

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
Katedra i Klinika Endokrynologii Ginekologicznej Uniwersytetu Medycznego
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
Kierownik Katedry i Kliniki: Prof. dr hab. n. med. Błażej Męczekalski

Lek. Anna Szeliga

**Ocena stężenia neurokininy B i nesfatyny-1 w surowicy krwi
pacjentek z czynnościowym podwzgórzowym brakiem
miesiączki przed leczeniem i po 6 miesiącach terapii
estrogenno-progestagennej**

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki medyczne

Promotor: Prof. dr hab. n. med. Błażej Męczekalski

Promotor pomocniczy: Dr hab. n. med. Agnieszka Podfigurna

Poznań, 2021

Składam wyrazy wdzięczności i podziękowania

Wojtkowi, za wyrozumiałość i cierpliwość

*Rodzicom, za wychowanie, ich nieopisane poświęcenie
oraz wsparcie na całej drodze edukacji*

Dziadkom, za to, że zawsze trzymali za mnie kciuki

Szczególne podziękowania składam

Panu prof. dr hab. n. med. Błażejowi Męczekalskiemu oraz

Pani dr hab. n. med. Agnieszce Podfigurnej

za okazaną pomoc i cenne wskazówki w trakcie pisania pracy.

SPIS TREŚCI

Spis tabel	5
Spis rycin.....	7
Lista skrótów	11
1. WSTĘP	14
1.1. Czynnościowy podwzgórzowy brak miesiączki.....	14
1.1.1. Diagnoza czynnościowego podwzgórzowego braku miesiączki	14
1.1.2. Rodzaje braku miesiączki pochodzenia podwzgórzowego	16
1.1.4. Leczenie czynnościowego podwzgórzowego braku miesiączki	22
1.2. Neuroendokryne mechanizmy regulacji funkcji rozrodczych	24
1.2.1. Neuroanatomia ośrodków regulacji układu rozrodczego	24
1.2.2. Neurony KNDy.....	24
1.3. Neurohormony wydzielane przez KNDy.....	27
1.3.1. Kisspeptyna	27
1.3.2. Neurokinina B.....	29
1.3.3. Dynorfina	31
1.4. Podwzgórzowe mechanizmy łączące stan odżywienia z funkcjami rozrodczymi	32
1.4.1. Podwzgórze a funkcje rozrodcze.....	32
1.4.2. Hormony zaangażowane w regulację funkcji rozrodczych i metabolicznych ...	35
1.4.3. Nesfatyna-1	37
2. CEL PRACY	43
3. MATERIAŁ I METODY.....	44
3.1. Grupa badana	44
3.2. Grupa kontrolna.....	45
3.3. Metodyka.....	46
4. WYNIKI	52
4.1. Porównanie grupy badanej przed leczeniem z grupą kontrolną.....	52
4.1.1. Charakterystyka grupy badanej i kontrolnej	52
4.1.2. Parametry hormonalne	55

4.1.3.	Profil metaboliczny.....	57
4.1.4.	Metabolizm tkanki kostnej.....	59
4.1.5.	Stężenie NKB i nesfatyny-1 w surowicy krwi.....	60
4.2.	Wyniki pacjentek chorujących na FHA po leczeniu	62
4.2.1.	Parametry hormonalne	62
4.2.2.	Profil metaboliczny.....	66
4.2.3.	Metabolizm tkanki kostnej.....	71
4.2.4.	Stężenie NKB i nesfatyny 1 w surowicy krwi	72
4.3.	Analiza korelacyjna	74
4.3.1.	Analiza korelacyjna parametrów antropometrycznych i stężenia NKB oraz nesfatyny-1 w surowicy krwi	74
4.3.2.	Analiza korelacyjna parametrów hormonalnych i NKB oraz nesfatyny-1.....	75
4.3.3.	Analiza korelacyjna parametrów metabolicznych oraz hormonalnych i NKB oraz nesfatyny-1 w surowicy krwi	78
4.3.4.	Analiza korelacyjna parametrów metabolizmu kostnego oraz parametrów hormonalnych i stężeń NKB oraz nesfatyny-1 w surowicy krwi	81
4.3.5.	Analiza korelacji między stężeniami NKB oraz nesfatyny-1 w surowicy krwi	82
4.4.	Krzywe ROC.....	83
4.4.1.	Krzywe ROC – ryzyko wtórnego braku miesiączki.....	83
4.4.2.	Krzywe ROC – ryzyko obniżonej BMD	88
4.5.	Modele wielowymiarowe	90
5.	DYSKUSJA	95
5.1.	Analiza stężeń NKB i nesfatyny-1 przed leczeniem	96
5.1.1.	Stężenie NKB i nesfatyny-1 u pacjentek z FHA.....	96
5.1.2.	NKB i nesfatyna -1 a czynniki antropometryczne	98
5.1.3.	NKB i nesfatyna -1 a parametry hormonalne.....	99
5.1.4.	NKB i nesfatyna -1 a parametry metaboliczne.....	100
5.1.5.	NKB i nesfatyna -1 a BMD	102
5.2.	Hormonalna terapia zastępcza w FHA.....	103
5.2.1.	Zmiany w układzie hormonalnym, wyrównaniu metabolicznym oraz gospodarce kostnej w trakcie HTZ u pacjentek z FHA	103
5.2.2.	Zmiany stężenia NKB i nesfatyny-1 w trakcie HTZ u pacjentek z FHA.....	107

5.2.3. Czynniki prognostyczne wystąpienia wtórnego braku miesiączki- krzywe ROC, analizy wielowymiarowe.....	108
6. WNIOSKI.....	111
7. STRESZCZENIE	112
8. SUMMARY.....	114
Bibliografia.....	116

Spis tabel

Tabela I. Zmiany hormonalne w przebiegu zaburzeń odżywiania związane z utratą gęstości mineralnej kości.	19
Tabela II. Leczenie FHA przygotowane w oparciu o zalecenia Functional Hypothalamic Amenorrhea	23
Tabela III. Wartości referencyjne badanych parametrów laboratoryjnych	48
Tabela IV. Porównanie danych antropometrycznych między grupą FHA a grupą kontrolną. .	52
Tabela V. Porównanie stężeń FSH, LH, E2, testosteronu, PRL, DHEA-S, kortyzolu porannego, TSH i fT4 w surowicy krwi między grupą FHA a grupą kontrolną.....	55
Tabela VI. Porównanie stężeń glukozy, insuliny i frakcji lipidowych na czczo w surowicy krwi oraz wskaźnika HOMA-IR między grupą FHA a grupą kontrolną.	57
Tabela VII. Porównanie BMD, T-score i Z-score między grupą FHA a grupą kontrolną	59
Tabela VIII. Porównanie stężenia niefatyny-1 oraz NKB w surowicy krwi między grupą FHA a grupą kontrolną.....	60
Tabela IX. Stężenia FSH, LH, E2 oraz PRL w surowicy krwi w grupie badanej po leczeniu w porównaniu do stanu przed leczeniem (p1) oraz w porównaniu do grupy kontrolnej (p2).	62
Tabela X. Stężenia testosteronu, DHEA-S, kortyzolu oraz TSH i fT4 w surowicy krwi w grupie badanej po leczeniu w porównaniu do stanu przed leczeniem (p1) oraz w porównaniu do grupy kontrolnej (p2).....	64
Tabela XI. Stężenie insuliny oraz glukozy na czczo w surowicy krwi z wyliczeniem wskaźnika HOMA-IR w grupie badanej po leczeniu w porównaniu do stanu przed leczeniem (p1) oraz w porównaniu do grupy kontrolnej (p2).	66
Tabela XII. Stężenie TCh, HDL, LDL oraz TG i wskaźnik BMI w grupie badanej po leczeniu w porównaniu do stanu przed leczeniem (p1) oraz w porównaniu do grupy kontrolnej (p2).	68
Tabela XIII. Parametry metabolizmu kostnego pacjentek z FHA po leczeniu w porównaniu do stanu przed leczeniem (p1) oraz w porównaniu do grupy kontrolnej (p2).	71
Tabela XIV. Stężenie NKB oraz niefatyny-1 w surowicy krwi pacjentek z FHA po leczeniu w porównaniu do stanu przed leczeniem (p1) oraz w porównaniu do grupy kontrolnej (p2).	72
Tabela XV. Współczynniki korelacji rang Spearmana dla czasu trwania wtórnego braku miesiączki i wieku oraz stężeń NKB i niefatyny-1 w surowicy krwi.	74

Tabela XVI. Współczynniki korelacji rang Spearmana dla stężeń FSH, LH, E2, oraz NKB i nesfatyny-1 w surowicy krwi.....	75
Tabela XVII. Współczynniki korelacji rang Spearmana dla stężeń testosteronu, kortyzolu i DHEA-S oraz NKB i nesfatyny-1 w surowicy krwi	77
Tabela XVIII. Współczynnik korelacji rang Spearmana dla BMI, stężeń glukozy i insuliny w surowicy krwi na czczo oraz wskaźnika HOMA-IR oraz stężeń FSH, LH, E2, testosteronu, NKB i nesfatyny-1 w surowicy krwi	78
Tabela XIX. Współczynnik korelacji rang Spearmana dla stężeń TCh, LDL, HDL i TG oraz stężeń FSH, LH, E2, testosteronu, NKB i nesfatyny-1 w surowicy krwi	80
Tabela XX. Współczynnik korelacji rang Spearmana dla BMD, T-score i Z-score oraz FSH, LH, E2, testosteronu, NKB i nesfatyny-1.....	81
Tabela XXI. Współczynnik korelacji rang Spearmana między stężeniem NKB i nesfatyny-1 w surowicy krwi w grupie FHA przed i po leczeniu oraz w grupie zdrowej	82
Tabela XXII. Analiza krzywych ROC dla ryzyka wystąpienia wtórnego braku miesiączki-parametry metaboliczne.	83
Tabela XXIII. Analiza krzywych ROC dla ryzyka wystąpienia wtórnego braku miesiączki-parametry hormonalne	86
Tabela XXIV. Analiza krzywych ROC dla ryzyka wystąpienia wtórnego braku miesiączki-stężenie NKB i nesfatyny-1 w surowicy krwi	87
Tabela XXV. Analiza krzywych ROC dla ryzyka wystąpienia obniżonej BMD- ocena BMI, stężenia FSH, LH, estradiolu, testosteronu, NKB, nesfatyny-1 w surowicy krwi.....	88
Tabela XXVI. Charakterystyka modeli zbudowanych metodą regresji logistycznej	91
Tabela XXVII. Porównanie wartości predykcyjnych oraz czułości i swoistości wybranych modeli oceny prawdopodobieństwa wystąpienia FHA.....	92

Spis rycin

Rycina 1. Ewolucja zaburzeń w triadzie lekkoatletycznej.	15
Rycina 2. Porównanie częstości i typu zaburzeń miesiączkowania między kobietami z siedzącym trybem życia a kobietami uprawiającymi nadmierny wysiłek fizyczny.....	21
Rycina 3. Układ neuronów KNDy w podwzgórzu.	25
Rycina 4. Zależności między układem POMC/CART oraz AgRP/NPY na poziomie podwzgórza	33
Rycina 5. Schematyczna prezentacja zależności neurohormonalnych układem metabolicznym i układem rozrodczym	34
Rycina 6. Porównanie wskaźnika BMI między grupą badaną przed leczeniem a grupą kontrolną	53
Rycina 7. Porównanie stężenia niefatyny-1 w surowicy krwi między grupami z prawidłowym i obniżonym BMI w grupie FHA	53
Rycina 8. Porównanie stężenia NKB w surowicy krwi między grupami z prawidłowym i obniżonym BMI w grupie FHA	53
Rycina 9. Porównanie stężenia LH w surowicy krwi między grupą badaną przed leczeniem a grupą kontrolną	56
Rycina 10. Porównanie stężenia estradiolu w surowicy krwi między grupą badaną przed leczeniem a grupą kontrolną.....	56
Rycina 11. Porównanie stężenia HDL w surowicy krwi między grupą badaną przed leczeniem a grupą kontrolną	58
Rycina 12. Porównanie stężenia TCh w surowicy krwi między grupą badaną przed leczeniem a grupą kontrolną	58
Rycina 13. Porównanie stężenia insuliny w surowicy krwi między grupą badaną przed leczeniem a grupą kontrolną.....	58
Rycina 14. Porównanie wartości wskaźnika HOMA-IR między grupą badaną przed leczeniem a grupą kontrolną	58
Rycina 15. Porównanie wskaźnika T-score między grupą badaną przed leczeniem a grupą kontrolną	59
Rycina 16. Porównanie stężenia NKB w surowicy krwi między grupą badaną przed leczeniem a grupą kontrolną	61

Rycina 17. Porównanie stężenia niefatyny-1 w surowicy krwi między grupą badaną przed leczeniem a grupą kontrolną.....	61
Rycina 18. Stężenia FSH, LH, E2 oraz PRL w surowicy krwi w grupie badanej po leczeniu w porównaniu do stanu przed leczeniem oraz w porównaniu do grupy kontrolnej.....	63
Rycina 19. Stężenia testosteronu, DHEA-S oraz kortyzolu w surowicy krwi w grupie badanej po leczeniu w porównaniu do stanu przed leczeniem oraz w porównaniu do grupy kontrolnej	65
Rycina 20. Stężenia insuliny oraz glukozy w surowicy krwi na czczo i wartość wskaźnika HOMA-IR w grupie badanej po leczeniu w porównaniu do stanu przed leczeniem oraz w porównaniu do grupy kontrolnej.....	67
Rycina 21. Stężenie cholesterolu całkowitego oraz wskaźnika BMI w grupie badanej po leczeniu w porównaniu do stanu przed leczeniem oraz w porównaniu do grupy kontrolnej.	69
Rycina 22. Stężenia HDL, TG i LDL w grupie badanej po leczeniu w porównaniu do stanu przed leczeniem oraz w porównaniu do grupy kontrolnej	70
Rycina 23. Stężenia NKB i niefatyny-1 w surowicy krwi w grupie badanej po leczeniu w porównaniu do stanu przed leczeniem oraz w porównaniu do grupy kontrolnej.....	73
Rycina 24. Korelacja między wiekiem i stężeniem niefatyny-1 w surowicy krwi - grupa FHA przed leczeniem	74
Rycina 25. Korelacja między stężeniem estradiolu i niefatyny-1 w surowicy krwi - grupa kontrolna	76
Rycina 26. Korelacja między stężeniem estradiolu i NKB w surowicy krwi - grupa FHA przed leczeniem.....	76
Rycina 27. Korelacja między stężeniem testosteronu i niefatyny-1 w surowicy krwi - grupa FHA po leczeniu	77
Rycina 28. Korelacja między stężeniem glukozy i niefatyny-1 w surowicy krwi - grupa FHA przed leczeniem	79
Rycina 29. Korelacja między stężeniem glukozy i niefatyny w surowicy krwi -1 - grupa FHA po leczeniu.....	79
Rycina 30. Korelacja między stężeniem insuliny i NKB w surowicy krwi - grupa FHA po leczeniu	79
Rycina 31. Korelacja między wskaźnikiem HOMA-IR i stężeniem niefatyny-1 w surowicy krwi - grupa FHA po leczeniu.....	79
Rycina 32. Korelacja między wskaźnikiem HOMA-IR i stężeniem NKB w surowicy krwi - grupa FHA po leczeniu	79
Rycina 33. Korelacja między stężeniem HDL i NKB - grupa FHA po leczeniu	80

Rycina 34. Korelacja między stężeniem HDL i nesfatyny-1 - grupa FHA przed leczeniem.....	80
Rycina 35. Korelacja między T-score i stężeniem NKB w surowicy krwi - grupa FHA po leczeniu	81
Rycina 36. Korelacja między BMD i stężeniem NKB w surowicy krwi - grupa FHA po leczeniu	81
Rycina 37. Korelacja między stężeniami NKB i nesfatyny-1 w surowicy krwi - grupa zdrowa.	82
Rycina 38. Korelacja między stężeniami NKB i nesfatyny-1 w surowicy krwi - grupa FHA po leczeniu.....	82
Rycina 39. Korelacja między stężeniami NKB i nesfatyny-1 w surowicy krwi - grupa FHA przed leczeniem.....	82
Rycina 40. Porównanie krzywych ROC dla ryzyka wystąpienia wtórnego braku miesiączki- BMI, stężenie insuliny, glukozy, TCh, HDL, LDL, TG w surowicy krwi oraz wskaźnik HOMA-IR.....	84
Rycina 41. Krzywa ROC ryzyka wtórnego braku miesiączki- wskaźnik HOMA-IR	84
Rycina 42. Krzywa ROC ryzyka wtórnego braku miesiączki- wskaźnik BMI	84
Rycina 43. Krzywa ROC ryzyka wtórnego braku miesiączki- stężenie insuliny w surowicy krwi	84
Rycina 44. Porównanie krzywych ROC dla ryzyka wystąpienia wtórnego braku miesiączki- stężenie FSH, testosteronu, porannego kortyzolu oraz DHEA-S w surowicy krwi.....	85
Rycina 45. Krzywa ROC ryzyka wtórnego braku miesiączki- stężenie testosteronu w surowicy krwi.....	85
Rycina 46. Krzywa ROC ryzyka wtórnego braku miesiączki- stężenie FSH w surowicy krwi....	85
Rycina 47. Porównanie krzywych ROC dla ryzyka wystąpienia wtórnego braku miesiączki- stężenie NKB i nesfatyny-1 w surowicy krwi	86
Rycina 48. Krzywa ROC ryzyka wtórnego braku miesiączki- stężenie nesfatyny-1 w surowicy krwi	86
Rycina 49. Krzywa ROC ryzyka wtórnego braku miesiączki- stężenie NKB w surowicy krwi ...	86
Rycina 50. Krzywa ROC ryzyka obniżonej BMD- stężenie estradiolu w surowicy krwi	89
Rycina 51. Krzywa ROC ryzyka obniżonej BMD- stężenie LH w surowicy krwi	89
Rycina 52. Porównanie krzywych ROC dla ryzyka obniżonej BMD- stężenie FSH, LH, E2, testosteronu, NKB, nesfatyny-1 w surowicy krwi oraz wskaźnik BMI	89
Rycina 53. Krzywa ROC ryzyka obniżonej BMD- wskaźnik BMI.....	89
Rycina 54. Charakterystyka 1. modelu uzyskanego metodą analizy skupień metodą k-średnich	91

Rycina 55. Charakterystyka 2. modelu uzyskanego metodą analizy skupień metodą k-średnich	92
Rycina 56. Charakterystyka 1. modelu uzyskanego metodą drzew klasyfikacyjnych.....	93
Rycina 57. Charakterystyka 2. modelu uzyskanego metodą drzew klasyfikacyjnych	94

Lista skrótów

1,25(OH) ₂ D ₃	<i>ang. 1,25-dihydroxycholecalciferol</i>	1,25-dihydroksycholekalcyferol
AA	<i>amino acids</i>	aminokwasy
AgRP	<i>Agouti-related protein</i>	białko Agouti
ARC	<i>arcuate nucleus, infundibular nucleus</i>	jądro łukowate
AUC	<i>area under curve</i>	pole pod krzywą
AVPV	<i>anteroventral periventricular nucleus</i>	jądro przedniobrzusze okołokomorowe podwzgórza
BMD	<i>bone mineral density</i>	gęstość mineralna kości
BMP6	<i>bone morphogenetic protein 6</i>	białko morfogenetyczne kości 6
Ca ²⁺	<i>calcium ion</i>	jony wapnia
cAMP	<i>cyclic adenosine monophosphate</i>	cykliczny adenozylo-3',5'- monofosforan
CART	<i>cocaine and amphetamine regulated transcript neuron</i>	układ regulowany kokainą i amfetaminą
DHEA	<i>dehydroepiandrosterone</i>	dehydroepiandrosteron
DHEA-S	<i>dehydroepiandrosterone sulfate</i>	siarczan dehydroepiandrosteronu
E2	<i>estradiol</i>	estradiol
Dyn	<i>dynorphin</i>	dynorfina
ERE	<i>estrogen responsive element</i>	sekwencja nukleotydów wiążąca receptor estrogenowy
ER α	<i>estrogen receptor α</i>	receptor dla estrogenów α
ER β	<i>estrogen receptor β</i>	receptor dla estrogenów β
FGF21	<i>fibroblast growth factor 21</i>	czynnik wzrostu fibroblastów 21
FHA	<i>functional hypothalamic amenorrhea</i>	czynnościowy podwzgórzowy brak miesiączki
ft4	<i>free thyroxine</i>	wolna tyroksyna
FSH	<i>follicle-stimulating hormone</i>	hormon folikulotropowy
GHSR	<i>growth hormone secretagogue receptor</i>	receptor dla greliny
GnRH	<i>gonadotropin-releasing hormone</i>	gonadoliberyna
GPR54	<i>G protein-coupled receptor 54</i>	receptor sprzężony z białkiem G 54
HDL	<i>high density lipoprotein</i>	lipoproteina wysokiej gęstości
IGF-1	<i>insulin-like growth factor 1</i>	insulinopodobny czynnik wzrostu 1
IGD	<i>isolated gonadotropin-releasing hormone deficiency</i>	izolowany niedobór GnRH
IHH	<i>idiopathic hypogonadotropic hypogonadism</i>	idiopatyczny hipogonadyzm hipogonadotropowy
IL-1	<i>interleukin-1</i>	interleukina-1
IL-6	<i>interleukin-6</i>	interleukina-6

IR	<i>insulin receptor</i>	receptor dla insuliny
IUGR	<i>intrauterine growth restriction</i>	ograniczony wewnątrzmaciczny wzrost płodu
KISS1	<i>kisspeptin</i>	kisspeptyna
KISS1R	<i>KISS1-derived peptide receptor</i>	receptor dla kisspeptyny
KNDy	<i>kisspeptin, neurokinin B, and dynorphin neurons</i>	neurony kisspeptyna/neurokinina B/dynorfina
LDL	<i>low-density lipoprotein</i>	lipoproteina o małej gęstości
LepR	<i>leptin receptor</i>	receptor dla leptyny
LH	<i>luteinizing hormone</i>	hormon luteinizujący
MC3-R	<i>melanocortin 3 receptor</i>	receptor melanokortyny 3
MC4-R	<i>melanocortin 4 receptor</i>	receptor melanokortyny 4
M-CSF	<i>macrophage colony-stimulating factor</i>	czynnik stymulujący kolonie makrofagów
ME	<i>median eminence</i>	wyniosłość pośrodkowa
mRNA	<i>messenger RNA</i>	matrycowy RNA
nesfatin-1	<i>NEFA/nucleobindin-2-encoded satiety- and fat-influencing protein</i>	nesfatyna-1
nIHH	<i>normosmic isolated hypogonadotropic hypogonadism</i>	normosomiczny typ IHH
NK1R	<i>tachykinin receptor 1</i>	receptor dla tachykininy 1
NK2R	<i>tachykinin receptor 2</i>	receptor dla tachykininy 2
NK3R	<i>tachykinin receptor 3</i>	receptor dla neurokininy 3
NKB	<i>neurokinin B</i>	neurokinina B
NPY	<i>neuropeptide Y</i>	neuropeptyd Y
NUCB2	<i>nucleobindin-2 gene</i>	gen nukleobindyny-2
NUCB2	<i>nucleobindin-2, DNA binding/EF-hand/acidic protein</i>	nukleobindyna-2
PBM	<i>peak bone mass</i>	szczytowa masa kostna
PCOS	<i>polycystic ovary syndrome</i>	zespół policystycznych jajników
POA	<i>preoptic area</i>	pole przedwzrokowe
POMC	<i>proopiomelanocortin</i>	proopiomelanokortyna
PPAR γ	<i>peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>	receptory aktywowane przez proliferatory peroksysomów gamma
PR	<i>progesterone receptor</i>	receptor dla progesteronu
PRL	<i>prolactin</i>	prolaktyna
PVN	<i>paraventricular nucleus</i>	jądro przykomorowe
PYY	<i>peptide YY</i>	peptyd YY
RANKL	<i>receptor activator for nuclear factor κ B</i>	ligand aktywatora receptora jądrowego czynnika κ B
SON	<i>supraoptic nucleus</i>	jądro nadwzrokowe
T	<i>testosterone</i>	testosteron
TAC3	<i>tachykinin precursor 3 gene</i>	gen preprotachykininy B
TC	<i>total cholesterol</i>	cholesterol całkowity

TG	<i>triglycerides</i>	trójglicerydy
TGF- β	<i>transforming growth factor β</i>	transformujący czynnik wzrostu beta
TNF- α	<i>tumor necrosis factor α</i>	czynnik martwicy nowotworów α
TSH	<i>thyroid-stimulating hormone</i>	tyreotropina
α -MSH	<i>α-melanocyte-stimulating hormone</i>	alfa-melanokortyna

1. WSTĘP

1.1. Czynnościowy podwzgórzowy brak miesiączki

Czynnościowy podwzgórzowy brak miesiączki (ang. functional hypothalamic amenorrhea, FHA, nazywany również funkcjonalnym podwzgórzowym brakiem miesiączki) jest przewlekłym schorzeniem endokrynnym spowodowanym zaburzeniem pulsacyjnego wydzielania hormonów na poziomie podwzgórza, co w następstwie doprowadza do zahamowania osi podwzgórze – przysadka - jajnik i rozwoju wtórnego braku miesiączki. Zahamowanie pulsacyjnego wydzielania hormonu uwalniającego gonadotropinę (ang. gonadotropin-releasing hormone, GnRH) w podwzgórzu skutkuje zahamowaniem wydzielania hormonu folikulotropowego (ang. follicle-stimulating hormone, FSH) i hormonu luteinizującego (ang. luteinizing hormone, LH) z przysadki, co w dalszej kolejności doprowadza do zahamowania funkcji hormonalnych i rozrodczych jajnika^{1,2}.

Wtórny brak miesiączki, charakteryzowany jako brak miesiączki występujący u kobiety uprzednio miesiączkującej, występuje u około 3-5% populacji dojrzałych kobiet. FHA jest przyczyną od 25% do nawet 35% wtórnego braku miesiączki, co sprawia, że jest najczęstszą przyczyną wtórnego braku miesiączki w naszej populacji. Jednocześnie odpowiada za około 3% pierwotnego braku miesiączki, ustępując pierwszeństwa takim schorzeniom, jak dysgenezie gonad czy zespół policystycznych jajników. Szacuje się, że nawet około 17 milionów kobiet na świecie może cierpieć z powodu FHA^{3,4}.

1.1.1. *Diagnoza czynnościowego podwzgórzowego braku miesiączki*

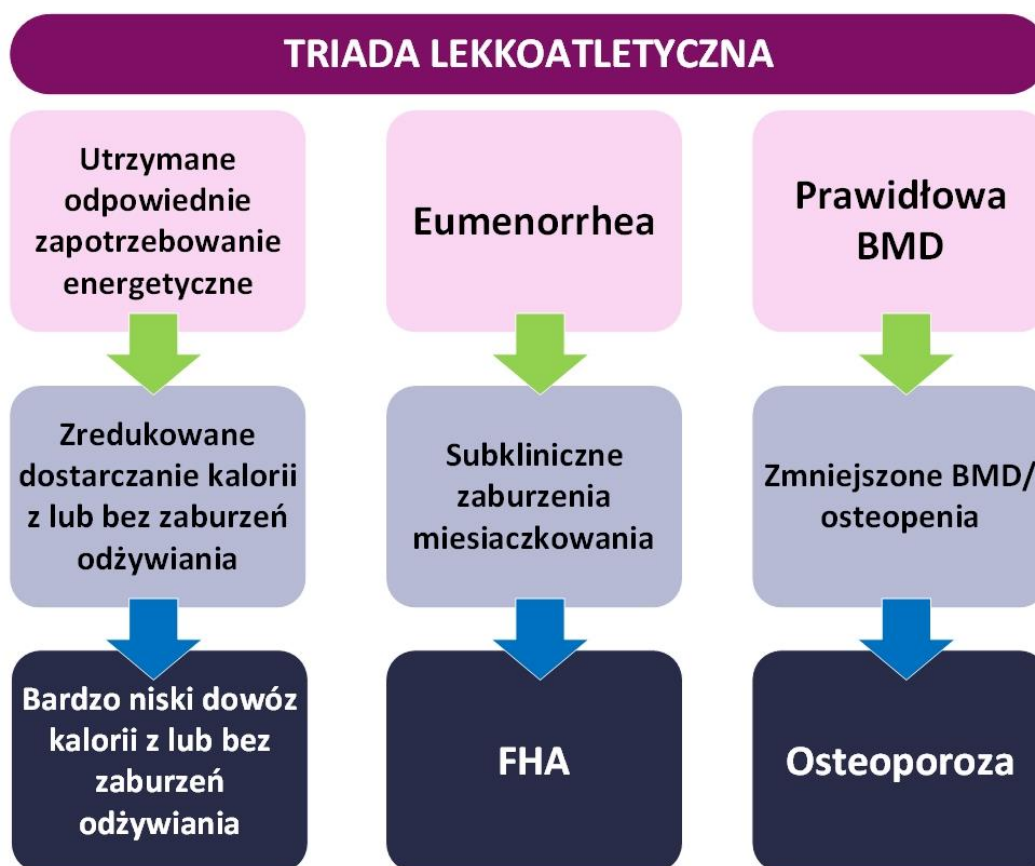
Diagnoza FHA może zostać postawiona u pacjentki po wykluczeniu innych przyczyn mogących powodować zaburzenia miesiączkowania pod postacią wtórnego, czy rzadziej pierwotnego braku miesiączki. Ponadto w przypadku diagnozy czynnościowej etiologii zaburzenia niezwykle istotny jest wywiad w kierunku czynników ryzyka FHA.

Należą do nich:

1. Nadmierny wysiłek fizyczny
2. Przewlekły stres
3. Ujemny bilans energetyczny

FHA często prezentowany jest przez tzw. triadę atletyczną, opisaną po raz pierwszy w 1997 roku⁵ (Rycina 1). W jej skład wchodzi:

- Obniżona gęstość mineralna kości
- Ujemny bilans energetyczny z lub bez współistniejących zaburzeń odżywiania
- Zaburzenia miesiączkowania



Rycina 1. Ewolucja zaburzeń w triadzie lekkoatletycznej. Grafika własna, opracowana na podstawie De Souza M.J. Br J Sports Med. 2014;48(4):289⁵

Szacuje się, że nawet 50% kobiet regularnie uprawiających sport może cierpieć na zaburzenia miesiączkowania, podczas gdy 30% z nich będzie prezentowało objawy wtórnego braku miesiączki. Jeśli zaburzenie pojawi się natomiast jeszcze przed okresem dojrzewania, kobiety mogą prezentować pierwotny brak miesiączki.

Jednocześnie coraz bardziej podkreśla się czynnik stresowy jako wywołujący oraz pogarszający rokowanie u pacjentek cierpiących na FHA. Dane z literatury wskazują, iż często pomimo powrotu prawidłowej masy ciała nie obserwuje się powrotu regularnych cykli miesiączkowych, co może być związane z przetrwałym czynnikiem stresowym^{2,6}.

Kluczowym badaniem w diagnostyce hipogonadyzm hipogonadotropowego jest test stymulacji z GnRH. Pozwala on na różnicowanie zaburzeń na patologie związane z niewydolnością podwzgórza oraz patologie związane z uszkodzeniem/dysfunkcją przysadki. Prawidłowa odpowiedź przysadki (wzrost FSH i LH jedną godzinę po egzogennym podaniu 0,1 ml GnRH) wskazuje na patologię podwzgórza, brak odpowiedzi sugeruje natomiast przysadkową przyczynę hipogonadyzmu hipogonadotropowego. Po potwierdzeniu zaburzenia na poziomie podwzgórza, niezwykle ważne jest wykluczenie zaburzeń organicznych i genetycznych mogących pozostawać przyczyną objawów prezentowanych przez pacjentkę.

1.1.2. Rodzaje braku miesiączki pochodzenia podwzgórzowego

Brak miesiączki pochodzenia podwzgórzowego na tle organicznym może być związany z guzami (np. craniopharyngioma) urazami, miejscową radioterapią, chorobami naciekowymi (sarkoidoza czy histiocytoza z komórek Langerhansa) lub odpowiedzią zapalną lokalizowaną w okolicy podwzgórza. Wśród przyczyn genetycznych natomiast, najczęstszą jest izolowany niedobór GnRH (ang. Isolated Gonadotropin-Releasing Hormone Deficiency, IGD), zwany również idiopatycznym hipogonadyzmem hipogonadotropowy (ang. Idiopathic Hypogonadotropic Hypogonadism, IHH). IHH może zostać podzielony na dwie główne grupy zaburzeń: IHH z anosmią, nazywany zespołem Kallmanna lub z normosmią (normosmiczny typ IHH, ang. Normosmic Idiopathic Hypogonadotropic Hypogonadism, nIHH). IHH jest genetycznie heterogenną grupą związaną z mutacjami genów związanych z:

- prawidłową migracją neuronów wydzielających GnRH – zaburzenie występujące w zespole Kallmanna
- prawidłowym generowaniem pulsów GnRH
- prawidłową budową okolicy układu podwzgórze- przysadka
- prawidłowym wydzielaniem gonadotropin

1.1.3. Powikłania czynnościowego podwzgórzowego braku miesiączki

FHA wpływa negatywnie na zdrowie kobiet w wieku rozrodczym w różnorodny sposób. Przewlekły hypoestrogenizm związany z tym schorzeniem wywiera negatywny wpływ zarówno na układ kostny, układ sercowo-naczyniowy, funkcje seksualne, układ nerwowy i zdrowie psychiczne. Ponadto zaburzenia wydzielania gonadotropin skutkują znacznym upośledzeniem funkcji rozrodczych z powodu współistniejącej anowulacji.

Układ sercowo- naczyniowy

W związku z często bardzo młodym wiekiem pacjentek chorujących na FHA, tradycyjne czynniki ryzyka chorób sercowo-naczyniowych takie jak wiek, nadciśnienie tętnicze czy cukrzyca często nie współwystępują u tych pacjentek⁴. Naczynia obwodowe oraz wieńcowe posiadają receptory dla estrogenów, pozostając organami efektorowymi dla tych hormonów. U zdrowych pacjentek w młodym wieku estrogeny działają na naczynia krwionośne jako aktywny wazodylatator, wywołując zwiększenie syntezy tlenu azotu. Hipoeestrogenizm prowadzi do dysfunkcji śródbłonna, nieprawidłowej biodostępności tlenu azotu, aktywacji układu renina-angiotensyna-aldosteron oraz zaburzeń lipidowych, takich jak wzrost stężenia cholesterolu całkowitego (ang. total cholesterol, TCh), lipoprotein o małej gęstości (ang. low-density lipoprotein, LDL) i trójglicerydów (ang. triglycerides, TG)^{7,8}. Hipoeestrogenizm może prowadzić do zaburzeń przepływu w tętnicy ramiennej (marker dysfunkcji śródbłonna naczyń wieńcowych). Ponadto prowadzi do zaburzeń grubości kompleksu intima-media⁹. Wykonane dotychczas badania jednoznacznie wykazują na silny związek między hipoeestrogenizmem pochodzenia podwzgórzowego a chorobami naczyń wieńcowych¹⁰. FHA pozostaje silnym, niezależnym czynnikiem ryzyka chorób sercowo-naczyniowych². Niemniej, dalsze badania określające ryzyko sercowo-naczyniowe u pacjentek chorujących na FHA są niezbędne celem ochrony, często młodych pacjentek, przed powikłaniami długotrwałego hipoeestrogenizmu. Ostatnie badania dowodzą, że stosowanie suplementacji estrogenowej u tych pacjentek poprawia profil lipidowy oraz zmniejsza ryzyko sercowo-naczyniowe¹¹.

Układ kostny

Estrogeny są kluczowym czynnikiem w regulacji metabolizmu kostnego. Niedobór estrogenów obserwowany u pacjentek z FHA znacząco wpływa na obniżenie gęstości mineralnej kości (ang. bone mineral density, BMD) i zaburzenia w zakresie osiągnięcia szczytowej masy kostnej (ang. peak bone mass, PBM), definiowanej jako największa gęstość mineralna kości osiągnięta przez daną osobę w życiu^{12,13,14}. Szacuje się, że nawet 85% pacjentek chorujących na FHA może wykazywać zaburzenia BMD o różnym nasileniu¹⁵. Ponadto pacjentki z FHA wykazują podwyższone ryzyko złamań w porównaniu ze zdrowymi pacjentkami^{16,17}.

Minimalne stężenie estradiolu niezbędne do utrzymania pozytywnego bilansu metabolizmu kostnego to około 40-50 pg/ml. U pacjentek z FHA obserwujemy niższe stężenia estradiolu, często poniżej dolnej granicy oznaczalności testów komercyjnych (poniżej 5 pg/ml). Powoduje to szczególne narażenie pacjentek z FHA na obniżenie BMD, takich jak osteopenia czy osteoporoza¹⁸. Zgodnie z wytycznymi Endocrine Society każda pacjentka z wtórnym brakiem miesiączki trwającym dłużej niż 6 miesięcy powinna mieć wykonane badanie densytometryczne z szyjki udowej lub odcinka lędźwiowego kręgosłupa².

Patomechanizm spadku BMD u pacjentek chorujących na FHA jest złożony. Estrogeny sprzyjają syntezie czynników wzrostu, w tym transformującego czynnika wzrostu beta (ang. transforming growth factor β , TGF- β), insulinopodobnego czynnika wzrostu 1 (insulin-like growth factor 1, IGF-1) oraz białka morfogenetycznego kości 6 (ang. bone morphogenetic protein 6, BMP6) przez osteoblasty. Ponadto stymulują syntezę aktywnej formy witaminy D3 (1,25(OH)2D3)^{19,20,21}. U kobiet z FHA odbudowa tkanki kostnej jest tłumiona z powodu nasilonej apoptozy osteoblastów, co powoduje zmniejszenie produkcji wymienionych czynników wzrostu. Ponadto hipoeestrogenizm sprzyja wzrostowi liczby osteoklastów, które wykazują aktywność resorpcyjną tkanki kostnej. Nasilony hipoeestrogenizm powoduje zmniejszenie syntezy osteoprotegeryny, która w warunkach fizjologicznych hamuje tworzenia osteoklastów, co prowadzi do nasilonej utraty tkanki kostnej²². Wzrost ilości osteoklastów dodatkowo zwiększa tworzenie ligandów aktywatora receptora jądrowego czynnika κ B (ang. receptor activator for nuclear factor κ B, RANKL), czynnika stymulującego kolonie makrofagów (ang. macrophage colony-stimulating factor, M-CSF), interleukiny-6 (IL-6), interleukiny-1 (IL-1) i czynnika martwicy nowotworów α (ang. tumor necrosis factor α , TNF- α), co dodatkowo prowadzi do zmniejszania gęstości mineralnej kości^{13,23}. Ponadto hipoeestrogenizm zaburza wchłanianie wapnia w przewodzie pokarmowym, zmniejszając w ten sposób stężenie biodostępnego wapnia w organizmie oraz prowadzi do podwyższenia stężenia kortyzolu w surowicy, co może prowadzić do zmniejszenia aktywności osteoblastów, jak i hamować wchłanianie wapnia z jelit⁴.

Dodatkowymi czynnikami ryzyka u pacjentek z FHA są niedobory wapnia i witaminy D3 w diecie, co nasila zaburzenia związane z hipoeestrogenizmem. Powoduje to również, że spośród FHA związanego z wysiłkiem fizycznym, stresem i niedożywieniem, to właśnie ostatnia grupa pacjentek ma największe ryzyko wystąpienia nasilonej osteopenii i osteoporozy²⁴. Zmiany hormonalne w przebiegu zaburzeń odżywiania, występujące również w FHA wpływające na BMD opisane zostały w Tabeli I¹⁵.

