A. Mehta, J. Raza, et al. et al. Mutations within the transcription factor PROP1 are rare in a cohort of patients with sporadic combined pituitary hormone deficiency (CPHD). *Clin Endocrinol (Oxf)*, 63, 2005, 1, 10-8.
319. Turton, JP, R. Reynaud, A. Mehta, et al. Novel mutations within the POU1F1 gene associated with variable combined pituitary hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005, 90, 4762–4770.
320. Turton, JP, M. Strom, S. Langham, et al. Two novel mutations in the POU1F1 gene generate null alleles through different mechanisms leading to combined pituitary hormone deficiency. *Clin Endocrinol (Oxf)*., 76, 2012, 3,387-93.
321. Vallette-Kasic, S., A. Barlier, C. Teinturier et al. PROP1 Gene Screening in Patients with Multiple Pituitary Hormone Deficiency Reveals Two Sites of Hypermutability and a High Incidence of Corticotroph Deficiency. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 86, 2001, 4529-4535.
322. Viera, T., V. Boldarine, J. Abucham. Molecular Analysis of PROP1, PIT1, HESX1, LHX3, and LHX4 Shows High Frequency of PROP1 Mutations in Patients with Familial Forms of Combined Pituitary Hormone Deficiency. *Arq Bras Endocrinol Metab.*, 51, 2007, 7, 1097-1103.
323. Vissers, L, C. van Ravenswaaij, R. Admiraal, et al. Mutations in a new member of a chromodomain gene family cause CHARGE syndrome. *Nat Genet.* 36, 2004, 955-957.
324. Vivenza, D, M. Godi, MF, Faienza et al. A novel HESX1 splice mutation causes isolated GH deficiency by interfering with mRNA processing. *Eur J Endocrinol.*, 164, 2011, 5, 705-13.

325. Voutetakis, A., M. Argyropoulou, A. Sertedaki, et al. The Pituitary Magnetic Resonance Imaging in 15 Patients with Prop1 Gene Mutations: Pituitary Enlargement May Originate from the Intermediate Lobe. *JCEM*, 89, 2004, 5, 2200–2206.
326. Wang, P., X. Liang, J. Yi et al., Novel SOX2 mutation associated with ocular coloboma in a Chinese family. *Arch Ophthalmol*, 126, 2008, 5, 709-13
327. Wang, TW, GP. Stromberg, JT. Whitney, et al. Sox3 expression identifies neural progenitors in persistent neonatal and adult mouse forebrain germinative zones. *J Comp Neurol*, 497, 2006, 88–100.
328. Wang, Y, JF. Martin, CB. Bai. Direct and indirect requirements of Shh/Gli signaling in early pituitary development. *Developmental biology*, 348, 2010,199-209.
329. Webb, E., M. Dattani. Septo-optic dysplasia. *Eur J Hum Genet*, 2010, 18, 393–397.
330. Wegner, M. SOX after SOX: SOXession regulates neurogenesis. *Gen. Dev.*, 25, 2011,23, 2423–2428.
331. Willert, K., R. Nusse. Wnt Proteins. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 4, 2012, 9, 7864.
332. Wit, JM, NM. Drayer, M. Jansen, et al. Total deficiency of growth hormone and prolactin, and partial deficiency of thyroid stimulating hormone in two Dutch families: a new variant of hereditary pituitary deficiency. *Horm Res.*, 39, 1989, 170–177.
333. Wit, JM, W. Oostdijk, M. Losekoot et al. MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: Novel genetic causes of short stature. *Eur J Endocrinol.*, 174, 2016, 4, 145-73.
334. Wit. JM., GA. Camp, B. Rikken. Spontaneous growth and response to growth hormone treatment in children with GH – deficiency and idiopathic short stature. *Pediatr. Res*, 1996, 39, 295-302.
335. Woods, K., M. Cundall, J. Turton, et al. Over- and underdosage of SOX3 is associated with infundibular hypoplasia and hypopituitarism. *American Journal of Human Genetics*, 76, 2005, 833–849.
336. Wu, W., JD. Cogan, RW. Pfeaffle, et al. Mutations in PROP1 cause familial combined pituitary hormone deficiency. *Nat Genet*, 1998, 18: 147-149.
337. Wyatt, A., P. Bakrania, DJ. Bunyan, et al. Novel heterozygous OTX2 mutations and whole gene deletions in anophthalmia, microphthalmia and coloboma. *Hum. Mutat.* 29, 2008, 278-283.
338. von Eckardstein S., M. Simoni, M. Bergmann, et al. Serum Inhibin B in Combination with Serum Follicle- Stimulating Hormone (FSH) Is a More Sensitive Marker Than Serum FSH Alone for Impaired Spermatogenesis in Men, But Cannot Predict the

