

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА ПО ПЕДИАТРИЯ

Д-р АНИ ВАЛЕНТИНОВА АРОЙО

АВТОРЕФЕРАТ

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

Област на висше образование: „Здравеопазване и спорт“

Професионално направление: „Медицина“

Научна специалност: „Педиатрия“, шифър 03.01.50

на тема

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

Научен ръководител: проф. д-р Ива Христова Стоева, дм

София 2018

Дисертационният труд съдържа 204 стандартни машинописни страници, от които 18 са приложения. За неговото онагледяване са използвани 30 таблици и 48 фигури. Библиографската справка обхваща 353 източника, от които 43 на кирилица и 279 на латиница.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за публична защита от Катедрения съвет на Катедра по Педиатрия при Медицински университет - София, проведен на 12.10.2017 г.

Публичната защита на дисертационната работа ще се проведе на 19.01.2018 г. от 14.00 ч. в аудиторията на СБАЛДБ „Проф. Иван Митев“ – ЕАД, бул. „Акад. Иван Гешов“ №11.

Научно жури в състав:

1. Проф. д-р Лилия Димитрова Пенева, дмн
2. Проф. д-р Виолета Михова Йотова, дмн
3. Проф. д-р Ива Христова Сточева, дм
4. Доц. д-р Богдана Петрова Василева-Клисарска, дмн
5. Доц. д-р Даниел Илиев Илиев, дм

Резервни членове:

1. Доц. д-р Даниела Мирчева Авджиева-Тзавелла, дм
2. Доц. д-р Соня Василева Галчева, дм

Материалите по защитата са на разположение в отдел „Наука“ на Медицински факултет към Медицински университет – София.

Забележка: Номерата на фигурите и таблиците в автореферата не съответстват на номерата в дисертационния труд.

СЪДЪРЖАНИЕ

СПИСЪК С ФИГУРИТЕ.....	4
СПИСЪС ТАБЛИЦИТЕ.....	5
СПИСЪК СЪС СЪКРАЩЕНИЯТА.....	6
ВЪВЕДЕНИЕ.....	8
ЦЕЛ И ЗАДАЧИ.....	9
I. Цели	9
II. ЗАДАЧИ	9
МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ НА ИЗСЛЕДВАНЕ.....	10
I. <i>Дизайн на проучването</i>	10
II. <i>Подбор на кандидати. Критерии за включване и изключване от изследването</i>	10
III. <i>Изследвани пациенти</i>	11
IV. <i>Методи</i>	12
V. <i>Молекулярно-генетични изследвания</i>	14
РЕЗУЛТАТИ.....	21
I. <i>Подбор на кандидати. Критерии за включване в проучването</i>	21
II. <i>Молекулярно-генетичен анализ на гена PROP1</i>	28
ОБСЪЖДАНЕ	42
ИЗВОДИ И ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....	62
СПИСЪК С ПУБЛИКАЦИИТЕ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	65
СПИСЪК С УЧАСТИЯ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....	66
СПИСЪК С НАУЧНИ ПРОЕКТИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....	67

СПИСЪК С ФИГУРИТЕ

Фигура 1. Алгоритъм за подбор на кандидати за изследване на определен ген.	15
Фигура 2. Съпоставка на възрастта на пациентите и SDS_h при поставяне на диагнозата.....	22
Фигура 3. Съпоставка на ръста на пациентите със среднородителския ръст.....	22
Фигура 4. Сравнение между хронологичната и костната възраст на пациентите при поставяне на диагнозата.....	23
Фигура 5. Комбинация от дефицити на хипофизарни хормони в брой пациенти	23
Фигура 6. Находка от ЯМР на хипоталамо-хипофизарната област по брой пациенти .	28
Фигура 7. Резултат от молекулярно-генетичен анализ на пациент 1	28
Фигура 8. А) Секвенционен анализ на пациент 2, показващ хомозиготна 150delA мутация и В) нормална секвенция	31
Фигура 9. А) Секвенционен анализ на пациент 3, показващо хомозиготна 150delA мутация и В) нормална секвенция	31
Фигура 10. Патологичните хромозомни аберации наблюдавани при пациент 7	38
Фигура 11. Патологичните хромозомни аберации наблюдавани при пациент 8.	41

СПИСЪК С ТАБЛИЦИТЕ

Таблица 1. Възрастово и полово разпределение на изследваните пациенти.....	12
Таблица 2. Описание на използваните тестове за стимулация секрецията на РХ.	13
Таблица 3. Използвани праймери за амплификационна реакция на PROP1	16
Таблица 4. Условия за амплификационна реакция на <i>PROP1</i>	16
Таблица 5. Използвани праймери за амплификационна реакция на <i>POU1F1</i>	17
Таблица 6. Условия на амплификационна реакция на гените <i>POU1F1</i> и <i>HESX1</i>	18
Таблица 7. Условия на провеждане на амплификационната реакция на гените <i>SOX2</i> и <i>SOX3</i> :	18
Таблица 8. Неонатални симптоми на ДРХ сред изследваните пациенти	21
Таблица 9. Нормални стойности за възрастови и пубертетни стадии.....	24
Таблица 10. Норми на инхибин b за възрастови и пубертетни стадии.	25
Таблица 11. Резултати на АМН при момичета.	26
Таблица 12. Резултати от inhibin b при момичета.	27
Таблица 13. Алелна честота на откритите мутации и полиморфизми в PROP1.	32
Таблица 14. Клинична изява на МТД в неонаталния период при пациенти с доказан дефект в PROP1 гена	33
Таблица 15. Ауксологични данни и резултати от проведените стимулационни тестове за РХ	34
Таблица 16. Възраст на изява на допълнителни хипофизарни дефицити.....	34
Таблица 17. Сравнение на възрастта на начало на изоставането, поставяне на генетична и етиологична диагноза и начало на лечението	35
Таблица 18. Находка от ЯМР на хипоталмо-хипофизарна област при пациентите с доказана PROP1 мутация	35
Таблица 19. Честота на очните аномалии при изследваните пациенти	36
Таблица 20. Гени включени в 7q23.11 микродупликацията при пациент 8	40
Таблица 21. Съпоставка на находката от ЯМР при пациенти с PROP1 мутация.....	51
Таблица 22. Сравнение на фенотипните характеристики при пациент 7 и пациенти с доказана микроделеция 17q21.31	58
Таблица 23. Сравнение между фенотипа на пациент 8 и фенотипа при 7q11.23 микродупликационен синдром	61

СПИСЪК СЪС СЪКРАЩЕНИЯ

АК	аминокисеселини
АКТХ	аденокортикотропен 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
МТД	множествен тропен дефицит
НПР	нервно-психическо развитие
НХ	неврохипофиза
ПР	прицелен ръст
ПРЛ	пролактин
РХ	растежен хормон
СОД	септо-оптична дисплазия
СРР	среднородителски ръст
ТСХ	тиреостимулиращ хормон
ТФ	транскрипционен фактор
ХХ	хипогонадотропен хипогонадизъм
ЦНС	Централна нервна система
ЯМР	ядрено-магнитен резонанс
АСТН	Adrenocorticotropic hormone
АМН	Anti-Mullerian Hormone
Atbf1	Zinc finger homeobox protein 3
α -GSU	α -гликопротеиновата субединица
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FSH	Follicle-Stimulating Hormone
HESX1	Homeobox Gene Expressed in ES Cells
HMG	High Mobiliy Group
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
GH	Growth Hormone
GSU	G _s alpha subunit
MPH	Midparental height
POU1F1 (POU1F1)	Pituitary-Specific Transcription Factor 1
PRL	Prolactin
PROK1	Prokineticin 1
PROP1	Prophet of POU1F1
Rbp-J	Recombining binding protein suppressor of hairless
SDS	Standard Deviation Score / индекс на стандартно отклонение
SOX2	SRY (sex determining region Y)-box 2
SOX3	SRY (sex determining region Y)-box 3
Shh	Sonic Hedgehog
TGF- β	Transforming Growth Factor- β
Tbx2	T-box transcription factor 2
TLE1	Transducin-like enhancer protein 1
TRH	Thyrotropin-releasing hormone
TSH	Thyroid-Stimulating Hormone

ВЪВЕДЕНИЕ

Хипосоматотропизмът е хетерогенен синдром, който може да включва изолиран дефицит на растежен хормон (ИДРХ) или да бъде в съчетание с дефицит/липса на един или повече хипофизарни хормона (множествен тропен дефицит (МТД)). Спада към редките болести, с честота от 1:4000 до 1:18000 живородени деца. Фокусът на дисертацията са вродените форми на хипопитуитаризъм.

МТД започва да се изяснява етиологично по-късно в сравнение с изолирания ДРХ, успоредно с проучването и разкриването на ролята на хипофизарните транскрипционни фактори (ТФ) в ембриогенезата на хипофизата. Детерминацията, пролиферацията и крайната диференциация на специфичните хипофизарни клетъчни линии се контролира от сложна каскада от сигнални молекули и ТФ, които се експресират в строго определен времеви и пространствен порядък. 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. Първата мутация в *PROP1* при човек е открита от Wu и сътрудници през 1998 год. Поради пошироката си експресия, мутации в гени, кодиращи ранни ТФ (напр. *HESX1*, *SOX2/3*, *Lhx3/4* и др.), предизвикват комплексен фенотип с хипоплазия на аденохипофизата, ектопична неврохипофиза, прекъснат инфундибулум, засягане на зрителните нерви, оптичната хиазма, corpus callosum, septum pellucidum. Екстрапитуитарните промени включват вродена цепка на устната и небцето, аномалии на сърдечно-съдовата, дихателната, храносмилателната, уро-гениталната системи.