Tabela I. Zmiany hormonalne w przebiegu zaburzeń odżywiania związane z utratą gęstości mineralnej kości. Opracowano na podstawie Fazeli P.K. et al. *Endocr Rev.* 2018;39(6):895-910¹⁵

IGF-1	Niskie stężenie w wyniku oporności na hormon wzrostu	Niskie stężenie związane z obniżeniem BMD
Estrogeny	Obniżone stężenie spowodowane zahamowaniem osi podwzgórze – przysadka - jajnik	Czas trwania braku miesiączki wprost proporcjonalny do spadku BMD
Testosteron	Obniżone stężenie	Niskie stężenie związane z zaburzeniem mikroarchitektury kości i obniżeniem BMD
Kortyzol	Podwyższone stężenie	Stężenie kortyzolu odwrotnie proporcjonalne do nasilenia kościotworzenia
DHEA	Niskie stężenie	Niskie stężenie DHEA jest związane ze wzrostem markerów kościogubienia
FGF21	Niskie stężenie	Obniżenie stężenia koreluje z pogorszeniem mikroarchitektury kości
Leptyna	Niskie stężenie	Obniżenie stężenia leptyny związane jest z zaburzeniem mikroarchitektury kości i obniżeniem BMD

Zdrowie psychiczne

Estrogeny w zasadniczy sposób wpływają na regulację funkcji psychicznych u kobiet. Hipoestrogenizm u młodych kobiet z FHA jest silnie związany ze zmianami aktywności różnych neuropeptydów oraz neuroprzekaźników na poziomie podwzgórze. Zmiany stężenia serotoniny, dopaminy i allopregnanolonu mogą w szczególności modulować nastrój u kobiet z brakiem miesiączki. Pacjentki z FHA wykazują większe trudności z radzeniem sobie z codziennym stresem i mają skłonność do większej zależności od innych osób. Ponadto częściej współwystępują u nich inne zaburzenia nastroju w porównaniu do zdrowych kobiet regularnie miesiączkujących²⁵. Dodatkowo wykazują one większą niepewność społeczną, introwersję, tendencje depresyjne, obserwuje się u nich nadmierne zainteresowanie dietą i lęk przed przybraniem na wadze^{25,26,27,28,29}.

Hiperkortyzolemia współwystępująca u pacjentek z FHA może być jednym z możliwych mediatorów zaburzeń nastroju. Podwyższony poziom kortyzolu w surowicy pozytywnie koreluje u tych pacjentek z punktacją w skali oceny depresji Hamiltona^{30,31}.

U kobiet cierpiących z powodu FHA zaobserwowano również zwiększone nasilenie zaburzeń seksualnych w porównaniu do zdrowych kobiet. Z jednej strony problem może wynikać z zaburzeń nastroju, lęku i niepokoju oraz zaburzeń o charakterze depresyjnym. Niewątpliwie dodatkowym czynnikiem wpływającym na zaburzenia seksualne jest hipoestrogenizm i hipoandrogenemia, oraz związana z nimi suchości pochwy i atrofia śluzówek. Prowadzi to do dyspareunii, które ustępują wraz ze zwiększeniem dostępności energii i normalizacją poziomów estrogenów²⁵.

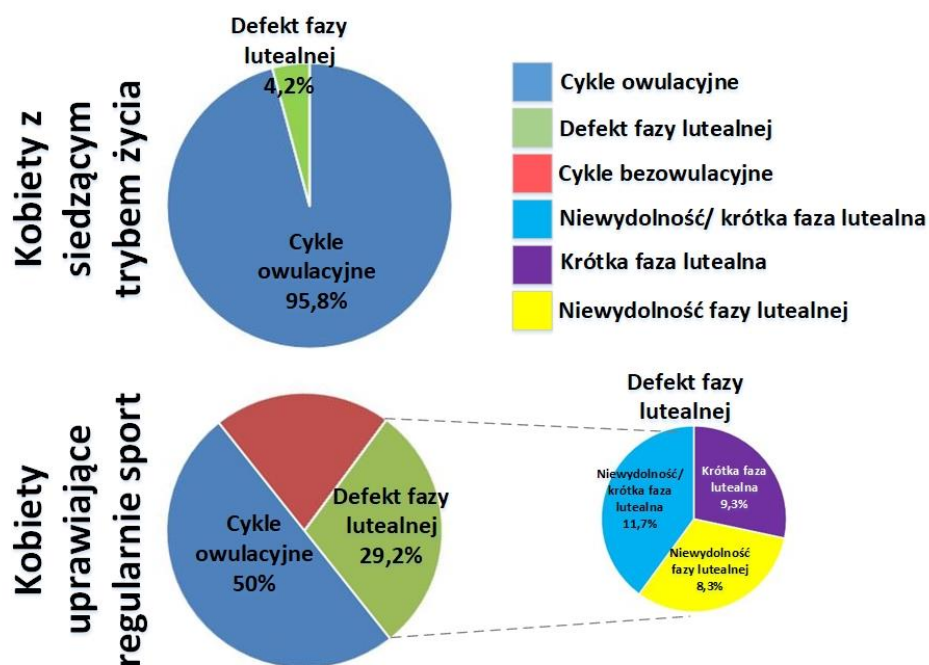
Układ rozrodczy

FHA wykazuje zarówno krótkoterminowe jak i długoterminowe konsekwencje dla zdrowia reprodukcyjnego. Oczywistym wydaje się być fakt, że zaburzenie wydzielania GnRH, a za tym brak stymulacji przysadki (brak wydzielania FSH i LH) i jajnika prowadzi do braku selekcji pęcherzyka dominującego i anowulacji oraz hipoestrogenizmu. Brak cyklicznych zmian stężeń estradiolu i progesteronu prowadzi do zaburzenia cyklicznych faz przemian endometrium. U pacjentek z FHA, w związku z anowulacją i brakiem przemiany endometrium spowodowanej progesteronem błona śluzowa macicy znajduje się w przewlekłej wczesnej fazie proliferacyjnej.

Nieleczony i długotrwały FHA może prowadzić do zanikowych zmian w błonie śluzowej układu moczowo-płciowego i mięśni macicy. Hipoestrogenizm w FHA jest podobny do tego, który obserwuje się u kobiet po menopauzie. Najwcześniejszym objawem niedoboru estrogenów jest zmniejszone nawilżenie pochwy. Może dochodzić również do atrofii śluzówki pochwy, często powikłanej infekcjami dróg rodnych. Ponadto w wyniku hipoestrogenizmu dochodzi u tych pacjentek do podwyższenia pH pochwy predysponującego do dalszych powikłań^{4,32}.

Charakterystycznym objawem wynikającym z opisanych zaburzeń występujących na osi podwzgórze - przysadka - jajnik jest brak miesiączki. Może prezentować się jako pierwotny brak miesiączki u pacjentek przed menarche, niemniej zdecydowanie częściej obserwujemy wtórny brak miesiączki, który rozwija się u dziewcząt i kobiet po okresie dojrzewania^{33,34}.

Anowulacja jest charakterystyczną cechą FHA, logicznym jest więc fakt, że pacjentki aktualnie cierpiące na FHA będą wykazywały znaczne trudności w zajściu w ciążę. Niestety, FHA i współistniejący długotrwały brak miesiączki wywierają negatywny wpływ na zdrowie reprodukcyjne w przyszłości. Nawet 30% pacjentek z zaburzeniami o typie jadłowstrętu psychicznego może wykazywać zaburzenia cyklu miesięczkowego w przyszłości³⁵. Opóźnione menarche, zaburzona synchronizacja procesu dojrzewania płciowego oraz niedorozwój drugorzędowych i trzeciorzędowych cech płciowych stanowią potencjalne ryzyko dla zdrowia reprodukcyjnego u dziewcząt dotkniętych FHA w okresie dojrzewania. U dorosłych kobiet FHA może prowadzić natomiast do zanikowych zmian w błonie śluzowej układu moczowo-płciowego i endometrium. Pacjentki z FHA mają większe ryzyko wystąpienia niepłodności oraz konieczności korzystania z pomocy medycznej celem zajścia w ciążę. Ponadto potrzebują istotnie dłuższego czasu (ponad 6 miesięcy) na zajście w ciążę niż populacja ogólna, istnieje u nich większe ryzyko zajścia w ciążę jedynie przy wykorzystaniu metod leczenia niepłodności³⁵.



Rycina 2. Porównanie częstości i typu zaburzeń miesiączkowania między kobietami z siedzącym trybem życia a kobietami uprawiającymi nadmierny wysiłek fizyczny. Grafika własna, opracowana na podstawie De Souza M.J. et al. Hum Reprod. 2010;25(2):491-503³⁴

Udowodniono, że pacjentki uprawiające nadmierny wysiłek fizyczny (>4 godziny tygodniowo przez okres 1-9 lat) mają 40% ogólnie mniejsze szanse na urodzenie żywego dziecka niż pacjentki, które nie ćwiczą w ogóle. Ponadto pacjentki te mają 3x większe ryzyko zakończenia cyklu bez transferu zarodka, 2x większe ryzyko niepowodzenia implantacji i utraty ciąży. Zaburzenia implantacji oraz zwiększony odsetek poronień w tej grupie pacjentek może być związany z niedomogą fazy lutealnej, a co za tym idzie, zaburzeniami odżywiania zarodka (Rycina 2)^{34,36}. Ponadto udowodniono, że ciążę u pacjentek z FHA lub z FHA w wywiadzie wymagają szczególnej opieki ze względu na zwiększone ryzyko poronienia i porodu przedwczesnego. Dane z literatury wskazują, że liczba urodzeń żywych dzieci w grupie pacjentek z jadłowstrętem psychicznym może być zmniejszona nawet do 1/3 w porównaniu do populacji ogólnej^{37,38}. Dodatkowo ciążę obciążone są większym ryzykiem powikłań położniczych, takich jak ograniczony wewnątrzmaciczny wzrost płodu (ang. intrauterine growth restriction, IUGR)^{39,40}.

1.1.4. Leczenie czynnościowego podwzgórzowego braku miesiączki

Leczenie kobiet cierpiących z powodu FHA (Tabela II) obejmuje leczenie podstawowej przyczyny hipogonadyzmu hipogonadotropowego, który spowodował:

- anowulację oraz związane z tym zaburzenia cyklu miesięczkowego
- niedobór estrogenu powikłany:
 - obniżeniem gęstości mineralnej kości
 - zaburzeniami nastroju, zaburzeniami seksualnymi, suchością pochwy i dyspareunią
 - chorobami sercowo-naczyniowymi²

Właściwe rozpoznanie i odpowiednie leczenie FHA jest ważne ze względu na potencjalne ryzyko obniżonej płodności, wynikającej z przewlekłego braku miesiączki, osteoporozy oraz powikłań sercowo-naczyniowych i neurologicznych.

Bardzo ważną rolę w leczeniu FHA odgrywa psychoterapia, szczególnie ze względu na fakt współwystępowania u tych pacjentek zaburzeń nastroju, depresji oraz zaburzeń odżywiania. Leczenie takich stanów powinno zazwyczaj obejmować psychologa lub psychiatrę. Terapia behawioralna, obejmująca zwiększenie przyjmowania kalorii, polepszenie odżywiania pacjentki, zmniejszenie ilości wysiłku fizycznego, co skutkuje zwiększeniem masy ciała jest podstawowym i pierwszoliniowym leczeniem².

U większości kobiet, u których zmiana trybu życia okazała się niewystarczająca, miesiączki udaje się wywołać po włączeniu sekwencyjnej hormonalnej terapii zastępczej⁴¹. Nową nadzieją dla pacjentek z FHA mogą okazać się analogi kisspeptyny. Obecnie trwają badania nad możliwością zastosowania ich w regulacji gospodarki hormonalnej u pacjentek z FHA, do tej pory osiągnięto obiecujące wyniki w zakresie stymulacji owulacji oraz przywracania regularnego cyklu miesięczkowego^{42,43,44}.

Tabela II. Leczenie FHA przygotowane w oparciu o zalecenia *Functional Hypothalamic Amenorrhea: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline, 2017*²

1	Diagnostyka w kierunku bradykardii, hipotensji, zaburzeń elektrolitowych	Szczególnie istotne u pacjentek z wywiadem w kierunku jadłowstrętu psychicznego; w przypadku wymienionych powikłań- rozważyć hospitalizację
2	Modyfikacja stylu życia skutkująca wzrostem masy ciała	Zwiększenie ilości przyjmowanych kalorii, poprawa stanu odżywienia, zmniejszenie aktywności fizycznej Wymagane podejście interdyscyplinarne: konsultacja dietetyczna
3	Leczenie psychologiczne; terapia poznawczo-behawioralna	Pacjentki z FHA wykazują mniejszą tolerancję stresu, większą zależność, w wywiadzie często zaburzenia psychiczne o charakterze depresji
Minimalny wymagany okres leczenia: 6-12 miesięcy		
4	Nie zaleca się stosowania doustnej antykoncepcji celem wywołania cyklu miesięczkowego	Nie poprawia BMD, szczególnie jeśli pacjentka utrzymuje deficyt energetyczny; mogą maskować powrót fizjologicznego cyklu miesięczkowego
5	Zaleca się zastosowanie krótkiego cyklu hormonalnej sekwencyjnej terapii zastępczej	Przy niepowodzeniu zmian stylu życia; preferowana droga transdermalna podawania estradiolu; optymalna dawka nieustalona; zawsze w połączeniu z modyfikacjami stylu życia
Nie zaleca się stosowania bisfosfonianów, denozumabu, testosteronu ani leptyny w leczeniu FHA		
6	Zaleca się suplementację witaminy D3 oraz wapnia	1200 do 1500 mg wapnia; utrzymanie stężenia 25(OH)D3 w zakresie 32 do 50 ng/mL
7	W przypadku znacznego obniżenia BMD zaleca się próbę leczenia rPTH	Konieczne dalsze badania
8	Stymulacja owulacji u pacjentek starających się o ciążę	1. pulsacyjne podawanie GnRH; 2. gonadotropiny; 3. próba leczenia cytrynianem kłomifenu u pacjentek z wyższym stężeniem estradiolu; Nie zaleca się stosowania kisspeptyny i leptyny; indukcja owulacji tylko przy BMI $\geq 18,5$ kg/m ²

1.2. Neuroendokryne mechanizmy regulacji funkcji rozrodczych

1.2.1. *Neuroanatomia ośrodków regulacji układu rozrodczego*

Funkcje układu rozrodczego kontrolowane są przez centra zlokalizowane w ośrodkowym układzie nerwowym, które, odbierając informacje z różnych szlaków regulacyjnych organizmu, przetwarzają je i koordynują spójną pracę obwodowych partii układu rozrodczego. Owe centra regulacji znajdują się w podwzgórzu należącym do międzymózgowia. To właśnie w podwzgórzu, poza ośrodkiem regulacji funkcji rozrodczych, znajdują się ośrodki odpowiadające za metabolizm, odbiór informacji czuciowych, regulację funkcji wewnątrzwydzielniczych zależnych od światła, ośrodek głodu i pragnienia, ośrodek regulacji rytmów dobowych, ośrodek snu i czuwania oraz termoregulacji. Dzięki bliskiemu sąsiedztwu w podwzgórzu, informacje z neuronów odpowiedzialnych za regulację wyżej wymienionych układów mogą wpływać na regulację funkcji rozrodczych.

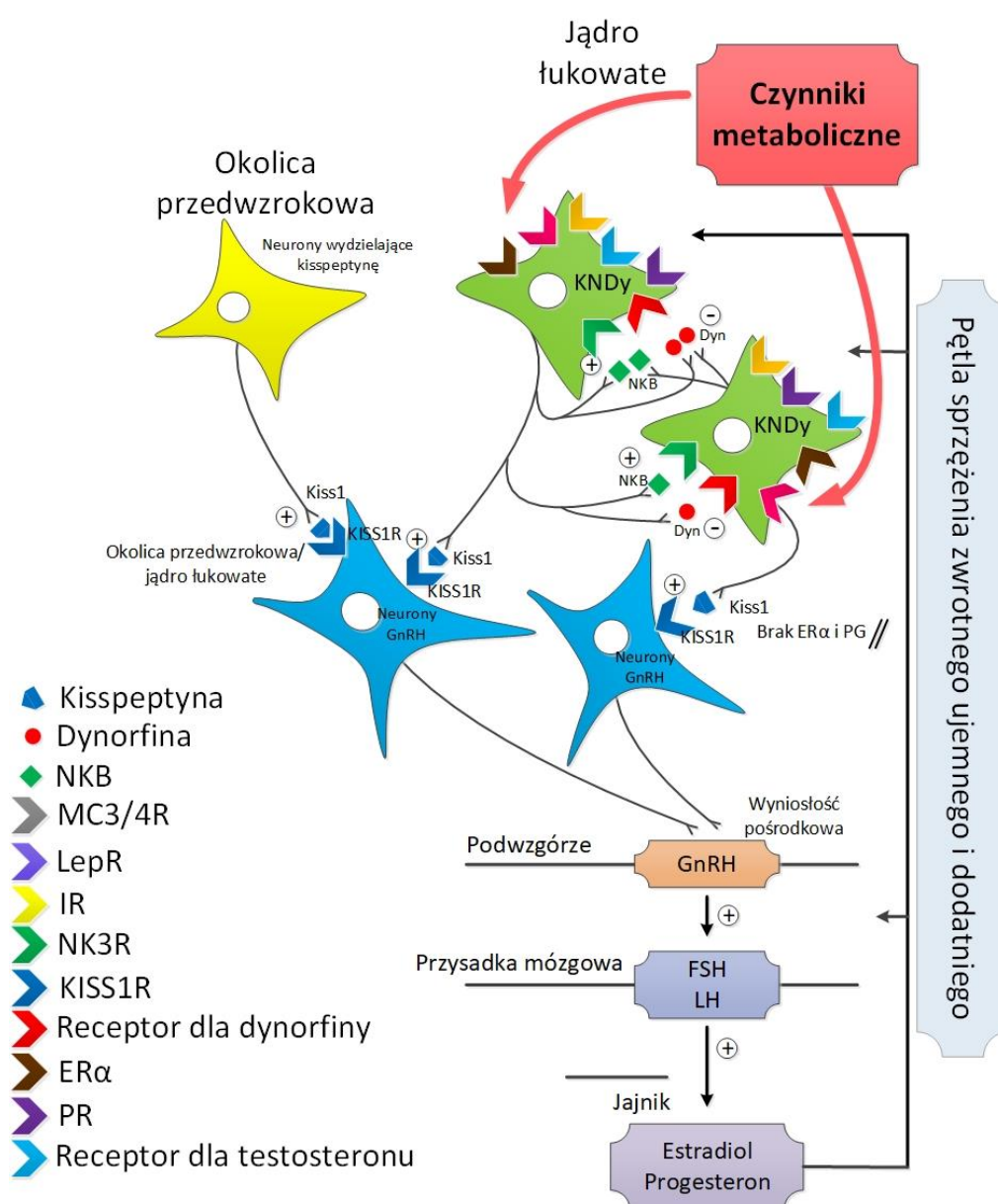
Jeszcze do niedawna za centralny węzeł kontrolujący funkcje rozrodcze uznawane były neurony produkujące GnRH. Wydzielając GnRH w sposób pulsacyjny i skoordynowany, miały regulować wydzielanie FSH i LH z przysadki. Gonadotropiny w dalszej kolejności, wpływając na gonady, odpowiadają za syntezę i wydzielanie hormonów steroidowych, kontrolując pracę narządów efektorowych.

Najnowsze badania dowodzą jednak, że sploty neuronów GnRH nie są generatorem sygnałów dla niższych partii osi podwzgórze – przysadka - jajnik. Udowodniono, że „nad” neuronami GnRH w szlaku regulacji znajdują się neurony, które dzięki szerokiej gamie receptorów zlokalizowanych na swojej powierzchni są w stanie odbierać impulsy z różnych układów regulacyjnych podwzgórza. W odpowiedzi wydzielają one substancje regulujące zarówno pracę swoją, jak i okolicznych neuronów. Ponadto mają zdolność pobudzania neuronów GnRH do pulsacyjnego wydzielania GnRH. Neuronami tymi są neurony wydzielające kisspeptynę, neurokininę B i dynorfinę, zwane neuronami kisspeptyna/neurokinina B/dynorfina (ang. kisspeptin, neurokinin B, and dynorphin neurons, neurony KNDy).

1.2.2. *Neurony KNDy*

Kluczową cechą neuronów KNDy jest ko-ekspresja kisspeptyny (ang. kisspeptin, KISS1), dynorfiny (ang. dynorphin, Dyn) i neurokininy B (ang. neurokinin B, NKB). Po raz pierwszy zjawisko to zaobserwowano w jądrze łukowatym owcy (ang. arcuate nucleus, ARC), następnie u szczura, myszy, kozy oraz małpy^{45,46,47}. W kolejnych badaniach wykazano, że również w jądrze łukowatym człowieka występują neurony, które wykazują jednocześnie ekspresję KISS1, NKB i Dyn^{48,49,50}.

Dotychczas przeprowadzono wiele badań dotyczących budowy sieci neuronów KNDy w jądrze łukowatym (Rycina 3). Neurony KNDy tworzą gęsty splot połączeń synaptycznych między sobą w obrębie jądra łukowatego, jak i projektują do przeciwległego jądra łukowatego^{51,52}. Kluczową cechą neuronów KNDy jest nie tylko koekspresja KISS1, NKB i Dyn, ale również obecność na ich powierzchni receptorów dla NKB (ang. tachykinin receptor 3, NK3R), receptorów dla Dyn (receptor opioidowy kappa), receptorów dla estrogenów α (ang. estrogen receptor alpha, ER α), progesteronu (ang. progesterone receptor, PR), i testosteronu. Na neuronach KNDy nie wykazano natomiast ekspresji receptora dla KISS1 (KISS1-derived peptide receptor, KISS1R), co sugeruje, że KISS1 wydzielana przez te neurony nie bierze udziału w procesach autoregulacyjnych. Jest ona natomiast przekąźnikiem dla innych neuronów, w tym przypadku neuronów GnRH⁵³.



Rycina 3. Układ neuronów KNDy w podwzgórzu. Grafika własna, opracowana na podstawie Szeliga A. et al. *Gynecol Endocrinol.* 2018;34(11):913-919²³⁵

Badanie Younga J. et al.⁵⁴ udowodniło, że neurohormony wydzielane w jądrze łukowatym nie są równorzędne w regulacji wydzielania GnRH. Zaobserwowano bowiem, że u pacjentów wykazujących mutacje inaktywujące NKB lub NK3R, a więc z brakiem lub zahamowaną regulacją neurokininową, podanie KISS1 przywraca prawidłowy wzór wydzielania LH i FSH z przysadki. Badanie to udowodniło, że NKB znajduje się „nad” KISS1 w szlaku regulacji wydzielania GnRH oraz, że jest regulatorem nadrzędnym względem KISS1 (Rycina 3)⁵⁴.

Wzajemne połączenia między neuronami KNDy odpowiadają za ich autoregulację w obrębie jądra łukowatego i jednocześnie pozwalają na utworzenie sieci neuronowej będącej centralnym regulatorem funkcji rozrodczych w ośrodkowym układzie nerwowym. Komórki KNDy działają synergistycznie, tworząc skoordynowany węzeł regulujący pulsacyjne wydzielanie GnRH poprzez kontrolowanie synaptyczne innych komórek KNDy⁵⁵. Możliwe jest to dzięki ekspresji NK3R i receptora opioidowego kappa w komórkach KNDy. Powoduje to, że stymulująca rola NKB i hamujące działanie Dyn autokrynnie koordynuje pulsacyjne uwalnianie KISS1⁴⁵. Neurony KNDy nie prezentują natomiast na swojej powierzchni KISS1R, którego występowanie zostało wykryte jedynie na neuronach wydzielających GnRH^{45,56}. Sugeruje to, że KISS1 odpowiada za pobudzanie neuronów GnRH zlokalizowanych w wyniosłości pośrodkowej (ang. median eminence, ME) do wydzielania GnRH (wykazują obecność KISS1R), nie biorąc jednocześnie udziału w autoregulacji działania innych neuronów KNDy (brak na ich powierzchni KISS1R)(Rycina 3)^{57,58}.

W ostatnim czasie pojawiły się również doniesienia o możliwym pobudzaniu neuronów GnRH bezpośrednio przez NKB, wykazano bowiem ekspresję NK3R na neuronach wydzielających GnRH. Rola tego odkrycia pozostaje jednak niejasna, wskazując na wyjątkową złożoność regulacji układu rozrodczego na poziomie jąder podwzgórza^{51,59,60}.

Na neuronach KNDy występują również receptory dla steroidów płciowych. Dotychczas w organizmie człowieka zidentyfikowano 2 receptory dla estrogenów, ER α i receptor dla estrogenów β (ang. estrogen receptor beta, ER β). Na neuronach KNDy występuje głównie ER α , odgrywając nadrzędną rolę w mechanizmie sprzężenia zwrotnego ujemnego między jajnikiem a podwzgórzem. Najnowsze badania wykazują jednak, że również na neuronach GnRH w wyniosłości pośrodkowej zidentyfikowano ER α , co sugeruje, że ujemny wpływ estradiolu na wydzielanie gonadotropin uzyskiwane jest poprzez różne mechanizmy sprzężenia zwrotnego, nie tylko hamowanie KNDy. Podobnie jednak jak w przypadku wspomnianej obecności NK3R na neuronach GnRH, istotność kliniczna tych obserwacji ta wymaga dalszych badań⁶¹.

Wydaje się, że estradiol działając poprzez swój receptor ma możliwość bezpośredniego blokowania transkrypcji NKB w neuronach KNDy. Wykryto bowiem, że bezpośrednio nad punktem startowym transkrypcji genu preprotachykininy B (ang. tachykinin precursor 3 gene, TAC3) znajduje się sekwencja nukleotydów wiążąca receptor estrogenowy (ang. estrogen responsive element, ERE) poprzez którą może dochodzić do zahamowania syntezy NKB w KNDy⁶². W przeprowadzonych badaniach zaobserwowano ponadto, że u myszy przed

okresem dojrzewania usunięcie ER α powoduje całkowite zahamowanie pętli sprzężenia z estradiolem. Jednocześnie u myszy po okresie dojrzewania pozbawionych ER α nie dochodzi do całkowitego hamowania ekspresji NKB w neuronach KNDy, co może wskazywać na wyższy poziom skomplikowania zależności między estradiolem a KNDy⁶³.

KNDy prezentują na swojej powierzchni również PR. Udowodniono, że neurony wykazujące ekspresję Dyn, w 90% wykazują również koekspresję PR. Progesteron działając przez PR prezentowany na powierzchni neuronów KNDy stymuluje wydzielanie Dyn, która następnie hamuje wydzielanie KISS1⁶¹.

Na podstawie przytoczonych badań staje się więc jasne, że neurony KNDy pośredniczą zarówno w negatywnym, jak i dodatnim sprzężeniu zwrotnym między steroidami płciowymi a jądrami podwzgórza⁶⁴.

Dodatkowo, neurony KNDy posiadają na swojej powierzchni receptory dla leptyny (ang. leptin receptor, LepR) oraz insuliny (ang. insulin receptor, IR), dzięki czemu mają możliwość odbioru informacji dotyczących statusu metabolicznego. Zauważono natomiast, że usunięcie LepR lub IR nie zaburza dojrzewania płciowego, co sugeruje, że pomimo obecności odpowiednich receptorów insulina i leptyna nie są czynnikami nadrzędnymi w regulacji układu rozrodczego oraz, że wywierają wpływ na neurony KNDy jedynie w sposób pośredni, najprawdopodobniej przez neurony wydzielające proopiomelanokortynę/układ regulowany kokainą i amfetaminą (ang. proopiomelanocortin and cocaine and amphetamine regulated transcript neurons, POMC/CART) i neurony wydzielające białko Agouti/neuropeptyd Y (ang. Agouti-related protein/neuropeptide Y, AgRP/NPY) (patrz Rozdział 1.4)^{65,66,67}.

1.3. Neurohormony wydzielane przez KNDy

1.3.1. Kisspeptyna

Gen dla KISS1 (ang. kisspeptin gene, *KISS1*), kodujący białko KISS1 został odkryty w 1996 roku w laboratorium w Hershey jako supresor przerzutów w czerniaku złośliwym człowieka⁶⁸. Nazwa genu, *KISS1* pochodzi od słynnych czekoladek Hershey's Kisses, produkowanych w właśnie w Hershey. Gen KISS1 jest zlokalizowany na chromosomie 1q32 i posiada cztery eksony, pierwsze dwa z nich nie podlegające procesowi translacji. Gen koduje białko prekursorowe złożone ze 145 aminokwasów, które następnie w procesie obróbki potranslacyjnej cięte jest m.in. na fragmenty 54- aminokwasowe. Białko to nazwane zostało metastyną. Dalsza obróbka prowadzi do powstawania peptydów o długości 14, 13 i 10 aminokwasów⁶⁹. Metastyna oraz krótsze białka należą do grupy peptydów, dzielących C-kończową sekwencję Arg-Phe-NH₂, i wspólnie określane są jako KISS1⁷⁰.

W 2001 r. KISS1 została zidentyfikowana jako ligand dla receptora sprzężonego z białkiem G 54 (ang. G protein-coupled receptor 54, GPR54), który został najpierw opisany w mózgu szczura, a następnie u człowieka, gdzie określany jest jako KISS1R⁷¹. Po związaniu KISS1, KISS1R aktywuje fosfolipazę C i stymuluje syntezę wtórnych przekazników wewnątrzkomórkowych, trójfosforanu inozytolu i diacyloglicerolu⁶⁴.

Neurony wydzielające KISS1 znajdują się głównie w okolicy przedwzrokowej oraz jądrze łukowatym podwzgórza (Rycina 3)^{57,58}. KISS1 stymulując wydzielanie GnRH pobudza wydzielanie FSH i LH z przysadki. Mutacje inaktywujące genu *KISS1* lub *KISS1R* powodują hipogonadyzm hipogonadotropowy, natomiast mutacje aktywujące powodują występowanie przedwczesnego dojrzewania płciowego^{72,73,74}.

Kisspeptyna a status metaboliczny

KISS1 jest jednym z elementów układanki neurohormonalnej odpowiedzialnej za oddziaływanie między układem rozrodczym i statusem energetycznym organizmu. Badania na zwierzętach poddanych restrykcji kalorycznej wykazały zmniejszenie ekspresji KISS1 w jądrach podwzgórza pod wpływem spadku przyjmowania pokarmu. Udowodniono, że długotrwałe ograniczenia energetyczne u owiec powodują zmniejszenie ekspresji mRNA dla KISS1 zarówno w ARC, jak i polu przedwzrokowym (ang. preoptic area, POA) w porównaniu z owcami o neutralnym bilansie energetycznym^{75,76,77}.

Uważa się, że neurony wydzielające KISS1 pozostają w kontakcie z neuronami POMC/CART i AgRP/NPY, co może być potencjalną drogą komunikacji między układami w obrębie podwzgórza. Udowodniono, że zarówno leptyna, jak i neuropeptyd Y (neuropeptide Y, NPY) stymulują ekspresję genu *KISS1*, ale wydaje się mało prawdopodobne, aby stymulujący efekt leptyny na neurony wydzielające KISS1 następował poprzez działanie NPY, ponieważ leptyna działając bezpośrednio hamuje powstawanie NPY (patrz rozdział 1.4)(Rycina 4)⁷⁸.

Innymi hormonalnymi przekaznikami między układem metabolicznym a układem kisspeptyny są grelina, IGF-1 oraz hormony osi podwzgórze-przysadka-nadnercza⁷⁸. Grelina, której wydzielanie wzrasta w niedoborach energetycznych, tłumi podwzgórzową ekspresję KISS1 mRNA⁷⁸. W przeciwieństwie do tego, IGF-1 zwiększa ekspresję KISS1 mRNA w jądrze przedniobrzusznym okołokomorowym podwzgórza (ang. anteroventral periventricular nucleus, AVPV) u samic szczurów⁷⁹. Blokada receptora IGF-1 nie zmienia jednak stężenia KISS1 w jądrach podwzgórza⁸⁰.

Kisspeptyna w FHA

W związku z rolą KISS1, jako jednego z głównych regulatorów funkcji rozrodczych, podejrzewano, że zaburzenia wydzielania tego neurohormonu mogą leżeć u podłoża

jadłowstrętu psychicznego oraz FHA. W badaniu przeprowadzonym na grupie 17 pacjentek z jadłowstrętem psychicznym nie wykazano istotnej statystycznie różnicy w stężeniu KISS1 w surowicy w porównaniu do grupy kontrolnej (stężenia odpowiednio w grupie badanej i kontrolnej 208,2 ng/L oraz 232,8 grupa kontrolna; $p=0,546$)⁸¹. Obserwacje te potwierdziły się również w badaniu Pałasz A. et al. ($0,94 \pm 0,4$ ng/ml w grupie z jadłowstrętem psychicznym, $0,99 \pm 0,09$ ng/ml w grupie kontrolnej; $p=0,86$)⁸² oraz w badaniu Podfigurna A. et al. ($0,20 \pm 0,07$ ng/ml w grupie z jadłowstrętem psychicznym w porównaniu do $0,3 \pm 0,36$ ng/ml w grupie kontrolnej; $p=0,712$)⁸³. Dotychczas przeprowadzono jednak tylko jedno badanie porównujące stężenie KISS1 w grupie FHA ze zdrowymi kobietami. W grupie pacjentek z FHA wykazano istotnie niższe stężenie KISS1 w porównaniu z grupą kontrolną ($0,17 \pm 0,11$ w grupie FHA, $0,3 \pm 0,36$ ng/ml w grupie kontrolnej; $p=0,027$)⁸⁴.

1.3.2. *Neurokinina B*

W 2009 r. Topaloglu et al. odkryli, że mutacje powodujące utratę funkcji genów kodujących NKB lub NK3R, prowadziły do rozwoju hipogonadyzmu hipogonadotropowego⁸⁵. To odkrycie spowodowało rozpoczęcie intensywnych badań nad NKB jako regulatora niezbędnego w procesie dojrzewania płciowego oraz kontroli wydzielania gonadotropin u człowieka.

NKB należy do białek z rodziny tachykinin. Charakteryzują się one wspólną C-końcową sekwencją aminokwasów (Phe-X-Gly-Leu-Met-NH₂) i obejmują substancję P, neurokininę A i NKB, a także neuropeptyd K, neuropeptyd γ i hemokininę-1. NKB jest jedyną tachykininą syntetyzowaną na podstawie genu *TAC3*⁸⁶. *TAC3* mRNA zawiera siedem eksonów, z których pięć podlega translacji tworząc peptyd - preprotachykininę B. Preprotachykinina B ulega następnie enzymatycznemu rozszczepieniu, tworząc proneurokininę B, a następnie NKB. Dotychczas zidentyfikowano trzy receptory dla tachykinin (ang. tachykinin receptor 1, 2 and 3, NK1R, NK2R i NK3R). Należą one do podobnej do rodopsyny rodziny sprzężonych z białkiem receptorów G i wykazują znaczną homologię strukturalną⁸⁶. Substancja P, neurokinina A i NKB wiążą się preferencyjnie odpowiednio z NK1R, NK2R i NK3R, ale każdy z nich w odpowiednio wysokim stężeniu może działać jako agonista pozostałych receptorów⁸⁷.

Jako neuropeptyd, NKB może przekazywać informacje na drodze synaptycznej, jak i może odpowiadać za komunikację pozasynaptyczną. NKB nie posiada szybkiego mechanizmu wychwytu zwrotnego, eliminacja ze szczeliny synaptycznej odbywa się poprzez rozkład przez nieswoiste enzymy, takie jak endopeptydazy i aminopeptydazy⁸⁸. Po aktywacji receptora NK3R dochodzi do zwiększenia wewnątrzkomórkowego stężenia Ca^{2+} poprzez hydrolizę trójfosforanu inozytolu oraz zwiększenia wewnątrzkomórkowego poziomu cyklicznego adenozylo-3',5'-monofosforanu (ang. cyclic adenosine monophosphate, cAMP) poprzez aktywację cyklicznej adenylanowej⁸⁹.

Neurony wykazujące ekspresję mRNA dla NKB zostały zlokalizowane w części podstawnej kresomózgowia i podwzgórzu, głównie w ARC i POA, ponadto występują również w regionie przegrody i jądra podstawnego Meynerta, prążku krańcowym i jądrze migdałowatym i korze nowej⁹⁰. Neurony wykazujące ekspresję NKB zostały również opisane w jądrze łukowatym małpy, owcy, kozy i myszy, co skazuje na znaczny stopień homologii tych jąder między gatunkami^{45,46,91,92}.

Hipogonadyzm hipogonadotropowy w mutacjach TAC3/TACR3

Badania osób z mutacjami genów *TAC3* i *TACR3* dostarczają unikalnego wglądu w rolę sygnalizacji NKB i NK3R w regulacji funkcji układu rozrodczego. Do tej pory opisano przypadki kilkudziesięciu pacjentów z mutacjami genu *TAC3* i *TACR3*^{85,93,94,95}. Pacjenci z mutacjami inaktywującymi *TAC3* i *TACR3* prezentują normosmiczny hipogonadyzm hipogonadotropowy, który podobnie jak w innych przypadkach charakteryzuje się niskim poziomem estrogenów i niskim stężeniem LH w surowicy krwi. Zaburzeniu temu towarzyszy brak pokwitania. Rzadsze mutacje aktywujące *TAC3* i *TACR3* powodują występowanie centralnego przedwczesnego dojrzewania⁹⁵.

Obserwacje te potwierdzają jednoznacznie, że przekazywanie sygnału przez NKB/NK3R ma zasadnicze znaczenie dla prawidłowej aktywacji oraz regulacji układu rozrodczego⁹⁶. Pulsacyjne podawanie GnRH dorosłym mężczyznom z mutacjami genu dla *TAC3* i *TACR3* przywracały prawidłowe stężenia LH i prawidłowe wydzielanie testosteronu (ang. testosterone, T). U kobiet z mutacjami *TAC3* i *TACR3* podawanie GnRH natomiast, poprzez stymulację dojrzewanie oocytów i owulacji, umożliwiło zajście w ciążę⁹⁴.

Warto zauważyć, że u pacjentów z mutacjami genu *TAC3* i *TACR3* dochodzi do względnego zachowania wydzielania FSH w porównaniu ze znacznym obniżeniem stężeniem LH w surowicy^{85,94}. Zjawisko to jest charakterystyczne dla zaburzenia pulsacyjnego wydzielania GnRH i może zostać wyindukowane zarówno poprzez spowolnienie pulsów GnRH jak i podawanie GnRH w sposób ciągły (wywołujący efekt hamujący na podwzgórze)⁹⁷.

Hipertrofia neuronów wydzielających NKB po menopauzie

Pierwsze wzmianki o prawdopodobnej roli NKB w regulacji funkcji rozrodczych pochodziło z badań nad pacjentami z mutacjami genów kodujących NKB i NK3R. Kolejne przesłanki, sugerujące silny wpływ regulacyjny NKB na funkcje rozrodcze pochodzą z badań nad ekspresją genów w podwzgórzu u kobiet po menopauzie⁴⁸.