- Presence of Sperm in Testicular Tissue Samples. *J Clin Endocrinol Metab*, 84, 1999, 2496–2501.
339. Xu, L., R. Lavinsky, J. Dasen, et al. Signal-specific co-activator domain requirements for Pit-1 activation. *Nature*. 395, 1998, 301–306.
340. Yamashita, T, K. Moriyama, HZ. Sheng, et al. Lhx4, a LIM homeobox gene. *Genomics*. 44, 1997, 1, 144-6.
341. Ying, C, DH. Lin, DK. Sarkar, et al. Interaction between estrogen receptor and Pit-1 protein is influenced by estrogen in pituitary cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.*, 68, 1999, 145–152.
342. Yingchuan, Q., J. Ranish, Z. Xiaoyan, et al. Atbf1 is required for the Pit1 gene early activation. *PNAS*, 105, 2008, 7, 2481-2486.
343. Yoo, JH., HO. Kim, SW. Cha. Age specific serum anti-Müllerian hormone levels in 1,298 Korean women with regular menstruation *Clin Exp Reprod Med*, 38, 2011, 2, 93-97.
344. Yoshida, S., T. Kato, T. Susa, et al. PROP1 coexists with SOX2 and induces PIT1-commitment cells. *Biochem Biophys Res Commun.*, 385, 2009, 1, 11-5.
345. You, T., Y. Lv, S. Liu, et al. Novel OTX2 mutation associated with congenital anophthalmia and microphthalmia in a Han Chinese family. *Acta Ophthalmol.*, 90, 2012, 6, 501-2.
346. Zanger, K., LE. Cohen, K. Hashimoto, et al. A novel mechanism for cyclic adenosine 39,59-monophosphate regulation of gene expression by CREB-binding protein. *Mol Endocrinol.*, 1999, 13, 268–275.
347. Zevallos, S. The role of sonic hedgehog in the hypothalamus. Dissertation. University of Pennsylvania, 2011.
348. Zhao, L., S. Zevallos, K. Rizzoti. Disruption of SoxB1 dependent Sonic hedgehog expression in the hypothalamus causes Septo-Optic Dysplasia. *Dev Cell*, 2012, 22, 585–596.
349. Zhu, X., J. Zhang, J. Tollkuhn. et al. Sustained Notch signaling in progenitors is required for sequential emergence of distinct cell lineages during organogenesis. *Genes Dev.*, 2006, 20, 2739–2753.
350. Zhu, X, B. Wang, J. Gun. et al. Signaling and Epigenetic Regulation of Pituitary Development. *Curr Opin Cell Biol*, 19, 2007, 605–611.

351. Zhu, X., A. Gleiberman, M. Rosenfeld. Molecular physiology of pituitary development: signaling and transcriptional networks. *Physiol. Rev.*, 2006, 87, 933-963.
  352. Zia, C., A. Azadeh, A. Rikani. et al. Sonic hedgehog signalling pathway: a complex network. *Ann. Neurosci.*, 21, 2014, 1, 28-31.
  353. Zollino, M, D. Orteschi, D. Murdolo et al. Mutations in KANSL1 cause the 17q21.31 microdeletion syndrome phenotype. *Nature Genet.*, 44, 2012, 636-638.
-