

Małgorzata Kałużna

Poszukiwanie nowych czynników genetycznych biorących udział  
w etiopatogenezie izolowanego hipogonadyzmu hipogonadotropowego  
przy użyciu zaawansowanych metod analizy genomu

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Promotor: prof. dr hab. Katarzyna Ziemnicka

Katedra i Klinika Endokrynologii, Przemiany Materii i Chorób Wewnętrznych  
Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Badania finansowane z grantu Preludium numer 2016/21/N/NZ5/00511  
pt. „Poszukiwanie nowych czynników genetycznych biorących udział  
w etiopatogenezie izolowanego hipogonadyzmu hipogonadotropowego  
przy użyciu zaawansowanych metod analizy genomu”

Poznań, 2018 r.

*Serdeczne podziękowania i wyrazy uznania  
za poświęcony czas i ogromną pomoc  
Promotorowi Profesor Katarzynie Ziemnickiej.*

*Podziękowania za zaangażowanie i merytoryczną pomoc  
dr n.biol. Bartłomiejowi Budnemu.*

*Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych dedykowana ukochanej rodzinie*

## SPIS TREŚCI

1.	Wstęp.....	1
1.1.	Definicja hipogonadyzmu hipogonadotropowego.....	1
1.2.	Przyczyny hipogonadyzmu hipogonadotropowego.....	1
1.3.	Opis osi podwzgórzowo-przysadkowo-gonadalnej.....	2
1.4.	Rozwój osi podwzgórzowo-przysadkowo-gonadalnej.....	3
1.5.	Epidemiologia izolowanego hipogonadyzmu hipogonadotropowego.....	7
1.6.	Podstawowe informacje o izolowanym hipogonadyzmie hipogonadotropowym .....	7
1.7.	Dziedziczenie izolowanego hipogonadyzmu hipogonadotropowego i geny leżące u podłoża IHH.....	10
2.	Cele pracy.....	20
3.	Materiał i Metodyka.....	21
3.1.	Opis grupy badanej i kontrolnej.....	21
3.2.	Badania hormonalne.....	26
3.3.	Badanie węchu.....	28
3.4.	Badania genetyczne.....	30
3.4.1.	Izolacja DNA.....	30
3.4.2.	Ogólne założenia badania.....	30
3.5.	Zgoda Komisji Bioetycznej. Finansowanie.....	38
4.	Wyniki badań.....	37
4.1.	Wyniki badań hormonalnych.....	37
4.2.	Wyniki badań obrazowych.....	44
4.3.	Wyniki badań genetycznych.....	48
4.4.	Korelacje genotypowo-fenotypowe.....	71
4.5.	Korelacje genotyp-przebieg choroby.....	72
5.	Omówienie wyników i dyskusja.....	81
5.1.	Znaczenie badań genetycznych w IHH.....	81
5.2.	Badania sekwencjonowania następnej generacji (NGS) w IHH dotychczas	82
5.3.	Odniesienie wyników własnych do piśmiennictwa.....	84
5.3.1.	Korelacje genotypowo-hormonalne.....	84
5.3.1.1.	Gonadotropiny.....	84
5.3.1.2.	Hormon wzrostu.....	84

5.3.1.3. Insulinooporność.....	85
5.3.2. Korelacje genotypowo-fenotypowe.....	85
a) Niedorozwój połowiczy twarzy.....	92
b) Otyłość.....	92
c) Ruchy lustrzane.....	92
d) Torbiel szyszynki .....	93
e) Niepełnosprawność intelektualna.....	93
f) Wady nerek.....	93
g) Węch.....	94
h) Wnętrostwo.....	95
5.3.3. Podsumowanie korelacji genotypowo-fenotypowych.....	98
5.4. Postaci odwracalne IHH.....	98
5.5. Izolowany hipogonadyzm hipogonadotropowy o późnym początku (ang. <i>adult-onset isolated hypogonadotropic hypogonadism</i> , aoIHH).....	100
5.6. Wielogenowe uwarunkowanie choroby i jej dziedziczenie.....	102
5.7. Udział genów biorących udział w rozwoju podwzgórza - wspólne podłoże genetyczne z wielohormonalną niedoczynnością przysadki (CPHD).....	107
5.8. Dalsze perspektywy badawcze.....	107
5.9. Znaczenie wczesnych badań genetycznych i hormonalnych w wykrywaniu IHH.....	108
5.10. Podsumowanie.....	108
5.11. Propozycja schematu diagnostyki genetycznej w IHH.....	109
6. Wnioski.....	110
7. Streszczenie w języku polskim.....	112
8. Streszczenie w języku angielskim.....	115
9. Piśmiennictwo.....	118
10. Spis tabel.....	144
11. Spis rycin.....	145

## Wykaz stosowanych skrótów

<b>ACMG</b>	- Amerykańskie Kolegium Genetyki i Genomiki Medycznej (ang. <i>American College of Medical Genetics and Genomics</i> )
<b>ACTH</b>	- hormon kortykotropowy
<b>AD</b>	- dziedziczenie autosomalne dominujące
<b>ANOS1(KALI)</b>	- gen kodujący anosminę (ang. <i>Kallmann syndrome gene-1</i> )
<b>aoIHH</b>	- izolowany hipogonadyzm hipogonadotropowy o późnym początku (ang. <i>adult-onset isolated hypogonadotropic hypogonadism</i> )
<b>AR</b>	- dziedziczenie autosomalne recesywne
<b>bd</b>	- brak danych
<b>BMI</b>	- wskaźnik masy ciała (ang. <i>Body mass index</i> )
<b>CHARGE</b>	- zespół wad wrodzonych, skrót (akronim) pochodzący od pierwszych liter angielskich nazw kardynalnych cech zespołu: coloboma; wady serca (ang. <i>heart defects</i> ); atrezja nozdrzy tylnych (ang. <i>atresia of the nasal choanae</i> ); zahamowanie wzrostu i rozwoju psychoruchowego (ang. <i>retardation of growth and development</i> ); wady układu moczowo-płciowego (ang. <i>genitourinary defects</i> ); wady uszu i (lub) głuchota (ang. <i>ear abnormalities</i> )
<b>CHD7</b>	- helikaza 7 modelująca chromatynę (ang. <i>chromodomain helicase DNA-binding protein-7</i> )
<b>chrom.</b>	- chromosom
<b>CPHD</b>	- wielohormonalna niedoczynność przysadki (ang. <i>combined pituitary hormone deficiency</i> )
<b>del</b>	- delecja
<b>DHEA-S</b>	- siarczan dehydroepiandrosteronu
<b>DM</b>	- cukrzyca (ang. <i>diabetes mellitus</i> )
<b>DM II</b>	- cukrzyca typu 2
<b>dup</b>	- duplikacja
<b>ECLIA</b>	- elektrochemiluminescencja
<b>E2</b>	- estradiol
<b>ELISA</b>	- test immunoenzymatyczny (ang. <i>enzyme linked immunosorbent assay</i> )
<b>FGF8</b>	- czynnik 8 wzrostu fibroblastów (ang. <i>fibroblast growth factor-8</i> )
<b>FGFR1</b>	- gen receptora typu I czynnika wzrostu fibroblastów (ang. <i>Fibroblast growth factor receptor-1 gene</i> )
<b>FSH</b>	- hormon folikulotropowy (ang. <i>follicle-stimulating hormone</i> )

<b>FraX</b>	- zespół łamliwego chromosomu X
<b>FTI</b>	- wskaźnik wolnego testosteronu (ang. <i>free testosterone index</i> )
<b>fT3</b>	- wolna trijodotyronina (ang. <i>free triiodothyronine</i> )
<b>fT4</b>	- wolna tyroksyna (ang. <i>free tyroxine</i> )
<b>GH</b>	- hormon wzrostu (ang. <i>growth hormone</i> )
<b>GnRH</b>	- gonadoliberyna (ang. <i>gonadotropin-releasing hormone</i> ), inaczej hormon uwalniający hormon luteinizujący (ang. <i>luteinizing hormone-releasing hormone</i> , LHRH)
<b>GNRH1</b>	- gen kodujący gonadoliberynę (ang. <i>Gonadotropin-releasing hormone-1 gene</i> )
<b>GNRHR</b>	- gen receptora gonadoliberyny (ang. <i>Gonadotropin-releasing hormone receptor gene</i> )
<b>GPCR</b>	- rodopsynopodobne receptory sprzężone z białkiem G (ang. <i>G protein-coupled receptors</i> )
<b>hCG</b>	- ludzka gonadotropina kosmówkowa (ang. <i>human chorionic gonadotropin</i> )
<b>het</b>	- układ heterozygotyczny
<b>HGVS</b>	- Towarzystwo ds. nazewnictwa zmian w ludzkim genomie (ang. <i>Human Genome Variation Society</i> )
<b>HGMD</b>	- Baza Danych Mutacji Genetycznych Człowieka (ang. <i>Human Gene Mutation Database</i> )
<b>hom</b>	- układ homozygotyczny
<b>HOMA-IR</b>	- wskaźnik insulinooporności (ang. <i>insulin insulin resistance index</i> )
<b>HS6ST1</b>	- gen kodujący 6-O-sulfotransferazę siarczanu heparanu (HS6ST) (ang. <i>HS 6- O-sulfotransferase-1 gene</i> )
<b>HTZ</b>	- hormonalna terapia zastępcza
<b>ID</b>	- numer identyfikacyjny pacjenta
<b>IGF-1</b>	- insulinopodobny czynnik wzrostu 1 (ang. <i>insulin-like growth factor 1</i> )
<b>IHH</b>	- izolowany hipogonadyzm hipogonadotropowy (ang. <i>isolated hypogonadotropic hypogonadism</i> )
<b>IR</b>	- insulinooporność (ang. <i>insulin resistance</i> )
<b>JP</b>	- jądro prawe
<b>JL</b>	- jądro lewe
<b>K</b>	- kobieta
<b>KISS1</b>	- gen kodujący kisspeptynę 1 (ang. <i>Kisspeptin 1 gene</i> )

<b>KISS1R</b>	- gen kodujący receptor kisspeptyny 1 (ang. <i>KISS1 receptor gene</i> ), inaczej <i>GPR54</i>
<b>LEP</b>	- gen kodujący leptynę (ang. <i>Leptin gene</i> )
<b>LEPR</b>	- gen kodujący receptor leptyny (ang. <i>Leptin receptor gene</i> )
<b>LH</b>	- hormon luteinizujący
<b>LPV</b>	- prawdopodobnie patogenny wariant genu (ang. <i>likely pathogenic variant</i> )
<b>M</b>	- mężczyzna
<b>MAF</b>	- częstość rzadkiego allelu (ang. <i>minor allele frequency</i> )
<b>MRI</b>	- rezonans magnetyczny (ang. <i>magnetic resonance imaging</i> )
<b>nd</b>	- nie dotyczy
<b>NELF, inaczej NSMF</b>	- czynnik migracji neuronów i sygnalizacji synopotencjalowej receptora NMDA (ang. <i>Nasal embryonic LHRH factor</i> )
<b>NI</b>	- niepełnosprawność intelektualna
<b>NMD</b>	- procesów kontroli jakości RNA polegający na usuwaniu matrycowego RNA zawierającego przedwczesny kodon stop (ang. <i>Nonsense-Mediated Decay</i> )
<b>nIHH</b>	- normosomiczna postać izolowanego hipogonadyzmu hipogonadotropowego (ang. <i>normosmic hypogonadotropic hypogonadism</i> )
<b>nr</b>	- numer pacjenta
<b>NT</b>	- niedoczynność tarczycy
<b>OEC</b>	- węchowe komórki glejowe (ang. <i>olfactory ensheathing cell</i> )
<b>OL</b>	- oko lewe
<b>OMIM</b>	- wersja elektroniczna bazy Mendlowskie zaburzenia u człowieka (ang. <i>Online Mendelian Inheritance in Man</i> )
<b>OP</b>	- oko prawe
<b>OSN</b>	- czuciowe neurony węchowe (ang. <i>olfactory sensory neuron</i> )
<b>PBM</b>	- pierwotny brak miesiączki
<b>PCR</b>	- reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. <i>polymerase chain reaction</i> )
<b>PGG</b>	- oś podwzgórzowo-przysadkowo-gonadalna
<b>PNT</b>	- pierwotna niedoczynność tarczycy
<b>POZ</b>	- próg odczuwania zapachu
<b>PRL</b>	- prolaktyna
<b>PROK2</b>	- gen prokinetycyny 2 (ang. <i>Prokineticin-2 gene</i> )
<b>PROKR2</b>	- gen receptora prokinetycyny 2 (ang. <i>Prokineticin receptor-2 gene</i> )
<b>PV</b>	- patogenny wariant genu (ang. <i>pathogenic variant</i> )

<b>SBE</b>	- zmiana pojedynczego nukleotydu (ang. <i>single base exchange</i> )
<b>SEMA3A</b>	- gen kodujący sematoforynę 3A (ang. <i>Semaphorin 3A gene</i> )
<b>SHBG</b>	- globulina wiążąca hormony płciowe (ang. <i>sex hormone binding globulin</i> )
<b>SOX2</b>	- gen kodujący czynnik transkrypcyjny SOX2 (ang. <i>Sex-determining region of the Y chromosome-related high-mobility group box-2 gene</i> )
<b>T</b>	- testosteron
<b>TAC3</b>	- gen kodujący tachykininę 3 (ang. <i>Tachykinin-3 gene</i> )
<b>TACR3</b>	- gen kodujący receptor tachykininy 3 (ang. <i>Tachykinin receptor-3 gene</i> )
<b>TSH</b>	- hormon tyreotropowy (tyreotropina) (ang. <i>Thyroid stimulation hormone</i> )
<b>VUS</b>	- wariant o nieznanym znaczeniu (ang. <i>variant of unknown significance</i> )
<b>WDR11</b>	- gen kodujący białko powtarzalne WD 11 (ang. <i>WD repeat-containing protein-11 gene</i> )
<b>WGS</b>	- sekwencjonowanie całego genomu (ang. <i>whole-genome sequencing</i> )
<b>WNT</b>	- wrodzona niedoczynność tarczycy
<b>XL</b>	- dziedziczenie sprzężone z chromosomem X
<b>XR</b>	- dziedziczenie sprzężone z chromosomem X recesywne
<b>ZK</b>	- Zespół Kallmanna

## **1. Wstęp**

### **1.1. Definicja hipogonadyzmu hipogonadotropowego**

Hipogonadyzm hipogonadotropowy zwany inaczej hipogonadyzmem wtórnym to dysfunkcja gonad wynikająca z zaburzeń na poziomie podwzgórza lub przysadki (1-3). Stężenie gonadotropin w hipogonadyzmie hipogonadotropowym jest obniżone bądź prawidłowe, lecz nieproporcjonalnie niskie w odniesieniu do stężenia obwodowych hormonów płciowych - testosteronu u mężczyzn bądź estradiolu u kobiet (1-3). Hipogonadyzm hipogonadotropowy u mężczyzn wyraża się zaburzeniami produkcji testosteronu i/lub spermy, natomiast hipogonadyzm hipogonadotropowy u kobiet objawia się zaburzeniami miesiączkowania i owulacji. Hipogonadyzm hipogonadotropowy może być wrodzony lub nabyty, izolowany bądź towarzyszący innym niedoborom hormonów przysadkowych. Jeśli hipogonadyzm ma charakter wrodzony lub pojawia się w okresie przed pokwitaniem bądź w okresie okołopokwitaniowym to wiąże się z niekompletnym dojrzewaniem płciowym lub jego brakiem. Prowadzi to do zaburzenia rozwoju drugorzędowych cech płciowych (2, 3). Hipogonadyzmowi hipogonadotropowemu u mężczyzn często towarzyszy ginekomastia, wynikająca ze zwiększonej konwersji testosteronu do estradiolu przez aromatazę (normalnie hamowanej przez gonadotropiny) (3, 4). Nieleczony hipogonadyzm hipogonadotropowy wiąże się z zaburzeniami libido i niepłodnością (5, 6).

### **1.2. Przyczyny hipogonadyzmu hipogonadotropowego**

Hipogonadyzm hipogonadotropowy może być spowodowany supresją gonadotropin wywołaną hiperprolaktynemią czy też może stanowić konsekwencję stosowania leków takich jak: analogi gonadoliberyny, androgeny, estrogeny, progestageny, glikokortykosteroidy, opioidy. Jego przyczyną mogą też być: ciężkie ostre schorzenia (uraz, operacja, zawał serca, udar itp.) lub przewlekłe choroby (np. otyłość, przewlekła niewydolność nerek, serca; cukrzyca; bezdech senny). Do niedoboru gonadotropin prowadzą też zaburzenia czynnościowe podwzgórzowo-przysadkowe (wtórne do stresu, nadmiernej aktywności fizycznej czy niskiej masy ciała), infekcje ludzkim wirusem niedoboru odporności (HIV) czy anoreksja (7-16). Inną przyczyną hipogonadyzmu hipogonadotropowego może być zniszczenie komórek gonadotropowych przysadki spowodowane łagodnymi bądź złośliwymi guzami okolicy siodła tureckiego bądź podwzgórza, chorobami naciekowymi - sarkoidozą, histiocytozą czy hemochromatozą, zapaleniami opon mózgowych, nagłym udarem krwotocznym przysadki (apopleksją) czy urazem czaszkowo-mózgowym z uszkodzeniem

lejka przysadki a także zapalenie limfocytowe przysadki (17-23). Izolowany hipogonadyzm hipogonadotropowy (IHH) może mieć też charakter wrodzony, spowodowany defektami genetycznymi, które powodują zaburzenie produkcji i sekrecji gonadoliberyny i gonadotropin, o czym traktuje poniższa rozprawa doktorska (24).

### **1.3. Opis osi podwzgórzowo-przysadkowo-gonadalnej**

Gonadoliberyna (GnRH), zwana również hormonem uwalniającym hormon luteinizujący (LHRH), jest liniowym dekapetydem, powstającym z 92-aminokwasowego prekursora, zwanego proGnRH (25-28). GnRH jest produkowane przez neurony zlokalizowane w przedniej części podwzgórza w okolicy przedwzrokowej. Zakończenia tych neuronów występują w obrębie wyniosłości pośrodkowej podwzgórza, w bezpośredniej bliskości szypuły przysadki. GnRH pobudza wydzielanie gonadotropin - hormonu folikulotropowego (folitropiny, FSH) i hormonu lutenizującego (lutotropiny, LH) - przez komórki gonadotropowe przedniego płata przysadki (28, 29). Jej działanie na te komórki odbywa się poprzez swoisty białkowy receptor GnRH. Receptor GnRH stanowi łańcuch polipeptydowy obejmujący m.in. siedem domen transbłonowych i konserwatywny motyw aminokwasowy charakterystyczny dla rodopsynopodobnych receptorów sprzężonych z białkiem G (ang. *G protein-coupled receptors* - GPCR) (30). W ostatnich badaniach nad strukturami krystalograficznymi receptora GnRH z 2017 r. wykazano, że aktywacja receptora zachodzi poprzez wiązanie ligandów z domenami zewnątrzkomórkowymi i transdukcję sygnału przez siedem przezbłonowych  $\alpha$ -helis do domen cytoplazmatycznych, związanych z białkiem G (30). FSH i LH są glikoproteinami, złożonymi z podjednostki  $\alpha$  (takiej samej dla obu wspomnianych hormonów) i podjednostki  $\beta$  (swoistej dla danego hormonu tropowego i nadającej mu specyficzną aktywność biologiczną) (31, 32). FSH i LH są wydzielane pulsacyjnie, zgodnie z pulsami GnRH (25, 28). Ta pulsacyjność wydzielania gonadoliberyny i gonadotropin jest niezbędna dla podtrzymania czynności rozrodczych i uniknięcia regulacji negatywnej receptorów (czyli zmniejszenia ich ekspresji przy ciągłej stymulacji) (33, 34). Gonadotropiny regulują czynność i wytwarzanie hormonów przez jajniki i jądra. LH u kobiet pobudza produkcję jajnikową estrogenów i progesteronu, odpowiada za owulację i pobudzanie czynności hormonalnej ciała żółtego. LH u mężczyzn kontroluje syntezę testosteronu przez komórki śródmiąższowe jąder i pośrednio kontroluje wytwarzanie plemników (25). FSH u kobiet kontroluje rozwój pęcherzyka owulacyjnego, zaś u mężczyzn kontroluje spermatogenezę poprzez m.in. stymulację wytwarzania białka wiążącego androgeny (25, 35). W regulacji spermatogenezы i wydzielania FSH u mężczyzn ważną rolę

spełnia też polipeptyd inhibina. Inhibina wydzielana przez komórki Sertoliego kanalików plemnikotwórczych, ma biologiczną rolę hamowania wydzielania FSH. Poziom inhibiny wzrasta u mężczyzn w wyniku wzrostu stężenia androgenów (25, 36). Sekretję inhibiny nasila insulinopodobny czynnik wzrostu-1 (IGF-1), a zmniejsza GnRH (37, 38).

Czynność osi podwzgórzowo-przysadkowo-gonadalnej regulowana jest w mechanizmie ujemnego i dodatniego sprzężenia zwrotnego. Mechanizm ujemnego sprzężenia zwrotnego polega na tym, że wysokie stężenie obwodowych steroidów płciowych (odpowiednio testosteronu bądź estradiolu) hamuje wydzielanie gonadotropin, zaś niskie ich stężenia pobudzają wydzielanie FSH i LH (39, 40). Dodatkowo sprzężenie zwrotne u kobiet polegające na wzroście stężeń FSH i LH w okresie okołoolulacyjnym po bodźcu jakim jest wzrost stężenia estrogenów wydzielanych przez jajniki, warunkuje występowanie owulacji (40, 41). U mężczyzn dodatnie sprzężenie zwrotne LH w odpowiedzi na wzrost stężenia estradiolu jest czasem obserwowane, lecz nie jest to zjawisko typowe. Jest ono częściej (niż w stanie zdrowia) opisywane w przypadku hipogonadyzmu czy kastracji (42, 43).

Dla właściwej sekrecji i działania GnRH niezbędna jest prawidłowa migracja neuronów wydzielających GnRH w okresie embrionalnym oraz pulsacyjny charakter wydzielania GnRH (28, 44-47).

#### **1.4. Rozwój osi podwzgórzowo-przysadkowo-gonadalnej**

U podłoża wrodzonego IHH leżą zaburzenia migracji neuronów wydzielających GnRH oraz defekty syntezy, wydzielania i działania samej GnRH. Główna populacja neuronów produkujących GnRH (70%) rozwija się ze zlokalizowanej pozaczaszkowo w okresie embrionalnym plakody węchowej (narząd Jacobsona czyli narząd przylemieszowy) skąd wędruje wzdłuż nerwów narządu przylemieszowego (ang. *vomeronasal nerves*) do blaszki sitowej, a następnie do przodomózgowia pomiędzy 6 a 9 tygodniem ciąży (48, 49). Około 30% neuronów GnRH pochodzi z grzebienia nerwowego (50). Zakończenia neuronów GnRH znajdują się w wyniosłości pośrodkowej podwzgórza, gdzie do krążenia wrotnego wydzielana jest GnRH. GnRH dociera krążeniem wrotnym do przedniego płata przysadki, najsilniej unaczynionego narządu u ssaków (51). Mechanizm regulujący migrację neuronów GnRH wciąż nie jest do końca poznany (44). Migracja neuronów GnRH zależy od wielu czynników zewnętrznych i wewnętrznych takich jak: białka macierzy, czynniki wzrostu, neurotransmitery, receptory błonowe z rodziny receptorów związanych z białkiem G czy czynniki transkrypcyjne (Tabela 1). Anosmina, białko genu *ANOS1* (inaczej zwanego

*KALI*), jest historycznie pierwszą glikoproteiną macierzy zewnątrzkomórkowej powiązaną z zaburzeniami migracji neuronów GnRH (52). Białko to stanowi chemoatraktant, niejako przewodnik po matrycy komórkowej dla aksonów węchowych, a więc tylko pośrednio wpływa na migrację neuronów GnRH (53). Czynniki i kodujące je geny związane z migracją neuronów GnRH przedstawione są w Tabeli 1.

Neurony GnRH zaczynają pojawiać się w podwzgórzu płodu około 40 dnia ciąży (54). GnRH jest wykrywana w podwzgórzu około 15 tygodnia ciąży, podobnie jak kisspeptyna i receptor dla kisspeptyny (KISS1R) (55, 56). Kisspeptyny są ważnymi regulatorami aktywacji osi podwzgórzowo-przysadkowo-gonadalnej (PPG) u płodu i pełnią także niezbędną rolę jako główne regulatory sekrecji GnRH w okresie postnatalnym (55, 57). KISS1R, zwany również GPR54, jest receptorem związanym z białkiem G o sekwencji podobnej do receptorów galaninowych (58). KISS1R wykazuje ekspresję w neuronach GnRH, ale również w wielu innych narządach np. tkance tłuszczowej, wątrobie, trzustce czy łożysku (57, 59). U ludzi dorosłych udokumentowano ekspresję kisspeptyny w obrębie jądra łukowatego i w obrębie neuronów zlokalizowanych w ścianie komory trzeciej w strefie okołokomorowej (ang. *periventricular zone*) (60, 61).

Komórki gonadotropowe (gonadotropiny) rozwijające się w przysadce zaczynają syntetyzować gonadotropiny około 9 tygodnia ciąży (62). FSH i LH w surowicy płodu są wykrywalne około 12 tygodnia ciąży, zaś testosteron między 12 a 14 tygodniem ciąży (63, 64). Niższe stężenia obu gonadotropin w obrębie przysadki, w surowicy i w płynie owodniowym u płodów męskich między 12 a 20 tygodniem ciąży wynikają prawdopodobnie ze sprzężenia zwrotnego ujemnego wywołanego podwyższonym stężeniem testosteronem między 11 a 17 tygodniem ciąży u płodów męskich (63). W 23 tygodniu ciąży stężenia FSH i LH w surowicy płodu są wysokie, u płodów żeńskich porównywalne ze stężeniami w okresie okołomenopauzalnym, a u płodów męskich porównywalne ze stężeniami u dorosłych mężczyzn. W tym czasie w wężomózgowiu obecne są tylko nieliczne neurony GnRH (55). Aktywność GnRH w podwzgórzu w tym okresie jest dość i niska i porównywalna u obu płci (65). W początkowym okresie ciąży stężenia LH i FSH są niezależne od regulacji GnRH czy kisspeptyn i dopiero około 30-31 tygodnia ciąży GnRH stopniowo przejmuje funkcję regulującą wydzielanie gonadotropin (55). W okresie okołoporodowym stężenia gonadotropin u płodów męskich i żeńskich są niskie bądź niewykrywalne (62).

Oś podwzgórzowo-przysadkowo-gonadalna (PPG) jest zatem aktywna od drugiego trymestru ciąży, ale negatywne sprzężenie zwrotne spowodowane wysokimi stężeniami

estrogenów pochodzących z łożyska (a u płodów męskich prawdopodobnie dodatkowo wpływa na to zjawisko wyższe stężenie testosteronu) powoduje jej uspienie aż do momentu oddzielenia łożyska (66, 67). Szczyt aktywacji osi PPG przypada na 6 do 8 tygodni po porodzie (66). Stężenia gonadotropin rosną po porodzie i utrzymują się na wysokim poziomie przez pierwsze 3 miesiące życia dziecka, następnie spadają. Jedynie stężenie FSH u dziewczynek pozostaje podwyższone do około 3-4 roku życia (67). Początek okresu mini-dojrzewania przypada na około 2 do 3 miesiąc życia dziecka (67, 68). W okresie minidojrzewania u chłopców stężenia testosteronu są porównywalne do stężeń u dorosłych mężczyzn i wiążą się ze wzrostem i rozwojem penisa i jąder (67). U dziewczynek w okresie minidojrzewania dochodzi do podwyższenia stężenia estradiolu i rozwoju pęcherzyków jajnikowych. Okres minidojrzewania jest oknem w którym możliwa jest hormonalna ocena osi PPG. Oś PGG pozostaje później uspiąta do okresu dojrzewania (67).

Warto podkreślić, że rozwój drogi węchowej i migracja neuronów GnRH są ze sobą sprzężone, stąd częste współwystępowanie wrodzonych zaburzeń węchu i izolowanego hipogonadyzmu hipogonadotropowego. Ektodermalna plakoda węchowa jest źródłem nie tylko 70% neuronów GnRH, ale przede wszystkim czuciowych neuronów węchowych (ang. *olfactory sensory neurons*, OSNs) i węchowych komórek glejowych (ang. *olfactory ensheathing cells*, OECs) (69). Aksony OSNs, nawigowane niejako przez OECs, dochodzą nie tylko do opuszek węchowych, ale również do podwzgórza i wyznaczają tym samym drogę migracji neuronów GnRH (70, 71). Wyróżnia się dwie główne formy IHH - postać z prawidłowym węchem - normosomiczną – nIHH (około 40-50% przypadków IHH) i postać z zaburzeniami węchu (anosmią - brakiem węchu bądź hiposmią - obniżonym poczuciem węchu), zwaną zespołem Kallmanna (ZK) (około 50-60% przypadków) (72, 73).

**Tabela 1.**

Czynniki wpływające na migrację neuronów GnRH.

Grupa czynników	Rodzaj czynnika	Gen kodujący (OMIM ID)	Piśmiennictwo
<b>Czynniki transkrypcyjne</b>	EBF2 RE1	<i>EBF2</i> (609934) <i>REST</i> (600571)	(74)
<b>Czynniki wzrostu</b>	FGF8 FGFR1 Gas6 Ax11 HGF/SF Tyro3	<b><i>FGF8</i></b> (600483) <b><i>FGFR1</i></b> (136350) <i>GAS6</i> (600441) <i>AXL</i> (109135) <i>HGF</i> (142409) <i>TYRO3</i> (600341)	(75) (76) (77) (78) (79) (78)
<b>Przebieżniki neuronalne</b>	CCK8/CCK1R GABA <sub>A</sub> R GABA <sub>B</sub> R HTR1A	<i>CCK /CCKAR</i> (118440) <i>GABRA1</i> (137160) <i>GABRB2</i> (603540) <i>HTR1A</i> (109760)	(80) (81) (82) (83)
<b>Czynniki adhezyjne i ich receptory</b>	Anosmina B3GNT1 Efryna i jej receptory  NCAM Netryna-1, Proteoglikany zawierające siarczan heparanu Reelina Semaforyna 3a Semaforyna 4D Plexyna-A1	<i>ANOS1</i> (300836) <i>B4GAT1</i> (605517) <i>EFNB1</i> (300035) <i>EFNB2</i> (600527) <i>EFNB3</i> (602297) <i>EFNA2</i> (602756) <i>EFNA3</i> (601381) <i>EFNA5</i> (601535) <i>EPHB2</i> (600997) <i>EPHB4</i> (600011) <i>EPHA1</i> (600997) <i>EPHA7</i> (602190) <i>NCAM1</i> (116930) <i>DCC/NTNG1</i> (120470 /608818)  <i>RELN</i> ( 600514) <b><i>SEMA3A</i></b> (603961) <i>SEMA4D</i> (601866) <i>PLXNA1</i> (601055)	(52) (84) (85)  (86) (87) (88, 89)  (90) (71) (91) (92)
<b>Receptory sprzężone z białkiem G</b>	CXCR4/SDF-1 KISS1 KISS1R PROK2 PROKR2	<i>CXC4</i> (162643) <b><i>KISS1</i></b> (603286) <b><i>KISS1R</i></b> (604161) <b><i>PROK2</i></b> (607002) <b><i>PROKR2</i></b> (607123)	(93, 94) (95) (95) (96) (97)
<b>Białka synaptyczne i jądrowe</b>	NELF Stat1, Stat2, Stat5a, Jak2, Irf7 and Irf9	<i>NSMF</i> (608137)  <i>JAK/STAT</i>	 (98)
<b>Inhibitory wiązania DNA</b>	NHLH2	<i>NHLH2</i> (162361)	(99)
<b>Komórki glejowe</b>	OEC		(45)
<b>Regulacja aksonów</b>	ARX	<i>ARX</i> (300382)*	(46, 100)
<b>Inne</b>	IGSF10 ANKRD26	<i>IGSF10</i> (617351) <i>ANKRD26</i> (610855)	(101) (102)

\* Dane nie potwierdzone w badaniach u ludzi. Czynniki zaznaczone pogrubieniem, to czynniki które znalazły się w panelu genów, który został zastosowany celem realizacji niniejszej rozprawy doktorskiej

### **1.5. Epidemiologia izolowanego hipogonadyzmu hipogonadotropowego (IHH)**

IHH jest istotną, choć dość rzadką przyczyną zaburzeń dojrzewania i niepłodności u ludzi. Częstość występowania izolowanego hipogonadyzmu hipogonadotropowego (IHH) wynosi około 1:10 000 mężczyzn i 1:50 000 kobiet. Stosunek mężczyzn do kobiet w tej chorobie wynosi od 4:1 w IHH z prawidłowym węchem (normoosmiczny IHH - nIHH) do 8:1 w zespole Kallmanna (ZK) w zależności od opublikowanych danych (103-105). IHH jest najczęściej rozpoznawany w wieku młodzieńczym, między 15 a 25 rokiem życia, wcześniej w postaciach rodzinnych niż w przypadkach sporadycznych. Postać IHH z początkiem przed okresem dojrzewania stanowi 90% przypadków. Postać z początkiem w wieku dorosłym (ang. *adult-onset isolated hypogonadotropic hypogonadism, aoIHH*), najczęściej objawiająca się u mężczyzn w wieku 30-50 lat, to około 10% przypadków IHH (106-108). Towarzyszące schorzeniu zaburzenia węchu, ruchy lustrzane i opóźnienie dojrzewania w wywiadzie rodzinnym występują też w grupie pacjentów z IHH z początkiem w wieku dorosłym (106).

### **1.6. Podstawowe informacje o izolowanym hipogonadyźmie hipogonadotropowym**

Izolowany hipogonadyzm hipogonadotropowy, zwany również izolowanym niedoborem gonadoliberyny (GnRH) jest zaburzeniem będącym wynikiem zaburzeń produkcji, sekrecji bądź działania gonadoliberyny. Defekt w IHH obejmuje jedynie oś podwzgórzowo-przysadkowo-gonadalną, nie wpływając na funkcje innych osi hormonalnych. Oś podwzgórzowo-przysadkowo-gonadalna reguluje liczne aspekty czynności rozrodczych (44, 67, 109).

Jak wspomniano powyżej, gonadoliberyna jest peptydem podwzgórzowym, który stymuluje wydzielanie folikulotropiny (FSH) i luteotropiny (LH), kontrolując tym samym proces dojrzewania i reprodukcji u człowieka. IHH jest schorzeniem w którym w niespełna połowie przypadków udowodniono podłoże genetyczne. Rozpoznaje się go w przypadku braku jakiegokolwiek innej zaburzeń wydzielania pozostałych hormonów przysadkowych, stąd ocena czynności pozostałej części przedniego płata przysadki jest niezbędna w procesie diagnostycznym. Diagnoza IHH jest diagnozą z wykluczenia, powinna zostać potwierdzona (poza wynikami badań hormonalnych) normalnym obrazem regionu podwzgórzowo-przysadkowego w rezonansie magnetycznym (w szczególności kiedy odpowiedź w teście stymulacji z gonadoliberyną jest nieprawidłowa) oraz wykluczeniem innych przyczyn hipogonadyzmu hipogonadotropowego omówionych powyżej. Głównym wyzwaniem diagnostycznym jest rozróżnienie IHH od konstytucjonalnego opóźnienia dojrzewania

czy czynnościowych zaburzeń podwzgórzowo-przysadkowych, wtórnych do stresu, sportu bądź niskiej masy ciała.

Wyróżniamy dwie postaci IHH - postać z prawidłowym węchem - normosomiczną – nIHH i postać z zaburzeniami węchu bądź jego brakiem zwaną zespołem Kallmanna (ZK) (72, 73). Nazwa zespołu Kallmanna pochodzi od nazwiska badacza Franza Josefa Kallmanna, który opisał jako pierwszy rodzinny charakter tego schorzenia w 1944 r. (110).

Różnicowanie płci w IHH jest prawidłowe, nie obserwuje się zmian w kariotypie. Wzrost w okresie dzieciństwa jest niezaburzony natomiast rozwój prącia u płodów męskich jest nieprawidłowy z powodu niskiego stężenia testosteronu wydzielanego przez jądra płodu co skutkować może obecnością mikropenisu przy urodzeniu (111). Zstępowanie jąder z jamy brzusznej do moszny, kontrolowane przez wiele czynników, w tym poziom testosteronu, jest w tym zespole często zaburzone, co może prowadzić do wnętrstwa jednostronnego, obustronnego bądź jąder cofających się (112, 113). Charakterystyczne dla wrodzonego hipogonadyzmu hipogonadotropowego są także niskie stężenia gonadotropin i obwodowych hormonów płciowych podczas okresu minidojrzwania, mającego miejsce pomiędzy trzecim a szóstym miesiącem życia dziecka (114). Objawy IHH w okresie noworodkowym i niemowlęcym mogą być nieobecne bądź niezauważone. Dojrzwanie płciowe w okresie nastoletnim jest zaburzone - niepełne bądź występuje jego zupełny brak. Pojawiające się u chorych proporcje enuchoidalne (rozpiętość ramion szersza o co najmniej 5 cm niż wzrost czy większa długość odcinka od miednicy do ziemi niż odcinka od czubka głowy do miednicy) są spowodowane opóźnionym zarastaniem przynasad kostnych wywołanym obniżonym stężeniem testosteronu bądź estradiolu (115, 116).

Dawniej IHH nosił nazwę wrodzonego hipogonadyzmu hipogonadotropowego, teraz częściej używa się terminu idiopatyczny HH ze względu na różny wiek prezentacji pierwszych objawów IHH i nie do końca ustalone podłoże genetyczne we wszystkich przypadkach tej jednostki chorobowej. Jak wspomniano powyżej przypadki pacjentów z późną prezentacją pierwszych objawów IHH są opisane w piśmiennictwie i stanowią około 10% pacjentów z IHH (106, 117).

Z powodu pulsacyjnego wydzielania i krótkiego okresu półtrwania oznaczanie gonadoliberyny we krwi obwodowej nie jest stosowane. Oznacza się za to stężenie gonadotropin, które są stabilniejsze i możliwa jest ocena ich stężeń podstawowych bądź stężeń po stymulacji hormonalnej. W toku diagnostyki IHH najczęściej wykonuje się test z podaniem dożylnym egzogennej gonadoliberyny, w którym obserwuje się prawidłowy bądź zaburzony albo nawet nieobecny wzrost gonadotropin (norma: to co najmniej

półtorakrotny wzrost dla FSH oraz co najmniej dwukrotny dla LH, choć brak adekwatnej odpowiedzi w zakresie FSH może stanowić wariant normy) (118, 119). W przypadku inaktywujących mutacji genu receptora GnRH, mutacji w obrębie *ANOS1* bądź *NROB1* w szczególności może nie być żadnej obserwowalnej odpowiedzi gonadotropin w teście z GnRH (47).

IHH towarzyszą często wady wrodzone twarzoczaszki, zaburzenia rozwoju zębów, zaburzenia słuchu, wady nerek, wady kostne (w szczególności palców rąk i stóp), ruchy lustrzane czy inne schorzenia neurologiczne, przedstawione w tabeli poniżej (Tabela 2).

**Tabela 2.**  
Defekty towarzyszące IHH.

Okolica	wada	Geny IHH/CPHD związane z wadą	piśmiennictwo
Twarz, jama ustna	Rozszczep wargi	<i>FGFR1, FGFR2, FGF8, ANOS1, HS6ST1</i>	(68, 120-124)
	Rozszczep podniebienia		
	Strzeliste podniebienie	<i>PROK2/PROKR2, CHD7, ANOS1</i>	(68, 123, 125)
	Hipodoncja (agenezja $\geq 1$ zęba)	<i>CHD7, ANOS1, FGFR, PROK2/PROKR2</i>	(68, 123, 125, 126)
	Dysplazja przegrodowo-wzrokowa	<i>GLI2, LHX3, LHX4, OTX2, POUF1, PROPR1, SOX2, SOX3, HESX1</i>	(127, 128)
	Inne wady środkowej części twarzy	<i>FGFR1, HESX1</i>	(68)
	Atrezja nozdrzy tylnych	<i>FGFR1, CHD7</i>	(68, 125, 126, 129)
Układ nerwowy i zmysły	Niedosłuch/głuchota, wady małżowiny usznej	<i>SOX10, CHD7, ANOS1, FGFR1, FGF8, PROK2/PROKR2, IL1R7D, LHX3</i>	(68, 120, 122-125, 130-133)
	Ruchy lustrzane rąk (synkineza)	<i>ANOS1, FGFR1, PROK2/PROKR2</i>	(68, 120, 122)
	Ataksja	<i>ANOS1</i>	(68)
	Hipoplazja nerwu wzrokowego	<i>CHD7</i>	(125, 126, 129)
	Zaburzenia widzenia, patologiczne ruchy gałek ocznych, oczopląs	<i>ANOS1, PROK2/PROKR2</i>	(68, 120)
	Hiperteloryzm	<i>FGF8</i>	(123, 124)
	Szczelina oka (ang. <i>coloboma</i> )	<i>FGFR1, FGF8, CHD7, HESX1</i>	(68, 122, 123, 125, 126, 129)
	Mikroftalmia	<i>SOX2</i>	(68)
	Holoprocencefalia	<i>GLI2</i>	(68)

Okolica	wada	Geny IHH/CPHD związane z wadą	piśmiennictwo
Skóra	Zaburzenia pigmentacji skóry, włosów i tęczówki	<i>SOX10</i>	(130, 131)
Wady kostne	Syndaktylia, polidaktylia, kamptodaktylia	<i>FGF8, FGFR1, HESX1</i>	(68, 122, 124)
	Klinodaktylia	<i>HS6ST1, ANOS1, FGF8, FGFR1, CHD7</i>	(68, 122, 125)
	Skolioza/kifoza	<i>ANOS1, FGF8, CHD7, PROK2/PROKR2</i>	(122, 125)
Narządy wewnętrzne	Jednostronna agenezja nerki	<i>ANOS1, FGFR1, FGF8</i>	(120, 123)
	Wada serca	<i>FGFR1, CHD7</i>	(68, 125, 126)
Inne	Niepełnosprawność intelektualna	<i>PROK2/PROKR2, CHD7</i>	(68)
	Zaburzenia snu	<i>PROK2/PROKR2</i>	(68)
	Otyłość	<i>PROK2/PROKR2, LEP, LEPR, PCSK1 (PC1), GNRHR, PROK2, PROKR2</i>	(68) (134-138)
	Opóźnienie wzrostu/niski wzrost	<i>CHD7</i>	(68, 125, 126, 129)
	Ograniczenie ruchów głowy	<i>LHX3</i>	(68, 128)

### 1.7. Dziedziczenie izolowanego hipogonadyzmu hipogonadotropowego i geny leżące u podłoża IHH

Dziedziczenie IHH wykazuje charakter autosomalny dominujący, autosomalny recesywny bądź sprzężony z chromosomem X. Prawie 60% pacjentów z nIHH/ZK to pacjenci u których nie zidentyfikowano podłoża genetycznego choroby (139, 140). Podejrzewa się, że defekt wielogenowy (ang. *oligogenicity*), czyli obecność mutacji w więcej niż jednym genie leży u podłoża około 10-15% przypadków IHH (141-144).

Ponad 70-80% przypadków IHH to pacjenci sporadyczni, pozostałe przypadki to formy rodzinne. Postaci rodzinne stanowią od 6.3 do 15% przypadków i dziedziczone są głównie autosomalnie recesywnie, ale też autosomalnie dominująco czy w sprzężeniu z chromosomem X (105, 145, 146). Liczba przypadków rodzinnych może być zaniżona ze względu na brak przekazywania takich informacji w rodzinie czy brak chęci diagnostyki bądź brak kontaktu ze wszystkimi członkami rodziny biologicznej.

IHH cechuje różny stopień ekspresji i niekompletna penetracja choroby. Kompletny IHH (bez spontanicznego dojrzewania płciowego) dotyczy odpowiednio 62% mężczyzn i 45.7% kobiet z IHH (145). Zupełny brak dojrzewania opisywany jest w około 81%

pacjentów z ZK vs. 46% pacjentów z nIHH (105). Wnętrostwo występuje w przypadku 15.3% kompletnego IHH vs. 3.9% niekompletnego IHH (145).