В България основно по проблема на децата с вродени форми на хипосоматотропизъм е работено от 1984 година, когато в своята докторска дисертация Л. Пенева установява значително превалиране на МТД над ИДРХ. Етиологичните проучвания върху пациенти с МТД стартират с фенотипната им характеристика през 1999 год. и молекулярно-генетичен анализ (МГА) на *PROP1* гена през 2001 год.

С навлизането на усъвършенствани и по-достъпни методи за МГА именно пациентите като естествени модели дават възможност да се разкрие патогенезата на "заболяването" и да се прогнозира еволюцията. Етиологичните проучвания са в основата на персонализирания подход при тези пациенти. Съвременните проучвания насочват към разлики в популациите по отношение честотата на участието на различните

транскрипционни фактори. В България липсват проучвания, които да изследват с панел от транскрипционни фактори пациентите с вроден множествен тропен дефицит. Всичко това ни даде основание да пристъпим към настоящия дисертационен труд.

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 *PROP1* мутация.

II. ЗАДАЧИ

1. Подбор на кандидати за молекулярно-генетичен анализ на *PROP1* 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 *PROP1* сред български пациенти с хипосоматотропизъм.
3. Анализирание на клиничния фенотип спрямо доказаната *PROP1* генотип.
4. Ревизия на използваната стратегия на провеждане на молекулярно-генетичен анализ на *PROP1* гена.
5. Въвеждане на молекулярно-генетичния анализ на *PROP1* 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: *POU1F1*, *HESX1*, *SOX2*, *SOX3*, *IGSF1* при пациенти без установена *PROP1* мутация.
7. Изследване на цялостния геном при пациенти с комплексен фенотип, включващ екстрапитуитарни аномалии.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ НА ИЗСЛЕДВАНЕ

I. ДИЗАЙН НА ПРОУЧВАНЕТО

Проучването се проведе в три основни етапа:

- Първи етап: Молекулярно-генетичен анализ на *PROP1* гена /в рамките на проект „Грант“ №57/2011, МУ-София/.
- Втори етап: Молекулярно-генетичен анализ на гените *POU1F1*, *HESX1*, *SOX3*, *SOX2*, *IGSF1*/„Грант“ №58/2012 МУ-София, проект „Млад изследовател“ №27-Д, МУ-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 /проект „Млад изследовател“ №41-Д, МУ-София/.

II. ПОДБОР НА КАНДИДАТИ. КРИТЕРИИ ЗА ВКЛЮЧВАНЕ И ИЗКЛЮЧВАНЕ ОТ ИЗСЛЕДВАНЕТО

1. Задължителен критерий за включване в проучването: хипосоматотропизъм

- Фенотипни белези на дефицит на растежен хормон (PX); ауксология (SDS на ръста ≤ -2 ; ръст, несъответно по-нисък от среднородителския; децелерация на растежната скорост); костна възраст (KB), изоставаща от календарната с повече от 1 година (интерпретация по атласа на Greulich и Pyle^(Greulich, 86)).
- Изследвания, насочени към изключване на не-ендокринни заболявания като причини за нисък ръст.
- Ендокринна диагностика: изключване на централен хипотиреоидизъм; базални нива на IGF1 и IGFBP3; функционални тестове за стимулиране секрецията на PX с фармакологични субстанции: глюкагон, инсулин, аргинин хидрохлорид, както и с физическо натоварване. За диагностициране на ДРХ са проведени най-малко два теста, най-често един фармакологичен тест с Insulin, Glucagon и/или Arginin HCL, и физическо натоварване¹.

¹ Теста с физическо натоварване се използва като скринингов тест за дефицит на PX.

2. Допълнителни критерии за включване в проучването

- Централен хипотиреоидизъм: клинични симптоми, ниски серумни нива на периферните тиреоидни хормони. Базалните нива на TSH могат да бъдат повишени, понижени или нормални, а стимулираният отговор към TRH 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: Клинични данни за липса на вторични полови белези в съответната за това възраст (11 години); ниски серумни нива на полови хормони (тестостерон/естрадиол) и ниски/недоловими нива на гонадотропни хормони. В проучването се измериха базални стойности на АМН и инхибин b при 44 от пациентите с хипосоматотропизъм в различна възраст и се оцени значението им като маркери за ХХ в предпубертетна възраст.
- Дефицит на АСТН: Клинични симптоми; ниските нива на кортизол в серум, понижена 24-часова кортизолова екскреция. При провеждане на тест с ИИХ, се изследва стимулираната секреция на кортизол.
- Патологична находка от ЯМР на хипоталамо-хипофизарна област: размер и структура на аденохипофизата, неврохипофизата, инфундибулума, очната хиазма, зрителните нерви, срединните мозъчни структури (septum pellucidum, corpus callosum, hippocampus и др).

3. Критерии за изключване от изследването

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

III. 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^{ти} братовчеди).

В проучването се включиха както пациенти в детска възраст, така и бивши пациенти на клиниката по Ендокринология, диабет и генетика в СБАЛДБ София, които вече се проследяват от специалисти ендокринолози. Разпределението по пол и възраст е представено в табл.1

Таблица 1. 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 над 18 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

В изследването бяха 13 пациенти с ИДРХ и 54 пациенти с МТД.

IV. МЕТОДИ

I. 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.

II. Определяне на базални серумни нива

- GH, TSH, FT4, T4, FT3, T3, FSH, LH, Estradiol, Testosterone (DELFIА®, PerkinElmer, Finland); IGF1(IGF-I – ELISA; Mediagnost, Germany; IGF1-ELISA, Diasource ImmunoAssays S.A.), IGFBP3 (IGFBP-3-ELISA, Diasource ImmunoAssays S.A.), AMH ELISA (AMH Gen II, Beckman Culter); Inhibin b ELISA (Inhibin B Gen II, Beckman Culter); Cortisol в серум ELISA (DIAsource Immuno assays SA, Belgium);
- В изследването за AMH и inhibin b бяха включени 22 момчета на средна възраст 12.2 години, медиана 12.2 години, от 0.08 до 25.6 години. Седем от пациентите са с вече доказан хипогонадотропен хипогонадизъм в рамките на МТД, като четирима от тях са на лечение с тестостеронов препарат. Четирима са с документиран крипторхизъм. При 12 от пациентите е доказан дефицит на ТСХ, а при 8 – дефицит на АКТХ. В анализа беше включена контролна група от 16

зdravi момчета на възраст от 9.48 до 28.0 години (средна 21.4 ± 4.7 , медиана 22.04).

III. Функционална ендокринна диагностика

Тестовите са проведени в различни звена, по различно време. Стимулационните тестове за растежен хормон са направени в комбинация по два теста (табл. 2). При деца под 1-годишна възраст серумните нива на РХ се изследват при спонтанна хипогликемия, без провеждане на стимулационен тест.

- Тестове за стимулиране секрецията на РХ

Таблица 2. Описание на използваните тестове за стимулация секрецията на РХ (базирана на Ranke, 2011).

Стимул	ИИХ	Arginin HCL	Glucagon	Физическо натоварване
Подготовка	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			
Механизъм на стимулация на секрецията на РХ	Чрез инхибиране на GHRH, както и потискане на α -адренергичните рецептори	Посредством α -адренергични рецептори и последващо освобождаване на GHRH	Посредством α -адренергични рецептори	Предполагат се адренергични механизми
Процедура	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)	0.03 mg/kg т.м., max 1 mg. i.m или s.c.	Форсирано изкачване на стълби за 10 мин
Пробовзимане	-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
Очакван пик в секрецията на РХ	Пик на РХ $\sim 60'$; най-ниското ниво на КЗ $\sim 30'$	$\sim 60'$ от началото на инфузията	$\sim 120'$ от поставянето на инжекцията	15-20 от началото на натоварването
Странични ефекти	Хипогликемия, хипокалиемия	Възможно е гадене при по-бърза от $30'$ инфузия	При мускулни инжекции може да се наблюдава гадене, повръщане, абдоминални болки	В зависимост от физическото състояние на детето; не се очакват
Забележка	За необходимата стимулация на РХ е необходимо поне 50% спадане на изходното ниво на КЗ			

- Тест за стимулация на TSH.

Секрецията 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. 2.