Okres menopauzy charakteryzuje się zwyrodnieniem pęcherzyków jajnikowych i nadmiernym wydzielaniem gonadotropin z przysadki z powodu utraty ujemnego sprzężenia zwrotnego wywołanego brakiem estradiolu⁹⁸. Wykazano, że w podwzgórzu u kobiet po menopauzie

dochodzi do hipertrofii podgrupy neuronów w jądrze łukowatym⁹⁹. Podobne zjawisko występuje również w jądrze łukowatym u starszych mężczyzn, niemniej jest on zdecydowanie mniej nasilone niż u starszych kobiet⁹⁹. Różnice te wynikają prawdopodobnie z różnic w funkcjonowaniu gonad w podeszłym wieku. U starszych kobiet dochodzi do praktycznie całkowitej utraty funkcji wydzielniczej jajników, co implikuje silniejsze pobudzenie podwzgórza, podczas gdy u mężczyzn dochodzi jedynie do łagodnej dysfunkcji jąder, co nie wywołuje skrajnego pobudzenia podwzgórza⁹⁹.

Jednocześnie wykazano, że hipertrofia neuronów ARC podwzgórza po menopauzie nie jest wtórna do degeneracji i zaniku innych obszarów OUN, w związku z czym zanik neuronów jądra łukowatego nie jest pierwotną przyczyną zaburzeń miesiączkowania i zmian hormonalnych w okresie postmenopauzalnym¹⁰⁰. Wykazano, że neurony podlegające hipertrofii wykazują ekspresję mRNA dla receptora estrogenowego α (ER α), KISS1 oraz NKB^{48,99,101}. W opisanych neuronach ekspresji ulega również mRNA dla Dyn, jednak w przeciwieństwie do wzrostu ekspresji mRNA dla KISS1 i NKB, ekspresja mRNA dla Dyn w wykrytych neuronach po menopauzie ulega zmniejszeniu⁴⁹. Wzrost transkrypcji genów peptydów pobudzających (NKB i KISS1) w połączeniu ze spadkiem transkrypcji peptydu hamującego (Dyn) powoduje zwiększenie wydzielania gonadotropin u kobiet po menopauzie^{101,98}.

Podobne zjawisko obserwowane jest u makaków poddanych chirurgicznej sterylizacji. Zauważono, że w wyniku ovariectomii dochodzi do hipertrofii neuronów podwzgórza i zwiększonej ekspresji mRNA dla KISS1 i NKB¹⁰¹. Ponadto zaobserwowano, że hormonalna terapia zastępcza powoduje odwrócenie opisanych zmian. Potwierdza to fakt, iż opisana hipertrofia i wzrost ekspresji mRNA KISS1 i NKB neuronów wynika z hipoestrogenizmu i zaniku sprzężenia zwrotnego ujemnego w osi podwzgórze-przysadka-jajnik¹⁰¹.

1.3.3. *Dynorfina*

Dyn odgrywa ważną rolę w utrzymaniu homeostazy poprzez kontrolę apetytu i rytmów okołodobowych. Dodatkowo jest uważana za czynnik regulujący apetyt oraz temperaturę ciała. Ponadto Dyn jest odpowiedzialna za modulowanie odpowiedzi organizmu na ból, dodatkowo bierze udział w powstawaniu zmian w ośrodkowym układzie nerwowym odpowiedzialnych za uzależnienie, między innymi od kokainy.

Dyn jest endogennym peptydem opioidowym zaangażowanym w ujemne sprzężenie zwrotne między progesteronem a wydzielaniem GnRH w fazie lutealnej. Wydzielana jest razem z NKB w jądrze łukowatym ssaków, również u człowieka¹⁰². Podobnie jak NKB, odpowiada za autokrynną i parakrynną synchronizację neuronów KNDy w obrębie jądra łukowatego.

W odróżnieniu od NKB, wykazuje działanie hamujące na sekrecję KISS1, przez co zmniejsza wydzielanie GnRH. Jak opisano powyżej, zaobserwowano, iż u kobiet w wieku pomenopauzalnym dochodzi do zmniejszenia ekspresji genu dla Dyn oraz zmniejszenia wydzielania mRNA dla Dyn w jądrze łukowatym. Podobne zjawisko zaobserwowano również u owiec poddanych owariektomii, co sugeruje udział Dyn w pętli sprzężeń między jajnikiem i podwzgórzem^{49,103}.

1.4. Podwzgórzowe mechanizmy łączące stan odżywienia z funkcjami rozrodczymi

Ssaki doświadczające stresu energetycznego przystosowane są do regulowania fizjologicznych procesów w organizmie tak, aby zapewnić jednostce przetrwanie w niekorzystnych warunkach środowiska. Zahamowaniu ulegają natomiast wszelkie zbędne w danym okresie procesy, na przykład mechanizmy związane z reprodukcją.

W opisanej sytuacji każdy poziom osi rozrodczej, odpowiednio podwzgórze, przysadka czy gonady, ma zdolność reagowania na sygnały związane ze stanem metabolicznym. U ludzi jadłowstręt psychiczny, kacheksja i nadmierne ćwiczenia fizyczne mogą zatrzymać cykliczne wydzielanie sterydów płciowych. Jednocześnie należy pamiętać, że na przeciwnym końcu spektrum zaburzeń wagi znajduje się otyłość i cukrzyca, które również mogą negatywnie wpływać na płodność^{104,105}.

Dane w literaturze wskazują, że do wystąpienia owulacji konieczne są odpowiednie rezerwy tłuszczu. Ostatnie badania wskazują jednak, że hamowanie funkcji rozrodczych następuje w wyniku aktualnych zaburzeń bilansu energetycznego, a nie bezwzględnej ilości zmagazynowanej tkanki tłuszczowej. Występowanie owulacji ulega zahamowaniu, gdy organizm narażony jest na ujemny bilans energetyczny, niezależnie od tego, czy stan ten jest spowodowany zbyt małym dowozem kalorycznym, zmniejszonym przyjmowaniem pokarmu, nadmierną aktywnością ruchową lub ciężkimi kosztami energetycznymi wydatkowanymi na inne procesy fizjologiczne, na przykład termoregulację. Wrażliwość osi rozrodczej na dostępność energii została podkreślona w ostatnich pracach sugerujących, że nawet subtelne spadki dostępności energii mogą powodować zaburzenia owulacji, co klinicznie prezentowane jest jako zaburzenia miesiączkowania^{106,107}.

1.4.1. Podwzgórze a funkcje rozrodcze

Podwzgórze odgrywa kluczową rolę w utrzymaniu płodności u wszystkich ssaków. Neurony KNDy w okolicy przedwzrokowej i jądrze łukowatym, kontrolują wydzielanie GnRH przez neurony zlokalizowane w wyniosłości pośrodkowej do układu wrotnego naczyń krwionośnych

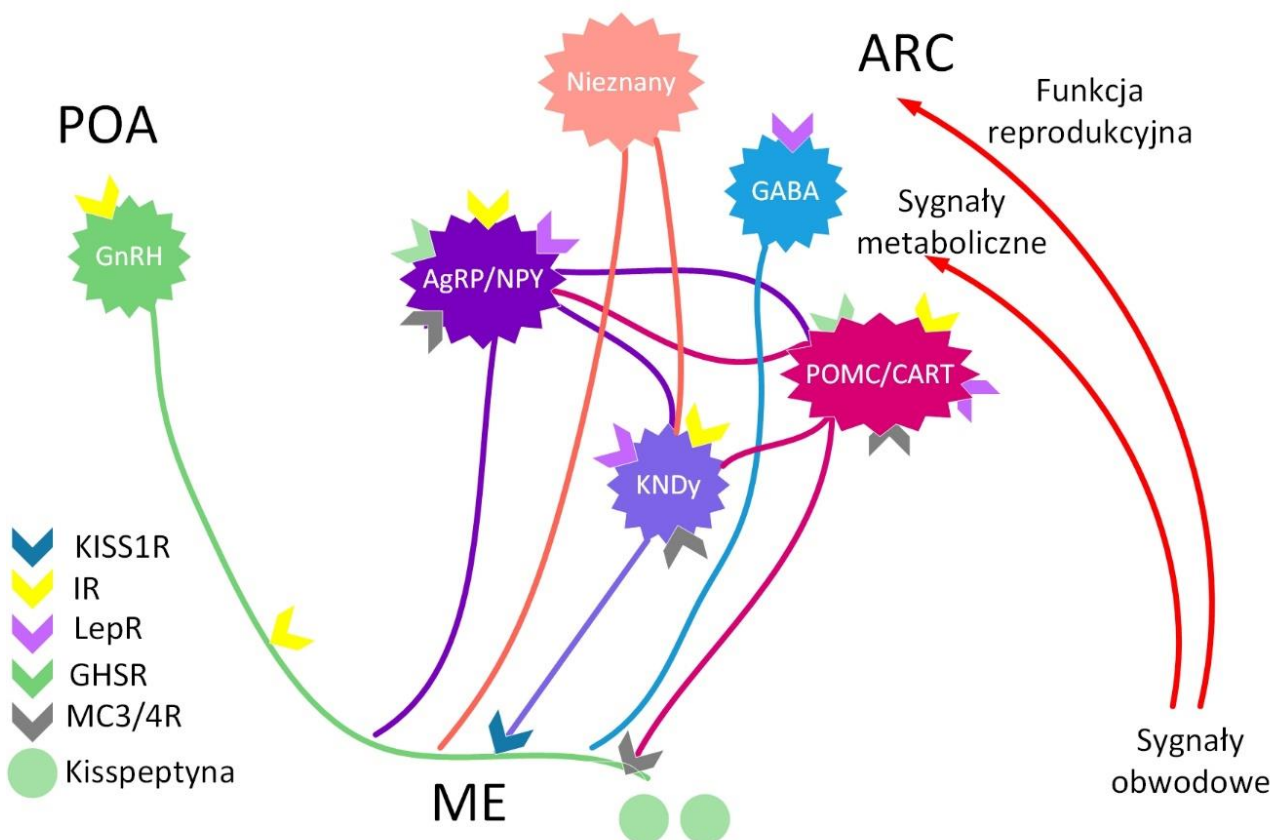
Kontrola metaboliczna na poziomie podwzgórza koncentruje się szczególnie w ARC⁶⁵. W tym ostatnim zlokalizowanych jest wiele potencjalnie zaangażowanych w kontrolę metabolizmu i rozmnażania neuronów. Jednymi z nich są neurony POMC/CART oraz neurony AgRP/NPY zaangażowane w regulację masy ciała i pobierania pokarmu. Neurony POMC/CART wydzielają alfa-melanokortynę (ang. α -melanocyte-stimulating hormone, α -MSH), działającą jako agonista receptorów melanokortyny 3 (ang. melanocortin 3 receptor, MC3-R) i receptorów melanokortyny 4 (ang. melanocortin 4 receptor, MC4-R). Neurony AgRP/NPY wydzielają natomiast białko Agouti (ang. agouti-related protein, AgRP) oraz NPY, antagonistów dla receptorów MC3R i MC4R^{109,110,111}. Badania potwierdzają rolę tych neuronów jako silnych regulatorów funkcji rozrodczych (Rycina 4)^{112,113,114}.



α -MSH, produkowane przez POMC/CART wywiera silne działanie anoreksygeniczne, zmniejszając w ten sposób przyjmowanie pokarmu i wywołując redukcję masy ciała, podczas gdy AgRP i NPY wykazują przeciwne działanie (oreksygeniczne), zwiększając pobieranie pokarmu^{112,113,114}.

Obie grupy neuronów (POMC/CART i AgRP/NPY) wykazują ekspresję LepR, IR oraz receptora dla greliny (ang. growth hormone secretagogue receptor, GHSR) (Rycina 5). Zarówno leptyna, jak i insulina stymulują neurony POMC/CART, hamują natomiast neurony AgRP/NPY. Grelina natomiast aktywuje neurony AgRP/NPY, które następnie, wydzielając GABA, hamują neurony POMC/CART^{115,116,117,118,119,120,121}.

Stwierdzono również, że neurony GnRH wykazują ekspresję MC3R i MC4R (Rycina 5), przez co układ melanokortyny może bezpośrednio modyfikować ich aktywność^{111,122}. Badania wskazują to jako kolejną z możliwych dróg regulacji układu rozrodczego przez status metaboliczny. Większość (~70%) neuronów GnRH jest aktywowana przez α -MSH, co wynika z bezpośredniej aktywacji postsynaptycznej MC3-R i MC4-R, AgRP natomiast wykazuje działanie hamujące (~10%) i stymulujące (~25%) na populację neuronów GnRH¹²³.



Rycina 5. Schematyczna prezentacja zależności neurohormonalnych układem metabolicznym i układem rozrodczym. Grafika własna, opracowana na podstawie Navarro V. et al. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes. 2013;20(4):335-341⁶⁵

1.4.2. Hormony zaangażowane w regulację funkcji rozrodczych i metabolicznych

Wiele adipokin oraz neurohormonów współdziała ze sobą, tworząc sieć skomplikowanych regulacji na poziomie podwzgórza (Rycina 5). Jak wcześniej podkreślono, neurony jądra łukowatego wykazują obecność receptorów dla adipokin tkanki tłuszczowej, które wpływają następnie na sekrecję GnRH. Są nimi m.in. leptyna, grelina oraz insulina. Najnowsze badania wskazują, że wiele innych hormonów, takich jak oreksyna, speksyna, waspina czy nesfatyna-1 mogą odgrywać ważną rolę w oddziaływaniu między układem rozrodczym a metabolizmem^{107,108,124,125}.

Leptyna

Leptyna, anoreksygeniczna adipokina odkryta w 1994 roku przez Jeffreya Friedmana, jest hormonem wydzielanym przez adipocyty białej tkanki tłuszczowej i odgrywa kluczową rolę w homeostazie metabolicznej ssaków. Udowodniono, że stężenie leptyny w surowicy odzwierciedla masę tkanki tłuszczowej, służąc jako wskaźnik stanu metabolicznego kontrolujący centralne neuroendokrynne ośrodki regulujące apetyt, homeostazę energetyczną i metabolizm^{65,126}.

Powoduje zmniejszenie wydzielania NPY i AgRP, który jest stymulatorem apetytu. W ten sposób leptyna zmniejsza apetyt oraz pobudza układ sympatyczny.

Spadek syntezy leptyny bądź niewrażliwość receptorów dla tego hormonu mogą prowadzić do wzrostu masy ciała i otyłości. Leptyna, działając poprzez receptory na neuronach POMC/CART i AgRP/NPY stymuluje wydzielanie POMC, hamuje natomiast syntezę NPY w OUN, przekazując informacje do ARC o zapasach energetycznych⁷⁸.

Jej stężenie w surowicy rośnie wprost proporcjonalnie do ilości białej tkanki tłuszczowej w organizmie, natomiast spadek jej stężenia informuje organizm o konieczności magazynowania energii. Pociąga to za sobą wyhamowanie innych, zbędnych w okresie głodu funkcji, takich jak m.in. reprodukcja¹²⁷.

Stany chorobowe, takie jak wywołany wysiłkiem fizycznym czy zaburzeniami odżywiania FHA są związane z niskim stężeniem leptyny^{128,129,130}. Wykazano, że egzogenne podawanie leptyny w FHA może unormować średnie stężenie LH w surowicy oraz przywrócić prawidłowe pulsacyjne wydzielanie LH, co skutkuje występowaniem owulacyjnych cykli miesięczkowych. Ponadto podawanie leptyny przywraca u tych pacjentek prawidłową gospodarkę w zakresie hormonów tarczycy, IGF-1 oraz parametrów metabolizmu kostnego¹¹¹.

Grelina

Grelina, odkryta w 1999 roku w komórkach żołądka szczura, jest wytwarzana w komórkach okładzinowych trzonu i dna żołądka (X/A-like cells) i jest uznawana za stymulator przyjmowania pokarmu u gryzoni i ludzi (działanie oreksygeniczne), wydzielany w czasie głodzenia^{128,129,121,131}.

Działając przez receptor GHSR1 zlokalizowany na neuronach podwzgórza zaangażowana jest w kontrolę równowagi energetycznej przez pobudzanie apetytu i zwiększanie pobierania pokarmu. Odpowiada ponadto za oszczędzanie zgromadzonej tkanki tłuszczowej, dodatkowo zwiększa motorykę i wydzielanie kwasów żołądkowych¹³².

Grelina zwiększa przyjmowanie pokarmu poprzez aktywację neuronów AgRP/NPY. Jednocześnie pobudzone przez grelinę neurony AgRP/NPY wydzielają GABA, który hamuje neurony POMC/CART, wzmacnia działanie oreksygeniczne wywierane w podwzgórzu¹²¹.

U gryzoni poziom greliny we krwi wzrasta podczas głodzenia, natomiast ulega obniżeniu po podaniu pokarmu lub jego wprowadzeniu do żołądka.

Grelina hamując pulsacyjne uwalnianie GnRH, służy jako sygnał do tłumienia reprodukcji w czasie głodu^{133,134,135}. Podwyższony poziom greliny może powodować opóźnione dojrzewanie płciowe i wywoływać hipogonadyzm hipogonadotropowy, ponadto może prowadzić do niepłodności^{130,136}.

Osoby otyłe wykazują obniżone stężenie greliny w surowicy. U pacjentów z jadłowstrętem psychicznym zaobserwowano natomiast podwyższone stężenie krążącej w surowicy greliny. Ponadto, w przeciwieństwie do osób zdrowych, poziom greliny u pacjentów z jadłowstrętem psychicznym nie zmniejsza się po posiłkach. Zaobserwowano również, że po udanym leczeniu zaburzeń odżywiania dochodzi do spadku stężenia greliny w surowicy^{137,138}.

Wykazano pozytywną korelację między stężeniem greliny w surowicy a aktywnością ruchową u szczurów, jednak funkcja greliny w regulacji aktywności fizycznej u ludzi nie jest jeszcze całkowicie wyjaśniona¹³⁸. Do tej pory zaobserwowano, że intensywny wysiłek fizyczny zwiększa stężenie greliny w surowicy osób chorych na cukrzycę typu 2, w tym przypadku poprawiając wyniki kontroli metabolicznej tych pacjentów¹³⁹. Najnowsze badania wykazały, że również u pacjentek z jadłowstrętem psychicznym występuje pozytywna korelacja między intensywnością wysiłku fizycznego a stężeniem greliny w surowicy¹³¹.

Peptyd YY

Peptyd YY (ang. peptide YY, PYY) jest neuropeptydem syntetyzowanym głównie w komórkach dokrewnych L dystalnej części jelita czczego. Wywiera działanie anoreksygeniczne, hamując ekspresję NPY i AgRP oraz pobudzając neurony POMC/CART w obszarze jądra łukowatego.

Wydzielanie PYY jest stymulowane przez przyjmowanie posiłków¹³⁷. PYY zmniejsza łaknienie poprzez hamowanie motoryki jelit i opróżniania żołądka, ponadto hamuje wydzielanie soku żołądkowego.

Pacjentki z jadłowstrętem psychicznym prezentują zwiększone stężenia PYY na czczo. Analogiczne zmiany zaobserwowano u kobiet cierpiących na FHA wywołane intensywnym wysiłkiem fizycznym. Sugeruje się w związku z tym, że podwyższone stężenie PYY może brać udział w etiopatogenezie jadłowstrętu psychicznego^{140–143}.

Insulina

Insulina uwalniana jest z trzustki w wyniku wzrostu stężenia glukozy i wywołuje reakcje anoreksygeniczne aktywując układ neuronów POMC/CART. Badania wskazują, że obniżone stężenie insuliny może powodować opóźnione dojrzewanie płciowe i wywoływać hipogonadyzm hipogonadotropowy, ponadto może prowadzić do niepłodności^{130,136}

Waspina

Waspina (ang. visceral adipose tissue-derived serine protease inhibitor, waspin) jest adipokiną produkowaną głównie w tkance tłuszczowej podskórnej i wisceralnej otyłych osób z prawidłową tolerancją glukozy. Jej obecność wykryto również w jadrach podwzgórza oraz błonie śluzowej żołądka. Badania na gryzoniach wykazały, że waspina wywiera działanie anoreksygeniczne wielokrotnie silniejsze od leptyny, co powoduje zmniejszenie pobierania pokarmu oraz spadek masy ciała¹⁴⁴.

Dane dotyczące stężenia waspiny u pacjentek cierpiących na FHA są niespójne. Wykazano bowiem, że u pacjentek z jadłowstrętem dochodzi do podwyższenia stężenia waspiny, co może być tłumaczone opornością pacjentek z FAH na waspinę. Niemniej, w innych badaniach nie wykazano istotnych różnic w stężeniu waspiny u pacjentek z FHA^{144,145}.

1.4.3. Nesfatyna-1

Nesfatyna-1 (ang. NEFA/nucleobindin-2-encoded satiety- and fat-influencing protein, nesfatin-1) została odkryta w 2006 roku jako jeden z nowych regulatorów podwzgórzowego

ośrodka głodu i sytości¹⁴⁶. Jest neurohormonem wykazującym głównie działanie anoreksygeniczne, niemniej od momentu jej odkrycia liczne grupy badawcze udowodniły jej plejotropowy wpływ na organizm człowieka^{146,147}.

Fizjologia wydzielania oraz budowa nesfatyny-1

Nesfatyna-1 została wykryta w płynie mózgowo-rdzeniowym szczura jako N-końcowy fragment pochodzący z rozkładu nukleobindiny 2 (ang. nucleobindin-2, DNA binding/EF-hand/acidic protein, NUCB2)¹⁴⁶. Jest kodowana przez gen *NUCB2*, zlokalizowany na krótkim ramieniu chromosomu 11. Produktem transkrypcji i translacji genu *NUCB2* jest peptyd zbudowany z 420 aminokwasów (ang. amino acids, AA) składający się z peptydu sygnałowego (24 AA) i peptydu o nazwie nukleobindyna 2 (396 AA). Podejrzewa się, że ten ostatni w wyniku obróbki potranslacyjnej zostaje pocięty przez konwertazy białkowe (PC) 1/3 i PC2 na trzy mniejsze fragmenty: nesfatynę-1 (AA 1–82), nesfatynę-2 (AA 85–163) i nesfatynę-3 (AA 166–396)¹⁴⁶. Nesfatyna-1 ma wysoce konserwatywną strukturę molekularną, która charakteryzuje się wyraźną homologią sekwencji między ssakami, w tym ludźmi, i gatunkami niższych kręgowców.

Gen *NUCB2* ulega ekspresji głównie w błonie śluzowej żołądka i białej tkance tłuszczowej, a także w niewielkim stopniu, w innych narządach obwodowych, jak np. trzustka i jądra^{148,149,150,151,152}. W ośrodkowym układzie nerwowym mRNA *NUCB2* występuje w podwzgórzu i pniu mózgu, m.in. jądrze przykomorowym (ang. paraventricular nucleus, PVN), jądrze nadwzrokowym (ang. supraoptic nucleus, SON), ARC, bocznym polu podwzgórza i w warstwie niepewnej (ang. zona incerta)^{153,154,155}. Wykazano, że nesfatyna-1 może przekraczać barierę krew-mózg poprzez dyfuzję przez błonową. To odkrycie sugeruje, że krążąca obwodowo nesfatyna-1 (endogenna lub egzogenna) może przechodzić do OUN i wywierać tam działania biologiczne^{156,157}.

W większości tkanek gryzoni badanych w kierunku obecności nesfatyny-1, na przykład błonie śluzowej żołądka, trzustce, przednim płacie przysadki i jądrach, wykryto obecność *NUCB2* lub nierozdzielny kompleks *NUCB2*/nesfatyna-1¹⁵⁰. Sama nesfatyna-1 została jednoznacznie zidentyfikowana w podwzgórzu i płynie mózgowo-rdzeniowym gryzoni, a także w ludzkim osoczu¹⁵⁸. Do tej pory nie wiadomo jednak, czy domniemane produkty rozzszczepiania *NUCB2*, nesfatyna-2 i -3, są wydzielane *in vivo*. Ponadto w badaniach na zwierzętach zauważono, że podawanie egzogenne nesfatyny-2 lub nesfatyny-3 nie zmieniało zwyczajów żywieniowych badanych zwierząt. Najprawdopodobniej więc fragmenty: nesfatyna-2 i -3 nie wykazują aktywności biologicznej¹⁴⁶. Wykazano bowiem, że dla aktywności biologicznej szczególnie istotny jest segment AA 24–53 *NUCB2*, co odpowiada środkowemu fragmentowi nesfatyny-1 i *NUCB2*^{159,160}.

Centralna regulacja wydzielania nesfatyny-1

Nesfatyna-1 uwalniana z podwzgórzowych neuronów zlokalizowanych w ARC hamuje oreksygeniczne neurony AgRP/NPY, nie wpływa natomiast na ekspresję peptydów produkowanych przez neurony POMC/CART (Rycina 4)¹⁶⁰. Wydaje się, że tłumienie oreksygenicznych neuronów w ARC może odgrywać jedną z kluczowych ról w anoreksji indukowanej nesfatyną-1¹⁶¹. Dodatkowo udowodniono, że centralne wstrzyknięcie α -MSH zwiększa ekspresję mRNA NUCB2 w podwzgórzu szczura, natomiast działanie nesfatyny-1 zostaje zniesione przez podanie antagonisty MC3-R oraz MC4-R¹⁶².

Wydzielanie nesfatyny jest regulowane również przez krążące adipokiny. Pierwotnie badania wykazały, że leptyna nie moduluje ekspresji NUCB2/nesfatyny-1 w podwzgórzu szczura, z drugiej strony hamowanie szlaków nesfatynowych nie wpływa na sygnalizację anoreksygeniczną leptyny¹⁴⁶. Udowodniono bowiem, że anoreksygeniczne działanie nesfatyny nie jest blokowane u szczurów z mutacją receptora dla leptyny¹⁶³. Ponadto, udowodniono, że nesfatyna-1 nie wpływa na ekspresję neuropeptydów produkowanych przez neurony POMC/CART¹⁶⁰, a pośredniczących w anorektycznym działaniu leptyny¹⁶⁰. Najnowsze badania sugerują jednak, że aktywność nesfatyny-1 i ekspresja NUCB2 mRNA w neuronach podwzgórza może być stymulowana przez leptynę¹⁶⁴.

Nesfatyna-1 a bilans energetyczny

Nesfatyna-1 odgrywa istotną rolę w regulacji metabolizmu, kontroli apetytu, ruchliwości jelit i zachowań żywieniowych¹⁵⁰.

Centralne podawanie nesfatyny-1 zmniejsza przyjmowanie pokarmu, hamuje motorykę żołądka i dwunastnicy oraz zmniejsza masę ciała^{146,165,166,167}. Poza tym udowodniono, że wstrzyknięcie dokomorowe nesfatyny-1 zmniejsza przyjmowanie pokarmu w sposób zależny od dawki, natomiast wstrzyknięcie przeciwciała antagonizującego działanie nesfatyny-1 stymuluje apetyt^{146,147}. W badaniu Mortazavi S et al. wykazano, że ekspresja mRNA NUCB2 w żołądku oraz w jądrach podwzgórza istotnie zmniejsza się po 24-godzinnym okresie głodówki. Udowodniono ponadto, że krótkotrwały wlew podskórny nesfatyny-1 zwiększa aktywność fizyczną i spalanie tłuszczu u szczurów. Towarzyszy temu zmniejszone przyjmowanie pokarmu i wyhamowanie tempa metabolizmu w porównaniu do grupy kontrolnej¹⁶⁸.

Dane literaturowe dotyczące korelacji nesfatyny-1 a BMI są niejednoznaczne. Część badań wskazuje na pozytywną korelację między ww. wskaźnikami. Zaobserwowano bowiem istotnie wyższe stężenie nesfatyny-1 w przypadku otyłości niż w przypadku obniżonej masy ciała¹⁶⁹. Ponadto, zauważono, że stężenie nesfatyny-1 w surowicy pozytywnie koreluje z BMI w badaniu przeprowadzonym na grupie pacjentek z jądłowstrętem psychicznym o charakterze

restrykcyjnym ($r = 0,520$, $p < 0,05$)^{170,171,172}. Inne badania natomiast wykazują brak korelacji, lub wręcz korelację negatywną. W badaniach przeprowadzonych na grupie pacjentek z przedwczesnym dojrzewaniem płciowym wykazano, że stężenie nesfatyny-1 koreluje negatywnie z BMI ($p = 0,025$, $r = -0,81$)^{173,173,174,175}. Wykazano również, że obwodowe stężenia nesfatyny-1 wykazują istotną ujemną korelację z BMI, procentem tkanki tłuszczowej i stężeniem glukozy we krwi¹⁵⁸. Powyższe rozbieżności w literaturze mogą wynikać zarówno z różnic między jednostkami chorobowymi, w których zależności były obserwowane, czy też wpływu innych czynników metabolicznych, nie branych do tej pory pod uwagę w powyższych analizach. Podejrzewa się natomiast, że ujemna korelacja między BMI a nesfatyną-1, wykryta w niektórych grupach chorych, może wynikać z faktu, iż obniżone stężenie nesfatyny-1 może stymulować apetyt i powodować wzrost BMI¹⁷⁴.

Nesfatyna-1 a stres i zaburzenia nastroju

Niedawno przeprowadzone badania sugerują, że ostry stres jest jednym z czynników aktywujących neurony wykazujące ekspresję nesfatyny-1 w ARC¹⁷⁶. Wykazano, że szczury narażone na ostry stres wykazywały zwiększoną ekspresję mRNA NUCB2 i CRH w podwzgórzu oraz zwiększone stężenie nesfatyny-1 w osoczu. Dodatkowo, stężenie nesfatyny-1 było pozytywnie skorelowane ze stężeniem CRH w osoczu¹⁷⁷

Zaburzenia wydzielania nesfatyny-1 występują nie tylko w ostrych, ale również w przewlekłych zaburzeniach psychiatrycznych. Ari M. et al. ocenili stężenie nesfatyny-1 w grupie pacjentów cierpiących na depresję. Wykazano, że pacjenci cierpiący na silne zaburzenia depresyjne mają wyższe stężenie nesfatyny-1 w surowicy, w porównaniu do populacji zdrowej, odwrotną zależność wykazano natomiast w badaniu przeprowadzonym na grupie pacjentów z uogólnionymi zaburzeniami lękowymi^{178,179}.

Badania oceniające stężenie nesfatyny-1 w osoczu otyłych mężczyzn i kobiet w zależności od stopnia nasilenia stresu, lęku i depresji wykazały silną zależność między stężeniem nesfatyny-1 a nasileniem lęku. U kobiet zaobserwowano dodatnią korelację, podczas gdy u mężczyzn stwierdzono odwrotną zależność. Wykazano dodatkowo, że nesfatyna-1 korelowała pozytywnie z nasileniem stresu i depresji jedynie w grupie badanych kobiet, nie mężczyzn. Wyniki te potwierdziły sugestię, że nesfatyna-1 jest istotnie zaangażowana w regulację nastroju i stresu w sposób zależny od płci¹⁷³.

Nesfatyna-1 a jadłowstręt psychiczny

Jadłowstręt psychiczny z założenia jest zaburzeniem gospodarki energetycznej, niemniej często jest związany ze zwiększeniem nasilenia lęku i depresją. Ponieważ udowodniono, że wzrost poziomu lęku i nasilenie depresji mogą wpływać na stężenie nesfatyny-1, podejrzewa się, że może ona brać udział w patomechanizmie powstawania jadłowstrętu psychicznego oraz

może być zaangażowana w modulację lęku i centralną regulację zachowania żywieniowego w tej jednostce chorobowej¹⁸⁰.

W badaniu Hoffmann et al. udowodniono, że stężenie krążącej w surowicy nesfatyny-1 koreluje dodatnio z nasileniem lęku, a nie z BMI u pacjentek cierpiących z powodu jadłowstrętu psychicznego¹⁸⁰. Z drugiej jednak strony, w innym badaniu wykazano, że poziomy nesfatyny-1 w osoczu były znacznie niższe w grupie chorych na jadłowstręt psychiczny o typie restrykcyjnym niż w grupie kontrolnej¹⁷⁰. Obserwacje te sugerują, że w przypadku jadłowstrętu psychicznego, stężenie nesfatyny-1 mogą być regulowane zarówno przez stan odżywienia, głód, jak i również przez nasilenie lęku.

Nesfatyna-1 a funkcje rozrodcze

Nesfatyna-1 zaangażowana jest również w interakcję między statusem energetycznym a układem rozrodczym^{65,181}.

Podczas prawidłowego procesu dojrzewania płciowego dochodzi do zwiększenia ekspresji NUCB2 mRNA w podwzgórzu. Wykazano również, że obniżenie podwzgórzowej ekspresji NUCB2 mRNA może opóźniać dojrzewanie płciowe i powodować obniżenie stężenia LH i wielkości jajników u osobników o prawidłowym statusie energetycznym¹⁸². Dane pochodzące z badań na szczurach wskazują, że podawanie dokomorowe bardzo wysokich dawek nesfatyny-1 zwiększa stężenie LH i FSH u samców szczurów¹⁸³. Dodatkowo zauważono, że krótkotrwałe głodzenie powoduje gwałtowny wzrost odpowiedzi, który powoduje 9-krotny wzrost poziomu LH w ciągu zaledwie 15 minut po wstrzyknięciu dokomorowym nesfatyny-1^{182,183,184}. W związku z tym podejrzewa się, że spadek stężenia nesfatyny-1 może być jednym z domniemanych czynników etiopatogenetycznych rozwoju hipogonadyzmu hipogonadotropowego.

W ostatnich badaniach udowodniono, że syntetyczna nesfatyna-1 zwiększa ekspresję receptora dla KISS1 i GnRH w komórkach GT1-7 (mysie komórki podwzgórza) oraz podjednostki β LH w L β T2 (mysie komórki przysadki)^{147,155}. Z drugiej strony syntetyczna KISS1 zwiększa ekspresję zarówno mRNA, jak i samego białka NUCB2 w komórkach GT1-7, analogiczne działanie na komórki GT1-7 i L β T2 wywierał testosteron, podczas gdy estradiol zwiększał ekspresję mRNA NUCB2 tylko w komórkach L β T2¹⁴⁷. Badanie to udowodniło, że nesfatyna-1 działa na neurony podwzgórza, wywołując stymulujący wpływ na układ hormonalny regulujący reprodukcję u myszy. Z kolei hormony steroidowe gonad modulują ekspresję NUCB2/nesfatyny-1 w podwzgórzu oraz przysadce¹⁴⁷. Ponadto, egzogenne podawanie KISS1 może powodować zwiększenie wydzielania nesfatyny-1 w OUN, co może odpowiadać pośrednio za anoreksygeniczne działanie KISS1¹⁸⁵.

Powyżej przytoczone obserwacje sugerują, że nesfatyna-1 pełni rolę stymulującą oś podwzgórze- przysadka- jajnik. W niedawno opublikowanym badaniu wykazano natomiast, że

dokomorowe podawanie nesfatyny-1 znacznie zmniejsza ekspresję mRNA dla GnRH w podwzgórzu, ekspresję FSH i LH mRNA w przysadce oraz ekspresję testosteronu w surowicy u dorosłych samców szczurów, co w tym przypadku sugeruje raczej hamującą rolę nesfatyny-1 na osi podwzgórze - przysadka - jajnik¹⁸⁶.

Podejrzewa się, że poza bezpośrednią stymulacją wydzielania GnRH przez nesfatynę-1, może ona wpływać na funkcje rozrodcze w sposób pośredni. Wykazano, że niedawno odkryty neuropeptyd feniksyna, ulega silnej koekspresji z nesfatyną-1 w obrębie wielu jąder podwzgórza (ARC, PVN, brzuszno-brzusze i boczne podwzgórze). Aż 86+/-6% neuronów wykazujących ekspresję feniksyny w jądrze łukowatym wykazuje koekspresję nesfatyny-1¹⁸⁷.

Uważa się, że feniksyna może być potencjalnym pośrednikiem w reakcjach między nesfatyną-1 a układem rozrodczym¹⁸⁷. Udowodniono, że zwiększa ona wydzielanie FSH oraz LH poprzez wzrost ekspresji genu *GnRH*, wzrost syntezy i sekrecji GnRH w podwzgórzu oraz wzrost ekspresji receptora GnRH w przysadce¹⁸⁸. Feniksyna, działając poprzez receptor GPR173 (ang. G-protein coupled receptor 173), aktywuje szlaki cAMP/kinaza białkowa A, a przez to zwiększenia wydzielania GnRH¹⁵⁵.

W ostatnich badaniach wykazano, że feniksyna w sposób zależny od dawki zwiększa stężenie LH w osoczu samic szczurów¹⁸⁹. Odwrotnie, u szczurów z mutacją inaktywującą gen feniksyny dochodziło do opóźnienia dojrzewania płciowego oraz redukcji ekspresji receptora GnRH w przysadce^{188,190}. Jako że feniksyna zwiększa stężenie LH, podejrzewa się, że jej podwyższone stężenie może brać udział w patogenezie PCOS. Wykazano bowiem pozytywną korelację między feniksyną a stężeniem FSH, LH, BMI i nesfatyną-1 oraz negatywną korelację z estradiolem u pacjentek z PCOS¹⁹⁰.

2. CEL PRACY

Celem pracy jest ocena dysfunkcji podwzgórza w oparciu o stężenia wybranych neurohormonów (NKB oraz nesfatyny-1) u pacjentek z czynnościowym podwzgórzowym brakiem miesiączki przed i po 6 miesiącach terapii estrogenno-progestagennej.

Badanie ma na celu określenie czy wydzielanie wymienionych neurohormonów ulega zaburzeniu u pacjentek z FHA (porównanie grupy badanej i kobiet zdrowych, dobranych pod względem wieku). Ponadto badanie stężeń NKB i nesfatyny-1 w surowicy po 6 miesiącach leczenia ma na celu odpowiedzenie na pytanie, czy ewentualne zaburzenia wydzielania wymienionych neurohormonów mają charakter pierwotny, czy wtórny do zaburzeń na poziomie gonady oraz w jaki sposób standardowo stosowana terapia wpływa na równowagę neurohormonalną na poziomie podwzgórza.

Oceniono stężenia estradiolu, gonadotropin: FSH i LH, androgenów: testosteronu, siarczanu dehydroepiandrosteronu (ang. dehydroepiandrosterone sulfate, DHEA-S) tyreotropiny (ang. thyroid-stimulating hormone, TSH), wolnej tyroksyny (ang. free thyroxine, fT4), prolaktyny (ang. prolactin, PRL) w surowicy krwi.

Do parametrów metabolicznych badanych w niniejszej pracy należą:

- stężenia glukozy oraz insuliny w surowicy, oznaczane na czczo, z oceną wskaźnika insulinooporności HOMA-IR
- stężenia frakcji lipidowych osocza: cholesterolu całkowitego, frakcji lipoprotein o wysokiej gęstości (ang. high density lipoprotein, HDL), frakcji lipoprotein o małej gęstości (ang. low-density lipoprotein, LDL) oraz trójglicerydów.

W badaniu wzięto też pod uwagę możliwy wpływ czynników antropometrycznych:

- masy ciała, wzrostu i wyliczonego na ich podstawie wskaźnika BMI.

Dodatkowo wykonano ocenę gęstości mineralnej kości z obliczeniem wskaźnika T-score oraz Z-score.

3. MATERIAŁ I METODY

3.1. Grupa badana

Do I etapu badania włączono 147 kobiet w wieku od 15 do 39 lat (minimum 2 lata po menarche) z rozpoznaniem FHA hospitalizowanych w Katedrze i Klinice Endokrynologii Ginekologicznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Pacjentki zostały włączone do badania w momencie diagnozy FHA.