Odwracalność objawów w ciągu całego życia pacjenta z IHH kształtuje się na poziomie nawet 15 do 22% pacjentów i ponad dwukrotnie częściej zdarza się w nIHH niż w ZK (147). U chorych z odwróceniem i bez odwrócenia nie występują różnice pod względem obecności mikropenisu, wnętrostwa czy częściowego dojrzewania płciowego (147).

Do tej pory zidentyfikowano ponad 50 genów biorących udział w patogenezie IHH. Są to geny które biorą udział w rozwoju układu podwzgórzowo-przysadkowego, formowaniu i migracji neuronów GnRH, regulacji wydzielania GnRH i gonadotropin. Część genów (w tym: *DMXL2*, *OTUD4*, *PNPLA6*, *POLR3A*, *POLR3B*, *RAB3GAP1*, *RAB18*, *RNF216*, *STUB1*, *TBC1D20*) to geny biorące udział w rozwoju postaci syndromicznych hipogonadyzmu hipogonadotropowego, gdzie hipogonadyzm hipogonadotropowy jest tylko jedną z wielu składowych towarzyszących podstawowym schorzeniem, najczęściej neurologiczno-okulistycznym. Geny te odpowiadają często za procesy ubikwitynacji białek, metabolizmu lipidów czy produkcji RNA, co może wpływać na procesy neurorozwojowe czy regulację wydzielania GnRH. Jak pokazały jednak dotychczasowe badania, mutacje w genach odpowiadających za postaci syndromiczne IHH występują także u pacjentów bez towarzyszących schorzeń neurologicznych czy okulistycznych, a ich udział w patogenezie IHH może być niedoszacowany (148).

Warto podkreślić, że podłoża genetyczne postaci normosomicznej IHH i ZK nakładają się i jest wiele genów, których mutacje mogą dać fenotypy z prawidłowym lub zaburzonym węchem. Geny wspólne dla nIHH i ZK to: *AXL*, *CHD7*, *DUSP6*, *FGF8*, *FGFR1*, *HS6ST1*, *IL17RD*, *KLB*, *NSMF*, *PLXNA1*, *PROK2*, *PROKR2*, *SEMA3E*, *SEMA7A*, *SPRY4*, *WDR11*. Wyróżniamy też geny typowe dla ZK: *ANOS1*, *CCDC141*, *FEZF-1*, *FLTR3*, *PLXNA1*, *SEMA3A*, *SMCHP1*, *SOX10*. Do genów, których defekty leżą u patogenezy IHH zalicza się też geny pierwotnie związane z wielohormonalną niedoczynnością przysadki (CPHD), takie jak: *HESX1*, *LHX4* czy *PROPI* (149). Część genów związanych z patogenezą IHH to geny mające znaczenie nie tylko w hipogonadyzmie hipogonadotropowym, ale także w patologicznej otyłości takie jak: *LEP*, *LEPR*, *PCSK1* (135, 150). Mutacje patogenezy w genach: *PCSK1*, *NROB1* i *NR5A1(SF-1)* odpowiadają za rozwój niedoczynności nadnerczy (150-152). Mutacje w niektórych genach uznawane są za jedynie współtowarzyszące innym mutacjom przyczynowymi w innych genach IHH, dotyczy to genów: *FGF8*, *FGF17*, *HS6ST1*, *IL17RD*, *NSMF*, *PLXNA1*, *SEMA7A*, *SEMA3E* (149). Model dziedziczenia defektów niektórych genów, w szczególności: *CCDC141*, *NR5A1*, *PLXNA1*, *SRA1*, *SPRY*, *WDR11*

jest nieustalony. Ustalenie sposobu dziedziczenia utrudnia wielogenowość czy dziedziczenie niezgodne z prawami Mendlowskimi, a jego sprecyzowanie wymaga szerszych badań całych rodzin u większej ilości pacjentów z daną mutacją (141, 149, 153, 154).

Geny zaangażowane w patogenezę IHH przedstawione zostały w Tabeli 3 w porządku alfabetycznym. W tabeli można odnaleźć ich produkty, funkcje genów, powiązany fenotyp uwzględniający istnienie zaburzenia węchu, model dziedziczenia w IHH, oraz numer referencyjny w OMIM. Szacunkowe częstości występowania mutacji w tych genach zostały przedstawione w ostatniej kolumnie. Częstości te mogą nie odzwierciedlać prawdziwego udziału genów w podłożu IHH ze względu na dotychczasowe dość wybiórcze badanie genów u większości pacjentów z IHH.

**Tabela 3.**

Geny, ich produkty, funkcje, powiazany fenotyp, model dziedziczenia w IHH (porzadek alfabetyczny).

Gen	Produkt genu	Locus	OMIM	dziedziczenie	funkcja	fenotyp	% IHH za które odpowiada dana mutacja**
<b>ANOS1 (KAL1)</b>	anosmina-1	Xp22.3	300836	sprężone z chromosomem X	migracja neuronów GnRH	ZK	5-12%(123, 155)
<b>AXL</b>	receptorowa kinaza tyrozynowo-białkowa Axl1	19q13.2	109135	nieokreślone	regulacja funkcji mikrogleju i migracji neuronów GnRH	ZK, nIHH	<4% *** (156)
<b>CCDC141</b>	CCDC141 (ang. <i>coiled-coil domain-containing protein 141</i> )	2q31.2	616031	AR	migracja neuronów GnRH	ZK, nIHH	3.3% *** (157)
<b>CHD7</b>	białko 7 z helikazą wiążącą DNA w domenach chromatynowych	8q12.1-q12.2	608892	AD, AR, wielogenowe,	regulacja rybosomalnego RNA, migracja neuronów GnRH	ZK, nIHH	5-10% (123, 158)
<b>DMXL2*</b>	rabkonektyna-3 (ang. <i>rabconnectin-3</i> )	15q21.2	612186	AR, AD	rozwój neuronów GnRH	DM, NI, WNT, nIHH	<1%*** (159)
<b>DUSP6</b>	fosfataza białkowa 6 o podwójnej specyficzności (ang. <i>dual specificity phosphatase 6</i> )	12q21.33	602748	AD	prolifracja komórek, apoptoza, różnicowanie, migracja neuronów GnRH	ZK, nIHH	<1.5% *** (132)
<b>FEZF1</b>	białko 1 z rodziny Fez z palcem cynkowym	7q31.32	613301	AR	represor transkrypcji; migracja neuronów GnRH	ZK	6% *** (160)

Gen	Produkt genu	Locus	OMIM	dziedziczenie	funkcja	fenotyp	% IHH za które odpowiada dana mutacja**
<b>FGF8</b>	czynnik wzrostu fibroblastów 8 (FGF8)	10q25	600483	AD, wielogenowe	migracja neuronów GnRH	ZK, nIHH	<2% (123)
<b>FGFR1</b>	receptor FGF8	8p11.2	136350	AD, AR, wielogenowe, <i>de novo</i>	migracja neuronów GnRH	ZK, nIHH	10% (123)
<b>FGF17</b>	czynnik wzrostu fibroblastów 17 (FGF17)	8p21.3	603725	AD, wielogenowe	migracja neuronów GnRH	ZK, nIHH	<1%*** (132)
<b>FLRT3</b>	bogate w powtórzenia leucyny transbłonowe białko FLRT3	20p12.1	604808	AD, wielogenowe	migracja neuronów GnRH	ZK	<1%*** (132)
<b>FSHB</b>	hormon folikulotropowy (FSH) – podj. $\beta$	11p14.1	136530	AR	działanie FSH jako hormonu	niepełny nIHH/ niedobór FSH	<1%
<b>GLI2</b>	Czynnik transkrypcyjny ze szlaku <i>hedgehog</i> -GLI	2q14.2	165230	AD	sygnalizacja <i>hedgehog</i> ; formacja przedniego płata przysadki	ZK	<1% (161)
<b>GNRH1</b>	gonadoliberyna (GnRH), progonadoliberyna 1	8p21-11.2	152760	AR, wielogenowe	stymulacja wydzielania gonadotropin i przekazywania sygnału GnRH	nIHH	<2% (123)
<b>GNRHR</b>	receptor GnRH	4q13.2-3	138850	AR, wielogenowe	działanie GnRH	nIHH	5-10% (123) 3.5%
<b>HESX1</b>	czynnik transkrypcyjny HESX1	3p14.3	601802	AR, AD	rozwój regionu podwzgórzowo-przysadkowego	CPHD/ZK	< 1% (162)
<b>HS6ST1</b>	6-O-sulfotransferaza siarczanu heparanu (HS6ST)	Xq26.2	604846	AD, wielogenowe	modyfikacja siarczanu heparanu, migracja neuronów GnRH	ZK, nIHH	<2% (123)

Gen	Produkt genu	Locus	OMIM	dziedziczenie	funkcja	fenotyp	% IHH za które odpowiada dana mutacja**
<b><i>IGSF10</i></b>	immunoglobulina IGSF10	3q25.1	617351	AD	migracja neuronów GnRH	nIHH	do 10%* (101)
<b><i>IL17RD</i></b>	receptor D interleukiny 17	3p14.3	606807	AD, AR, wielogenowe	migracja neuronów GnRH	ZK, nIHH	2-5% (123)
<b><i>KISS1</i></b>	kisspeptyna 1	1q32	603286	AR	tworzenie połączeń między neuronami GnRH, regulacja wydzielania GnRH	nIHH	<2% (123)
<b><i>KISS1R</i></b>	receptor kisspeptyny 1	19p13.3	604161	AR	tworzenie połączeń między neuronami GnRH, regulacja wydzielania GnRH	nIHH, ZK	<2% (123)
<b><i>KLB</i></b>	białko KLB	4p14	611135	AD	sygnalizacja FGF; modulacja wydzielania GnRH	ZK, nIHH	4%(163)*
<b><i>LEP</i></b>	leptyna	7q31.3	164160	AR	modulacja wydzielania GnRH	otyłość patologiczna, nIHH	<5%(164)
<b><i>LEPR</i></b>	receptor leptyny	1p31	601007	AR	kontrola obwodowa neurosekrecji GnRH	otyłość patologiczna, nIHH	
<b><i>LHB</i></b>	hormon luteinizujący (LH)	19q13.33	152780	AR	sekrecja LH	niepełen nIHH/niedobór LH	<1%
<b><i>LHX4</i></b>	LHX4, białko homodomenowe typu LIM	1q25.2	602146	AR	rozwój przedniego płata przysadki	CPHD, IHH?	nieznana

Gen	Produkt genu	Locus	OMIM	dziedziczenie	funkcja	fenotyp	% IHH za które odpowiada dana mutacja**
<i>NSMF</i>	czynnik migracji neuronów i sygnalizacja zw. z receptorem NMDA	9q34.3	608137	AD, wielogenowe	migracja neuronów GnRH	ZK, nIHH	<2%(165)
<i>NR0B1</i>	receptor jądrowy DAX1	X21.3-21.2	300473	sprężone z chromosomem X	transkrypcja genów reg. funkcję układu podwzgórzowo-przysadkowego	NN, nIHH	<1%
<i>NR5A1(SF-1)</i>	czynnik transkrypcyjny NR5A1	9q33.3	184757	AD	łączenie z motywem AGGTCA i regulacja ekspresji wielu genów	NN, IHH	(154) udokumentowany IHH na modelu mysim
<i>OTUD4*</i>	proteina 4 zawierająca domenę OTU (OTUD4)	4q31.21	611744	AR, wielogenowe	ubikwitynacja	zespół Gordon Holmes'a, ataksja, nIHH	<1%
<i>PCI/ PCSKI</i>	konwertaza 1 prohormonu	5q15	162150	AR	aktywacja prohormonów, regulacja neuroendokrynologiczna	nIHH, niedoczyność nadnerczy, otyłość	<1% (134, 166)
<i>PLXNA1</i>	pleksyna A1 (ang. <i>plexin A1</i> )	3q21.3	601055	AD	migracja neuronów GnRH	ZK	<1% (92)
<i>PNPLA6*</i>	enzym katalizujący deestryfikację fosfatydylocholiny błonowej	19p13.2	603197	AR	metabolizm lipidów	zespół Gordon Holmes'a, zespół Boucher Neuhäuser	<1% (167, 168)
<i>POLR3A*</i>	podjednostka polimerazy RNA III (POLR3A)	10q22.3	614258	AR	produkcja RNA	zespół 4H	nieznana (169)

Gen	Produkt genu	Locus	OMIM	dziedziczenie	funkcja	fenotyp	% IHH za które odpowiada dana mutacja**
<b><i>POLR3B*</i></b>	podjednostka RPC2 polimerazy RNA III (POLR3B)	12q23.3	614366	AR	produkcja RNA	ZK, nIHH, zespół 4H	<1% *** (148)
<b><i>PROK2</i></b>	prokinetycyna 2	3p13	607002	AR, AD, wielogenowe	migracja neuronów GnRH	ZK, nIHH	<2% (123)
<b><i>PROKR2</i></b>	receptor prokinetycyny	20p12.3	607123	AR, AD, wielogenowe	migracja neuronów GnRH	ZK, nIHH	5% (123)
<b><i>PROP1</i></b>	specyficzny dla przysadki czynnik transkrypcyjny (PROP1)	5q35.3	601538	AR	rozwój przedniego płata przysadki	CPHD/nIHH	<1% (170)
<b><i>RAB3GAP1*</i></b>	RAB3GAP	2q21.3	602536	AR	regulacja egzocytozy neuroprzebieżników i hormonów	zespół Warburga	<1% (171)
<b><i>RAB3GAP2*</i></b>	RAB3GAP	1q41	609275	AR	regulacja egzocytozy neuroprzebieżników i hormonów	zespół Warburga, zespół Martsolfa	<1% (172)
<b><i>RAB18*</i></b>	białko powiązane z RAS 18 (RAB18)	10p12.1	602207	AR	hamuje aktywność sekrecyjną w komórkach neuroendokrynowych	zespół Warburga	<1% (173)
<b><i>RNF216*</i></b>	TRIAD3	7p22.1	212840	AR	ubikwitynacja	zespół Gordon Holmes'a, ataksja, nIHH	<1% (174)
<b><i>SEMA3A</i></b>	semaforyna-3A	7p12.1	603961	AD, wielogenowe	ustalenie ścieżki aksonów neuronów GnRH	ZK	<2% (123)
<b><i>SEMA3E</i></b>	semaforyna-3E	7q21.11	608166	AD, wielogenowe	ustalenie ścieżki neuronów GnRH	ZK, nIHH	<1% *** (175)

Gen	Produkt genu	Locus	OMIM	dziedziczenie	funkcja	fenotyp	% IHH za które odpowiada dana mutacja**
<i>SEMA7A</i>	sematoforyna-7A	15q24.1	607961	wielogenowe/nieznane	ustalenie ścieżki neuronów GnRH	ZK, nHH	<1%*** (176)
<i>SMCHD1</i>	SMCHD1	18p11.32	614982	AD	inaktywacja chromosmu X; migracja neuronów GnRH	ZK	<1% (177)
<i>SOX2</i>	czynnik transkrypcyjny SOX2	3q26.33	184429	AD	rozwój twarzoczaszki i opuszki węchowej	CPHD, nIHH	<1% (178)
<i>SOX10</i>	czynnik transkrypcyjny SOX10	22q13.1	602229	AD	rozwój twarzoczaszki i opuszki węchowej	ZK	2-5% (123)
<i>SPRY4</i>	homolog Sprouty 4 (Spry-4)	5q31.3	607984	nieokreślone	migracja neuronów GnRH	ZK, nIHH	3.5% *** (132)
<i>SRA1</i>	aktywator RNA receptora sterydowego 1	5q31.3	603819	nieokreślone	rozwój układu podwzgórzowo-przysadkowego	nIHH	2%*** (152)
<i>STUB1*</i>	CHIP ( ang. carboxyl terminus of Hsp70-interacting protein)	6p13.3	607207	AR	ubikwitynacja	zespół Gordon Holmes'a	<1% (179)
<i>TAC3</i>	neurokinina B (tachykinina)	12q13-12	162330	AR	stymulacja i hamowanie wydzielania GnRH	nIHH	5% ***(123)
<i>TACR3</i>	receptor dla neurokininy B (tachykininy)	4q25	162332	AR	stymulacja i hamowanie wydzielania GnRH	nIHH	<2% (123)
<i>TBC1D20*</i>	TBC1D20	20p13	611663	AR	rozwój mózgu	zespół Warburga	<1% (180)
<i>WDR11</i>	białko powtarzalne WD11	10q26.12	606417	AD	rozwój neuronów węchowych	ZK, nIHH	3%*** (181)

Legenda:

geny związane z zaburzeniami rozwoju i migracji neuronów GnRH

geny związane z zaburzeniami generatora pulsów GnRH

geny związane z zaburzeniami rozwojowymi regionu podwzgórzowo-przysadkowego

geny związane z zaburzeniami na poziomie komórek gonadotropowych/gonadotropin

IHH z otyłością

\* postaci syndromiczne, związane z zespołami neurodegeneracyjnymi

\*\* procentowy (%) udział danego genu w patogenezie IHH może być niedoszacowany ze względu na przewidywaną wielogenowość IHH i różnice populacyjne

\*\*\* dane raportowane tylko w jednej publikacji, stąd dane procentowe mogą być zawyżone

dla częstości poniżej <1% nie wpisywano dokładnej częstości, tylko <1%

Wyjaśnienia zastosowanych w tabeli skrótów:

AD - dziedziczenie autosomalne dominujące

AR - dziedziczenia autosomalne recesywne

CPHD - wielohormonalna niedoczynność przysadki

nIHH - normosmiczna postać izolowanego hipogonadyzmu hipogonadotropowego

NN - niedoczynność nadnerczy

Zespół 4H - leukodystrofia hipomielinizacyjna, cechująca się hipomielinizmem, hipogonadyzmem hipogonadotropowym i hipodoncją.

ZK - zespół Kallmana

## 2. Cele pracy

Izolowana postać hipogonadyzmu hipogonadotropowego (IHH) jest istotną przyczyną zaburzeń dojrzewania i niepłodności u ludzi. U podłoża IHH leżą m.in. zaburzenia migracji neuronów wydzielających gonadoliberynę (GnRH) oraz defekty syntezy, wydzielania i działania samej GnRH. Mechanizmy dojrzewania płciowego i procesy warunkujące jego podłoże genetyczne u człowieka nadal pozostają nie do końca zbadane. Wobec postępu technologicznego i nowych możliwości wykrywania zmian w genomie człowieka wykonano szeroką i kompleksową analizę genetyczną w grupie pacjentów z IHH, celem poszukiwania czynników genetycznych leżących u podłoża IHH. Podłoże genetyczne ponad 50% przypadków IHH jest wciąż nieznane, a u większości pacjentów z populacji polskiej, z wyjątkiem niektórych pacjentów pediatrycznych, podłoże IHH nie było jak do tej pory badane.

Określono poniższe cele rozprawy doktorskiej:

1. Ocena przydatności sekwencjonowania nowej generacji (NGS) z zastosowaniem wytypowanego panelu 27 genów związanych z IHH u pełnoobjawowych chorych z IHH i próba stworzenia algorytmu diagnostyki genetycznej w IHH.
2. Oszacowanie częstości występowania mutacji przyczynowych w regionach kodujących genów związanych z IHH.
3. Oszacowanie częstości mutacji wielogenowych związanych z IHH u badanych polskich pacjentów z IHH.
4. Korelacja wykrytych defektów genetycznych z obrazem klinicznym IHH.
5. Próba wytypowania miejsc typu „hot-spot” w regionach kodujących genów związanych z IHH.

Prace traktujące o podłożu genetycznym IHH w populacji polskiej oparte na badaniach takich jak sekwencjonowanie następnej generacji (NGS) nie były jak dotąd publikowane.

### **3. Materiał i Metodyka**

#### **3.1. Opis grupy badanej i kontrolnej**

Grupę pacjentów objętych badaniami stanowiło 34 pacjentów z IHH pozostający pod opieką Katedry i Kliniki Endokrynologii, Przemiany Materii i Chorób Wewnętrznych w Poznaniu, a także innych ośrodków w Polsce, posiadających pod swoją opieką chorych z IHH (Zakład Zdrowia Prokreacyjnego Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego w Warszawie i Oddział Kliniczny Endokrynologii Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie). Celem realizacji tematu rozprawy doktorskiej zebrano unikalną grupy pacjentów z IHH, obejmującej także przypadki rodzinne. W grupie pacjentów włączonych do badania znalazło się zatem 34 pełnoletnich pacjentów z IHH z całej Polski z pełną charakterystyką kliniczną, 29 mężczyzn (średnio 27.9 lat; min-max: 18 do 48 lat), 5 kobiet (średnio 27.6 lat; min-max: 21 do 43 lat). Tylko 3 pacjentów (9%) to przypadki rodzinne, reszta to przypadki prawdopodobnie sporadyczne (92%) choć nie można wykluczyć braku świadomości pacjentów co do istnienia osób o podobnych dolegliwościach w rodzinie.

Dokładna charakterystyka opisowa badanej grupy znajduje się w Tabeli 4 i w Tabeli 5.

U każdego pacjenta po uzyskaniu jego pisemnej zgody przeprowadzono dokładny wywiad kliniczny. Wykonano u niego szczegółowe badanie przedmiotowe i pomiary antropometryczne (pomiar masy i wzrostu). U pacjentów przeprowadzono ocenę hormonalną oraz odpowiednio ocenę andrologiczną (badanie fizykalne i ultrasonograficzne jąder) bądź ginekologiczną (badanie ginekologiczne i USG dopochwowe lub przezodbytnicze). Przeprowadzono również podstawową próbę węchową (4 zapachy). Pacjenci przechodzili także badania w kierunku towarzyszących wad rozwojowych - w każdym przypadku badanie USG jamy brzusznej czy przesiewowe badanie słuchu w przypadku klinicznego podejrzenia niedosłuchu. Większość pacjentów miała wykonane badanie rezonansem magnetycznym przysadki, w przypadku braku przeciwwskazań do tego badania.

**Tabela 4.**

Dane antropometryczne badanych pacjentów

nr	pleć	wiek w momencie diagnozy	wiek w momencie badania	masa ciała (w kg)	wzrost (w cm)	BMI	węch	obecne leczenie
1	M	25	25	42	161	16.2	0	0
2	M	25	32	96	178	30.3	0	0
3	M	22	22	110	180	33.9	1	0
	M	25*	25	108	180	33.3	1	0
4	M	20	20	75	182	22.64	0	0
	M	25*	25	81	182	24.45	0	0
5	M	17	20	64	183	19.11	0	1
6	M	33	35	76	174	25.1	1	1
7	M	19	23	130	196	33.84	0	0
8	M	33	33	94	171	32.15	0	0
9	M	18	18	bd	173	bd	0	0
10	M	19	19	66	182	19.93	1	0
11	M	30	36	113	185	33.02	0	1
12	M	16	19	115	184	33.24	0	0
13	M	17	20	84	178	26.51	0	1
14	M	18	43	86	180	26.54	0	1
15	M	17	24	75	173	25.06	0	1
16	M	17	35	75	185	21.91	1	1
17	M	17	24	84	180	25.93	0	1
18	K	18	26	101	174	33.36	0	1
19	M	18	24	62	180	17.92	1	1
20	M	25	21	bd	bd	bd	1	0
21	M	20	33	108	193	28.99	1	1
22	M	16	26	70	181	21.36	1	1
23	M	33	33	106	169	37.11	1	0
24	M	17	27	70	181	21.36	0	1
25	M	15	43	89	182	26.87	0	1
26	M	16	18	64	185	18.7	0	0
27	M	17	19	67	170	23.18	0	0
28	M	16	48	89	172	30.08	0	1
29	K	16	24	45	162	17.15	1	1
30	M	26	41	112	186	32.37	0	1
31	K	19	24	72	180	22.22	0	0
32	K	18	21	69	165	25.34	1	1
33	K	20	43	80	169	28.01	0	1
34	M	27	27	bd	bd	bd	1	0

nr - numer pacjenta

węch: 0 - anosmia bądź hiposmia; 1 - węch prawidłowy

leczenie 1- pacjent leczony przed diagnostyką genetyczną; 2 - pacjent wcześniej nieleczony hormonami płciowymi

\* - odwrócenie objawów (ang. "reversal form")

**Tabela 5.**

Fenotyp badanych pacjentów z IHH.

nr	pleć	węch	wnętrostwo w wywiadzie	wady towarzyszące	dodatkowe choroby	dojrzewanie bez leczenia
1	M	anosmia	jednostronne (JP)	-	FAS; niedowaga; osteoporoza	brak
2	M	hiposmia	-	syndaktylia II i III palca stóp, stulejka	otyłość; insulinooporność; stłuszczenie wątroby; niedoczynność tarczycy; stulejka zoperowana	niepełne
3	M	normosmia	-	-	otyłość	brak
4	M	anosmia	-	-	osteopenia	brak
5	M	hiposmia	obustronne	-	nietrzymanie moczu; śledziona dodatkowa; osteopenia	brak
6	M	normosmia	-	-	stulejka; torbiel szyszynki; nadwzroczność	pełne
7	M	anosmia	jednostronne	ruchy lustrzane rąk	niedoczynność tarczycy; insulinooporność; otyłość; osteopenia; gotyckie podniebienie	brak
8	M	anosmia	-	-	otyłość; stłuszczenie wątroby; kamica nerek; ginekomastia; osteoporoza	niepełne
9	M	normosmia	-	-	osteopenia	brak
10	M	normosmia	-	-	torbiel szyszynki; leukopenia; niedokrwistość; alergie wziewne	pełne
11	M	hiposmia	-	ruchy lustrzane rąk	otyłość; reumatyzm dziecięcy; nawykowe skręcanie kostek	pełne
12	M	normosmia	obustronne	-	niskorosłość leczona GH; otyłość	brak
13	M	anosmia	-	mikropenis	zez rozbieżny OP; krótkowzroczność; rak tarczycy; niedokrwistość z niedoboru żelaza; ginekomastia lewostronna; nadwaga; torbiel szyszynki	brak
14	M	hiposmia	-	-	osteopenia	brak
15	M	anosmia	wędrujące JP; przepuklina mosznowa prawostronna	ruchy lustrzane rąk; agenezja nerki prawej; gotyckie podniebienie	niedoczynność tarczycy; zez oka OL	brak

**Tabela 5.** Fenotyp badanych pacjentów z IHH (kontynuacja).

nr	pleć	węch	wnętrostwo w wywiadzie	wady towarzyszące	dotychczasowe choroby	dojrzewanie bez leczenia
16	M	normosmia	jednostronne (JL)		stulejka	brak
17	M	anosmia	wedrujące jądra, bez jawnego wnętrstwa		stulejka; trądzik pospolity	brak
18	K	anosmia	nd	-	otyłość; insulinooporność	PBM
19	M	normosmia	-	-	niedoczynność tarczycy; niedobór hormonu wzrostu w dzieciństwie	brak
20	M	normosmia	-	mikropenis	osteoporoza	brak
21	M	normosmia	-	wyrośle przeduszne po stronie lewej	nadwaga; insulinooporność; kamica pęcherzyka żółciowego i polipy; ginekomastia; torbiele najądrzy	brak
22	M	normosmia	-	-	-	brak
23	M	normosmia	-	-	mózgowe porażenie dziecięce; NI; padaczka; DM II, częściowy zespół pustego siodła; stłuszczenie wątroby; otyłość; torbiel nerki	niepełne
24	M	hiposmia	-	-	-	brak
25	M	anosmia	obustronne	ruchy lustrzane rąk; agenezja nerki lewej, mikropenis	astygmatyzm; kamica nerek; żylaki powrózka; dna moczanowa; osteopenia; nadwaga	brak
26	M	anosmia	-	mikropenis	osteopenia; torbiel prosta nerki lewej	brak
27	M	hiposmia	-	-	nadwaga; anemia	brak
28	M	anosmia	obustronne	obsutr. rozszczep wargi i podniebienia	przewlekłe zapalenie oskrzeli; osteopenia; otyłość	brak

<b>Tabela 5.</b> Fenotyp badanych pacjentów z IHH (kontynuacja).						
<b>nr</b>	<b>pleć</b>	<b>węch</b>	<b>wnętrostwo w wywiadzie</b>	<b>wady towarzyszące</b>	<b>dodatkowe choroby</b>	<b>dojrzewanie bez leczenia</b>
<b>29</b>	M	normosmia	nd	niedorozwój lewej połowy twarzy - niedorozwój bez ubytku kości jarzmowej od poziomu piramid do zatok szczękowych włącznie (dotyczący L nozdrza; szczęki; żuchwa; brak gałki ocznej L) - skośny rozczep twarzy ; wyrosła przeduszne przy obu skrawkach małżowin		PBM
<b>30</b>	M	anosmia	wnętrostwo obustronne	zdwojenie układu kielichowo-miedniczkowego	otyłość	niepełne
<b>31</b>	K	anosmia	nd	niepełny zwrot nerki P; hipoplazja macicy i pochwy	krótkowzroczność	PBM
<b>32</b>	K	hiposmia	nd	niedoczynność tarczycy; nadwaga; osteopenia	-	PBM
<b>33</b>	K	hiposmia	nd	zdwojenie układu zbiorczego nerki L; hipoplazja macicy i pochwy;	rozsiane bóle stawowe; NT; zawroty głowy; nadwaga; podostre zapalenie tarczycy; niedoczynność tarczycy	PBM
<b>34</b>	M	normosmia	obustronne	-	padaczka; zaburzenia osobowości; ginekomastia; osteopena; nadwaga	niepełne

Wyjaśnienia zastosowanych w tabeli skrótów:

DM II - cukrzyca typu II; FAS - alkoholowy zespół płodowy; JL - jądro lewe; JP - jądro prawe; K – kobieta, M – mężczyzna; nd - nie dotyczy; NI - niepełnosprawność intelektualna; NT - nadciśnienie tętnicze; OL - oko lewe; OP - oko prawe; PBM - pierwotny brak miesiączki

### 3.2. Badania hormonalne

Badania hormonalne obejmowały ocenę podstawowych stężeń hormonów przysadkowych (LH, FSH) hormonu wzrostu (GH), hormonu adrenokortykotropowego (ACTH), hormonu tyreotropowego (TSH), prolaktyny (PRL), pomiar stężenia testosteronu, estradiolu, kortyzolu porannego, siarczanu dehydroepiandrosteronu (DHEA-S), insulinopodobnego czynnika wzrostu 1 (IGF-1), wolnej trójjodotyroniny (fT3) i wolnej tyroksyny (fT4) w surowicy krwi pobranej na czczo. Oznaczano również stężenie kortyzolu wieczornego (o godzinie 18.00). Pacjenci mieli wykonany test z dożylnym podaniem gonadoliberyny (LHRH, Ferring). W pojedynczych przypadkach test ten wykonany był ambulatoryjnie poza szpitalem, bądź nie był wykonany (w przypadku wcześniej zdiagnozowanego i leczonego pacjenta z wadą węchu bądź inną wadą związaną z IHH, który odmówił odstawienia leków z powodu aktualnie prowadzonej stymulacji spermatogenezy czy obawą przed spadkiem libido i potencji). Test z LHRH wykonywany był przed włączeniem leczenia lub po co najmniej 3 miesięcznym zaprzestaniu pobierania preparatów hormonalnych. Test z gonadoliberyną przeprowadzano z użyciem preparatu LH-RH Ferring (0.1 mg/ml). Analog GnRH w dawce 100 µg podawano dożylnie. Stężenia FSH i LH oznaczano wyjściowo oraz po 30, 60 i 90 minutach od podania analogu. Test interpretowano wg poniższych kryteriów prawidłowej odpowiedzi, biorąc pod uwagę, że w niektórych przypadkach wyjściowe stężenia gonadotropin u pacjentów były bardzo niskie (pomiędzy 0-1 mIU/ml) i stymulowane stężenia gonadotropin pomimo zwiększenia krotności stężenia były mniejsze niż oczekiwano. Normy przyjęto jak omówiono to powyżej: co najmniej półtorakrotny wzrost dla FSH, co najmniej dwukrotny dla LH, choć wzięto pod uwagę, że brak adekwatnej odpowiedzi w zakresie FSH może stanowić wariant normy (118, 119).

W wybranych przypadkach przeprowadzono testy stymulacyjne z użyciem syntetycznej tyreotropiny (TRH Ferring, 200 µg iv. z oznaczeniem TSH w 0, 30 i 60 minucie testu) czy kortykotropiny (CRH Ferring, 100 µg iv. z oznaczeniem ACTH i kortyzolu w 0, 15, 30, 60, 90 minucie testu), zgodnie z charakterystyką produktu leczniczego i zaleceniami producenta.

Stężenie hormonu folikulotropowego (FSH) (mIU/ml) oceniane było metodą ECLIA (elektrochemiluminescencja, Roche Diagnostics) z użyciem biotynylowanego przeciwciała swoistego dla FSH oraz przeciwciała znakowanego rutenem swoistego dla FSH. Norma dla mężczyzn: 1.5-12.4 mIU/ml. Dla kobiet w zależności od fazy cyklu miesiączkowego: faza

folikularna: 3.5 do 12.0, faza owulacyjna 4.7 do 21.5, faza lutealna 1.5 do 8.0, faza postmenopauzalna 26.0 do 135.0 mIU/ml.

Poziom hormonu luteinizującego (LH) (mIU/ml) mierzony był z użyciem ECLIA (Roche Diagnostics) z użyciem biotynylowanego przeciwciała swoistego dla LH oraz przeciwciała znakowanego rutenem swoistego dla LH. Norma dla mężczyzn: 1.7 - 8.6 mIU/ml, dla kobiet w fazie folikularnej 2.5 do 12.5, faza owulacyjna 14.0 do 95.6, faza lutealna 1.0 do 11.5, faza postmenopauzalna 7.5 do 58.5 mIU/ml.

Stężenie prolaktyny (PRL) ( $\mu$ IU/ml) oznaczane było z użyciem ECLIA (Roche Diagnostics) z udziałem biotynylowanego przeciwciała swoistego dla PRL oraz przeciwciała znakowanego rutenem swoistego dla PRL. Norma dla mężczyzn > 18 lat: 85 - 390, norma dla kobiet 70 do 510  $\mu$ IU/ml.

Poziom estradiolu (pg/ml) mierzony był przy pomocy ECLIA (Roche Diagnostics) - metody kompetycyjnej z użyciem biotynylowanych przeciwciał dla E2 i pochodnej E2 znakowanej kompleksem rutenu; w próbówce na skrzep bądź heparynę. Norma dla mężczyzn 11-43 pg/ml, dla kobiet w zależności od cyklu faza folikularna 12-233, faza owulacyjna 41 do 398, faza lutealna 22-341, faza postmenopauzalna <5pg/ml.

Stężenie globuliny wiążącej hormony płciowe (SHBG) (nmol/l) mierzone było przy pomocy ECLIA (Roche Diagnostics) z użyciem biotynylowanego przeciwciała swoistego dla SHBG oraz przeciwciała znakowanego rutenem swoistego dla SHBG. Norma dla kobiet w wieku 17 - 50 lat: 26.1 - 110.0 nmol/l dla mężczyzn w wieku 17 - 65 lat: 14.5 - 48.4 nmol/l.

Pomiar stężenia testosteronu całkowitego (nmol/l) odbywał się metodą ECLIA (elektrochemiluminescencja) - metodą kompetycyjną z użyciem biotynylowanych przeciwciał swoistych dla testosteronu i pochodnej testosteronu znakowanej kompleksem rutenu. Norma dla mężczyzn > 18 lat: 9.9 - 27.8 nmol/l, dla kobiet w wieku rozrodczym: 0.2 do 2.9 nmol/l.

Stężenie tyreotropiny (TSH;  $\mu$ U/ml) oznaczane było metodą ECLIA (Roche Diagnostics) z użyciem biotynylowanych przeciwciał dla TSH i przeciwciał znakowanych rutenem dla TSH. Norma 0.27 - 4.20  $\mu$ U/ml, zaś stężenie tyroksyny wolnej (FT4) (pmol/l) z użyciem ECLIA (elektrochemiluminescencja) z udziałem swoistego, znakowanego rutenem przeciwciała przeciw T4 oraz biotynylowanego T4. Norma > 20 lat: 11.5 - 21.0 pmol/l. Stężenie hormonu adrenokortykotropowego (ACTH; pg/ml) oznaczono metodą: ECLIA (Roche) z użyciem biotynylowanego przeciwciała swoistego dla ACTH oraz przeciwciała znakowanego rutenem swoistego dla ACTH. Zakres referencyjny: 7.20-63.30 pg/ml.

Stężenie kortyzolu (nmol/l) mierzone było metodą ECLIA (Roche Diagnostics) - metodą kompetycyjną z użyciem swoistego, biotynylowanego przeciwciała dla kortyzolu oraz z pochodną kortyzolu znakowaną kompleksem rutenu. Zakres referencyjny: godz. 6-10: 172 - 497 godz. 16-20: 74 - 286 nmol/l.

Stężenie hormonu wzrostu (GH; ng/ml) mierzone było metodą ECLIA (Roche Diagnostics) z użyciem biotynylowanych przeciwciał dla hGH i przeciwciał znakowanych rutenem dla hGH. Zakres referencyjny: kobieta lat: 17 - 77: 0.13 - 9.88 ng/ml, mężczyzna lat: 17 - 79 : 0.03 - 2.47 ng/ml.

Oznaczanie insulinopodobnego czynnika wzrostu (IGF-1, somatomedyny C; ng/ml) oparte było na metodzie RIA – radioimmunologicznej (firma DIASource). Norma zależna od wieku i płci: mężczyźni: 17 - 20 lat: 70 - 758; 20 - 30 lat: 161 - 517; 30 -40 lat: 153 - 489; 40 -54 lat: 90 - 360; > 54 lat: 71 - 290; kobiety: 17 - 20 lat: 135 - 1276; 20 - 30 lat: 170 - 418; 30 -40 lat: 100 - 459; 40 -54 lat: 90 - 360; > 54 lat: 71 - 290 ng/ml.

Stężenie siarczaniu dehydroepiandrosteronu (DHEA-S; µg/dL) mierzone było metodą ECLIA (Roche Diagnostics) z użyciem biotynylowanych przeciwciał dla DHEA-S i przeciwciał znakowanych rutenem dla DHEA-S . Norma zależna od wieku i płci: mężczyźni: 15-19 lat: 70.2 -492; 20 - 24 lat: 211-492; 25-34 lat: 160 - 449; 35-44 lat: 88.9 - 427; 45-54 lat 44.3-331; 55-54 lat 51.7-295; 65-74 lat 33.6-249; >75 lat 16.2-123; kobiety: 15-19 lat: 65.1-368; 20 - 24 lat: 148-407; 25-34 lat: 98.8-340; 35-44 lat: 60.9-337; 45-54 lat 35.4-256; 55-54 lat 18.9-205; 65-74 lat 9.4-246; >75 lat 12-154 µg/dL.

Insulinooproność była oceniana przy pomocy wskaźnika insulinooporności (ang. insulin resistance index, HOMA-IR). HOMA-IR został wyliczony przy pomocy wzoru: stężenie insuliny na czczo (µU/L) x stężenie glukozy na czczo (mg/dL)/405. Przy wartości wskaźnika HOMA-IR $\geq$ 2.5 diagnozowano insulinooporność (182).

### **3.3. Badanie węchu**

Wszyscy pacjenci niezależnie od raportowania zaburzeń węchu w wywiadzie mieli przeprowadzone przedmiotowe badanie węchu. W wywiadzie uwzględniono: istnienie i czas trwania zaburzeń węchu, skalę zaburzeń zmysłu węchu, ewentualne narażenie na substancje toksyczne, urazy i operacje twarzoczaszki i mózgowiczaszki w przeszłości. W badaniu laryngologicznym poprzedzającym właściwe badanie węchu oceniono drożność nosa, stan śluzówki nosa, obecność wydzieliny patologicznej. Badania nie wykonywano w momencie przejściowych zaburzeń drożności nosa spowodowanych nieżytem nosa.

Do oceny węchu została użyta metoda podmuchowa Elsberga-Levy'ego w modyfikacji Pruszewicza (183, 184). W badaniu powonienia wykorzystano cztery następujące substancje zapachowe: kawę naturalną, anyż, olejek cytrynowy i miętę. U każdego badanego w obu przewodach nosowych wyznaczano progi odczucia zapachu poszczególnych substancji wonnych. Metoda podmuchowa Elsberga – Levy'ego jest najczęściej używaną i najdostępniejszą w Polsce metodą badania węchu. Zestaw używany w tym badaniu składa się z czterech wystandaryzowanych pojemników szklanych, w których znajdują się wyżej wymienione cztery różne substancje zapachowe. W Szpitalu Klinicznym im. H. Święckickiego w Poznaniu stosowane są butelki z ciemnego szkła o pojemności 750 ml. W korkach szczelnie zamkniętych butelek znajdują się po 2 otwory, przez które przechodzą szklane rurki do których podłączone są plastikowe dreny zaopatrzone w metalową końcówkę donosową (umieszczaną w przedsionku nosa) i zacisk regulujący strumień powietrza (pierwszy dren) oraz w strzykawkę (drugi dren). Do jamy nosa kierowano strumień powietrza, o określonej objętości, zawierające cząsteczki zapachowe. Pacjent jednocześnie uciskając skrzydełko nosa zamykał palcem drugi przewód nosowy i wstrzymał oddech. Na dren doprowadzający powietrze do jamy nosa zakładano zacisk, zwalniany podczas zmiany objętości podawanego powietrza. Na początku podawano do jamy nosa 1 cm<sup>3</sup> powietrza, zwiększając objętość o kolejne 1-2 cm<sup>3</sup> nie częściej niż co 30 sekund do czasu gdy pacjent zgłosił odczuwanie zapachu. Próbę kontynuowano do momentu, gdy zapach został zidentyfikowany przez pacjenta. Wynik przedstawiono w postaci progu odczuwania zapachu – czyli najmniejszej objętości powietrza podanego do jamy nosa, przy której badany zgłosił odczucie zapachu - i progu identyfikacji zapach.

Zgodnie z Pruszewiczem przyjęto normy progu odczuwania zapachu (POZ) dla:

- kawy i olejku anyżowego – 4 – 14 cm<sup>3</sup>,
- olejków cytrynowego i miętowego 1 – 10 cm<sup>3</sup>.

Anosmię i hiposmię diagnozowano wg. kryteriów z poniższej tabeli (Tabela 6):

**Tabela 6.**

Kryteria diagnostyczne hiposmii i anosmii w badaniu węchu metodą podmuchową Elsberga-Levy'ego w modyfikacji Pruszewicza.

Zaburzenie węchu	Definicja	POZ dla kawy i olejku anyżowego	POZ dla olejku cytrynowego i miętowego
Hiposmia	obniżony węch,	14 – 40 cm <sup>3</sup>	10 – 40 cm <sup>3</sup>

	upośledzenie odczuwania zapachów		
<b>Anosmia</b>	brak węchu	>40 cm <sup>3</sup>	>40 cm <sup>3</sup>

POZ - próg odczuwania zapachu

Przeprowadzenie testu miało na celu podzielenie chorych na 2 grupy – z jakimkolwiek rodzajem dysosmii do zespołu Kallmanna (ZK) i z normalnym zmysłem węchu – do grupy pacjentów z normosmiczną postacią IHH (nIHH). Jest to istotne ze względu na różnorodność obrazu klinicznego i konieczność dokładnego określenia fenotypu pacjenta. Mutacje w tym samym genie mogą być prezentowane jako ZK lub nIHH.

### **3.4. Badania genetyczne**

#### **3.4.1. Izolacja DNA**

Celem izolacji genomowego DNA pobrane zostało 10 ml krwi obwodowej na do probówki z EDTA (stężenie końcowe 0.1%) bądź 2 ml śliny do dedykowanej saliwetki (zestaw Oragene bądź Norgen) po uprzednim uzyskaniu pisemnej zgody pacjenta. DNA izolowane z limfocytów krwi obwodowej lub leukocytów śliny posłużyło jako wyjściowy materiał do badań molekularnych. Stosowano izolację DNA za pomocą metody z wykorzystaniem fenolu-chloroformu, co miało zapewnić materiał w adekwatnej ilości i o jak najlepszej jakości. Wyizolowane DNA, odpowiednio zabezpieczone i oznaczone było przechowywane w temperaturze -20<sup>0</sup>C do czasu sekwencjonowania. Ilość i jakość DNA były ustalane spektrofotometrycznie .