- GnRH стимуляционен тест

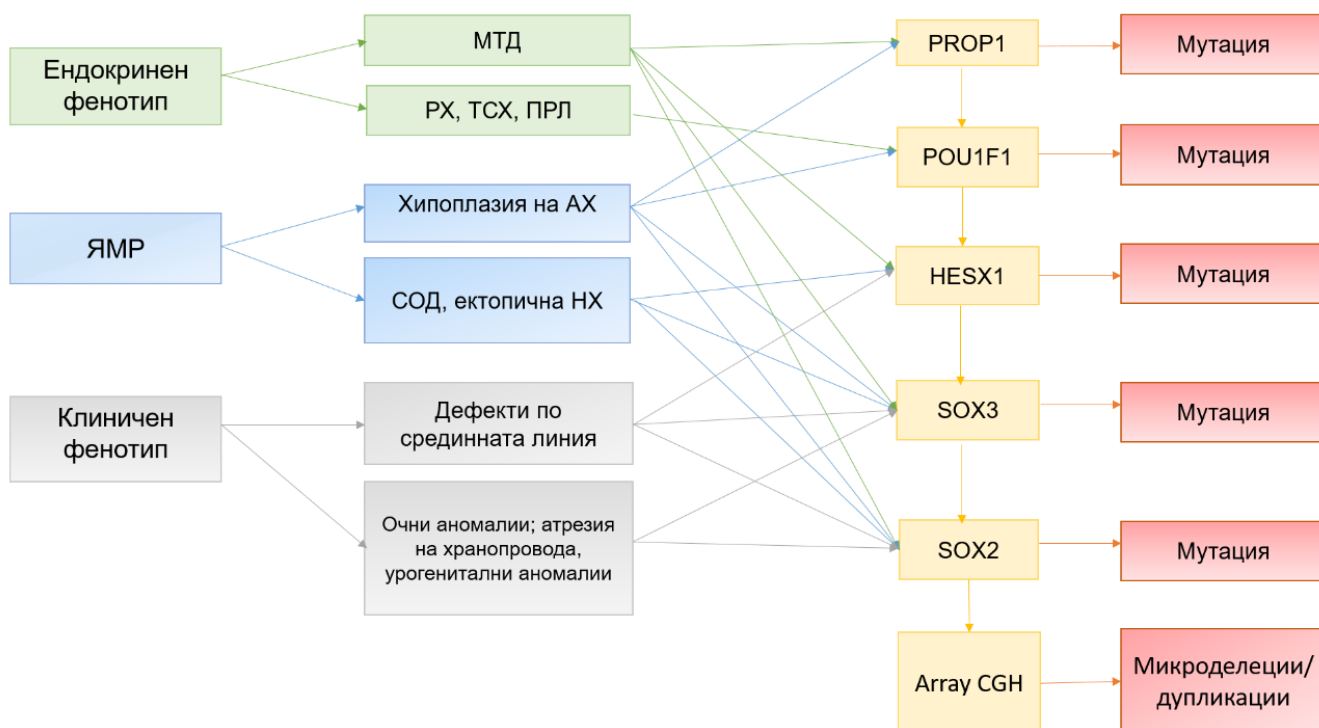
Секрецията на гонадотропини се стимулира от болусна инжекция на 100 µg на GnRH. Проби за измерване на гонадотропини се взимат на -15 и 0 минута (базални нива), последвани от 15, 30, 45, 60, 90 и 120 минута от началото на теста. Подготовката за теста вж табл. 2 (Ranke, 2011).

- Тест с Pregnyl. 3x500Е, за стимулация на тестостерон.

V. 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 (фиг. 1). При наличие на хипосоматотропизъм със 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 1. Алгоритъм за подбор на кандидати за изследване на определен ген. МТД – множествен тропен дефицит, СОД – септооптична дисплазия, АХ – аденохипофиза, НХ – неврохипофиза



4.1. 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 (Cat. No. 740951.250), според инструкциите на производителя. Концентрацията на добитата ДНК 40-80 ng/ml.

4.2. Мутационен скрининг за хипофизарни ТФ

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 и условията на реакцията са показани в табл. 3 и 4.

Таблица 3. Използвани праймери за амплификационна реакция на PROP1

	Праймери	Температура на анилинг	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		

Таблица 4. Условия за амплификационна реакция на PROP1:

	PROP1								
	Exon 2			Exon 1			Exon 3		
DNA, 50 ng	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		94 °	5 min		94 °	5 min	
Denaturation	94 °	40 sec	35 cycles	94 °	40 sec	35 cycles	94 °	40 sec	35 cycles
Annealing	60 °	30 sec		60 °	30 sec		60 °	30 sec	
Elongation	72 °	40 sec		72 °	40 sec		72 °	40 sec	
Final extinction	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. Микса се поставя на 37° за 10 часа. Резултатът се визуализира на UV светлина след елетрофореза на 4% агарозен гел.

- Условия на амплификационна реакция на POU1F1, HESX1, SOX3, SOX2

Таблица 5. Използвани праймери за амплификационна реакция на POU1F1

	Праймери	Температура на хибридизация	Източник
POU1F1			
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- AAGTTCCTTTTCCTGTTGCC		
Екзон 4	F4- AAAGTTGGAGCTGATGGTC	58 °	Miyata, 2006
	R4- CACAGCCTTCAGAGACAC		
Екзон 5	F5- TTTGTAATTATCTCTCTTTTCC	58 °	Miyata, 2006
	R5- TACACTCAAATGCTCATTCC		
Екзон 6	F6- AATTTACCCCCCTATGTCC	58 °	Miyata, 2006
	R6- GAAACGGGAGAAAAAGGCT		
HESX1			
Екзон 1	F1- AGCTGTTGCTCTGTGCAGACCACGAGA	63 °	Cruz, 2010
	R1- ACAAAGAATTGAAACAATTAAGCTGTGGCA		
Екзон 2	F2- TTGACCATCTAAGACAGGGC	63 °	Cruz, 2010
	R2- AAGTGAGTGGGCTTTTGCTC		
Екзон 3+4	F3- GAGCAAAAGCCCACTCACTT	63 °	Cruz, 2010
	R3- CCACTGATTCTTCATGCTCT		
SOX3			
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		
SOX2			
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 (табл. 6):

Таблица 6. Условия на амплификационна реакция на гените *POU1F1* и *HESX1*.

	POU1F1			HESX1		
DNA, 50 ng	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 ₂ 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 extinction	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. Генът на *SOX2*, по подобие на този на *SOX3*, се състои само от 1 екзон. Поради голямата му дължина, бе разделен на 3 участъка (табл. 7).

Таблица 7. Условия на провеждане на амплификационната реакция на гените *SOX2* и *SOX3* :

	SOX3									SOX2			
	Участък 1			Участък 2			Участък 3			Участък 1, 2, 3			
DNA, 50 ng	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			-			
	-			-			2.6			-			
dH ₂ O	5.75µl			5.25 µl			2.65 µl			5.75µl			
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		t °	35 sec		
Elongation	72 °	50 sec		72 °	50 sec		72 °	50 sec		72 °	50 sec		
Final extinction	72 °	10 min		72 °	10 min		72 °	10 min		72 °	10 min		

- Секвенционна реакция на всички екзони на изследваните гени

Извърши се 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 mkl, TE буфер 0.6 мл, 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, анилинг за 40'' на 62°C, елонгация за 30'' на 72°C и крайна елонгация за 5' на 72°C.

4.3. Сравнителна геномна хибридизация

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

Сравнителната геномна хибридизация бе 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 Kb (килобази). Белязането на ДНК пробите (референтна и на пациента) се извърши с кита SureTag Complete DNA Labeling Kit (Agilent), спазвайки неговия протокол. Пречистването на белязаните ДНК проби бе осъществено с MinElute PCR Purification Кит. С 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. С 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 бе извършено промиването на чипа от нехибридизиралите ДНК-и и останалите компоненти на хибридизационната смес.

4.4. 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.

РЕЗУЛТАТИ

I. ПОДБОР НА КАНДИДАТИ. КРИТЕРИИ ЗА ВКЛЮЧВАНЕ В ПРОУЧВАНЕТО.

След подбор по фенотип в изследването бяха включени 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 консангвинитет (родителите са 3^{ти} братовчеди). Средната възраст на пациентите е 14.46 години (децимали), медиана 12 години (от 0.08 до 39.6 години).

- Симптоми на ДРХ в неонаталния период:

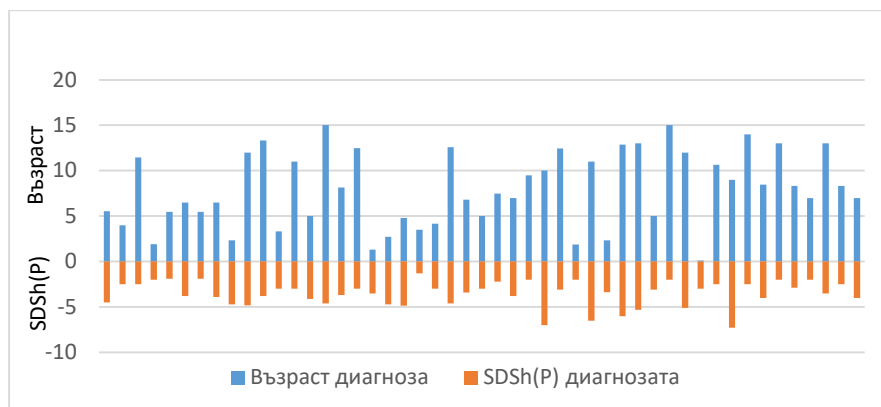
При 24 от изследваните пациенти е документирано нормално протекло раждане и неонатален период. При 25 от останалите пациенти се съобщава моносимптоматична изява, а при 18 – различна комбинация от изброените симптоми на ДРХ (табл. 8).