U każdej z pacjentek rozpoznano czynnościowy podwzgórzowy brak miesiączki na podstawie poniższych kryteriów zgodnych z wytycznymi Endocrine Society z 2017 roku oraz danymi z literatury:

1. rozpoznanie wtórnego braku miesiączki, określanego jako brak miesiączki przez okres dłuższy niż 90 dni, niezwiązany z ciążą
2. obniżone stężenie LH w surowicy krwi (<5 mIU/ml)
3. obniżone stężenie estradiolu w surowicy krwi (<50 pg/ml)

Każda pacjentka włączona do badania podała w wywiadzie co najmniej jeden z czynników ryzyka FHA: stres, intensywny wysiłek fizyczny lub spadek masy ciała.

Celem potwierdzenia FHA u każdej pacjentki wykonano test czynnościowy z GnRH, uzyskując prawidłową odpowiedź przysadki mózgowej na egzogenne podanie GnRH.

Do II etapu badania włączono 55 pacjentek, u których stosowano hormonalną sekwencyjną terapię estrogenno-progestagenną (2 mg 17- β -estradiolu + 10 mg dydrogesteronu) przez 6 miesięcy.

Kryteria wykluczenia z grupy badanej:

- jadłowstręt psychiczny zdiagnozowany zgodnie z najnowszą, V wersją DSM z 2013 roku (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*) jako¹⁹¹:

1. Ograniczenia poboru energii względem zapotrzebowania prowadzące do znacząco niskiej masy ciała w kontekście, wieku, płci, rozwoju psychofizycznego i zdrowia fizycznego. Znacząco mniejsza masa jest zdefiniowana jako masa, która jest mniejsza niż minimalna normalna a dla dzieci lub młodzieży, mniejsza niż minimalnie oczekiwana.

2. Intensywny lęk przed przyrostem masy ciała i przytyciem, lub zaciekle zachowanie, które koliduje z przyrostem masy ciała, nawet gdy masa ciała jest znacząco niska.
 3. Zakłócenie postrzegania własnej masy i kształtu własnego ciała, nadmierny wpływ masy ciała lub jego kształtu na samoocenę albo zaprzeczanie realności aktualnie niskiej masy ciała;
- niedoczynność przysadki jatrogenna lub w przebiegu urazów czaszkowo-mózgowych, zespołu Sheehana lub innych zespołów przebiegających z hipopituitaryzmem, stwierdzona na podstawie badań hormonalnych i testu czynnościowego z gonadoliberyną lub w wywiadzie;
 - zaburzenia miesiączkowania o innej etiologii niż podwzgórzowa (hiperprolaktynemia, niedoczynność/nadczynność tarczycy, zespół policystycznych jajników, zespół lub choroba Cushinga);
 - stwierdzone w wywiadzie lub badaniu ginekologicznym bądź ultrasonograficznym narządu rodniczego, nieprawidłowości morfologiczne w obrębie układu rozrodczego, które mogą być przyczyną zaburzeń miesiączkowania o charakterze pierwotnego lub wtórnego braku miesiączki;
 - stosowanie obecnie lub w czasie ostatnich sześciu miesięcy leczenia hormonalnego;
 - złośliwe rozrosty nowotworowe lub nowotwory hormonalnie zależne- aktywne lub w wywiadzie;
 - występowanie bezwzględnych przeciwwskazań do hormonalnej terapii zastępczej:
 1. przebyta żylna choroba zakrzepowo-zatorowa (ŻChZZ); wysokie ryzyko ŻChZZ
 2. źle kontrolowane nadciśnienie tętnicze
 3. przebyty zawał serca, niestabilna choroba wieńcowa
 4. przebyty udar mózgu
 5. aktywna choroba wątroby, niewydolność wątroby
 6. podejrzenie trombofilii wrodzonej

3.2. Grupa kontrolna

Grupę kontrolną stanowiło 88 zdrowych kobiet dobranych pod względem wieku do grupy badanej.

Do grupy kontrolnej zakwalifikowano kobiety, według następujących kryteriów:

- wiek od 15 do 39 lat,
- prawidłowa masa ciała (BMI 18,5-24,9 kg/m²)
- brak epizodów odchudzania się w wywiadzie przez ostatnie 12 miesięcy,
- regularne cykle miesiączkowe (miesiączki co 28±5 dni) w ciągu ostatniego roku
- brak zaburzeń endokrynologicznych w zakresie przysadki, tarczycy i nadnerczy, stwierdzona na podstawie badań hormonalnych oraz na podstawie wywiadu,
- brak stosowania leczenia hormonalnego w ciągu ostatnich sześciu miesięcy.

Wszystkie pacjentki włączone do badania uzyskały informację na temat celu oraz przebiegu badania i wyraziły na nie pisemną, poinformowaną i świadomą zgodę.

Badanie otrzymało zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (uchwała nr 1265/18)

3.3. Metodyka

Badanie podmiotowe

Pacjentki grupy badanej i kontrolnej były hospitalizowane w Katedrze i Klinice Endokrynologii Ginekologicznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu.

Ze wszystkimi pacjentkami, włączonymi zarówno do grupy badanej, jak i kontrolnej zebrano szczegółowy wywiad lekarski. Wywiad medyczny składał się m.in. z następujących informacji:

1. wiek wystąpienia pierwszej miesiączki, długość cyklu miesięczkowego oraz krwawienia miesięczkowego w przeszłości, bolesność i obfitość miesiączek w wywiadzie;
2. czas trwania braku miesiączki;
3. wystąpienie czynników ryzyka FHA: spadek masy ciała, czas trwania ewentualnego odchudzania, wystąpienie w przeszłości silnego stresu lub znacznego wysiłku fizycznego;
4. dotychczasowe leczenie hormonalne;
5. przeszłość położnicza;
6. choroby przewlekłe;
7. przyjmowane leki;
8. przebyte operacje;
9. uczulenia na leki;
10. wywiad rodzinny.

Badanie przedmiotowe

U wszystkich pacjentek przeprowadzono badanie przedmiotowe, obejmujące:

- masę ciała, wzrost; obliczenie wskaźnika masy ciała - BMI (Body Mass Index) [kg/m²].

W badaniu przyjęto następujące przedziały wartości BMI:

16 – 16,99 kg/m² – wychudzenie;

17 – 18,49 kg/m²- niedowaga;

18,5-24,9 kg/m²- norma;

25-29,9 kg/m²-nadwaga;
30-39,9 kg/m²- otyłość;
>40 kg/m²- otyłość ogromna.

- badanie ginekologiczne,
- ocena cech hiperandrogenizacji (hirsutyzm w skali Ferrimana-Gallweya, trądzik, łysienie typu męskiego);

Diagnostyka obrazowa

Badanie ultrasonograficzne narządu rodnic sondą dopochwową [sonda dopochwowa Aloka Prosound Alpha 6, Hitachi Aloka Medical Ltd., Tokyo, Japan]

W skład badania USG wchodziła ocena USG narządów miednicy mniejszej dostępnych w badaniu, ocena trzonu macicy w 3 wymiarach, ocena grubości oraz echogeniczności endometrium, ocena wielkości jajników w 3 wymiarach z obliczeniem objętości jajników, ocena morfologii jajników z oceną występowania pęcherzyka dominującego, ciała żółtego lub zmian ogniskowych przydatków.

Diagnostyka laboratoryjna

U każdej pacjentki włączonej do badania została pobrana krew z żyły łokciowej przez tymczasowy kontakt żylny do suchej, plastikowej probówki w godzinach rannych (6.00 do 10.00). Przed pobraniem krwi pacjentki pozostawały na czczo przez okres 8-10 godzin. Po pobraniu krew poddawano wirowaniu z przyspieszeniem 1500 g przez 10 minut celem pozyskania surowicy krwi. Uzyskaną surowicę zamrożono w -80°C celem wykonania dalszych oznaczeń. Wartości referencyjne badanych parametrów podano w Tabeli III.

W grupie badanej krew pobrana została po zakwalifikowaniu pacjentki do grupy z FHA oraz po 6 miesiącach hormonalnej terapii estrogenno-progestagennej.

W grupie kontrolnej krew pobierana była w fazie folikularnej, około 11-13 dnia cyklu, przy współistnieniu pęcherzyka dominującego w jajniku (10 lub więcej mm średnicy) oraz stężeniu estradiolu >90 pg/ml.

Badanie surowic krwi pacjentek z grupy badanej i kontrolnej zostało przeprowadzone w Centralnym Laboratorium Ginekologiczno-Położniczego Szpitala Klinicznego UM w Poznaniu.

Tabela III. Wartości referencyjne badanych parametrów laboratoryjnych

Parametr	Wartość referencyjna
Parametry hormonalne	
FSH [mIU/mL]	Faza folikularna: 3,5-12,5 Faza okołowulacyjna: 4,7-21,5 Faza lutealna: 1,7-7,7
LH [mIU/mL]	Faza folikularna: 2,4-12,6 Faza okołowulacyjna: 14,0-95,6 Faza lutealna: 1,0-11,4
Estradiol [pg/mL]	Faza folikularna: 12,5-166 Faza okołowulacyjna: 41,0-398,0 Faza lutealna: 22,3-341,0
Prolaktyna [ng/mL]	4,74-23,3
Kortyzol 8.00 [nmol/L]	166-507
Testosteron [ng/mL]	0,06-0,82
DHEA-S [μmol/L]	1,65-9,15
TSH [μIU/mL]	0,27-4,2
fT4 [ng/dL]	0,93-1,7
Parametry metaboliczne	
Glukoza [mg/dl]	55-99
Insulina [mU/mL]	2,6-24,9
HOMA-IR	<2,5
TCh [mg/dL]	<190
HDL [mg/dL]	>45
LDL [mg/dL]	<115
TG [mg/dL]	<150
Neurohormony	
NKB [ng/L]	brak
Nesfatyna-1 [mmol/L]	brak

Stężenie FSH, LH, estradiolu, prolaktyny, testosteronu, DHEA-S, kortyzolu oznaczono w godzinach porannych (6.00-10.00). Oznaczono również parametry równowagi tarczycowej, TSH, fT4, wykluczając patologie tarczycy (Tabela III). Oznaczenia stężenia wymienionych hormonów zostały wykonane metodą elektrochemiluminescencji (ECLIA) za pomocą analizatora Cobas e601, Roche Diagnostics International. ECLIA to technika elektrochemiluminescencyjna, metoda, w której za emisję światła z wzbudzonych cząsteczek odpowiedzialny jest szereg reakcji rodnikowych, zachodzących na powierzchni elektrody platynowej. Do powstania rodników dochodzi w wyniku wykorzystania testu immunochemicznego typu sandwich. Jest to metoda niekompetycyjna z zastosowaniem nadmiaru przeciwciał. W pierwszym etapie antygen obecny w badanej próbce inkubowany jest z biotynylowanymi przeciwciałami swoistymi dla badanego antygenu oraz monoklonalnymi przeciwciałami swoistymi dla wyżej wymienionych hormonów. W trakcie

szeregu reakcji chemicznych powstają substancje tworząc niestabilne rodniki, który przy powrocie do stanu podstawowego emitują światło o długości fali 620 nm rejestrowane przez fotopowielacz. Stężenie badanej substancji jest odwrotnie proporcjonalne do odczytu emisji fotonu.

Oznaczono również parametry wyrównania metabolicznego pacjentek: glukozy oraz insuliny na czczo (oraz wskaźnik HOMA-IR obliczony ze wzoru: poziom insuliny we krwi na czczo (mu/ml) x poziom glukozy we krwi na czczo (mmol/l)/22,5)

Dodatkowo oznaczono profil lipidowy, zawierający stężenie cholesterolu całkowitego, frakcji HDL, frakcji LDL oraz trójglicerydów. Pomiar stężenia TC, HDL, LDL i TG wykonany został metodą enzymatyczno-kolorymetryczną. W analizie enzymatycznej reakcję barwną poprzedza reakcja katalizowana przez enzym. W szeregu reakcji chemicznych, w obecności peroksydazy powstaje nadtlenek wodoru, który reagując z odpowiednimi substratami, daje odpowiedni zabarwione produkty. Intensywność powstałego zabarwienia jest wprost proporcjonalna do stężenia badanej substancji w próbce. Oznaczenie jest wykonane poprzez pomiar wzrostu absorpcji mierzonej fotometrycznie.

Stężenie insuliny w surowicy zostało oznaczone metodą ECLIA, stężenie glukozy na czczo natomiast referencyjna metoda enzymatyczna z heksokinazą, polegającą na fosforylacji glukozy przez ATP do glukozo-6-fosforanu. Reakcja ta katalizowana jest przez heksokinazę. Następnie dehydrogenaza glukozo-6-fosforanowa utlenia glukozo-6-fosforan w obecności NADP do glukozo-6-fosforanu. Utlenieniu nie ulega żaden inny węglowodan. Tempo powstawania NADPH w trakcie reakcji jest bezpośrednio proporcjonalne do stężenia glukozy i mierzone jest metodą fotometryczną.

Ocena stężenia NKB oraz nesfatyny-1 w surowicy krwi

U każdej pacjentki w grupie badanej w I i II etapie badania (przed i po 6 miesiącach terapii estrogenno-progestagennej) oraz w grupie kontrolnej zostało wykonane oznaczenie stężenia NKB oraz nesfatyny-1 w surowicy krwi.

Ocena stężenia NKB oraz nesfatyny-1 w surowicy została wykonana metodą kompetycyjną ELISA. Studzienki reakcyjne znajdujące się na mikropłytkce zostały już wstępnie opłaszczane badaną substancją (odpowiedni NKB i nesfatyną-1) w określonej ilości. Metoda polega na dodaniu materiału badanego, a następnie przeciwciała skierowane przeciwko NKB i nefatynie-1 znakowanego biotyną. Na tym etapie podczas 45 min inkubacji w 37 stopniach C, zachodzi współzawodniczenie (kompetycja) ograniczonej ilości NKB i nesfatyny-1 zakotwiczonej na fazie stałej (dno studzienki) z NKB i nesfatyną-1, która znajduje się w materiale badanym o miejsce wiązania z przeciwciałem przeciw NKB i nesfatynie-1 związanym z biotyną. Następnie podczas płukania zostają usunięte niezwiązane z fazą stałą kompleksy NKB i nesfatyny-1 (z materiału badanego) + przeciwciało-biotyna. Po dodaniu streptawidyny

koniugowanej z enzymem (peroksydazą chrzanową) następuje inkubacja 30 min w 37 stopniach C. Dzięki wykorzystaniu bardzo swoistego i silnego powinowactwa streptawidyny i biotyny do istniejącego już kompleksu na fazie stałej zostaje dołączony koniugat (streptawidyna połączona z enzymem). Kolejne płukanie usuwa nadmiar niewykorzystanego koniugatu. Kolejnym krokiem jest dodanie bezbarwnego substratu dla enzymu, czyli Tetrametylobenzydyny (TMB). Ponownie inkubujemy ok. 10-20 min w 37 stopniach C. w tym czasie enzym rozkłada TMB tworząc produkt barwy niebieskiej. Po upływie tego czasu zatrzymujemy pracę enzymu dodając kwasu siarkowego. Nagłe zakwaszenie środowiska reakcji doprowadza do zmiany barwy powstałego produktu z niebieskiej na żółtą. Absorbancję mierzymy przy długości fali 450nm. Absorbancja jest odwrotnie proporcjonalna do stężenia badanej substancji.

Ocena gęstości mineralnej kości

U każdej pacjentki w grupie badanej w I i II etapie badania (po 6 miesiącach terapii estrogenno-progestagennej) oraz w grupie kontrolnej zostało wykonane badanie gęstości mineralnej kości metodą dwuenergetycznej absorpcjometrii rentgenowskiej (DXA) (aparat Lunar Prodigy Primo, General Electric, USA). DXA zostało wykonane z odcinka L1-L4 kręgosłupa lędźwiowego. Obliczono T-score (pacjentki ≥ 18 roku życia) oraz Z score (pacjentki < 18 roku życia), gdzie T-score określa stosunek gęstości mineralnej kości (BMD) osoby badanej do średniej gęstości kości zdrowej osoby w wieku 30 lat, a Z-score jest ilością odchyłeń standardowych BMD osoby badanej w populacji osób tej samej płci i w tym samym wieku (wykorzystywany u młodych pacjentek).

Interwencja lecznicza

U 55 pacjentek z FHA (grupa badana), włączonych do II etapu badania, w momencie diagnozy została włączona sekwencyjna hormonalna terapia estrogenno-progestagenna (2 mg 17- β -estradiolu + 10 mg dydrogesteronu) przez 6 miesięcy (pierwszoliniowa terapia zalecana przez Endocrine Society, według Charakterystyki Produktu Leczniczego zatwierdzona do leczenia na terenie Polski jako hormonalna terapia zastępcza (HTZ)).

Analiza statystyczna

Cechy badane (oznaczone i wyliczone) opisano jako wartość średnią i odchylenie standardowe, medianę oraz rozstęp kwartyłowy (wartości median oraz rozstępu kwartyłowego podawano ze względu na brak zgodności z rozkładem normalnym niektórych badanych parametrów). Zgodność z rozkładem normalnym została sprawdzona testem Shapiro-Wilka. Grupy porównywano za pomocą testu t-Studenta dla prób niezależnych (gdy w grupie występował rozkład zgodny z normalnym) lub testu nieparametrycznego Manna-

Whitney'a, gdy rozkład nie był zgodny z rozkładem naturalnym. Wartości przed leczeniem oraz po leczeniu w grupie badanej porównano wykorzystując test t-studenta dla prób zależnych (gdy w grupie występował rozkład zgodny z normalnym) lub test Wilcoxona (gdy rozkład nie był zgodny z rozkładem naturalnym). Zależność między parametrami badano wyznaczając współczynnik korelacji Pearsona (po potwierdzeniu zgodności z rozkładem normalnym) lub współczynnik korelacji nieparametrycznej Spearmana. $p \leq 0,05$ uznano za istotne statystycznie.

W analizie statystycznej wykonano również analizę krzywych ROC oraz porównanie krzywych ROC. Przeprowadzono również analizę wielowymiarową metodą regresji wielowymiarowej oraz dwoma metodami Data Miningu: analizą skupień metodą K-średnich oraz metodą drzew klasyfikacyjnych, określając jednocześnie wpływ kilku czynników na prawdopodobieństwo wystąpienia wtórnego braku miesiączki.

Obliczenia wykonano przy pomocy pakietu statystycznego oraz zestawu medycznego STATISTICA (*data analysis software system*), v. 13 (Dell Inc. (2016). Dell Statistica (*data analysis software system*), version 13), przy współpracy z Katedrą i Zakładem Informatyki i Statystyki Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

4. WYNIKI

4.1. Porównanie grupy badanej przed leczeniem z grupą kontrolną

4.1.1. Charakterystyka grupy badanej i kontrolnej

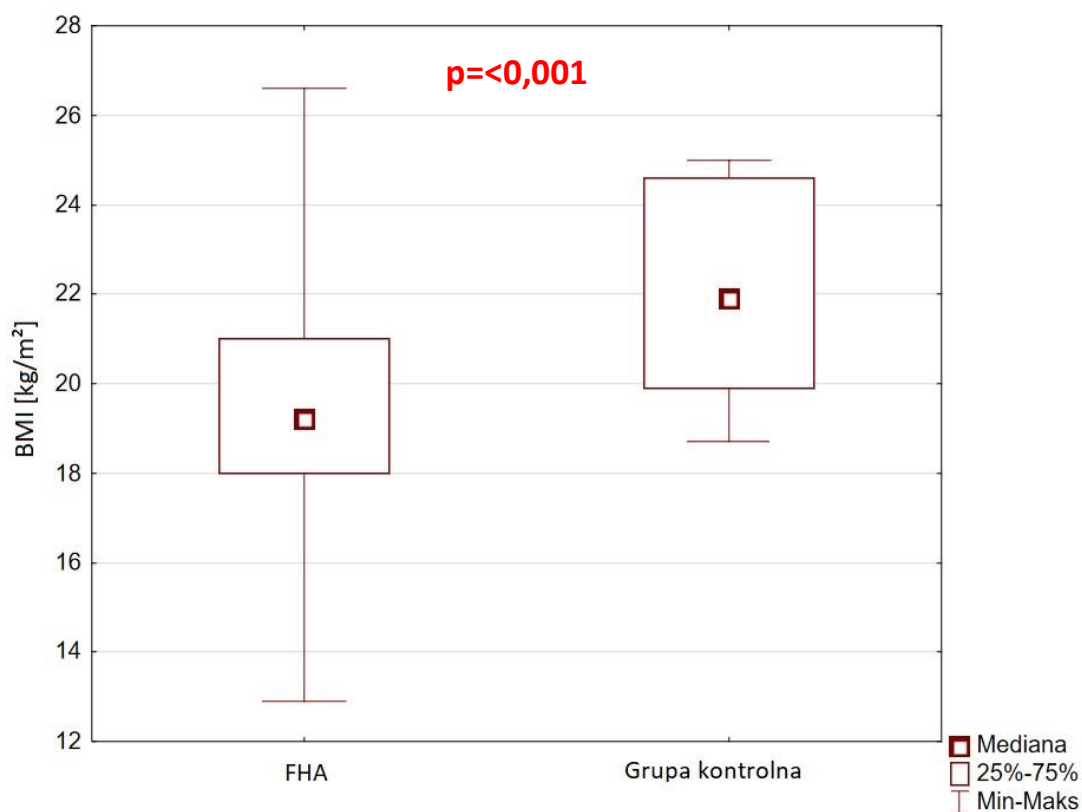
Do grupy badanej włączono 147 pacjentek spełniających kryteria rozpoznania FHA zgodnie z wytycznymi Endocrine Society² (mediana wieku pacjentek wynosiła 24 lata), podczas gdy do grupy kontrolnej włączono 88 zdrowych kobiet zgodnie z wyżej opisanymi kryteriami. Średni czas trwania braku miesiączki w grupie badanej wynosił 10,48 miesiąca, z medianą 6 miesięcy (Tabela IV).

Tabela IV. Porównanie danych antropometrycznych między grupą FHA a grupą kontrolną.

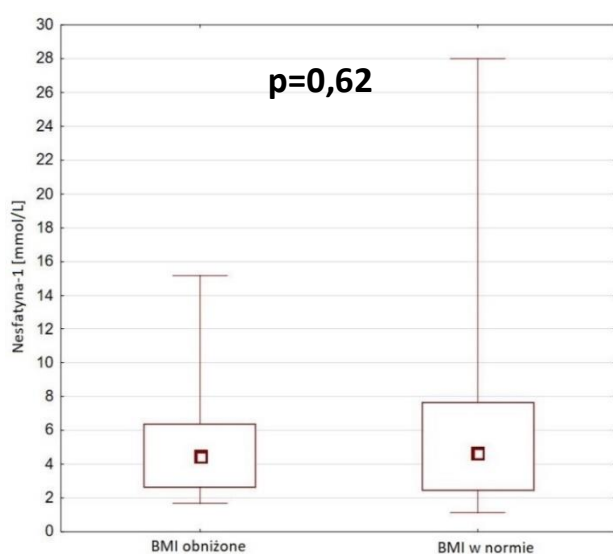
	FHA	Grupa kontrolna	Wartość p
	Średnia ± SD Mediana Górny i dolny kwartyl	Średnia ± SD Mediana Górny i dolny kwartyl	
Wiek [lata]	25,02±5,24 24,0 21,0-28,0	29,06±6,37 28,0 24,0-35,0	<0,001
Czas trwania wtórnego braku miesiączki [miesiące]	10,48±10,65 6,0 3,0-12,0	Nie dotyczy	Nie dotyczy
Wzrost [cm]	166,76±6,18 167,0 163,0-171,0	166,46±5,95 168,0 162,0-171,0	0,688
Masa ciała [kg]	55,24±9,1 54,0 49,0-61,0	62,21±11,61 60,5 55,0-67,5	<0,001
BMI [kg/m ²]	19,64±2,37 19,2 18,0-21,0	21,89±2,55 21,9 19,9-24,6	<0,001

$p \leq 0,05$ istotnie statystycznie; test t-Studenta dla prób niezależnych (gdy rozkład zgodny z normalnym) lub test Manna-Whitney'a (rozkład niezgodny z rozkładem naturalnym)

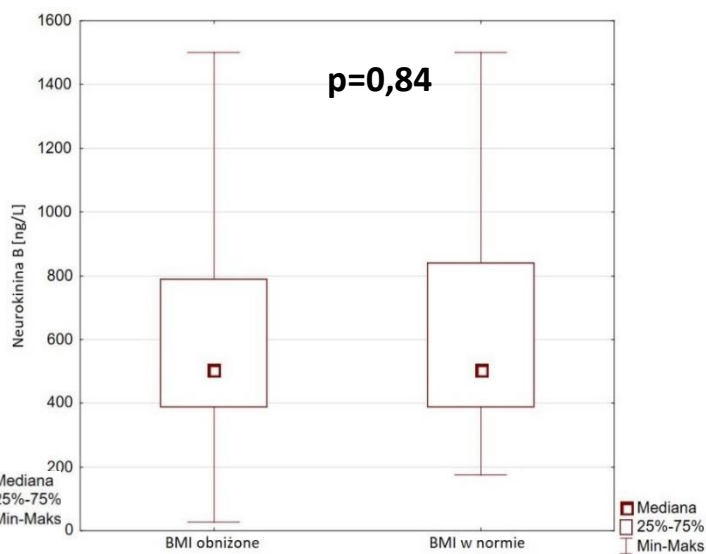
Grupa badana wykazała istotnie statystycznie niższe BMI oraz masę ciała w porównaniu do grupy kontrolnej (Rycina 6, Tabela IV). W grupie badanej 17 pacjentek wykazywało wychudzenie (12%), 43 pacjentki niedowagę (29%), natomiast 87 normalne BMI (59%). W grupie kontrolnej 4 pacjentki (4,5%) wykazywało cechy niedowagi, natomiast 84 pacjentki (95,5%) normalne BMI.



Rycina 6. Porównanie wskaźnika BMI między grupą badaną przed leczeniem a grupą kontrolną



Rycina 8. Porównanie stężenia nesfatyny-1 w surowicy krwi między grupami z prawidłowym i obniżonym BMI w grupie FHA



Rycina 7. Porównanie stężenia NKB w surowicy krwi między grupami z prawidłowym i obniżonym BMI w grupie FHA

Badając jedynie grupę FHA, nie wykazano istotnej statystycznie różnicy w stężeniu NKB i nesfatyny-1 w surowicy krwi między grupami z prawidłowym i obniżonym BMI. Średnie stężenie NKB w surowicy krwi w grupie z prawidłowym BMI wynosiło $650,72 \pm 343,88$ ng/L,

natomiast w grupie z obniżonym BMI $597,27 \pm 296,93$ ng/L ($p=0,84$)(Rycina 7). Analogicznie, średnie stężenie nesfatyny-1 w surowicy krwi w grupie z prawidłowym BMI wynosiło $5,96 \pm 4,04$ mmol/L, natomiast w grupie z obniżonym BMI $6,39 \pm 5,29$ mmol/L ($p= 0,62$)(Rycina 8). W grupie kontrolnej, analogicznie do grupy badanej, nie znaleziono istotnych statystycznie różnic w stężeniu NKB i nesfatyny-1 w surowicy krwi między grupami BMI.

4.1.2. Parametry hormonalne

Wykazano istotne statystycznie różnice w parametrach hormonalnych między grupą badaną i kontrolną (Tabela V). Grupa kontrolna wykazywała istotnie niższe stężenie estradiolu i LH w surowicy krwi (mediany w grupie badanej 1,78 mIU/mL oraz 16,94 pg/mL, w grupie kontrolnej odpowiednio 11,81 mIU/mL oraz 178,25 pg/mL)(Rycina 9,Rycina 10).

Tabela V. Porównanie stężeń FSH, LH, E2, testosteronu, PRL, DHEA-S, kortyzolu porannego, TSH i fT4 w surowicy krwi między grupą FHA a grupą kontrolną.

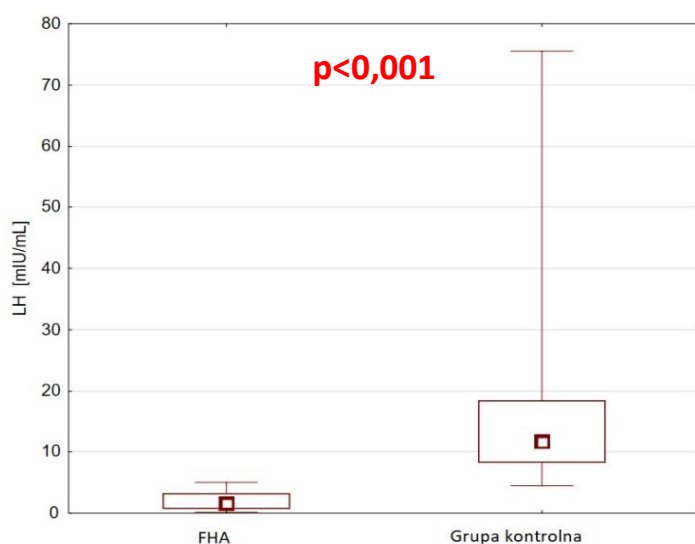
	FHA przed leczeniem	Grupa kontrolna	p
	Średnia±SD Mediana Górny i dolny kwartył	Średnia±SD Mediana Górny i dolny kwartył	
FSH [mIU/mL]	4,59±2,06 4,64 3,42-5,74	5,68±1,93 5,44 4,425-6,6	<0,001
LH [mIU/mL]	1,98±1,43 1,78 0,75-3,16	15,55±11,7 11,81 8,345-18,37	<0,001
E2 [pg/mL]	18,77±11,51 16,94 8,28-26,23	210,17±120,4 178,25 116,25-274,25	<0,001
PRL [ng/mL]	8,54±5,13 6,84 5,32-10,24	15,26±5,72 15,90 10,925-18,97	<0,001
Testosteron [ng/mL]	0,31±0,16 0,28 0,21-0,39	0,42±0,19 0,41 0,28-0,52	<0,001
DHEA-S [μmol/L]	7,24±2,8 7,09 5,28-8,9	7,55±3,1 7,20 4,94-9,28	0,604
Kortyzol 8.00 [nmol/L]	400,95±129,06 394,20 312,5-471,5	367,29±135,86 344,20 271,3-426,5	0,020
TSH [μIU/mL]	1,88±0,90 1,69 1,12-2,56	2,41±0,90 2,32 1,785-2,93	<0,001
fT4 [ng/dL]	1,12±0,17 1,10 1,0-1,21	1,29±0,16 1,27 1,18-1,37	<0,001

$p \leq 0,05$ istotne statystycznie; test t-Studenta dla prób niezależnych (gdy rozkład zgodny z normalnym) lub test Manna-Whitney'a (rozkład niezgodny z rozkładem naturalnym)

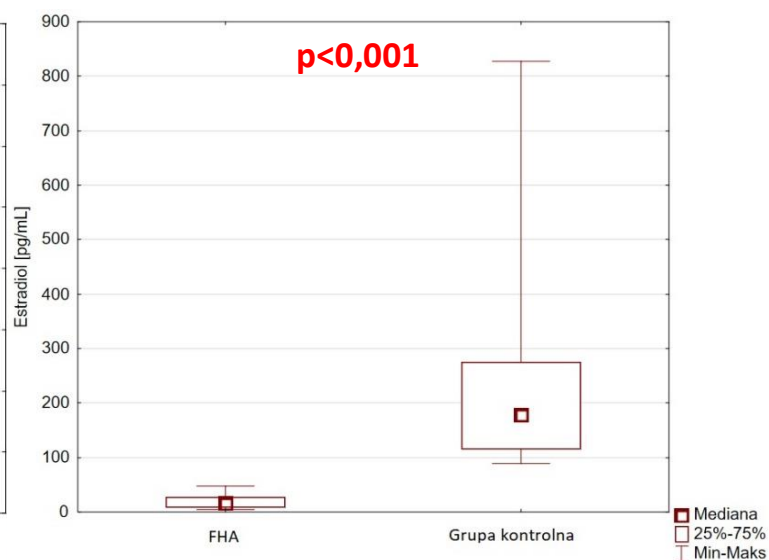
Ponadto wykazano istotnie statystycznie niższe stężenie FSH w surowicy krwi z medianą w grupie badanej wynoszącą 4,64 mIU/mL oraz 5,44 mIU/mL w grupie kontrolnej.

W grupie badanej zaobserwowano statystycznie istotnie niższe stężenia testosteronu w surowicy krwi (mediana w grupie badanej 0,28 ng/mL, natomiast w grupie kontrolnej 0,41 ng/mL). Zaobserwowano niższe średnie stężenia DHEA-S w surowicy krwi w grupie badanej, niemniej bez istotności statystycznej.

Podobną zależność stwierdzono dla stężeń TSH i fT4 w surowicy krwi, z niższymi wartościami w grupie badanej. Dla kolejnego analizowanego hormonu, PRL również odnotowano niższe stężenia w surowicy krwi w grupie FHA w stosunku do kobiet zdrowych (mediana w grupie FHA wynosiła 6,84 ng/mL, odpowiednio w grupie kontrolnej 15,90 ng/mL). Ponadto w grupie badanej stwierdzono statystycznie istotnie wyższe stężenie w surowicy krwi porannego kortyzolu (mediany odpowiednio 394,20 nmol/L oraz 344,20 nmol/L)



Rycina 9. Porównanie stężenia LH w surowicy krwi między grupą badaną przed leczeniem a grupą kontrolną



Rycina 10. Porównanie stężenia estradiolu w surowicy krwi między grupą badaną przed leczeniem a grupą kontrolną

4.1.3. Profil metaboliczny

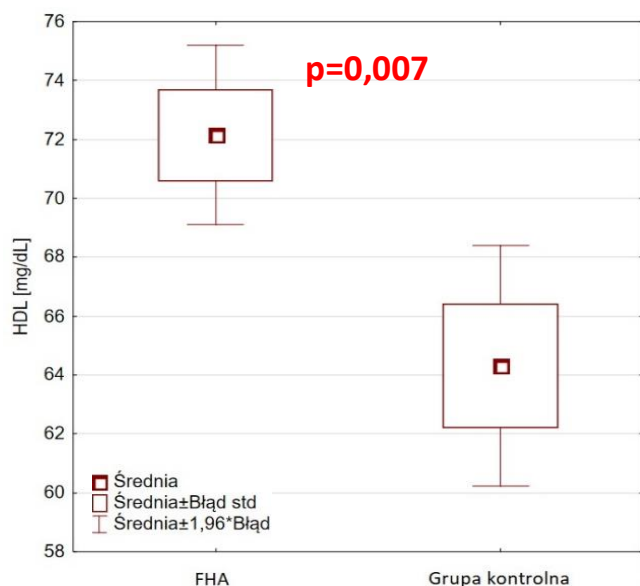
U pacjentek włączonych do badania przeanalizowano również parametry metaboliczne. Oceniono m.in. parametry gospodarki węglowodanowej: glukozę na czczo i insulinę na czczo w surowicy krwi oraz wyliczono wskaźnik HOMA-IR (Tabela VI). Wykazano istotnie statystycznie niższe stężenie insuliny w surowicy krwi w grupie badanej, co za tym idzie również istotnie statystycznie niższe wartości wskaźnika HOMA-IR (mediana 4,58 mU/mL oraz 0,89 dla grupy badanej, odpowiednio 6,85 mU/mL oraz 1,38 w grupie kontrolnej)(Rycina 14, Rycina 13). Nie zaobserwowano natomiast istotnej statystycznie różnicy w stężeniu glukozy w surowicy krwi między grupą FHA i grupą kontrolną.

Tabela VI. Porównanie stężeń glukozy, insuliny i frakcji lipidowych na czczo w surowicy krwi oraz wskaźnika HOMA-IR między grupą FHA a grupą kontrolną.

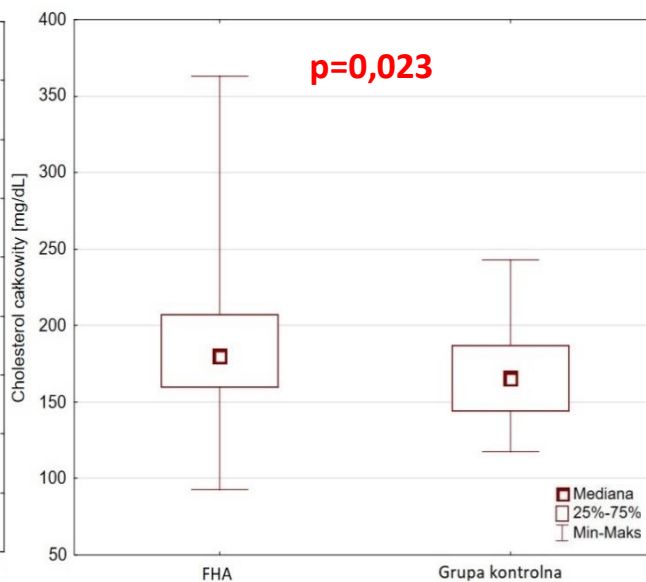
	FHA przed leczeniem	Grupa kontrolna	Wartość p
	Średnia ± SD Mediana Górny i dolny kwartyl	Średnia ± SD Mediana Górny i dolny kwartyl	
Insulina [mU/mL]	5,37±3,0 4,58 3,34-6,6	7,84±3,56 6,85 5,49-9,64	<0,001
Glukoza [mg/dl]	78,61±10,06 78,30 70,8-85,9	79,91±8,01 78,80 74,35-85,4	0,251
HOMA-IR	1,06±0,64 0,89 0,63-1,34	1,57±0,79 1,38 1,03-1,87	<0,001
Cholesterol całkowity [mg/dL]	183,84±44,66 180,40 159,7-207,3	167,33±32,34 165,85 144,4-187,0	0,023
Cholesterol HDL [mg/dL]	72,15±16,16 72,20 60,5-83,5	64,31±12,87 62,10 56,8-71,9	0,007
Cholesterol LDL [mg/dL]	98,23±34,43 97,50 77,5-116,6	103,79±33,95 98,20 74,1-123,9	0,537
Triglicerydy [mg/dL]	75,84±27,54 71,70 55,4-91,1	75,87±33,96 70,30 53,8-88,5	0,823

$p \leq 0,05$ istotne statystycznie; test t-Studenta dla prób niezależnych (gdy rozkład zgodny z normalnym) lub test Manna-Whitney'a (rozkład niezgodny z rozkładem naturalnym)

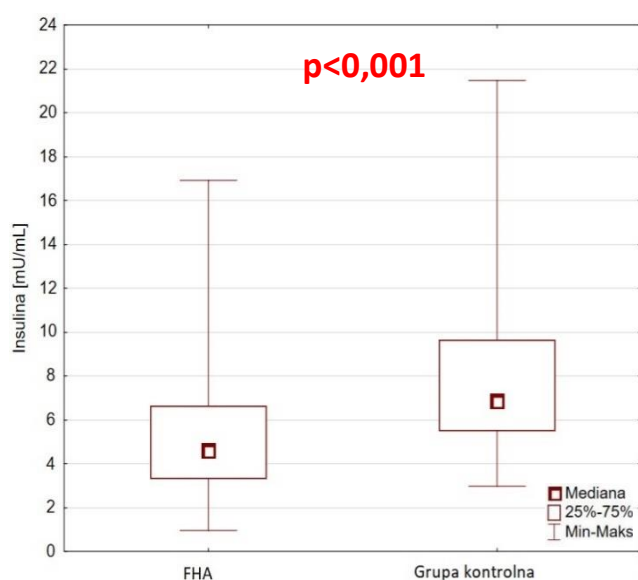
Zaobserwowano również istotne statystycznie różnice stężeniach poszczególnych frakcji lipidowych w surowicy krwi. Odnotowano istotne statystycznie różnice w stężeniu TCh, z statystycznie istotnie wyższymi stężeniami w grupie badanej (mediana odpowiednio 180,40 mg/dL oraz 165,85 mg/dL). Analogiczną różnicę zaobserwowano w zakresie stężenia frakcji HDL (mediany 72,20 mg/dL oraz 62,1 mg/dL)(Rycina 12). Nie wykazano natomiast różnic w stężeniach frakcji LDL oraz TG w surowicy krwi (Rycina 11) .