#### **3.4.2. Ogólne założenia badania**

Badania odbywały się w Pracowni Endokrynologii Molekularnej w Katedrze i Klinice Endokrynologii, Przemiany Materii i Chorób Wewnętrznych Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Badania genetyczne wykonywano z użyciem platformy sekwencyjnej następnej generacji (NGS) o średniej przepustowości.

Sekwencjonowanie dedykowanego panelu genów związanych z IHH zostało wykonane na aparacie Ion Torrent Personal Genome Machine (Ion PGM)<sup>TM</sup> (Thermo Fisher Scientific, Inc.) i obejmowało następujące etapy, opisane dokładnie poniżej:

#### **1. Selekcja i synteza oligonukleotydów dla panelu genów do sekwencjonowania następnej generacji (NGS) wg protokołu Ion AmpliSeq;**

2. Przygotowanie biblioteki genomowej (amplifikacja oraz wzbogacenie z zastosowaniem emulsyjnego PCR);

3. Sekwencjonowanie na platformie Ion PGM;

4. Analiza sekwencji. Walidacja wybranych mutacji za pomocą sekwencjonowania kapilarnego metodą Sanger (ang. Sanger Sequencing).

Panel genów do badań został zaprojektowany przy użyciu algorytmu opracowanego przez Thermo Fisher Scientific pozwalającego na optymalnego zaprojektowanie par primerów o długości do 400 pz. (narzędzia dostępne poprzez stronę <http://www.ampliseq.com>). Ostatecznie wybrano regiony kodujące następujących genów uczestniczących w patogenezie IHH: *ANOS1*, *CHD7*, *FEZF1*, *FGF8*, *FGFR1*, *GLI2*, *GNRH1*, *GNRHR*, *HS6ST1*, *IL17RD*, *KISS1*, *KISS1R*, *LHX3*, *LHX4*, *LRRIQ3*, *NSMF*, *NR0B1*, *OTX1*, *OTX2*, *PROK2*, *PROKR2*, *PROPI*, *SEMA3A*, *SOX10*, *TAC3*, *TACR3*, *WDR11* (Tabela 7). Wybrano geny, których mutacje najczęściej leżą u podłoża IHH, a także zaproponowano geny, których mutacje opisywane są w patogenezie CPHD celem poszerzenia wiedzy na temat udziału tych czynników w patogenezie IHH. Finalne pokrycie sekwencji kodujących ampikonami wyniosło 97-100%.

**Tabela7.**

Panel 27 genów o udowodnionym bądź podejrzewanym znaczeniu klinicznym w IHH

gen	lokalizacja	OMIM ID	opis	dziedziczenie
<i>ANOS1</i>	Xp22.31	300836	IHH z anosmią	XL
<i>CHD7</i>	8q12.2	608892	IHH z lub bez anosmii, Zespół CHARGE	AD, AR
<i>FEZF1</i>	7q31.32	613301	IHH z lub bez anosmii	AR
<i>FGF8</i>	10q24.32	600483	IHH z lub bez anosmii	AD
<i>FGFR1</i>	8p11.23	136350	IHH z lub bez anosmii	AD
<i>GLI2</i>	2q14.2	165230	Holprosencephalia, CPHD	AD
<i>GNRH1</i>	8p21.2	152760	IHH bez anosmii	AR
<i>GNRHR</i>	4q13.2	138850	IHH bez anosmii	AR
<i>HS6ST1</i>	Xq26.2	604846	IHH z lub bez anosmii	AD
<i>IL17RD</i>	3p14.3	606807	IHH z lub bez anosmii	AD, AR
<i>KISS1</i>	1q32.1	603286	IHH z lub bez anosmii	AR
<i>KISS1R</i>	19p13.3	604161	IHH z lub bez anosmii	AR
<i>LHX3</i>	9q34.3	600577	CPHD	AR
<i>LHX4</i>	1q25.1	602146	CPHD	AD
<i>LRRIQ3</i>	1p31.1	- (RefSeq NM_001105659)	Opóźnione dojrzewanie, niepełnosprawność intelektualna	AD
<i>NSMF</i>	9q34.3	608137	IHH z lub bez anosmii	AD
<i>NR0B1</i>	Xp21.2	300473	IHH z lub bez anosmii	XL

gen	lokalizacja	OMIM ID	opis	dziedziczenie
<i>OTX1</i>	2p15	600036	opóźnienie wzrostu i dojrzewania płciowego u myszy; udział w embriogenezie przysadki (185, 186)	nieznane
<i>OTX2</i>	14q22.3	600037	CPHD	AD
<i>PROK2</i>	3p13	607002	IHH z lub bez anosmii	AD
<i>PROKR2</i>	20p12.3	607123	IHH z lub bez anosmii	AD
<i>PROPI</i>	5q35.3	601538	CPHD	AR
<i>SEMA3A</i>	7q21.11	603961	IHH z lub bez anosmii	AD
<i>SOX10</i>	22q13.1	602229	IHH z anosmią, zespół Waardenburga	AD
<i>TAC3</i>	12q13.3	162330	IHH z lub bez anosmii	AR
<i>TACR3</i>	4q24	162332	IHH z lub bez anosmii	AR
<i>WDR11</i>	10q26.12	606417	IHH z lub bez anosmii	AD

Wyjaśnienia zastosowanych w Tabeli 7 skrótów:

AD - dziedziczenie autosomalne dominujące

AR - dziedziczenie autosomalne recesywne

XL - dziedziczenie sprzężone z chromosomem X

OMIM ID - numer identyfikacyjny genu w wersji elektronicznej bazy Mendlowskie zaburzenia u człowieka (ang. *Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM*)

## 2. Przygotowanie biblioteki i wzbogacenie sparowanych próbek DNA

Pierwszym krokiem było wygenerowanie biblioteki genomowej badanych fragmentów DNA każdego pacjenta i ligacja ze specyficznymi adapterami Ion Torrent (ang. *barcoding*). Konstrukcja biblioteki i późniejsze wzbogacenie sparowanych próbek DNA zostało wykonane z użyciem systemu *Ion OneTouch* (Thermo Fisher Scientific, Inc.), zgodnie z protokołem producenta (Thermo Fisher, San Diego, USA, MAN0006735). Wykorzystano około 40 ng genomowego DNA od każdego pacjenta i zestaw Ampliseq Library Preparation Kit 2.0 (Thermo Fisher, San Diego, USA, MAN0006735).

Przygotowanie biblioteki obejmowało następujące etapy:

- amplifikację metodą reakcji łańcuchowej polimerazy, PCR docelowego genomowego DNA (próbki zostały poddane aktywacji enzymatycznej w 99°C przez 2 minuty, następnie 17 cyklom PCR - wstępnej denaturacji cieplnej w 99°C przez 15 sekund i przyłączaniu starterów i wydłużaniu w 60°C przez przez 4 minuty);
- częściowe trawienie sekwencji primerowych;
- ligację adapterów Ion Torrent do aplikonów i oczyszczanie niezamplifikowanej biblioteki;

- analizę ilościową każdej zamplifikowanej biblioteki z użyciem Fluorymetru Qubit 2.0. (Cat. no Q32866) i zestawu Qubit dsDNA HS Assay Kit na podstawie 5 uL produktu PCR;
- ustalenie właściwego rozcieńczenia i rozcieńczenie biblioteki z użyciem MilliQ superczystej wody celem uzyskania stężenia około 100pM.
- finalne wzbogacenie biblioteki - klonalna amplifikacja została wykonana z zastosowaniem emulsyjnego PCR (emPCR); 25 mikrolitrów każdej próbki zostało wzbogaconych z użyciem maszyny One-Touch Two (OT2) i zestawem wzbogacającym Ion PGM™ Template OT2 400 (Thermo Fisher) celem przygotowania do sekwencjonowania cząsteczek aktywnych posiadających sekwencje kodujące (ang. Template-positive Ion Sphere Particles.)

Biblioteka po przygotowaniu była przechowywana w temperaturze -20°C. Produkty PCR poszczególnych pacjentów zostały oznaczone przy użyciu zestawu Ion Xpress Barcode Adapter 1–96 kit.

### **3. Sekwencjonowanie następnej generacji (NGS)**

Tak przygotowana biblioteka została rozcieńczona do 100 pM. Do bezpośredniego sekwencjonowania zastosowano Ion PGM Sequencing 400 Kit i chip sekwencyjny: Ion 318 v2. Zastosowanie Ion 318 gwarantuje teoretyczne pokrycie >200x na pojedynczy fragment. Średnie pokrycie w wykonanym eksperymencie wyniosło 199.8x. Po wygenerowaniu danych w sekwenatorze Ion PGM™ dane zostały automatycznie przesłane do serwera Torrent. Dane były poddane przetwarzaniu sygnału, filtracji i algorytmom bazowym generując sekwencje DNA o wysokiej jakości (pliki SAM/BAM oraz następnie VCF).

### **4. Analiza sekwencji i walidacja mutacji**

Analiza otrzymanych sekwencji została wykonana za pomocą dedykowanych programów (np. IONReporter, Mutation Taster, PhenIX) oraz ogólnodostępnych narzędzi bioinformatycznych służących analizie porównawczej (Ensembl, NCBI). Odczytane sekwencje zostały zmapowane do genomu ludzkiego (GRCh37/hg19) z użyciem Torrent Suite™ software (version 4.0.2; Thermo Fisher Scientific, Inc.).

Informacje o znanych mutacjach uzyskiwano z genetycznych, ogólnodostępnych baz danych np. GenBank, ClinVar, HGMD lub baz genomowych (1000 genomes, 5000 exomes, ExAc). Programu PhenIX użyto za pośrednictwem strony internetowej <http://compbio.charite.de/PhenIX/> © 2014, Exomiser team: Charité Universitätsmedizin

Berlin, Institute for Medical Genetics and Human Genetics, Computational Biology and Bioinformatics Group and Sanger Mouse Informatics Group at the Sanger Institute (187). Analizowano pliki VCF pod kątem mutacji patogennych. Filtrowanie mutacji oparto o wykorzystanie algorytmu HPO standaryzowanego słownika zaburzeń fenotypowych ang. *Human Phenotype Ontology* (HPO) stosując termin "*hypogonadotropic hypogonadism*" (187). Do programu wczytano uzyskane pliki VCF. Algorytm MutationTaster użyto za pośrednictwem strony <http://www.mutationtaster.org/StartQueryEngine.html> (188). Do programu również wczytano pliki VCF. Program bazuje na klasyfikacji Bayesa celem oceny stopnia patogenności zmian genetycznych, zarówno polimorfizmów jak i mutacji przyczynowych. Klasyfikacja ta opiera się między innymi na wykorzystaniu danych z HGMD Professional i projektu 1000 Genomes. Zmiany genetyczne klasyfikowane są na podstawie braku zmiany sekwencji aminokwasowej (zmiany niesynonimiczne i intronowe) bądź złożoności zmiany sekwencji aminokwasowej (zmiana pojedynczego aminokwasu bądź złożona zmiana sekwencji aminokwasowej). Wartość prawdopodobieństwa (p; ang. p value) jest prawdopodobieństwem prognozy, tj. im p bliższe 1, tym wyższa pewność prognozy programu. Niskie wartości p często wiążą się z polimorfizmami. Zmiana powodująca przedwczesną terminację transkrypcji (kodon terminacyjny) i w następstwie rozpoznawanie i niszczenie mRNA (ang. *nonsense mediated decay*, NMD), znacząca zmiana konformacji białka oraz mutacje tyłu "splice-site" wprowadzające nowe sygnały redagowania białka są określane jako zmiana powodująca chorobę (ang. *disease causing*, DC). Zmiana już opisana w ClinVar, HGMD, TGP, dbSNP jako mutacja przyczynowa badanej choroby jest określana jako automatyczna zmiana powodująca chorobę (ang. *disease causing automatic*).

Po porównywaniu każdy wariant został przeanalizowany pod kątem nomenklatury HGVS (Human Genome Variant Society), częstości populacyjnej w Europie wg. ExAC, statusu w ClinVar oraz funkcji i konserwatywności ewolucyjnej. Katalog opisanych mutacji stanowiła baza danych HGMD. Przy ocenie patogenności, uwzględniono następujące kryteria:

- rodzaj mutacji, wpływ na konformację białka, konsekwencja zmiany struktury i funkcji odpowiedniego białka,
- liczba mutacji allelicznych obserwowana w kohorcie pacjentów o podobnym fenotypie,
- ewolucyjna konserwatywność zmutowanego nukleotydu/aminokwasu,
- lokalizacja mutacji w stosunku do funkcjonalnie ważnych domen białkowych.

Dane te zostały skonfrontowane z danymi z dwóch wyżej opisanych programów analizujących mutacje (Mutation Taster i PhenIX). Warunkiem uwzględnienia mutacji była także częstość rzadkiego allelu MAF ang. minor allele frequency (189) <1% w Europejskiej populacji w bazie ExAC (Exome Aggregation Consortium). W oparciu o wytyczne opracowane przez Amerykańskie Kolegium Genetyki i Genomiki Medycznej (ang. *American College of Medical Genetics and Genomics*, ACMG) do oceny patogenności zidentyfikowanych mutacji posłużono się następującą klasyfikacją: wariant patogenny (ang. *pathogenic variants*, PV), prawdopodobnie patogenny wariant (ang. *likely pathogenic variants*, LPV) i wariant o nieokreślonym znaczeniu (ang. *variants of unknown significance*, VUS) (190).

Wariant został zakwalifikowany jako PV jeśli:

- jest mutacją zmiany funkcji wywołującym chorobę (ang. "*null mutation*") - mutacja nonsensowna, przesuująca ramkę odczytu, mutacja splicingowa,
- lub jest wcześniej zaraportowaną mutacją typu zmiana sensu (ang. *missense mutation*),
- i zmiana pasuje do fenotypu i (przewidywanego) modelu dziedziczenia.

Wariant został zakwalifikowany jako LPV jeśli:

- jest wcześniej nie raportowaną mutacją zmiany sensu dotycząca znanych genów leżących u podłoża IHH,
- w algorytmach predykcji *in silico* uznawany był za zmianę wpływającą na konformację białka,
- zmiana pasuje do fenotypu i modelu dziedziczenia.

Wariant został zakwalifikowany jako VUS jeśli:

- fenotyp pacjenta nie pasuje do spektrum zmian klinicznych które powinna dawać dana mutacja,
- w algorytmach predykcji *in silico* zmiana uznawana jest za wpływającą na konformację białka,
- lub zmiana pasująca do fenotypu i modelu dziedziczenia ale została uznana za łagodną w ClinVar bez eksperymentów *in vitro* czy *in vivo* (190).

W przypadku identyfikacji defektu przyczynowego, wybrane mutacje genetyczne zostały potwierdzone za pomocą konwencjonalnych metod takich jak sekwencjonowanie kapilarne. Mutacje w nowoodkrytych genach zostały poddane analizie *in silico* w celu oceny wpływu zmiany na architekturę białka, oceny jego funkcjonalności oraz potencjalnego

zaangażowania w ekspresję nieprawidłowego fenotypu. Analiza *in silico* patogenności wykrytych wariantów została wykonana za pomocą programów PolyPHEN oraz Sift (sekwencje kodujące), SpliceSite (sekwencje intronowe).

### **3.5. Zgoda Komisji Bioetycznej. Finansowanie.**

Zgoda Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym w Poznaniu została przyznana decyzją uchwały numer 1002/13 z dnia 05.12.2013 r. i 990/15 z dnia 05.11.2015 r.

Badania finansowane w ramach grantu Preludium NCN 2016/21/N/NZ5/00511 pt. „Poszukiwanie nowych czynników genetycznych biorących udział w etiopatogenezie izolowanego hipogonadyzmu hipogonadotropowego przy użyciu zaawansowanych metod analizy genomu”

## 4. Wyniki badań

### 4.1. Wyniki badań hormonalnych

Wyniki pomiarów podstawowych i maksymalnych stymulowanych stężeń gonadotropin w teście z gonadoliberyną oraz wartości obwodowych hormonów płciowych (odpowiednio testosteronu u mężczyzn i estradiolu u kobiet) zamieszczono w Tabeli 8. Tabela ta przedstawia korelacje wyników badań genetycznych i hormonalnych w odniesieniu do badania osi podwzgórze-przysadka-jądra bądź podwzgórze-przysadka-jajnik.

Większość pacjentów miała zachowaną odpowiedź w teście z GnRH. Wartości wyjściowe i stymulowane gonadotropin obserwowane u badanych pacjentów były stosunkowo niskie w porównaniu z wartościami obserwowanymi zwykle u pacjentów zdrowych, pomimo zachowanej krotności wzrostu stężenia danej gonadotropiny. Tylko u pacjenta nr 19 ze zmianami patogennymi genów *CHD7* i *GNRHR* i u pacjenta nr 22 z mutacją w *GNRHR* nie obserwowano adekwatnego wzrostu gonadotropin w teście z GnRH.

Wyniki badań stężeń testosteronu, SHBG i FTI zamieszczono w Tabeli 8. Trzynastu pacjentów (45%) miało wartości stężenia testosteronu <10 nmol/l w trakcie oznaczenia przy wizycie lekarskiej (80%). Siedmiu pacjentów nie odstawiło preparatów testosteronu przed badaniami kontrolnymi (test z GnRH wykonany w przeszłości najczęściej), podobnie jedna pacjentka nie dostawiła preparatu hormonalnej terapii zastępczej przed kontrolą. Cztery pozostałe badane pacjentki (80% badanych pacjentek) miały wartości stężenia estradiolu <15 pg/ml, w tym dwie poniżej 5 pg/ml.

Wyniki innych badań hormonalnych zamieszczono w Tabeli 9. Prezentacja szerszych wyników hormonalnych ma na celu pokazanie, że pacjenci nie mieli niedoczynności przysadki w innych osiach w momencie badania, choć dwóch z nich miało w dzieciństwie leczoną hormonem wzrostu niskorosłość (pacjenci nr 12, 19). U pacjentów wykluczono też inne przyczyny hipogonadyzmu takie jak choroba i zespół Cushinga czy akromegalia.

Wyniki podsumowujące istnienie innych zaburzeń hormonalnych u badanych pacjentów przedstawiono w Tabeli 11. Czterech pacjentów (12%) miało zdiagnozowaną wcześniej lub w momencie kontroli pierwotną niedoczynność tarczycy. Sześciu pacjentów (18%) miało zdiagnozowaną insulinooporność, a jeden pacjent miał już wcześniej rozpoznaną cukrzycę insulinoniezależną (typu II).

**Tabela 8.**

Odpowiedź w teście z GnRH w zakresie gonadotropin i stężenie obwodowych hormonów płciowych.

nr	FSH 0' (mIU/ml)	FSH max w teście z GnRH (mIU/ml)	LH 0' (mIU/ml)	LH max w teście z GnRH (mIU/ml)	Testosteron (nmol/l)	SHBG (nmol/l)	FTI (%)	Estradiol (pg/ml) u kobiet
1.	0.6	4.1	<0.1	2.3	0.3	108.2	0.29	
2.	3.4	6.4	3.1	16.3	3.5	12.1	28.9	
3.	1.11	4.53	0.7	12.19	2.3	bd	bd	
3. odwrócenie	1.5	2.7	1.8	13.5	14	bd	bd	
4.	0.6	1.1	1.1	5.0	2.1	48.2	4.36	
4. odwrócenie	1.4	bd	3.6	bd	16	39.3	40.64	
5.	0.2	bd	<0.1	bd	47.2*	39.9	118.33	
6.	0.4	1.1	0.3	4.5	0.3	78.3	63.66	
7.	0.21	1.6	0.1	1.35	1.21	bd	bd	

nr	FSH 0' (mIU/ml)	FSH max w teście z GnRH (mIU/ml)	LH 0' (mIU/ml)	LH max w teście z GnRH (mIU/ml)	Testosteron (nmol/l)	SHBG (nmol/l)	FTI (%)	Estradiol (pg/ml) u kobiet
8.	<0.1	<0.1*	<0.1	<0.1*	16.8*	38.2	44.03	
9.	3.9	9.1	5	36.2	5.1	11.3	45.33	
10.	0.3	1.3	0.2	8.1	0.1	28.8	0.43	
11.	<0.1	bd*	<0.1	bd*	11.3	9.8	114.84	
12.	1.3	2.8	1	11	2.1	29	7.37	
13.	0.1	bd*	0.1	bd*	11.8*	17.1	68.83	
14.	0.293	bd*	0.1	bd*	bd	bd	T wolny 46.2 pg/ml	
15.	0.2	1.4	<0.1	0.7	3.2	35.5	9.12	
16.	0.536	1.32	0.1	1.36	1.04	30	4.17	
17.	<0.1	bd*	<0.1	bd*	17.5*	60.3	28.97	
18.	0.22	0.67	<0.1	0.3	1.4	54.4	2.5	<5

nr	FSH 0' (mIU/ml)	FSH max w teście z GnRH (mIU/ml)	LH 0' (mIU/ml)	LH max w teście z GnRH (mIU/ml)	Testosteron (nmol/l)	SHBG (nmol/l)	FTI (%)	Estradiol (pg/ml) u kobiet
19.	0.6	0.63	0.65	0.76	0.9	bd	44.4	
20.	0.7	1.4	0.4	2.6	0.6	91.2	0.69	
21.	0.2	test ambulatoryjnie*	<0.1	bd*	16.7*	25.5	65.61	
22.	0.63	0.63	0.67	0.76	8.1	17.4	46.55	
23.	5	7	4.7	8.9	9.8	17.4	56.25	
24.	1.5	4.2	0.4	1.9	3	bd	bd	
25.	0.4	2.3	<0.1	2.3	0.9	59.1	1.58	
26.	1.5	4.2	0.6	9.6	0.4	bd	bd	
27.	0.2	1.3	<0.1	1.6	18.5*	bd	bd	
28.	0.1	bd*	0.1	bd*	23.2*	87.5	26.46	
29.	0.2	0.8	0.4	1.8	0.6	bd	bd	9

nr	FSH 0' (mIU/ml)	FSH max w teście z GnRH (mIU/ml)	LH 0' (mIU/ml)	LH max w teście z GnRH (mIU/ml)	Testosteron (nmol/l)	SHBG (nmol/l)	FTI (%)	Estradiol (pg/ml) u kobiet
30.	1.09	4.64	1.22	8.95	6.6	50.5	73.85	
31.	2.4	8.8	0.2	7.1	bd	bd	bd	13
32.	1.3	3.2	0.6	6	1.4	85.8	1.63	<5
33.	0.1	bd*	<0.1	bd*	0.2	78.3	0.22	42*
34.	0.7	2.7	0.4	3.4	1.4	35.7	4.03	

FSH 0' - wyjściowe stężenie folikulotropiny

FSH max w teście z GnRH - - maksymalne stężenie folikulotropiny w teście z syntetyczną gonadoliberyną

FTI - wskaźnik wolnego testosteronu

LH 0' - wyjściowe stężenie lutropiny

LH max w teście z GnRH - maksymalne stężenie lutropiny w teście z syntetyczną gonadoliberyną

nr - numer identyfikacyjny pacjenta

SHBG - globulina wiążąca hormony płciowe

\* - pacjent odmówił odstawienia leków celem wykonania testu z gonadoliberyną bądź nie zgodził się wogóle na wykonanie testu z gonadolibery

**Tabela 9.**

Wyniki innych badań hormonalnych.

nr	pleć	TSH (uU/ml) N: 0.27- 4.20	fT3 (pmol/l) N: 3.90- 6.70	fT4 (pmol/l) N: 11.5- 21.0	PRL (uIU/ml) N: 70-510	DHEA-S (ug/dl) ***	E2 (pg/ml) ****	ACTH (pg/ml) N: 7.20- 63.30	kortyzol 8 (nmol/l) N: 172- 497	kortyzol 18 (nmol/l) N:74-286	HGH (ng/ml) N: 0.13- 9.88	IGF1 (ng/ml) *****
1.	M	0.94	6.19	15.85	308	188	<5	64.3	376	261	0.32	292
2.	M	2.9	5.53	18.39	165	280	<5	26.99	348	236	0.03	364
3.	M	2.44	5.71	16.15	338.4	362.3	23.45	40.59	485.4	245.6	1.3	274
4.	M	2.39	5.3	12.66	722	175	12.03	22	516	155	bd	bd
5.	M	2.67	7.33	19.21	209	161	28	21.01	236	72	2.17	298
6.	M	1.63	6.28	19.47	132	206	<5	24.82	126	106	0.57	200
7.	M	2.39	5.73	17	198.7	336.3	20	64.75	497	273	1.3	240
8.	M	0.91	5	14.92	442	401	15	50.77	585	94	9.18	270
9.	M	0.67	5.54	13.63	258	212	11.39	32.2	623	44	bd	465
10.	M	1.93	6.66	17.21	109	161	<5	25.6	411	390	bd	454
11.	M	2.1	5.61	16.06	276	291	30	30.9	448	121	0.05	426
12.	M	3.04	4.77	12.67	260	268	<5	38.1	467	196	<0.03	139
13.	M	1.04	5.56	15.71	220	448	18	31.06	335	bd	0.1	314
14.	M	1.13	bd	19.03	179.4	207.4	76	19.2	384.8	196.5	1	134
15.	M	5.72	5.2	15.34	210	592	bd	24.74	305	395	0.03	137
16.	M	2.2	4.15	15.47	326	249	<5	22.25	446	59	0.1	91
17.	M	2.74	5.78	17.27	146	517	41	22.21	351	167	0.07	151
18.	K	0.99	5.58	15.68	285	271	59	31.2	660	351	1.04	166
19.	M	1.7	5.16	17.93	89	252.7	bd	67.5	662	146	bd	148

nr	pleć	TSH (uU/ml) N: 0.27- 4.20	fT3 (pmol/l) N: 3.90- 6.70	fT4 (pmol/l) N: 11.5- 21.0	PRL (uIU/ml) N: 70-510	DHEA-S (ug/dl) **	E2 (pg/ml) ***	ACTH (pg/ml) N: 7.20- 63.30	kortyzol 8 (nmol/l) N: 172- 497	kortyzol 18 (nmol/l) N:74-286	HGH (ng/ml) N: 0.13- 9.88	IGF1 (ng/ml) *****
20.	M	3.5	5.58	18.57	251	122	bd	57.62	632	282	0.03	340
21.	M	3.8	6.89	14.2	251	228	25	37.75	177	158	0.1	668
22.	M	1.2	5.01	16.48	271	252.7	40.47	67.5	744	215	bd	bd
23.	M	2.46	5.62	15.96	101	338	36	bd	272	107	<0.03	bd
24.	M	3	5.79	16.57	302	bd	28.02	61	320	150	1.9	bd
25.	M	2.21	4.8	15.72	81	313	bd	15.17	336	129	5.15	111
26.	M	2.86	6.54	14.08	175	123	7.04	22.2	298	bd	0.5	694
27.	M	2.49	5.66	9.23	330	324	bd	bd	524	227	bd	bd
28.	M	1.67	5.09	13.13	223	202	15	34.61	358	bd	0.65	127
29.	K	1.77	5.45	19.13	276	159	68.7	30.9	672	424	bd	558
30.	M	1.8	6.32	13.84	52.0	329	bd	16.4	520	170	0.83	bd
31.	K	2.85	5.11	20.11	191	391	13	54.03	538	119	24.82*	172
32.	K	3.64	3.88	14.8	369	165	5	37.7	532	262	0.7	398
33.	K	5.46	5.19	17.65	205	78	42	13.24	271	133	2.29	105
34.	M	1.26	4.73	18.14	164	325	<5	21.4	516	155	0.68	235

nr- numer identyfikacyjny pacjenta \* w teście hamowania z 75 g glukozy GH<1 ng/ml

\*\* norma dla DHEA-S zależna od wieku i płci: mężczyźni: 15-19 lat: 70.2 -492; 20 - 24 lat: 211-492; 25-34 lat: 160 - 449; 35-44 lat: 88.9 - 427; 45-54 lat 44.3-331; 55-54 lat 51.7-295; 65-74 lat 33.6-249; >75 lat 16.2-123; kobiety: 15-19 lat: 65.1-368; 20 - 24 lat: 148-407; 25-34 lat: 98.8-340; 35-44 lat: 60.9-337; 45-54 lat 35.4-256; 55-54 lat 18.9-205; 65-74 lat 9.4-246; >75 lat 12-154µg/dL.

\*\*\* norma dla E2 zależna od wieku, płci i fazy cyklu miesięczkowego u kobiet; norma dla mężczyzn 11-43 pg/ml, dla kobiet w zależności od cyklu faza folikularna 12-233, faza owulacyjna 41 do 398, faza lutealna 22-341, faza postmenopauzalna <5pg/ml.

\*\*\*\*\* norma IGF-1 zależna od wieku i płci: mężczyźni: 17 - 20 lat: 70 - 758; 20 - 30 lat: 161 - 517; 0 -40 lat: 153 - 489; 40 -54 lat: 90 - 360; > 54 lat: 71 - 290 kobiety: 17 - 20 lat: 135 - 1276; 20 - 30 lat: 170 - 418; 30 -40 lat: 100 - 459; 40 -54 lat: 90 - 360; > 54 lat: 71 - 290 ng/ml

## 4.2. Wyniki badań obrazowych

Wyniki badań ultrasonograficznych jąder zamieszczono w Tabeli 10. Objętość jąder wg badania USG <15 ml miało 19 pacjentów (66%), w tym 13 pacjentów miało objętość jąder <5 ml. Średnia objętość jąder u pacjentów wynosiła 6,5 ml. Trzeba pamiętać przy interpretacji wyników tych badań, że część pacjentów była leczona preparatami testosteronu bądź ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej (HCG) przed wykonanym kontrolnie badaniem USG jąder, a w piśmiennictwie opisuje się statystycznie istotne zwiększenie objętości jąder u pacjentów leczonych tymi lekami, w szczególności HCG (191, 192).

**Tabela 10.**

Wyniki badania ultrasonograficznego jąder.

nr	V JP (ml)	V JL (ml)	sumaryczna V jąder (ml)	dane dodatkowe
1	0.282	stan po usunięciu jądra z powodu wnętrstwa	0.282	-
2	11.02	9.804	20.82	-
3	2.024	2.288	4.31	-
3	4.8	5.2	10	-
4	12.18	13.65	25.83	-
4	17.86	18.56	36.42	-
5	1.04	1.08	2.12	obustronnie obniżona echogeniczność
6	7.86	5.95	13.81	-
7	0.16	0.14	0.30	-
8	15.7	15.69	31.39	-
9	6.04	3.6	9.64	-
10	6.94	6.55	13.49	-
11	9.7	8.31	18.01	obustronnie obniżona echogeniczność, liczne mikrozwapnienia
12	5.72	1.68	7.4	-
13	0.3	0.3	0.6	-
14	bd	bd	bd	bd
15	0.9	0.95	1.85	przepuklina mosznowa po stronie prawej
16	0.945	2.43	3.38	obustronnie obniżona echogeniczność
17	5.184	4.959	10.14	obustronnie niewielkie torbiele najądrzy
19	0.34	0.49	0.83	-

nr	V JP (ml)	V JL (ml)	sumaryczna V jąder (ml)	dane dodatkowe
20	3.3	3.6	6.9	-
21	4.56	4.08	8.64	niewielkie torbiele najądrza prawego
22	0.67	0.77	1.44	-
23	9.18	12.4	21.58	-
24	2.64	2.5	5.14	-
25	0.34	0.42	0.76	obustronnie zmiany zejściowe w przebiegu wodniaka jądra
26	3.825	2.7	6.53	niewielkie mikrozwapnienia obustronnie
27	jądra hipoplastyczne		bd	obustronnie obniżona echogeniczność
28	0.05	0.064	0.11	najądrza prawidłowej wielkości
30	2.048	0.864	2.904	liczne mikrozwapnienia obustronnie
34	0.71	0.55	1.26	najądrza małe

nr- numer identyfikacyjny pacjenta

### Tabela 11.

Wyniki badania rezonansu magnetycznego przysadki i obecność innych towarzyszących zaburzeń hormonalnych.

nr pacjenta	obraz przysadki w MRI	inne zaburzenia hormonalne
1	hipoplazja PPP	-
2	hipoplazja PPP	IR, PNT
3	hipoplazja PPP	-
4	prawidłowa wielkość i morfologia przysadki	-
5	prawidłowa wielkość i morfologia przysadki	-
6	prawidłowa wielkość i morfologia przysadki	-
7	prawidłowa wielkość i morfologia przysadki	IR, PNT
8	hipoplazja PPP	-
9	hipoplazja PPP	-

<b>nr pacjenta</b>	<b>obraz przysadki w MRI</b>	<b>inne zaburzenia hormonalne</b>
10	prawidłowa wielkość i morfologia przysadki	-
11	prawidłowa wielkość i morfologia przysadki	-
12	hipoplazja PPP	niskorosłość leczona GH
13	hipoplazja PPP	PNT
14	<i>brak danych</i>	-
15	prawidłowa wielkość i morfologia przysadki	-
16	prawidłowa wielkość i morfologia przysadki	-
17	prawidłowa wielkość i morfologia przysadki	-
18	hipoplazja PPP	IR
19	<i>brak danych</i>	niskorosłość leczona GH; IR
20	prawidłowa wielkość i morfologia przysadki	-
21	prawidłowa wielkość i morfologia przysadki	IR
22	prawidłowa wielkość i morfologia przysadki; mikrogruczolak przysadki średnicy 4 mm	
23	hipoplazja PPP	cukrzyca insulinoniezależna
24	prawidłowa wielkość i morfologia przysadki	-
25	<i>brak danych</i>	-
26	prawidłowa wielkość i morfologia przysadki;	-
27	prawidłowa wielkość i morfologia przysadki	-
28	<i>brak danych</i>	-
29	hipoplazja PPP	-
30	prawidłowa wielkość i morfologia przysadki	IR
31	prawidłowa wielkość i morfologia przysadki	-
32	prawidłowa wielkość i morfologia przysadki	-
33	prawidłowa wielkość i morfologia przysadki	NT po podostrym zapaleniu tarczycy
34	prawidłowa wielkość i morfologia przysadki	-

Wyjaśnienia zastosowanych w tabeli skrótów:

GH - hormon wzrostu; IR – insulinooporność; NT - niedoczynność tarczycy; PNT - pierwotna niedoczynność tarczycy; PPP - przedni płat przysadki ; V jąder - objętość jąder mierzona w badaniu ultrasonograficznym

Komentarz : Nie oceniano osobno morfologii opuszek węchowych.

Wyniki USG ginekologicznego zamieszczono w Tabeli 12. Wszystkie pacjentki miały trzon macicy typu *infantilis* i były wcześniej leczone hormonalną terapią zastępczą.

**Tabela 12.**

Wynik USG ginekologicznego i wcześniejsze leczenie hormonalne.

nr pacjentki	USG ginekologiczne	wcześniejsze leczenie hormonalne
18	Trzon macicy w tyłozgięciu długości 3.67 cm, wymiar ap 2.98 cm, edometrium 9 mm. JP 17.4x11.2 mm, JL 22.2x10.0mm. oba jajniki z bardzo drobnymi pęcherzykami.	Femoston Mite od 18 rż
29	Trzon macicy w przodozgięciu długości 3.26cm, wymiar ap 2.11 cm, edometrium 7 mm. JP objętości 14.8mm <sup>3</sup> , JL objętości 13.8mm <sup>3</sup> . oba jajniki z bardzo drobnymi pęcherzykami.	Femoston Mite od 16 rż
31	Trzon macicy w przodozgięciu długości 1.2 cm. JP 15x11 mm lity, JL 12x9mm lity.	brak
32	Trzon macicy w przodozgięciu długości 2.1 cm. JP objętości 14.5 mm <sup>3</sup> , JL objętości 19.6mm <sup>3</sup> . Jajniki z pęcherzykami do średnicy 2 mm.	Estrofem od 15 rż
33	Trzon macicy w przodozgięciu długości 2.0 cm. JP 20x10mm, JL18x12mm. Jajniki z pęcherzykami do średnicy 2 mm.	Estrofem/Dupshaston/Femoston mite/Cycloprogyna od 20 rż

Wyjaśnienia zastosowanych w tabeli skrótów:

JP - jajnik prawy JL - jajnik lewy wymiar ap – wymiar przednio-tylny

Dziesięciu pacjentów (nr: 1, 2, 3, 8, 9, 12, 13, 18, 23, 29) miało cechy hipoplazji przysadki w badaniu MRI przysadki. Za wskaźniki hipoplazji przysadki przyjęto granicę 3 mm w ocenie wysokości gruczołu bądź obniżoną objętość przysadki w porównaniu z normami dla danego wieku i płci (193-195). Jeden z pacjentów miał zobrazowanego mikrogruczolaka przysadki w badaniu MRI (w prawobocznej części płata przedniego opisano obszar słabszego wzmocnienia pokontrastowego 4 mm), bez czynności hormonalnej (pacjent nr 22). Pozostali przebadani pacjenci mieli przysadkę o prawidłowej wielkości i morfologii.

Kilku pacjentów to pacjenci diagnozowani z powodu podejrzenia IHH kilkanaście lat temu. Pacjenci zostali zakwalifikowani do badania na podstawie archiwalnych kart wypisowych i historii chorób i możliwości przeprowadzenia badań dzięki zabezpieczeniu ich DNA, w pojedynczych przypadkach niemożliwe było wykonanie rezonansu magnetycznego przysadki (brak dostępności w przeszłości tego badania, klaustrofobia u pacjenta czy przeciwwskazania do badania) (nr 14, 19, 25 i 28). Z tymi pacjentami nie udało się skontaktować ani telefonicznie ani listownie, celem ponownej oceny hormonalnej i uzupełnienia diagnostyki o MRI przysadki.

### 4.3. Wyniki badań genetycznych

Wyniki badań genetycznych zamieszczono w Tabeli 13.

Warianty patogenne i prawdopodobnie patogenne w badanych genach znaleziono u wszystkich badanych chorych. Mutacje dwugenowe znaleziono u 12 pacjentów (35%), a trójgenowe u 2 pacjentów (6%). Wielogenowość mutacji odpowiedzialnych prawdopodobnie za IHH u badanych pacjentów wynosiła 41%. Wykryto następujące mutacje dwugenowe: *PROKR2* i *WDR11*; *CHD7* i *PROKR2*; *GNRH1* i *WDR11*; *GNRHR* i *WDR11*; *CHD7* i *GNRHR* dwukrotnie; *FGF8* i *FGF17* dwukrotnie; *ANOS1* i *WDR11*, *LRRIQ3* i *NSMF*; *CHD7* i *GLI2*. Zidentyfikowano następujące mutacje trójgenowe: *CHD7*, *GNRHR* i *WDR11* oraz *FGFR1*, *GLI2* i *OTX2*.

Mutacje występujące w postaci złożonej heterozygoty w obrębie genu *KISS1R* (zwanego również *GPR54*) w pozycjach intronowych 918693 i 918695 (*g.1407A>G*; *g.1409G>A*) w układzie homozygotycznym zidentyfikowana została u wszystkich badanych pacjentów, jednak ze względu na jej niejasny charakter (możliwy wariant specyficzny populacyjnie) nie została ona uwzględniona w ocenie wielogenowości mutacji u pacjentów.

W oparciu o wytyczne opracowane przez ACMG zidentyfikowano: warianty patogenne (PV) u pacjentów, warianty prawdopodobnie patogenne (LPV) u pacjentów i warianty o nieokreślonym znaczeniu dla fenotypu. Większość wykrytych zmian patogennych to zmiany zakwalifikowane do PV i LPV (odpowiednio 80% i 20%).