Таблица 8. Неонатални 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
Моносимптоматични	25
Множество симптоми	18

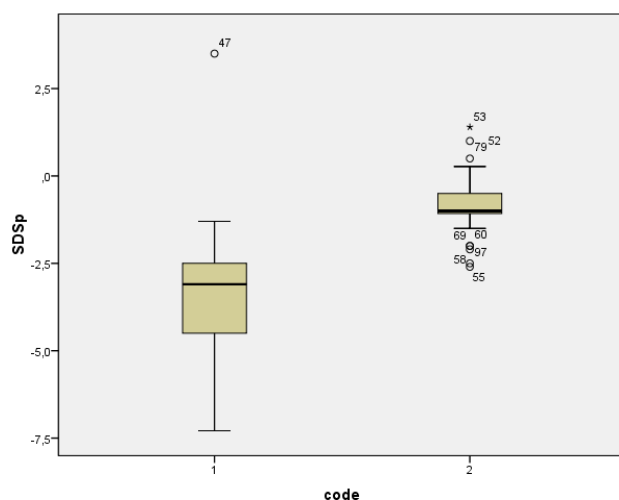
- Ауксология:
 - Основен критерий за поставяне на диагноза ДРХ в нашето проучване е SDS на ръста по Prader ($SDS_h(P) \leq -2$). Изключение от това правило се прави при бързо спадаща растежна скорост или отклонение на ръста с повече от -2 SDS спрямо среднородителския ръст. Поради това в изследването са включени и пет пациенти с $SDS_h(P)$ между -1.5 и -1.9 (фиг. 2).

Фигура 2. Съпоставка на възрастта на пациентите и SDS_h при поставяне на диагнозата



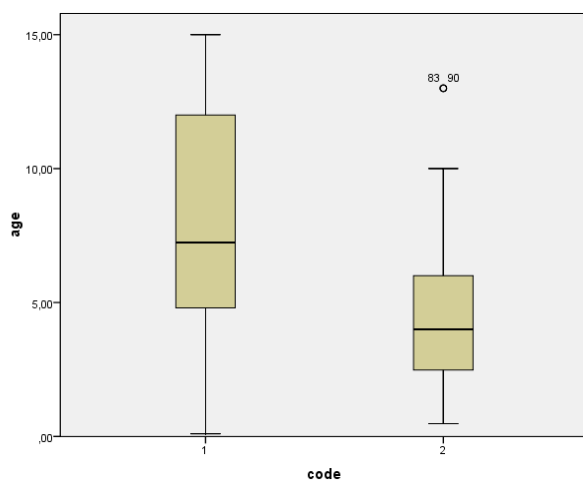
- Анализът на ръста на пациентите се прави според прицелната височина и среднородителския ръст, което определя и генетичния им потенциал. Ръстът на родителите на изследваните пациенти, изразен в SDS , е по-нисък от средния за популацията, без да излиза извън рамките на нормалния. Средният $SDS_h(P)$ на пациентите е значимо по-нисък от среднородителския ($x=-3.5$, vs -1 ; $p>0.0001$) (фиг. 3).

Фигура 3. Съпоставка на ръста на пациентите със среднородителския ръст, изразени в $SDSh(P)$. На графиката код 1 – $SDS_h(P)$ на пациентите; код 2 - среднородителски $SDS_h(P)$.



- Костна възраст, интерпретирана по метода на Greulich и Pyle. Костната възраст при поставяне на диагноза е значимо по-ниска от календарната ($x=7.8$, vs 4.8 , $p<0.001$) (фиг.4).

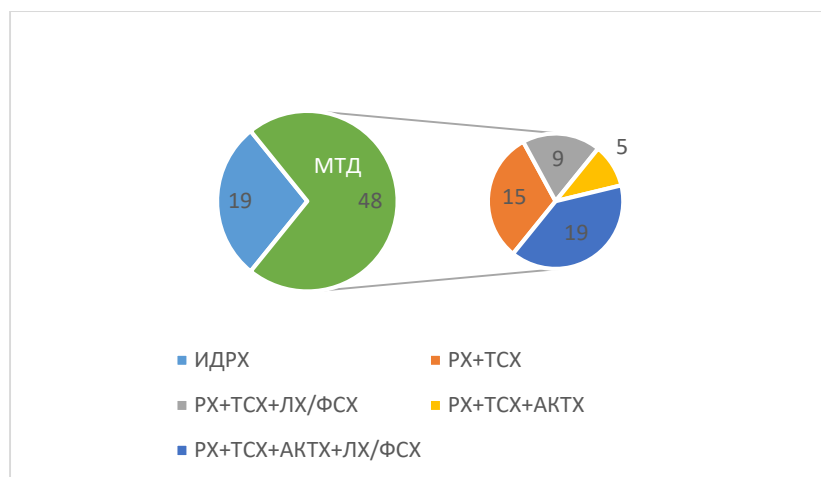
Фигура 4. Сравнение между хронологичната и костната възраст на пациентите при поставяне на диагнозата. На графиката код 1 – хронологична възраст; код 2 – костна възраст.



Допълнителни критерии за включване в проучването

От включените пациенти в изследването, 19 са с ИДРХ, а 48 са с МТД. Сред тях най-често срещан е панхипопитуитаризмът (n=19). При 15 пациенти се наблюдава комбинация от дефицит на РХ и TSH. Разпределението на хипофизарните дефицити при различните пациенти е представено на фиг. 5.

Фигура 5. Комбинация от дефицити на хипофизарни хормони в брой пациенти



АМН се изследва при 22 момчета на средна възраст 12.2 години , медиана 12.2 ± 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 Akglaede и резултати на изследваните пациенти. * Пациенти с доказан ХХ са маркирани с удебелени и наклонени букви.

Норми за възрастови и пубертетни стадии			Изследвани пациенти, групирани според пубертетния стадий			
n	Норма АМХ (pmol/l)	Възраст (min-max)	Възрастови/пубертетни периоди	Собствени пациенти		АМХ (pmol/l)
	Медиана (5-95 ^{ти} персентил)			Име	Год.	
82	148 (53-340)	0	Раждање	-	-	-
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	М.Н.С.	4.72	28.8↓↓
129	697 (321-1218)	6.1-8.9	G1a	К.К.Ц	6.16	208.6↓
				К.А.Ф.	7.16	152.5↓
204	585 (297-1113)	9.0-13.2	G1b	И.И.Б.	8.8	195.3↓
				Б.Н.К.	13	170.6↓
				К.И.К	10	5.3↓↓↓
				С.Б.М	14.4	195.9↓
				М.С.И.	9.48	206
83	235 (46-1120)	10.5-14.8	G2	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
				Р.С.Р (Т)	15	163.1
				Ж.М.М (Т)	16.48	206.1
				Х.Г.Х (Т)	17	172.6
				М.М.Н.	12.48	51.4
27	66 (22-734)	11.1-14.4	G3	Р.Ц.Б.	15	151.4
				С.Х.К.	15.56	141.5
				С.Л.И. (Т)	19.24	188.4
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 АМН смятаме, че 11 пациенти са с данни за ХХ. Осем от тях са до 14.4 години, без признаци за отключен пубертет. Четирима от момчетата с доказан ХХ са с нормални нива на АМН, но са на лечение с тестостеронов препарат. При двама от пациентите нивата на АМН са под медианата, между 5-10 персентил.

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 на инхибин b за възрастови и пубертетни стадии, анализирани спрямо нормите на Andersson и сътр., 1997.

Норми за възрастови и пубертетни стадии		Възрастови/пубертетни периоди	Изследвани пациенти, групирани според пубертетния стадий		
n	Норма инхибин b (pg/ml)		Собствени пациенти		Инхибин b (pg/ml)
	Средна (5-95 ^{ти} перцентил)		Име	Год.	
72	459 (266-742)	Мини-пубертет	М.И.Г	0.08	99 ↓
116	78 (32-182)	Детство	М.Н.С.	4.72	9.5↓↓
156	78(35-182)	G1a	К.К.Ц	6.16	113.7
			К.А.Ф.	7.16	26.5 ↓↓
			К.И.К	10	9.2 ↓↓
			С.Б.М	14.4	33.2 ↓↓
204	78 (32-182)	G1b	И.И.Б.	8.8	114.9
			Б.Н.К.	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
			Р.С.Р.	15	13.9 ↓↓
			Ж.М.М	16.48	63.6
			Х.Г.Х.	17	15.8 ↓↓
27	163 (78-323)	G3	М.М.Н.	12.48	157.8
			Р.Ц.Б.	15	14.4↓↓
			С.Х.К.	15.56	16.3 ↓↓
			С.Л.И.	19.24	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 възрастови 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 възрастови 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 долнио-граничния диапазон за възрастовата норма (табл. 11)

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

Норми за възрастови и пубертетни стадии		Изследвани пациенти, групирани според пубертетния стадий			
Норма АМН (pmol/l) Средна (2.5-97.5 ^{та} персентил)	Възрастови/пубертетни периоди	Собствени пациенти		АМН (pmol/l)	интерпретация
		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 (табл. 12) 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 и 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 възрастови и пубертетни стадии		Изследвани пациенти, групирани според пубертетния стадий			
Норма AMX (pmol/l)	Възрастови/пубертетни периоди	Собствени пациенти		Inhibin b (pmol/l)	интерпретация
Средна (5-95 ^{ти} персентил)		Име	Год.		
	0-3 месеца	-	-	-	-
	4-6 месеца	-	-	-	-
22.0±3.4	6-12 месеца				
22.0±3.4	1-4 години	Х.И.Б.	1.32	38.7	Висок
		П.Л.В.	4.0	10.9	Нисък
23.2±2.7	4-8 години	М.И.А.	7.64	29.5	Висок
26.5 (20-100)	I	Г.С.П.	9.48	11.7	Нисък
		В.В.П.	10.88	12.4	Нисък
		Л.Ц.Я.	15.0	9.5	Нисък
		С.И.Й.	16.6	10.6	Нисък
51 (20-240)	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	-	-	-	-
94 (20-205)	IV	В.Д.Г.	14.88	13.5	Нисък
75 (20-177)	V	В.Г.Р.	13.16	28.1	Ниска норма
		М.М.Р.	16.8	11.8	Нисък
49 (20-385)	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

- Патологична находка от ЯМР на хипоталамо-хипофизарна област:

Образното изследване на хипоталамо-питуитарната област е от ключово значение за 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. 6). Нормална ЯМР находка на хипоталамо-хипофизарната област се обективизира само при двама пациенти.