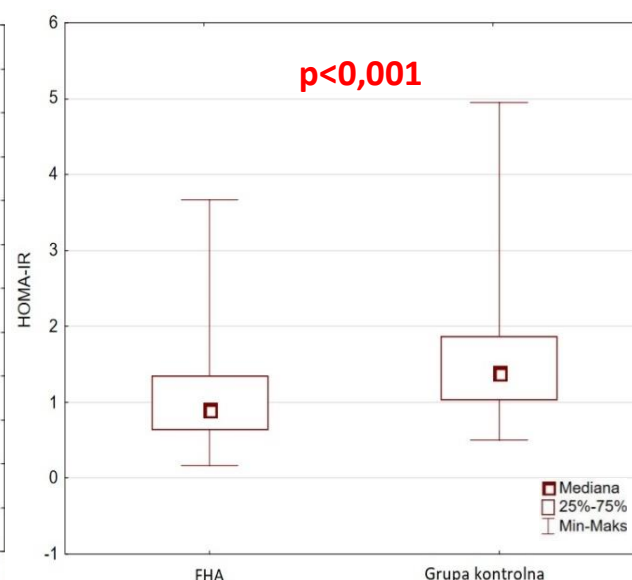
Rycina 12. Porównanie stężenia HDL w surowicy krwi między grupą badaną przed leczeniem a grupą kontrolną



Rycina 11. Porównanie stężenia TCh w surowicy krwi między grupą badaną przed leczeniem a grupą kontrolną



Rycina 14. Porównanie stężenia insuliny w surowicy krwi między grupą badaną przed leczeniem a grupą kontrolną



Rycina 13. Porównanie wartości wskaźnika HOMA-IR między grupą badaną przed leczeniem a grupą kontrolną

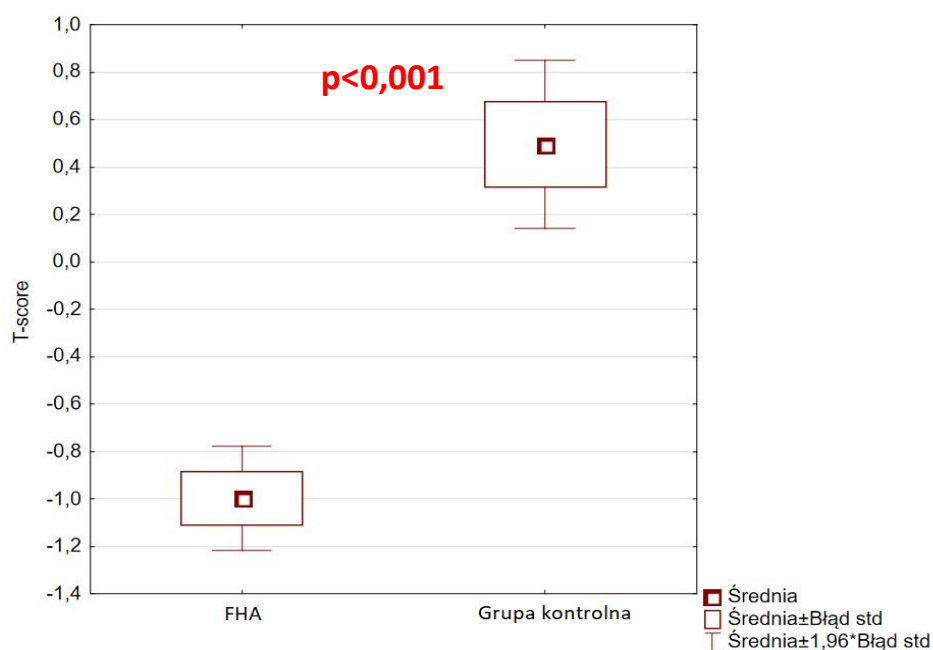
4.1.4. Metabolizm tkanki kostnej

W badaniu oceniono również parametry BMD i porównano je z wynikami w grupie kontrolnej. Zaobserwowano statystycznie istotnie niższe wartości BMD, T-score i Z-score w grupie FHA w porównaniu do grupy kontrolnej (mediana BMD odpowiednio 1,06 g/cm² oraz 1,22 g/cm², średnie T-score i Z-score odpowiednio -0,99 oraz -0,99 w grupie badanej i 0,49 oraz 0,49 w grupie kontrolnej)(Tabela VII, Rycina 15)

Tabela VII. Porównanie BMD, T-score i Z-score między grupą FHA a grupą kontrolną

	FHA przed leczeniem	Grupa kontrolna	Wartość p
	Średnia±SD Mediana Górny i dolny kwartył	Średnia±SD Mediana Górny i dolny kwartył	
BMD [g/cm ²]	1,04±0,22 1,06 0,97-1,15	1,27±0,32 1,22 1,09-1,3	<0,001
T-score	-0,99±1,05 -0,9 -1,6 - [-0,2]	0,49±0,82 0,5 0,1 - [- 1]	<0,001
Z-score	-0,99±1,01 -0,7 -1,4 - [-0,02]	0,49±0,95 0,65 -0,4 - 1,1	<0,001

$p \leq 0,05$ istotne statystycznie; test t-Studenta dla prób niezależnych (gdy rozkład zgodny z normalnym) lub test Manna-Whitney'a (rozkład niezgodny z rozkładem naturalnym)



Rycina 15. Porównanie wskaźnika T-score między grupą badaną przed leczeniem a grupą kontrolną

4.1.5. Stężenie NKB i nesfatyny-1 w surowicy krwi

Analiza stężeń NKB oraz nesfatyny-1 w surowicy krwi w grupie FHA oraz w grupie kontrolnej wykazała statystycznie istotnie niższe stężenia NKB oraz nesfatyny-1 w surowicy krwi w grupie FHA.

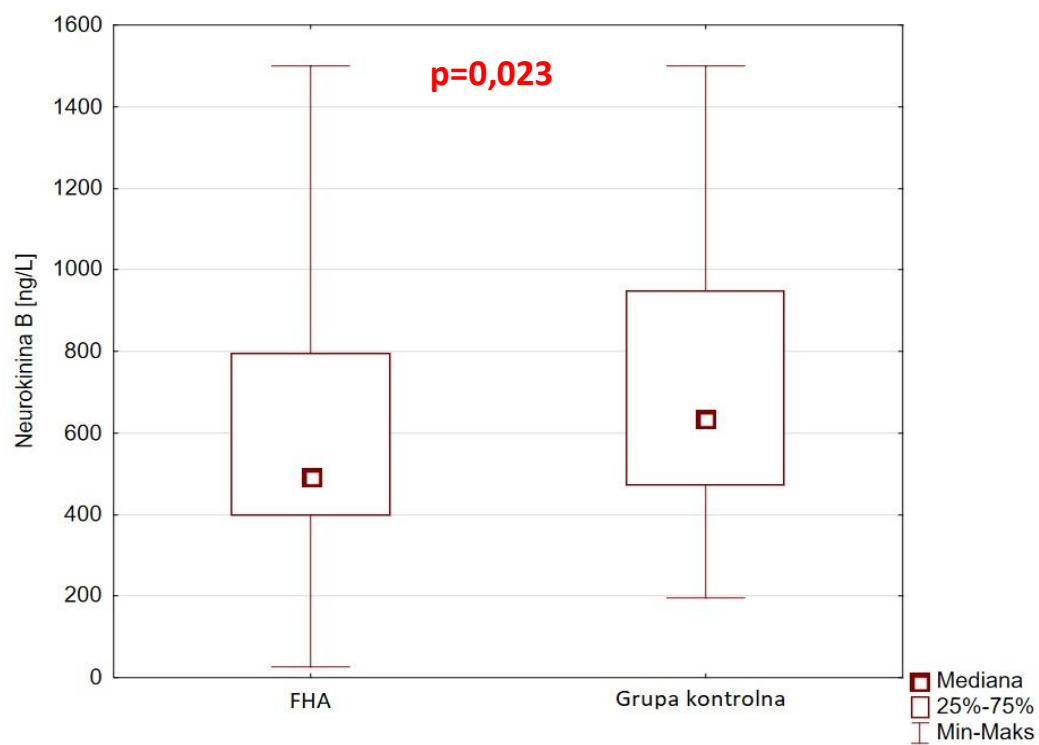
Mediana stężeń nesfatyny-1 w surowicy krwi w grupie FHA wynosiła 4,64 mmol/L, natomiast w grupie kontrolnej 6,91 mmol/L ($p=0,005$)(Tabela VIII, Rycina 16).

Jednocześnie zaobserwowano statystycznie istotnie niższe stężenie NKB w surowicy krwi w grupie FHA w porównaniu do grupy kontrolnej. Mediana stężenia NKB w surowicy krwi wynosiła odpowiednio 494,11 ng/L w grupie FHA oraz 636,07 ng/L w grupie kontrolnej (Rycina 17).

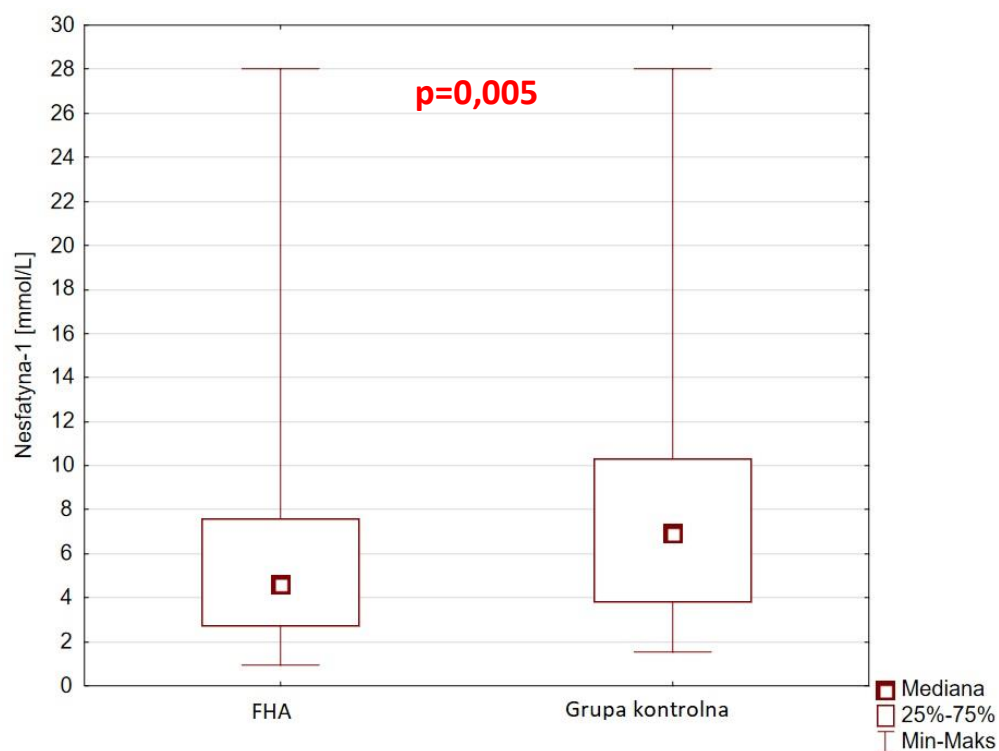
Tabela VIII. Porównanie stężenia nesfatyny-1 oraz NKB w surowicy krwi między grupą FHA a grupą kontrolną.

	FHA przed leczeniem	Grupa kontrolna	Wartość p
	Średnia±SD Mediana Górny i dolny kwartyl	Średnia±SD Mediana Górny i dolny kwartyl	
Nesfatyna-1 [mmol/L]	6,21±4,79 4,64 2,72-7,57	8,64±6,63 6,91 3,80-10,32	0,005
NKB [ng/L]	628,35±324,92 494,11 399,07-795,13	721,41±337,57 636,07 471,84-947,18	0,023

$p \leq 0,05$ istotne statystycznie; test t-Studenta dla prób niezależnych (gdy rozkład zgodny z normalnym) lub test Manna-Whitney'a (rozkład niezgodny z rozkładem naturalnym)



Rycina 17. Porównanie stężenia NKB w surowicy krwi między grupą badaną przed leczeniem a grupą kontrolną



Rycina 16. Porównanie stężenia nesfatyny-1 w surowicy krwi między grupą badaną przed leczeniem a grupą kontrolną

4.2. Wyniki pacjentek chorujących na FHA po leczeniu

4.2.1. Parametry hormonalne

W badaniu przeanalizowano wyniki badań hormonalnych, parametry metaboliczne, BMD oraz stężenie NKB i nesfatyny-1 po leczeniu u pacjentek z FHA. Ponadto otrzymane wyniki porównano z grupą kontrolną celem sprawdzenia, czy po leczeniu oceniane parametry w grupie badanej różnią się statystycznie istotnie od grupy kontrolnej.

Zaobserwowano, że po 6 miesiącach leczenia sekwencyjną doustną hormonalną terapią estrogenno-progestagenną (2 mg 17- β -estradiolu + 10 mg dydrogesteronu) doszło do istotnego statystycznie wzrostu stężenia E2 w surowicy krwi (mediana przed leczeniem 16,94 pg/mL, po leczeniu 57,72 pg/mL), analogiczną zmianę zaobserwowano w przypadku stężenia PRL w surowicy krwi (Rycina 18).

Co bardzo istotne, nie zaobserwowano zmiany stężenia LH w surowicy krwi (mediana przed leczeniem 1,78 mIU/mL, po leczeniu 1,63 mIU/mL), podczas gdy zaobserwowano istotny statystycznie spadek stężenia FSH w surowicy krwi (mediana przed leczeniem 4,64 mIU/mL, mediana po leczeniu 3,83 mIU/mL)(Tabela IX, Rycina 18).

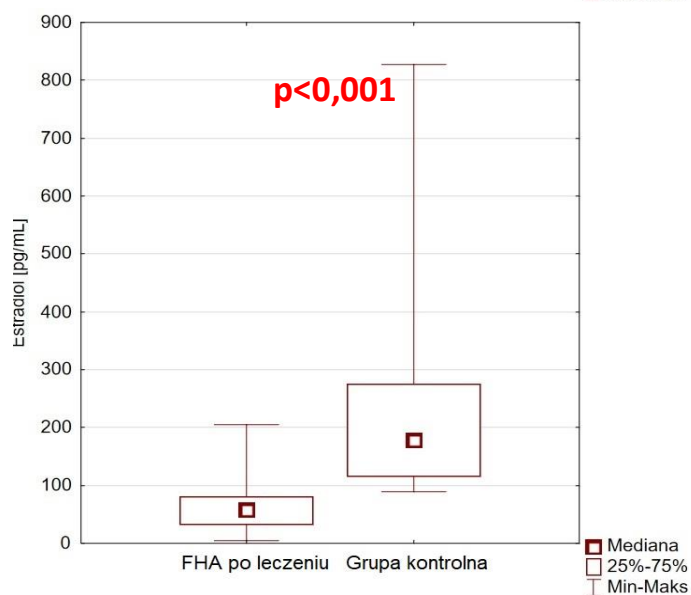
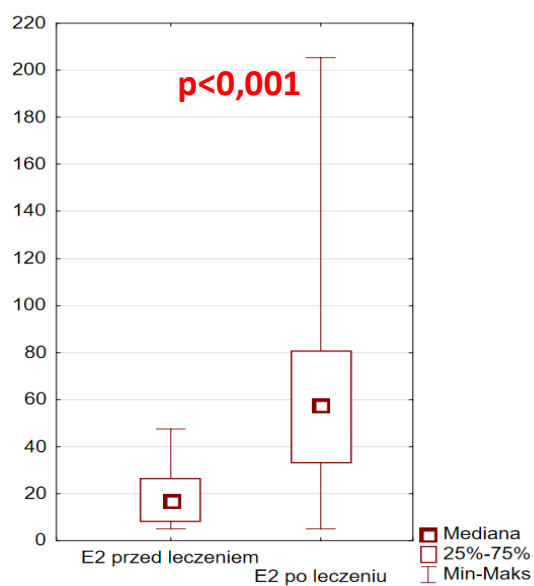
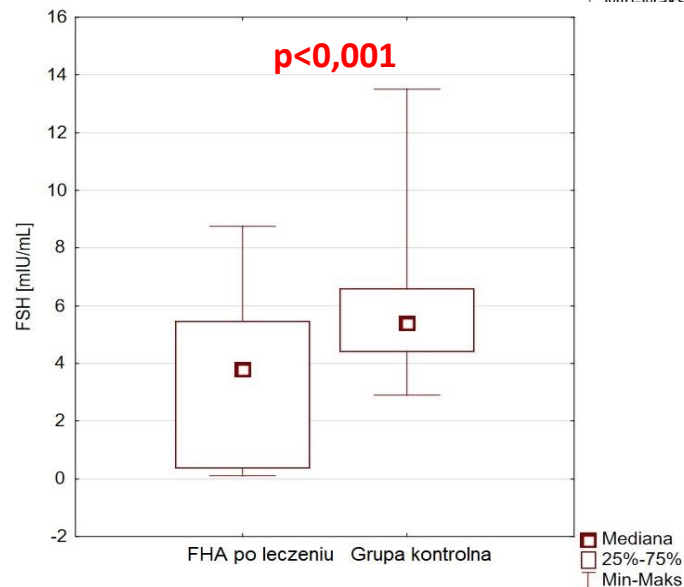
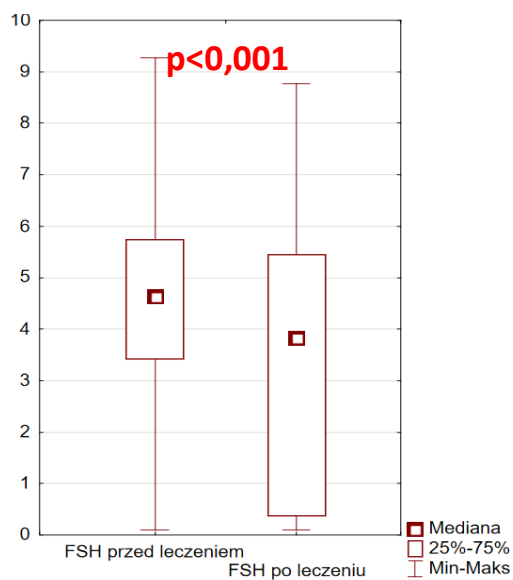
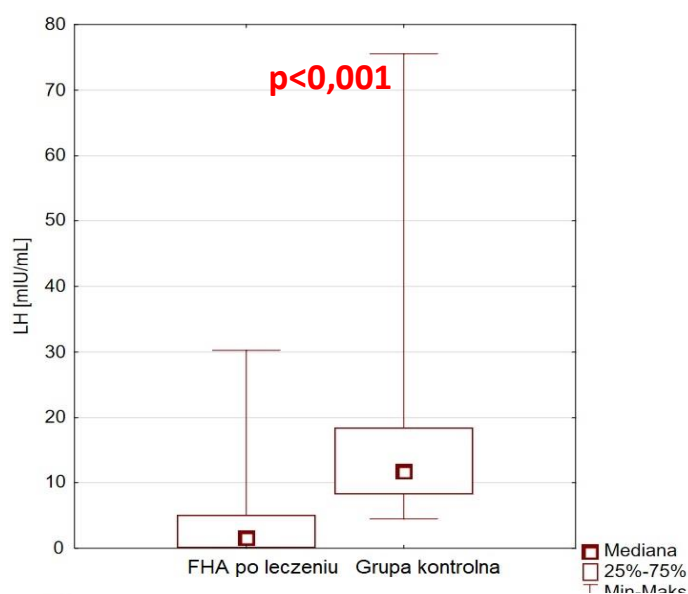
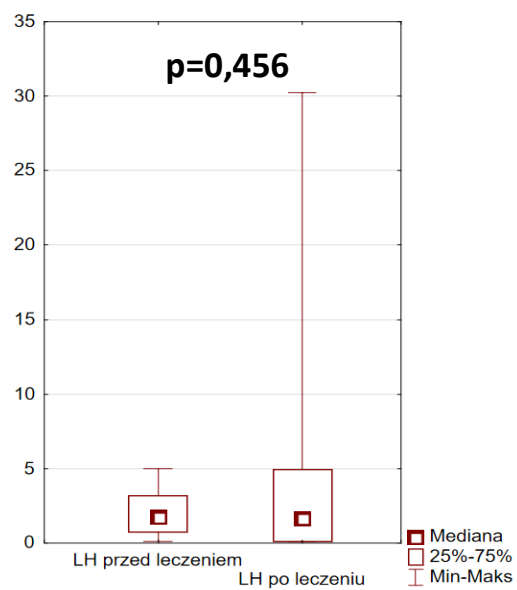
Tabela IX. Stężenia FSH, LH, E2 oraz PRL w surowicy krwi w grupie badanej po leczeniu w porównaniu do stanu przed leczeniem (p1) oraz w porównaniu do grupy kontrolnej (p2).

	FHA przed leczeniem	FHA po leczeniu		Grupa kontrolna	
	Średnia $\pm$ SD Mediana Górny i dolny kwartył	Średnia $\pm$ SD Mediana Górny i dolny kwartył	p1	Średnia $\pm$ SD Mediana Górny i dolny kwartył	p2
FSH [mIU/mL]	4,59 $\pm$ 2,06 4,64 3,42-5,74	3,31 $\pm$ 2,63 3,83 0,38-5,45	<0,001	5,68 $\pm$ 1,93 5,44 4,43-6,60	<0,001
LH [mIU/mL]	1,98 $\pm$ 1,43 1,78 0,75-3,16	3,23 $\pm$ 5,01 1,63 0,1-4,96	0,456	15,55 $\pm$ 11,7 11,81 8,345-18,37	<0,001
E2 [pg/mL]	18,77 $\pm$ 11,51 16,94 8,28-26,23	62,45 $\pm$ 40,62 57,72 33,17-80,5	<0,001	210,17 $\pm$ 120,4 178,25 116,25-274,25	<0,001
PRL [ng/mL]	8,54 $\pm$ 5,13 6,84 5,32-10,24	10,12 $\pm$ 7,04 7,66 5,04-12,46	0,005	15,26 $\pm$ 5,72 15,90 10,93-18,97	<0,001

$p \leq 0,05$ istotne statystycznie;

p1: porównanie grupy badanej przed i po leczeniu; test t-studenta dla prób zależnych (rozkład zgodny z normalnym) lub test Wilcoxa (rozkład niezgodny z rozkładem naturalnym);

p2: porównanie grupy badanej po leczeniu z grupą kontrolną; test t-Studenta dla prób niezależnych (gdy rozkład zgodny z normalnym) lub test Manna-Whitney'a (rozkład niezgodny z rozkładem naturalnym);



Rycina 18. Stężenia FSH, LH, E2 oraz PRL w surowicy krwi w grupie badanej po leczeniu w porównaniu do stanu przed leczeniem oraz w porównaniu do grupy kontrolnej

Jednocześnie zarówno stężenie FSH, jak i LH, E2 oraz PRL w surowicy krwi pozostało statystycznie istotnie niższe po leczeniu w porównaniu do grupy kontrolnej, analogiczne do wyników sprzed leczenia.

Badania pacjentek z grupy FHA po leczeniu wykazały istotny statystycznie spadek stężenia DHEA-S w surowicy krwi (mediana przed leczeniem 7,09 $\mu\text{mol/L}$ oraz 5,86 $\mu\text{mol/L}$ po leczeniu) oraz istotny statystycznie wzrost stężenia kortyzolu porannego w surowicy krwi (mediana przed leczeniem 394,20 nmol/L, po leczeniu 457,05 nmol/L)(Tabela X). Nie zaobserwowano natomiast istotnej statystycznie zmiany stężenia testosteronu w surowicy krwi po leczeniu pacjentek z FHA.

Tabela X. Stężenia testosteronu, DHEA-S, kortyzolu oraz TSH i fT4 w surowicy krwi w grupie badanej po leczeniu w porównaniu do stanu przed leczeniem (p1) oraz w porównaniu do grupy kontrolnej (p2).

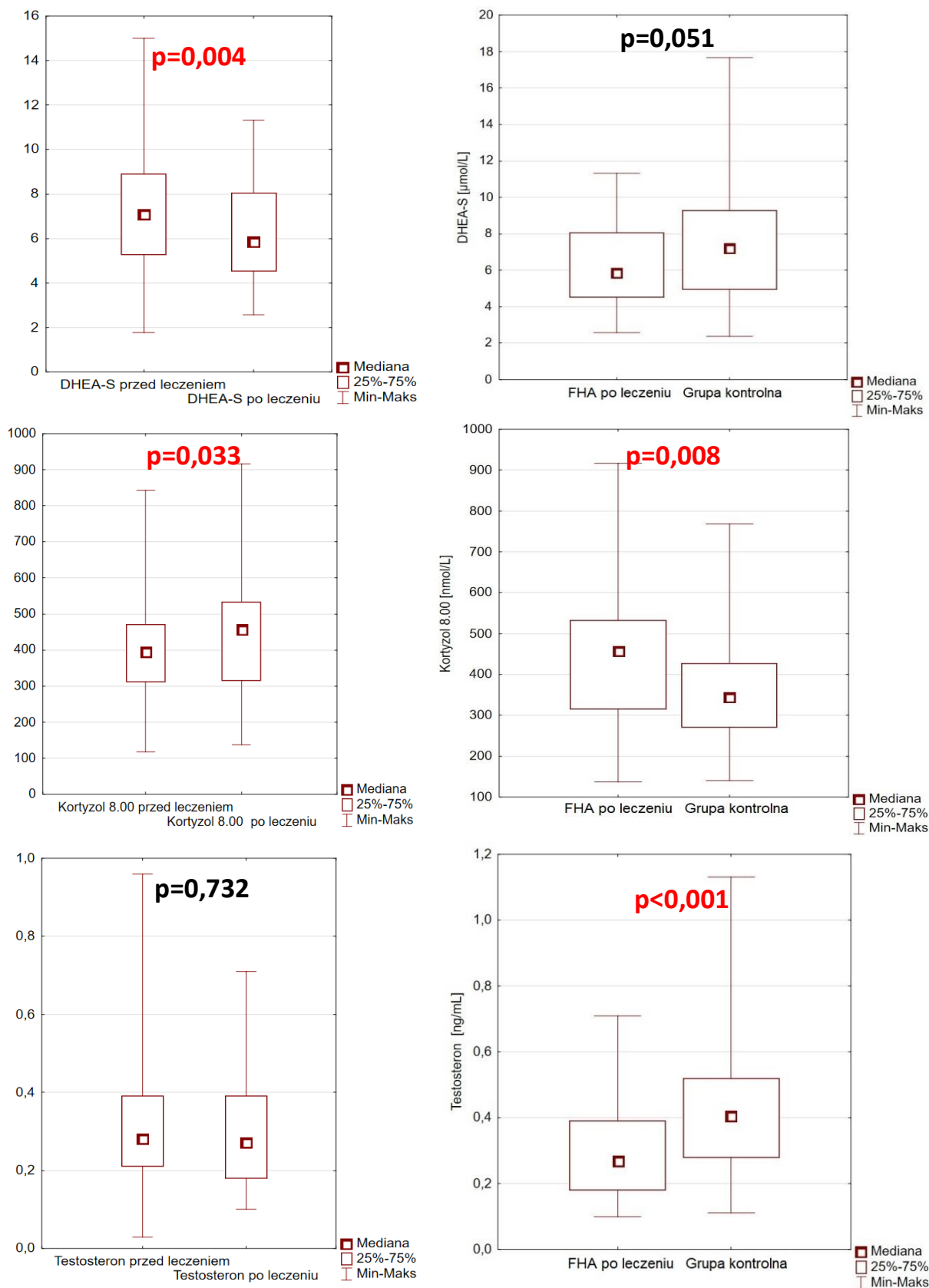
	FHA przed leczeniem	FHA po leczeniu		Grupa kontrolna	
	Średnia $\pm$ SD Mediana Górny i dolny kwartył	Średnia $\pm$ SD Mediana Górny i dolny kwartył	p1	Średnia $\pm$ SD Mediana Górny i dolny kwartył	p2
Testosteron [ng/mL]	0,31 $\pm$ 0,16 0,28 0,21-0,39	0,30 $\pm$ 0,14 0,27 0,18-0,39	0,732	0,42 $\pm$ 0,19 0,41 0,28-0,52	<0,001
DHEA-S [$\mu\text{mol/L}$]	7,24 $\pm$ 2,8 7,09 5,28-8,9	6,45 $\pm$ 2,36 5,86 4,53-8,05	0,004	7,55 $\pm$ 3,1 7,20 4,94-9,28	0,051
Kortyzol 8.00 [nmol/L]	400,95 $\pm$ 129,06 394,20 312,50-471,50	439,47 $\pm$ 163,45 457,05 316,00-532,90	0,033	367,29 $\pm$ 135,86 344,20 271,30-426,50	0,008
TSH [$\mu\text{IU/mL}$]	1,88 $\pm$ 0,90 1,69 1,12-2,56	2,06 $\pm$ 1,06 1,88 1,32-2,49	0,015	2,41 $\pm$ 0,90 2,32 1,79-2,93	0,013
fT4 [ng/dL]	1,12 $\pm$ 0,17 1,10 1,00-1,21	1,099 $\pm$ 0,17 1,08 0,99-1,20	0,626	1,29 $\pm$ 0,16 1,27 1,18-1,37	<0,001

$p \leq 0,05$ istotne statystycznie;

p1: porównanie grupy badanej przed i po leczeniu; test t-studenta dla prób zależnych (rozkład zgodny z normalnym) lub test Wilcoxona (rozkład niezgodny z rozkładem naturalnym);

p2: porównanie grupy badanej po leczeniu z grupą kontrolną; test t-Studenta dla prób niezależnych (gdy rozkład zgodny z normalnym) lub test Manna-Whitney'a (rozkład niezgodny z rozkładem naturalnym);

Analogicznie do stężeń FSH, LH, E2 oraz PRL, stężenia testosteronu, TSH i fT4 w surowicy krwi pozostały istotnie statystycznie niższe po leczeniu w porównaniu do grupy kontrolnej, analogiczne do wyników sprzed leczenia (Rycina 19). Stężenie kortyzolu w surowicy krwi natomiast pozostało statystycznie istotnie wyższe, podobnie jak przed leczeniem, stężenie DHEA-S w surowicy krwi po leczeniu nie różniło się natomiast statystycznie istotnie od stężenia w grupie kontrolnej (podobnie jak przed leczeniem)



Rycina 19. Stężenia testosteronu, DHEA-S oraz kortyzolu w surowicy krwi w grupie badanej po leczeniu w porównaniu do stanu przed leczeniem oraz w porównaniu do grupy kontrolnej

4.2.2. Profil metaboliczny

W przypadku parametrów metabolicznych zaobserwowano, iż w grupie FHA po leczeniu stężenie insuliny w surowicy krwi statystycznie istotnie podwyższyło się w porównaniu do stanu sprzed leczenia (mediana przed leczeniem 4,58 mU/mL, mediana po leczeniu 4,70 mU/mL). Analogiczne zmiany zaobserwowano w przypadku HOMA-IR (mediana przed leczeniem 0,89, mediana po leczeniu 0,9). Stężenie glukozy w surowicy krwi natomiast nie uległo istotnej statystycznie zmianie po leczeniu (mediana przed leczeniem 76,3 mg/dL, po leczeniu 77,7 mg/dL)(Tabela XI, Rycina 20).

Tabela XI. Stężenie insuliny oraz glukozy na czczo w surowicy krwi z wyliczeniem wskaźnika HOMA-IR w grupie badanej po leczeniu w porównaniu do stanu przed leczeniem (p1) oraz w porównaniu do grupy kontrolnej (p2).

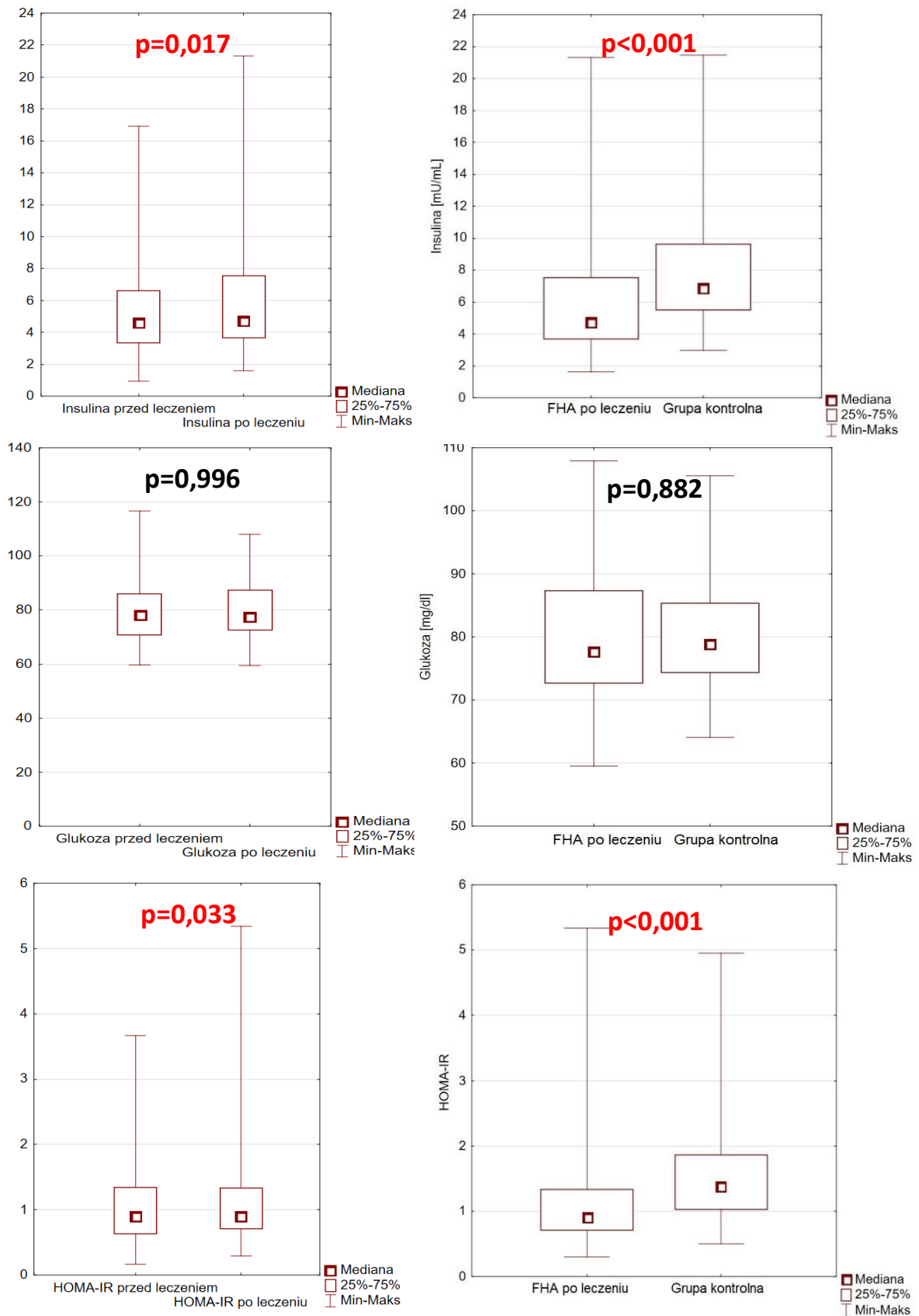
	FHA przed leczeniem	FHA po leczeniu		Grupa kontrolna	
	Średnia ± SD Mediana Górny i dolny kwartyl	Średnia ± SD Mediana Górny i dolny kwartyl	p1	Średnia ± SD Mediana Górny i dolny kwartyl	p2
Insulina [mU/mL]	5,37±3,0 4,58 3,34-6,6	5,72±3,21 4,70 3,67-7,54	0,017	7,84±3,56 6,85 5,49-9,64	<0,001
Glukoza [mg/dl]	78,61±10,06 78,30 70,8-85,9	79,70±9,67 77,70 72,7-87,3	0,996	79,90±8,00 78,80 74,35-85,4	0,882
HOMA-IR	1,06±0,64 0,89 0,63-1,34	1,15±1,52 0,90 0,71-1,33	0,033	1,57±0,79 1,38 1,03-1,87	<0,001

$p \leq 0,05$ istotne statystycznie;

p1: porównanie grupy badanej przed i po leczeniu; test t-studenta dla prób zależnych (rozkład zgodny z normalnym) lub test Wilcozona (rozkład niezgodny z rozkładem naturalnym);

p2: porównanie grupy badanej po leczeniu z grupą kontrolną; test t-Studenta dla prób niezależnych (gdy rozkład zgodny z normalnym) lub test Manna-Whitney'a (rozkład niezgodny z rozkładem naturalnym);

Pomimo istotnego statystycznie wzrostu stężenia insuliny w surowicy krwi oraz wskaźnika HOMA-IR nie zaobserwowano zmian w różnicach pomiędzy grupą FHA po leczeniu a grupą kontrolną. Analogicznie do stanu sprzed leczenia zaobserwowano istotnie statystycznie niższe stężenie insuliny w surowicy krwi (mediana w grupie badanej po leczeniu 4,70 mU/mL, w grupie kontrolnej 6,85 mU/mL), co implikuje podobną sytuację w przypadku HOMA-IR. Stężenie glukozy w surowicy krwi po leczeniu w grupie kontrolnej natomiast pozostało bez istotnej statystycznie różnicy względem grupy kontrolnej, analogicznie jak przed leczeniem (Tabela XI, Rycina 20).



Rycina 20. Stężenia insuliny oraz glukozy w surowicy krwi na czczo i wartość wskaźnika HOMA-IR w grupie badanej po leczeniu w porównaniu do stanu przed leczeniem oraz w porównaniu do grupy kontrolnej

W grupie FHA po leczeniu wykazano istotnie statystycznie wyższe BMI niż w grupie chorej przed leczeniem (mediana BMI przed leczeniem 19,2 kg/m², po leczeniu 20,0 kg/m²). Nie zaobserwowano natomiast istotnych statystycznie zmian stężeń frakcji lipidowych, zarówno cholesterolu całkowitego jak i frakcji HDL, LDL oraz TG.

Tabela XII. Stężenie TCh, HDL, LDL oraz TG i wskaźnik BMI w grupie badanej po leczeniu w porównaniu do stanu przed leczeniem (p1) oraz w porównaniu do grupy kontrolnej (p2).