**Tabela 13.** Zidentyfikowane mutacje w badanych genach IHH.

nr pacjenta	gen/ model dziedziczenia/ zygotyczność	Chrom.	typ mutacji	mutacja	zmiana aminokwasowa (HGSV protein level)	dbSNP	HGVS DNA
1.	<i>PROKR2</i> (AD) <i>het</i>	20	mutacja punktowa; mutacja typu "splice-site"; zmiana struktury białka; mutacja zmiany sensu	R268C	p.Arg268Cys	78861628	c.802C>T, cDNA.1049C>T g.14340C>T
	<i>WDR11</i> (AD) <i>het</i>	10	mutacja punktowa; mutacja typu "splice-site"; zmiana struktury białka	M769V	bez zmiany aminokwasowej	61761620	c.2305A>G cDNA.2543A>G g.38789A>G
	<i>KISS1R</i> (AR) <i>hom</i>	19	<i>mutacja punktowa; mutacja typu "splice-site"; zmiana struktury białka</i>	-	<i>bez zmiany aminokwasowej</i>	918693, 918695	<i>g.1407A&gt;G; g.1409G&gt;A</i>
2.	<i>CHD7</i> (AD) <i>het</i> <i>złożona</i>	8	mutacja punktowa	E1195A	p.Glu1195Ala	-	c.3408_3408delA cDNA.3885_3885delA g.149915_149915delA
			mutacja punktowa; mutacja typu "splice-site"; zmiana struktury białka	-	bez zmiany aminokwasowej	-	g.172390T>C
	<i>KISS1R</i> (AR) <i>hom</i>	19	<i>mutacja punktowa; mutacja typu "splice-site"; zmiana struktury białka</i>	-	<i>bez zmiany aminokwasowej</i>	918693, 918695	<i>g.1407A&gt;G; g.1409G&gt;A</i>
3.	<i>FGFR1</i> (AD) <i>het</i>	9	mutacja punktowa; mutacja typu "splice-site"; zmiana struktury białka	K192E	p.Lys192Glu	-	NM_015850.3 c.574A>G cDNA.1516A>G g.40867A>G
	<i>KISS1R</i> (AR) <i>hom</i>	19	<i>mutacja punktowa; mutacja typu "splice-site"; zmiana struktury białka</i>	-	<i>bez zmiany aminokwasowej</i>	918693, 918695	<i>g.1407A&gt;G; g.1409G&gt;A</i>

nr pacjenta	gen/ model dziedziczenia/ zygotyczność	Chrom.	typ mutacji	mutacja	zmiana aminokwasowa (HGSV protein level)	dbSNP	HGVS DNA
4.	<b>CHD7 (AD) het</b>	8	delecja, mutacja typu "splice-site"; zmiana struktury białka; NMD	L1137Sfs*33	p.Leu1137Sfs*33	-	c.3408_3408delA cDNA.3885_3885delA g.149915_149915delA
			mutacja punktowa , mutacja typu "splice-site"; zmiana struktury białka	E770G	p.Glu770Gly	-	c.2309A>G cDNA.2788A>G g.121681A>G
			mutacja punktowa, mutacja typu "splice-site"; zmiana struktury białka	K729E	p.Lys729Glu	41272437	2185A>G cDNA.2664A>G g.116297A>G
	<b>PROKR2 złożona (AD) het</b>	20	mutacja punktowa, mutacja typu "splice-site"; zmiana struktury białka	R81K	p.Arg81Lys	-	c.242G>A cDNA.396G>A g.12398G>A
			mutacja punktowa, mutacja typu "splice-site"; zmiana struktury białka	R102K	p.Arg102Lys	-	c.305G>A cDNA.314G>A g.12398G>A
	<b>KISS1R (AR) hom</b>	19	<i>mutacja punktowa; mutacja typu "splice-site"; zmiana struktury białka</i>	-	<i>bez zmiany aminokwasowej</i>	918693, 918695	<i>g.1407A&gt;G; g.1409G&gt;A</i>
5.	<b>FGFR1 (AD) het</b>	9	mutacja punktowa; mutacja typu "splice-site"; zmiana struktury białka	K618R	p.Lys618Arg	-	NM_015850.3 c.1853A>G cDNA.2795A>G g.52964A>G
	<b>KISS1R (AR) hom</b>	19	<i>mutacja punktowa; mutacja typu "splice-site"; zmiana struktury białka</i>	-	<i>bez zmiany aminokwasowej</i>	918693, 918695	<i>g.1407A&gt;G; g.1409G&gt;A</i>

nr pacjenta	gen/ model dziedziczenia/ zygotyczność	Chrom.	typ mutacji	mutacja	zmiana aminokwasowa (HGSV protein level)	dbSNP	HGVS DNA
6.	<i>WDR11 (AD) het</i>	10	mutacja punktowa; mutacja typu "splice-site"; zmiana struktury białka	P3R	p.Pro3Arg	-	
	<i>GNRHI (AR) het</i>	8	mutacja punktowa	-	bez zmiany aminokwasowej	6186	c.183C>T cDNA.215C>T g.3028C>T
	<i>KISSIR (AR) hom</i>	19	mutacja punktowa; mutacja typu "splice-site"; zmiana struktury białka	-	bez zmiany aminokwasowej	918693, 918695	g.1407A>G; g.1409G>A
7.	<i>GnRHR (AR) het</i>	4	mutacja punktowa; zmiana struktury białka	Q106R	p.Gln106Arg	104893836	c.317A>G; cDNA.342A>G; g.342A>G
	<i>WDR11 (AD)het</i>	10	mutacja punktowa; mutacja typu "splice-site"; zmiana struktury białka	I716V	p.Ile716Val	-	c.2146A>G
	<i>KISSIR (AR) hom</i>	19	mutacja punktowa; mutacja typu "splice-site"; zmiana struktury białka	-	bez zmiany aminokwasowej	918693, 918695	g.1407A>G; g.1409G>A
8.	<i>WDR11 het (AD)<sup>1</sup></i>	10	mutacja punktowa	-	bez zmiany aminokwasowej	-	c.2563T>C cDNA.2801T>C g.48894T>C
	<i>KISSIR (AR) hom</i>	19	mutacja punktowa; mutacja typu "splice-site"; zmiana struktury białka	-	bez zmiany aminokwasowej	918693, 918695	g.1407A>G; g.1409G>A

nr pacjenta	gen/ model dziedziczenia/ zygotyczność	Chrom.	typ mutacji	mutacja	zmiana aminokwasowa (HGSV protein level)	dbSNP	HGVS DNA
9.	<i>CHD7 (AD)</i> <i>het</i>	8	mutacja punktowa; mutacja typu "splice-site"; zmiana struktury białka	M2527L	p.Met2527Leu	192129249	c.7579A>C cDNA.8058A>C g.178082A>C
	<i>KISS1R (AR)</i> <i>hom</i>	19	<i>mutacja punktowa; mutacja typu "splice-site"; zmiana struktury białka</i>	-	<i>bez zmiany aminokwasowej</i>	918693, 918695	<i>g.1407A&gt;G; g.1409G&gt;A</i>
10.	<i>CHD7 (AD)</i> <i>Het</i>	8	mutacja punktowa; mutacja typu "splice-site"; zmiana struktury białka	E661K	p.Glu661Lys	-	c.1981G>A cDNA.1981G>A g.102538G>A
	<i>GNRHR (AR)</i> <i>het</i>	4	mutacja punktowa; zmiana struktury białka	R139H	p.Arg139His	104893842	c.416G>A cDNA.416G>A g.441G>A
	<i>KISS1R (AR)</i> <i>hom</i>	19	<i>mutacja punktowa; mutacja typu "splice-site"; zmiana struktury białka</i>	-	<i>bez zmiany aminokwasowej</i>	918693, 918695	<i>g.1407A&gt;G; g.1409G&gt;A</i>
11.	<i>FGF8 (AD)</i> <i>het</i>	10	mutacja punktowa	P26L	p.Pro26Leu	137852660	c.77C>T cDNA.77C>T g.862C>T
	<i>KISS1R (AR)</i> <i>hom</i>	19	<i>mutacja punktowa; mutacja typu "splice-site"; zmiana struktury białka</i>	-	<i>bez zmiany aminokwasowej</i>	918693, 918695	<i>g.1407A&gt;G; g.1409G&gt;A</i>
12.	<i>FGF8 (AD)</i> <i>het</i>	10	mutacja punktowa, mutacja typu "splice-site"; zmiana struktury białka	-	bez zmiany aminokwasowej	3218238	g.5390G>A
	<i>FGF17 (AD)</i> <i>het</i>	9	mutacja punktowa, mutacja typu "splice-site"; zmiana struktury białka	-	-	-	g353C>T
	<i>KISS1R (AR)</i> <i>hom</i>	19	<i>mutacja punktowa; mutacja typu "splice-site"; zmiana struktury białka</i>	-	<i>bez zmiany aminokwasowej</i>	918693, 918695	<i>g.1407A&gt;G; g.1409G&gt;A</i>

nr pacjenta	gen/ model dziedziczenia/ zygotyczność	Chrom.	typ mutacji	mutacja	zmiana aminokwasowa (HGSV protein level)	dbSNP	HGVS DNA
13.	<b>GNRHR</b> <i>złożona (AR)</i> <i>het</i>	4	mutacja punktowa, mutacja typu "splice-site"; zmiana struktury białka	E47D	p.Glu47Asp	35542850	c.141G>C cDNA.173G>C g.1465G>C
			mutacja punktowa, mutacja typu "splice-site"; zmiana struktury białka	-	bez zmiany aminokwasowej	6186	c.183C>T cDNA.1507C>T g.3028C>T
	<b>KISSIR (AR)</b> <i>hom</i>	19	<i>mutacja punktowa; mutacja typu "splice-site"; zmiana struktury białka</i>	-	<i>bez zmiany aminokwasowej</i>	918693, 918695	<i>g.1407A&gt;G; g.1409G&gt;A</i>
14.	<b>FGFRI (AD)</b> <i>het</i>	9	mutacja punktowa, mutacja typu "splice-site"; zmiana struktury białka	V102I	p.Val102Ile	55642501	NM_015850.3 c.304G>A cDNA.1246G>A g.39099G>A
	<b>KISSIR (AR)</b> <i>hom</i>	19	<i>mutacja punktowa; mutacja typu "splice-site"; zmiana struktury białka</i>	-	<i>bez zmiany aminokwasowej</i>	918693, 918695	<i>g.1407A&gt;G; g.1409G&gt;A</i>
15.	<b>ANOS1 (XR)</b> <i>hom</i>	X	mutacja punktowa, mutacja typu "splice-site"; zmiana struktury białka; NMD	R631*	p.Arg631*	-	c.1891C>T cDNA.2041C>T g.197775C>T
	<b>KISSIR (AR)</b> <i>hom</i>	19	<i>mutacja punktowa; mutacja typu "splice-site"; zmiana struktury białka</i>	-	<i>bez zmiany aminokwasowej</i>	918693, 918695	<i>g.1407A&gt;G; g.1409G&gt;A</i>

nr pacjenta	gen/ model dziedziczenia/ zygotyczność	Chrom.	typ mutacji	mutacja	zmiana aminokwasowa (HGSV protein level)	dbSNP	HGVS DNA
16.	<i>FGF8 (AD)</i> <i>het</i>	10	mutacja punktowa, mutacja typu "splice-site"; zmiana struktury białka	-	bez zmiany aminokwasowej	3218238	g.5390G>A
	<i>FGF17 (AD)</i> <i>het</i>	8	mutacja punktowa , mutacja typu "splice-site"; zmiana struktury białka	-	bez zmiany aminokwasowej	147561706	-
	<i>KISS1R (AR)</i> <i>hom</i>	19	<i>mutacja punktowa; mutacja typu "splice-site"; zmiana struktury białka</i>	-	<i>bez zmiany aminokwasowej</i>	<i>918693, 918695</i>	<i>g.1407A&gt;G; g.1409G&gt;A</i>
17.	<i>FGF8 (AD)</i> <i>het</i>	10	mutacja punktowa, mutacja typu "splice-site"; zmiana struktury białka	-	bez zmiany aminokwasowej	3218238	g.5390G>A
	<i>KISS1R (AR)</i> <i>hom</i>	19	<i>mutacja punktowa; mutacja typu "splice-site"; zmiana struktury białka</i>	-	<i>bez zmiany aminokwasowej</i>	<i>918693, 918695</i>	<i>g.1407A&gt;G; g.1409G&gt;A</i>
18.	<i>GNRH1 (AD)</i> <i>het</i>	8	insercja, przesunięcie ramki odczytu; mutacja typu "splice-site"; zmiana struktury białka; NMD	C21Lfs*23	p.Cys21Leufs*23	-	c.60_61insC cDNA.92_93insC g.1384_1385insC
	<i>KISS1R (AR)</i> <i>hom</i>	19	<i>mutacja punktowa; mutacja typu "splice-site"; zmiana struktury białka</i>	-	<i>bez zmiany aminokwasowej</i>	<i>918693, 918695</i>	<i>g.1407A&gt;G; g.1409G&gt;A</i>

nr pacjenta	gen/ model dziedziczenia/ zygotyczność	Chrom.	typ mutacji	mutacja	zmiana aminokwasowa (HGSV protein level)	dbSNP	HGVS DNA
19.	<i>CHD7 (AD)</i> <i>złożona het</i>	8	mutacja punktowa ; mutacja typu "splice-site"; zmiana struktury białka	S103T	p.Ser103Thr	41272435	c.307T>A cDNA.784T>A g.62962T>A
				L1739P	p.Leu1739Pro	-	-
	<i>GNRHR (AR)</i> <i>złożona het</i>	4	mutacja punktowa,; zmiana ramki odczytu; mutacja typu "splice-site"; zmiana struktury białka	Y283Tfs*4	p.Tyr283Thrfs*4	-	c.846_846delC cDNA.871_871delC g.13740_13740delC
				L141P	p.Leu141Pro	-	c.422T>C cDNA.447T>C g.447T>C
	<i>KISS1R (AR)</i> <i>hom</i>	19	<i>mutacja punktowa; mutacja typu "splice-site"; zmiana struktury białka</i>	-	<i>bez zmiany aminokwasowej</i>	918693, 918695	<i>g.1407A&gt;G; g.1409G&gt;A</i>
20.	<i>GNRHR (AR)</i> <i>złożona het</i>	4	mutacja punktowa; mutacja typu "splice-site"; zmiana struktury białka	R139H	p.Arg139His	104893842	c.416G>A cDNA.441G>A g.441G>A
			mutacja punktowa ; mutacja typu "splice-site"; zmiana struktury białka	R262Q	p.Arg262Gln	104893837	c.785G>A cDNA.810G>A g.13679G>A
	<i>KISS1R (AR)</i> <i>hom</i>	19	<i>mutacja punktowa; mutacja typu "splice-site"; zmiana struktury białka</i>	-	<i>bez zmiany aminokwasowej</i>	918693, 918695	<i>g.1407A&gt;G; g.1409G&gt;A</i>

nr pacjenta	gen/ model dziedziczenia/ zygotyczność	Chrom.	typ mutacji	mutacja	zmiana aminokwasowa (HGSV protein level)	dbSNP	HGVS DNA
21.	<i>FGFR1 (AD)</i> <i>het</i>	9	insercja, frameshift; mutacja typu "splice-site"; zmiana struktury białka; NMD	W722Sfs*35	p.Trp722fs*35		c.2071_2072insCTGT cDNA.3013_3014insCTGT T g.54568_54569insCTGT
	<i>KISS1R (AR)</i> <i>hom</i>	19	<i>mutacja punktowa; mutacja typu "splice-site"; zmiana struktury białka</i>	-	<i>bez zmiany aminokwasowej</i>	918693, 918695	<i>g.1407A&gt;G; g.1409G&gt;A</i>
22.	<i>GNRHR (AR)</i> <i>het złożona</i>	4	mutacja punktowa ; zmiana struktury białka	R139H	p.Arg139His	104893842	c.416G>A cDNA.441G>A g.441G>A;
			delecja; mutacja typu "splice-site" i zmiana struktury białka	W205	p.Trp205	.-	c.616_618delTGG cDNA.641_643delTGG g.9667_9669delTGG
	<i>KISS1R (AR)</i> <i>hom</i>	19	<i>mutacja punktowa; mutacja typu "splice-site"; zmiana struktury białka</i>	-	<i>bez zmiany aminokwasowej</i>	918693, 918695	<i>g.1407A&gt;G; g.1409G&gt;A</i>
23.	<i>FGF8 (AD)</i> <i>het</i>	10	mutacja punktowa ; mutacja typu "splice-site" i zmiana struktury białka	-	bez zmiany aminokwasowej	3218238	-
	<i>KISS1R (AR)</i> <i>hom</i>	19	<i>mutacja punktowa; mutacja typu "splice-site"; zmiana struktury białka</i>	-	<i>bez zmiany aminokwasowej</i>	918693, 918695	<i>g.1407A&gt;G; g.1409G&gt;A</i>

nr pacjenta	gen/ model dziedziczenia/ zygotyczność	Chrom.	typ mutacji	mutacja	zmiana aminokwasowa (HGSV protein level)	dbSNP	HGVS DNA
24.	<i>GNRHR (AR)</i> <i>het</i>	4	mutacja punktowa, zmiana struktury białka	R139H	p.Arg139His	104893842	c.416G>A cDNA.441G>A g.441G>A
	<i>CHD7 (AD)</i> <i>het</i>	8	insercja; mutacja typu "splice-site"; zmiana struktury białka	-	bez zmiany aminokwasowej	398124316	g.102606_102607insAAA GCA
	<i>WDR11 (AD)</i> <i>het</i>	10	mutacja punktowa	-	bez zmiany aminokwasowej	12355108	c.1542C>T cDNA.1780C>T g.22727C>T
	<i>KISS1R (AR)</i> <i>hom</i>	19	<i>mutacja punktowa; mutacja typu "splice-site"; zmiana struktury białka</i>	-	<i>bez zmiany aminokwasowej</i>	<i>918693, 918695</i>	<i>g.1407A&gt;G; g.1409G&gt;A</i>
25.	<i>ANOS1 (XR)</i> <i>Hom</i>	X	mutacja punktowa; mutacja typu "splice-site"; zmiana struktury białka; NMD	R631*	p.Arg631*	-	c.1891C>T cDNA.2041C>T g.197775C>T
	<i>WDR11 (AD)</i> <i>het</i>	10	mutacja punktowa	-	bez zmiany aminokwasowej	12355108	c.1542C>T cDNA.1780C>T g.22727C>T
	<i>KISS1R (AR)</i> <i>hom</i>	19	<i>mutacja punktowa; mutacja typu "splice-site"; zmiana struktury białka</i>	-	<i>bez zmiany aminokwasowej</i>	<i>918693, 918695</i>	<i>g.1407A&gt;G; g.1409G&gt;A</i>

nr pacjenta	gen/ model dziedziczenia/ zygotyczność	Chrom.	typ mutacji	mutacja	zmiana aminokwasowa (HGSV protein level)	dbSNP	HGVS DNA
26.	<b>PROKR2</b> (AD) <i>het</i>	20	mutacja punktowa; zmiana struktury białka	R85H	p.Arg85His	74315418	-
	<b>KISS1R (AR)</b> <i>hom</i>	19	mutacja punktowa; mutacja typu "splice-site"; zmiana struktury białka	-	bez zmiany aminokwasowej	918693, 918695	<i>g.1407A&gt;G; g.1409G&gt;A</i>
27.	<b>LRR1Q3 (AD)</b> <i>het</i>	1	mutacja punktowa; mutacja typu "splice-site"; zmiana struktury białka	R227C	p.Arg227Cys	1995536965	c679C>T
	<b>NELF (AD)</b> <i>het</i>	9	mutacja punktowa	-	bez zmiany aminokwasowej	112888704	-
	<b>KISS1R (AR)</b> <i>hom</i>	19	mutacja punktowa; mutacja typu "splice-site"; zmiana struktury białka	-	bez zmiany aminokwasowej	918693, 918695	<i>g.1407A&gt;G; g.1409G&gt;A</i>
28.	<b>FGFR1 (AD)</b> <i>het</i>	9	mutacja punktowa; mutacja typu "splice-site"; zmiana struktury białka	R250W	p.Arg250Trp	-	NM_015850.3 c.748C>T cDNA.1690C>T g.44138C>T
	<b>GLI2 (AD) het</b> <i>złożona</i>	1	mutacja punktowa; mutacja typu "splice-site"; zmiana struktury białka	D1520N	p.Asp1520Asn	11481474	c.4558G>A cDNA.4588G>A g.254850G>A
				-	bez zmiany aminokwasowej	14914072	<i>g.254346A&gt;G</i>
	<b>OTX2 (AD)</b> <i>het</i>	14	mutacja punktowa; mutacja typu "splice-site";	-	bez zmiany aminokwasowej	142743327	c.663C>T cDNA.940C>T g.8514C>T
	<b>KISS1R (AR)</b> <i>hom</i>	19	mutacja punktowa; mutacja typu "splice-site"; zmiana struktury białka	-	bez zmiany aminokwasowej	918693, 918695	<i>g.1407A&gt;G; g.1409G&gt;A</i>

nr pacjenta	gen/ zygotyczność/ model dziedziczenia	Chrom.	typ mutacji	mutacja	zmiana aminokwasowa (HGSV protein level)	dbSNP	HGVS DNA
29.	<i>CHD7 (AD)</i> <i>het</i>	8	mutacja punktowa	-	bez zmiany aminokwasowej	41312172	g.174230A>G
	<i>GLI2 (AD)</i> <i>hom</i>	1	polimorfizm	D1306N	p.Asp1306Asn	12711538	c.3916G>A cDNA.3976G>A g.254208G>A
	<i>KISS1R (AR)</i> <i>hom</i>	19	<i>mutacja punktowa; mutacja typu "splice-site"; zmiana struktury białka</i>	-	<i>bez zmiany aminokwasowej</i>	918693, 918695	<i>g.1407A&gt;G; g.1409G&gt;A</i>
30.	<i>FGFR1</i>	9	mutacja punktowa; mutacja typu "splice-site"; zmiana struktury białka, NMD	W99*	p.Trp99*	-	c.198G>A cDNA.928G>A g.38993G>A
	<i>WDR11 (AD)</i> <i>het</i>	10	mutacja punktowa; mutacja typu "splice-site"; zmiana struktury białka	S515P	p.Ser515Pro	-	c.1543T>C cDNA.1781T>C g.22728T>C
	<i>KISS1R (AR)</i> <i>hom</i>	19	<i>mutacja punktowa; mutacja typu "splice-site"; zmiana struktury białka</i>	-	<i>bez zmiany aminokwasowej</i>	918693, 918695	<i>g.1407A&gt;G; g.1409G&gt;A</i>
31.	<i>GNRHR (AR)</i> <i>het</i>	4	mutacja punktowa; mutacja typu "splice-site"; zmiana struktury białka	P146S	p.Pro146Ser	144900788	c.436C>T cDNA.461C>T g.461C>T
	<i>KISS1R (AR)</i> <i>hom</i>	19	<i>mutacja punktowa; mutacja typu "splice-site"; zmiana struktury białka</i>	-	<i>bez zmiany aminokwasowej</i>	918693, 918695	<i>g.1407A&gt;G; g.1409G&gt;A</i>

nr pacjenta	gen/ zygotyczność/ model dziedziczenia	Chrom.	typ mutacji	mutacja	zmiana aminokwasowa (HGSV protein level)	dbSNP	HGVS DNA
32.	<i>GNRHI (AD)</i> <i>het</i>	8	mutacja punktowa	-	bez zmiany aminokwasowej	6186	c.183C>T cDNA.215C>T g.3028C>T
	<i>KISSIR (AR)</i> <i>hom</i>	19	<i>mutacja punktowa; mutacja typu "splice-site"; zmiana struktury białka</i>	-	<i>bez zmiany aminokwasowej</i>	<i>918693, 918695</i>	<i>g.1407A&gt;G; g.1409G&gt;A</i>
33.	<i>WDR11 (AD)</i> <i>het</i>	10	mutacja punktowa; mutacja typu "splice-site"; zmiana struktury białka	-	bez zmiany aminokwasowej	-	c1551A>G
	<i>KISSIR (AR)</i> <i>hom</i>	19	<i>mutacja punktowa ; mutacja typu "splice-site"; zmiana struktury białka</i>	-	<i>bez zmiany aminokwasowej</i>	<i>918693, 918695</i>	<i>g.1407A&gt;G; g.1409G&gt;A</i>
34.	<i>NELF1 (AD)</i> <i>het</i>	9	mutacja punktowa; mutacja typu "splice-site"; zmiana struktury białka	-	bez zmiany aminokwasowej	148475876	-
	<i>KISSIR (AR)</i> <i>hom</i>	19	<i>mutacja punktowa; mutacja typu "splice-site"; zmiana struktury białka</i>	-	<i>bez zmiany aminokwasowej</i>	<i>918693, 918695</i>	<i>g.1407A&gt;G; g.1409G&gt;A</i>

Chrom. - chromosom

NMD - procesów kontroli jakości RNA polegający na usuwaniu matrycowego RNA zawierającego przedwczesny kodon stop (ang. *Nonsense Mediated Decay*)

Wykorzystując znane bazy danych genetycznych zweryfikowano, czy wykryte mutacje były już wcześniej opisane, czy stanowiły nowoodkryty defekt, co przedstawiono w Tabeli 14.

**Tabela 14.**

Wykryte mutacje, opis w piśmiennictwie, ClinVar, HGMD, predykcja patogenności.

nr pacjenta	gen/ model dziedziczenia/ zygotyczność	Chrom.	zmiana aminokwasowa (HGSV protein level)	dbSNP	taka sama mutacja opisana w piśmienni- ctwie	Fenotyp pacjenta/pacjentów z piśmiennictwa	zmiana opisana w Clinvar lub HGMD	predykcja patogenności wg MT	predykcja patogenności wg ACMG
1.	<i>PROKR2</i> (AD) het	20	p.Arg268Cys	78861628	(196)	het., sporadyczny, ZK	ClinVar	1	PV
	<i>WDR11</i> (AD) het	10	bez zmiany aminokwasowej	61761620	-	-	ClinVar	0.99	PV
	<i>KISS1R</i> (AR) hom	19	bez zmiany aminokwasowej	918693, 918695	-	-	0	0.95	VUS
2.	<i>CHD7</i> (AD) het złożona	8	p.Glu1195Ala	-	-	-	0	1	LPV
			bez zmiany aminokwasowej	-	-	-	0	1	PV
	<i>KISS1R</i> (AR) hom	19	bez zmiany aminokwasowej	918693, 918695	-	-	0	0.95	VUS
3.	<i>FGFR1</i> (AD) het	9	p.Lys192Glu	-	-	-	0	1	PV
	<i>KISS1R</i> (AR) hom	19	bez zmiany aminokwasowej	918693, 918695	-	-	0	0.95	VUS

nr pacjenta	gen/ model dziedziczenia/ zygotyczność	Chrom.	zmiana aminokwasowa (HGSV protein level)	dbSNP	taka sama mutacja opisana w piśmiennictwie	fenotyp pacjenta/pacjentów z piśmiennictwa	zmiana opisana w Clinvar lub HGMD	predykcja patogenności wg MT	predykcja patogenności wg ACMG
4.	<i>CHD7 (AD) het</i>	8	p.Leu1137Sfs*3 3	-	-	-	0	1	PV
			p.Glu770Gly	-	-	-	0	1	PV
			p.Lys729Glu	41272437	-	-	0	0.99	PV
	<i>PROKR2 złożona (AD) het</i>	20	p.Arg81Lys	-	-	-	0	0.99	LPV
			p.Arg102Lys	-	-	-	0	0.99	LPV
<i>KISS1R (AR) hom</i>	19	bez zmiany aminokwasowej	918693, 918695	-	-	0	0.95	VUS	
5.	<i>FGFR1 (AD) het</i>	9	p.Lys618Arg	-	Inna mutacja w tej pozycji p.Lys618Asn (197)	nIHH, sporadyczny	HGMD ID CD065717 CM099473	0.95	PV
	<i>KISS1R (AR) hom</i>	19	bez zmiany aminokwasowej	918693, 918695	-	-	0	0.95	VUS
6.	<i>WDR11 het (AD)</i>	10	p.Pro3Arg	-	-	-	-	0.99	PV
	<i>GNRH1 (AR) het</i>	8	bez zmiany aminokwasowej	6186	-	-	0	0.95	LPV
	<i>KISS1R (AR) hom</i>	19	bez zmiany aminokwasowej	918693, 918695	-	-	0	0.95	VUS

nr pacjenta	gen/ model dziedziczenia/ zygotyczność	Chrom.	zmiana aminokwasowa (HGSV protein level)	dbSNP	taka sama mutacja opisana w piśmiennictwie	fenotyp pacjenta/pacjentów z piśmiennictwa	zmiana opisana w Clinvar lub HGMD	predykcja patogenności wg MT	predykcja patogenności wg ACMG
7.	<i>GnRHR (AR) het</i>	4	p.Gln106Arg	104893836	(198)  złożona z p.Arg262Gln (199)	M, nIHH i K, nIHH, WBM  18 przypadków (199), K i M, z ZK i nIHH, też aoIHH, dziedziczenie ? lub AD lub AR	ClinVar	0.99	LPV
	<i>WDR11(AD) het</i>	10	p.Ile716Val	-	-	-	0	1	PV
	<i>KISS1R (AR) hom</i>	19	bez zmiany aminokwasowej	918693, 918695	-	-	0	0.95	VUS
8.	<i>WDR11 het AD</i>	10	bez zmiany aminokwasowej	-	-	-	0	1	LPV
	<i>KISS1R (AR) hom</i>	19	bez zmiany aminokwasowej	918693, 918695	-	-	0	0.95	VUS
9.	<i>CHD7 (AD) Het</i>	8	p.Met2527Leu	192129249	-	-	ClinVar	0.99	PV
	<i>KISS1R (AR) hom</i>	19	bez zmiany aminokwasowej	918693, 918695	-	-	0	0.95	VUS

nr pacjenta	gen/ model dziedziczenia/ zygotyczność	Chrom.	zmiana aminokwasowa (HGSV protein level)	dbSNP	taka sama mutacja opisana w piśmiennictwie	fenotyp pacjenta/pacjentów z piśmiennictwa	zmiana opisana w Clinvar lub HGMD	predykcja patogenności wg MT	predykcja patogenności wg ACMG
10.	<i>CHD7 (AD) het</i>	8	p.Glu661Lys	-	-	-	0	0.99	PV
	<i>GNRHR (AR) het</i>	4	p.Arg139His	104893842	(199-201)	K, nIHH, PBM, K, nIHH, AR	1	0.99	PV
	<i>KISS1R (AR) hom</i>	19	bez zmiany aminokwasowej	918693, 918695	-	-	0	0.95	VUS
11.	<i>FGF8 (AD) het</i>	10	p.Pro26Leu	137852660	(202)	M, ZK, niepełny IHH	ClinVar	1	LPV
	<i>KISS1R (AR) hom</i>	19	bez zmiany aminokwasowej	918693, 918695	-	-	0	0.95	VUS
12.	<i>FGF8 (AD) het</i>	10	bez zmiany aminokwasowej	3218238	-	-	ClinVar	1	PV
	<i>FGF17 (AD) het</i>	9	-	-	-	-	0	1	PV
	<i>KISS1R (AR) hom</i>	19	bez zmiany aminokwasowej	918693, 918695	-	-	0	0.95	VUS
13.	<i>GNRHR złożona (AR) het</i>	4	p.Glu47Asp	35542850	-	-	0	0.99	PV
			bez zmiany aminokwasowej	6186	-	-	0	0.95	PV
	<i>KISS1R (AR) hom</i>	19	bez zmiany aminokwasowej	918693, 918695	-	-	0	0.95	VUS

nr pacjenta	gen/ model dziedziczenia/ zygotyczność	Chrom.	zmiana aminokwasowa (HGSV protein level)	dbSNP	taka sama mutacja opisana w piśmiennictwie	fenotyp pacjenta/pacjentów z piśmiennictwa	zmiana opisana w Clinvar lub HGMD	predykcja patogenności wg MT	predykcja patogenności wg ACMG
14.	<i>FGFR1 (AD)</i> <i>het</i>	9	p.V102I	55642501	(203)	het., sporadyczny, ZK	HGMD CM050258 CI030753	1	PV
	<i>KISS1R (AR)</i> <i>hom</i>	19	bez zmiany aminokwasowej	918693, 918695	-	-	0	0.95	VUS
15.	<i>ANOS1 (XR)</i> <i>hom</i>	X	p.Arg631*	-	-	-	0	1	PV
	<i>KISS1R (AR)</i> <i>hom</i>	19	bez zmiany aminokwasowej	918693, 918695	-	-	0	0.95	VUS
16.	<i>FGF8 (AD)</i> <i>het</i>	10	bez zmiany aminokwasowej	3218238	HGMD CS072207 (204)	Spodziectwo	HGMD ClinVar	1	PV
	<i>FGF17 (AD)</i> <i>het</i>	8	bez zmiany aminokwasowej	147561706	-	-	0	1	PV
	<i>KISS1R (AR)</i> <i>hom</i>	19	bez zmiany aminokwasowej	918693, 918695	-	-	0	0.95	VUS
17.	<i>FGF8 (AD)</i> <i>het</i>	10	bez zmiany aminokwasowej	321823	HGMD CS072207	Spodziectwo	HGMD ClinVar	1	PV
	<i>KISS1R (AR)</i> <i>hom</i>	19	bez zmiany aminokwasowej	918693, 918695	-	-	0	0.95	VUS

nr pacjenta	gen/ model dziedziczenia/ zygotyczność	Chrom.	zmiana aminokwasowa (HGSV protein level)	dbSNP	taka sama mutacja opisana w piśmiennictwie	fenotyp pacjenta/pacjentów z piśmiennictwa	zmiana opisana w Clinvar lub HGMD	predykcja patogenności wg MT	predykcja patogenności wg ACMG
18.	<i>GNRH1 (AD) het</i>	8	p.Cys21Leufs*2 3	-	-	-	0	1	PV
	<i>KISS1R (AR) hom</i>	19	bez zmiany aminokwasowej	918693, 918695	-	-	0	0.95	VUS
19.	<i>CHD7 (AD) złożona het</i>	8	p.Ser103Thr	41272435	-	-	HGMD CN169374	0.99	PV
			p.Leu1739Pro	-	Inna mutacja w tej pozycji p.Leu173Arg (205)	-	ClinVar	0.99	PV
	<i>GNRHR (AR) złożona het</i>	4	p.Tyr283Thrfs* 4	-	Inna mutacja w tej pozycji p.Tyr283His (206)	M, nIHH	0	1	PV
			p.Leu141Pro	-	-	-	0	1	PV
	<i>KISS1R (AR) hom</i>	19	bez zmiany aminokwasowej	918693, 918695	-	-	0	0.95	VUS
20.	<i>GNRHR (AR) złożona het</i>	4	p.Arg139His	104893842	(199, 201)	K, nIHH, PBM, K, nIHH, AR	0	0.99	PV
			p.Arg262Gln	104893837	(198) złożona z p.Gln106Arg	M, nIHH i K, nIHH, WBM	1	0.99	PV
	<i>KISS1R (AR) hom</i>	19	bez zmiany aminokwasowej	918693, 918695	-	-	0	0.95	VUS

nr pacjenta	gen/ model dziedziczenia/ zygotyczność	Chrom.	zmiana aminokwasowa (HGSV protein level)	dbSNP	taka sama mutacja opisana w piśmiennictwie	fenotyp pacjenta/pacjentów z piśmiennictwa	zmiana opisana w Clinvar lub HGMD	predykcja patogenności wg MT	predykcja patogenności wg ACMG
21.	<i>FGFR1(AD)</i> <i>het</i>	9	p.Trp722fs*35	-	Inna mutacja w tej pozycji p.Pro722 Ser (207)	-	0	1	PV
	<i>KISS1R (AR)</i> <i>hom</i>	19	bez zmiany aminokwasowej	918693, 918695	-	-	0	0.95	VUS
22.	<i>GNRHR (AR)</i> <i>het złożona</i>	4	p.Arg139His	104893842	(199, 201)	K, nIHH, PBM; K, nIHH, AR	1	0.99	PV
			p.Trp205	-	-	-	0	0.99	PV
	<i>KISS1R (AR)</i> <i>hom</i>	19	bez zmiany aminokwasowej	918693, 918695	-	-	0	0.95	VUS
23.	<i>FGF8 (AD)</i> <i>het</i>	10	bez zmiany aminokwasowej	3218238	-	-	0	1	PV
	<i>KISS1R (AR)</i> <i>hom</i>	19	bez zmiany aminokwasowej	918693, 918695	-	-	0	0.95	VUS
24.	<i>GNRHR (AR)</i> <i>het</i>	4	p.Arg139His	104893842	(199, 201)	K, nIHH, PBM, K, nIHH, AR	1	0.99	PV
	<i>CHD7 (AD)</i> <i>het</i>	8	bez zmiany aminokwasowej	398124316	-	-	0	1	PV
	<i>WDR11 (AD)</i> <i>het</i>	10	bez zmiany aminokwasowej	12355108	-	-	0	1	LPV
	<i>KISS1R (AR)</i> <i>hom</i>	19	bez zmiany aminokwasowej	918693, 918695	-	-	0	0.95	VUS

nr pacjenta	gen/ model dziedziczenia/ zygotyczność	Chrom.	zmiana aminokwasowa (HGSV protein level)	dbSNP	taka sama mutacja opisana w piśmiennictwie	fenotyp pacjenta/pacjentów z piśmiennictwa	zmiana opisana w Clinvar lub HGMD	predykcja patogenności wg MT	predykcja patogenności wg ACMG
25.	<i>ANOS1 (XR) Hom</i>	X	p.Arg631*	-	Inna mutacja w tej pozycji p.Arg631Ter m (208)	2 przypadki: ZK, M, synkineza, agenezja nerki	0	1	PV
	<i>WDR11 (AD) het</i>	10	bez zmiany aminokwasowej	12355108	-	-	0	1	LPV
	<i>KISS1R (AR) hom</i>	19	bez zmiany aminokwasowej	918693, 918695			0	0.95	VUS
26.	<i>PROKR2 (AD) het</i>	20	p.Arg85His	74315418	(196)	K, ZK, sporadyczny, heterozygota	1	1	PV
	<i>KISS1R (AR) hom</i>	19	bez zmiany aminokwasowej	918693, 918695	-	-	0	0.95	VUS
27.	<i>LRRIQ3 (AD) het</i>	1	p.Arg227Cys	199553696 5	-	-	0	1	PV
	<i>NELF (AD) het</i>	9	bez zmiany aminokwasowej	3218238	-	-	0	0.99	LPV
	<i>KISS1R (AR) hom</i>	19	bez zmiany aminokwasowej	918693, 918695	-	-	0	0.95	VUS

nr pacjenta	gen/ model dziedziczenia/ zygotyczność	Chrom.	zmiana aminokwasowa (HGSV protein level)	dbSNP	taka sama mutacja opisana w piśmiennictwie	fenotyp pacjenta/pacjentów z piśmiennictwa	zmiana opisana w Clinvar lub HGMD	predykcja patogenności wg MT	predykcja patogenności wg ACMG
28.	<i>FGFR1 (AD) het</i>	9	p.Arg250Trp	Inna mutacja w tym kodonie rs121909645 p.Arg250Gln	(207)	ZK	HGMD CM063987	1	PV
	<i>GLI2 (AD) het złożona</i>	1	p.Asp1520Asn	11481474	(209) K, holoprozencefalia (wysokie czoło, asymetria twarzy z hipoplastyczną lewą stroną, brak lewej gałki ocznej, nieprawidłowe uszy, rozszczep wargi i podniebienia, wyrośla przeduszne)		ClinVar	0.99	PV
			bez zmiany aminokwasowej	14914072	-	-	0	0.99	PV
	<i>OTX2 (AD) het</i>	14	bez zmiany aminokwasowej	142743327	-	-	0	1	PV
	<i>KISS1R (AR) hom</i>	19	bez zmiany aminokwasowej	918693, 918695	-	-	0	0.95	VUS
29.	<i>CHD7 (AD) het</i>	8	bez zmiany aminokwasowej	41312172	-	IHH, anosmia, CHARGE, AD	ClinVar	1	LPV
	<i>GLI2 (AD) Hom</i>	1	p.Asp1306Asn	12711538	(210)	holoprozencefalia	ClinVar	1	VUS?
	<i>KISS1R (AR) hom</i>	19	bez zmiany aminokwasowej	918693, 918695	-	-	0	0.95	VUS

nr pacjenta	gen/ model dziedziczenia/ zygotyczność	Chrom.	zmiana aminokwasowa (HGSV protein level)	dbSNP	taka sama mutacja opisana w piśmiennic- twie	fenotyp pacjenta/pacjentów z piśmiennictwa	zmiana opisana w Clinvar lub HGMD	predykcja patogenności wg MT	predykcja patogenności wg ACMG
30.	<i>FGFR1</i>	9	p.Trp99*	-	-	-	0	1	PV
	<i>WDR11 (AD) het</i>	10	p.Ser515Pro	-	-	-	0	1	PV
	<i>KISS1R (AR) hom</i>	19	bez zmiany aminokwasowej	918693, 918695	-	-	0	0.95	VUS
31.	<i>GNRHR (AR) het</i>	4	p.Pro146Ser	144900788	(199)	K, nIHH i M, ZK	0	1	PV
	<i>KISS1R (AR) hom</i>	19	bez zmiany aminokwasowej	918693, 918695	-	-	0	0.95	VUS
32.	<i>GNRH1 (AD) het</i>	8	bez zmiany aminokwasowej	6186	-	-	0	0.95	LPV
	<i>KISS1R (AR) hom</i>	19	bez zmiany aminokwasowej	918693, 918695	-	-	0	0.95	VUS
33.	<i>WDR11 (AD) het</i>	10	bez zmiany aminokwasowej	-	-	-	0	1	PV
	<i>KISS1R (AR) hom</i>	19	bez zmiany aminokwasowej	918693, 918695	-	-	0	0.95	VUS
34.	<i>NELF1 (AD) het</i>	9	bez zmiany aminokwasowej	148475876	-	-	0	1	PV
	<i>KISS1R (AR) hom</i>	19	bez zmiany aminokwasowej	918693, 918695	-	-	0	0.95	VUS

LPV - wariant prawdopodobnie patogenne, PV - wariant patogeny, VUS - wariant o nieokreślonym znaczeniu

PBM - pierwotny brak miesiączki, WBM - wtórny brak miesiączki

#### 4.4. Korelacje genotypowo-fenotypowe

Korelacje genotypowo-fenotypowe w formie tabelarycznej przedstawiono w Tabeli 15 i 16. Dysosmią cechowało się 21 pacjentów (60%), u których to wykryto warianty patogenne genów: *ANOS1*, *CHD7*, *FGFR1*, *FGF8*, *GLI2*, *GNRH1*, *GNRHR*, *LRR1Q3*, *OTX2*, *PRORK2*, *WDR11*. Anosmia wystąpiła w 13 przypadkach (38%), hiposmia u 8 pacjentów (24%) pozostałych 13 badanych (38%) miało prawidłowy węch. Postać niepełna (z pełnym bądź częściowym dojrzewaniem płciowym spontanicznym) została opisana u 8 pacjentów (23%) z mutacjami w genach: *CHD7*, *FGF8*, *FGFR1*, *GNRH1*, *GNRHR*, *NSMF*, *WDR11*. Wada nerek została zdiagnozowana u 4 (12%) pacjentów z wariantami patogennymi genów: *ANOS1*, *FGFR1*, *GNRHR* i *WDR11*. Ruchy lustrzane wystąpiły u 4 badanych z mutacjami monogenowymi w genach: *ANOS1*, *FGF8*, dwugenowymi: *ANOS1* i *WDR11* oraz *WDR11* *GNRHR*. Podniebienia gotyckie było opisane u 3 pacjentów z mutacją monogenową w: *ANOS1* i dwugenowymi: *GNRH1* i *WDR11* oraz *ANOS1* i *WDR11*. Agenezja zębów była opisana u 1 pacjentki z mutacją w genie *GLI2*. Wada słuchu nie była opisywana w przypadku naszych pacjentów. Torbiel szyszynki została wykryta w badaniu MRI głowy u 3 pacjentów, jednak badanie MRI głowy nie było wykonywane rutynowo u wszystkich pacjentów, stąd liczba torbieli przysadki może się różnić. Korelacje genotypowo-fenotypowe zostały dokładniej omówione w Dyskusji, gdzie zostały skonfrontowane z danymi piśmienniczymi (Tabela 19).

Fenotypy niereprodukcyjne, czyli związane z obecnością wężu i wad towarzyszących u badanych pacjentów, z podziałem na grupy genów w których wykryto mutacje i udziałem procentowym poszczególnych wad podsumowano w Tabeli 15 i 16. Oprócz omawianych wyżej wad uwzględniono w niej również syndaktylię (wystąpiła u 1 pacjenta z mutacją w *CHD7*) i obecność zaburzeń ruchomości gałek ocznych (u 2 pacjentów, z mutacją w genie *ANOS1* i u drugiego z mutacją w genie *GNRHR*). Procentowe wystąpienie wady w przypadku pacjentów z mutacją w danym genie pozwala z szerszej perspektywy spojrzeć na częstość wad u pacjentów z mutacjami w tym samym genie.

Otyłość ( $BMI > 30 \text{ kg/m}^2$ ) występowała u 10 pacjentów (29%) z mutacjami o charakterze zarówno jednogenowym (*CHD7*, *FGF8*, *FGF17*, *GNRH1*, *WDR11*) jak i wielogenowym (*GNRHR* i *WDR11*; *FGF17* i *FGF8*; *FGFR1*, *GLI2* i *OTX2*; *FGFR1* i *WDR11*).

#### 4.5. Korelacje genotyp-przebieg choroby

Korelacje genotyp-przebieg choroby w formie tabelarycznej przedstawiono w Tabeli 17 i 18 a i b.

W wynikach korelacji genotyp-przebieg choroby zwraca uwagę różnorodność przebiegu choroby i różny stopień penetracji choroby u pacjentów z mutacjami w tym samym genie IHH. Powyższe stwierdzenie dotyczy większości badanych genów. W przypadku mutacji w 7 różnych genach (*CHD7*, *FGFR1*, *FGF8*, *GNRH1*, *GNRHR*, *NSMF*, *WDR11*) u 8 pacjentów (nr 2, 6, 8, 10, 11, 23, 30, 34) zaobserwowano późny początek pojawienia się objawów HH.

Odwroćenie objawów hipogonadyzmu (ang. reversal form) zaobserwowano u 2 pacjentów (nr 3 i 4) - u pacjenta z mutacją dwugenową (*CHD7* i *PROKR2*) i u drugiego pacjenta z wykrytą mutacją monogenową w *FGFR1*.

Fenotypy reprodukcyjne, czyli związane z rozwojem drugorzędowych cech płciowych i zstępowaniem jąder u mężczyzn podsumowano w Tabeli.

Najmniejszą objętość jąder w momencie badania mieli pacjenci z mutacjami w genach: *ANOS1*, *GLI2*, *OTX2* i *NSMF*. Największą objętość jąder (>10 ml) w momencie badania mieli pacjenci z mutacjami w genach *CHD7*, *FGF8*, *GNRH1* i *PROKR2*. Wnętrostwo najczęściej występowało w wypadku wariantów patogennych w genach *ANOS1*, *FGF17*, *NSMF* i *WDR11*. Mikropenis występował u pacjentów z mutacjami w genach *GNRH1* (2 pacjentów), *NROB1*, *PROKR2*, *ANOS1* i *WDR11*.

Niepełną postać IHH ze spontanicznym dojrzewaniem najczęściej reprezentowali pacjenci z patogennymi mutacjami w genach *CHD7*, *FGFR1*, *FGF8*, *GNRH1*, *NSMF* i *WDR11*.

**Tabela 15.**

Fenotypy nie związane z funkcją gonad.