Фигура 6. Находка от ЯМР на хипоталамо-хипофизарната област по брой пациенти

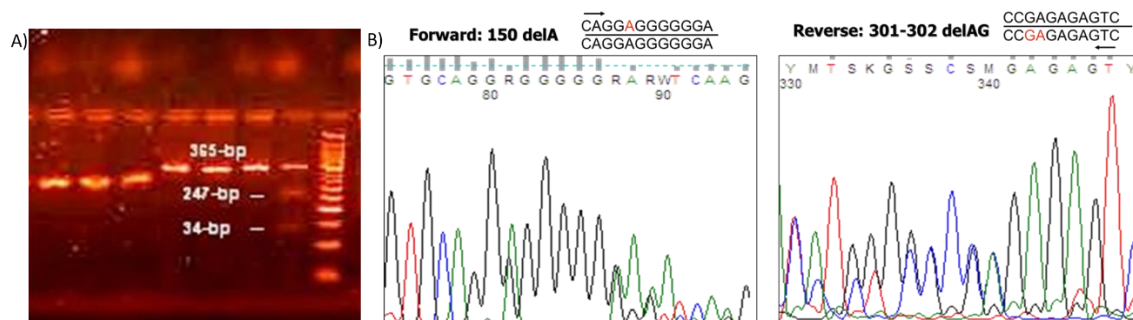


II. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕН АНАЛИЗ НА ГЕНА PROP1

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

BsgI рестриктазната реакция показва патологична електрофоретична подвижност, 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. 7A). За потвърждаване на резултата, както и за откриване на облигатната втора мутация (автосомно-рецесивен ход на заболяването), при пациента се приложи директно секвениране. Доказа се съчетана хетерозиготност на мутацията 301-302delAG/150delA (фиг. 7B).

Фигура 7. Резултат от молекулярно-генетичен анализ на пациент 1: А) BsgI 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.

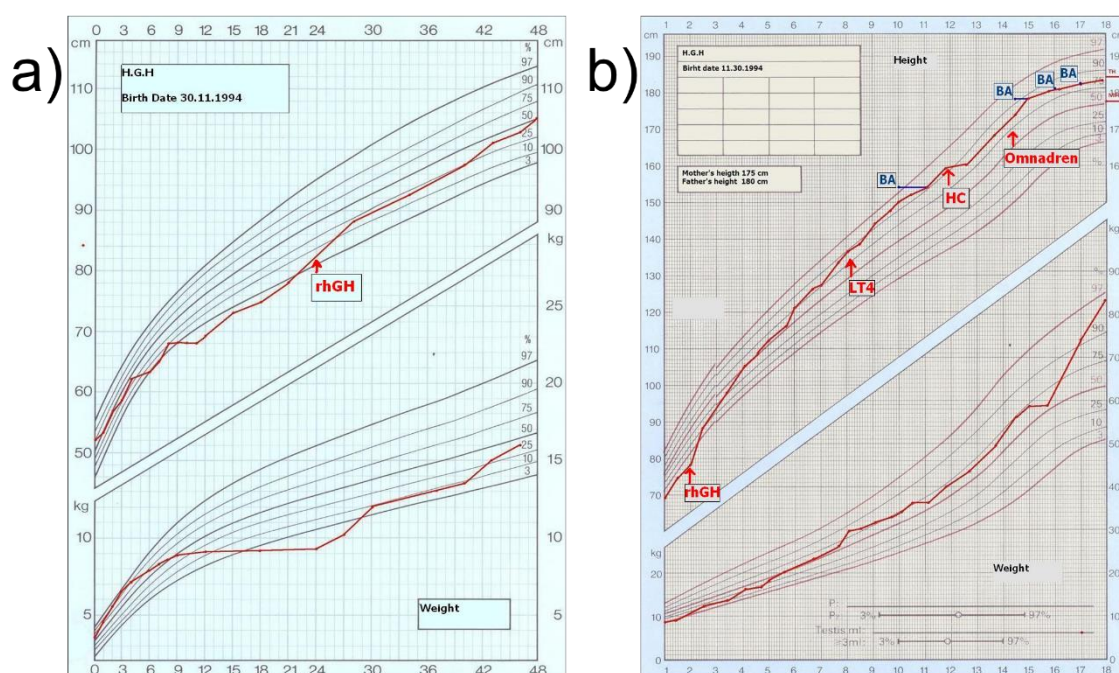
Генетичен материал от бащата на пациента не бе наличен поради отказ от изследване.

- **История на заболяването на пациент 1**

Момче, родено от първа, нормално протекла бременност и раждане, с тегло 3450 г. (50^{ти} персентил) и дължина 52 см (75^{ти} персентил). 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 KB с една година, съотношение KB/XB 0.4, тежък дефицит на PX (пик 3.2 ng/ml). Започната терапия с човешки рекомбинантен PX 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 8. Растежни криви на пациент 1: а) 0-4 години; б) 1-18 години

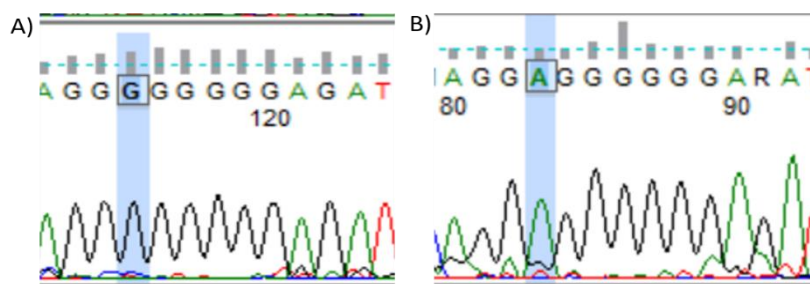


а. Втора стъпка: директно секвениране

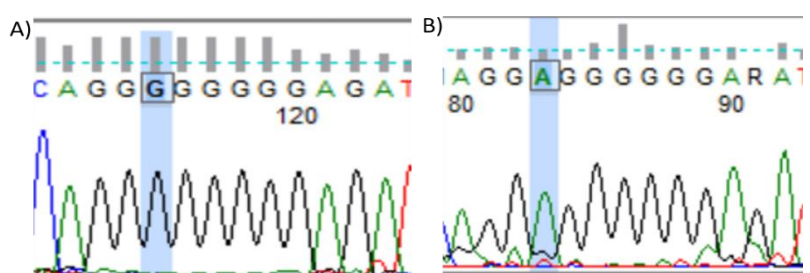
○ Екзон 2

Доказаха се **5 пациенти** с патогенни мутации в екзон 2 на *PROP1*, като един е със съчетана хетерозиготна мутация 301-302delAG/150delA, а останалите четирима са с хомозиготна мутация 150delA (табл. 8). При изследването на наличният генетичен материал от родители на пациенти с уточнен генотип, се намериха четирима хетерозиготни носители на мутацията 150delA (фиг. 8, 9). 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 9. А) Секвенционен анализ на пациент 2, показващ хомозиготна 150delA мутация и В) нормална секвенция



Фигура 10. 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 *PROP1* гена на всички изследвани пациенти не показва мутации в този участък. Откриха се три полиморфни варианти с висока алелна честота, представени в таблица 13.

- Екзон 3

Секвенционният анализ на екзон 3 на *PROP1* гена на всички изследвани пациенти не доказаха мутации в този участък. Откриха се шест полиморфни варианти, представени в таблица 13.

Таблица 13. Алелна честота на откритите мутации и полиморфизми в PROP1.

	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 полиморфни 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).

3. 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 лекуващите лекари. 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 стимулационен 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 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±1.25; медиана -0.73) и на бащите на пациентите (-1.20±1.29, медиана -1.14) са в рамките на приемания за нормален ръст (±1 SD).

- *Характеристики на неонаталния период*

Всички пациенти са родени в 39^{та} 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_{Prader}. Няма пациенти с епизоди на хипогликемия в неонаталния период. При един от пациентите е документирана пролонгирана жълтеница (табл. 14). Всички пациенти от мъжки пол са диагностицирани с крипторхизъм и микропенис от неонатална възраст (табл. 14).