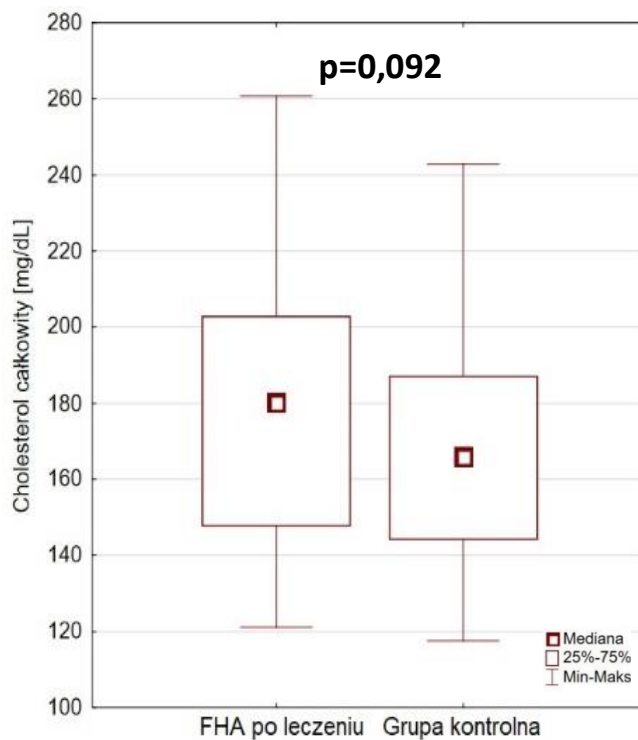
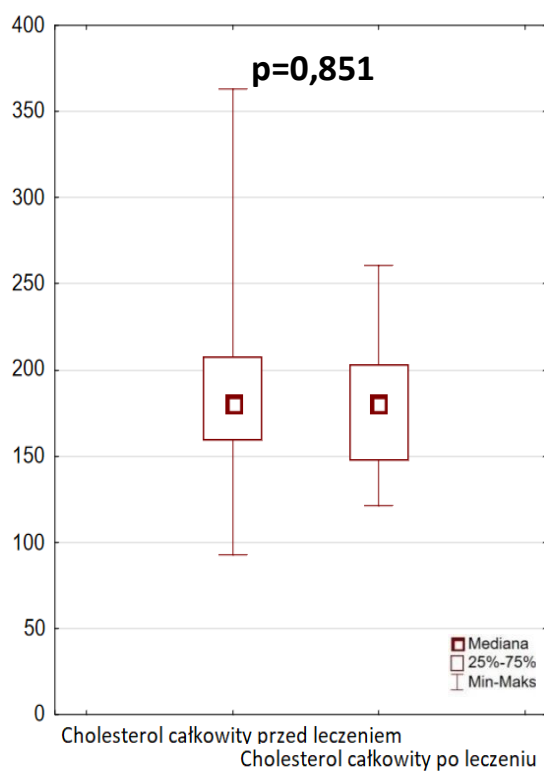
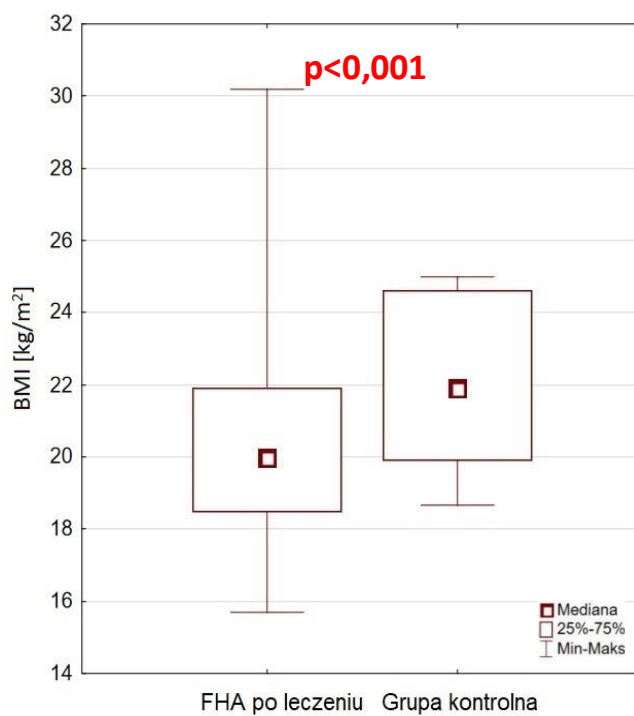
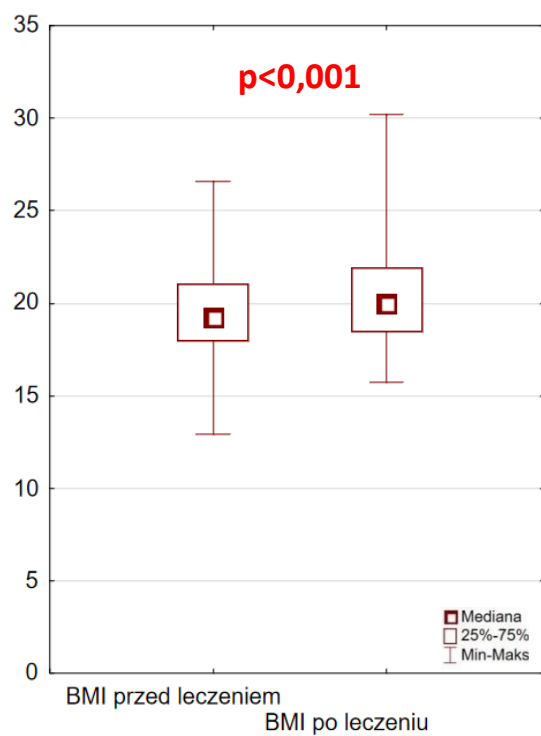
	FHA przed leczeniem	FHA po leczeniu		Grupa kontrolna	
	Średnia ± SD Mediana Górny i dolny kwartyl	Średnia ± SD Mediana Górny i dolny kwartyl	p1	Średnia ± SD Mediana Górny i dolny kwartyl	p2
BMI [kg/m ²]	19,64±2,37 19,2 18,0-21,0	20,47±2,93 20,0 18,5-21,9	<0,001	21,89±2,55 21,9 19,9-24,6	<0,001
Cholesterol całkowity [mg/dL]	183,84±44,66 180,40 159,7-207,3	180,58±33,26 180,20 147,9-202,8	0,851	167,33±32,34 165,85 144,4-187	0,092
Cholesterol HDL [mg/dL]	72,15±16,16 72,20 60,5-83,5	74,87±16,52 70,70 60,9-86	0,561	64,31±12,87 62,10 56,8-71,9	0,002
Cholesterol LDL [mg/dL]	98,23±34,43 97,50 77,5-116,6	90,52±23,51 92,00 73,9-106,4	0,789	103,79±33,95 98,20 74,1-123,9	0,153
Triglicerydy [mg/dL]	75,84±27,54 71,70 55,4-91,1	84,88±34,40 76,20 59,2-107,4	0,279	75,87±33,96 70,30 53,8-88,5	0,262

$p \leq 0,05$ istotne statystycznie;

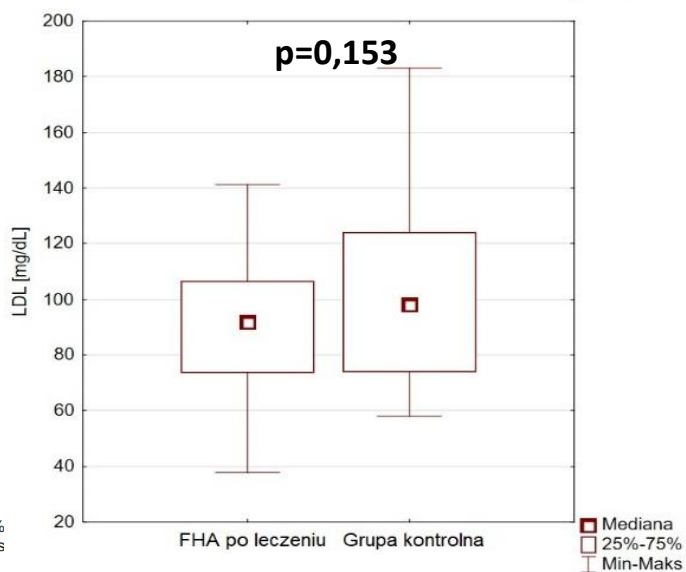
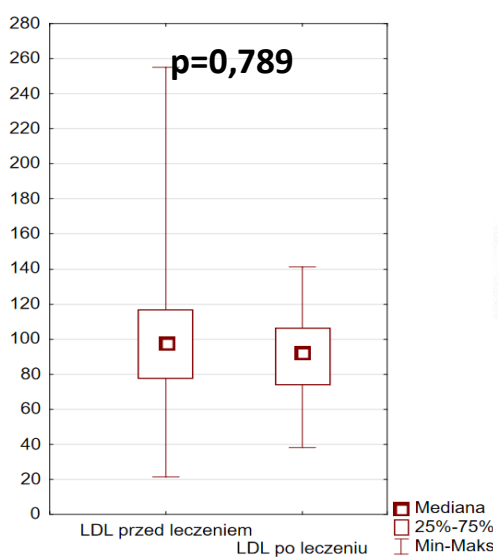
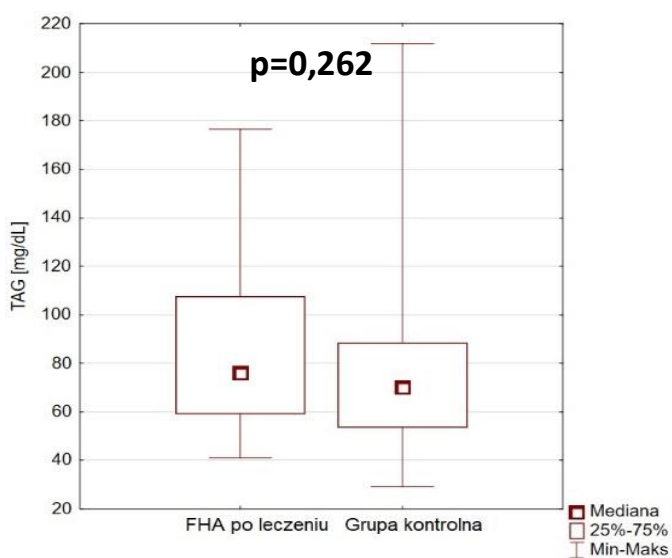
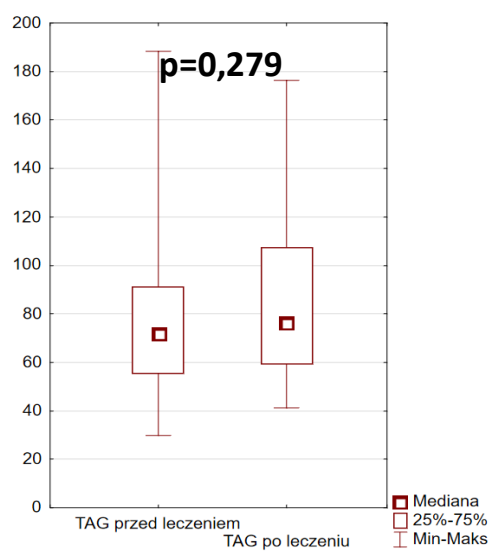
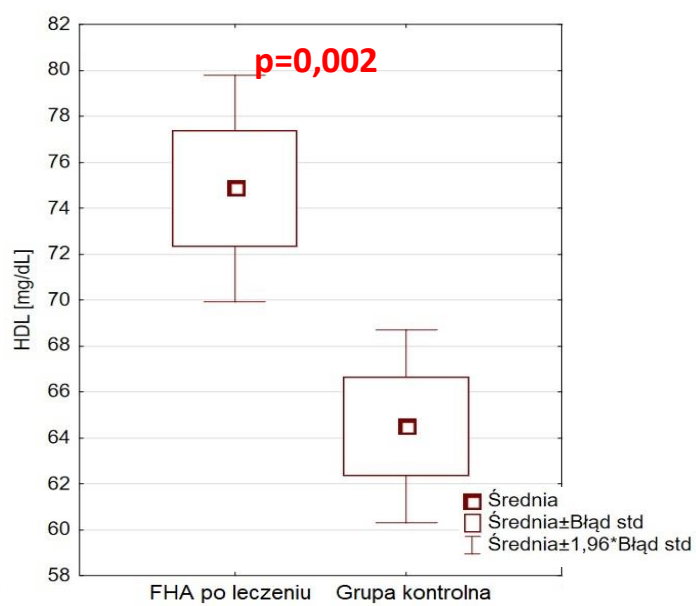
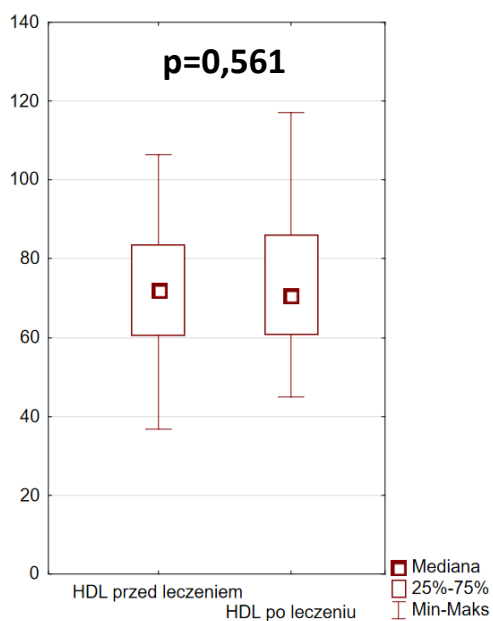
p1: porównanie grupy badanej przed i po leczeniu; test t-studenta dla prób zależnych (rozkład zgodny z normalnym) lub test Wilcoxona (rozkład niezgodny z rozkładem naturalnym);

p2: porównanie grupy badanej po leczeniu z grupą kontrolną; test t-Studenta dla prób niezależnych (gdy rozkład zgodny z normalnym) lub test Manna-Whitney'a (rozkład niezgodny z rozkładem naturalnym);

Stwierdzono, że po leczeniu BMI w grupie badanej pozostaje nadal istotnie statystycznie niższe niż w grupie kontrolnej (mediana w grupie badanej po leczeniu 20,0 kg/m², natomiast w grupie kontrolnej 21,9 kg/m²)(Tabela XII, Rycina 21). Jednocześnie po leczeniu nie wykazano istotnej statystycznie różnicy w stężeniu TCh między grupą FHA po leczeniu a grupą kontrolną (Rycina 21). Obserwowano natomiast różnicę w stężeniu TCh między grupą badaną przed leczeniem a grupą kontrolną, co wskazuje na normalizację TCh po leczeniu. Stężenie HDL po leczeniu nadal pozostawało statystycznie istotnie wyższe w grupie badanej (mediany odpowiednio 70,70 mg/dL oraz 62,10 mg/dL)(Tabela XII, Rycina 22). Podobnie jak przy porównaniu grupy FHA przed leczeniem z grupą kontrolną, stężenie LDL oraz TG nie różniło się istotnie statystycznie między grupą badaną po leczeniu a grupą kontrolną (Tabela XII, Rycina 22).



Rycina 21. Stężenie cholesterolu całkowitego oraz wskaźnika BMI w grupie badanej po leczeniu w porównaniu do stanu przed leczeniem oraz w porównaniu do grupy kontrolnej



Rycina 22. Stężenia HDL, TG i LDL w grupie badanej po leczeniu w porównaniu do stanu przed leczeniem oraz w porównaniu do grupy kontrolnej

4.2.3. Metabolizm tkanki kostnej

Nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic w parametrach gęstości mineralnej kości w grupie badanej po leczeniu względem stanu przed leczeniem.

Mediany dla BMD wynosiły odpowiednio 1,06 g/cm² przed leczeniem oraz 1,08 g/cm² po leczeniu, nie wykazano między nimi różnicy istotnej statystycznie. Analogicznie różnic takich nie wykazano między średnimi T-score i Z-score (Tabela XIII).

Tabela XIII. Parametry metabolizmu kostnego pacjentek z FHA po leczeniu w porównaniu do stanu przed leczeniem (p1) oraz w porównaniu do grupy kontrolnej (p2).

	FHA przed leczeniem	FHA po leczeniu		Grupa kontrolna	
	Średnia ± SD Mediana Górny i dolny kwartyl	Średnia ± SD Mediana Górny i dolny kwartyl	p1	Średnia ± SD Mediana Górny i dolny kwartyl	p2
BMD [g/cm ²]	1,04±0,22 1,06 0,97-1,15	1,01±0,29 1,08 0,99-1,12	0,372	1,27±0,32 1,22 1,09-1,30	<0,001
T-score	-0,99±1,05 -0,9 -1,6 - [-0,2]	-1,05±0,90 -0,8 -1,65 - [-0,5]	0,344	0,49±0,82 0,5 0,1 - [- 1]	<0,001
Z-score	-0,76±1,01 -0,7 -1,4 - [-0,02]	-0,73±0,87 -0,6 -1,4 - [-0,3]	0,137	0,49±0,95 0,65 -0,4 - 1,1	<0,001

$p \leq 0,05$ istotne statystycznie;

p1: porównanie grupy badanej przed i po leczeniu; test t-studenta dla prób zależnych (rozkład zgodny z normalnym) lub test Wilcoxona (rozkład niezgodny z rozkładem naturalnym);

p2: porównanie grupy badanej po leczeniu z grupą kontrolną; test t-Studenta dla prób niezależnych (gdy rozkład zgodny z normalnym) lub test Manna-Whitney'a (rozkład niezgodny z rozkładem naturalnym);

Wykazano również, że pomimo leczenia, wartości BMD nie wróciły do normy i podobnie jak przed leczeniem, nadal obserwowano istotnie statystycznie niższe BMD, T-score i Z-score w porównaniu do grupy kontrolnej.

4.2.4. Stężenie NKB i nesfatyny 1 w surowicy krwi

W badaniu przeanalizowano stężenie NKB i nesfatyny-1 w surowicy krwi po 6 miesiącach leczenia sekwencyjną hormonalną terapią estrogenno-progestagenną (2 mg 17- β -estradiolu + 10 mg dydrogesteronu). Zaobserwowano istotny statystycznie wzrost stężenia nefatyny-1 w surowicy krwi (mediana stężenia w surowicy krwi przed leczeniem 4,64 mmol/L, mediana stężenia w surowicy krwi po leczeniu 6,10 mmol/L, $p=0,006$)(Tabela XIV, Rycina 23). Jednocześnie nie zaobserwowano istotnej statystycznie różnicy w stężeniu NKB w surowicy krwi między pacjentkami w grupie FHA przed i po leczeniu. Zaobserwowano jednak znaczne ujednolicenie grupy badanej po leczeniu (rozstęp kwartylowy przed leczeniem: 399,07 ng/L - 795,13 ng/L, po leczeniu 425,67 ng/L - 720,80 ng/L)(Tabela XIV, Rycina 23)

Tabela XIV. Stężenie NKB oraz nesfatyny-1 w surowicy krwi pacjentek z FHA po leczeniu w porównaniu do stanu przed leczeniem (p1) oraz w porównaniu do grupy kontrolnej (p2).

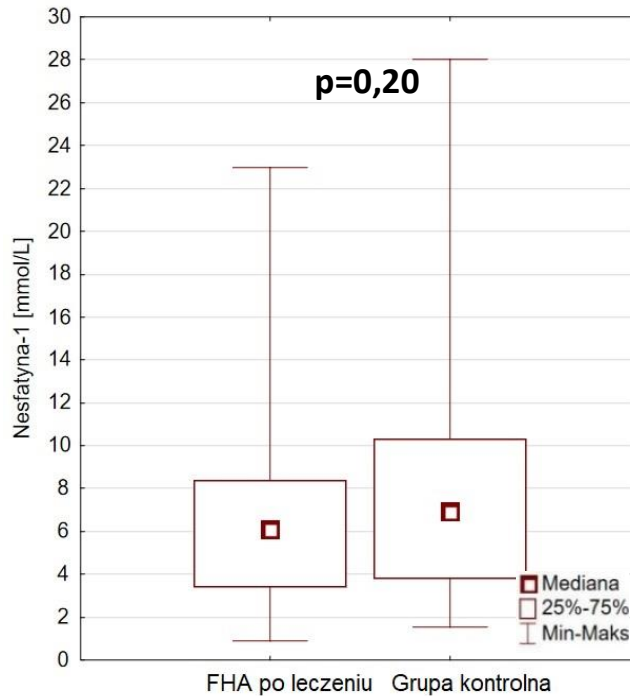
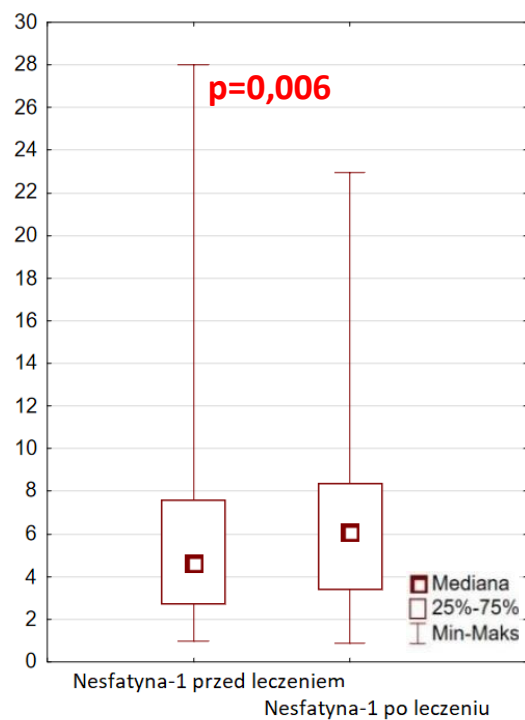
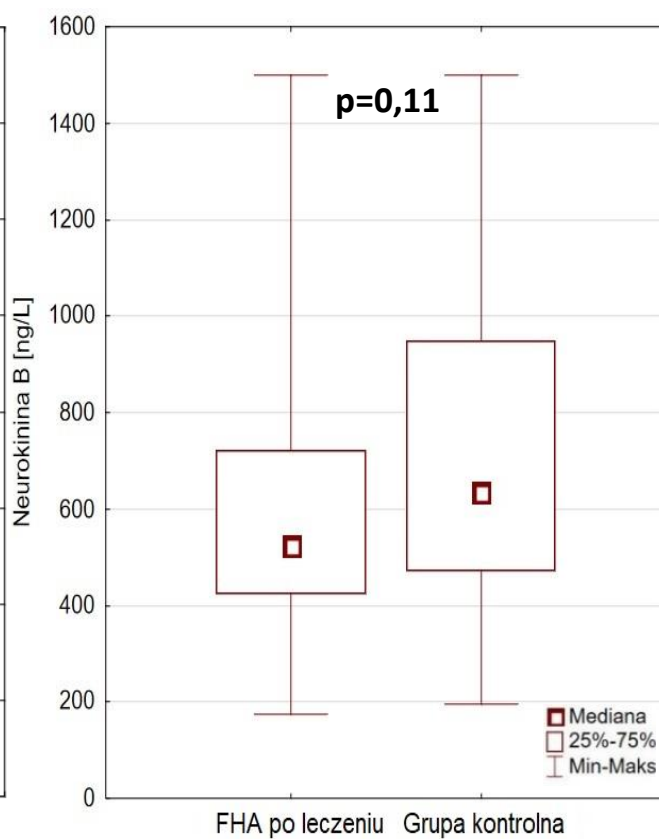
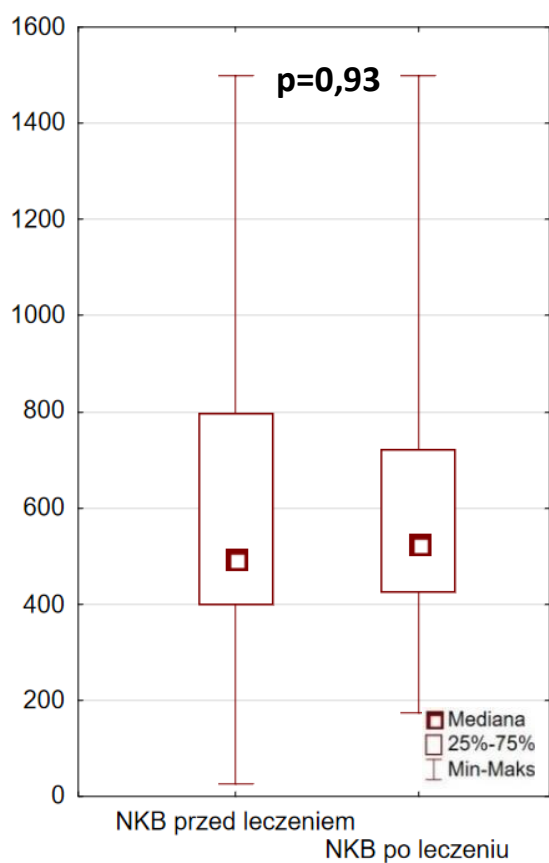
	FHA przed leczeniem	FHA po leczeniu		Grupa kontrolna	
	Średnia $\pm$ SD Mediana Górny i dolny kwartyl	Średnia $\pm$ SD Mediana Górny i dolny kwartyl	p1	Średnia $\pm$ SD Mediana Górny i dolny kwartyl	p2
Nesfatyna-1 [mmol/L]	6,21 $\pm$ 4,79 4,64 2,716-7,569	6,63 $\pm$ 4,15 6,10 3,40-8,37	0,006	8,64 $\pm$ 6,63 6,91 3,80-10,32	0,20
NKB [ng/L]	628,35 $\pm$ 324,92 494,11 399,07-795,13	623,54 $\pm$ 296,07 523,29 425,67-720,80	0,93	721,41 $\pm$ 337,57 636,07 471,84-947,18	0,11

$p \leq 0,05$ istotne statystycznie;

p1: porównanie grupy badanej przed i po leczeniu; test t-studenta dla prób zależnych (rozkład zgodny z normalnym) lub test Wilcoxona (rozkład niezgodny z rozkładem naturalnym);

p2: porównanie grupy badanej po leczeniu z grupą kontrolną; test t-Studenta dla prób niezależnych (gdy rozkład zgodny z normalnym) lub test Manna-Whitney'a (rozkład niezgodny z rozkładem naturalnym);

Porównanie grupy pacjentek z FHA po leczeniu z grupą kontrolną wykazało brak istotnych statystycznie różnic w stężeniu zarówno nesfatyny-1 jak i NKB w surowicy krwi między obiema grupami. Jest to istotna statystycznie zmiana względem stanu przed leczeniem, gdzie wykazano istotnie statystycznie niższe stężenia NKB i nesfatyny-1 w surowicy krwi w grupie badanej przed leczeniem w porównaniu do grupy kontrolnej (Tabela XIV).



Rycina 23. Stężenia NKB i nesfatyny-1 w surowicy krwi w grupie badanej po leczeniu w porównaniu do stanu przed leczeniem oraz w porównaniu do grupy kontrolnej

4.3. Analiza korelacyjna

4.3.1. Analiza korelacyjna parametrów antropometrycznych i stężenia NKB oraz nesfatyny-1 w surowicy krwi

W analizie zależności między badanymi cechami wzięto pod uwagę wskaźniki różniące grupę kobiet z FHA i grupę kontrolną, które mogą potencjalnie wpływać na stężenie NKB oraz nesfatyny-1 w surowicy krwi: wiek, czas trwania wtórnego braku miesiączki, BMI, stężenia LH, FSH, estradiolu, testosteronu, DHEA-S, porannego kortyzolu, insuliny i glukozy na czczo w surowicy krwi, HOMA-IR, TCh, LDL, HDL, TG. Cechy te zbadano następnie w kontekście możliwego wpływu na stężenie NKB oraz nesfatyny-1 w surowicy krwi zarówno przed, jak i po leczeniu w grupie pacjentek z FHA, a także w grupie kontrolnej.

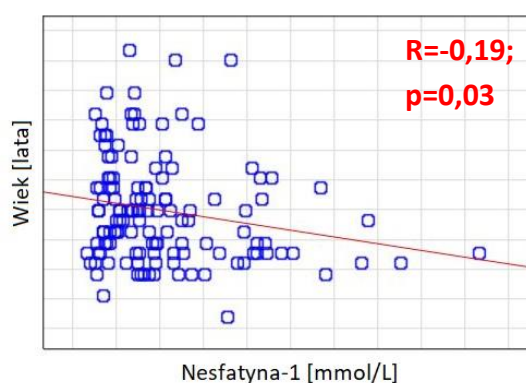
Tabela XV. Współczynniki korelacji rang Spearmana dla czasu trwania wtórnego braku miesiączki i wieku oraz stężeń NKB i nesfatyny-1 w surowicy krwi.

	Grupa	NKB [ng/L]	Nesfatyna-1 [mmol/L]
Czas trwania wtórnego braku miesiączki [miesiące]	1	-0,08	-0,11
	2	-0,07	-0,22
	3	nie dotyczy	nie dotyczy
Wiek [lata]	1	-0,05	R=-0,19; p=0,03
	2	-0,07	-0,13
	3	0,07	-0,09

W przypadku braku istotności statystycznej przedstawiono współczynnik korelacji rang Spearmana (R), w przypadku istotności statystycznej podano R oraz wartość p. Istotność statystyczna przy $p \leq 0,05$; Grupa 1: grupa FHA przed leczeniem; Grupa 2: grupa FHA po leczeniu; Grupa 3: grupa kontrolna.

Analiza korelacyjna nie wykazała istotnych statystycznie korelacji między czasem trwania wtórnego braku miesiączki a stężeniem NKB i nesfatyny-1 w surowicy krwi.

Wykazano natomiast istotną statystycznie zależność między wiekiem a stężeniem nesfatyny-1 w surowicy krwi pacjentek chorych przed leczeniem ($R=-0,19$, $p=0,03$) (Rycina 24). Nie zaobserwowano istotnych statystycznie korelacji między wiekiem i stężeniem NKB w surowicy krwi (Tabela XV).



Rycina 24. Korelacja między wiekiem i stężeniem nesfatyny-1 w surowicy krwi - grupa FHA przed leczeniem

4.3.2. Analiza korelacyjna parametrów hormonalnych i NKB oraz nesfatyny-1

W wykonanej analizie korelacyjnej parametrów hormonalnych wykazano liczne istotne statystycznie korelacje między stężeniami FSH, LH oraz E2 w surowicy krwi, zarówno w grupie badanej przed i po leczeniu, jak i w grupie badanej (Tabela XVI)

Tabela XVI. Współczynniki korelacji rang Spearmana dla stężeń FSH, LH, E2, oraz NKB i nesfatyny-1 w surowicy krwi.

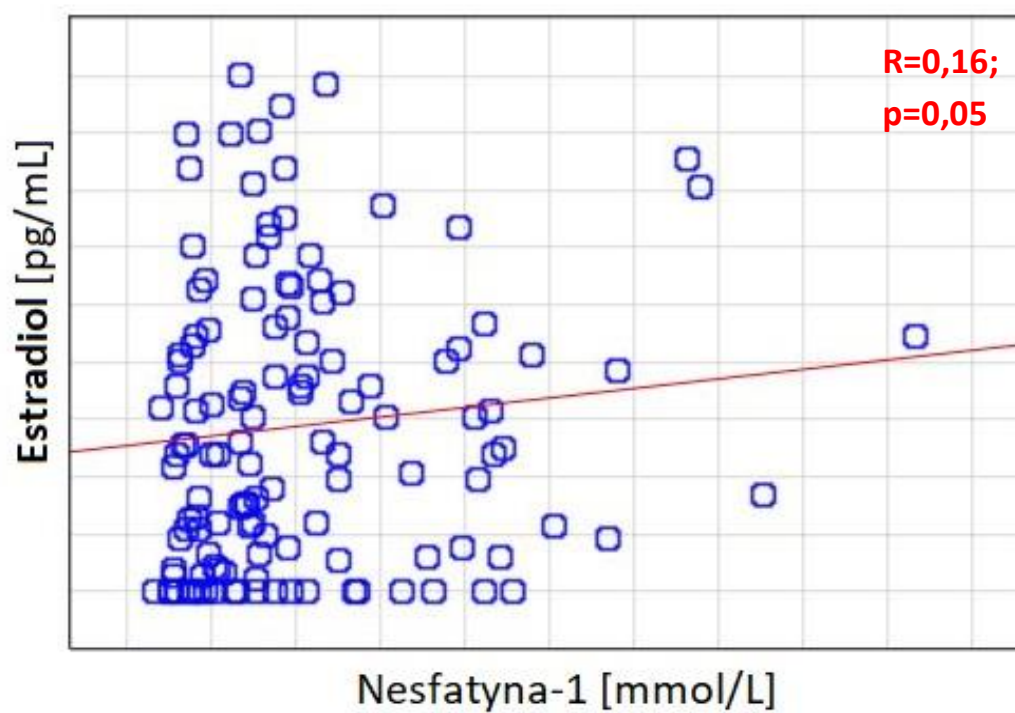
	Grupa	FSH	LH	E2	Testosteron	Nesfatyna-1	NKB
FSH [mIU/mL]	1	-	R= 0,55; p<0,001	R=0,14; p=0,05	-0,03	-0,09	-0,04
	2	-	R=0,88; p<0,001	-0,04	-0,03	0,06	-0,12
	3	-	R=0,40; p<0,001	-0,02	-0,01	-0,06	0,05
LH [mIU/mL]	1	R= 0,55; p<0,001	-	R= 0,27; p<0,001	0,14	0,02	0,08
	2	R=0,88; p<0,001	-	0,19	0,17	0,09	-0,10
	3	R=0,40; p<0,001	-	R=0,53; p<0,001	R=0,18; p=0,05	0,18	-0,16
E2 [pg/mL]	1	R=0,14; p=0,05	R= 0,27; p<0,001	-	R=0,25; p=0,003	R=0,16; p=0,05	0,06
	2	-0,04	0,19	-	R=0,26; p=0,05	-0,20	0,07
	3	-0,02	R=0,53; p<0,001	-	-0,07	0,15	R=-0,26; p=0,046

W przypadku braku istotności statystycznej przedstawiono współczynnik korelacji rang Spearmana (R), w przypadku istotności statystycznej podano R oraz wartość p. Istotność statystyczna przy $p \leq 0,05$; Grupa 1: grupa FHA przed leczeniem; Grupa 2: grupa FHA po leczeniu; Grupa 3: grupa kontrolna.

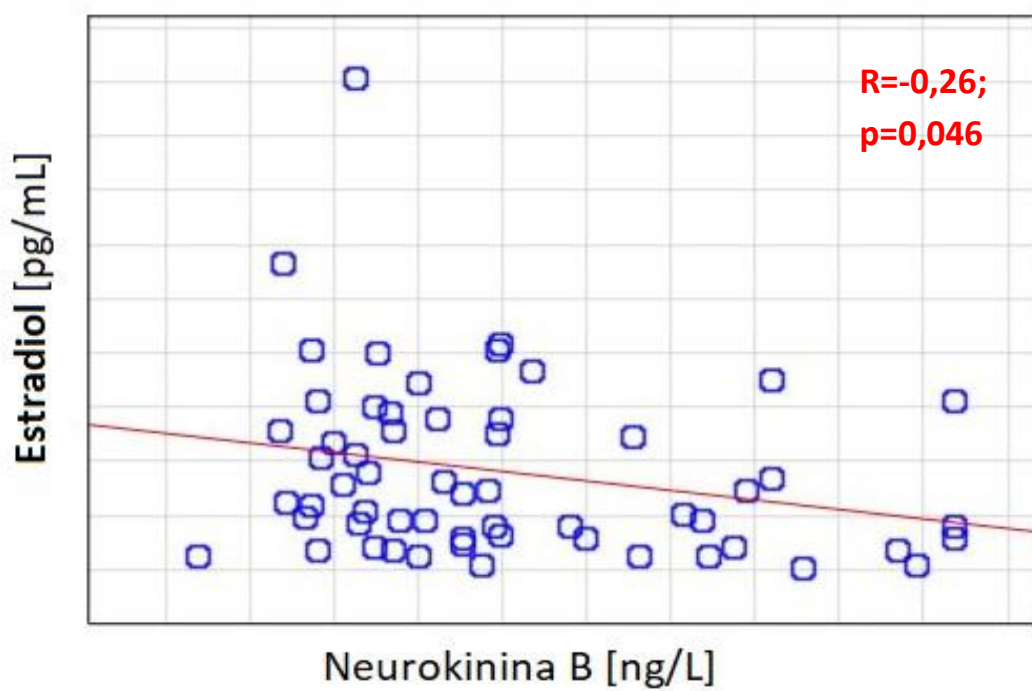
Zaobserwowano istotną statystycznie korelację między stężeniem NKB a stężeniem E2 w surowicy krwi w grupie kontrolnej ($R=-0,26$; $p=0,046$)(Tabela XVI, Rycina 26). Jednocześnie nie zauważono wyżej opisanej zależności w grupie badanej, zarówno przed jak i po leczeniu.

W grupie badanej przed leczeniem zaobserwowano natomiast istotną statystycznie pozytywną korelację między stężeniem nesfatyny-1 a E2 w surowicy krwi ($R=0,16$; $p=0,05$)(Tabela XVI, Rycina 25).

Jednocześnie nie zaobserwowano istotnych statystycznie korelacji między stężeniem NKB i stężeniem nesfatyny-1 w surowicy krwi a stężeniami FSH i LH w surowicy krwi, zarówno w grupie FHA, jak i w grupie kontrolnej.



Rycina 25. Korelacja między stężeniem estradiolu i nesfatyny-1 w surowicy krwi – grupa FHA przed leczeniem



Rycina 26. Korelacja między stężeniem estradiolu i NKB w surowicy krwi - grupa kontrolna

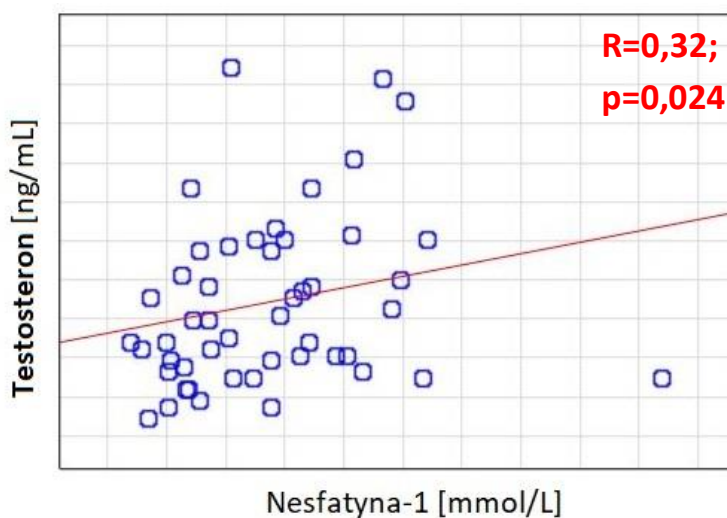
W grupie badanej po leczeniu zaobserwowano istotną statystycznie pozytywną korelację między stężeniem nesfatyny-1 a stężeniem testosteronu w surowicy krwi ($R=0,32$; $p=0,024$)(Tabela XVII, Rycina 27)

Nie wykazano istotnych statystycznie korelacji między stężeniem NKB a stężeniem testosteronu, DHEA-S i porannego kortyzolu w surowicy krwi (Tabela XVII)

Tabela XVII. Współczynniki korelacji rang Spearmana dla stężeń testosteronu, kortyzolu i DHEA-S oraz NKB i nesfatyny-1 w surowicy krwi

	Grupa	FSH	LH	E2	Testosteron	Nesfatyna-1	NKB
Testosteron [ng/mL]	1	-0,03	0,14	$R=0,25$; $p=0,003$	-	0,11	0,11
	2	-0,03	0,17	$R=0,26$; $p=0,05$	-	$R=0,32$; $p=0,024$	0,07
	3	-0,01	$R=0,18$; $p=0,05$	-0,07	-	-0,01	0,11
DHEA-S [μmol/L]	1	-0,09	0,04	0,11	$R=0,72$; $p<0,001$	0,09	0,13
	2	-0,15	-0,01	0,01	$R=0,66$; $p<0,001$	0,21	0,10
	3	-0,12	0,05	$R=-0,22$; $p=0,040$	$R=0,59$; $p<0,001$	-0,03	-0,04
Kortyzol 8.00 [nmol/L]	1	-0,07	-0,08	$R=-0,26$; $p=0,002$	0,00	0,15	0,13
	2	$R=-0,31$; $p=0,022$	$R=-0,32$; $p=0,019$	-0,15	0,20	0,12	0,03
	3	-0,05	$R=0,19$; $p=0,05$	-0,03	$R=0,31$; $p=0,004$	0,26	0,12

W przypadku braku istotności statystycznej przedstawiono współczynnik korelacji rang Spearmana (R), w przypadku istotności statystycznej podano R oraz wartość p . Istotność statystyczna przy $p \leq 0,05$; Grupa 1: grupa FHA przed leczeniem; Grupa 2: grupa FHA po leczeniu; Grupa 3: grupa kontrolna.