Gen	nr	normo- smia	anosmia/ hiposmia	wada nerek	rozszczerp podniebienia /wargi	ruchy lustrzane	syndaktylia	podniebie- nie gotyckie	agenezja zębów	wada słuchu	zaburzenia ruchomości galek ocznych	otyłość	torbiel szyszynki
<i>ANOS1</i>	15 25	0% (0/2)	100% (2/2)	100% (2/2)	0% (0/2)	100% (2/2)	0% (0/2)	100% (2/2)	0% (0/2)	0% (0/2)	50% (1/2)	0% (0/2)	0% (0/2)
<i>CHD7</i>	2 4 9 10 19 24	50% (3/6)	50% (3/6)	0% (0/6)	0% (0/6)	0% (0/6)	16.7% (1/6)	0% (0/6)	0% (0/6)	0% (0/6)	0% (0/6)	16.7% (1/6)	16.7% (1/6)
<i>FGFR1</i>	3 5 14 21 30	40% (2/5)	60% (3/5)	20% (1/5)	0% (0/5)	0% (0/5)	0% (0/5)	0% (0/5)	0% (0/5)	0% (0/5)	0% (0/5)	40% (2/5)	0% (0/5)
<i>FGF8</i>	11 12 16 17 23	20% (1/5)	40% (2/5)	0% (0/5)	0% (0/5)	20% (1/5)	0% (0/5)	0% (0/5)	0% (0/5)	0% (0/5)	0% (0/5)	60% (3/5)	0% (0/5)
<i>FGF17</i>	12 16	0% (0/2)	0% (0/2)	0% (0/2)	0% (0/2)	0% (0/2)	0% (0/2)	0% (0/2)	0% (0/2)	0% (0/2)	0% (0/2)	50% (1/2)	0% (0/2)
<i>GLI2</i>	28 29	50% (1/2)	50% (1/2)	0% (0/2)	50% (1/2)	0% (0/2)	0% (0/2)	0% (0/2)	0% (0/2)	0% (0/2)	0% (0/2)	50% (1/2)	0% (0/2)

Gen	nr	normo- smia	anosmia/ hiposmia	wada nerek	rozszczep podniebienia /wargi	ruchy lustrzane	syndaktylia	podniebie- nie gotyckie	agenezja zębów	wada słuchu	zaburzenia ruchomości gałek ocznych	otyłość	torbiel szyszynki
<i>GNRHI</i>	6 18 32	33.3% (1/3)	66.6% (2/3)	0% (0/3)	0% (0/3)	0% (0/3)	0% (0/3)	0% (0/3)	0% (0/3)	0% (0/3)	0% (0/3)	33.3% (1/3)	33.3% (1/3)
<i>GNRHR</i>	7 10 13 19 20 22 24 31	50% (4/8)	50% (4/8)	12.5% (1/8)	0% (0/0)	12.5% (1/8)	0% (0/0)	12.5% (1/8)	0% (0/0)	0% (0/0)	12.5% (1/8)	12.5% (1/8)	12.5% (1/8)
<i>LRRIQ3</i>	27	0% (0/1)	100% (1/1)	0% (0/1)	0% (0/1)	0% (0/1)	0% (0/1)	0% (0/1)	0% (0/1)	0% (0/1)	0% (0/1)	0% (0/1)	0% (0/1)
<i>NSMF</i>	27 25	0% (0/2)	50% (1/2)	0% (0/2)	0% (0/2)	0% (0/2)	0% (0/2)	0% (0/2)	0% (0/2)	0% (0/2)	0% (0/2)	0% (0/2)	0% (0/2)
<i>OTX2</i>	28	0% (0/1)	100% (1/1)	0% (0/1)	100% (1/1)	0% (0/1)	0% (0/0)	0% (0/0)	0% (0/1)	0% (0/1)	0% (0/1)	100% (1/1)	0% (0/1)
<i>PROKR2</i>	1 4 26	0% (0/3)	100% (3/3)	0% (0/3)	0% (0/3)	0% (0/3)	0% (0/3)	0% (0/3)	0% (0/3)	0% (0/3)	0% (0/3)	0% (0/3)	0% (0/3)
<i>WDR11</i>	1 6 7 8 24 25 33	14.3% (1/7)	85.7% (6/7)	28.6% (2/7)	0% (0/7)	28.6% (2/7)	0% (0/7)	28.6% (2/7)	0% (0/7)	0% (0/7)	0% (0/7)	42.9% (3/7)	14.3% (1/7)

nr - numer identyfikacyjny pacjenta

**Tabela 16.**

Fenotypy nie związane z funkcją gonad (w przypadkach mutacji wielogenowych).

Geny	nr	normosmia	anosmia/ hiposmia	wada nerek	rozszerzenie podniebienia /wargi	ruchy lustrzane	podniebienie -nie gotyckie	agenezja zębów	Wada słuchu	zaburzenia ruchomość i galek ocnych	otyłość	torbiel szyszynki
<i>PROKR2+ WDR11</i>	1	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>CHD7 + PROKR2</i>	4	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>GNRH1+WDR11</i>	6	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>GNRHR+WDR11</i>	7	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-
<i>CHD7+GNRHR</i>	10	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	19	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>FGF8+FGF17</i>	12	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	16	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>ANOS1+ WDR11</i>	25	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-
<i>LRRIQ3+NELF</i>	27	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>CHD7+GLI2</i>	29	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>FGFR1+WDR11</i>	30	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>CHD7+GNRHR+WDR11</i>	24	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>FGFR1+GLI2+OTX2</i>	28	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-

**Tabela 17.** Fenotypy reprodukcyjne u badanych pacjentów według grup genów.

Gen	nr pacjenta	objętość jąder w momencie badania (cm <sup>3</sup> )	wnętrostwo	mikropenis	brak dojrzewania	dojrzewanie częściowe	dojrzewanie pełne	odwracalność
<i>ANOS1</i>								
	15 25	1.21±0.77	100% (2/2)	50% (1/2)	100% (2/2)	0% (0/2)	0% (0/2)	0% (0/2)
<i>CHD7</i>								
	2 4 9 10 22 27 32	12.63±9.45	0% (0/7)	0% (0/7)	57.1% (4/7)	14.3% (1/7)	28.6% (2/7)	14.3% (1/7)
<i>FGFR1</i>								
	3 5 14 21 30	5.02±3.32	40% (2/5)	0% (0/5)	60% (3/5)	20% (1/5)	20% (1/5)	20% (1/5)
<i>FGF8</i>								
	11 12 16 17 23	11.06±8.2	40% (2/5)	0% (0/5)	20% (1/5)	40% (2/5)	40% (2/5)	0% (0/5)
<i>FGF17</i>								
	12 16	5.39±2.85	100% (2/2)	0% (0/2)	50% (1/2)	50% (1/2)	0% (0/2)	0% (0/2)

Gen	nr pacjenta	objętość jąder w momencie badania (cm <sup>3</sup> )	wnętrostwo	mikropenis	brak dojrzewania	dojrzewanie częściowe	dojrzewanie pełne	odwracalność
<b>GLI2</b>	28	0.11	0%	0%	0%	0%	0%	0%
	29		(0/2)	(0/2)	(0/2)	(0/2)	(0/2)	(0/2)
<b>GNRH1</b>	6	13.81	0%	0%	0%	66.3% (2/3)	33.3% (1/3)	(0/3)
	18		(0/3)	(0/3)	(0/3)			
	32							
<b>GNRHR</b>	7	4.1±1.44	12.5 % (1/8)	25 % (2/8)	62.5% (5/8)	25 % (2/8)	12.5 % (1/8)	0% (0/8)
	10							
	13							
	19							
	20							
	22							
	24							
	31							
<b>LRRIQ3</b>	27	bd	0% (0/1)	0% (0/1)	100% (1/1)	0% (0/1)	0% (0/1)	0% (0/1)
	27	1.26±0.63	50%	0%	50%	0%	50%	0%
25	(1/2)		(0/2)	(1/2)	(0/2)	(1/2)	(0/2)	
<b>OTX2</b>	28	0.11	0% (0/1)	0% (0/1)	100% (1/1)	0% (0/1)	0% (0/1)	0% (0/1)
	1	10.88±6.53	33% (1/3)	33% (1/3)	100% (3/3)	0% (0/3)	0% (0/3)	33% (1/3)
4								
26								

Gen	nr pacjenta	objętość jąder w momencie badania (cm <sup>3</sup> )	wnętrostwo	mikropenis	brak dojrzewania	dojrzewanie częściowe	dojrzewanie pełne	odwracalność
<i>WDR11</i>	1	8.61±2.95	42.9% (3/7)	14,3% (1/7)	57,1% (4/7)	0% (0/7)	42.9% (3/7)	0% (0/7)
	6							
	7							
	8							
	24							
	25							
	33							

**Tabela 18 a i 18 b.**

Fenotypy reprodukcyjne w przypadkach mutacji wielogenowych.

**Tabela 18 a.**

Geny	nr pacjenta	objętość jąder (ml)	wnętrostwo	mikropenis	brak dojrzewania	dojrzewanie częściowe	dojrzewanie pełne	odwracalność
<i>PROKR2+WDR11</i>	1	0.28	+	-	+	-	-	-
<i>CHD7+PROKR2</i>	4	25.83	-	-	+	-	-	+
<i>GNRH1+WDR11</i>	6	13.81	-	-	-	-	+	-
<i>GNRHR+WDR11</i>	7	0.30	+	-	+	-	-	-
<i>CHD7+GNRHR</i>	10	13.49	-	-	-	-	+	-
	19	0.83	-	-	+	-	-	-
<i>FGF8+FGF17</i>	12	7.40	+	-	-	+	-	-
	16	3.38	+	-	+	-	-	-
<i>ANOS1+ WDR11</i>	25	0.76	-	+	+	-	-	-
<i>LRRIQ3+NELF</i>	27	bd	-	-	+	-	-	-
<i>CHD7+GLI2</i>	29	nd	-	-	+	-	-	-
<i>FGFR1+WDR11</i>	30	bd	+	-	-	-	+	-
<i>CHD7+GNRHR+WDR11</i>	24	5.14	-	-	+	-	-	-
<i>FGFR1+GLI2+OTX2</i>	28	0.11	-	-	+	-	-	-

**Tabela 18 b.**

Fenotypy reprodukcyjne w przypadkach mutacji wielogenowych.

<b>Geny</b>	<b>nr pacjenta</b>	<b>Objętość jąder (ml)</b>	<b>Wnętrostwo</b>	<b>Mikropenis</b>	<b>Brak dojrzewania</b>	<b>Dojrzewanie częściowe</b>	<b>Dojrzewanie pełne</b>	<b>Odwracalność</b>
<i>PROKR2+WDR11</i>	1	0.28	100% (1/1)	0% (0/0)	100% (1/1)	0% (0/0)	0% (0/0)	0% (0/0)
<i>CHD7+PROKR2</i>	4	25.83	0% (0/0)	0% (0/0)	100% (1/1)	0% (0/0)	0% (0/0)	100% (1/1)
<i>GNRH1+WDR11</i>	6	13.81	0% (0/0)	0% (0/0)	0% (0/0)	0% (0/0)	100% (1/1)	0% (0/0)
<i>GNRHR+WDR11</i>	7	0.30	100% (1/1)	0% (0/0)	100% (1/1)	0% (0/0)	0% (0/0)	0% (0/0)
<i>CHD7+GNRHR</i>	10 19	7.16+8.95	0% (0/2)	0% (0/2)	50% (1/2)	0% (0/2)	50% (1/2)	0% (0/2)
<i>FGF8+FGF17</i>	12 16	5.39+2.84	100% (2/2)	0% (0/2)	50% (1/2)	50% (1/2)	0% (0/2)	0% (0/2)
<i>ANOS1+ WDR11</i>	25	0.76	0% (0/0)	100% (1/1)	100% (1/1)	0% (0/0)	0% (0/0)	0% (0/0)
<i>LRRIQ3+NELF</i>	27	bd	0% (0/0)	0% (0/0)	100% (1/1)	0% (0/0)	0% (0/0)	0% (0/0)
<i>CHD7+GLI2</i>	29	nd	0% (0/0)	0% (0/0)	100% (1/1)	0% (0/0)	0% (0/0)	0% (0/0)
<i>FGFR1+WDR11</i>	30	bd	100% (1/1)	0% (0/0)	0% (0/0)	0% (0/0)	100% (1/1)	0% (0/0)
<i>CHD7+GNRHR+WDR11</i>	24	5.14	0% (0/0)	0% (0/0)	100% (1/1)	0% (0/0)	0% (0/0)	0% (0/0)
<i>FGFR1+GLI2+OTX 2</i>	28	0.11	0% (0/0)	0% (0/0)	100% (1/1)	0% (0/0)	0% (0/0)	0% (0/0)

## 5. Omówienie wyników i dyskusja

### 5.1. Znaczenie badań genetycznych w IHH

Badania genetyczne w izolowanym hipogonadyźmie hipogonadotropowym (IHH) zyskują w ostatnim czasie coraz większe znaczenie. Znajomość podłoża genetycznego IHH u danego pacjenta umożliwia poprawę skuteczności diagnostyki a także zastosowanie odpowiedniej terapii. W zależności od defektu genetycznego, różna jest szansa na odwracalność choroby (ang. "*reversal form*") (211, 212). Zidentyfikowanie mutacji, o której z danych do tej pory opublikowanych wiadomo, że jest często raportowana jako mutacja występująca w postaci odwracalnej IHH pozwala na próbę przerwania terapii i obserwacji chorego pod kątem ustąpienia objawów hipogonadyzmu ale też jego ewentualnego powrotu po okresie remisji (147, 213). Oczywiście znajomość podłoża genetycznego nie zwalnia z wnikliwej obserwacji pacjenta. W każdym przypadku możemy mieć do czynienia z nietypowym przebiegiem choroby uwarunkowanym np. jej wielogenowym podłożem co może modyfikować obraz kliniczny czy wystąpieniem u pacjenta innych chorób endokrynologicznych np. gruczolaka przysadki (214). Poradnictwo genetyczne, czyli informacja na temat defektów genetycznych, i ryzyka odziedziczenia choroby przez potomstwo, to bardzo istotny element opieki nad pacjentami z genetycznie uwarunkowanymi zaburzeniami płodności. Informacje co do prognozy są kluczowe także dla pacjentów z IHH. Wiedza na temat patogenezы tego schorzenia umożliwia skuteczniejsze i poparte dowodami poradnictwo genetyczne. Nierzadko po poznaniu defektu genetycznego podejmuje się decyzje o poszerzeniu diagnostyki genetycznej i endokrynologicznej w rodzinie. Wiedząc jakie wady mogą towarzyszyć danym defektom genetycznym w IHH, zdarza się że po wykryciu mutacji rozszerza się diagnostykę np. o dodatkowe badania obrazowe mające na celu wykrycie m.in. wad nerek. Przykładowo wykrycie mutacji w obrębie genu *CHD7*, co raportowane jest u ok. 6% pacjentów z IHH, a w grupie badanej wystąpiło u 18% pacjentów, obliguje do poszukiwania dotąd niezdiagnozowanych składowych zespołu CHARGE (ang. CHARGE association) (158). Xu i wsp. wykazali, że w przypadku istnienia wariantu patogennego lub prawdopodobnie patogennego genu *CHD7*, nawet u 80% pacjentów z tym defektem można wykryć cechy fenotypowe zespołu CHARGE (158). W grupie badanej z wariantem patogennym genu *CHD7* tylko jeden pacjent miał syndaktylię II i III palca stóp, nie znaleziono natomiast takich wad jak: szczelina oka (*coloboma*), rozszczep wargi czy podniebienia, podniebienie gotyckie, agenezja zębów, wady

uszu i słuchu czy niepełnosprawność intelektualna. Wzrost u wszystkich badanych pacjentów był powyżej 170 cm (i był zgodny z prognozami rodzicielskimi).

Badania genetyczne w IHH i wykrywanie mutacji w nowych genach, dotąd niezwiązanych z rozwojem tego schorzenia, umożliwiają poszerzenie wiedzy na temat czynników odpowiadających za rozwój regionu podwzgórzowo-przysadkowego, migrację neuronów GnRH, sekrecję GnRH itd., a więc mają niebagatelnie znaczne poznawcze, uzupełniając naszą wiedzę na temat procesów neuroendokrynologicznych i neurorozwojowych.

Trzeba pamiętać, że wynik badań genetycznych ma największą rolę w indywidualizacji opieki i terapii u pacjenta z IHH, a w szerszej perspektywie umożliwia lepsze poznanie samego izolowanego hipogonadyzmu hipogonadotropowego jako w wielu przypadkach choroby genetycznej o różnorodnym przebiegu klinicznym.

## **5.2. Badania sekwencjonowania następnej generacji (NGS) w IHH dotychczas - dane piśmiennicze**

Jak do tej pory opublikowano kilka prac w których używano NGS do badań nad izolowanym hipogonadyzmem hipogonadotropowym.

Quaynor i wsp. zastosowali technikę NGS celem analizy 261 genów u 48 pacjentów z nIHH bądź KS. Analizowane przez nich geny zostały wybrane na podstawie udziału genów w formowaniu podwzgórza, przysadki czy dróg węchowych oraz przewidywania efektu pod postacią strukturalnych anomalii chromosomalnych (ang. *suggested by chromosome rearrangements*). Nowatorskie podejście pozwoliło wytypować osiemnaście genów kandydujących: *AMNI, CCKBR, CRY1, CXCR4, FGF13, GAP43, GLI3, JAG1, NOS1, MASTL, NOTCH1, NRP2, PALM2, PDE3A, PLEKHA5, RD3, TRAPPC9 i TSPAN11*. Dwugenowe mutacje znaleziono w 16.7% przypadków, natomiast trójgenowe w 2.1% pacjentów. Zidentyfikowano również 2 nowe mutacje w obrębie *FGFR1* (139).

Ayers i wsp. wykonali sekwencjonowanie z użyciem celowanego panelu 19 genów IHH (*CHD7, GNRH1, GNRHR, HESX1, LEP, PROKR2, PROP1, TAC3, FGFR1, ANOS1, LHX3, FGF8, PROK2, KISS1R, WDR11, SPRY4, FSHB, CGA, SOX10*) u 47 pacjentów pediatrycznych z prawidłowym kariotypem męskim i zaburzeniami rozwoju płci pod postacią wnetrostwa, mikropenisu czy zaburzeń dojrzewania (215). Łącznie znaleziono 14 rzadkich wariantów (<1% MAF w g1000 i ESP6500) genów IHH u 11 pacjentów, w tym mutację dwugenową u 1 pacjenta (w obrębie *CHD7 i FGFR1*) i trójgenową u 1 pacjenta (w obrębie *CHD7, FGFR1 i LEP*). Diagnostykę IHH u tych pacjentów utrudniał fakt, że znajdowali się

w okresie między minidojrzwaniem a dojrzewaniem i wykonano oznaczenia gonadotropin tylko podstawowe, nie stymulowane GnRH (choć test z GnRH ma ograniczone zastosowanie u pacjentów pediatrycznych) Dwóch z 11 pacjentów miało podwyższone stężenie gonadotropin, jeden nie miał ocenianego stężenia gonadotropin, a reszta miała gonadotropiny w normie bądź niskie. Znalezione następujące rzadkie warianty: *PROKR2*: c.C563T:p.S188L (u dwóch pacjentów); *PROKR2* c.G991A:p.V331M; *PROKR2* c.T1054G:p.W352G; *PROK2* c.G68A:p.R23H; *WDR11* c.G2409T:p.W803C; *WDR11* c.A1352G:p.H451R; *WDR11* c.T1279A:p.L427I; *FGFR1* c.C320T:p.S107L (u trzech pacjentów); *CHD7* c.G1565T:p.G522V i *CHD7* c.C2347T:p.P783S (216).

Ji i wsp. wykonali u pacjenta z IHH niedoborem 5-alfa-reduktazy badanie przesiewowe 23 genów z użyciem NGS i zwalidowali wyniki w sekwencjonowaniu tradycyjnym. Panel genów objął: *ANOS1*, *FGFR1*, *FGF8*, *PROKR2*, *PROK2*, *GNRHR*, *GNRH1*, *KISS1R*, *KISS1*, *TACR3*, *TAC3*, *CHD7*, *WDR11*, *HS6ST1*, *SEMA3A*, *NROB1*, *LHB*, *LEP*, *LEPR*, *FSHβ*, *PCSK1*, *SRD5A2* i *NSMF*. Wariant genu *SRD5A2*:c. 680G>A został zidentyfikowany, obok niepatogennych wariantów *ANOS1* i *GnRH1* (rs808119, rs6185). Brak identyfikacji mutacji patogennej leżącej u podłoża IHH może wynikać z obecności mutacji w obrębie innego genu bądź w obrębie regionów niekodujących (217). Shima i wsp. wykryli mutację nonsensowną genu *SOX2* (p.Lys35\*) u pacjenta z izolowanym, niesyndromicznym IHH z towarzyszącą padaczką i obustronnym niedosłuchem czuciowo-ruchowym. Wykonali oni NGS 13 genów uczestniczących w patogenezie IHH (*CHD7*, *FGFR1*, *GNRH1*, *GNRHR*, *ANOS1*, *KISS1R*, *OTX2*, *PROK2*, *PROKR2*, *SOX3*, and *TACR3*) (218). Lima i wsp. zidentyfikowali nowy wariant genu *GNRH1*:c.154-2A>C u brazylijskiego pacjenta z nIHH wykonując badanie NGS na platformie Illumina HiSeq 2500 z wykorzystaniem panelu 34 genów (219). Kolodkina i wsp. przeprowadzili badania NGS u 20 pacjentów z nIHH i 5 pacjentów z ZK z użyciem sekwenatora Ion Torrent (220). Znalezione 21 heterozygotycznych patogennych lub prawdopodobnie patogennych mutacji u 13 pacjentów (*CHD7*, *n*=4; *GNRHR*, *n*=3; *POLR3A*, *n*=3; *POLR3B*, *n*=2; *ANOS1*, *n*=2; *PROKR2*, *n*=2; *FGFR1*, *n*=1; *HS6ST1*, *n*=1; *WDR11*, *n*=1; *FGF8*, *n*=1; *SPRY4*, *n*=1.), z czego 9 było nowych, a u 2 pacjentów wykryto mutację w przynajmniej 3 genach (220).

Xu i wsp. przeprowadzili NGS z wykorzystaniem panelu 15 genów IHH (*ANOS1*, *FGFR1*, *NELF*, *FGF8*, *CHD7*, *WDR11*, *SEMA3A*, *KISS1R*, *KISS1*, *PROKR2*, *PROK2*, *TAC3*, *TACR3*, *GNRH1* i *GNRHR*) u 4 mężczyzn z ZK i rozszczepem wargi bądź podniebienia i u 6 pacjentów z IHH bez rozszczepu podniebienia czy wargi. Zidentyfikowano dwie nowe mutacje w genie *FGFR1*: c.776G>A (p.G259E) i c.358C>T (p.R120C) u dwóch różnych

pacjentów z ZK i towarzyszącym rozszczepem wargi/podniebienia. Ponadto nowa heterozygotyczna mutacja w *KISS1R* c.587C>A (p.P196H) została opisana u innego pacjenta z ZK i rozszczepem wargi (221).

### **5.3. Odniesienie wyników własnych do piśmiennictwa**

#### **5.3.1. Korelacje genotypowo-hormonalne**

##### **5.3.1.1. Gonadotropiny**

Podstawowym badaniem wykonywanym u chorych z hipogonadyzmem hipogonadotropowym jest test stymulacji wydzielania gonadotropin przy pomocy GnRH. Wyniki badań prowadzonych w ramach tego opracowania dotyczących różnych reakcji gonadotropin w teście z GnRH odpowiadają danym przedstawionym w piśmiennictwie (153, 222-225). Między innymi dotyczy to braku adekwatnej odpowiedzi w teście z GnRH u chorych z inaktywującymi mutacjami genu receptora GnRH bądź *NR0B1*(47). Pacjenci z mutacjami w *ANOS1* w badanej grupie mieli zachowaną odpowiedź w teście z GnRH, choć stężenia gonadotropin wyjściowo i po stymulacji w teście z GnRH były raczej niskie, mimo informacji w piśmiennictwie co do częstego całkowitego braku odpowiedzi w teście z GnRH u tych pacjentów (47). Zachowana, lecz stłumiona odpowiedź LH w teście z GnRH była opisywana u pacjentów z autosomalną postacią ZK, tak jak u pacjenta nr 1 czy 7 (226). W publikacjach podkreśla się często, że brak pulsacji LH wiąże się nie tylko z defektem genetycznym, ale również z małą objętością jąder  $\leq 4 \text{ cm}^3$  (107). U pacjentów badanych w ramach niniejszej pracy brak pulsacji LH również wiązał się ze bardzo małą objętością jąder (Tabela 8 i 10).

##### **5.3.1.2. Hormon wzrostu**

U większości pacjentów z IHH tempo liniowego wzrostu jest niezaburzone, ale często brak wyraźnego skoku pokwitaniowego (123, 227). Dwóch pacjentów z opisanej w tej pracy grupy miało w dzieciństwie rozpoznaną niskorosłość leczoną hormonem wzrostu. U pacjenta nr 19 z mutacją w genie *CHD7* w wieku dorosłym stężenie IGF-1 było prawidłowe. U innego pacjenta (nr 12) z wariantem patogennym genu *FGF17* stężenie IGF-1 wynosiło 139 ng/ml, zaś GH<0.13 ng/ml w wieku dorosłym. Trzeba pamiętać, że nie każdy niedobór hormonu wzrostu w dzieciństwie utrwali się w wieku dorosłym (228). W piśmiennictwie opisano przypadek pacjenta ze współistniejącym zespołem Kallmanna, hipoplazją przysadki, niedoborem hormonu wzrostu i niskim wzrostem (229). Podobny przypadek ZK i niskorosłości opisał także Subramanian i wsp. i Li i wsp. (230, 231). Opisany w badanej

grupie pacjent nr 12 również miał hipoplazję przysadki, ale dla odmiany wykazywał IHH bez zaburzeń węchu.

### 5.3.1.3. Insulinooporność

Częstość występowania insulinooporności (IR) u pacjentów z IHH jest wyższa niż w populacji ogólnej. Insulinooporność ewidentnie wiąże się z niedoborem testosteronu (232), (233). W badanej grupie pacjentów IR lub DM występowała u 7 pacjentów (31%) i wiązała się z wyższymi wartościami BMI.

### 5.3.2. Korelacje genotypowo fenotypowe

Korelacje genotypowo-fenotypowe w odniesieniu do danych z piśmiennictwa przedstawiono w Tabeli 19. Zwraca uwagę duża zgodność między doniesieniami z piśmiennictwa na temat występowania konkretnych fenotypów IHH w przypadku określonych mutacji a wynikami prowadzonych w niniejszej pracy obserwacji. Przykładem może tu być przypadek dwójki spokrewnionych pacjentów (krewni trzeciego stopnia w linii bocznej) z taką samą mutacją w genie *ANOS1* (chorzy nr 15 i 25), u których wykryte wady rozwojowe (jednostronna agenezja nerek, ruchy lustrzane) dokładnie odpowiadały fenotypowi pacjentów z mutacją w *ANOS1* opisanym dotychczas (105, 120, 122, 123, 208, 234-236). Pacjenci mieli bardzo zbliżony przebieg choroby pomimo, że u starszego z nich wykryto towarzyszący wariant patogeny genu *WDR11*. Opisana mutacja w genie *ANOS1* jest nowym, dotąd nieopisanym defektem, stąd ciągła obserwacja tej rodziny jest istotna dla pełnej oceny wpływu genotypu na fenotyp i przebieg choroby. Późno leczone wnętrostwo, tak jak u pacjenta nr 25 (operacyjne sprowadzenie jąder do moszny w 6 i 7 rż.), oczywiście pogarsza prognozę osiągnięcia płodności. Pacjent nr 15 ze względu na brak takiego obciążenia (prawidłowe zstąpienie jąder) ma lepszą prognozę co do płodności.

Czasem stopień penetracji choroby i obecność wad dodatkowych zdaje się różnić się u badanych pacjentów w porównaniu z danymi z piśmiennictwa (158). W przypadku mutacji w genie *CHD7* żaden pacjent z badanej grupy nie miał rozszczepu podniebienia czy warg, podniebienia gotyckiego, agenezji zębów czy wady słuchu pomimo częstej występowania takich wad w przypadku mutacji tego genu (126, 158).

Poniżej przedstawiono wady i schorzenia towarzyszące oraz opis obserwacji w badanej grupie w porównaniu z danymi z piśmiennictwa (Tabela 19).

**Tabela 19.** Wady i schorzenia towarzyszące oraz opis obserwacji w badanej grupie w porównaniu z danymi z piśmiennictwa.

Gen	nr	normo-smia	anosmia/hiposmia	postać niepełna	wada nerek	rozszczep podniebienia /wargi	ruchy lustrzane	podniebienie gotyckie	agenezja zębów	wada słuchu	Źródło danych/ inne wady
ANOS1	<i>Piśmiennictwo</i>	-	+	-	+ 30%	-	+ 80%	+	-	-	(122, 226, 237-239)
	15	-	+	-	+	-	+	+	-	-	zez oka lewego
	25	-	+	-	+	-	+	+	-	-	astygmatyzm; nadwaga

Gen	nr	normo-smia	anosmia/hiposmia	postać niepełna	wada nerek	rozszczep podniebienia /wargi	ruchy lustrzane	podniebienie gotyckie	agenezja zębów	wada słuchu	Źródło danych/ inne wady
CHD7	<i>Piśmiennictwo</i>	+	+	+	-	+	-	+	+	+	zespół CHARGA: coloboma, niski wzrost, NI (122, 125, 129, 181)
	2	-	+	+	-	-	-	-	-	-	syndaktylia II i III palca stóp; otyłość
	4	-	+	-	-	-	-	-	-	-	odwrocenie objawów w 25 rż.
	9	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10	+	-	+	-	-	-	-	-	-	torbiel szyszynki; leukopenia; niedokrwistość
	19	+	-	-	-	-	-	-	-	-	niedobór GH w dzieciństwie
	24	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Gen	nr	normo-smia	anosmia/hiposmia	postać niepełna	wada nerek	rozszczep podniebienia /wargi	ruchy lustrzane	podniebienie gotyckie	agenezja zębów	wada słuchu	Źródło danych/inne wady
GLI2	<i>Piśmiennictwo</i>	-	+	-	-	+	-	-	-	-	mikropenis, obustronne wnetrostwo, CPHD, polidaktylia, holoprocencefalia (161, 240)
	29	+	-	-	-	-	-	-	-	-	niedorozwój lewej połowy twarzy; wyrosła przeduszne

**Tabela 19.** Wady i schorzenia towarzyszące oraz opis obserwacji w badanej grupie w porównaniu z danymi z piśmiennictwa - kontynuacja.

Gen	nr	normo-smia	anosmia/hiposmia	postać niepełna	wada nerek	rozszczep podniebienia /wargi	ruchy lustrzane	podniebienie gotyckie	agenezja zębów	wada słuchu	Źródło danych/inne wady
<i>FGFR1</i>	<i>Piśmiennictwo</i>	+	+	+	-	+	+ 10%	-	+	-	brachydaktylia, syndaktylia (122, 241, 242)
	3	+	-	-	-	-	-	-	-	-	otyłość; odwrócenie IHH
	5	-	+	-	-	-	-	-	-	-	nietrzymanie moczu
	14	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	21	+	-	-	-	-	-	-	-	-	wyrośle przeduszne po stronie lewej; nadwaga; kamica pęcherzyka żółciowego
	30	-	+	+	+	-	-	-	-	-	zdwojenie układu kielichowo-miedniczkiowego; otyłość

Gen	nr	normo-smia	anosmia/hiposmia	postać niepełna	wada nerek	rozszczep podniebienia /wargi	ruchy lustrzane	podniebienie gotyckie	agenezja zębów	wada słuchu	Źródło danych/inne wady
<i>FGF8</i>	<i>Piśmiennictwo</i>	+	+	+	-	+	-	+	-	-	hiperteloryzm, kamptodaktylia, hipersprężystość stawów palców (124, 202)
	11	-	+	+	-	-	+	-	-	-	otyłość; nawykowe skręcanie kostek
	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	niskorosłość leczona GH; otyłość
	16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	17	-	+	-	-	-	-	--	-	-	trądzik pospolity
	23	+	-	+	-	-	-	-	-	-	mózgowe porażenie dziecięce; oligofrenia; padaczka; cukrzyca insulinoniezależna; częściowy zespół pustego siodła; otyłość

**Tabela 19.** Wady i schorzenia towarzyszące oraz opis obserwacji w badanej grupie w porównaniu z danymi z piśmiennictwa - kontynuacja.

Gen	nr	normo-smia	anosmia/hiposmia	postać niepełna	wada nerek	rozszczep podniebienia /wargi	ruchy lustrzane	podniebienie gotyckie	agenezja zębów	wada słuchu	Źródło danych/inne wady
FGF17	<i>Piśmiennictwo</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-	(132)
	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	niskorosłość leczona GH; otyłość
	16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Gen	nr	normo-smia	anosmia/hiposmia	postać niepełna	wada nerek	rozszczep podniebienia /wargi	ruchy lustrzane	podniebienie gotyckie	agenezja zębów	wada słuchu	Źródło danych/inne wady
GLI2	<i>Piśmiennictwo</i>	-	+	-	-	+	-	-	-	-	mikropenis, obustronne wnetrostwo, CPHD, polidaktylia, holoprocencefalia (161, 240)
	28	-	+	-	-	+	-	-	-	-	otyłość
	29	+	-	-	-	-	-	-	-	-	niedorozwój lewej połowy twarzy; wyrosła przeduszne

Gen	nr	normo-smia	anosmia/hiposmia	postać niepełna	wada nerek	rozszczep podniebienia /wargi	ruchy lustrzane	podniebienie gotyckie	agenezja zębów	wada słuchu	Źródło danych/inne wady
GNRH1	<i>Piśmiennictwo</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	-	(211, 243)
	6	+	-	+	-	-	-	-	-	-	torbiel szyszynki; nadwzroczność
	18	-	+	-	-	-	-	-	-	-	otyłość
	32	-	+	-	-	-	-	-	-	-	nadwaga

**Tabela 19.** Wady i schorzenia towarzyszące oraz opis obserwacji w badanej grupie w porównaniu z danymi z piśmiennictwa - kontynuacja.

Gen	nr	normo-smia	anosmia/hiposmia	postać niepełna	wada nerek	rozszczep podniebienia /wargi	ruchy lustrzane	podniebienie gotyckie	agenezja zębów	wada słuchu	Źródło danych/inne wady
<i>GNRHR</i>	<i>Piśmiennictwo</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	-	(107, 198, 244)
	7	-	+	-	-	-	+	+	-	-	otyłość; gotyckie podniebienie
	10	+	-	+	-	-	-	-	-	-	torbiel szyszynki; leukopenia; niedokrwistość
	13	-	+	-	-	-	-	-	-	-	mikropenis; zez rozbieżny OP; krótkowzroczność; niedokrwistość z niedoboru żelaza; nadwaga; torbiel szyszynki
	19	+	-	-	-	-	-	-	-	-	niedobór GH w dzieciństwie
	20	+	-	-	-	-	-	-	-	-	mikropenis
	22	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	24	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	31	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-

Gen	nr	normo-smia	anosmia/hiposmia	postać niepełna	wada nerek	rozszczep podniebienia /wargi	ruchy lustrzane	podniebienie gotyckie	agenezja zębów	wada słuchu	Źródło danych/inne wady
<i>LRRIQ3</i>	<i>Piśmiennictwo</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	krótka szyja z ograniczoną rotacją, CPHD; (128, 133)
	27	-	+	-	-	-	-	-	-	-	nadwaga

**Tabela 19.** Wady i schorzenia towarzyszące oraz opis obserwacji w badanej grupie w porównaniu z danymi z piśmiennictwa - kontynuacja.

Gen	nr	normo-smia	anosmia/hiposmia	postać niepełna	wada nerek	rozszczep podniebienia /wargi	ruchy lustrzane	podniebienie gotyckie	agenezja zębów	wada słuchu	Źródło danych/inne wady
NSMF	<i>Piśmiennictwo</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-	(165)
	27	-	+	-	-	-	-	-	-	-	nadwaga
	34	-	-	+	-	-	-	-	-	-	padaczka; zaburzenia osobowości; nadwaga

Gen	nr	normo-smia	anosmia/hiposmia	postać niepełna	wada nerek	rozszczep podniebienia /wargi	ruchy lustrzane	podniebienie gotyckie	agenezja zębów	wada słuchu	Źródło danych/inne wady
OTX2	<i>Piśmiennictwo</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	CPHD, mikroftalmia, brak lewej tętnicy szyjnej wewnętrznej (245, 246)
	28	-	+	-	-	+	-	-	-	-	otyłość

Gen	nr	normo-smia	anosmia/hiposmia	postać niepełna	wada nerek	rozszczep podniebienia /wargi	ruchy lustrzane	podniebienie gotyckie	agenezja zębów	wada słuchu	Źródło danych/inne wady
PROKR2	<i>Piśmiennictwo</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-	(122, 247)
	1	-	+	-	-	-	-	-	-	-	niedowaga
	4	-	+	-	-	-	-	-	-	-	odwrócenie objawów w 25 rż
	26	-	+	-	-	-	--	-	-	-	mikropenis

**Tabela 19.** Wady i schorzenia towarzyszące oraz opis obserwacji w badanej grupie w porównaniu z danymi z piśmiennictwa - kontynuacja.

Gen	nr	normo-smia	anosmia/hiposmia	postać niepełna	wada nerek	rozszerzenie podniebienia /wargi	ruchy lustrzane	podniebienie gotyckie	agenezja zębów	wada słuchu	Źródło danych/inne wady
WDR11	<i>Piśmiennictwo</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-	(248)
	1	-	+	-	-	-	-	-	-	-	niedowaga
	6	+	-	+	-	-	-	-	-	-	torbiel szyszynki; nadwzroczność
	7	-	+	-	-	-	+	+	-	-	otyłość, gotyckie podniebienie
	8	-	+	+	-	-	-	-	-	-	otyłość
	24	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	25	-	+	-	+	-	+	+	-	-	astygmatyzm; kamica nerek; dna moczaniowa; nadwaga
	30	-	+	+	+	-	-	-	-	-	Zdwojenie układu kielichowo-miedniczkiowego; otyłość
33	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	

nr - numer identyfikacyjny pacjenta

NI - niepełnosprawność intelektualna

### **a) Nedorozwój połowiczy twarzy**

Wariant patogeny genu *GLI2* został wykryty u pacjentki nr 32 ze złożonym fenotypem, w tym z niedorozwojem połowiczym twarzy i wyrosłami przedusznymi, bez innych wad kostnych, wad węchu czy słuchu. W piśmiennictwie mutacje genu *GLI2* odpowiadają za rozwój różnego stopnia wad rozwojowych twarzy od rozszczepu wargi i podniebienia do holoprosencefalii (ang. *holoprosencephaly*). Mutacja genu *GLI2* w hipoplazji połowy twarzy została opisana przez Bertolacini i wsp. (209).

### **b) Otyłość**

Otyłość i nadwaga, były szczególnie często obserwowane u badanych pacjentów w przypadku mutacji w genach: *FGF8*, *FGFR1*, *KISS1R*, *WDR11*. Zgodnie z doniesieniami z piśmiennictwa za związane z fenotypem otyłości mutacje w genach IHH uważa się mutacje w genach: *LEP*, *LEPR* i *PCSK1 (PC1)* (134-136). W piśmiennictwie znajdują się również opisy otyłych pacjentów z IHH i mutacjami w genach: *GNRHR*, *PROK2* i *PROKR2* (137, 138). Mutacje w *KISS1* i *KISS1R* wiązane są również z otyłością (249). Wydaje się, iż obecność otyłości i nadwagi u badanych pacjentów z wariantami patogennymi genów: *FGF8*, *FGFR1*, *WDR11* to koincydencja, a jej przyczyną jest raczej styl życia, a nie podłoże genetyczne choroby, choć powyższe obserwacje wymagają potwierdzenia u większej liczby pacjentów. Hipogonadyzm jako jednostka chorobowa wiąże się ze zmianą proporcji tkanki tłuszczowej do tkanki mięśniowej i skłonnością do otyłości (250, 251).

### **c) Ruchy lustrzane**

Ruchy lustrzane są wynikiem braku hamowania przeciwstawnej drogi piramidowej prawdopodobnie wskutek braku skrzyżowania drogi piramidowej w ciele modzelowatym (252). Do tej pory ruchy lustrzane opisywane były przy mutacjach w obrębie takich genów wiązanych z IHH: *ANOS1*, *CHD7*, *DUSP6*, *FEZF1*, *FGF17*, *FGF8*, *FGFR1*, *FLRT3*, *HESX1*, *HS6ST1*, *IL17RD*, *KISS1R*, *NSMF*, *PROK2*, *PROKR2*, *SEMA3A*, *SOX10*, *SPRY4*, *TACR3*, *WDR11* (122, 154, 237, 253-255). Obserwacje w niniejszej pracy zgadzają się z doniesieniami z piśmiennictwa. Ruchy lustrzane odnotowano u pacjentów z mutacjami w obrębie: *ANOS1*, *FGF8*, *GNRHR* i *WDR11* (pacjenci nr 7, 11, 15, 25). Należy zaznaczyć, że u pacjenta z mutacją w obrębie *GNRHR* współwystępowała mutacja genu *WDR11* w układzie heterozygotycznym, co zwraca uwagę na znaczenie wielogenowości w kształtowaniu fenotypu IHH.

#### **d) Torbiel szyszynki**

Torbiel szyszynki została wykryta u trzech pacjentów (9% pacjentów) z mutacjami *CHD7* i *GNRHR* (pacjent nr 10), *GNRHR* (pacjent nr 13), i *WDR11* i *GNRHI* (pacjent nr 6). Do tej pory torbiele szyszynki łączone były z mutacjami w genach *RBI* i *DICER1* (256, 257). Torbiele szyszynki występują nawet u 10% pacjentów, którzy mają wykonywane MRI głowy z różnych wskazań, więc ich częstość występowania jest wysoka (258). Nie znaleziono danych w piśmiennictwie na temat częstości występowania torbieli szyszynki w populacji chorych z IHH więc mało prawdopodobne jest aby to schorzenie było powiązane z hipogonadyzmem.

#### **e) Niepełnosprawność intelektualna**

Niepełnosprawność intelektualna (NI) była obserwowana u 1 z 34 (3%) badanych pacjentów. Częstość występowania NI w IHH jest trudna do określenia. Niepełnosprawność intelektualna występuje w IHH głównie w postaciach syndromicznych takich jak: zespół Pradera-Williego, zespół CHARGE', zespół Warburga i zespół związany z mutacją genu *DMLX2* (154) (159). Quin i wsp. opisali deficyt intelektu u 2 z 21 (9.5%) badanych dzieci z IHH (259).

U pacjenta nr 23 z mutacją w genie *FGF8* występowało opisywane w przypadku mutacji w tym genie niepełnosprawność intelektualna. Suzuki i wsp. u 16-letniego chłopca z heterozygotyczną mutacją p.S192fsX204 w ostatnim eksonie genu *FGF8* opisali opóźnione dojrzewanie, hiposmię, niepełnosprawność intelektualną w stopniu lekkim, wady twarzoczaszki i wadę słuchu (260). Geny *FGF8* i *CHD7* łączy epistatyczna zależność podczas rozwoju robaka mózdzku (261). *FGF8* bierze udział w rozwoju przodomózgowia, plakody węchowej, oka i ucha, czyli struktur których dotyczy zespół CHARGE (262) (263). Trzeba pamiętać, że niepełnosprawność intelektualna współwystępująca u pacjentów z IHH może być także wywołane innymi czynnikami genetycznymi (np. zespół łamliwego chromosomu X - FraX), lub niegenetycznymi (np. niedotlenienie okołoporodowe). Dla przykładu Weissortel i wsp opisali przypadek pacjenta z ZK spowodowanym delecją w Xp22.3 w *ANOS1* i niepełnosprawnością intelektualną sprzężoną z chromosomem X oraz rybią łuską sprzężoną z chromosomem X (264).

#### **f) Wady nerek**

U 4 z 34 (9%) wszystkich badanych pacjentów z wariantami patogennymi genów: *ANOS1*, *FGFR1*, *GNRHR* i *WDR11* zobrazowano wady nerek. Należy w tym miejscu

podkreślić szczególną rolę receptora FGFR1 i FGF8 w rozwoju nerek i dolnych dróg moczowych (120, 265). U pacjenta nr 30 ze zdwojeniem układu kielichowo-miedniczkowego zidentyfikowano warianty patogenne w obrębie genów *FGFR1* i *WDR11*. W przypadku mutacji prowadzących do utraty funkcji *FGFR1* opisano jednostronną aplazję nerki (266). Za geny związane z wadami nerek w IHH uważa się: *ANOS1*, *FGFR1*, *FGF8*, *PAX2*, *BMP4* i *SOX10* (120). Niepełny zwrot nerki prawej u pacjenta nr 31 z mutacją w genie *GNRHR* wydaje się być zatem związany z pozagenetycznymi czynnikami, w przeciwnym wypadku byłoby to pierwsze doniesienie o mutacji *GNRHR* i współwystąpieniu wady rozwojowej nerki

### g) Węch

Anosmia opisywana jest u 30-60% pacjentów z IHH w zależności od źródła i badanej grupy (123, 145). Należy jednak pamiętać, że nawet udowodniona w badaniu węchu dysosmia może wynikać z wielu przyczyn, takich jak infekcyjne i poinfekcyjne zaburzenia węchu, uraz czy narażenie na toksyny. Także mnogość czynników wpływających na wielkość progu identyfikacji zapachu (takich jak współpraca pacjenta, jego płeć, inteligencja czy pamięć węchowa) znacznie utrudnia diagnozowanie zaburzeń węchu (106).