Таблица 14. Клинична изява на МТД в неонаталния период при пациенти с доказан дефект в PROP1 гена

	Х.Г.Х.	С.Б.И.	Х.И.Д	Н.Х.Ч.	С.С.Г.
Пол	М	М	М	Ж	М
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	доносено
Дължина (SDS)	0.59	1.04	0.59	доносено	доносено
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 ± 4.2 години. Средната възраст на поставяне на диагнозата ДРХ е 7.7 ± 5.5 години, медиана 8 години, а средната възраст на започване на лечението с човешки рекомбинантен РХ е 9.4 ± 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 15. 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	-	-
Възраст диагноза	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	-	-3.4
Костна/календарна възраст	0.46	0.54	0.31	-	0.5

Най-често е съчетанието *хипосоматотропизъм с централен хипотиреоидизъм*. Средната възраст на диагностицирането му е 10.6 ± 3.7 години, медиана 8.2 години. При четири от петте пациенти 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 хипогонадизъм се установява при петимата пациенти на средна възраст 14.9 ± 1.4 години, медиана 15.48 години. Изявата на дефицит на аденокортикотропен 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, ниски 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 16. 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 [*]	12.88	8	16	8
Гонадотропини	12.8	15.48	16.0	16	14.0
АСТН	11.88	-	28.0	-	-
PRL	-	-	28.0	16	8

Таблица 17. 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.	С.С.Г
Начало на изоставането в растежа	0.48	9	5		
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 18. 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.	С.С.Г.
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

4. Въвеждане на молекулярно-генетичния анализ на PROP1 в рутинния диагностичен алгоритъм при пациенти с вроден хипосоматотропизъм, със 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 на СБАЛДБ „Проф. Иван Митев“. Към такъв анализ могат да се насочват пациенти, които отговарят на горепосочените критерии от цялата страна, по **Наредба № 26 от 14 юни 2007 г. за предоставяне на акушерска помощ на здравно неосигурени жени и за извършване на изследвания извън обхвата на задължителното здравно осигуряване на деца и бременни жени** ([обн. ДВ, бр. 51 от 2007 г.](#)).

5. Оформяне на група пациенти за молекулярно-генетичен анализ на други кандидат-гени, кодиращи хипофизарни ТФ, при пациенти без установена PROP1 мутация

a. 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.

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. *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. 19).

Таблица 19. Честота на очните аномалии при изследваните пациенти

	Аномалия	Брой пациенти
Рефракционни аномалии	Миопия	3
	Хиперметропия	2
Размер на очната ябълка	Микрофталмия	2
Преден очен сегмент	Вродена катаракта	1
	Едностранны 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	Едностранны 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.

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.

5. *IGSF1*

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

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

1. Пациент 7: В.Д.Г.

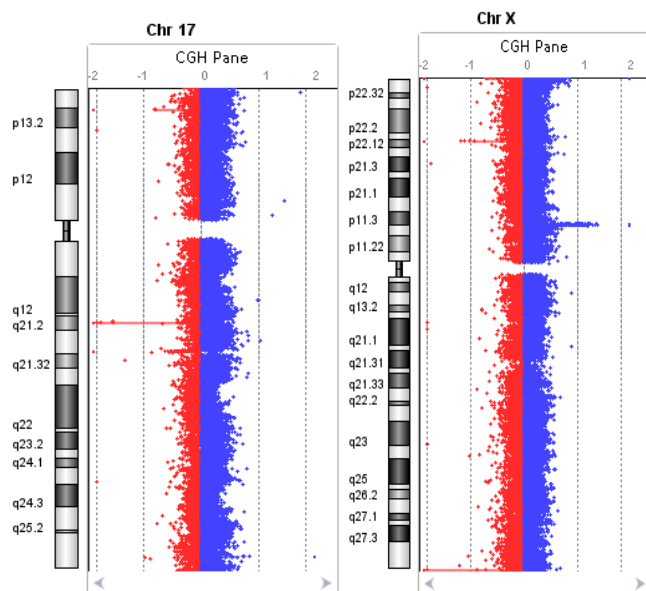
При молекулярно-генетичния анализ бяха открити различни аберации (делеции и дупликации) в 17 хромозомни участъка, които включват 59 гена. Анализът на хромозомните участъци и гените, намиращи се в тях, както и тяхната функция бе извършен чрез проверка в публични бази данни (Database of Genomic Variants, 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 *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 11. Патологичните хромозомни аберации наблюдавани при пациент 7: отляво – делеция в 17q21.31; отдясно – дупликация в Xp11.3



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 аберантни 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). 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.

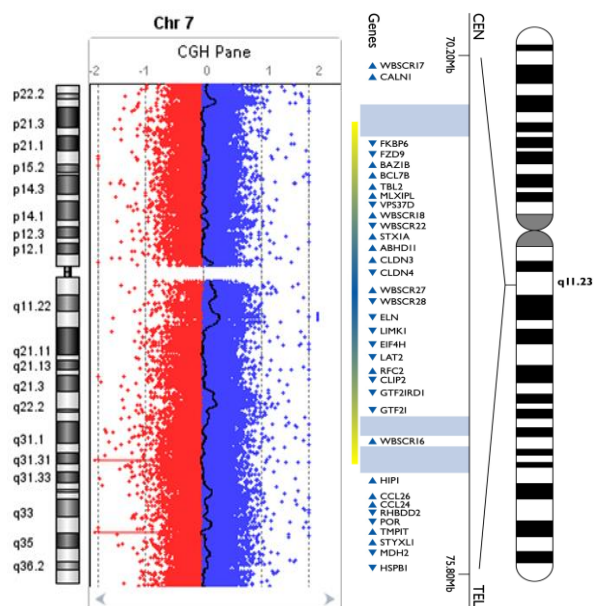
Третият патологичен участък е дупликация в хромозома *7:(q11.23q11.23)(72366111-75663082)х3 [hg19]*. Размера на дупликацията е 3.297 Mb и включва 62 гена. От тях 13 са псевдогени, останалите 49 са гени с известна функция.

В литературата съществува описан автозомно доминантен синдром – ***7q11.23 микродупликационен синдром***, който включва дупликация на 30 гена. В този локус попада аберантният участък на изследвания пациент, като се установи, че 26 гени от известните 30 съвпадат (87% припокриване (табл. 20)). При нашия пациент, обаче, размерът на аберантният участък е по-голям и в него попадат допълнителни 22 гена, с различна функция (табл.20).

Таблица 20. Гени включени в 7q23.11 микродупликацията при пациент 8

Цито-лента	Гени, влизащи в 7q11.23 микродупликационен синдром		Допълнителни гени, дублицирани при пациент 8	
	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
	G TF2I	general transcription factor Iii	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		

Фигура 12. Патологичните хромозомни аберации наблюдавани при пациент 8: 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.

ОБСЪЖДАНЕ

I. Подбор на кандидати за молекулярно-генетичен анализ на PROP1

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

- Единствен задължителен критерий бе ДРХ, поради възможността за по-нататъшно развитие на допълнителни хипофизарни дефицити (Pfeaffle, 2011).
- Наличието на структурна аномалия на аденохипофизата не бе задължителен критерий. Описани са пациенти, с първоначално хиперпластична аденохипофиза, която инволюира с времето (Voutetakis, 2004, Riepe, 2001).

След подбор по фенотип от общата група от 67 пациенти, 56 пациенти бяха изследвани за мутации в *PROP1* гена. Двама от пациентите са родственици от първа степен (брат и сестра). При едно от семействата има консангвинитет (родителите са 3^{ти} братовчеди).

II. Установяване на общата честота на мутациите в гена, кодиращ PROP1, както и най-честата мутация при български пациенти с хипосоматотропизъм.

В настоящото проучване се откриха две мутации в *PROP1* гена при 5 пациента: 301-302delAG и 150delA. Изчислената **алелна честота на PROP1 мутации сред български пациенти с хипосоматотропизъм е 8.9%**. Съобщаваната честотата на *PROP1* мутации е 11-22% в различните проучвания (Viera, 2007; Raynoud, 2006; Lemos, 2006; Rainbow 2005; Crus 2010), а при фамилените форми на МТД достига до 30-50% (Cogan, 1998; Deladoey, 98; Fofanova, 98; Torton, 2005). В настоящето изследване фенотипът на пациентите е разширен, което води до понижаване на алелната честота. Също така, в цялата кохорта има само един случай на фамилен форма на МТД. Това обуславя сравнително ниската честота.

Първата доказана *PROP1* мутация в настоящето проучване е 301-302delAG в екзон 2. Доказа се само в хетерозиготно състояние при един от изследваните пациенти, първо чрез Vsg1 рестриктазна реакция. Мутацията бе потвърдена чрез директно секвениране и се намери облигатната втора мутация 150delA. **Изчислената алелна честота на мутацията 301-302delAG сред изследваната пациентска група 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 год. 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 фамилните случаи на мутация в *PROP1* гена (Deladoey, 1999). Доказано е, че тя е резултат от т. нар. ефект на основателя и се среща в страните от Западна и Централна Евтропа, както и в Южна Америка (Dusatkova, 2015). Делецията на две нуклеотидни бази от кодон 101 предизвиква изместване на рамката на четене и появата на стоп-кодон (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 150delA, в хомозиготно състояние при четирима пациенти и в хетерозиготно при един, с алелната честота 8%. Това е най-често срещаната *PROP1* 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 с липсващ ДНК-свързващ хомеодомейн и карбокси-терминалния участък, без 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). Тя също е резултат от ефект на основателя (Dusatkova, 2015). 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 PX, TSH и АСТН и последващо отпадане на LH и FSH и хипоплазия на аденохипофиза (Riepe, 2001).

В изследваната група пациенти бе доказана висока честота на полиморфизми в екзон 1 и 3 на *PROP1* гена. Този резултат съответства на други проучвания, при които не се доказва *PROP1* мутация, но се открива висока честота на полиморфизми (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.

III. Анализ на корелациите генотип-фенотип при пациенти с доказана *PROP1* мутация

1. Неонатални прояви

В нашето изследване, установените средно тегло при раждане на пациентите с доказана *PROP1* мутация (3450 гр.), и SDS на дължината при раждане (0.8) съответстват на

средните норми за популацията (Станимирова, 2007). Пренаталната фаза на растеж се влияе предимно от инсулин и IGF1 (Brook, 2005). Въпреки това, анализ, направен от Lebl и колеги показва, че теглото и дължината при раждането на пациентите с *PROP1* мутация съответстват на средните норми за популацията, но все пак се наблюдава дискретно несъответствие – относително високо тегло спрямо ръста (Lebl, 2005).