Rycina 27. Korelacja między stężeniem testosteronu i nesfatyny-1 w surowicy krwi - grupa FHA po leczeniu

4.3.3. Analiza korelacyjna parametrów metabolicznych oraz hormonalnych i NKB oraz nesfatyny-1 w surowicy krwi

Analiza korelacyjna nie wykazała istotnych statystycznie zależności między BMI a stężeniem NKB i nesfatyny-1 w surowicy krwi, zarówno w grupie badanej przed i po leczeniu, jak i w grupie kontrolnej.

Tabela XVIII. Współczynnik korelacji rang Spearmana dla BMI, stężeń glukozy i insuliny w surowicy krwi na czczo oraz wskaźnika HOMA-IR oraz stężeń FSH, LH, E2, testosteronu, NKB i nesfatyny-1 w surowicy krwi

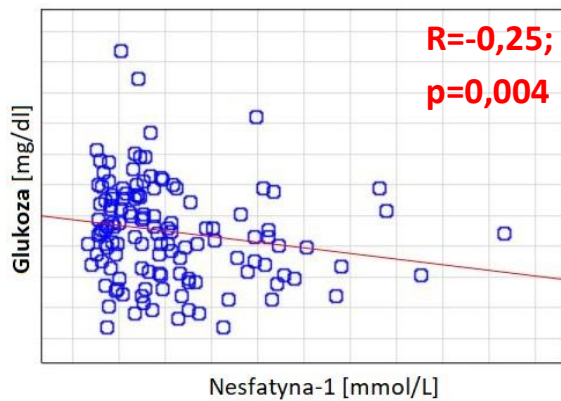
	Grupa	FSH	LH	E2	Testosteron	Nesfatyna-1	NKB
BMI [kg/m ²]	1	0,02	R=0,24; p=0,003	R=0,27; p=0,001	0,14	-0,06	-0,01
	2	R=0,29; p=0,034	R=0,37; p=0,005	R=0,27; p=0,049	0,10	-0,08	0,14
	3	-0,12	-0,02	0,14	0,15	-0,10	0,14
Insulina [mU/mL]	1	-0,08	0,09	R=0,17; p=0,041	-0,07	0,01	0,03
	2	R=0,29; p=0,034	R=0,41; p=0,002	R=0,43; p=0,001	0,16	-0,24	R=0,33; p=0,019
	3	-0,05	-0,04	-0,15	0,04	0,11	0,10
Glukoza [mg/dl]	1	0,16	0,07	0,00	-0,01	R=-0,25; p=0,004	0,01
	2	0,17	0,21	0,14	-0,04	R=-0,25; p=0,05	-0,03
	3	0,04	0,07	-0,09	-0,12	-0,01	-0,05
HOMA-IR	1	-0,01	0,12	0,13	-0,03	-0,06	0,06
	2	R=0,33; p=0,014	R=0,45; p<0,001	R=0,44; p=0,001	0,15	R=-0,28; p=0,05	R=0,30; p=0,037
	3	-0,04	-0,03	-0,15	-0,02	0,11	0,06

W przypadku braku istotności statystycznej przedstawiono współczynnik korelacji rang Spearmana (R), w przypadku istotności statystycznej podano R oraz wartość p. Istotność statystyczna przy $p \leq 0,05$; Grupa 1: grupa FHA przed leczeniem; Grupa 2: grupa FHA po leczeniu; Grupa 3: grupa kontrolna.

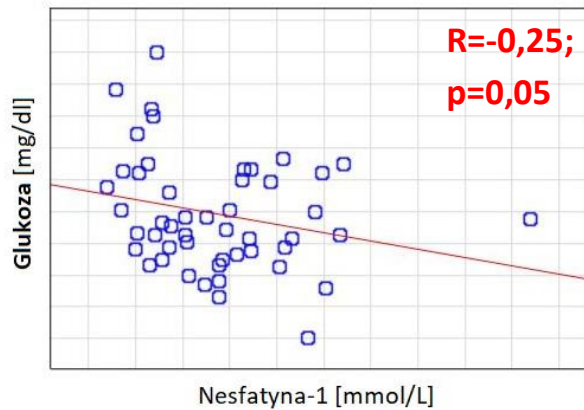
Korelacje wybranych parametrów metabolicznych wykazały istotną statystycznie zależność między stężeniem insuliny i NKB w surowicy krwi ($R=0,33$; $p=0,019$) (Rycina 30) w grupie badanej po leczeniu. Nie wykazano natomiast korelacji między stężeniem insuliny i nesfatyny-1 w surowicy krwi (Tabela XVIII).

Wykazano natomiast, że glukoza korelowała statystycznie istotnie ze stężeniem nesfatyny-1 w surowicy krwi w grupie badanej, zarówno przed jak i po leczeniu (odpowiedni $R=-0,25$; $p=0,004$ przed leczeniem, $R=-0,25$; $p=0,05$ po leczeniu) (Rycina 29, Rycina 28).

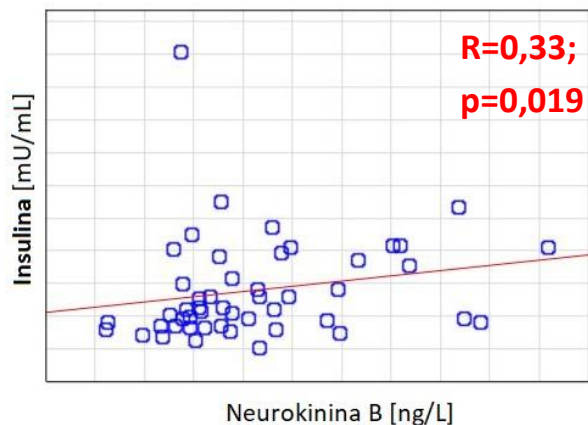
W grupie FHA po leczeniu zaobserwowano natomiast korelację między wskaźnikiem HOMA-IR a stężeniem zarówno NKB w surowicy krwi ($R=0,30$; $p=0,037$), jak i nesfatyny-1 w surowicy krwi ($R=-0,28$; $p=0,05$) (Rycina 31, Rycina 32).



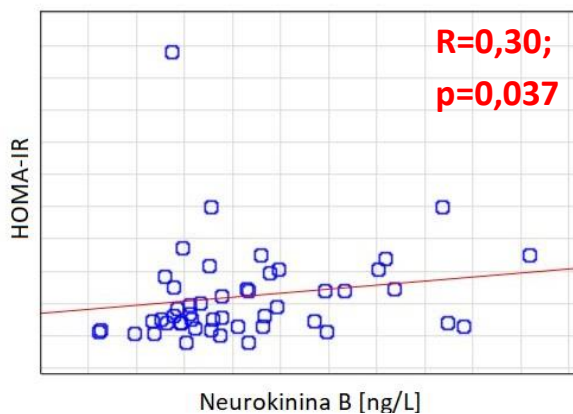
Rycina 28. Korelacja między stężeniem glukozy i nesfatyny-1 w surowicy krwi - grupa FHA przed leczeniem



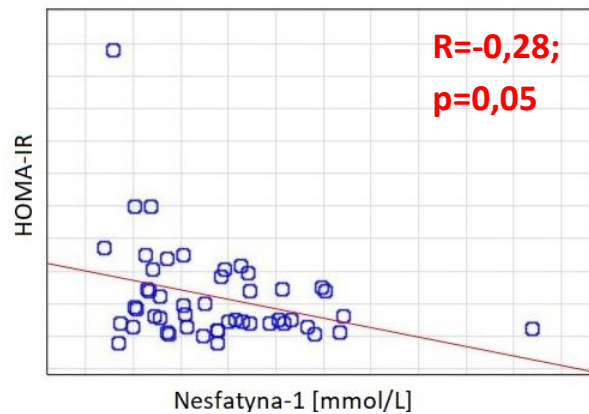
Rycina 29. Korelacja między stężeniem glukozy i nesfatyny w surowicy krwi -1 - grupa FHA po leczeniu



Rycina 30. Korelacja między stężeniem insuliny i NKB w surowicy krwi - grupa FHA po leczeniu



Rycina 32. Korelacja między wskaźnikiem HOMA-IR i stężeniem nesfatyny-1 w surowicy krwi - grupa FHA po leczeniu



Rycina 31. Korelacja między wskaźnikiem HOMA-IR i stężeniem NKB w surowicy krwi - grupa FHA po leczeniu

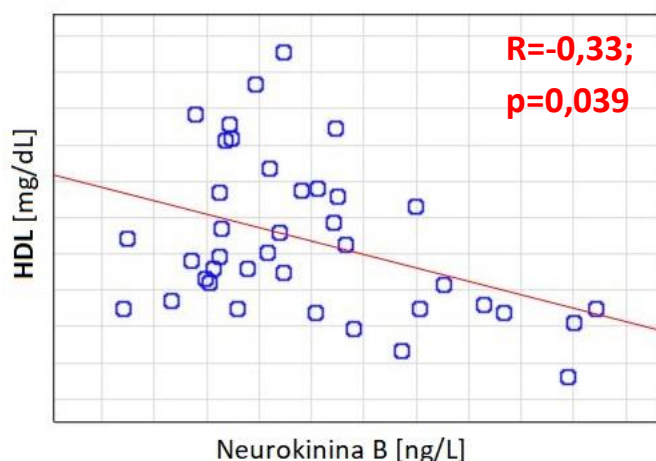
W analizie korelacyjnej między stężeniem poszczególnych frakcji lipidowych i stężeń NKB oraz nesfatyny-1 w surowicy krwi wykazano istotną statystycznie korelację ujemną między stężeniem HDL przed leczeniem i stężeniem nesfatyny-1 w surowicy krwi ($R=-0,17$; $p=0,05$) w grupie pacjentek FHA przed leczeniem oraz istotną statystycznie ujemną korelację między stężeniem nesfatyny-1 w surowicy krwi a HDL ($R=-0,33$; $p=0,039$) po leczeniu w grupie FHA (Rycina 34, Rycina 33).

Tabela XIX. Współczynnik korelacji rang Spearmana dla stężeń TCh, LDL, HDL i TG oraz stężeń FSH, LH, E2, testosteronu, NKB i nesfatyny-1 w surowicy krwi

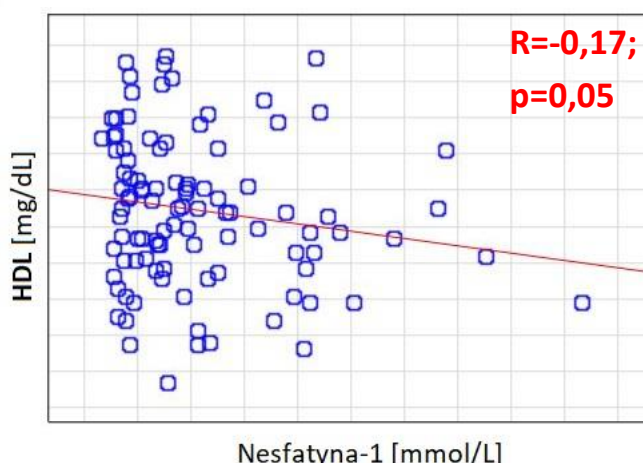
	Grupa	FSH	LH	E2	Testosteron	Nesfatyna-1	NKB
Cholesterol całkowity [mg/dL]	1	0,09	0,01	-0,11	R=-0,32; p<0,001	-0,07	-0,02
	2	0,14	0,24	0,05	-0,05	0,04	-0,10
	3	0,05	0,00	0,14	-0,02	-0,21	-0,04
Cholesterol HDL [mg/dL]	1	-0,01	-0,01	R=-0,20; p=0,043	R=-0,34; p<0,001	R=-0,17; p=0,05	0,11
	2	0,13	0,15	0,05	0,00	-0,07	R=-0,33; p=0,039
	3	R=0,30; p=0,05	0,04	0,28	-0,11	-0,20	-0,20
Cholesterol LDL [mg/dL]	1	0,08	-0,03	-0,05	R=-0,23; p=0,016	0,09	-0,07
	2	0,15	0,22	-0,04	-0,04	0,15	-0,06
	3	-0,07	0,03	0,11	0,02	-0,08	-0,08
Triglicerydy [mg/dL]	1	0,02	0,08	0,04	-0,06	-0,08	0,11
	2	-0,09	0,06	R=0,29; p=0,05	-0,01	-0,11	0,22
	3	-0,17	-0,11	-0,07	-0,17	0,28	-0,27

W przypadku braku istotności statystycznej przedstawiono współczynnik korelacji rang Spearmana (R), w przypadku istotności statystycznej podano R oraz wartość p. Istotność statystyczna przy $p \leq 0,05$; Grupa 1: grupa FHA przed leczeniem; Grupa 2: grupa FHA po leczeniu; Grupa 3: grupa kontrolna.

Nie wykazano natomiast zależności między stężeniami TCh, LDL oraz TG a stężeniami nesfatyny-1 oraz NKB w surowicy krwi (Tabela XIX).



Rycina 33. Korelacja między stężeniem HDL i NKB - grupa FHA po leczeniu



Rycina 34. Korelacja między stężeniem HDL i nesfatyny-1 - grupa FHA przed leczeniem

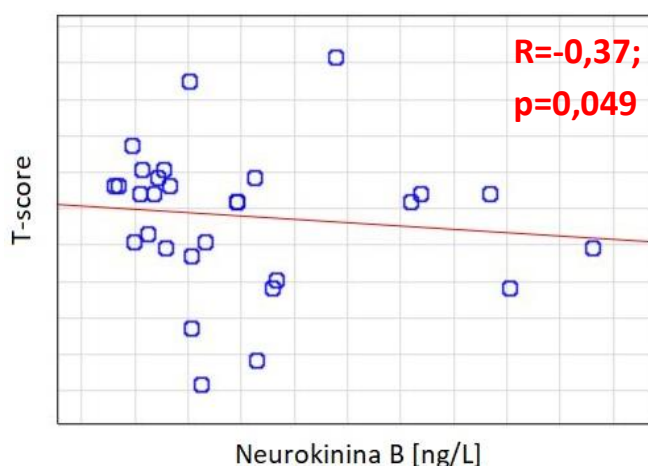
4.3.4. Analiza korelacyjna parametrów metabolizmu kostnego oraz parametrów hormonalnych i stężeń NKB oraz nesfatyny-1 w surowicy krwi

Analiza korelacji wskaźników gęstości mineralnej kości oraz stężeń NKB i nesfatyny-1 w surowicy krwi wykazała istnienie istotnej statystycznie korelacji między BMD oraz wskaźnikiem T-score a stężeniem NKB w surowicy krwi po leczeniu w grupie FHA (odpowiednio $R=-0,38$; $p=0,034$ dla BMD i $R=-0,37$; $p=0,049$ dla T-score)(Tabela XX, Rycina 35, Rycina 36).

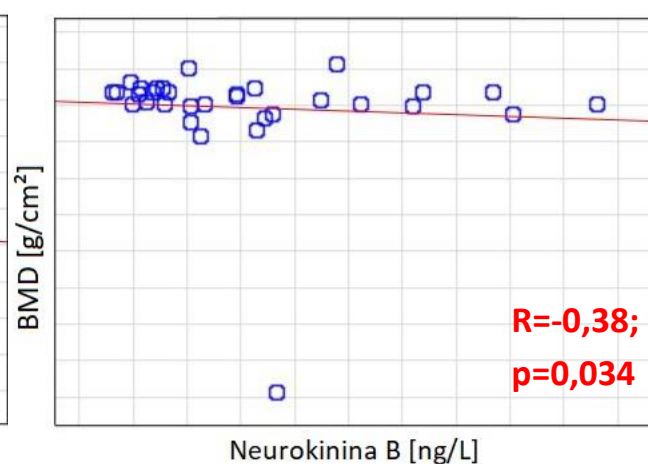
Tabela XX. Współczynnik korelacji rang Spearmana dla BMD, T-score i Z-score oraz FSH, LH, E2, testosteronu, NKB i nesfatyny-1

	Grupa	FSH	LH	E2	Testosteron	Nesfatyna-1	NKB
BMD [g/cm ²]	1	0,03	0,15	0,01	$R=0,18$; $p=0,05$	-0,16	0,11
	2	-0,02	0,05	0,01	0,09	0,23	$R=-0,38$; $p=0,034$
	3	0,03	-0,31	-0,32	-0,10	0,04	-0,07
T-score	1	0,14	$R=0,25$; $p=0,025$	0,03	$R=0,24$; $p=0,031$	-0,17	0,08
	2	0,07	0,16	0,01	0,16	0,30	$R=-0,37$; $p=0,049$
	3	0,14	-0,32	-0,34	0,15	-0,07	0,12
Z-score	1	0,02	0,09	-0,08	0,14	-0,15	0,13
	2	-0,16	-0,10	0,01	0,03	0,12	-0,28
	3	0,17	-0,22	-0,38	0,09	-0,03	0,06

W przypadku braku istotności statystycznej przedstawiono współczynnik korelacji rang Spearmana (R), w przypadku istotności statystycznej podano R oraz wartość p . Istotność statystyczna przy $p \leq 0,05$; Grupa 1: grupa FHA przed leczeniem; Grupa 2: grupa FHA po leczeniu; Grupa 3: grupa kontrolna.



Rycina 35. Korelacja między T-score i stężeniem NKB w surowicy krwi - grupa FHA po leczeniu



Rycina 36. Korelacja między BMD i stężeniem NKB w surowicy krwi - grupa FHA po leczeniu

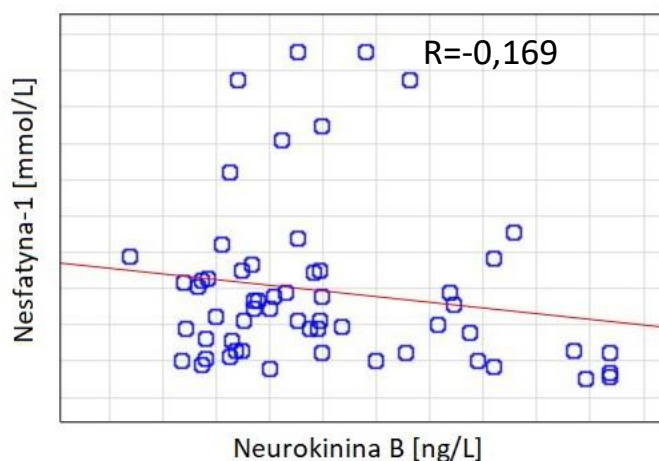
4.3.5. Analiza korelacji między stężeniami NKB oraz nesfatyny-1 w surowicy krwi

W analizie korelacyjnej nie wykazano istotnej statystycznie zależności między stężeniem NKB i nesfatyny-1 w surowicy krwi zarówno w grupie FHA przed i po leczeniu jak i w grupie kontrolnej (Tabela XXI, Rycina 37, Rycina 39, Rycina 38)

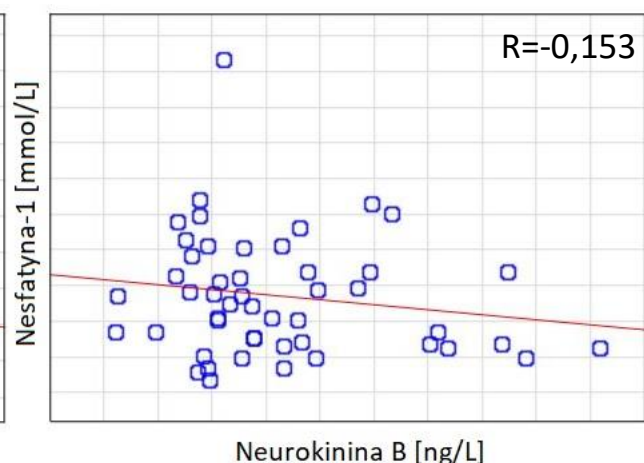
Tabela XXI. Współczynnik korelacji rang Spearmana między stężeniem NKB i nesfatyny-1 w surowicy krwi w grupie FHA przed i po leczeniu oraz w grupie zdrowej

Nesfatyna-1 [mmol/L]	Grupa	NKB [ng/L]
	1	-0,015
	2	-0,153
	3	-0,169

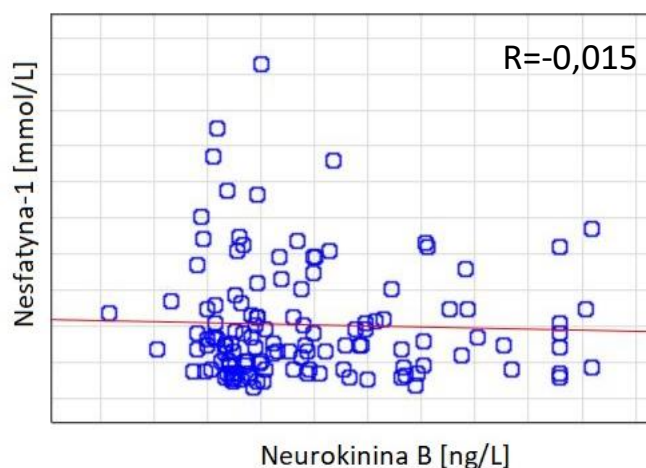
W przypadku braku istotności statystycznej przedstawiono współczynnik korelacji rang Spearmana (R), w przypadku istotności statystycznej podano R oraz wartość p . Istotność statystyczna przy $p \leq 0,05$; Grupa 1: grupa FHA przed leczeniem; Grupa 2: grupa FHA po leczeniu; Grupa 3: grupa kontrolna.



Rycina 37. Korelacja między stężeniami NKB i nesfatyny-1 w surowicy krwi - grupa zdrowa



Rycina 39. Korelacja między stężeniami NKB i nesfatyny-1 w surowicy krwi - grupa FHA po leczeniu



Rycina 38. Korelacja między stężeniami NKB i nesfatyny-1 w surowicy krwi - grupa FHA przed leczeniem

4.4. Krzywe ROC

W badaniu zanalizowano również krzywe ROC dla ryzyka wystąpienia wtórnego braku miesiączki jak i dla ryzyka obniżonej gęstości mineralnej kości.

4.4.1. Krzywe ROC – ryzyko wtórnego braku miesiączki

W analizie ryzyka wystąpienia wtórnego braku miesiączki na podstawie parametrów metabolicznych wykazano, że największe pole pod krzywą (ang. area under curve, AUC) występuje w przypadku stężenia insuliny w surowicy krwi (AUC 0,746, wartość odcięcia 5,08 mU/mL, czułość i swoistość odpowiednio 65,49% oraz 70,45%)(Tabela XXII, Rycina 40, Rycina 43) oraz BMI (0,738, wartość odcięcia 21,7 kg/m², czułość i swoistość odpowiednio 84,14% oraz 51,14%) (Rycina 40, Rycina 42).

Porównanie krzywych ROC dla dwóch krzywych o najwyższym AUC (insuliny i BMI) wykazało brak istotnej statystycznie różnicy między krzywymi ($p=0,863$).

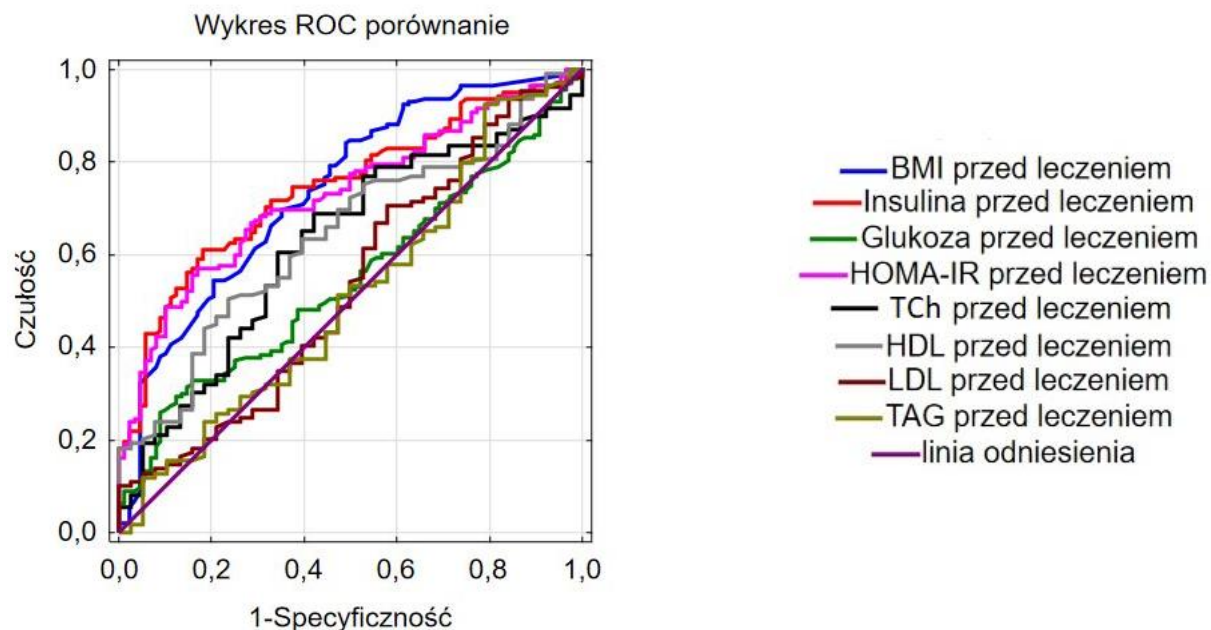
Wykazano istotną statystycznie różnicę między krzywymi dla BMI oraz TCh ($p=0,026$) oraz BMI i HDL ($p=0,011$);

Tabela XXII. Analiza krzywych ROC dla ryzyka wystąpienia wtórnego braku miesiączki- parametry metaboliczne.

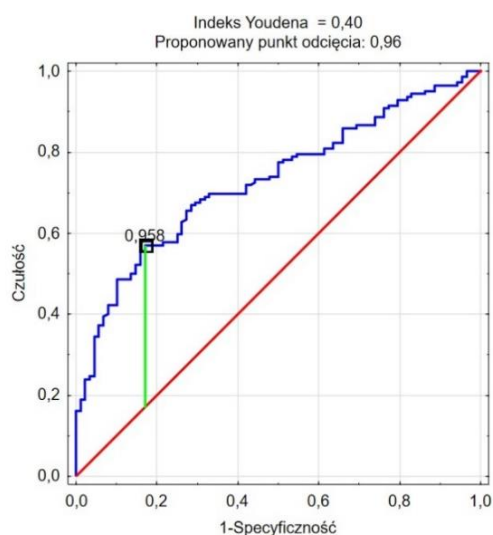
	AUC	Wartość p	Punkt odcięcia	Czułość	Specyficzność
BMI [kg/m ²]	0,738	<0,001	21,7	84,14%	51,14%
Insulina [mU/mL]	0,746	<0,001	5,08	65,49%	70,45%
Glukoza [mg/dl]	0,545	0,2342	73,2	32,87%	84,09%
HOMA-IR	0,729	<0,001	0,958	57,04%	82,95%
Cholesterol całkowity [mg/dL]	0,624	0,0157	167,2	68,81%	57,89%
Cholesterol HDL [mg/dL]	0,641	0,0039	72,2	50,46%	76,32%
Cholesterol LDL [mg/dL]	0,466	0,5456	80,2	73,39%	34,21%
Triglicerydy [mg/dL]	0,512	0,8255	45,2	92,66%	21,05%

$p \leq 0,05$ istotne statystycznie

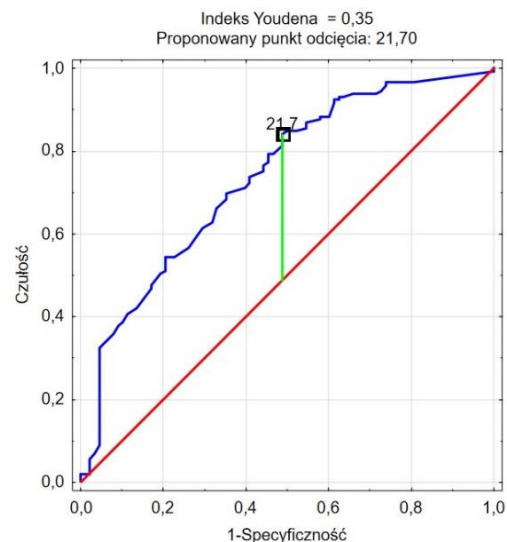
Jednocześnie największą czułość wykazano dla wskaźnika BMI (84,14%) a specyficzność dla wskaźnika HOMA-IR (82,95%)(Rycina 41)



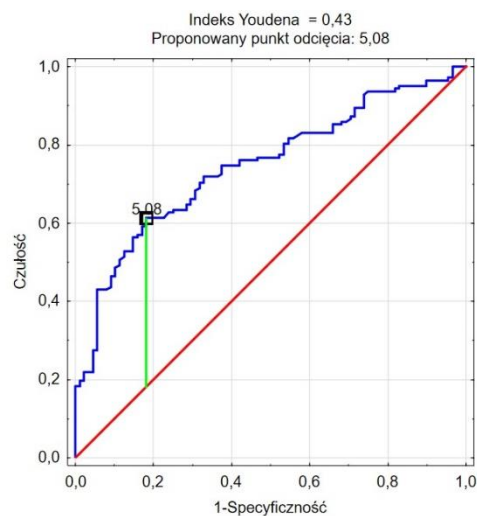
Rycina 40. Porównanie krzywych ROC dla ryzyka wystąpienia wtórnego braku miesiączki- BMI, stężenie insuliny, glukozy, TCh, HDL, LDL, TG w surowicy krwi oraz wskaźnik HOMA-IR



Rycina 41. Krzywa ROC ryzyka wtórnego braku miesiączki- wskaźnik HOMA-IR

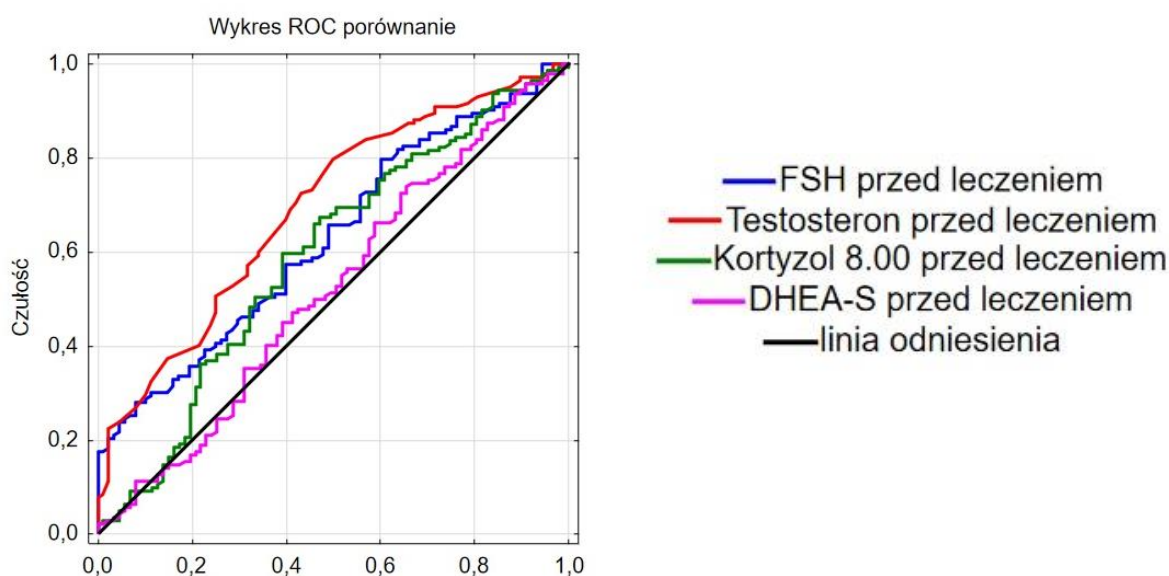


Rycina 42. Krzywa ROC ryzyka wtórnego braku miesiączki- wskaźnik BMI

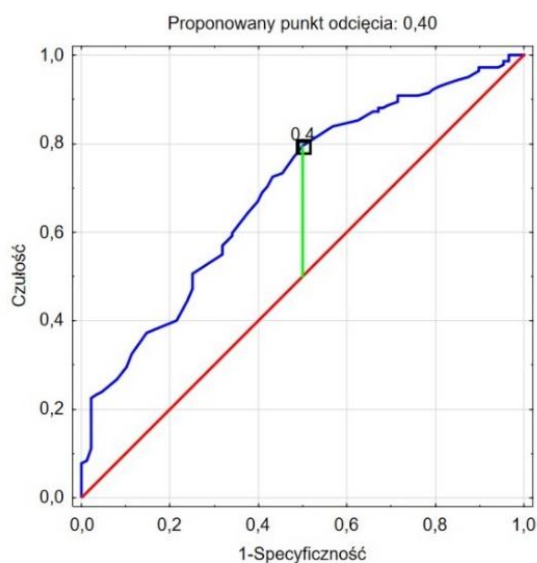


Rycina 43. Krzywa ROC ryzyka wtórnego braku miesiączki- stężenie insuliny w surowicy krwi

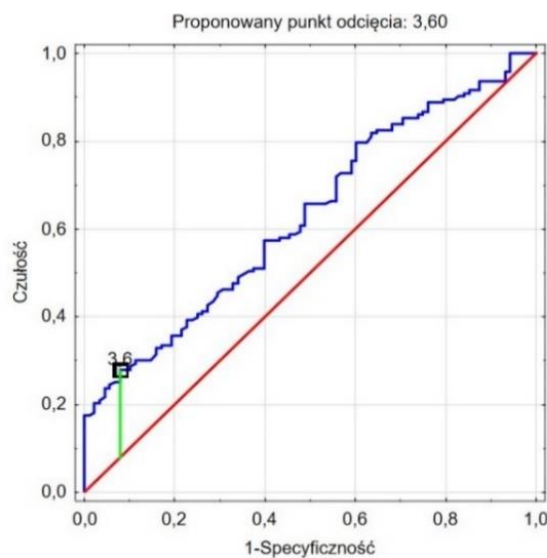
Analiza parametrów hormonalnych wykazała najwyższe AUC w przypadku krzywej ROC dla stężenia testosteronu w surowicy krwi (AUC 0,692, punkt odcięcia 0,4 ng/mL; czułość i swoistość 79,58% oraz 50,00%) oraz stężenia FSH w surowicy krwi (AUC 0,629, punkt odcięcia 3,6 mIU/mL, czułość i swoistość odpowiednio 27,97% oraz 92,05%)(Tabela XXIII, Rycina 44, Rycina 45, Rycina 46). Porównanie krzywych nie wykazało istotnej statystycznie różnicy dla stężeń T i FSH w surowicy krwi ($p=0,229$) oraz stężeń testosteronu i kortyzolu porannego w surowicy krwi ($p=0,103$). Istotność statystyczną wykryto jedynie przy porównaniu krzywych dla stężenia testosteronu i kortyzolu porannego w surowicy krwi ($p<0,001$). Największą swoistość odnotowano w przypadku stężenia FSH w surowicy krwi poniżej 3,6 mIU/mL (specyficzność 92,05%), natomiast czułość w przypadku stężenia testosteronu w surowicy krwi poniżej 0,4 ng/mL (79,58%) (Tabela XXIII).



Rycina 44. Porównanie krzywych ROC dla ryzyka wystąpienia wtórnego braku miesiączki- stężenie FSH, testosteronu, porannego kortyzolu oraz DHEA-S w surowicy krwi



Rycina 46. Krzywa ROC ryzyka wtórnego braku miesiączki- stężenie testosteronu w surowicy krwi

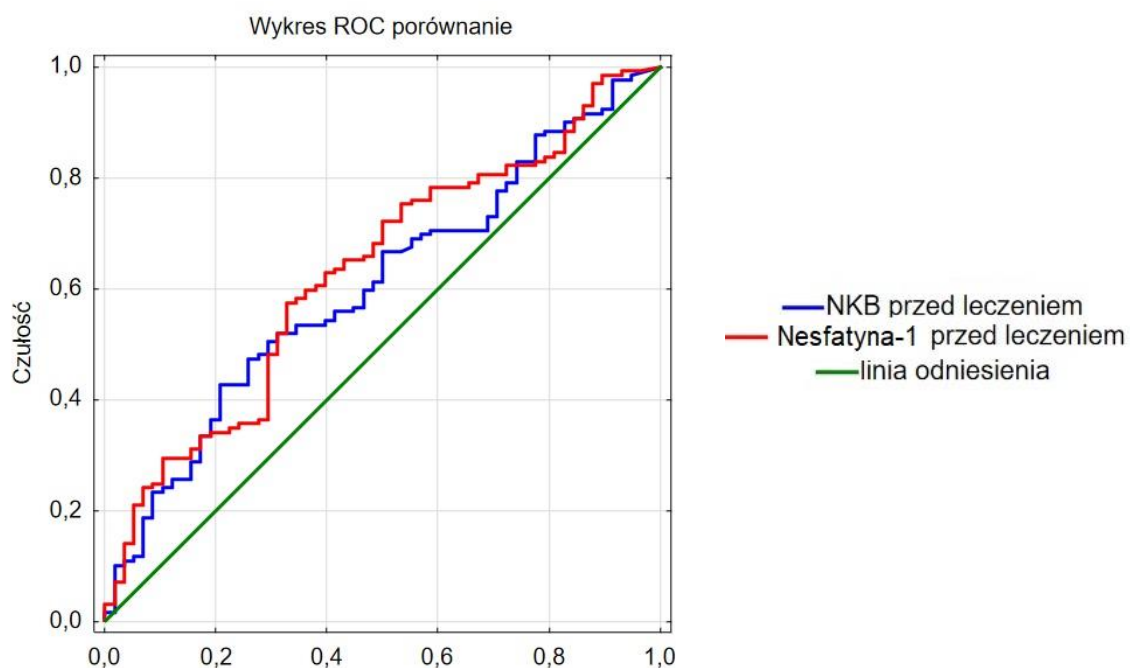


Rycina 45. Krzywa ROC ryzyka wtórnego braku miesiączki- stężenie FSH w surowicy krwi

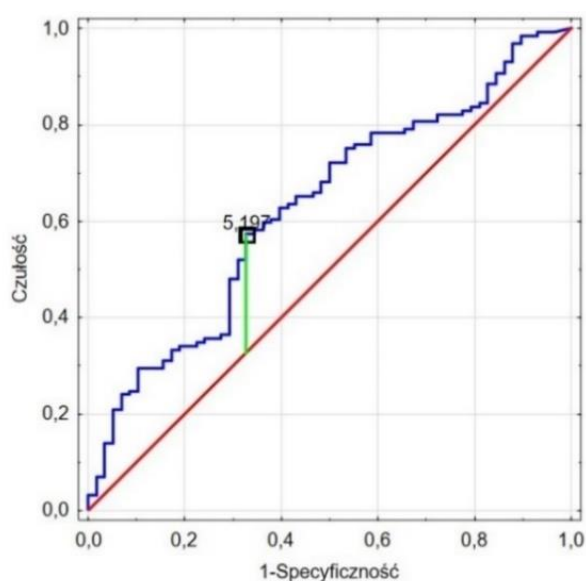
Tabela XXIII. Analiza krzywych ROC dla ryzyka wystąpienia wtórnego braku miesiączki- parametry hormonalne

	AUC	Wartość p	Punkt odcięcia	Czułość	Specyficzność
FSH [mIU/mL]	0,629	<0,001	3,6	27,97%	92,05%
Testosteron [ng/mL]	0,692	<0,001	0,4	79,58%	50,00%
Kortyzol 8,00 [nmol/L]	0,592	0,019	361,8	59,57%	60,92%
DHEA-S [μmol/L]	0,520	0,609	8,61	73,94%	34,48%

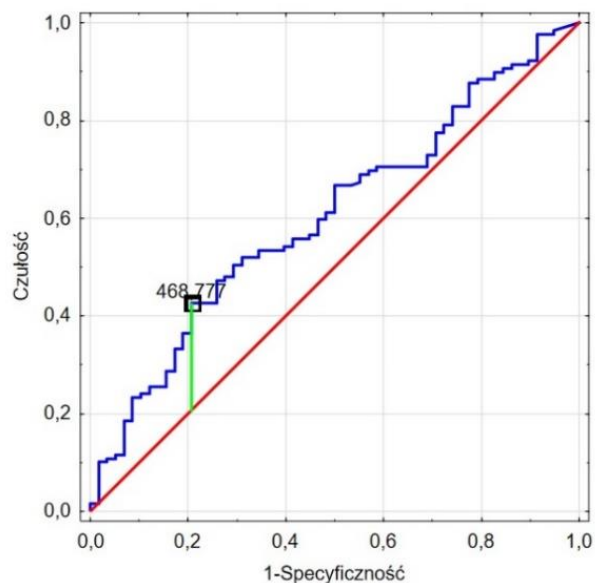
$p \leq 0,05$ istotne statystycznie



Rycina 47. Porównanie krzywych ROC dla ryzyka wystąpienia wtórnego braku miesiączki- stężenie NKB i nesfatyny-1 w surowicy krwi



Rycina 48. Krzywa ROC ryzyka wtórnego braku miesiączki- stężenie nesfatyny-1 w surowicy krwi



Rycina 49. Krzywa ROC ryzyka wtórnego braku miesiączki- stężenie NKB w surowicy krwi

Tabela XXIV. Analiza krzywych ROC dla ryzyka wystąpienia wtórnego braku miesiączki- stężenie NKB i nesfatyny-1 w surowicy krwi

	AUC	Wartość p	Punkt odcięcia	Czułość	Specyficzność
NKB [ng/L]	0,604	0,016	468,78	42,64%	79,31%
Nesfatyna-1 [mmol/L]	0,63	0,003	5,2	57,36%	67,24%

$p \leq 0,05$ istotne statystycznie

Porównano stężenie nefatyny-1 i NKB w surowicy krwi jako czynników predykcyjnych wystąpienia wtórnego braku miesiączki. Wykazano, że ocena stężenia NKB w surowicy krwi cechuje się większą specyficznością (AUC 0,6, punkt odcięcia 468,78 ng/L, specyficzność 79,31%), podczas gdy stężenie nesfatyny-1 w surowicy krwi cechuje się większą czułością, na poziomie 57,36% (AUC 0,63, punkt odcięcia 5,2mmol/L)(Tabela XXIV, Rycina 47, Rycina 49, Rycina 48). Nie wykazano istotnej statystycznie różnicy między krzywymi ROC dla stężeń NKB i nesfatyny-1 w surowicy krwi ($p=0,074$).