Jeden z pacjentów (nr 11) relacjonował zaburzenia węchu dopiero od 30 rż. Także objawy hipogonadyzmu u tego pacjenta pojawiły się w podobnym czasie. W wywiadzie brak informacji o urazach głowy czy innych czynnikach które mogłyby przyczynić się do rozwoju takich objawów. U tego pacjenta wykryto mutację w genie *FGFR1*, odpowiedzialnym za aolHH i postacię ZK. Nie znaleziono podobnego opisu tak późnego pojawienia się zaburzeń węchu w ZK w piśmiennictwie. Możliwe jest, że pacjent wcześniej nie zwrócił uwagi na zaburzenia węchu, lub miał hiposmię mniejszego stopnia, na którą nałożyło się pogorszenie węchu z jakichś innych powodów np. laryngologicznych, co dopiero wtedy zostało zauważone przez pacjenta. Hiposmia pojawiająca się z wiekiem może się wiązać z pojawieniem się zespołu Parkinsona (częstość hiposmii wynosi w tych przypadkach nawet 60%), dlatego pacjent z późno rozwiniętą hiposmią powinien być obserwowany w tym kierunku (267).

U 2 pacjentek (18, 32) (z mutacją w obrębie *GnRH1* zwraca uwagę dysosmia (u jednej pacjentki anosmia, u drugiej hiposmia obecna od wielu lat). U tych pacjentek nie wykryto innych mutacji w badanym panelu genów, a warto wspomnieć, że dla pacjentów z mutacjami w genie *GNRH1* charakterystyczna jest normosmia. Podobnie u pacjentów (7, 13, 24, 31) z wariantami patogennymi w obrębie genu *GNRHR* stwierdzono dysosmię. U pacjentów 13 i 31 to jedyne wykryte mutacje. U pacjenta 7 współwystępowała mutacja w obrębie genu

*WDR11*, co mogłoby tłumaczyć zaburzenia wężu. U pacjenta 24 dodatkowo występowały warianty patogenne genów *CHD7* i *WDR11*. Do tej pory u badanych pacjentów z anosmią/hiposmią nie opisano izolowanych mutacji w genie *GNRHR* i *GNRHI* (268-270).

U pacjentki 29 z mutacją w genie *GLI2* była obecna normosmia, choć często u chorych z mutacjami w *GLI2* odpowiadającymi za IHH mamy do czynienia z zaburzeniami wężu (161, 209, 240). Vaaralahati i wsp. opisali przypadek pacjenta z ZK - z anosmią, wnętrstwem, mikropenisem i dwoma heterozygotycznymi mutacjami, jedną w *SIX3* (c.428G>A, p.G143D) i drugą w *GLI2* (c.2509 G>A, p.E837K) (161). Być może obecność lub nieobecność wężu spotykana przy różnych mutacjach w tym samym genie jest różny i w dużej mierze zależy od miejsca defektu. Nie jest wykluczone, że u omawianych pacjentów współwystępują inne niewykryte mutacje które modyfikują fenotyp związany z wężem.

#### **h) Wnętrostwo**

Ośmiu pacjentów (27.6% z grupy męskiej) miało w wywiadzie wnętrstwo, w tym trzech jednostronne, a pięciu obustronne. Wnętrostwo występowało częściej u pacjentów z dysosmią (5 pacjentów, w tym 4 z anosmią, 1 z hiposmią) niż u pacjentów z nomosmią (3 pacjentów). Powyższe doniesienie jest zgodne z danymi z piśmiennictwa. Pierwsze prace opisujące częstość występowania wnętrstwa u pacjentów z IHH wskazywały na wnętrstwo u 1/3 chorych, z czego u połowy jednostronne, a u drugiej połowy obustronne (238, 271). Aktualnie wnętrstwo opisywane jest w 5 do 40%, a nawet 56% przypadków pacjentów z IHH w zależności od grupy badanej (145, 238). Obecność wnętrstwa i mikropenisa częściej obserwuje się w ZK niż nIHH (238).

Wnętrostwo w badanej grupie wystąpiło u obu pacjentów z mutacją w obrębie genu *FGF17* i u żadnego pacjenta z mutacją w genie *GNRHI* czy *GLI2*, a także u żadnego chorego z jednogenną mutacją tylko w genie *GNRHR*. W piśmiennictwie występowanie wnętrstwa czy mikropenisa jest opisywane w różnych mutacjach genów związanych z IHH (122). U pacjentów z mutacją w genie *ANOS1* wnętrstwo występuje u 56% badanych, w przypadku mutacji w *FGF8/FGFR1* na poziomie 51%, *PROK2/PROKR2* na poziomie 27% a *CHD7* na poziomie 82% (122). Mikropenis występuje u 25-30% pacjentów z mutacjami w genach: *ANOS1*, *FGF8/FGFR1*, *PROK2/PROKR2*, *CHD7* i *HS6ST1*(122). U pacjentów z mutacjami w *HS6ST1* nie obserwowano wnętrstwa zgodnie z piśmiennictwem. Nie znaleziono dokładnych danych statystycznych co do częstości wnętrstwa w genach: *FGF17*, *GNRHI*, *GNRHR* i *GLI2*. Co ciekawe w 2011 r. Latinen i wsp. opublikowali pracę w której

nie udowodnili udziału genów IHH - *FGFR1*, *GNRHR*, *PROK2*, *PROKR2*, *TAC3*, *TACR3* w patogenezie izolowanego wnętrza, co wspiera stwierdzenie, że wnętrze jest objawem towarzyszącym IHH, a zależność jego obecności od genów IHH jest raczej niepewna i prawdopodobnie wiąże się z innymi czynnikami genetycznymi lub pozagenetycznymi (272).

**Tabela 20.**

Przebieg, wielogenowość i różny stopień penetracji i różny fenotyp IHH.

Gen	nr pacjenta	Późny początek (123, 273)	Odwracalność (ang. reversal) (123, 273)	Jednogenowość	Wielogenowość	Różny stopień penetracji i różny fenotyp	piśmiennictwo
<i>ANOS1</i>	Piśmiennictwo	-	+	+	+	-	(122, 226, 237-239)
	15	-	-	+	-	anosmia, agenezja jednej nerki, ruchy lustrzane	
	25	-	-	-	+		
<i>CHD7</i>	Piśmiennictwo	+	+	+	+	+	(122, 125, 129, 181)
	2	+	-	+	-	hiposmia, syndaktylia II i III palca stóp, niepełne dojrzewanie	
	4	-	+	-	+	anosmia	
	9	-	-	+	-	normosmia	
	10	?	-	-	+	normosmia, pełne dojrzewanie	
	19	-	-	-	+	normosmia, niedobór GH w dzieciństwie	
	24	-	-	-	+	hiposmia	
29	-	-	-	+	niedorozwój lewej połowy twarzy; wyrosła przeduszne		
<i>FGFR1</i>	Piśmiennictwo	+	+	+	+	+	(122, 241, 242)
	3	-	+	+	-	normosmia	
	5	-	-	+	-	hiposmia, obustronne wnętrzo, nietrzymanie moczu	
	14	-	-	+	-	hiposmia	
	21	-	-	+	-	normosmia, wyrosłe przeduszne po stronie lewej	
	30	?	-	-	+	anosmia, wnętrzo, zdwojenie układu kielichowo-miedniczkowego, otyłość, niepełne dojrzewanie	
<i>FGF8</i>	Piśmiennictwo	+	-	+	+	+	
	11	+	-	+	-	hiposmia, ruchy lustrzane, otyłość	
	12	-	-	-	+	normosmia, obustronne wnętrzo, niskorosłość leczona GH	
	16	-	-	-	+	normosmia, jednostronne wnętrzo	
	17	-	-	+	-	anosmia, jądra wędrujące,	
	23	?	-	+	-	normosmia, niepełnosprawność intelektualna, padaczka, DM II, otyłość	
<i>FGF17</i>	Piśmiennictwo						
	12	-	-	-	+	normosmia, obustronne wnętrzo, niskorosłość leczona GH	

<i>FGF17</i> <i>cd.</i>	nr pacjenta	Późny początek (123, 273)	Odwracalność (ang. reversal) (123, 273)	Jedno- geno- wość	Wielogeno- wość	Różny stopień penetracji i różny fenotyp	
	16	-	-	-	+	normosmia, jednostronne wnętrostwo	
<i>GLI2</i>	<i>Piśmienni- ctwo</i>	-	-	+	<i>podejrzew ana</i>	-	(161, 240)
	28	-	-	-	+	anosmia, obustronny rozszczep wargi i podniebienia, otyłość	
	29	-	-	-	+	niedorozwój lewej połowy twarzy; wyrosła przeduszne	
<i>GNRH1</i>	<i>Piśmienni- ctwo</i>	+	-	+	+	+	(211, 243)
	6	+	-	-	+	normosmia	
	18	-	-	+	-	anosmia, otyłość	
	32	-	-	+	-	hiposmia, nadwaga	
<i>GNRHR</i>	<i>Piśmienni- ctwo</i>	+	+	+	+	+	(107, 198, 244)
	7	-	-	-	+	anosmia, ruchy lustrzane rąk, gotyckie podniebienie, jednostronne wnętrstwo, otyłość	
	10	?	-	-	+	normosmia, pełne dojrzewanie	
	13	-	-	+	-	anosmia, mikropenis, zez rozbieżny, nadwaga	
	19	-	-	-	+	normosmia, niedobór GH w dzieciństwie	
	20	-	-	+	-	normosmia; mikropenis	
	22	-	-	+	-	normosmia	
	24	-	-	-	+	hiposmia	
	31	-	-	+	-	anosmia, niepełny zwrot nerki P	
<i>LRR1Q3</i>	<b>brak danych</b>						
	27	-	-	-	+	hiposmia, nadwaga	
<i>NSMF</i>	<i>Piśmienni- ctwo</i>	+	+	-	+	+	(165)
	27	-	-	-	+	hiposmia, nadwaga	
	34	?	-	+	-	Normosmia, obustronne wnętrostwo, padaczka, nadwaga	
<i>OTX2</i>	<i>Piśmienni- ctwo</i>	-	-	+	-	+	(245, 246)
	28	-	-	-	+	anosmia, obustronny rozszczep wargi i podniebienia, otyłość	
<i>PROKR2</i>	<i>Piśmienni- ctwo</i>	+	+	+	+	+	(122, 247)
	1	-	-	-	+	anosmia, jednostronne wnętrostwo, niedowaga	
	4	-	+	-	+	anosmia	
	26	-	-	+	-	anosmia, mikropenis	
<i>WDR11</i>	<i>Piśmienni- ctwo</i>	+	-	-	+	+	(248)
	1	-	-	-	+	anosmia, jednostronne wnętrostwo, niedowaga	
	6	+	-	-	+	normosmia	
	7	-	-	-	+	anosmia, ruchy lustrzane rąk, gotyckie podniebienie, jednostronne wnętrstwo, otyłość	
	8	+	-	+	-	anosmia, otyłość, niepełne dojrzewanie	
	24	-	-	-	+	hiposmia	
	25	-	-	-	+	anosmia, agenezja jednej nerki, ruchy lustrzane	
	30	?	-	-	+	anosmia, wnętrstwo, zdwojenie układu kielichowo- miedniczkowego, otyłość, niepełne dojrzewanie	

### **5.3.3 Podsumowanie korelacji genotypowo-fenotypowych - złożony fenotyp i zróżnicowana penetracja**

Analizując otrzymane wyniki wydaje się, że złożony fenotyp ze współtowarzyszącymi wadami rozwojowymi występuje u pacjentów z mutacjami w genach: *ANOS1*, *CHD7*, *FGFR1*, *GLI2* i *WDR11*. Obserwacje te zgodne są z doniesieniami z piśmiennictwa które opisują współistnienie wielu wad rozwojowych i złożonego fenotypu w przypadku pacjentów IHH z mutacjami w powyższych genach (Tabela 20).

Dość złożony fenotyp rozrodczy i nie związany z funkcją gonad (ang. *nonreproductive*; związany z wadami towarzyszącymi) prezentowali pacjenci z mutacjami w dwóch lub trzech genach. Jednak w piśmiennictwie znajduje się raczej informacje, że pacjenci z mutacjami wielogenowymi nie mają cięższego fenotypu niż pacjenci z mutacjami monogenowymi. Shaw i wsp. opisali w grupie 248 kobiet z niedoborem GnRH dziesięć pacjentek z wielogenowymi mutacjami patogennymi (RSV) nie obserwując bardziej złożonego fenotypu w przypadku mutacji wielogenowych (274).

Zmiany patogenne w genach IHH odznaczają się różną penetracją, co zaznaczono w Tabeli 20. Różna penetracja mutacji wydaje się być obserwowana również u pacjentów w aktualnie badanej grupie co wyraża się różnym przebiegiem dojrzewania i różną manifestacją objawów klinicznych. Dane własne korelują zatem z danymi piśmienniczymi w odniesieniu do dużej heterogenności obrazu klinicznego u pacjentów z mutacjami w tym samym genie powodującymi IHH (237, 242, 274, 275).

### **5.4. Postaci odwracalne IHH**

Odwrócenie objawów hipogonadyzmu (ang. *reversal form*) jest opisywane w przypadku 5-10% pacjentów z IHH i najczęściej występuje w drugiej i trzeciej dekadzie życia (213). Odwrócenie hipogonadyzmu występuje częściej w postaci normosmicznej IHH niż ZK, w trakcie leczenia hormonalnego albo spontanicznie (276). Opisywane są przypadki odwrócenia hipogonadyzmu u pacjentów bez uwidocznionych opuszek węchowych w badaniu rezonansu magnetycznego. U tych pacjentów odwrócenie objawów hipogonadyzmu nie łączy się z poprawą dysosmii (147). W badanej grupie zaobserwowano odwrócenie objawów u jednego pacjenta z normosmią (nr 3) i u jednego pacjenta z anosmią (nr 4). Odwrócenie objawów hipogonadyzmu w IHH opisywane jest w piśmiennictwie w przypadku mutacji w obrębie genów: *ANOS1*, *CHD7*, *FGFR1*, *FGF8*, *GNRHR*, *HS6ST1*, *KISS1*, *KISS1R*, *NSMF*, *PROK2*, *PROKR2*, *TAC3*, *TACR3* (147, 213, 273). Pacjenci

z wyższym stężeniem podstawowej i stymulowanej luteotropiny oraz większym rozmiarem jąder przed leczeniem częściej doznają odwrócenia objawów (213). W badaniu Sidhoum i wsp. z 308 pacjentów z IHH, aż 44 pacjentów (30% z ZK, 70% z nIHH) doświadczyło odwrócenia objawów hipogonadyzmu (147).

Odwrócenie objawów hipogonadyzmu zaobserwowano u pacjenta (nr 4) z mutacjami w genach *CHD7* i *PROKR2* (geny odpowiedzialne za migrację neuronów GnRH) i u pacjenta (nr 3) z mutacją w genie *FGFR1* (gen związany z rozwojem neuronów GnRH). U pierwszego pacjenta zaobserwowano stosunkowo dużą wyjściową objętość jąder (objętość jąder >25 ml) i prawie pięciokrotny wzrost LH w teście z GnRH. U drugiego pacjenta obserwowano małą wyjściową objętość jąder (<5 ml), ale wzrost LH w teście był znaczący - aż osiemnastokrotny. U żadnego z tych pacjentów nie obserwowano wnętrostwa, mikropenisu czy częściowego dojrzewania bez leków. Obserwowane przypadki odwracalności IHH były identyfikowane w przypadku mutacji w genach, przy których opisano już w piśmiennictwie przypadki odwracalności. Prawdopodobnie część odwróceń objawów w IHH może zostać przeoczona z powodu niechęci pacjentów do przerywania terapii hormonalnej celem kontroli i obserwacji w kierunku odwrócenia, a także utratą części pacjentów spod regularnej kontroli, czego również doświadczono w czasie prowadzenia powyższego badania (siedmiu pacjentów odmówiło przerywania terapii hormonalnej celem pełnej kontroli czy uzupełnienia diagnostyki).

Podsumowując, odwrócenie IHH prawdopodobnie jest bardziej rozpowszechnione niż wcześniej szacowano i może wystąpić w szerokim zakresie genotypów i fenotypów (147). Ciągła terapia może maskować naturalny przebieg choroby i wystąpienie odwrócenia objawów hipogonadyzmu. Niestety nawet 10% pacjentów z tych którzy doznali odwrócenia objawów hipogonadyzmu nie ma utrzymania odwrócenia objawów i wystąpi u nich nawrót choroby (147). Wskazane jest zatem nieprzerwane, regularne monitorowanie w kierunku odwrócenia, a potem w kierunku ewentualnego nawrotu hipogonadyzmu (147). Istnienie postaci odwracalnej IHH rodzi pytanie czy postawiono właściwą diagnozę na wstępie co może być poddawane w wątpliwość w przypadku braku wykrycia charakterystycznej mutacji. Chory może mieć nierozpoznane konstytucjonalne opóźnienie dojrzewania i wzrostu lub też nie przyznać się do pobierania preparatów sterydowych na własną rękę, szczególnie w przypadku sportowców czy amatorów siłowni (277). Fakt, że odwrócenie objawów hipogonadyzmu często następuje po leczeniu hormonalnym sugeruje możliwość istnienia populacji neuronów GnRH, które aktywują się dopiero po okresie dojrzewania i do tej aktywacji wymagają pewnej stymulacji np. ekspozycji na steroid płciowy (123).

### **5.5. Izolowany hipogonadyzm hipogonadotropowy o późnym początku (ang. *adult-onset isolated hypogonadotropic hypogonadism, aoIHH*)**

Pacjenci z późnym początkiem IHH (ang. *adult-onset hypogonadotropic hypogonadism* - aoIHH) to pacjenci, którzy o czasie i samoistnie przeszli dojrzewanie płciowe, ale rozwinęli w wieku dorosłym cechy izolowanego hipogonadyzmu hipogonadotropowego i u których wykluczono inne, wtórne przyczyny tego stanu. W niektórych przypadkach pacjenci tacy posiadają biologiczne potomstwo poczęte przed rozwinięciem cech IHH (5). Pierwszy pacjent z potwierdzonym genetycznie IHH i zaobserwowanym odwróceniem objawów hipogonadyzmu opisany w piśmiennictwie to mężczyzna z heterozygotyczną mutacją Q106R w obrębie genu *GNRHR* (107). Bonomi i wsp. opublikowali dane na temat dokładnego fenotypowania włoskiej kohorty pacjentów z IHH i określili częstość hipogonadyzmu z początkiem w wieku dorosłym na około 10% chorych (44 z 503 pacjentów) (106). U kobiet postać aoIHH jest rzadsza i dotyczy około 4.3% pacjentek, bądź nie jest właściwie diagnozowana i rozpoznawana, tylko leczona objawowo (278). Większość chorych z aoIHH odpowiada na pulsacyjne podawanie GnRH drogą podskórną (sc.) i może być skutecznie leczona celem osiągnięcia płodności (131, 279). Zatem w aoIHH uszkodzona jest produkcja bądź wydzielanie GnRH (279). W grupie pacjentów z mutacją w genie *NROB1* (*DAX-1*), z towarzyszącą wrodzoną niedoczynnością nadnerczy (ang. *X-linked adrenal hypoplasia congenita*, AHC) również opisano przypadki aoIHH, także z bardzo płaskim (ang. *blunted*) wyrzutem gonadotropin w teście z gonadoliberyną (280). Postacie z aoIHH zostały opisane w piśmiennictwie w mutacjach następujących genów: *CHD7*, *FGFR1*, *FGF8*, *FGF17*, *GNRH1*, *GNRHR*, *HS6ST1*, *NROB1*, *NSMF*, *PROK2*, *PROKR2*, *WDR11* (123, 154, 273). Późny początek IHH obserwowany był u 21% badanych pacjentów (7 z 34 pacjentów nr: 2, 6, 10, 11, 23, 30, 34), w przypadku mutacji w genach: *CHD7*, *FGFR1*, *FGF8*, *GNRH1*, *GNRHR*, *NSMF* i *WDR11*, co wyjątkowo koreluje z doniesieniami z piśmiennictwa omawianymi powyżej. Obraz kliniczny i szybkość pojawienia się pierwszych objawów są bardzo różne i złożone, co powinno wyczulić klinicystów na możliwość nietypowego przebiegu IHH.

W piśmiennictwie opisywane są też przypadki aoIHH bez udowodnionego podłoża genetycznego, co może wynikać z wybiórczego badania genów IHH i nieznajomości całego podłoża genetycznego IHH (279). Ważne, lecz trudne technicznie ze względu na brak dostępności specyficznych dla przysadki badań immunologicznych, jest to aby w tej postaci IHH wykluczyć autoimmunologiczne zapalenie przysadki, które mogłoby spowodować hipogonadyzm (131). Autoimmunologiczna niedoczynność przysadki (ANP) z obrazem

klinicznym jedynie hipogonadyzmu hipogonadotropowego jest rzadko opisywana u mężczyzn (281, 282). Nie opisywano do tej pory udowodnionego selektywnego uszkodzenia grupy neuronów GnRH w ANP. Obraz ANP nie koresponduje z opisywaną zazwyczaj zachowaną odpowiedzią gonadotropów na podanie gonadoliberyny w aoIHH (279). Pacjenci z grupy badanej nie mieli wykonywanej diagnostyki w kierunku ANP, aczkolwiek nie wykazywali oni skłonności do schorzeń autoimmunologicznych i ich wywiad rodzinny w tym kierunku był nieobciążony, z wyjątkiem pacjenta z młodzieńczym idiopatycznym zapaleniem stawów w wywiadzie (11).

Podobny przypadek jak u pacjenta nr 6 przedstawili Kobayashi i wsp., którzy opisali 37-letnią mężczyznę ze świeżo zdiagnozowanym w przebiegu niepłodności wtórnej aoIHH, który posiadał już pięcioletnie dziecko i po 15 miesiącach leczenia podskórnego GnRH jego żona zaszła w ciążę w skutek inseminacji nasieniem męża (283). U tego pacjenta brak jednak danych dotyczących mutacji leżącej u podłoża IHH. Zbliżony przypadek u 31-letniego mężczyzny z niepłodnością, także bez określenia mutacji leżącej u podłoża IHH, opisał Volpi i wsp. (284). Pacjent nr 6 również został zdiagnozowany w kierunku IHH w trakcie diagnostyki niepłodności wtórnej i stymulacja spermatogenezy okazała się skutecznym leczeniem niepłodności w jego przypadku.

Nachtigall i wsp. przestudiowali 10 przypadków mężczyzn z aoIHH w wieku 27 do 57 lat i porównali je z grupą 24 mężczyzn z klasyczną postacią IHH, wnioskując, że mężczyźni z aoIHH mają większą objętość jąder, wyższe stężenie testosteronu i inhibiny B w surowicy krwi. Pięciu z siedmiu opisanych pacjentów miało stosunkowo dużą objętość jąder (>13 ml). Stężenie testosteronu wynosiło u nich średnio jednak znacznie mniej niż u pozostałych badanych (1.4 vs 11.9 nmol/l) (279). W przypadku naszych pacjentów nie oznaczano poziomu inhibiny B, natomiast objętość jąder i poziom testosteronu były również wyższe u pacjentów z aoIHH względem klasycznej postaci IHH.

Hamowanie podwzgórzowej sekrecji gonadoliberyny odbywa się w dużej mierze za pośrednictwem aromatyzacji testosteronu do estrogeny. Ioannrou-Kadis i wsp. postulowali, że aoIHH może wynikać z nabytej nadmiernej wrażliwości podwzgórza na estrogeny, bazując na przykładzie pacjenta z aoIHH, którego hipogonadyzm odwrócił się po terapii cytrynianem kłomifenu (285).

Postać aoIHH rodzi wiele pytań takich jak: czy jest to zaburzenie wrodzone i czy wszystkie przyczyny wtórnego hipogonadyzmu zostały z całą pewnością wykluczone. Zanim poznano defekty genetyczne charakterystyczne dla klasycznego IHH u pacjentów z aoIHH, twierdzono, że jest to zaburzenie nabyte (279). Caronia i wsp. wykazali obecność tych

samych patogennych zmian genetycznych charakterystycznych dla IHH u kobiet z podwzgórzowym czynnościowym brakiem miesiączki (ang. *functional hypothalamic amenorrhea*, FHA) (286). U 7 z 55 pacjentek z FAH zidentyfikowano mutacje utraty funkcji w następujących genach: *FGFR1* G260E, *FGFR1* R756H, *PROKR2* R85H, *PROKR2* L173R i *GNRHR* R262Q (286). Nie było natomiast do tej pory opublikowanych wyników takich badań w czynnościowych zaburzeniach podwzgórzowych u mężczyzn. Rozróżnienie hipogonadyzmu czynnościowego i aoIHH może być trudne klinicznie w niektórych przypadkach, a jak się okazuje te dwie jednostki chorobowe mogą mieć wspólne podłoże genetyczne. Postulowano nawet, że aoIHH może być odpowiednikiem FAH u mężczyzn (279). Aktualnie zatem najwłaściwsze wydaje się stwierdzenie, że aoIHH jest zaburzeniem, dla którego skłonność jest uwarunkowana genetycznie i być może w zależności od momentu wystąpienia różnych czynników współtowarzyszących czy działania dysraptorów endokrynologicznych zaburzenie to może się ujawnić w różnym czasie. Opóźniony charakter choroby genetycznej może być podobny do późnych manifestacji rodzinnej moczówki podwzgórzowo-przysadkowej, która jest chorobą autosomalnie dominującą związaną z mutacją w genie *AVP* (287). Jednak jak do tej pory opisano aoIHH w przypadku różnych genów, nie tylko dziedziczonych autosomalnie dominująco. AoIHH ma częściej charakter sporadyczny niż rodzinny, choć w wywiadzie pacjentów z aoIHH są w rodzinie osoby z opóźnionym dojrzewaniem czy niepłodnością (279, 288).

## 5.6. Wielogenowe uwarunkowanie choroby i dziedziczenie

Problemem w ocenie wzorów dziedziczenia w IHH może być fakt, że choroba ta może mieć podłoże wielogenowe tak więc w tych przypadkach trudno jest określić charakter dziedziczenia. Jeśli patogenne warianty wystąpią w układzie heterozygotycznym, to może to stanowić duże wyzwanie diagnostyczne (132, 141, 289). Celem oceny modelu dziedziczenia najwłaściwsze było by zebranie dokładnego wywiadu rodzinnego z uwzględnieniem trzech pokoleń, biorąc pod uwagę przebieg dojrzewania, płodność, zaburzenia węchu i obecność ewentualnych wad dodatkowych związanych z IHH. W przypadku nieustalenia podłoża genetycznego IHH ryzyko IHH dla członów rodziny jest trudne do ustalenia, ale w przypadkach mutacji dominujących może sięgać nawet 50% (123).

W 2006 r. Dode i wsp. opisali przypadek pacjenta z ZK który miał zidentyfikowane mutacje w 2 genach - *PROKR2* i *ANOS1* (196). Od tego czasu badanie wielogenowe podłoża IHH stało się przedmiotem wielu prac. Badając kolejne większe kohorty pacjentów, współwystępowanie mutacji w genie *PROKR2* i *ANOS1* opisywano na poziomie nawet 8%,

zaś w genach *GNRHR* i *ANOS1* w 10% badanych przypadków (143, 145). U przedstawionych w niniejszej pracy pacjentów nie odnaleziono ww. mutacji dwugenowych.

Nair i wsp. badając populację Indian z Azji z IHH opisali wielogenowość na poziomie tylko 1.5% (105). Aktualnie uważa się, że wielogenowy defekt w IHH dotyczy nawet 10-20% pacjentów (154). Mutacje dwugenowe są częstsze - 11-16.7%, niż trójgenowe - ok. 2.1% pacjentów. (141, 224) (139, 141, 142, 144, 154, 165). Mutacje dwugenowe wykryto u 12 czyli u 34% pacjentów opisywanych w obecnym opracowaniu (1, 4, 6, 7, 10, 12, 16, 19, 25, 27, 29, 30). Mutacje trójgenowe wykryto u 2 pacjentów, czyli 6% pacjentów (24 i 28). Trzeba pamiętać, że badaniom poddano małą grupę chorych, stąd procent wielogenowości może być zawyżony. Na pewno na wykryty procent mutacji wielogenowych miało wpływ zastosowanie szerokiego panelu badanych genów leżących u podłoża IHH.

Jak wspomniano wyżej mutacje występujące w postaci heterozygoty złożonej w obrębie genu *KISS1R* (zwanego również *GPR54*) w pozycjach intronowych 918693 i 918695 (*g.1407A>G*; *g.1409G>A*) w układzie homozygotycznym zidentyfikowane zostały u wszystkich badanych. Mutacje te nie zostały dotąd opisane w bazach populacyjnych ExAC czy 1000G. Nie znana jest ich częstość w stosunkowo homogennej populacji polskiej, która może różnić się od częstości w mieszanej populacji europejskiej. Program Mutation Taster (MT) ocenił zmiany te jako powodujące chorobę (ang. *disease causing*), a prawdopodobieństwo predykcji mutacji oszacował na poziomie odpowiednio 0.93 i 0.96 (im wynik bliższy 1.0 tym wyższe prawdopodobieństwo patogenności). MT bazuje na klasyfikacji Bayesa w predykcji potencjału wywołania choroby przez zmianę. Nie znany jest dokładny skutek *in vitro* czy *in vivo* tych intronowych mutacji typu „*splice site*” wobec tego wskazane są dalsze badania. Mutacje typu „*splice site*” prowadząc do zmian w składaniu mRNA oraz powstawania różnego rodzaju transkryptów mogą zmieniać docelową strukturę i funkcję białek. Przypuszczalnie mutacja ta może mieć znaczenie modyfikacyjne i oddziaływać wspólnie z innymi mutacjami na fenotyp pacjentów z IHH, chociaż Shimizu i wsp. opisali bezpośredni wpływ mutacji utraty funkcji (ang. *loss of function mutation*) P147L w obrębie genu *KISS1R* (290) na powstanie IHH. Mutacja P147L powoduje zaburzenie funkcji receptora poprzez zmniejszenie powierzchni kontaktu ligand-receptor w obrębie kieszeni wiążącej i utratę powinowactwa ligandu do receptora (290). W piśmiennictwie mutacje w obrębie *KISS1R* są jedynymi mutacjami opisanymi u pacjentów z IHH lub mogą towarzyszyć innym mutacjom. Ich częstość opisana jest na poziomie <2% w badanej dotąd populacji IHH (123). Mutacje w obrębie *KISS1R* zostały do tej pory opisane w kilkunastu przypadkach, stąd dalsze badania tego genu w IHH są potrzebne dla

oszacowania fenotypowego zróżnicowania w przypadku zmian patogennych w tym genie (105, 144, 176, 212, 221, 290-293). Mutacje typu "splice site" uznawane za przyczynowe w opisanych przypadkach IHH były opisane przez Breuera i wsp. i Teles i wsp. (293, 294).

W przyszłości planowane są dalsze badania częstości występowania tych mutacji o złożonej heterogenności w obrębie genu *KISS1R* w pozycjach intronowych: 918693 i 918695 (*g.1407A>G*; *g.1409G>A*) w populacji polskiej. Ze względu na bardzo wysoką częstość tej mutacji w badanej grupie chorych i jej nieznaną dokładny wpływ na fenotyp i patogenezę IHH została ona przedstawiona kursywą w Tabeli 13 i nie była uwzględniana w wyliczeniu częstości mutacji wielogenowych u badanych pacjentów.

Sykotis i wsp. zbadali obecność mutacji w 8 genach: *FGFR1*, *ANOS1*, *PROKR2*, *GNRHR*, *FGF8*, *KISS1R*, *NELF* i *PROK2* (141). Mutacje dwugenowe u pacjentów ze znaną mutacją w 1 genie znaleziono u 11% pacjentów, zaś tylko u 2.5% pacjentów u wszystkich pacjentów. Minusem tej analizy było nie uwzględnienie w niej genów *CHD7* i *WDR11* (141). W prowadzonych w niniejszej pracy badaniach mutacji u pacjentów z IHH szczególnie często w układzie dwugenowym występowały geny: *WDR11*, *CHD7* i *GNRHR*. Geny te są odpowiedzialne za rozwój i migrację neuronów GnRH i transdukcję sygnału na poziomie przysadki. Wspomniane trzy geny to geny, których mutacje zgodnie z piśmiennictwem z wysoką częstością występują u pacjentów z IHH - łącznie u nawet 13 do 23% pacjentów z IHH (Tabela 3) stąd zapewne wysoka wykrywalność mutacji w nich w badanej populacji. Celem miarodajnego porównania poziomu wielogenowości na pewno wykorzystywany do badań genetycznych w IHH panel powinien zawierać geny: *WDR11*, *CHD7* i *GNRHR*. Quaynor i wsp. zbadali obecność mutacji w obrębie 13 najpopularniejszych genach odpowiadających za IHH (*ANOS1*, *GNRHR*, *FGFR1*, *KISS1R*, *TAC3*, *TACR3*, *FGF8*, *PROKR2*, *PROK2*, *CHD7*, *NELF*, *GNRH1* i *WDR11*), wykrywając mutacje dwugenowe u 12.5% pacjentów (144), czyli rzadziej niż w obecnym badaniu. Zapewne istnieją również różnice populacyjne ale aby obiektywnie ocenić tę hipotezę należałoby zastosować tak samo szeroki panel genów w różnych badanych populacjach. Trudno porównywać wyniki badań panelu 20 genowego względem panelu 13 genowego (144).

Podsumowując poziom wielogenowości określany w różnych badaniach zależy do dobranych metod, szerokości zastosowanego panelu genetycznego i grupy chorych. Mutacje w różnych *loci* powodują interakcje i zmieniają fenotyp IHH w opisywanych dotychczas przypadkach rodzinnych. Dwa różne defekty genetyczne mogą działać synergistycznie i dawać cięższy fenotyp niż mutacje pojedyncze, co może przypominać proces antycypacji spotykany w chorobach z ekspansją powtórzeń trójnukleotydowych (142).

Geny IHH opisane w układach wielogenowych to: *ANOS1*, *CHD7*, *DUSP6*, *FGFR1*, *FGF8*, *FGF17*, *GNRHR*, *HS6ST1*, *KISS1R*, *NSMF*, *OL14RD*, *PROK2*, *PROKR2*, *SEMA3A*, *SEMA7A*, *SPRY*, *TAC3*, *TACR3*, *WDR11* (132, 273). Do tej pory w układach wielogenowych u pacjentów IHH nie opisywano mutacji w genach *GLI2* i *LRRIQ3*, co obserwowano w badanej grupie chorych w tym opracowaniu. Podejrzewa się, że warianty patogene w obrębie genów takich jak *NSMF* czy *WDR11* to mutacje raczej towarzyszące, a nie główne w IHH i same nie wywołają IHH (165). Jak wspomniano wyżej, większość znanych defektów związanych z IHH powstaje na podłożu wielogenowym, co może skutkować synergistycznym działaniem i generować różną ekspresję i różny stopień penetracji choroby (123)

Samo wykrycie mutacji w więcej niż jednym genie nie świadczy o tym, że ta druga mutacja ma wpływ na fenotyp i przebieg choroby. Synergistyczna heterozygotyczność, zakładająca istnienie kilku częściowych defektów białkowych w co najmniej jednej ścieżce sygnałowej jest szczególnie badana we wrodzonych chorobach serca, zespole Alporta, zespole metabolicznym czy chorobach nowotworowych (295-297). *FGF8*, *FGFR1* i *ANOS1* są genami, których produkty wchodzą w szczególne reakcje. Siarczan heparanu jest niezbędny to funkcjonowania *FGFR1* i anosminy (298). Ta wspólna ścieżka sygnałowa dla *FGF8*, *FGFR1* i *ANOS1* szczególnie wskazuje na uwzględnienie synergistycznej heterozygotyczności w patogenezie IHH. Xu i wsp. zaproponowali model synergistycznej heterozygotyczności w przypadku mutacji *NELF* i *ANOS1* oraz *NELF* i *TACR3* (165).

W Tabeli 21 przedstawiono funkcje zmutowanych genów w badanych pacjentów. Mutacje najczęściej dotyczyły genów biorących w rozwoju neuronów GnRH i migracji neuronów GnRH. Tuż za uplasowały się defekty dotyczące rozwoju przysadki i transdukcji sygnału.

**Tabela 21.**

Funkcja genów w których znaleziono mutacje u poszczególnych pacjentów.

Nr	gen w którym znaleziono mutację	funkcja			
		migracja neuronów GnRH	rozwój neuronów GnRH	podwzgórzowa transdukcja sygnału	rozwój przysadki i transdukcja sygnału na poziomie przysadki
1.	<i>PROKR2</i>				
	<i>WDR11</i>				
2.	<i>CHD7</i>				
3.	<i>FGFR1</i>				
4.	<i>CHD7</i>				
	<i>PROKR2</i>				
5.	<i>FGFR1</i>				
6.	<i>WDR11</i>				
	<i>GNRH1</i>				
7.	<i>GnRHR</i>				
	<i>WDR11</i>				
8.	<i>WDR11</i>				
9.	<i>CHD7</i>				
10.	<i>CHD7</i>				
	<i>GNRHR</i>				
11.	<i>FGF8</i>				
12.	<i>FGF8</i>				
	<i>FGF17</i>				
13.	<i>GNRHR</i>				
14.	<i>FGFR1</i>				
15.	<i>ANOS1</i>				
16.	<i>FGF8</i>				
	<i>FGF17</i>				
17.	<i>FGF8</i>				
18.	<i>GNRH1</i>				
19.	<i>CHD7</i>				
	<i>GNRHR</i>				
20.	<i>GNRHR</i>				
21.	<i>FGFR1</i>				
22.	<i>GNRHR</i>				
23.	<i>FGF8</i>				
24.	<i>GNRHR</i>				
	<i>CHD7</i>				
	<i>WDR11</i>				
25.	<i>ANOS1</i>				
	<i>WDR11</i>				
26.	<i>PROKR2</i>				
27.	<i>LRRIQ3</i>				
	<i>NELF</i>				
28.	<i>FGFR1</i>				
	<i>GLI2</i>				
	<i>OTX2</i>				
29.	<i>CHD7</i>				
	<i>GLI2</i>				
30.	<i>FGFR1</i>				
	<i>WDR11</i>				
31.	<i>GNRHR</i>				
32.	<i>GNRH1</i>				
33.	<i>WDR11</i>				
34.	<i>NELF1</i>				

nr - numer identyfikacyjny pacjenta

## 5.7. Udział genów biorących udział w rozwoju podwzgórza - wspólne podłoże genetyczne z CPHD

Do panelu badanych genów włączono geny typowe dla embriogenezy przysadki i rozwoju wielohormonalnej niedoczynności przysadki (ang. *combined pituitary hormone deficiency*, CPHD) oraz dysplazji przegrodowo-wzrokowej (ang. *septo-optic dysplasia*, SOD): *GLI2*, *LHX3*, *LHX4*, *OTX2*, *POUF1*, *PROPR1*. Czynniki transkrypcyjne: *SOX2*, *SOX3*, *HESX1* i *OTX2* leżą u podstawy SOD, która charakteryzuje się niedoczynnością przysadki, hipoplazją nerwów wzrokowych i agenezją przegrody przezroczystej (127). CPHD, SOD i IHH częściowo dzielą wspólne podłoże genetyczne. Mutacje genów takie jak *SOX3* czy *LHX3*, pierwotnie wiązane z CPHD, zostały również zidentyfikowane w przypadku pacjentów z IHH (299). Podobnie prawdopodobnie patogenne, rzadkie warianty genetyczne genu *WDR11* czy *PROKR2*, pierwotnie łączone z IHH, zostały zidentyfikowane u pacjentów z CPHD (299, 300).

Oprócz tego do panelu genów włączono również gen *LRRIQ3* (ang. *Leucine Rich Repeats And IQ Motif Containing 3*), znany też pod nazwą *LRRC44*, którego ekspresja została udowodniona w obrębie przysadki i jąder, a jego produkt to prawdopodobnie wewnątrzkomórkowe białko (301). Gen ten został wytypowany w badaniach badania całego eksomu w kohorcie pacjentów z zaburzeniami neurorozwojowym - niepełnosprawnością intelektualną (302). Gen ten badany był już w kontekście opóźnionego dojrzewania. Howard i wsp. zidentyfikowali 12 rzadkich (MAF <2.5%) i prawdopodobnie patogennych wariantów tego genu u 49 pacjentów z opóźnionym dojrzewaniem (101).

Włączenie powyższych genów umożliwiły wykrycie wariantów patogennych genów *OTX2* i *GLI2* u pacjenta nr 28 z ZK i obustronnym rozszczepem wargi i podniebienia.

## 5.8. Dalsze perspektywy badawcze

Przyszłością diagnostyki IHH będzie zapewne zaawansowana analiza wielogenowa. Sekwencjonowanie następnej generacji (ang. *next generation sequencing* - NGS) i sekwencjonowanie całego eksomu (ang. *whole exome sequencing*, WES) zyskują na popularności od 2010 r. Wciąż trwają poszukiwania najlepszych bioinformatycznych algorytmów do analizy i interpretacji ogromnej ilości danych, jakie daje NGS czy WES. Sekwencjonowanie całego genomu (ang. *whole-genome sequencing*, WGS), oprócz sekwencjonowania eksonów, czyli ok. 1 procenta naszego genomu, obejmuje również introny i regiony regulatorowe oraz połączenia intronowo-eksonowe. WGS jest z pewnością badaniem molekularnym przyszłości nie tylko w IHH. Badania WES skutecznie już

zastosowano w diagnostyce pacjentów IHH, u których nie wykryto defektów z zastosowaniem panelu określonych genów (148, 303-306).

### **5.9. Znaczenie wczesnych badań genetycznych i hormonalnych w wykrywaniu IHH**

Minidojrzewanie, czyli okres od około 3 do 6 miesiąca życia dziecka, stanowi swoiste okno diagnostyczne i lecznicze dla hipogonadyzmu hipogonadotropowego (149). Dla dziecka z IHH charakterystyczne będzie obniżone stężenie gonadotropin, odpowiednio testosteronu u chłopca/estradiolu u dziewczynki, oraz obniżenie poziomu inhibiny B. Obniżony poziom FSH, testosteronu i inhibiny B w okresie minidojrzewania u chłopców w IHH wiąże się często z obecnością mikropenisu (długość <2.5 cm) i wnetrostwa (149). Okres minidojrzewania jest ważny dla rozwoju komórek rozrodczych w jądrach i niedojrzałych komórek Sertoliego, zatem jego brak w IHH może mieć ogromne znaczenie dla przyszłej płodności i fenotypu rozrodczego pacjenta z IHH. Jest to okres kiedy można wcześniej, przy pomocy pojedynczego pobrania krwi między 4 a 8 tygodniem życia dziecka wysunąć podejrzenie i zdiagnozować IHH, a nawet rozpocząć leczenie (leczenie prowadzi się w okresie minidojrzewane i wraca się do niego naśladując naturalne dojrzewanie w okresie młodzieńczym) (114). Świadomość istnienia tego okresu pomoże monitorować dzieci pacjentów z IHH, u których uda się osiągnąć sukces rozrodczy. Podsumowując dokładna obserwacja niemowląt w kierunku powyższych objawów klinicznych, wykonanie wstępnych badań hormonalnych, a następnie badań genetycznych w kierunku IHH pozwala na szybkie postawienie właściwej diagnozy i następcze optymalne monitorowanie i leczenie pacjenta.

### **5.10. Podsumowanie**

Badania NGS przeprowadzone u polskich pacjentów z IHH, posiadających bardzo dokładną charakterystykę kliniczną umożliwiły poznanie mutacji patogennych w badanym panelu genów u wszystkich chorych. Badania z użyciem NGS i szerokiego panelu wyselekcjonowanych na podstawie piśmiennictwa genów u bardzo dobrze scharakteryzowanych klinicznie pacjentów z IHH wskazują na dużą skuteczność takiego podejścia do diagnostyki genetycznej. Kluczowe wydaje się właściwe kliniczne zakwalifikowanie pacjentów i przeprowadzenie szerokiej diagnostyki różnicowej a także uważne poszukiwanie wad towarzyszących.