Клиничната изява на заболяването още в неонаталния период може да бъде моносимптомна или комбинация от множество симптоми (Brook's, 5th edition, Ranke, 2013). Всички наши пациенти са родени по нормален механизъм, в 39 г.с., с главично предлежание. Крипторхизъм и микропенис при раждането са документирани при всички момчета. Допълнителна патология се наблюдава само при пациента със съчетана хетерозиготност: травматично раждане, интензивна неонатална жълтеница. Според Lebl и сътрудници честотата на проблеми в неонаталния период е по ниска: крипторхизъм и микропенис при 20% от пациентите, а хипогликемични епизоди само при 5% от пациентите. Възможно е разликите да се обусловени от сравнително малкия брой открити от нас пациенти.

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 е по-нисък от средния за популацията, без да излиза извън рамките на нормалния. Само двама от пациентите с доказана *PROP1* мутация са брат и сестра и фамилна форма на МТД, но не съобщават за други роднини с изоставане в растежа.

3. Ендокринен фенотип

3.1. Дефицит на растежен хормон

Начало на изоставането в растежа. Обикновено изоставането в растежа се забелязва от родителите около 3-4 годишна възраст (Brook's Pediatric Endocrinology). При пациентите с хомозиготна мутация 150delA това изоставане е забелязано между 5 и 9 години. За разлика от тях, обаче, при пациента с мутация 301-302delAG/150delA това изоставане се забелязва 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 донякъде се различава при пациентите с различни мутации. Изразен в SDS, средният ръст на пациентите с хомозиготна 150delA мутация, отчетен при поставяне на диагнозата е -3.1. За разлика от тях, при този със съчетана хетерозиготност се измерва SDS -1.9. Тази разлика в степента на изоставане в растежа най-вероятно се дължи на значително по-ранната възраст на поставяне на диагнозата при пациента със съчетана хетерозиготност, както и на по-краткия период от началото на изоставането, забелязано от родителите до първото посещение при детски ендокринолог и поставяне на диагнозата: средно 3.5 години за пациентите с хомозиготна 150delA мутация и 1.5 година за пациента с 301-302delAG мутация.

3.2.TSH

Най-често дефицитът на PX се съпътства от дефицит на тиреостимулиращ хормон. При открития в настоящето проучване пациент 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). При около 88% от описаните в световната литература пациенти с хомозиготна мутация 301-302delAG/301-302delAG, или със съчетана хетерозиготност 301-302delAG/150delA, се диагностицира едновременно дефицит на PX и TSH (Riepe, 2001, Lebl, 2005, Obretenova, 2011; Wu, 98; Cogan, 99; Mendoca, 99; Lee, 2004; Pernessatti, 2000; Viera, 2007; Vallette-Kacik, 2004). За разлика от пациент 1, при пациентите с хомозиготна 150delA/150delA мутация времето на диагноза на хипосоматотропизъм и хипотиреоидизъм съвпада. Това корелира и с описаните в литературата случаи (Krzisnik, 91, Doknic, 2011). Причината за това може да е в сравнително по-късното начало и съответно диагноза на дефицита на растежен хормон сред пациентите хомозиготна 150delA/150delA мутация (средна възраст 11.2 ± 3.9 , медиана 10.4 години).

3.3.Гонадотропни

При голяма част пациентите с мутация в *PROP1* гена, които достигат пубертетна възраст се наблюдава липса на пубертетни белези. Има съобщения и за пациенти, които отключват пубертет спонтанно, но впоследствие той затихва (Fluck, 99). 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).

При доказаните в настоящото проучване пет пациенти с мутация в *PROP1* гена се открива хипогонадотропен хипогонадизъм. 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 *PROP1* гена.

Като част от настоящото проучване се проведе изследване на базални серумни нива 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 β , чиято основна функция е да инхибира развитието на Мюлеровите структури в мъжкия ембрион. Секрецията му започва през 7-8-та г.с., от незрели Сертолиевы клетки (СК), стимулира се от плацентарния hCG, впоследствие и от FSH, а се подтиква 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 от 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 (Grumbach, 2005). 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 дисфункция. 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 пубертетното развитие, серумната концентрация на АМН остава висока. При нелекувани пациенти с вроден ХХ, обаче, АМН е *повишен спрямо нормите за възрастта*, тъй като серумния тестостерон остава на предпубертетни нива и не оказва инхибиращото си влияние, но *понижен спрямо пубертетния стадий*, 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 глюкопротеин, състоящ се от α - и β -субединица. Секретира се от СК. Подобно на АМН, пикът на секрецията му се достига 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 възрастен 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 жизнени 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 на **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. (2010 г.) 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 г. 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. Това най-вероятно се дължи на отключена хипофизо-гонадна ос с повишаващи се нива на FSH. Това води до увеличаване на интратестикуларния тестостерон достатъчно, за да потисне секрецията на АМН, но не достатъчно за увеличаване на интратестикуларния 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 и при един пациент с МТД в пубертетна възраст (Н.Я.М на 16.48 години), достигнал пубертетен стадий G5, при 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 със затихнала тестикуларна хормонална продукция впоследствие.

- 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 струмно, 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, пациентките с поликистозни яйчници. Напоследък се използва все повече при оцелели от рак момичета също като индикатор за яйчниковия резерв. По време на менопаузата се наблюдава постепенно спадане на серумната концентрация ^(Hagen, 2010, Владимиров, 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 без вторични полови белези, навършила 16 години.

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-^{ти} 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 гонадотропини.

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 при пациентките в пубертетна възраст на лечение с рекомбинантен растежен хормон да се съпоставят хормоналния профил /базална и стимулирана секреция/ и данните от УЗ на яйчниците в динамика.

3.4. 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, поради което според някои автори *Prop1* няма роля в детерминацията на тези клетъчни линии (Sarson, 96). Въпреки това, при част от пациентите с мутация в *PROP1* 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 на частичен или тежък АСТН дефицит още през първа и втора декада на живота (Agraval, 2000; Torton, 2000).

В настоящето проучване, от четири пациенти 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. Макар и значително по-рядко, ранното начало на дефицит на АСТН не е изключение. Около 20% от пациентите с доказана 301-302delAG в хетеро- или хомозиготно състояние развиват АСТН дефицит през първата или в началото на втората декада от живота (Agraval, 2000; Torton, 2000).

3.5.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. 21. При нито един от пациентите не се доказва засягане на инфундибулума, задния дял на хипофизата или други мозъчни структури. Това наблюдение съответства на публикуваните случаи в световната литература.

Таблица 21. Съпоставка на находката от ЯМР при пациенти с *PROP1* мутация

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

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 екипа на И. Стоева (Stoeva, 2003), 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 е била три-стъпална: 1. Bcg1 рестриктазна реакция като скрининг за мутационния hot spot 301-302 delAG; 2. SSCP и 3. директно секвениране на гена (Stoeva, 2010). 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. 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, 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**. При пациент 1 вторият хипофизарен дефицит се е изявил 8 години след първия.
- Структурна аномалия на хипофизата не е задължителен критерии. При пациент 2 се доказва нормална находка от ЯМР на хипоталамо-хипофизарна област.
- Мутационният скрининг се извършва в две стъпки: Bcg1 рестриктазна реакция и 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, със 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 СБАЛДБ „Проф. Иван Митев”. 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 със или без съпътстващ дефицит, в съчетание с хипоплазия на аденохипофизата, първият кандидат-ген е *PROP1*. Ако не се установи мутация, следващия 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. 1). *POU1F1* ($n=49$)

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. Съобщаваната честота на *POU1F1* мутации е до 11.3%, като честотата на мутацията се увеличава при фамилни форми. Vas и колеги (2015 г.) 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.

SOX3 ($n=23$)

В кохортата от пациенти, включени в изследването, се наблюдава преобладаване на мъжкия пол. Поради това X-свързаният хипопитуитаризъм е взет под внимание и *SOX3* е 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. Класическият фенотип, свързан с мутации в този ТФ, включва X-свързано умствено изоставане, съчетано с дефицит на *PX*. 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 *PX*, 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 (n=22)

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 (n=16)

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. 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 със СОД в големи изследвани серии 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.

IGSF1

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

Поради наличието на дефицит на *PX* и *TSH*, нисък пролактин, както и хипоплазия на хипофизата, той бе насочен за анализ на *PROP1* и *POU1F1*, но мутации не бяха открити. За откриването на следващия кандидат-ген, направихме обстоен анализ на фенотипа на пациента. Открихме няколко особености:

- При многократното изследване на секреция на РХ се наблюдава различен отговор на ендогенни стимули (нощен ритъм с пик на РХ 48.1 mIU/l) и фармакологични стимули (пик 7.8 mIU/l при тест с ИИХ).
- Флукутиращ централен хипотиреоидизъм.
- 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, пациента 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*.

При момчета с централен хипотиреоидизъм първи кандидат-ген трябва да е *IGSF1* гена (Stoeva, 2017).

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.