Wielogenowość w IHH zdaje się być niedoceniany i niedoszacowanym zjawiskiem. Kontekst wieogenowy i użycie nowoczesnych metod biologii molekularnej takich jak NGS pozwala na równoczesną ocenę współistniejących kilku mutacji w IHH, a tym samym

na dokładniejsze określenie korelacji genotypowo-fenotypowych. Obraz kliniczny pacjentów z IHH jest bardzo heterogenny, a za zjawisko to odpowiada w dużej mierze oligogeniczność jak i różnorodność i złożoność zmian patogennych w tym samym genie.

Ze względu na heterogenność samej jednostki chorobowej jak i wielość mutacji które mogą leżeć u podłoża IHH nadal wyzwaniem wydaje się opracowanie skutecznych i ekonomicznych algorytmów i paneli badań diagnostycznych. Potrzeba jest dalszych obserwacji w szerszej grupie polskich chorych z IHH nad specyfiką rozkładu mutacji IHH.

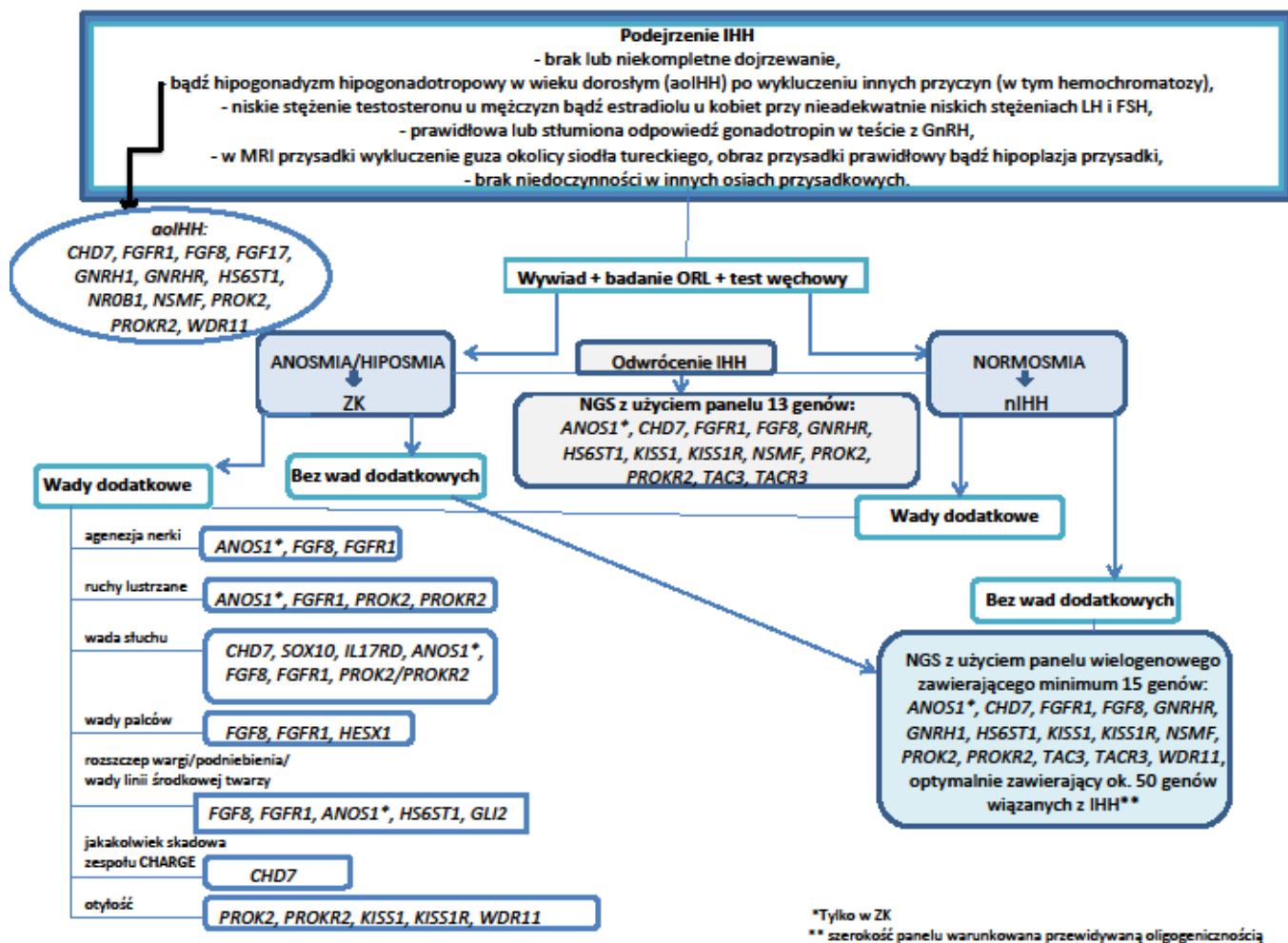
Istnieje dalsza potrzeba badań genu *LRRIQ3* i znaczenia mutacji w jego obrębie u pacjentów z IHH.. Celowe wydaje się także dalsze poszukiwania nowych genów związanych z patogenezą IHH.

### **5.11. Propozycja schematu diagnostyki genetycznej w IHH**

Schemat diagnostyki genetycznej przedstawiono w formie graficznej - Rycina 1. W przypadku podejrzenia IHH i po wykluczeniu innych przyczyn hipogonadyzmu hipogonadotropowego diagnostykę genetyczną można ukierunkować w zależności od obecności: wad dodatkowych (zaproponowano najczęstsze geny łączone z najczęstszymi wadami towarzyszącymi IHH), postaci odwracalnej IHH - wytypowano 13 genów (*ANOS1*, *CHD7*, *FGFR1*, *FGF8*, *GNRHR*, *HS6ST1*, *KISS1*, *KISS1R*, *NSMF*, *PROK2*, *PROKR2*, *TAC3*, *TACR3*) i postaci IHH z początkiem w wieku dorosłym (aoIHH) - wybrano 12 genów (*CHD7*, *FGFR1*, *FGF8*, *FGF17*, *GNRH1*, *GNRHR*, *HS6ST1*, *NR0B1*, *NSMF*, *PROK2*, *PROKR2*, *WDR11*). Brak zaburzeń węchu jest czynnikiem różnicującym pacjentów na grupę ZK i nIHH. Z wyjątkiem pominięcia analizy genu *ANOS1* w nIHH, większość innych genów powinna zostać uwzględniona w diagnostyce genetycznej zarówno u pacjentów z ZK jak i nIHH, ze względu na to że mutacje patogenne większości tych genów opisywano do tej pory zarówno w przypadku ZK jak i nIHH (Tabela 3). Jednoczasowa analiza różnych genów w IHH zdaje się być podejściem przyszłości ze względu na duże prawdopodobieństwo istnienia defektów wielogenowych i to znacznie częściej niż do tej pory myślano. Trzeba pamiętać, że wykrycie mutacji charakterystycznej dla danej postaci IHH z konkretną wadą towarzyszącą nie wyklucza współistnienia innej mutacji, nie przewidywanej z punktu widzenia fenotypu (przykład pacjenta 28 z mutacją dwugenową: *ANOS1* i *WDR11*). W przypadku braku wykrycia mutacji u pacjenta z potwierdzonym klinicznie IHH, w szczególności z towarzyszącymi zaburzeniami węchu lub inną wadą dodatkową, rozważyć trzeba WES bądź WGS.

## 6. Wnioski

1. Wykorzystanie sekwencjonowania nowej generacji (NGS) z zastosowaniem odpowiednio dużego panelu genów zwiększa szanse na wykrycie defektu genetycznego u pełnoobjawowego chorego z izolowanym hipogonadyzmem hipogonadotropowym. Do rutynowej diagnostyki genetycznej IHH proponuje się następujący schemat (Rycina 1).
2. Najczęściej stwierdzane defekty genetyczne u chorych z izolowanym hipogonadyzmem hipogonadotropowym dotyczą genów odpowiedzialnych za rozwój neuronów GnRH.
3. Defekty wielogenowe występują często u pełnoobjawowych chorych z IHH ale określenie ich wpływu na tę chorobę wymaga dalszych badań.
4. Stwierdzone w badanej grupie korelacje genotypowo-fenotypowe odzwierciedlają dane do tej pory opublikowane aczkolwiek określony fenotyp chorego z IHH nie zawsze wskazuje na udział dodatkowych czynników genetycznych w powstaniu lub modyfikacji przebiegu choroby (w tym udział defektów wielogenowych)
5. Nieobecność defektów genetycznych wykazujących podwyższoną częstość występowania w IHH (tzw. „hot-spots”) wskazuje na dużą heterogenność mutacji. Wobec tego w celu dokonania szczegółowej i efektywnej analizy genetycznej należy poddać badaniu całe sekwencje kodujące genów związanych z IHH.



Rycina 1. Proponowany schemat diagnostyki genetycznej w izolowanym hipogonadyźmie hipogonadotropowym.

## 7. Streszczenie w języku polskim

Izolowana postać hipogonadyzmu hipogonadotropowego (IHH) jest istotną przyczyną zaburzeń dojrzewania i niepłodności u ludzi. IHH występuje pięć razy częściej u mężczyzn niż u kobiet. U podłoża IHH leżą m.in. zaburzenia migracji neuronów wydzielających gonadoliberynę (GnRH) oraz defekty syntezy, wydzielania i działania samej GnRH. Główna populacja neuronów GnRH rozwija się ze zlokalizowanej pozaczaszkowo plakody węchowej (narząd Jacobsona czyli narząd przylemieszowy) skąd wędruje wzdłuż nerwów narządu przylemieszowego (ang. *vomeronasal nerves*) do blaszki sitowej, a następnie do przodomózgowia pomiędzy 6 a 9 tygodniem ciąży. Wśród postaci IHH wyróżnia się typ z anosmią (brakiem węchu) lub hiposmią (osłabionym węchem), czyli zespół Kallmanna, oraz postać normosmiczną IHH (bez zaburzeń węchu). Zespół Kallmanna stanowi około 60% przypadków IHH. Do dnia dzisiejszego zidentyfikowano około pięćdziesiąt różnych genów biorących udział w etiopatogenezie IHH. Jednakże podłoże genetyczne ponad połowy przypadków IHH nadal pozostaje nieznane.

Nadrzędnym celem badań było oszacowanie częstości występowania mutacji przyczynowych w obrębie znanych genów uczestniczących w patogenezie IHH w populacji polskiej oraz określenie tzw. mutacyjnych miejsc typu „hot-spot” czyli potencjalnych defektów charakteryzujących się zwiększoną częstością w populacji. Zaplanowano również poszukiwanie nowych czynników genetycznych, które leżą u podłoża IHH.

Grupa 34 pełnoobjawowych pacjentów (29 mężczyzn, 5 kobiet, średnio 27.8 lat; min-max: 18 do 43 lat) z IHH z pełną charakterystyką kliniczną została poddana analizie skringingu genomowego przy użyciu platformy sekwencyjnej następnej generacji NGS Ion Torrent Personal Genome Machine (Ion PGM™, firma Thermo Fisher Scientific, Inc.) i dedykowanego panelu 27 genów związanych z IHH, obejmujący regiony kodujące genów: *ANOS1, CHD7, FEZF1, FGF8, FGFR1, GLI2, GNRH1, GNRHR, HS6ST1, IL17RD, KISS1, KISS1R, LHX3, LHX4, LRRIQ3, NSMF, NROB1, OTX1, OTX2, PROK2, PROKR2, PROP1, SEMA3A, SOX10, TAC3, TACR3, WDR11*. Badania przeprowadzono w Pracowni Endokrynologii Molekularnej w Katedrze i Klinice Endokrynologii, Przemiany Materii i Chorób Wewnętrznych Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. W przypadku identyfikacji defektu przyczynowego, wykryte mutacje genetyczne zostały potwierdzone za pomocą konwencjonalnych metod takich jak sekwencjonowanie kapilarne. Mutacje w nowoodkrytych genach poddano analizie *in silico* w celu oceny wpływu zmiany na architekturę białka, oceny jego funkcjonalności oraz potencjalnego zaangażowania w ekspresję nieprawidłowego

fenotypu. Badania przeprowadzone zostały u pacjentów, posiadających bardzo dokładną charakterystykę kliniczną. Zastosowane metody molekularne są obecnie uznawane za najbardziej nowoczesne i zaawansowane narzędzia do badania genomu ludzkiego oraz poszukiwania nowych genów związanych z patogenezą określonych chorób. Tak szeroka analiza nie była dotychczas wykonywana u pacjentów z IHH.

Zidentyfikowano nowe czynniki genetyczne (i ich skojarzenia) potencjalnie zaangażowanych w etiopatogenezę IHH. Warianty patogenne i prawdopodobnie patogenne w badanych genach znaleziono u wszystkich 34 badanych chorych łącznie w 13 genach: *ANOS1*, *CHD7*, *FGF8*, *FGFR1*, *FGF17*, *GLI2*, *GNRH1*, *GNRHR*, *LRRIQ3*, *NSMF*, *OTX2*, *PROKR2*, *WDR11*. W oparciu o wytyczne opracowane przez ACMG (ang. *American College of Medical Genetics and Genomics*) zidentyfikowano: warianty patogenne mutacji - w 80% i warianty prawdopodobnie patogenne – w 20% przypadków. Mutacje jednogenowe zidentyfikowano u 59% pacjentów. Mutacje dwugenowe znaleziono u 12 pacjentów (35%), a trójgenowe u 2 pacjentów (6%). Wielogenowe występowanie mutacji odpowiedzialnych prawdopodobnie za IHH u badanych pacjentów pojawiło się u 41.2% badanych chorych. Łączenie wykryto 12 zmian patogennych i prawdopodobnie patogennych w obrębie genów odpowiedzialnych za migrację neuronów GnRH, 23 mutacje w obrębie genów odpowiedzialnych za rozwój neuronów GnRH, 3 mutacje genów odpowiedzialnych za podwzgórzową transdukcję sygnału i 12 mutacji w obrębie genów odpowiedzialnych za rozwój przysadki i transdukcję sygnału na poziomie przysadki. Wśród badanych pacjentów 3 pacjentów to przypadki rodzinne IHH, pozostali pacjenci to przypadki potencjalnie sporadyczne.

Wykorzystanie sekwencjonowania następnej generacji (NGS) z zastosowaniem odpowiednio szerokiego panelu genów zwiększa szanse na wykrycie defektu genetycznego u chorego z izolowanym hipogonadyzmem hipogonadotropowym z pełną charakterystyką kliniczną. Najczęściej stwierdzane defekty genetyczne u chorych z izolowanym hipogonadyzmem hipogonadotropowym dotyczą genów odpowiedzialnych za rozwój neuronów GnRH. Defekty wielogenowe występują często u pełnoobjawowych chorych z IHH ale określenie ich wpływu na tę chorobę wymaga dalszych obserwacji. Stwierdzone w badanej grupie korelacje genotypowo-fenotypowe odpowiadają danym do tej pory opublikowanym, jednakże określony fenotyp chorego z IHH nie zawsze wskazuje na udział dodatkowych czynników genetycznych w powstaniu lub modyfikacji przebiegu choroby (w tym udział defektów wielogenowych). Nieobecność defektów genetycznych wykazujących podwyższoną częstość występowania w IHH (tzw. „hot-spots”) wskazuje na

dużą heterogenność mutacji. Wobec tego w celu dokonania rzetelnej analizy genetycznej należy poddać badaniu całe sekwencje kodujące genów związanych z IHH.

## 8. Streszczenie w języku angielskim

Isolated hypogonadotropic hypogonadism (IHH) is an important cause of pubertal disorders and infertility in humans. IHH is five times more common in males than in females. GnRH neuronal migration disorders and defects in the synthesis, secretion and action of gonadotropin releasing hormone (GnRH) underlie the background of IHH. The main population of GnRH neurons develops from the extracranially localized olfactory plaque (Jacobson's organ, or an auxiliary organ) and migrates along the vomeronasal nerves to the cribriform lamina and further on to the forebrain between 6 and 9 weeks of gestation. IHH is divided into two types: a type with anosmia (lack of smell) or hyposmia (disturbed sense of smell), called Kallmann syndrome and normosmic form, nIHH (without disturbances of smell). Kallmann syndrome accounts for about 60% of IHH. To date, about fifty different genes involved in the etiopathogenesis of IHH have been identified. However, the genetic background of more than half of IHH cases remains unknown.

The main aim of the research was to estimate the frequency of occurrence of causative mutations in known genes involved in the pathogenesis of IHH in the Polish patients and to determine hot-spots regions, i.e. potential defects characterized by an increased frequency in the population. The search for new genetic factors that underlie IHH is also planned.

A group of 34 well-characterized patients (29 males, 5 females, average age 27.8 min-max: 18 to 43 years) with IHH were included into the study and subjected to genomic screening analysis using the next-generation sequencing (NGS) technology with use of Ion Torrent Personal Genome Machine System (Ion PGM™, Thermo Fisher Scientific, Inc.) and a dedicated panel of 27 genes associated with IHH, including the coding regions of the genes: *ANOS1*, *CHD7*, *FEZF1*, *FGF8*, *FGFR1*, *GLI2*, *GNRH1*, *GNRHR*, *HS6ST1*, *IL17RD*, *KISS1*, *KISS1R*, *LHX3*, *LHX4*, *LRRIQ3*, *NSMF*, *NROB1*, *OTX1*, *OTX2*, *PROK2*, *PROKR2*, *PROP1*, *SEMA3A*, *SOX10*, *TAC3*, *TACR3*, *WDR11*. The research was carried out in the Laboratory of Molecular Endocrinology at the Department of Endocrinology, Metabolism and Internal Diseases of the Medical University of Poznan. In case of identification of a causative defect, detected genetic mutations have been confirmed using conventional methods such as capillary sequencing. Mutations in newly discovered genes were subjected to in silico analysis to evaluate the effect of change on protein architecture, evaluate its functionality and potential involvement in the expression of an abnormal phenotype. The studies were conducted in patients with very detailed clinical characteristics. The applied molecular methods are currently considered to be the most modern and advanced tools for testing the human

genome and searching for new genes related to the pathogenesis of specific diseases. Such extensive analysis has not been performed so far in patients with IHH.

New genetic factors (and their associations) potentially involved in the etiopathogenesis of IHH have been identified. Pathogenic and probably pathogenic variants in the examined genes were found in all 34 patients in 13 genes in total: *ANOS1*, *CHD7*, *FGF8*, *FGFR1*, *FGF17*, *GLI2*, *GNRH1*, *GNRHR*, *LRR1Q3*, *NSMF*, *OTX2*, *PROKR2*, *WDR11*. With the consideration of the criteria defined by the ACMG (American College of Medical Genetics and Genomics), pathogenic variants of the mutation were identified in 80% of cases and probably pathogenic in 20% of cases. Monogenic mutations were identified in 59% of patients. Digenic mutations were found in 12 patients (35%) and trigenic mutations in 2 patients (6%). In 41% of patients oligogenic mutations were discovered.

To sum up, 12 pathogenic and possibly pathogenic changes in the genes responsible for the migration of GnRH neurons, 23 mutations in the genes responsible for the development of GnRH neurons, 3 mutations of genes responsible for the hypothalamic signal transduction and 12 mutations in the genes responsible for pituitary formation and signal transduction at pituitary level were detected. Among the patients studied, 3 patients are family cases of IHH, the remaining patients are potentially sporadic cases.

The use of next-generation sequencing (NGS) employing appropriate and wide panel of genes increases the chances of detecting a genetic defect in a patient with isolated hypogonadotropic hypogonadism and full clinical characteristics. Mutations of genes responsible for the development of GnRH neurons constitute the most frequently observed genetic defects in patients with isolated hypogonadotropic hypogonadism. Oligogenic defects are often present in highly symptomatic patients with IHH, but the determination of their impact of oligogenicity on the disease requires further observation. The genotype-phenotype correlations found in the studied group correspond to the data published so far, however, the specific phenotype of IHH patient does not always indicate the involvement of additional genetic factors (including the oligogenic defects). The absence of hot-spots regions indicates a high heterogeneity of mutations. Therefore, for the purpose of reliable genetic analysis, whole exome sequencing of genes related to IHH should be applied.

**Tabela 22.**

Skróty nazw aminokwasów

<b>Skrót trójliterowy</b>	<b>Skrót jednoliterowy</b>	<b>Nazwa aminokwasu</b>	<b>Skrót trójliterowy</b>	<b>Skrót jednoliterowy</b>	<b>Nazwa aminokwasu</b>
Ala	A	alanina	Leu	L	leucyna
Arg	R	arginina	Lys	K	lizyna
Asn	N	asparagina	Met	M	metionina
Asp	D	kwask asparaginowy	Phe	F	feniloalanina
Cys	C	cysteina	Pro	P	prolina
Gln	Q	glutamina	Ser	S	seryna
Glu	E	kwask glutaminowy	Thr	T	treonina
Gly	G	glicyna	Trp	W	tryptofan
His	H	histydyna	Tyr	Y	tyrozyna
Ile	I	izoleucyna	Val	V	walina

## 9. Piśmiennictwo

1. Andrzej M. Endokrynologia kliniczna: Polskie Towarzystwo Endokrynologiczne; 2012.
2. Carnegie C. Diagnosis of hypogonadism: clinical assessments and laboratory tests. *Rev Urol.* 2004;6 Suppl 6:S3-8.
3. Fraietta R, Zylberstejn DS, Esteves SC. Hypogonadotropic hypogonadism revisited. *Clinics (Sao Paulo).* 2013;68 Suppl 1:81-8.
4. Lodh M, Mukhopadhyay R. Hypogonadotropic Hypogonadism and Gynaecomastia in the Young Adult: A Case Series. *Indian J Clin Biochem.* 2016;31(1):121-4.
5. Silveira LF, Latronico AC. Approach to the patient with hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(5):1781-8.
6. Rabijewski M. [The treatment of hypogonadism and maintenance of fertility in men]. *Pol Merkur Lekarski.* 2016;40(237):198-201.
7. Dhindsa S, Prabhakar S, Sethi M, Bandyopadhyay A, et al. Frequent occurrence of hypogonadotropic hypogonadism in type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(11):5462-8.
8. MacAdams MR, White RH, Chipps BE. Reduction of serum testosterone levels during chronic glucocorticoid therapy. *Ann Intern Med.* 1986;104(5):648-51.
9. Abs R, Verhelst J, Maeyaert J, Van Buyten JP, et al. Endocrine consequences of long-term intrathecal administration of opioids. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85(6):2215-22.
10. Woolf PD, Hamill RW, McDonald JV, Lee LA, et al. Transient hypogonadotropic hypogonadism caused by critical illness. *J Clin Endocrinol Metab.* 1985;60(3):444-50.
11. Winston AP, Wijeratne S. Hypogonadism, hypoleptinaemia and osteoporosis in males with eating disorders. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2009;71(6):897-8.
12. Miller KK. Endocrine effects of anorexia nervosa. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2013;42(3):515-28.
13. Luboshitzky R, Lavie L, Shen-Orr Z, Herer P. Altered luteinizing hormone and testosterone secretion in middle-aged obese men with obstructive sleep apnea. *Obes Res.* 2005;13(4):780-6.
14. Grossmann M, Matsumoto AM. A Perspective on Middle-Aged and Older Men With Functional Hypogonadism: Focus on Holistic Management. *J Clin Endocrinol Metab.* 2017;102(3):1067-75.

15. Snyder G, Shoskes DA. Hypogonadism and testosterone replacement therapy in end-stage renal disease (ESRD) and transplant patients. *Transl Androl Urol.* 2016;5(6):885-9.
16. Wong N, Levy M, Stephenson I. Hypogonadism in the HIV-Infected Man. *Curr Treat Options Infect Dis.* 2017;9(1):104-16.
17. Carter JN, Tyson JE, Tolis G, Van Vliet S, et al. Prolactin-screening tumors and hypogonadism in 22 men. *N Engl J Med.* 1978;299(16):847-52.
18. El Osta R, Grandpre N, Monnin N, Hubert J, et al. Hypogonadotropic hypogonadism in men with hereditary hemochromatosis. *Basic Clin Androl.* 2017;27:13.
19. Spruit MA, Thomeer MJ, Gosselink R, Wuyts WA, et al. Hypogonadism in male outpatients with sarcoidosis. *Respir Med.* 2007;101(12):2502-10.
20. Scarano V, De Santis D, Suppressa P, Lastella P, et al. Hypogonadotropic hypogonadism associated with hereditary hemorrhagic telangiectasia [corrected]. *Case Rep Endocrinol.* 2013;2013:465376.
21. Hari Kumar KV, Swamy MN, Khan MA. Prevalence of hypothalamo pituitary dysfunction in patients of traumatic brain injury. *Indian J Endocrinol Metab.* 2016;20(6):772-8.
22. Garg SK, Bandyopadhyay PK, Dash RJ. Hypogonadotropic hypogonadism. An unusual complication of tuberculous meningitis. *Trop Geogr Med.* 1987;39(3):296-8.
23. Honegger J, Schlaffer S, Menzel C, Droste M, et al. Diagnosis of Primary Hypophysitis in Germany. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015;100(10):3841-9.
24. Lima Amato LG, Latronico AC, Gontijo Silveira LF. Molecular and Genetic Aspects of Congenital Isolated Hypogonadotropic Hypogonadism. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2017;46(2):283-303.
25. Traczyk WT, A. *Fizjologia człowieka z elementami fizjologii stosowanej i klinicznej.* Warszawa: PZWL; 2015. 345-8; 865-9 p.
26. Matsuo H, Baba Y, Nair RM, Arimura A, et al. Structure of the porcine LH- and FSH-releasing hormone. I. The proposed amino acid sequence. *Biochem Biophys Res Commun.* 1971;43(6):1334-9.
27. Baba Y, Matsuo H, Schally AV. Structure of the porcine LH- and FSH-releasing hormone. II. Confirmation of the proposed structure by conventional sequential analyses. *Biochem Biophys Res Commun.* 1971;44(2):459-63.

28. Schally AV, Arimura A, Kastin AJ, Matsuo H, et al. Gonadotropin-releasing hormone: one polypeptide regulates secretion of luteinizing and follicle-stimulating hormones. *Science*. 1971;173(4001):1036-8.
29. Marques P, Skorupskaite K, Rozario KS, Anderson RA, et al. Physiology of GnRH and Gonadotropin Secretion. In: De Groot LJ, Chrousos G, Dungan K, Feingold KR, Grossman A, Hershman JM, et al., editors. *Endotext*. South Dartmouth (MA)2000.
30. Flanagan CA, Manilall A. Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Receptor Structure and GnRH Binding. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2017;8:274.
31. Schally AV, Arimura A, Baba Y, Nair RM, et al. Isolation and properties of the FSH and LH-releasing hormone. *Biochem Biophys Res Commun*. 1971;43(2):393-9.
32. Schally AV, Kastin AJ, Arimura A. Hypothalamic follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH)-regulating hormone: structure, physiology, and clinical studies. *Fertil Steril*. 1971;22(11):703-21.
33. Byrnes WW, Meyer RK. Effect of physiological amounts of estrogen on the secretion of follicle stimulating and luteinizing hormones. *Endocrinology*. 1951;49(4):449-60.
34. Cargille CM, Ross GT, Yoshimi T. Daily variations in plasma follicle stimulating hormone, luteinizing hormone and progesterone in the normal menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab*. 1969;29(1):12-9.
35. Li CH, Simpson ME, Evans HM. Isolation of Pituitary Follicle-Stimulating Hormone (FSH). *Science*. 1949;109(2835):445-6.
36. Bramble FJ, Houghton AL, Eccles SS, Murray MA, et al. Specific control of follicle stimulating hormone in the male: postulated site of action of inhibin. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1975;4(4):443-9.
37. Luisi S, Florio P, Reis FM, Petraglia F. Inhibins in female and male reproductive physiology: role in gametogenesis, conception, implantation and early pregnancy. *Hum Reprod Update*. 2005;11(2):123-35.
38. Shi F, Ozawa M, Komura H, Yang P, et al. Secretion of ovarian inhibin and its physiologic roles in the regulation of follicle-stimulating hormone secretion during the estrous cycle of the female guinea pig. *Biol Reprod*. 1999;60(1):78-84.
39. Baker FD, Kragt CL. Maturation of the hypothalamic-pituitary-gonadal negative feedback system. *Endocrinology*. 1969;85(3):522-7.
40. Barraclough CA, Haller EW. Positive and negative feedback effects of estrogen on pituitary LH synthesis and release in normal and androgen-sterilized rats. *Endocrinology*. 1970;86(3):542-51.

41. Shaw RW. Estrogen modulation of gonadotrophin release. *Proc R Soc Med.* 1975;68(2):73-5.
42. Lee PA. Positive feedback of gonadotropins in males. *Andrologia.* 1978;10(6):485-9.
43. Kulin HE, Reiter EO. Gonadotropin and testosterone measurements after estrogen administration to adult men, prepubertal and pubertal boys, and men with hypogonadotropism: evidence for maturation of positive feedback in the male. *Pediatr Res.* 1976;10(1):46-51.
44. Wierman ME, Kiseljak-Vassiliades K, Tobet S. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuron migration: initiation, maintenance and cessation as critical steps to ensure normal reproductive function. *Front Neuroendocrinol.* 2011;32(1):43-52.
45. Geller S, Lomet D, Caraty A, Tillet Y, et al. Rostro-caudal maturation of glial cells in the accessory olfactory system during development: involvement in outgrowth of GnRH neurites. *Eur J Neurosci.* 2017;46(10):2596-607.
46. Taroc EZM, Prasad A, Lin JM, Forni PE. The terminal nerve plays a prominent role in GnRH-1 neuronal migration independent from proper olfactory and vomeronasal connections to the olfactory bulbs. *Biol Open.* 2017;6(10):1552-68.
47. Spratt DI, Carr DB, Merriam GR, Scully RE, et al. The spectrum of abnormal patterns of gonadotropin-releasing hormone secretion in men with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism: clinical and laboratory correlations. *J Clin Endocrinol Metab.* 1987;64(2):283-91.
48. Yoshida K, Tobet SA, Crandall JE, Jimenez TP, et al. The migration of luteinizing hormone-releasing hormone neurons in the developing rat is associated with a transient, caudal projection of the vomeronasal nerve. *J Neurosci.* 1995;15(12):7769-77.
49. Wray S, Grant P, Gainer H. Evidence that cells expressing luteinizing hormone-releasing hormone mRNA in the mouse are derived from progenitor cells in the olfactory placode. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86(20):8132-6.
50. Forni PE, Taylor-Burds C, Melvin VS, Williams T, et al. Neural crest and ectodermal cells intermix in the nasal placode to give rise to GnRH-1 neurons, sensory neurons, and olfactory ensheathing cells. *J Neurosci.* 2011;31(18):6915-27.
51. Greenspan FSGDG. *Endokrynologia ogólna i kliniczna.* I ed. Lublin: Czelej; 2004. 109-10 p.
52. Legouis R, Hardelin JP, Levilliers J, Claverie JM, et al. The candidate gene for the X-linked Kallmann syndrome encodes a protein related to adhesion molecules. *Cell.* 1991;67(2):423-35.

53. Cariboni A, Pimpinelli F, Colamarino S, Zaninetti R, et al. The product of X-linked Kallmann's syndrome gene (KAL1) affects the migratory activity of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-producing neurons. *Hum Mol Genet.* 2004;13(22):2781-91.
54. Schwanzel-Fukuda M, Crossin KL, Pfaff DW, Bouloux PM, et al. Migration of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons in early human embryos. *J Comp Neurol.* 1996;366(3):547-57.
55. Guimiot F, Chevrier L, Dreux S, Chevenne D, et al. Negative fetal FSH/LH regulation in late pregnancy is associated with declined kisspeptin/KISS1R expression in the tuberal hypothalamus. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(12):E2221-9.
56. Clements JA, Reyes FI, Winter JS, Faiman C. Ontogenesis of gonadotropin-releasing hormone in the human fetal hypothalamus. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1980;163(3):437-44.
57. Oakley AE, Clifton DK, Steiner RA. Kisspeptin signaling in the brain. *Endocr Rev.* 2009;30(6):713-43.
58. Muir AI, Chamberlain L, Elshourbagy NA, Michalovich D, et al. AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide KiSS-1. *J Biol Chem.* 2001;276(31):28969-75.
59. Kuohung W, Kaiser UB. GPR54 and KiSS-1: role in the regulation of puberty and reproduction. *Rev Endocr Metab Disord.* 2006;7(4):257-63.
60. Hrabovszky E, Ciofi P, Vida B, Horvath MC, et al. The kisspeptin system of the human hypothalamus: sexual dimorphism and relationship with gonadotropin-releasing hormone and neurokinin B neurons. *Eur J Neurosci.* 2010;31(11):1984-98.
61. Rometo AM, Krajewski SJ, Voytko ML, Rance NE. Hypertrophy and increased kisspeptin gene expression in the hypothalamic infundibular nucleus of postmenopausal women and ovariectomized monkeys. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(7):2744-50.
62. Hagen C, McNeilly AS. The gonadotrophins and their subunits in foetal pituitary glands and circulation. *J Steroid Biochem.* 1977;8(5):537-44.
63. Clements JA, Reyes FI, Winter JS, Faiman C. Studies on human sexual development. III. Fetal pituitary and serum, and amniotic fluid concentrations of LH, CG, and FSH. *J Clin Endocrinol Metab.* 1976;42(1):9-19.
64. Kaplan SL, Grumbach MM. The ontogenesis of human foetal hormones. II. Luteinizing hormone (LH) and follicle stimulating hormone (FSH). *Acta Endocrinol (Copenh).* 1976;81(4):808-29.

65. Aubert ML, Grumbach MM, Kaplan SL. The ontogenesis of human fetal hormones. IV. Somatostatin, luteinizing hormone releasing factor, and thyrotropin releasing factor in hypothalamus and cerebral cortex of human fetuses 10-22 weeks of age. *J Clin Endocrinol Metab.* 1977;44(6):1130-41.
66. Kurtoglu S, Bastug O. Mini puberty and its interpretation. *Turk Pediatri Ars.* 2014;49(3):186-91.
67. Kuiri-Hanninen T, Sankilampi U, Dunkel L. Activation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in infancy: minipuberty. *Horm Res Paediatr.* 2014;82(2):73-80.
68. Knickmeyer RC, Auyeung B, Davenport ML. Assessing prenatal and neonatal gonadal steroid exposure for studies of human development: methodological and theoretical challenges. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2014;5:242.
69. Whitlock KE. A new model for olfactory placode development. *Brain Behav Evol.* 2004;64(3):126-40.
70. Wray S. From nose to brain: development of gonadotrophin-releasing hormone-1 neurones. *J Neuroendocrinol.* 2010;22(7):743-53.
71. Cariboni A, Hickok J, Rakic S, Andrews W, et al. Neuropilins and their ligands are important in the migration of gonadotropin-releasing hormone neurons. *J Neurosci.* 2007;27(9):2387-95.
72. Balasubramanian R, Crowley WF, Jr. Isolated Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Deficiency. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Stephens K, et al., editors. *GeneReviews*((R)). Seattle (WA)1993.
73. Mitchell AL, Dwyer A, Pitteloud N, Quinton R. Genetic basis and variable phenotypic expression of Kallmann syndrome: towards a unifying theory. *Trends Endocrinol Metab.* 2011;22(7):249-58.
74. Corradi A, Croci L, Broccoli V, Zecchini S, et al. Hypogonadotropic hypogonadism and peripheral neuropathy in *Ebf2*-null mice. *Development.* 2003;130(2):401-10.
75. Chung WC, Moyle SS, Tsai PS. Fibroblast growth factor 8 signaling through fibroblast growth factor receptor 1 is required for the emergence of gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology.* 2008;149(10):4997-5003.
76. Kim SH, Hu Y, Cadman S, Bouloux P. Diversity in fibroblast growth factor receptor 1 regulation: learning from the investigation of Kallmann syndrome. *J Neuroendocrinol.* 2008;20(2):141-63.

77. Salian-Mehta S, Xu M, Pierce A, Bliesner B, et al. Loss of Growth arrest specific gene 6 (Gas6) results in altered GnRH neuron migration, delayed vaginal opening and sexual maturation in mice. *Mol Cell Endocrinol.* 2014;393(1-2):164-70.
78. Pierce A, Bliesner B, Xu M, Nielsen-Preiss S, et al. Axl and Tyro3 modulate female reproduction by influencing gonadotropin-releasing hormone neuron survival and migration. *Mol Endocrinol.* 2008;22(11):2481-95.
79. Giacobini P, Giampietro C, Fioretto M, Maggi R, et al. Hepatocyte growth factor/scatter factor facilitates migration of GN-11 immortalized LHRH neurons. *Endocrinology.* 2002;143(9):3306-15.
80. Giacobini P, Kopin AS, Beart PM, Mercer LD, et al. Cholecystokinin modulates migration of gonadotropin-releasing hormone-1 neurons. *J Neurosci.* 2004;24(20):4737-48.
81. Casoni F, Hutchins BI, Donohue D, Fornaro M, et al. SDF and GABA interact to regulate axophilic migration of GnRH neurons. *J Cell Sci.* 2012;125(Pt 21):5015-25.
82. Watanabe M, Fukuda A, Nabekura J. The role of GABA in the regulation of GnRH neurons. *Front Neurosci.* 2014;8:387.
83. Poopalasundaram S, Chambers D, Graham A, Bouloux PM. Serotonin Receptor 1A (HTR1A), a Novel Regulator of GnRH Neuronal Migration in Chick Embryo. *Endocrinology.* 2016;157(12):4632-40.
84. Bless E, Raitcheva D, Henion TR, Tobet S, et al. Lactosamine modulates the rate of migration of GnRH neurons during mouse development. *Eur J Neurosci.* 2006;24(3):654-60.
85. Gamble JA, Karunadasa DK, Pape JR, Skynner MJ, et al. Disruption of ephrin signaling associates with disordered axophilic migration of the gonadotropin-releasing hormone neurons. *J Neurosci.* 2005;25(12):3142-50.
86. Franco B, Guioli S, Pragliola A, Incerti B, et al. A gene deleted in Kallmann's syndrome shares homology with neural cell adhesion and axonal path-finding molecules. *Nature.* 1991;353(6344):529-36.
87. Deiner MS, Sretavan DW. Altered midline axon pathways and ectopic neurons in the developing hypothalamus of netrin-1- and DCC-deficient mice. *J Neurosci.* 1999;19(22):9900-12.
88. Hacker U, Nybakken K, Perrimon N. Heparan sulphate proteoglycans: the sweet side of development. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005;6(7):530-41.

89. Gonzalez-Martinez D, Hu Y, Bouloux PM. Ontogeny of GnRH and olfactory neuronal systems in man: novel insights from the investigation of inherited forms of Kallmann's syndrome. *Front Neuroendocrinol.* 2004;25(2):108-30.
90. Cariboni A, Rakic S, Liapi A, Maggi R, et al. Reelin provides an inhibitory signal in the migration of gonadotropin-releasing hormone neurons. *Development.* 2005;132(21):4709-18.
91. Giacobini P, Messina A, Morello F, Ferraris N, et al. Semaphorin 4D regulates gonadotropin hormone-releasing hormone-1 neuronal migration through PlexinB1-Met complex. *J Cell Biol.* 2008;183(3):555-66.
92. Marcos S, Monnier C, Rovira X, Fouveaut C, et al. Defective signaling through plexin-A1 compromises the development of the peripheral olfactory system and neuroendocrine reproductive axis in mice. *Hum Mol Genet.* 2017;26(11):2006-17.
93. Toba Y, Tiong JD, Ma Q, Wray S. CXCR4/SDF-1 system modulates development of GnRH-1 neurons and the olfactory system. *Dev Neurobiol.* 2008;68(4):487-503.
94. Schwarting GA, Henion TR, Nugent JD, Caplan B, et al. Stromal cell-derived factor-1 (chemokine C-X-C motif ligand 12) and chemokine C-X-C motif receptor 4 are required for migration of gonadotropin-releasing hormone neurons to the forebrain. *J Neurosci.* 2006;26(25):6834-40.
95. Schwarting GA, Wierman ME, Tobet SA. Gonadotropin-releasing hormone neuronal migration. *Semin Reprod Med.* 2007;25(5):305-12.
96. Pitteloud N, Zhang C, Pignatelli D, Li JD, et al. Loss-of-function mutation in the prokineticin 2 gene causes Kallmann syndrome and normosmic idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(44):17447-52.
97. Prosser HM, Bradley A, Caldwell MA. Olfactory bulb hypoplasia in Prokr2 null mice stems from defective neuronal progenitor migration and differentiation. *Eur J Neurosci.* 2007;26(12):3339-44.
98. Xu N, Bhagavath B, Kim HG, Halvorson L, et al. NELF is a nuclear protein involved in hypothalamic GnRH neuronal migration. *Mol Cell Endocrinol.* 2010;319(1-2):47-55.
99. Cogliati T, Delgado-Romero P, Norwitz ER, Guduric-Fuchs J, et al. Pubertal impairment in Nhlh2 null mice is associated with hypothalamic and pituitary deficiencies. *Mol Endocrinol.* 2007;21(12):3013-27.
100. Yoshihara S, Omichi K, Yanazawa M, Kitamura K, et al. Arx homeobox gene is essential for development of mouse olfactory system. *Development.* 2005;132(4):751-62.

101. Howard SR, Guasti L, Ruiz-Babot G, Mancini A, et al. IGSF10 mutations dysregulate gonadotropin-releasing hormone neuronal migration resulting in delayed puberty. *EMBO Mol Med.* 2016;8(6):626-42.
102. Soga T, Lim WL, Khoo AS, Parhar IS. Kisspeptin Activates Ankrd 26 Gene Expression in Migrating Embryonic GnRH Neurons. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2016;7:15.
103. MacColl G, Quinton R, Bouloux PM. GnRH neuronal development: insights into hypogonadotropic hypogonadism. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM.* 2002;13(3):112-8.
104. Laitinen EM, Vaaralahti K, Tommiska J, Eklund E, et al. Incidence, phenotypic features and molecular genetics of Kallmann syndrome in Finland. *Orphanet J Rare Dis.* 2011;6:41.
105. Nair S, Jadhav S, Lila A, Jagtap V, et al. Spectrum of phenotype and genotype of congenital isolated hypogonadotropic hypogonadism in Asian Indians. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2016;85(1):100-9.
106. Bonomi M, Vezzoli V, Krausz C, Guizzardi F, et al. Characteristics of a nationwide cohort of patients presenting with isolated hypogonadotropic hypogonadism (IHH). *Eur J Endocrinol.* 2018;178(1):23-32.
107. Cerrato F, Shagoury J, Kralickova M, Dwyer A, et al. Coding sequence analysis of GNRHR and GPR54 in patients with congenital and adult-onset forms of hypogonadotropic hypogonadism. *Eur J Endocrinol.* 2006;155 Suppl 1:S3-S10.
108. Buck C, Balasubramanian R, Crowley WF. Isolated Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Deficiency. In: Pagon RA, Adam MP, Bird TD, Dolan CR, Fong CT, Stephens K, editors. *GeneReviews.* Seattle (WA)1993.
109. Grumbach MM. The neuroendocrinology of human puberty revisited. *Horm Res.* 2002;57 Suppl 2:2-14.
110. Kallmann FJ SW, Barrera SE. The genetic aspects of primary eunuchoidism. *Am J Mental Def.* 1944;48(203).
111. Kim SO, Ryu KH, Hwang IS, Jung SI, et al. Penile growth in response to human chorionic gonadotropin (HCG) treatment in patients with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Chonnam Med J.* 2011;47(1):39-42.
112. Lambert AS, Bougneres P. Growth and descent of the testes in infants with hypogonadotropic hypogonadism receiving subcutaneous gonadotropin infusion. *Int J Pediatr Endocrinol.* 2016;2016:13.
113. Hutson J. Reply to letter to the editor. *J Pediatr Surg.* 2013;48(9):1987-8.

114. Dwyer AA, Jayasena CN, Quinton R. Congenital hypogonadotropic hypogonadism: implications of absent mini-puberty. *Minerva Endocrinol.* 2016;41(2):188-95.
115. Weise M, De-Levi S, Barnes KM, Gafni RI, et al. Effects of estrogen on growth plate senescence and epiphyseal fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(12):6871-6.
116. Emons J, Chagin AS, Savendahl L, Karperien M, et al. Mechanisms of growth plate maturation and epiphyseal fusion. *Horm Res Paediatr.* 2011;75(6):383-91.
117. Kyriakakis N, Shonibare T, Kyaw-Tun J, Lynch J, et al. Late-onset X-linked adrenal hypoplasia (DAX-1, NR0B1): two new adult-onset cases from a single center. *Pituitary.* 2017;20(5):585-93.
118. Hoffman AR, Crowley WF, Jr. Induction of puberty in men by long-term pulsatile administration of low-dose gonadotropin-releasing hormone. *N Engl J Med.* 1982;307(20):1237-41.
119. Rabijewski M, Zgliczynski W. [Pathogenesis, evaluation and treatment of hypogonadism in men]. *Endokrynol Pol.* 2009;60(3):222-33.
120. Tickotsky N, Moskovitz M. Renal agenesis in Kallmann syndrome: a network approach. *Ann Hum Genet.* 2014;78(6):424-33.
121. Wang H, Zhang T, Wu T, Hetmanski JB, et al. The FGF and FGFR Gene Family and Risk of Cleft Lip With or Without Cleft Palate. *Cleft Palate Craniofac J.* 2013;50(1):96-103.
122. Costa-Barbosa FA, Balasubramanian R, Keefe KW, Shaw ND, et al. Prioritizing genetic testing in patients with Kallmann syndrome using clinical phenotypes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(5):E943-53.
123. Balasubramanian RC, W. Isolated Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Deficiency Seattle: University of Washington, Seattle; 2017 [updated March 2, 2017. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1334/>.
124. Trarbach EB, Abreu AP, Silveira LF, Garmes HM, et al. Nonsense mutations in FGF8 gene causing different degrees of human gonadotropin-releasing deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(7):3491-6.
125. Jongmans MC, van Ravenswaaij-Arts CM, Pitteloud N, Ogata T, et al. CHD7 mutations in patients initially diagnosed with Kallmann syndrome--the clinical overlap with CHARGE syndrome. *Clin Genet.* 2009;75(1):65-71.
126. Zentner GE, Layman WS, Martin DM, Scacheri PC. Molecular and phenotypic aspects of CHD7 mutation in CHARGE syndrome. *Am J Med Genet A.* 2010;152A(3):674-86.

127. McCabe MJ, Alatzoglou KS, Dattani MT. Septo-optic dysplasia and other midline defects: the role of transcription factors: HESX1 and beyond. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2011;25(1):115-24.
128. Pfaeffle RW, Savage JJ, Hunter CS, Palme C, et al. Four novel mutations of the LHX3 gene cause combined pituitary hormone deficiencies with or without limited neck rotation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(5):1909-19.
129. Kim HG, Kurth I, Lan F, Meliciani I, et al. Mutations in CHD7, encoding a chromatin-remodeling protein, cause idiopathic hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann syndrome. *Am J Hum Genet.* 2008;83(4):511-9.
130. Pingault V, Bodereau V, Baral V, Marcos S, et al. Loss-of-function mutations in SOX10 cause Kallmann syndrome with deafness. *Am J Hum Genet.* 2013;92(5):707-24.
131. Suzuki F, Shimizu C, Umetsu M, Nagai S, et al. Adult-onset idiopathic hypogonadotropic hypogonadism due to isolated pituitary gonadotropin deficiency. *Intern Med.* 2004;43(7):571-4.
132. Miraoui H, Dwyer AA, Sykiotis GP, Plummer L, et al. Mutations in FGF17, IL17RD, DUSP6, SPRY4, and FLRT3 are identified in individuals with congenital hypogonadotropic hypogonadism. *Am J Hum Genet.* 2013;92(5):725-43.
133. Rajab A, Kelberman D, de Castro SC, Biebermann H, et al. Novel mutations in LHX3 are associated with hypopituitarism and sensorineural hearing loss. *Hum Mol Genet.* 2008;17(14):2150-9.
134. Jackson RS, Creemers JW, Ohagi S, Raffin-Sanson ML, et al. Obesity and impaired prohormone processing associated with mutations in the human prohormone convertase 1 gene. *Nat Genet.* 1997;16(3):303-6.
135. Strobel A, Issad T, Camoin L, Ozata M, et al. A leptin missense mutation associated with hypogonadism and morbid obesity. *Nat Genet.* 1998;18(3):213-5.
136. Clement K, Vaisse C, Lahlou N, Cabrol S, et al. A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature.* 1998;392(6674):398-401.
137. Fichna P, Fichna M, Zurawek M, Nowak J. Hypogonadotropic hypogonadism due to GnRH receptor mutation in a sibling. *Endokrynol Pol.* 2011;62(3):264-7.
138. Sarfati J, Dode C, Young J. Kallmann syndrome caused by mutations in the PROK2 and PROKR2 genes: pathophysiology and genotype-phenotype correlations. *Front Horm Res.* 2010;39:121-32.

139. Quaynor SD, Bosley ME, Duckworth CG, Porter KR, et al. Targeted next generation sequencing approach identifies eighteen new candidate genes in normosmic hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann syndrome. *Mol Cell Endocrinol.* 2016;437:86-96.
140. Young J, Metay C, Bouligand J, Tou B, et al. SEMA3A deletion in a family with Kallmann syndrome validates the role of semaphorin 3A in human puberty and olfactory system development. *Hum Reprod.* 2012;27(5):1460-5.
141. Sykiotis GP, Plummer L, Hughes VA, Au M, et al. Oligogenic basis of isolated gonadotropin-releasing hormone deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(34):15140-4.
142. Pitteloud N, Quinton R, Pearce S, Raivio T, et al. Digenic mutations account for variable phenotypes in idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Invest.* 2007;117(2):457-63.
143. Canto P, Munguia P, Soderlund D, Castro JJ, et al. Genetic analysis in patients with Kallmann syndrome: coexistence of mutations in prokineticin receptor 2 and KAL1. *J Androl.* 2009;30(1):41-5.
144. Quaynor SD, Kim HG, Cappello EM, Williams T, et al. The prevalence of digenic mutations in patients with normosmic hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann syndrome. *Fertil Steril.* 2011;96(6):1424-30 e6.
145. Bhagavath B, Podolsky RH, Ozata M, Bolu E, et al. Clinical and molecular characterization of a large sample of patients with hypogonadotropic hypogonadism. *Fertil Steril.* 2006;85(3):706-13.
146. Nie M, Xu H, Chen R, Mao J, et al. Analysis of genetic and clinical characteristics of a Chinese Kallmann syndrome cohort with ANOS1 mutations. *Eur J Endocrinol.* 2017;177(4):389-98.
147. Sidhoum VF, Chan YM, Lippincott MF, Balasubramanian R, et al. Reversal and relapse of hypogonadotropic hypogonadism: resilience and fragility of the reproductive neuroendocrine system. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(3):861-70.
148. Richards MR, Plummer L, Chan YM, Lippincott MF, et al. Phenotypic spectrum of POLR3B mutations: isolated hypogonadotropic hypogonadism without neurological or dental anomalies. *J Med Genet.* 2017;54(1):19-25.
149. Maione L, Dwyer AA, Francou B, Guiochon-Mantel A, et al. GENETICS IN ENDOCRINOLOGY: Genetic counseling for congenital hypogonadotropic

- hypogonadism and Kallmann syndrome: new challenges in the era of oligogenism and next-generation sequencing. *Eur J Endocrinol*. 2018.
150. Stijnen P, Ramos-Molina B, O'Rahilly S, Creemers JW. PCSK1 Mutations and Human Endocrinopathies: From Obesity to Gastrointestinal Disorders. *Endocr Rev*. 2016;37(4):347-71.
  151. Ravel C, Hyon C, Siffroi JP, Christin-Maitre S. Are human male patients with DAX1/NR0B1 mutations infertile? *Ann Endocrinol (Paris)*. 2014;75(2):126-7.
  152. Kotan LD, Cooper C, Darcan S, Carr IM, et al. Idiopathic Hypogonadotropic Hypogonadism Caused by Inactivating Mutations in SRA1. *J Clin Res Pediatr Endocrinol*. 2016;8(2):125-34.
  153. Goncalves CI, Aragues JM, Bastos M, Barros L, et al. GNRHR biallelic and digenic mutations in patients with normosmic congenital hypogonadotropic hypogonadism. *Endocr Connect*. 2017;6(6):360-6.
  154. Topaloglu AK. Update on the Genetics of Idiopathic Hypogonadotropic Hypogonadism. *J Clin Res Pediatr Endocrinol*. 2017;9(Suppl 2):113-22.
  155. Pedersen-White JR, Chorich LP, Bick DP, Sherins RJ, et al. The prevalence of intragenic deletions in patients with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann syndrome. *Mol Hum Reprod*. 2008;14(6):367-70.
  156. Salian-Mehta S, Xu M, Knox AJ, Plummer L, et al. Functional consequences of AXL sequence variants in hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(4):1452-60.
  157. Hutchins BI, Kotan LD, Taylor-Burds C, Ozkan Y, et al. CCDC141 Mutation Identified in Anosmic Hypogonadotropic Hypogonadism (Kallmann Syndrome) Alters GnRH Neuronal Migration. *Endocrinology*. 2016;157(5):1956-66.
  158. Xu C, Cassatella D, van der Sloot AM, Quinton R, et al. Evaluating CHARGE syndrome in congenital hypogonadotropic hypogonadism patients harboring CHD7 variants. *Genet Med*. 2017.
  159. Tata B, Huijbregts L, Jacquier S, Csaba Z, et al. Haploinsufficiency of Dmxl2, encoding a synaptic protein, causes infertility associated with a loss of GnRH neurons in mouse. *PLoS Biol*. 2014;12(9):e1001952.
  160. Kotan LD, Hutchins BI, Ozkan Y, Demirel F, et al. Mutations in FEZF1 cause Kallmann syndrome. *Am J Hum Genet*. 2014;95(3):326-31.
  161. Vaaralahti K, Raivio T, Koivu R, Valanne L, et al. Genetic Overlap between Holoprosencephaly and Kallmann Syndrome. *Mol Syndromol*. 2012;3(1):1-5.

162. Newbern K, Natrajan N, Kim HG, Chorich LP, et al. Identification of HESX1 mutations in Kallmann syndrome. *Fertil Steril*. 2013;99(7):1831-7.
163. Xu C, Messina A, Somm E, Miraoui H, et al. KLB, encoding beta-Klotho, is mutated in patients with congenital hypogonadotropic hypogonadism. *EMBO Mol Med*. 2017;9(10):1379-97.
164. Bianco SD, Kaiser UB. The genetic and molecular basis of idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Nat Rev Endocrinol*. 2009;5(10):569-76.
165. Xu N, Kim HG, Bhagavath B, Cho SG, et al. Nasal embryonic LHRH factor (NELF) mutations in patients with normosmic hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann syndrome. *Fertil Steril*. 2011;95(5):1613-20 e1-7.
166. Burnett LC, LeDuc CA, Sulsona CR, Paull D, et al. Deficiency in prohormone convertase PC1 impairs prohormone processing in Prader-Willi syndrome. *J Clin Invest*. 2017;127(1):293-305.
167. G. H. A form of familial degeneration of the cerebellum. *Brain*. . 1907;30:466–89.
168. Langdahl JH, Frederiksen AL, Nguyen N, Brusgaard K, et al. Boucher Neuhauser Syndrome - A rare cause of inherited hypogonadotropic hypogonadism. A case of two adult siblings with two novel mutations in PNPLA6. *Eur J Med Genet*. 2017;60(2):105-9.
169. Daoud H, Tetreault M, Gibson W, Guerrero K, et al. Mutations in POLR3A and POLR3B are a major cause of hypomyelinating leukodystrophies with or without dental abnormalities and/or hypogonadotropic hypogonadism. *J Med Genet*. 2013;50(3):194-7.
170. Reynaud R, Barlier A, Vallette-Kasic S, Saveanu A, et al. An uncommon phenotype with familial central hypogonadism caused by a novel PROP1 gene mutant truncated in the transactivation domain. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(8):4880-7.
171. Asahina M, Endoh Y, Matsubayashi T, Fukuda T, et al. Novel RAB3GAP1 compound heterozygous mutations in Japanese siblings with Warburg Micro syndrome. *Brain Dev*. 2016;38(3):337-40.
172. Aligianis IA, Morgan NV, Mione M, Johnson CA, et al. Mutation in Rab3 GTPase-activating protein (RAB3GAP) noncatalytic subunit in a kindred with Martsolf syndrome. *Am J Hum Genet*. 2006;78(4):702-7.
173. Handley MT, Morris-Rosendahl DJ, Brown S, Macdonald F, et al. Mutation spectrum in RAB3GAP1, RAB3GAP2, and RAB18 and genotype-phenotype correlations in warburg micro syndrome and Martsolf syndrome. *Hum Mutat*. 2013;34(5):686-96.

174. Margolin DH, Kousi M, Chan YM, Lim ET, et al. Ataxia, dementia, and hypogonadotropism caused by disordered ubiquitination. *N Engl J Med.* 2013;368(21):1992-2003.
175. Cariboni A, Andre V, Chauvet S, Cassatella D, et al. Dysfunctional SEMA3E signaling underlies gonadotropin-releasing hormone neuron deficiency in Kallmann syndrome. *J Clin Invest.* 2015;125(6):2413-28.
176. Kansakoski J, Fagerholm R, Laitinen EM, Vaaralahti K, et al. Mutation screening of SEMA3A and SEMA7A in patients with congenital hypogonadotropic hypogonadism. *Pediatr Res.* 2014;75(5):641-4.
177. Shaw ND, Brand H, Kupchinsky ZA, Bengani H, et al. SMCHD1 mutations associated with a rare muscular dystrophy can also cause isolated arhinia and Bosma arhinia microphthalmia syndrome. *Nat Genet.* 2017;49(2):238-48.
178. Stark Z, Storen R, Bennetts B, Savarirayan R, et al. Isolated hypogonadotropic hypogonadism with SOX2 mutation and anophthalmia/microphthalmia in offspring. *Eur J Hum Genet.* 2011;19(7):753-6.
179. Shi CH, Schisler JC, Rubel CE, Tan S, et al. Ataxia and hypogonadism caused by the loss of ubiquitin ligase activity of the U box protein CHIP. *Hum Mol Genet.* 2014;23(4):1013-24.
180. Liegel RP, Handley MT, Ronchetti A, Brown S, et al. Loss-of-function mutations in TBC1D20 cause cataracts and male infertility in blind sterile mice and Warburg micro syndrome in humans. *Am J Hum Genet.* 2013;93(6):1001-14.
181. Kim HG, Layman LC. The role of CHD7 and the newly identified WDR11 gene in patients with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann syndrome. *Mol Cell Endocrinol.* 2011;346(1-2):74-83.
182. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia.* 1985;28(7):412-9.
183. Pruszewicz A. [Apropos of Gustatory and Olfactory Tests]. *Otolaryngol Pol.* 1965;19:29-37.
184. Elsberg CA, Levy I, Brewer ED. A New Method for Testing the Sense of Smell and for the Establishment of Olfactory Values of Odorous Substances. *Science.* 1936;83(2148):211-2.

185. Acampora D, Mazan S, Tuorto F, Avantaggiato V, et al. Transient dwarfism and hypogonadism in mice lacking *Otx1* reveal prepubescent stage-specific control of pituitary levels of GH, FSH and LH. *Development*. 1998;125(7):1229-39.
186. Davis SW, Ellsworth BS, Perez Millan MI, Gergics P, et al. Pituitary gland development and disease: from stem cell to hormone production. *Curr Top Dev Biol*. 2013;106:1-47.
187. Adams PD, Afonine PV, Bunkoczi G, Chen VB, et al. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2010;66(Pt 2):213-21.
188. Schwarz JM, Rodelsperger C, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. *Nat Methods*. 2010;7(8):575-6.
189. Rochira V, Zirilli L, Genazzani AD, Balestrieri A, et al. Hypothalamic-pituitary-gonadal axis in two men with aromatase deficiency: evidence that circulating estrogens are required at the hypothalamic level for the integrity of gonadotropin negative feedback. *Eur J Endocrinol*. 2006;155(4):513-22.
190. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015;17(5):405-24.
191. Aydogdu A, Bolu E, Sonmez A, Tasci I, et al. Effects of three different medications on metabolic parameters and testicular volume in patients with hypogonadotropic hypogonadism: 3-year experience. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2013;79(2):243-51.
192. Huang B, Mao J, Xu H, Wang X, et al. [Spermatogenesis of pulsatile gonadotropin-releasing hormone infusion versus gonadotropin therapy in male idiopathic hypogonadotropic hypogonadism]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2015;95(20):1568-71.
193. Murray RA, Maheshwari HG, Russell EJ, Baumann G. Pituitary hypoplasia in patients with a mutation in the growth hormone-releasing hormone receptor gene. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2000;21(4):685-9.
194. Doraiswamy PM, Potts JM, Axelson DA, Husain MM, et al. MR assessment of pituitary gland morphology in healthy volunteers: age- and gender-related differences. *AJNR Am J Neuroradiol*. 1992;13(5):1295-9.
195. Suzuki M, Takashima T, Kadoya M, Konishi H, et al. Height of normal pituitary gland on MR imaging: age and sex differentiation. *J Comput Assist Tomogr*. 1990;14(1):36-9.

196. Dode C, Teixeira L, Levilliers J, Fouveaut C, et al. Kallmann syndrome: mutations in the genes encoding prokineticin-2 and prokineticin receptor-2. *PLoS Genet.* 2006;2(10):e175.
197. Raivio T, Sidis Y, Plummer L, Chen H, et al. Impaired fibroblast growth factor receptor 1 signaling as a cause of normosmic idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94(11):4380-90.
198. de Roux N, Young J, Misrahi M, Genet R, et al. A family with hypogonadotropic hypogonadism and mutations in the gonadotropin-releasing hormone receptor. *N Engl J Med.* 1997;337(22):1597-602.
199. Gianetti E, Hall JE, Au MG, Kaiser UB, et al. When genetic load does not correlate with phenotypic spectrum: lessons from the GnRH receptor (GNRHR). *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(9):E1798-807.
200. Arora KK, Cheng Z, Catt KJ. Mutations of the conserved DRS motif in the second intracellular loop of the gonadotropin-releasing hormone receptor affect expression, activation, and internalization. *Mol Endocrinol.* 1997;11(9):1203-12.
201. Costa EM, Bedecarrats GY, Mendonca BB, Arnhold IJ, et al. Two novel mutations in the gonadotropin-releasing hormone receptor gene in Brazilian patients with hypogonadotropic hypogonadism and normal olfaction. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(6):2680-6.
202. Falardeau J, Chung WC, Beenken A, Raivio T, et al. Decreased FGF8 signaling causes deficiency of gonadotropin-releasing hormone in humans and mice. *J Clin Invest.* 2008;118(8):2822-31.
203. Albuissou J, Pecheux C, Carel JC, Lacombe D, et al. Kallmann syndrome: 14 novel mutations in KAL1 and FGFR1 (KAL2). *Hum Mutat.* 2005;25(1):98-9.
204. Beleza-Meireles A, Lundberg F, Lagerstedt K, Zhou X, et al. FGFR2, FGF8, FGF10 and BMP7 as candidate genes for hypospadias. *Eur J Hum Genet.* 2007;15(4):405-10.
205. Bartels CF, Scacheri C, White L, Scacheri PC, et al. Mutations in the CHD7 gene: the experience of a commercial laboratory. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2010;14(6):881-91.
206. Beneduzzi D, Trarbach EB, Latronico AC, Mendonca BB, et al. Novel mutation in the gonadotropin-releasing hormone receptor (GNRHR) gene in a patient with normosmic isolated hypogonadotropic hypogonadism. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2012;56(8):540-4.

207. Trarbach EB, Costa EM, Versiani B, de Castro M, et al. Novel fibroblast growth factor receptor 1 mutations in patients with congenital hypogonadotropic hypogonadism with and without anosmia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(10):4006-12.
208. Jansen C, Hendriks-Stegeman BI, Jansen M. A novel nonsense mutation of the KAL gene in two brothers with Kallmann syndrome. *Horm Res.* 2000;53(4):207-12.
209. Bertolacini CD, Ribeiro-Bicudo LA, Petrin A, Richieri-Costa A, et al. Clinical findings in patients with GLI2 mutations--phenotypic variability. *Clin Genet.* 2012;81(1):70-5.
210. Bean LJ, Tinker SW, da Silva C, Hegde MR. Free the data: one laboratory's approach to knowledge-based genomic variant classification and preparation for EMR integration of genomic data. *Hum Mutat.* 2013;34(9):1183-8.
211. Chan YM, de Guillebon A, Lang-Muritano M, Plummer L, et al. GNRH1 mutations in patients with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(28):11703-8.
212. Laitinen EM, Tommiska J, Sane T, Vaaralahti K, et al. Reversible congenital hypogonadotropic hypogonadism in patients with CHD7, FGFR1 or GNRHR mutations. *PLoS One.* 2012;7(6):e39450.
213. Mao JF, Xu HL, Duan J, Chen RR, et al. Reversal of idiopathic hypogonadotropic hypogonadism: a cohort study in Chinese patients. *Asian J Androl.* 2015;17(3):497-502.
214. Doknic M, Pekic S, Civcic M, Popovic V. Clinical Case Seminar. Peculiar prolactinomas in patients with pituitary developmental gene mutations: from an adult endocrinologist perspective. *Hormones (Athens).* 2012;11(2):189-98.
215. Ayers KL, Bouty A, Robevska G, van den Bergen JA, et al. Variants in congenital hypogonadotropic hypogonadism genes identified in an Indonesian cohort of 46,XY under-virilised boys. *Hum Genomics.* 2017;11(1):1.
216. Sun QH, Zheng Y, Zhang XL, Mu YM. Role of Gonadotropin-releasing Hormone Stimulation Test in Diagnosing Gonadotropin Deficiency in Both Males and Females with Delayed Puberty. *Chin Med J (Engl).* 2015;128(18):2439-43.
217. Ji W, Zhang LY, Li FC, Wang Y, et al. Genetic sequencing of a patient with Kallmann syndrome plus 5alpha-reductase type 2 deficiency. *Asian J Androl.* 2017;19(3):386-7.
218. Shima H, Ishii A, Wada Y, Kizawa J, et al. SOX2 nonsense mutation in a patient clinically diagnosed with non-syndromic hypogonadotropic hypogonadism. *Endocr J.* 2017;64(8):813-7.
219. Lima L.G. MLR, Lima L.O., Mendonca B.B., Latronico A.C. Silveira L.F.G. A New GNRH1 variant in a Patient with Congenital Isolated Hypogonadotropic

- Hypogonadism. Endocrine Society's 98th Annual Meeting and Expo, April 1–4, 2016 - Boston. April 3, 2016
220. Kolodkina A. KM, Kalinchenko N., Raygorodskaya N., Malievskiy O., Fidelina O., Vasilyeva E., Petrova V, Naumova M., Tiulpakova A. Screening of Mutations in Idiopathic Hypogonadotropic Hypogonadism Using a Targeted Next-Generation Sequencing Approach. *ESPE Abstracts*. 2015;84:1-114
  221. Xu H, Niu Y, Wang T, Liu S, et al. Novel FGFR1 and KISS1R Mutations in Chinese Kallmann Syndrome Males with Cleft Lip/Palate. *Biomed Res Int*. 2015;2015:649698.
  222. Pitteloud N, Crowley W., Balasubramanian R. . Isolated gonadotropin-releasing hormone deficiency (idiopathic hypogonadotropic hypogonadism) 2017 [updated Nov 21, 2017. Available from: <https://www.uptodate.com/contents/isolated-gonadotropin-releasing-hormone-deficiency-idiopathic-hypogonadotropic-hypogonadism#H465554411>.
  223. Dash PK, Raj DH. Biochemical and MRI findings of Kallmann's syndrome. *BMJ Case Rep*. 2014;2014.
  224. Cole LW, Sidis Y, Zhang C, Quinton R, et al. Mutations in prokineticin 2 and prokineticin receptor 2 genes in human gonadotrophin-releasing hormone deficiency: molecular genetics and clinical spectrum. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(9):3551-9.
  225. Kottler ML, Counis R, Bouchard P. Mutations of the GnRH receptor gene: a new cause of autosomal-recessive hypogonadotropic hypogonadism. *Arch Med Res*. 1999;30(6):481-5.
  226. Oliveira LM, Seminara SB, Beranova M, Hayes FJ, et al. The importance of autosomal genes in Kallmann syndrome: genotype-phenotype correlations and neuroendocrine characteristics. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(4):1532-8.
  227. Van Dop C, Burstein S, Conte FA, Grumbach MM. Isolated gonadotropin deficiency in boys: clinical characteristics and growth. *J Pediatr*. 1987;111(5):684-92.
  228. Smyczynska J, Stawerska R, Lewinski A, Hilczer M. Incidence and predictors of persistent growth hormone deficiency (GHD) in patients with isolated, childhood-onset GHD. *Endokrynol Pol*. 2014;65(5):334-41.
  229. Baki S LR, Mghari G., Ansari N. Kallmann Syndrome with Short Stature and Pituitary Hypoplasia. *Ibnosina J Med BS*. 2016;5(8):188-92.
  230. Subramanian N, Rajeswari S, Tamilvanan S. Rare cause for short stature--Kallmann's syndrome--a case report. *Indian J Med Sci*. 2002;56(3):119-21.

231. Li J, Li N, Ding Y, Huang X, et al. Clinical characteristics and follow-up of 5 young Chinese males with gonadotropin-releasing hormone deficiency caused by mutations in the KAL1 gene. *Meta Gene*. 2016;7:64-9.
232. Naharci MI, Pinar M, Bolu E, Olgun A. Effect of testosterone on insulin sensitivity in men with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Endocr Pract*. 2007;13(6):629-35.
233. Carlioglu A, Durmaz SA, Kibar YI, Ozturk Y, et al. Mean platelet volume in a patient with male hypogonadotropic hypogonadism: the relationship between low testosterone, metabolic syndrome, impaired fasting glucose and cardiovascular risk. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2015;26(7):811-5.
234. Ahmadzadeh A, Ghods E, Mojarrad M, Aboutorabi R, et al. Study on KAL1 Gene Mutations in Idiopathic Hypogonadotropic Hypogonadism Patients with X-Linked Recessive Inheritance. *Int J Mol Cell Med*. 2015;4(3):152-9.
235. Basaran Y, Bolu E, Unal HU, Sagkan RI, et al. [Multiplex ligation dependent probe amplification analysis of KAL1, GNRH1, GNRHR, PROK2 and PROKR2 in male patients with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism]. *Endokrynol Pol*. 2013;64(4):285-92.
236. El Husny AS, Raiol-Moraes M, Fernandes-Caldato MC, Ribeiro-Dos-Santos A. A novel nonsense mutation of the KAL1 gene (p.Trp204\*) in Kallmann syndrome. *Appl Clin Genet*. 2014;7:177-82.
237. Quinton R, Duke VM, Robertson A, Kirk JM, et al. Idiopathic gonadotrophin deficiency: genetic questions addressed through phenotypic characterization. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2001;55(2):163-74.
238. Pitteloud N, Hayes FJ, Boepple PA, DeCruz S, et al. The role of prior pubertal development, biochemical markers of testicular maturation, and genetics in elucidating the phenotypic heterogeneity of idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(1):152-60.
239. Massin N, Pecheux C, Eloit C, Bensimon JL, et al. X chromosome-linked Kallmann syndrome: clinical heterogeneity in three siblings carrying an intragenic deletion of the KAL-1 gene. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(5):2003-8.
240. Franca MM, Jorge AA, Carvalho LR, Costalonga EF, et al. Novel heterozygous nonsense GLI2 mutations in patients with hypopituitarism and ectopic posterior pituitary lobe without holoprosencephaly. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95(11):E384-91.

241. Dode C, Levilliers J, Dupont JM, De Paepe A, et al. Loss-of-function mutations in FGFR1 cause autosomal dominant Kallmann syndrome. *Nat Genet.* 2003;33(4):463-5.
242. Pitteloud N, Meysing A, Quinton R, Acierno JS, Jr., et al. Mutations in fibroblast growth factor receptor 1 cause Kallmann syndrome with a wide spectrum of reproductive phenotypes. *Mol Cell Endocrinol.* 2006;254-255:60-9.
243. Bouligand J, Ghervan C, Tello JA, Brailly-Tabard S, et al. Isolated familial hypogonadotropic hypogonadism and a GNRH1 mutation. *N Engl J Med.* 2009;360(26):2742-8.
244. Bedecarrats GY, Kaiser UB. Mutations in the human gonadotropin-releasing hormone receptor: insights into receptor biology and function. *Semin Reprod Med.* 2007;25(5):368-78.
245. Diaczok D, Romero C, Zunich J, Marshall I, et al. A novel dominant negative mutation of OTX2 associated with combined pituitary hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(11):4351-9.
246. Shimada A, Takagi M, Nagashima Y, Miyai K, et al. A Novel Mutation in OTX2 Causes Combined Pituitary Hormone Deficiency, Bilateral Microphthalmia, and Agenesis of the Left Internal Carotid Artery. *Horm Res Paediatr.* 2016;86(1):62-9.
247. Dode C, Rondard P. PROK2/PROKR2 Signaling and Kallmann Syndrome. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2013;4:19.
248. Kim HG, Ahn JW, Kurth I, Ullmann R, et al. WDR11, a WD protein that interacts with transcription factor EMX1, is mutated in idiopathic hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann syndrome. *Am J Hum Genet.* 2010;87(4):465-79.
249. Holmes D. Metabolism: kisspeptin signalling linked to obesity. *Nat Rev Endocrinol.* 2014;10(9):511.
250. Aoki A, Fujitani K, Takagi K, Kimura T, et al. Male Hypogonadism Causes Obesity Associated with Impairment of Hepatic Gluconeogenesis in Mice. *Biol Pharm Bull.* 2016;39(4):587-92.
251. Cohen PG. The hypogonadal-obesity cycle: role of aromatase in modulating the testosterone-estradiol shunt--a major factor in the genesis of morbid obesity. *Med Hypotheses.* 1999;52(1):49-51.
252. Nass R. Mirror movement asymmetries in congenital hemiparesis: the inhibition hypothesis revisited. *Neurology.* 1985;35(7):1059-62.

253. Conrad B, Kriebel J, Hetzel WD. Hereditary bimanual synkinesis combined with hypogonadotropic hypogonadism and anosmia in four brothers. *J Neurol.* 1978;218(4):263-74.
254. Krams M, Quinton R, Ashburner J, Friston KJ, et al. Kallmann's syndrome: mirror movements associated with bilateral corticospinal tract hypertrophy. *Neurology.* 1999;52(4):816-22.
255. Mayston MJ, Harrison LM, Quinton R, Stephens JA, et al. Mirror movements in X-linked Kallmann's syndrome. I. A neurophysiological study. *Brain.* 1997;120 ( Pt 7):1199-216.
256. Ruiz Del Rio N, Abelairas Gomez JM, Alonso Garcia de la Rosa FJ, Peralta Calvo JM, et al. [Trilateral retinoblastoma. Correlation between the genetic anomalies of the RB1 gene and the presence of pineal gland cysts]. *Arch Soc Esp Oftalmol.* 2014;89(1):4-9.
257. Bueno MT, Martinez-Rios C, la Puente Gregorio A, Ahyad RA, et al. Pediatric imaging in DICER1 syndrome. *Pediatr Radiol.* 2017;47(10):1292-301.
258. Fakhran S, Escott EJ. Pineocytoma mimicking a pineal cyst on imaging: true diagnostic dilemma or a case of incomplete imaging? *AJNR Am J Neuroradiol.* 2008;29(1):159-63.
259. Qin M, Gong C, Qi Z, Wu D, et al. [Children with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism: clinical data analysis and mutations analysis of KAL1 and FGFR1 gene]. *Zhonghua Er Ke Za Zhi.* 2014;52(12):942-7.
260. Suzuki E, Yatsuga S, Igarashi M, Miyado M, et al. De novo frameshift mutation in fibroblast growth factor 8 in a male patient with gonadotropin deficiency. *Horm Res Paediatr.* 2014;81(2):139-44.
261. Basson MA. Epistatic interactions between Chd7 and Fgf8 during cerebellar development: Implications for CHARGE syndrome. *Rare Dis.* 2014;2:e28688.
262. Hurd EA, Poucher HK, Cheng K, Raphael Y, et al. The ATP-dependent chromatin remodeling enzyme CHD7 regulates pro-neural gene expression and neurogenesis in the inner ear. *Development.* 2010;137(18):3139-50.
263. Layman WS, Hurd EA, Martin DM. Reproductive dysfunction and decreased GnRH neurogenesis in a mouse model of CHARGE syndrome. *Hum Mol Genet.* 2011;20(16):3138-50.
264. Weissortel R, Strom TM, Dorr HG, Rauch A, et al. Analysis of an interstitial deletion in a patient with Kallmann syndrome, X-linked ichthyosis and mental retardation. *Clin Genet.* 1998;54(1):45-51.

265. Walker KA, Sims-Lucas S, Bates CM. Fibroblast growth factor receptor signaling in kidney and lower urinary tract development. *Pediatr Nephrol.* 2016;31(6):885-95.
266. Dode C, Hardelin JP. Clinical genetics of Kallmann syndrome. *Ann Endocrinol (Paris).* 2010;71(3):149-57.
267. Brooks DJ, Pavese N. Recent imaging advances in the diagnosis and management of Parkinson's disease. *F1000 Med Rep.* 2009;1.
268. Quinton R. Kallmann Syndrome and Hypogonadotropic Hypogonadism. Grossman A, editor. London: Karger; 2010.
269. Bhagavath B, Ozata M, Ozdemir IC, Bolu E, et al. The prevalence of gonadotropin-releasing hormone receptor mutations in a large cohort of patients with hypogonadotropic hypogonadism. *Fertil Steril.* 2005;84(4):951-7.
270. Caron P, Chauvin S, Christin-Maitre S, Bennet A, et al. Resistance of hypogonadic patients with mutated GnRH receptor genes to pulsatile GnRH administration. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84(3):990-6.
271. Pitteloud N, Hayes FJ, Dwyer A, Boepple PA, et al. Predictors of outcome of long-term GnRH therapy in men with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(9):4128-36.
272. Laitinen EM, Tommiska J, Virtanen HE, Oehlandt H, et al. Isolated cryptorchidism: no evidence for involvement of genes underlying isolated hypogonadotropic hypogonadism. *Mol Cell Endocrinol.* 2011;341(1-2):35-8.
273. Boehm U, Bouloux PM, Dattani MT, de Roux N, et al. Expert consensus document: European Consensus Statement on congenital hypogonadotropic hypogonadism--pathogenesis, diagnosis and treatment. *Nat Rev Endocrinol.* 2015;11(9):547-64.
274. Shaw ND, Seminara SB, Welt CK, Au MG, et al. Expanding the phenotype and genotype of female GnRH deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(3):E566-76.
275. Stamou MI, Georgopoulos NA. Kallmann syndrome: phenotype and genotype of hypogonadotropic hypogonadism. *Metabolism.* 2017.
276. Raivio T, Falardeau J, Dwyer A, Quinton R, et al. Reversal of idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *N Engl J Med.* 2007;357(9):863-73.
277. Kanayama G, Brower KJ, Wood RI, Hudson JI, et al. Treatment of anabolic-androgenic steroid dependence: Emerging evidence and its implications. *Drug Alcohol Depend.* 2010;109(1-3):6-13.

278. Tang RY, Chen R, Ma M, Lin SQ, et al. Clinical characteristics of 138 Chinese female patients with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Endocr Connect.* 2017;6(8):800-10.
279. Nachtigall LB, Boepple PA, Pralong FP, Crowley WF, Jr. Adult-onset idiopathic hypogonadotropic hypogonadism--a treatable form of male infertility. *N Engl J Med.* 1997;336(6):410-5.
280. Hashimoto K, Kurokawa H, Nishioka T, Takao T, et al. Four patients with polyendocrinopathy with associated pituitary hormone deficiency. *Endocr J.* 1994;41(6):613-21.
281. Thodou E, Asa SL, Kontogeorgos G, Kovacs K, et al. Clinical case seminar: lymphocytic hypophysitis: clinicopathological findings. *J Clin Endocrinol Metab.* 1995;80(8):2302-11.
282. Allix I, Rohmer V. [Hypophysitis: increasingly complex clinicopathological spectrum!]. *Ann Endocrinol (Paris).* 2012;73 Suppl 1:S17-25.
283. Kobayashi T, Okuno H, Nishiyama H, Nakamura E, et al. Adult-onset idiopathic hypogonadotropic hypogonadism presented with erectile and ejaculatory disorder. *Int J Urol.* 2002;9(10):604-6.
284. Volpi R, Ugolotti MC, Carbucicchio A, Delsignore R. Idiopathic hypogonadotropic hypogonadism in selective human gonadotropin deficiency in adult man: a case report. *Acta Biomed.* 2008;79(3):251-4.
285. Ioannidou-Kadis S, Wright PJ, Neely RD, Quinton R. Complete reversal of adult-onset isolated hypogonadotropic hypogonadism with clomiphene citrate. *Fertil Steril.* 2006;86(5):1513 e5-9.
286. Caronia LM, Martin C, Welt CK, Sykiotis GP, et al. A genetic basis for functional hypothalamic amenorrhea. *N Engl J Med.* 2011;364(3):215-25.
287. McLeod JF, Kovacs L, Gaskill MB, Rittig S, et al. Familial neurohypophyseal diabetes insipidus associated with a signal peptide mutation. *J Clin Endocrinol Metab.* 1993;77(3):599A-G.
288. Zhu J, Choa RE, Guo MH, Plummer L, et al. A shared genetic basis for self-limited delayed puberty and idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015;100(4):E646-54.
289. Hanchate NK, Giacobini P, Lhuillier P, Parkash J, et al. SEMA3A, a gene involved in axonal pathfinding, is mutated in patients with Kallmann syndrome. *PLoS Genet.* 2012;8(8):e1002896.

290. Shimizu K, Yonekawa T, Yoshida M, Miyazato M, et al. Conformational Change in the Ligand-Binding Pocket via a KISS1R Mutation (P147L) Leads to Isolated Gonadotropin-Releasing Hormone Deficiency. *J Endocr Soc.* 2017;1(10):1259-71.
291. Brioude F, Bouligand J, Trabado S, Francou B, et al. Non-syndromic congenital hypogonadotropic hypogonadism: clinical presentation and genotype-phenotype relationships. *Eur J Endocrinol.* 2010;162(5):835-51.
292. Brioude F, Bouligand J, Francou B, Fagart J, et al. Two families with normosmic congenital hypogonadotropic hypogonadism and biallelic mutations in KISS1R (KISS1 receptor): clinical evaluation and molecular characterization of a novel mutation. *PLoS One.* 2013;8(1):e53896.
293. Breuer O, Abdulhadi-Atwan M, Zeligson S, Fridman H, et al. A novel severe N-terminal splice site KISS1R gene mutation causes hypogonadotropic hypogonadism but enables a normal development of neonatal external genitalia. *Eur J Endocrinol.* 2012;167(2):209-16.
294. Teles MG, Trarbach EB, Noel SD, Guerra-Junior G, et al. A novel homozygous splice acceptor site mutation of KISS1R in two siblings with normosmic isolated hypogonadotropic hypogonadism. *Eur J Endocrinol.* 2010;163(1):29-34.
295. Pulignani S, Vecoli C, Borghini A, Foffa I, et al. Targeted Next-Generation Sequencing in Patients with Non-syndromic Congenital Heart Disease. *Pediatr Cardiol.* 2018.
296. Cervera-Acedo C, Coloma A, Huarte-Loza E, Sierra-Carpio M, et al. Phenotype variability in a large Spanish family with Alport syndrome associated with novel mutations in COL4A3 gene. *BMC Nephrol.* 2017;18(1):325.
297. Niku M, Pajari AM, Sarantaus L, Paivarinta E, et al. Western diet enhances intestinal tumorigenesis in Min/+ mice, associating with mucosal metabolic and inflammatory stress and loss of Apc heterozygosity. *J Nutr Biochem.* 2017;39:126-33.
298. Gonzalez-Martinez D, Kim SH, Hu Y, Guimond S, et al. Anosmin-1 modulates fibroblast growth factor receptor 1 signaling in human gonadotropin-releasing hormone olfactory neuroblasts through a heparan sulfate-dependent mechanism. *J Neurosci.* 2004;24(46):10384-92.
299. Izumi Y, Suzuki E, Kanzaki S, Yatsuga S, et al. Genome-wide copy number analysis and systematic mutation screening in 58 patients with hypogonadotropic hypogonadism. *Fertil Steril.* 2014;102(4):1130-6 e3.

300. Raivio T, Avbelj M, McCabe MJ, Romero CJ, et al. Genetic overlap in Kallmann syndrome, combined pituitary hormone deficiency, and septo-optic dysplasia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(4):E694-9.
301. LRRRIQ3 [Internet].
302. Reuter MS, Tawamie H, Buchert R, Hosny Gebril O, et al. Diagnostic Yield and Novel Candidate Genes by Exome Sequencing in 152 Consanguineous Families With Neurodevelopmental Disorders. *JAMA Psychiatry.* 2017;74(3):293-9.
303. Akkus G, Kotan LD, Durmaz E, Mengen E, et al. Hypogonadotropic Hypogonadism due to Novel FGFR1 Mutations. *J Clin Res Pediatr Endocrinol.* 2017;9(2):95-100.
304. Turan I, Hutchins BI, Hacıhamdioglu B, Kotan LD, et al. CCDC141 Mutations in Idiopathic Hypogonadotropic Hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2017;102(6):1816-25.
305. Bouilly J, Messina A, Papadakis G, Cassatella D, et al. DCC/NTN1 complex mutations in patients with congenital hypogonadotropic hypogonadism impair GnRH neuron development. *Hum Mol Genet.* 2018;27(2):359-72.
306. Fan Y, Zhang X, Wang L, Wang R, et al. Diagnostic Application of Targeted Next-Generation Sequencing of 80 Genes Associated with Disorders of Sexual Development. *Sci Rep.* 2017;7:44536.

## 10. Spis tabel

- Tabela 1.** Czynniki wpływające na migrację neuronów GnRH.
- Tabela 2.** Defekty towarzyszące IHH.
- Tabela 3.** Geny, ich produkty, funkcje, powiązany fenotyp, model dziedziczenia w IHH (porządek alfabetyczny).
- Tabela 4.** Dane antropometryczne badanych pacjentów.
- Tabela 5.** Fenotyp badanych pacjentów z IHH.
- Tabela 6.** Kryteria diagnostyczne hiposmii i anosmii w badaniu węchu metodą podmuchową Elsberga-Levy’ego w modyfikacji Pruszewicza.
- Tabela 7.** Panel 27 genów o udowodnionym bądź podejrzanym znaczeniu klinicznym w IHH.
- Tabela 8.** Odpowiedź w teście z GnRH w zakresie gonadotropin i stężenie obwodowych hormonów płciowych.
- Tabela 9.** Wyniki innych badań hormonalnych.
- Tabela 10.** Wyniki badania ultrasonograficznego jąder.
- Tabela 11.** Wyniki badania rezonansu magnetycznego przysadki i obecność innych towarzyszących zaburzeń hormonalnych.
- Tabela 12.** Wynik USG ginekologicznego i wcześniejsze leczenie hormonalne.
- Tabela 13.** Zidentyfikowane mutacje w badanych genach IHH.
- Tabela 14.** Wykryte mutacje, opis w piśmiennictwie, ClinVar, HGMD, predykcja patogenności.
- Tabela 15.** Fenotypy nie związane z funkcją gonad. .
- Tabela 16.** Fenotypy nie związane z funkcją gonad (w przypadkach mutacji wielogenowych).
- Tabela 17.** Fenotypy reprodukcyjne u badanych pacjentów według grup genów.
- Tabela 18 a i b.** Fenotypy reprodukcyjne w przypadkach mutacji wielogenowych.
- Tabela 19.** Wady i schorzenia towarzyszące oraz opis obserwacji w badanej grupie w porównaniu z danymi z piśmiennictwa.
- Tabela 20.** Przebieg, wielogenowość i różny topień penetracji i różny fenotyp IHH.
- Tabela 21.** Funkcja genów w których znaleziono mutacje u poszczególnych pacjentów.
- Tabela 22.** Skrótów nazw aminokwasów.

## 11. Spis rycin

**Rycina 1.** Proponowany schemat diagnostyki genetycznej w izolowanym hipogonadyźmie hipogonadotropowym.