1. Пациент 7

Първата пациентка клинично изпълва основните критерии от триадата, характеризираща СОД: хипоплазия на очните нерви и макулата, агенезия на septum pellucidum и хидроцефалия, както и хипоплазия на аденохипофизата, причиняваща множествен тропен дефицит, включващ дефицит на РХ и TSH. Тази клинична картина насочи към молекулярно-генетичен анализ чрез секвениране на най-честите болестотворни 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 цялостния 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 2006 година, при изследване на огромни кохорти от пациенти с умствено изоставане, 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 НПР, 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 живи раждания (Koolen, 2008). До момента са известни поне 60 пациенти от мъжки и женски пол със 17q21.31 микроделеционен синдром (Koolen, 2012). В България има един описан случай на синдром на Koolen de Vries (Авджиева, 2014)

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 (Koolen, 2008). Първоначално критичният район на делецията е определен като загуба на 424 kb, включващи шест гена: *C17orf69*, *CRHR1*, *SPPL2C*, *MAPT*, *STH* and *KANSL1*. През 2012 година, независимо един от друг, Koolen и колеги и Zollino и колеги описват пациенти със синдром на Koolen de Vries точкови мутации в *KANSL1* гена, поради което вече е известно, че синдромът се дължи на аберация в един единствен ген и той е достатъчен да предизвика патологичния фенотип. 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, както и при възрастни, но експресията е особено висока в централната нервна система (Nagase, 1999). Делецията намерена при нашия пациент обхваща *KANSL1* гена, както и *LOC644246*, известен като псевдоген, поради което най-вероятно не допринася за описания фенотип.

Клинично при изследвания пациент се откриват част от характерните за 17q21.31 микроделеционен синдром 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 оттогава насам. При изследваната пациентка има известно изоставане в нервно-психическото развитие и 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. 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). 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.

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 и 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 22. 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%	+

Вторият потенциално аберентен участък *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 ефекта на гена е дозо-зависим. Известни са други гени в X хромозомата, мутации, в които причиняват умствено изоставане и различна степен на хипопитуитаризъм, като част от септо-оптична дисплазия. 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. Прямо

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.

2. 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*, пациента бе насочен за изследване на цялостния геном чрез агау 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 *Drosophilla* 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 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 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*]. Размера 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 дуплицирания 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 *1.5Mb* и включва между 25 и 30 гена, изброени на фиг. 11. По-често срещан е *7q11.23* микроделеционният синдром на Williams-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. 16). В този участък при пациента се намират още 22 гена с различна функция (табл. 16).

Фенотипните прояви на синдрома са вариабилни. Лицевият дисморфизъм включва коси и близко разположени вежди, дълбоко разположени очи, широка основа на носа, скъсено разстояние между носа и устата, широко изпъкнало чело, с възможна асиметрия на лицето и макроцефалия. Характерни за синдрома са и късно проговаряне, трудности с изговарянето и формулирането, намален слух, който с възрастта се подобрява, леко до средно умствено изоставане, изоставане в НПР, обикновено нормален ръст, но се съобщава за пациенти с изоставане в растежа както пре-, така и постнатално, крипторхизъм, вродена цепка на устната или небцето при 11% от пациентите, поведение

от аутистичния спектър, включващо липса на контакт с очите и социални връзки и повтарящи се интереси, характерни са изключителна срамежливост, своенравност и избухливост, 27% имат офталмологични проблеми, най-често рефракционни аномалии (хиперметропия и астигматизъм), страбизъм и синдром на Duane.

Таблица 23. 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 ННР	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%	-

Разлики във фенотипа могат да се обяснят с по-обширната дупликация, която включва 22 допълнителни гена с различни функции. Останалите патогенни аберации също биха могли да допринесат за клиничната изява.

В бъдеще ние 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 пациенти с комплексен фенотип.
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.

ИЗВОДИ И ПРИНОСИ 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 *PROP1* мутации в изследваната група български пациенти е 8.9%. Най-честата *PROP1* 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 *PROP1* 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 *PROP1* гена.
- 1.5. Мутационният скрининг за хипофизарни транскрипционни фактори трябва да започва с двустъпален анализ на *PROP1* 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 *IGSF* гена.
- 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 *PROP1* значението му като етиологичен фактор.
- 2.2. Установи се общата честота на мутации в гена *PROP1*, както и най-често срещаната сред български пациенти е 150delA.
- 2.3. Описа се първият пациент с мутация в гена *IGSF1* в България. Фенотипа 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 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 (*PROP1*, *POU1F1*, *HESX1*, *SOX2*, *SOX3*) се въведе в рутинната диагностика на пациенти с хипосоматотропизъм.
- 3.2. Подборът на пациенти се прави по разширен фенотип, като 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 *PROP1/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 хипофизарни ТФ. При отрицателен резултат се предлага сравнителна геномна хибридизация и/или секвениране от ново поколение.

СПИСЪК С ПУБЛИКАЦИИТЕ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Ива Стоева, **Ани Аройо**, *Множествен тропен дефицит и транскрипционния фактор пропфет на PIT-I (PROP1)*, Ендокринология, 17, 2012, 4, 219-233
2. **Ани Аройо**, Ива Стоева, *Синдроми свързани с мутации в SOX2: клинична картина и възможности за диагноза*, Педиатрия, 52, 2012, suppl 1, 50-54
3. **Ани Аройо**, Ива Стоева, Даниела Дачева, Даниела Авджиева, Радка Кънева, *Хипопитуитаризъм асоцииран с вродени аномалии: фенотипно описание на двама пациенти и техните резултати от мутационния скрининг на хипофизарни транскрипционни фактори*. Педиатрия, 55, 2015, 2, 26-31
4. Iva Stoeva, **Ani Aroyo**, Radoslava Emilova, Shina Pashova, Zdravka Abadshieva, Georgi Kirilov. Serum IGF1 levels measured by different ELISA assays and IRMA: a comparability study. Scripta Scientifica Medica, vol. 47, No 1, 2015, 39-46
5. **Ani Aroyo**, Iva Stoeva, Gergana Stancheva, Daniela Pencheva, Alek Oscar, Radka Kaneva. *A case of a boy with SOD and 7q11.23 microduplication syndrome*. IJPSI, 2017, 6 (9), 30-36

СПИСЪК С УЧАСТИЯ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. **Ani Aroyo**, Iva Stoeva, Shina Pashova, Sylvia Andonova, Alexei Savov, *Congenital sporadic panhypopituitarism and pituitary hypoplasia in a prepubertal boy, without PROP1-mutation*, Horm Res, 2012, 78, suppl 1, 307;
2. **Ani Aroyo**, Iva Stoeva, Daniela Dacheva, Atanaska Mitkova, Rada Kuneva, Shina Pashova, Vanio Mitev, *Screening for POU1F1 mutations among Bulgarian patients with congenital hyposomatotropism*, Horm Res, 2013, suppl 1, 317-318;
3. Iva Stoeva, **Ani Aroyo**, Silvia Andonova, *PROP1 mutations among Bulgarian patients with combined pituitary hormone deficiency. Genotype-Phenotype correlations*, II-nd Postgraduate Course “Contemporary Diabetes”, Varna, April 25-27, 2013
4. **Ани Аройо**, Ива Стоева, Ганка Динева, *Антимюлеров хормон: значение за диагнозата на хипогонадотропния хипогонадизъм у момчета – първи резултати*. IV Национална конференция за редки болести и лекарства сираци, Пловдив, 13-14 септември 2013
5. **Ani Aroyo**, Iva Stoeva, Daniela Dacheva, Atanaska Mitkova, Rada Kaneva, Vanio Mitev, *Screening for SOX2 and SOX3 mutations in Bulgarian patients with congenital hyposomatotropism: first results*. 16th Congress of the European Neuro Endocrine Association, 10-13th September 2014 Sofia, p 63-64.

СПИСЪК С НАУЧНИ ПРОЕКТИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Проект „Грант“ №57/2011, *“Мутационен скрининг за PROP1 при български пациенти с хипосоматотропизъм”*. Водещ изследовател: проф. Ива Стоева, дм, съизследовател: д-р Ани Аройо.
2. Проект „Млад изследовател“ № 27-Д, *„Въвеждане мутационен анализ на SOX2 при български пациенти с хипосоматотропизъм и/или очни аномалии“*. Водещ изследовател: д-р Ани Аройо.
3. Проект „Грант“ № 58/2012, *“Въвеждане на мутационен скрининг за транскрипционните фактори POUF-1 (PIT-1), HESX1, SOX3 при пациенти с вроден хипосоматотропизъм : пилотен проект”*. Водещ изследовател: проф. Ива Стоева, дм, съизследовател: д-р Ани Аройо.
4. Проект „Млад изследовател“ № 41-Д, *„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.

БЛАГОДАРНОСТИ

- На научния ми ръководител проф. Ива Стоева;
- На доц. Елисавета Стефанова, д-р Красимира Казакова, д-р Михаела Димитрова-Младенова и целия екип на клиника по Ендокринология, СБАЛДБ, София;
- На проф. Георги Кирилов и д-р Ивайла Узунова, УСБАЛЕ;
- На Силвия Андонова, доц. Алексей Савов и целия екип на НГЛ;
- На доц. Радка Кънева, д-р Даниела Пенчева, Гергана Станчева и целия екип на ММЦ;
- На д-р Шина Пашова;
- На екипа от лаборанти в лаборатория „Скрининг и функционална ендокринна диагностика“;
- На д-р Алек Оскар и целия екип на клиника по детска офталмология на УМБАЛ „Александровска“.
- На Васил Хайкин и цялото ми семейство.