Porównanie krzywych ROC dla najlepszych parametrów hormonalnych i metabolicznych wykazało, że BMI jest statystycznie istotnie lepszym wskaźnikiem niż stężenie FSH w surowicy krwi ($p=0,033$), nie wykazano istotnej różnicy między BMI a stężeniem testosteronu w surowicy krwi ($p=0,306$).

4.4.2. Krzywe ROC – ryzyko obniżonej BMD

W badaniu wyznaczono również krzywe ROC ryzyka wystąpienia obniżonego BMD. Zbadano wpływ parametrów: BMI, stężenia FSH, LH, estradiolu, testosteronu, NKB oraz nesfatyny-1 w surowicy krwi

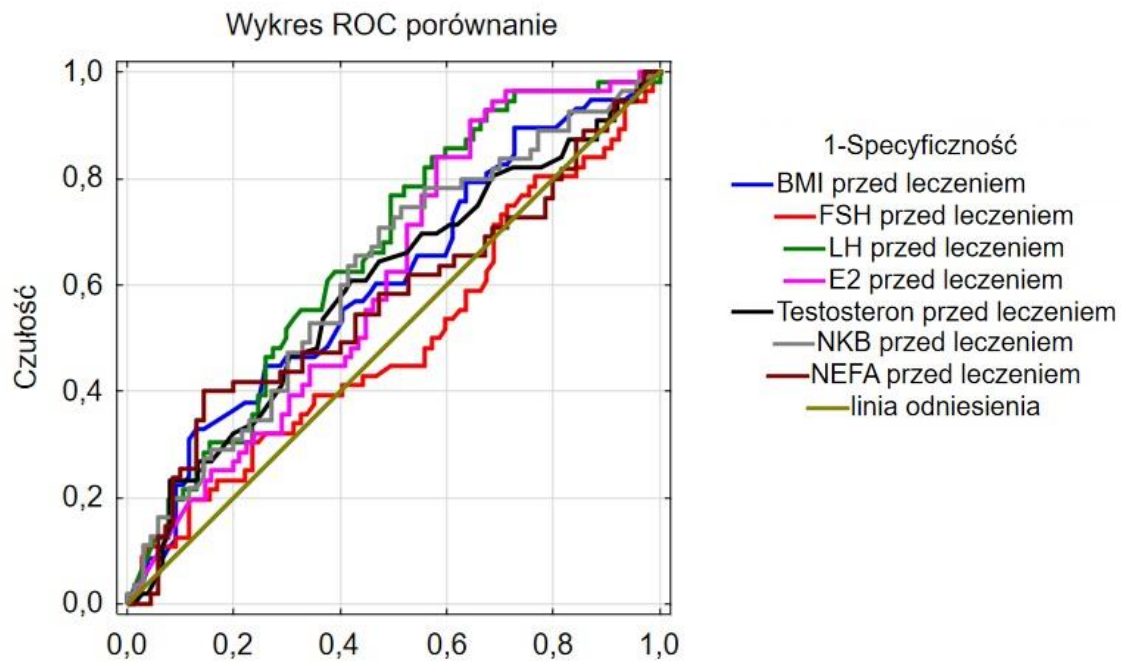
Tabela XXV. Analiza krzywych ROC dla ryzyka wystąpienia obniżonej BMD- ocena BMI, stężenia FSH, LH, estradiolu, testosteronu, NKB, nesfatyny-1 w surowicy krwi

	AUC	Wartość p	Punkt odcięcia	Czułość	Specyficzność
BMI [kg/m ²]	0,61	0,031	17,80	32,76%	87,01%
FSH [mIU/mL]	0,50	0,927	2,34	19,64%	88,31%
LH [mIU/mL]	0,66	<0,001	2,95	76,79%	50,65%
Estradiol [pg/mL]	0,61	0,023	36,45	91,07%	35,53%
Testosteron [ng/mL]	0,59	0,066	0,30	60,71%	57,89%
NKB [ng/L]	0,62	0,018	649,39	70,91%	52,86%
Nesfatyna-1 [mmol/L]	0,57	0,210	7,63	40,00%	85,71%

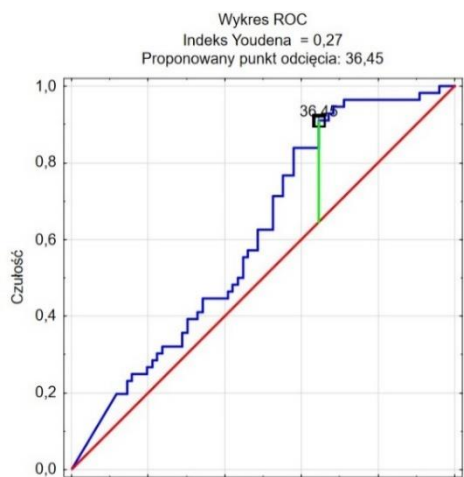
p ≤ 0,05 istotne statystycznie

Największe AUC wykazano dla krzywej stężenia LH w surowicy krwi (AUC 0,66), stężenia NKB w surowicy krwi (AUC 0,62), BMI (AUC 0,61) oraz stężenia estradiolu w surowicy krwi (AUC 0,61) (Tabela XXV, Rycina 51, Rycina 53). Nie wykazano statystycznie istotnej różnicy między krzywymi dla BMI a stężenia LH w surowicy krwi ($p=0,433$); BMI a stężenia estradiolu w surowicy krwi ($p=0,879$); BMI a stężenia NKB w surowicy krwi ($p=0,946$); stężenia LH a estradiolu w surowicy krwi ($p=0,291$); stężenia NKB a LH w surowicy krwi ($p=0,462$) oraz stężenia estradiolu i NKB w surowicy krwi ($p=0,979$)

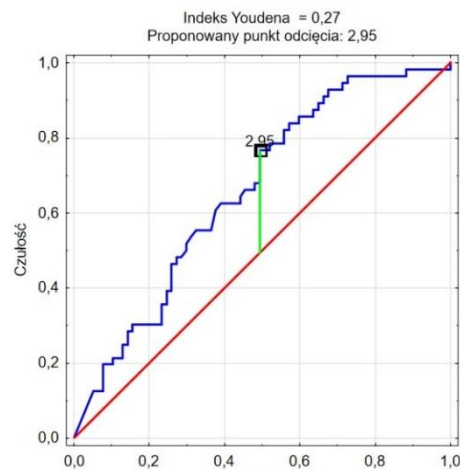
Jednocześnie największą specyficzność wykazano przy BMI <17,8 kg/m² (AUC 0,61)(Rycina 50), natomiast największą czułość (91,07%) przy stężeniu estradiolu w surowicy krwi <36,45 pg/mL (Rycina 52)



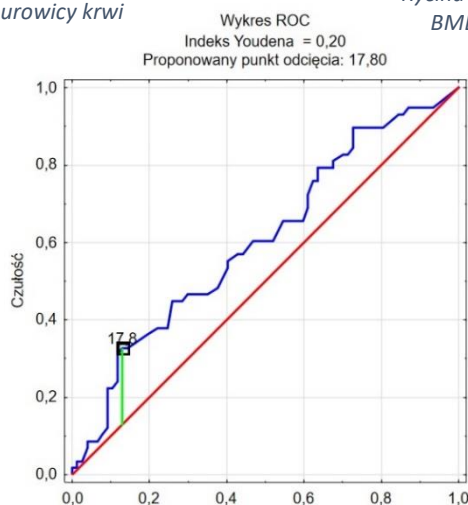
Rycina 53. Porównanie krzywych ROC dla ryzyka obniżonej BMD- stężenie FSH, LH, E2, testosteronu, NKB, nesfatyny-1 w surowicy krwi oraz wskaźnik BMI



Rycina 52. Krzywa ROC ryzyka obniżonej BMD- stężenie estradiolu w surowicy krwi



Rycina 51. Krzywa ROC ryzyka obniżonej BMD- stężenie LH w surowicy krwi



Rycina 50. Krzywa ROC ryzyka obniżonej BMD- wskaźnik BMI

4.5. Modele wielowymiarowe

Na podstawie oznaczonych zmiennych zbudowano modele określające prawdopodobieństwo wystąpienia wtórnego braku miesiączki u pacjentek z czynnikami ryzyka FHA. Wykorzystano do tego metodę regresji logistycznej oraz 2 metody Data Miningu: analizę skupień metodą K-średnich oraz metodę drzew klasyfikacyjnych.

Regresja logistyczna

Aby określić prawdopodobieństwo wystąpienia FHA metodą regresji logistycznej z grupy analizowanych w badaniu parametrów wybrano zmienne mogące mieć największy wpływ na etiopatogenezę choroby, a niebędące jednocześnie kryteriami rozpoznania choroby (stężenie LH i estradiolu w surowicy). Wzięto pod uwagę: stężenie FSH, testosteronu, porannego kortyzolu, insuliny, NKB oraz nesfatyny-1 w surowicy.

Zbudowano 2 modele czynników mających jednoczasowy wpływ na wystąpienie choroby i charakteryzujące się poprawnością klasyfikacyjną:

1. Stężenie FSH, testosteronu oraz insuliny
2. Stężenie nesfatyny-1, FSH i testosteronu.

Do budowania analizowanych modeli nie udało się wykorzystać zmiennych: stężenia porannego kortyzolu oraz NKB ze względu na nadmiarowość.

Włączenie stężenia nesfatyny-1 do budowy modelu okazało się nieistotne statystycznie przy jednoczesnym uwzględnieniu insuliny. Wobec braku możliwości jednoczesnego uwzględnienia dwóch wymienionych parametrów jednocześnie zbudowano drugi model, uwzględniający stężenie nesfatyny-1, FSH i testosteronu. W 2. modelu uzyskano nieznaczny wzrost czułości (z 86,61% na 89,06%), jednak znaczny spadek swoistości modelu (z 46,59% na 31,03%)(Tabela XXVI).

Tabela XXVI. Charakterystyka modeli zbudowanych metodą regresji logistycznej

Model		p	Iloraz szans modelu (OR)	Zmienne istotne	Iloraz szans dla parametrów	Klasyfikacja przypadków
FHA vs. kontrola	1	p<0,001	5,64	FSH p<0,001 testosteron p<0,001 insulina 0<0,001	FSH 0,73 testosteron 0,02 insulina 0,77	% poprawnych 71,3% czułość 86,61% swoistość 46,59%
	2	p<0,001	3,66	nesfatyna-1 p=0,04 FSH p=0,01 testosteron p<0,001	nesfatyna-1 0,94 FSH 0,78 testosteron 0,02	% poprawnych 70,9% czułość 89,06% swoistość 31,03%

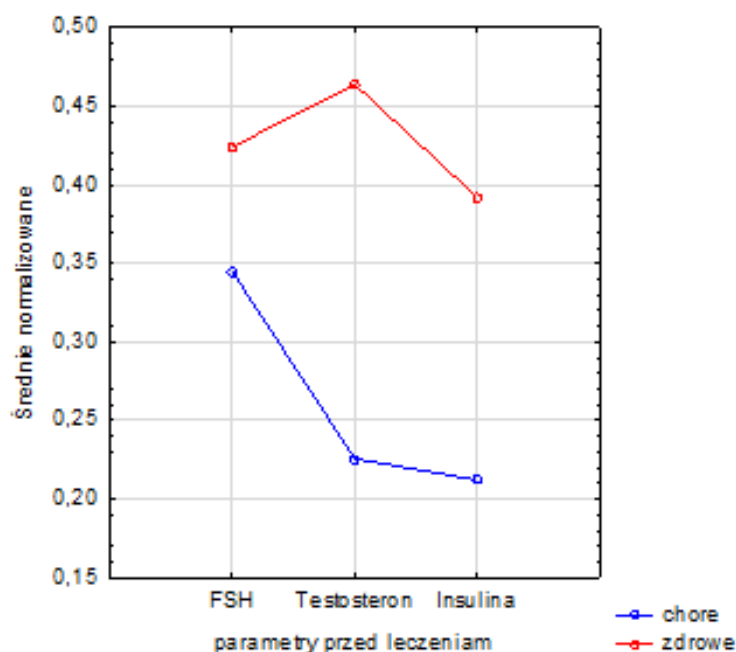
$p \leq 0,05$ istotne statystycznie

Data Mining

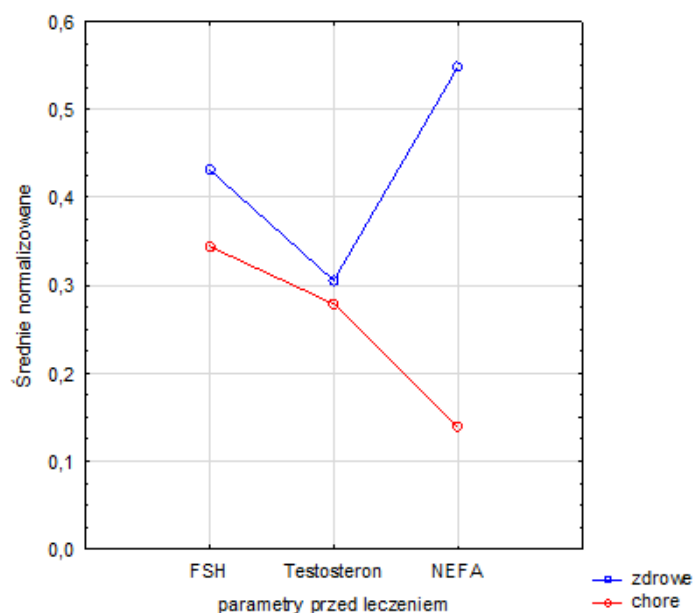
Do oceny modeli zbudowanych przy wykorzystaniu metody regresji logistycznej wykorzystano również metody Data Miningu.

Analiza skupień metodą K-średnich

Pierwszą metodą Data Miningu wykorzystaną do budowy modelu była analiza skupień metodą K-średnich. Metoda której celem jest ułożenie obiektów w grupy w taki sposób, aby stopień powiązania obiektów z obiektami należącymi do tej samej grupy był jak największy, a z obiektami z pozostałych grup jak najmniejszy. Wykorzystując dane analogiczne jak w regresji logistycznej zbudowano 2 modele, których charakterystykę przedstawiono poniżej:



Rycina 54. Charakterystyka pierwszego modelu uzyskanego metodą analizy skupień metodą k-średnich



Rycina 55. Charakterystyka drugiego modelu uzyskanego metodą analizy skupień metodą k-średnich

Jak przedstawiono na powyższych rycinach, model 1. dobrze pogrupował obiekty w skupienia (miarą poprawności modelu jest stopień oddalenia od siebie krzywych)(Rycina 54). Drugi model charakteryzuje się słabą zdolnością do grupowania (Rycina 55). Czułość i swoistość obu modeli przedstawiona jest w Tabeli XXVII.

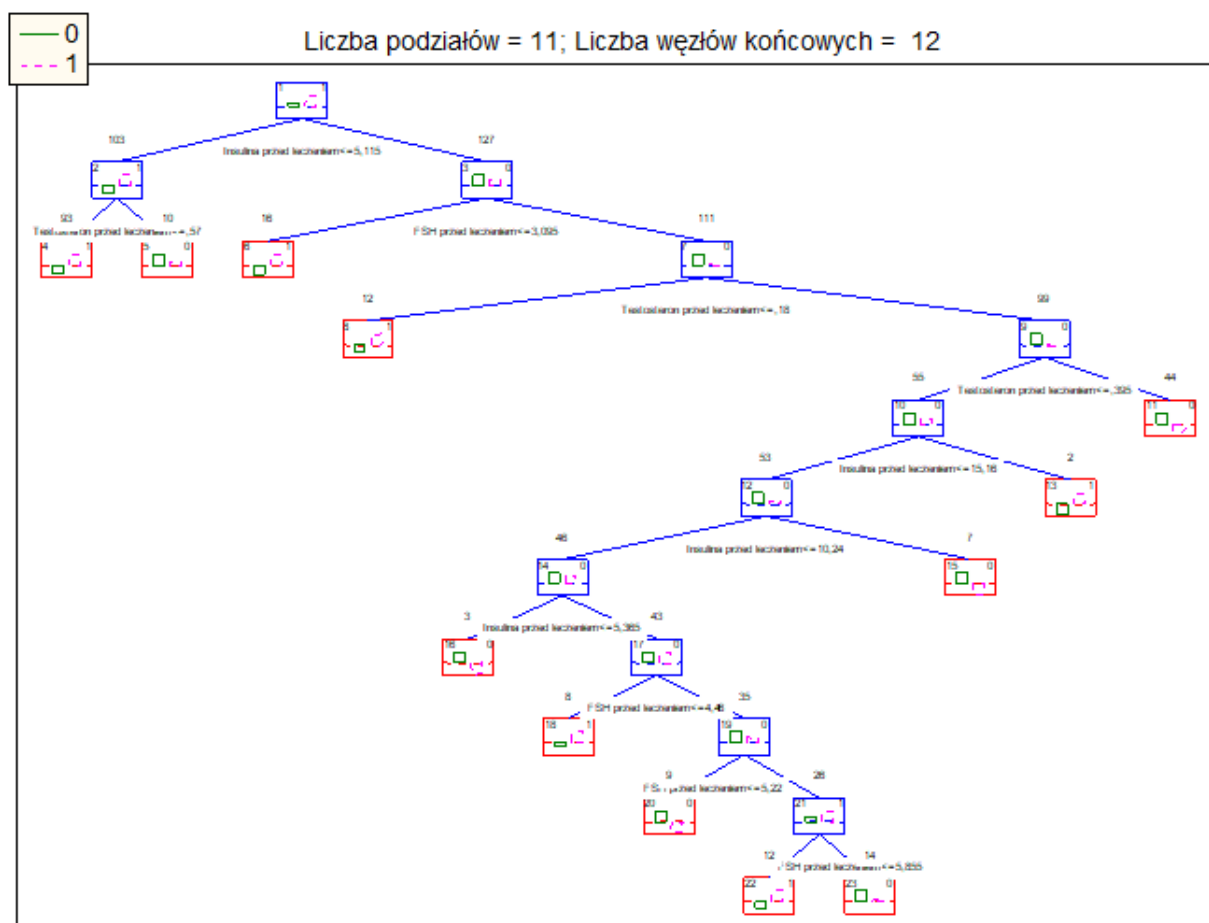
Tabela XXVII. Porównanie wartości predykcyjnych oraz czułości i swoistości wybranych modeli oceny prawdopodobieństwa wystąpienia FHA

	Regresja logistyczna		Analiza skupień metodą k-średnich		Drzewa klasyfikacyjne	
	Model 1	Model 2	Model 1	Model 2	Model 1	Model 2
Czułość	86,61%	89,06%	88,03%	82,81%	88,73%	92,97%
Swoistość	46,59%	31,03%	52,27%	27,59%	80,68%	53,45%
Wartość predykcyjna dodatnia	0,72	0,74	0,75	0,72	0,88	0,82
Wartość predykcyjna ujemna	0,68	0,56	0,73	0,42	0,82	0,78

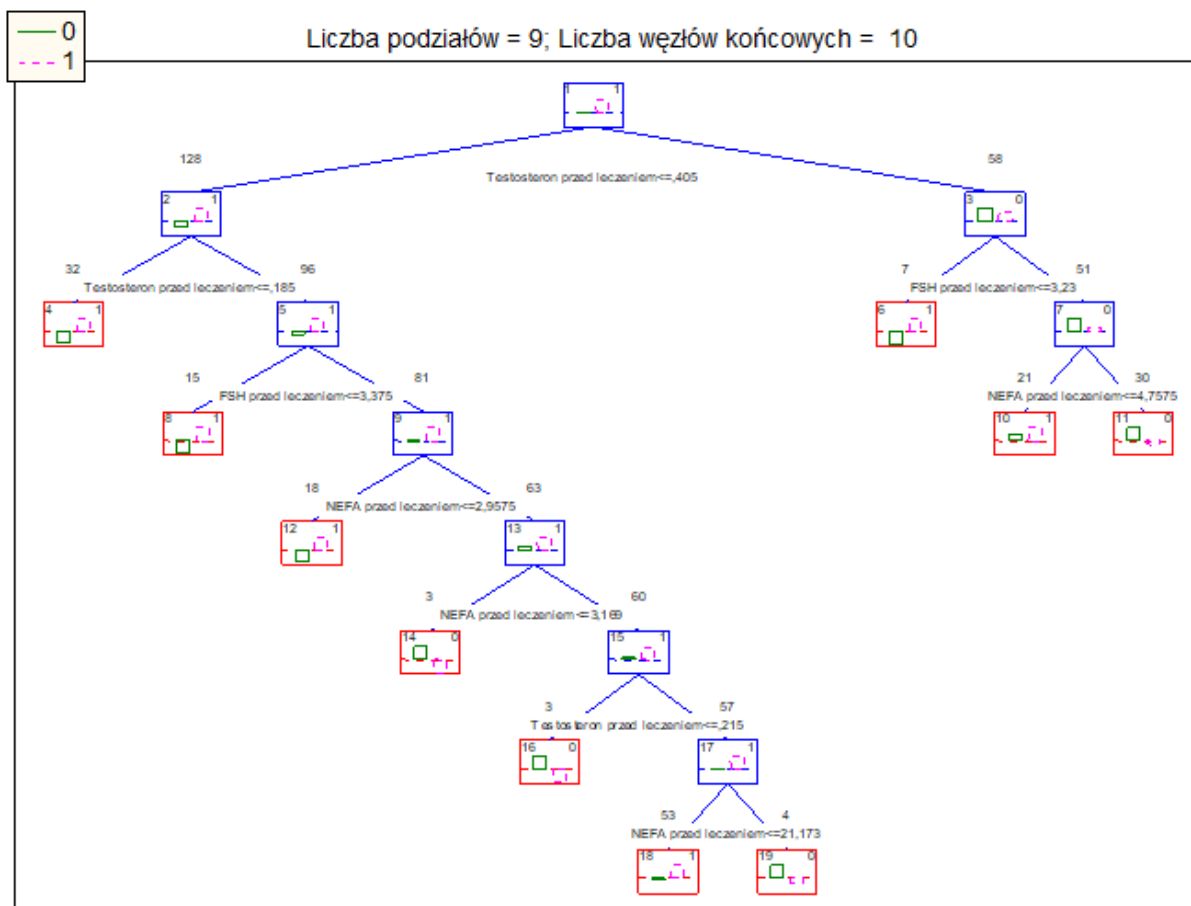
Drzewa klasyfikacyjne

Wykorzystuje się je do wyznaczania przynależności przypadków do klas jakościowej zmiennej zależnej na podstawie pomiarów jednej lub więcej predyktorów. Dokonuje podziału próby statystycznej na klasy obserwacji o podobnych właściwościach za pomocą diagramów zwanych drzewami klasyfikacji. Metoda drzew klasyfikacyjnych jest odmianą hierarchicznej analizy skupień. Wartości predykcyjne oraz czułość i swoistość modeli została podana w tabeli (Tabela XXVII).

Porównanie czułości i swoistości oraz wartości predykcyjnych wskazało, że spośród zaprezentowanych w badaniu modeli, algorytmem najlepiej rozpoznającym pacjentki chore i zdrowe są drzewa klasyfikacyjne, szczególnie model zbudowany ze zmiennych: stężenia FSH, testosteronu i nesfatyny-1. Model utworzony w oparciu o stężenie FSH, testosteronu, oraz insuliny wykazuje nieznacznie niższą czułość przy wysokiej swoistości oraz wysokich wartościach predykcyjnych dodatniej i ujemnej. Jednocześnie model 1. zbudowany jest na powszechnie dostępnych oznaczeniach stężenia FSH, testosteronu oraz insuliny, co znacząco ułatwia jego wykorzystanie kliniczne.



Rycina 56. Charakterystyka 1. modelu uzyskanego metodą drzew klasyfikacyjnych



Rycina 57. Charakterystyka 2. modelu uzyskanego metodą drzew klasyfikacyjnych

5. DYSKUSJA

Wtórny brak miesiączki występuje u około 3-5 % kobiet w wieku rozrodczym, stanowiąc istotny problem kliniczny wśród tej grupy pacjentek. Czynnościowy podwzgórzowy brak miesiączki jest najczęstszą przyczyną wtórnego braku miesiączki w tej populacji. Związany jest on z nadmierną utratą masy ciała, intensywnym wysiłkiem fizycznym lub stresem. Znacznie rzadziej, jeśli czynniki ryzyka wystąpią odpowiednio wcześniej, czynnościowy podwzgórzowy brak miesiączki może stanowić przyczynę pierwotnego braku miesiączki^{3,4}.

Bezpośrednią przyczyną anowulacji w FHA jest zaburzenie pulsacyjnego wydzielania GnRH, co w dalszej kolejności implikuje zaburzenie częstotliwości i amplitudy pulsów LH¹⁹². Obniżone stężenia LH i FSH w surowicy są niewystarczające do utrzymania prawidłowej folikulogenezy i stymulacji jajników, co wywołuje wtórny brak miesiączki, zmniejszoną płodność oraz hipoeestrogenizm^{33,193}.

Podjezuwa się jednak, że nie zaburzenie wydzielania GnRH, a zaburzenia wydzielania neurohormonów w jądrze łukowatym są główną przyczyną rozwoju FHA (patrz Rycina 3). Dotychczas wykryto wiele czynników, mogących wpływać neuromodulująco na wydzielanie GnRH. Obejmują one zarówno sygnały hamujące, jak i czynniki stymulacyjne, które pośredniczą między sekrecją GnRH a informacjami płynącymi zarówno ze środowiska wewnętrznego, jak i zewnętrznego. Udowodniono dotychczas, że istnieje ścisły związek między aktywacją osi podwzgórze – przysadka - nadnercza oraz hiperkortyzolemią a zmniejszeniem wydzielania GnRH u osób z FHA. Zmniejszone przyjmowanie pokarmu, wpływające na stężenie adipokin, czy intensywny wysiłek fizyczny uruchamiają kaskadę neuromodulującą skutkującą zaburzeniem pulsacyjnego wydzielania GnRH^{194,195}. Wykazano, że centralnym punktem kumulującym informacje z układu stresu czy układu metabolicznego i regulującym w ten sposób funkcje rozrodcze są neurony KNDy (patrz Rycina 3). Wydzielając KISS1, NKB oraz Dyn regulują pracę innych neuronów KNDy w obrębie jądra łukowatego oraz stymulują wydzielanie GnRH, wpływając na pracę niższych pięter układu rozrodczego. Na ich powierzchni znajdują się receptory dla NKB, receptory dla Dyn i testosteronu, leptyny oraz insuliny, a także ER α , PR, MC3R i MC4R odbierające informacje z układu POMC/CART. Szeroki wachlarz receptorów sprawia, że to właśnie neurony KNDy są uważane za centralny regulator funkcji rozrodczych⁶⁵.

Na podstawie przeprowadzonych dotąd badań podejzuwa się, że zmiany wydzielania zarówno NKB jak i nesfatyny-1, wpływające na regulację wydzielania GnRH, mogą być pierwotną przyczyną zaburzeń, których kaskadę obserwuje się u pacjentek z FHA. Do tej pory udowodniono występowanie zaburzeń wydzielania KISS1 w grupie pacjentek z FHA⁸⁴. Ponieważ NKB znajduje się w szlaku regulacji neurohormonalnej powyżej KISS1, podejzuwa

się, że to zaburzenie wydzielania NKB jest tym pierwotnym, a dopiero wtórnie dochodzi do zaburzenia wydzielania KISS1 i szlaku następstw obserwowanych w FHA.

Nesfatyna-1 jest nowo odkrytym neurohormonem silnie zaangażowanym w regulację interakcji między statusem energetycznym a rozmnażaniem. Jej wydzielanie jest regulowane przez wydzielanie adipokin, nesfatyna-1 natomiast w dalszej kolejności wpływa na wydzielanie GnRH.

W świetle danych literaturowych zasadne wydaje się przypuszczenie, iż u pacjentek z FHA dochodzić będzie do obniżenia stężenia NKB oraz nesfatyny-1, co tłumaczyłoby dalszą kaskadę następstw obserwowanych w FHA, poczynając od obniżenia stężenia KISS1, kończąc na hipolestrogenizmie i jego powikłaniach.

W prezentowanym badaniu zadano sobie więc pytanie, czy pacjentki cierpiące na FHA wykazują obniżone stężenie NKB i nesfatyny-1 w surowicy krwi. Ponadto w badaniu tym starano się odpowiedzieć na pytanie, w jaki sposób standardowe leczenie hormonalne wpływa na czynniki etiopatogenetyczne FHA, czyli czy i jak sekwencyjna dwuskładnikowa hormonalna terapia zastępcza będzie zmieniała wydzielanie NKB oraz nesfatyny-1 u pacjentek z FHA?

Spodziewano się, że włączenie HTZ u pacjentek z FHA nie wpłynie na stężenia NKB oraz nesfatyny-1 jako czynników etiologicznych choroby. Zasadne wydaje się podejrzenie, że jedynie zmiany behawioralne lub wzrost masy ciała mogą wywołać znaczące zmiany na poziomie neurohormonalnym i w ten sposób przyczynić się do wyleczenia pacjentek z FHA. Podejrzewa się, że HTZ nie wpływa na czynniki etiopatogenetyczne choroby, a u pacjentek z FHA ma jedynie na celu zapobieganie odległym skutkom hipolestrogenizmu oraz wywoływanie regularnego cyklu miesięczkowego.

Z drugiej strony, brano pod uwagę, że HTZ może hamować funkcję jąder podwzgórza u pacjentek z FHA w mechanizmie sprzężenia zwrotnego ujemnego. Może doprowadzać to do pogłębienia zaburzeń neurohormonalnych występujących w FHA, a co za tym idzie, skutkować dalszym spadkiem LH oraz pogłębieniem hipogonadyzmu.

5.1. Analiza stężeń NKB i nesfatyny-1 przed leczeniem

5.1.1. Stężenie NKB i nesfatyny-1 u pacjentek z FHA

Badanie udowodniło występowanie istotnie statystycznie niższego stężenia NKB oraz nesfatyny-1 w surowicy u pacjentek chorych na FHA.

Średnie stężenie NKB u tych pacjentek wynosiło $628,35 \pm 324,92$ ng/L, natomiast w grupie pacjentek zdrowych $721,41 \pm 337,57$ ng/L; mediany wynosiły odpowiednio 494,11 ng/L oraz

636,07 ng/L ($p=0,002$). Jak udowodniono w dostępnej literaturze, u pacjentek z FHA dochodzi do silnego wyhamowania osi podwzgórze – przysadka – jajnik, jednak głównym punktem, który podlega zahamowaniu jest jądro łukowate podwzgórza, centralnie regulujące całą oś. Dotychczasowe obserwacje wykazały, że u pacjentek z jadłowstrętem psychicznym o typie restrykcyjnym dochodzi do obniżenia stężenia KISS1 w porównaniu do grupy kontrolnej, jednak bez istotności statystycznej ($0,2 \pm 0,07$ ng/ml vs. $0,3 \pm 0,36$ ng/ml; $p=0,71$), podczas gdy w grupie pacjentek z FHA wykazano istotnie statystycznie niższe stężenie KISS1 ($0,17 \pm 0,11$ ng/ml vs. $0,3 \pm 0,36$ ng/ml; $p=0,027$)^{83,84}. W badaniu Bacopoulou F. et al⁸¹. z 2017 roku wykazano, że w grupie pacjentek z typowym jadłowstrętem psychicznym stężenie KISS1 silnie korelowało z BMI ($r=-0,60$, $p=0,012$). Ponadto wykazano istotną statystycznie różnicę w stężeniu KISS1 między grupą pacjentek z typowym i atypowym jadłowstrętem psychicznym ($208,2$ ng/L [$110,0$ ng/L- $586,0$ ng/L] vs. $436,9$ ng/L [$167,3$ ng/L- $641,4$ ng/L]; $p=0,055$), podczas gdy nie zaobserwowano istotnej statystycznie różnicy między grupą z typowym jadłowstrętem psychicznym i grupą kontrolną ($208,2$ ng/L [$110,0$ ng/L- $586,0$ ng/L] vs. $232,8$ ng/L [$101,9$ ng/L- $709,1$ ng/L]; $p=0,546$). Praca Hofmann T. et al. z 2016 roku wskazała natomiast, że w grupie pacjentek z jadłowstrętem psychicznym stężenie KISS1 korelowało negatywnie z intensywnością wysiłku fizycznego ($r=-0,41$, $p=0,01$), a pozytywnie z BMI w tej samej grupie pacjentek ($r=0,514$, $p<0,001$)¹³¹. Ponadto, zauważono, że podawanie KISS1 we wlewie iv. pacjentkom z FHA przywraca u nich prawidłowe pulsacyjne wydzielanie LH, FSH oraz niezaburzoną sekrecję E2¹⁹⁶. Na podstawie wyżej opisanych badań należało podejrzewać, że w związku z faktem, iż NKB reguluje wydzielanie KISS1, również stężenie NKB będzie obniżone u pacjentek z FHA. Podejrzenie to potwierdzono w wynikach obecnie prezentowanego badania. W dostępnych bazach literaturowych brak jest podobnych doniesień pozwalających odnieść bezpośrednio wyniki własne do innych autorów. Prezentowane badanie jest bowiem pierwszym badaniem, podczas którego oznaczono stężenie NKB w surowicy krwi u pacjentek z FHA.

Jednocześnie w badaniu przeanalizowano stężenie innego neurohormonu, nesfatyny-1, która podobnie jak NKB (ale w innym mechanizmie, patrz Rycina 4, Rycina 5) reguluje wydzielanie KISS1. W badaniu wykazano, że średnie stężenie nesfatyny-1 w surowicy krwi w grupie FHA jest statystycznie istotnie niższe niż w grupie badanej (średnie odpowiednio $6,21 \pm 4,79$ mmol/L oraz $8,64 \pm 6,63$ mmol/L, mediany odpowiednio $4,64$ mmol/L w grupie FHA i $6,91$ mmol/L w grupie zdrowej; $p=0,005$). W dostępnych danych literaturowych, według wiedzy autora, zaprezentowano tylko jedno badanie przeprowadzone na grupie pacjentek z jadłowstrętem psychicznym o charakterze restrykcyjnym autorstwa Ogiso K. et al. Wykazano w nim, że stężenie nesfatyny-1 w surowicy pacjentek z jadłowstrętem psychicznym było statystycznie istotnie niższe niż w grupie kontrolnej ($6,23 \pm 0,70$ ng/ml w grupie badanej względem $8,91 \pm 0,85$ ng/ml w grupie kontrolnej, $p<0,05$)¹⁷⁰. Do tej pory nie przeprowadzono innych badań dotyczących stężenia nesfatyny-1 w grupie pacjentek z FHA czy pacjentek uprawiających intensywny wysiłek fizyczny, co utrudnia analizę wyników uzyskanych w prezentowanym badaniu.

W badaniu udało się również wykazać, że stężenia nesfatyny-1 i NKB nie korelują ze sobą statystycznie istotnie, ani w grupie FHA, ani w grupie kontrolnej. Może to wynikać z faktu, że oba neurohormony znajdują się w innym szlaku regulacji. Jednocześnie pewne przesłanki z literatury sugerują możliwość połączenia tych dwóch układów regulacyjnych, niemniej dane te są skąpe i niejednoznaczne, co utrudnia analizę powyższych wyników^{155,185,147}.

5.1.2. *NKB i nesfatyna -1 a czynniki antropometryczne*

W związku z mechanizmem etiopatogenetycznym i utratą masy ciała jako czynnikiem wywołującym FHA, pacjentki chorujące na tę chorobę wykazują statystycznie istotnie niższą masę ciała w porównaniu do grupy osób zdrowych. W grupie badanej masa ciała pacjentek, a co za tym idzie również BMI były istotnie statystycznie niższe niż w grupie kontrolnej. W grupie badanej aż 60 na 147 (41%) pacjentek wykazywało obniżone BMI (12% wychudzenie, 29% niedowagę), podczas gdy w grupie kontrolnej jedynie u 4,5% pacjentek zdiagnozowano niedowagę. Jednocześnie w badaniu nie wykazano istotnej statystycznie różnicy w stężeniu NKB

i nesfatyny-1 w grupie pacjentek z FHA mających prawidłowe BMI lub niedowagę, podobnych zależności nie wykazano również w grupie zdrowej. W przedstawianym badaniu nie wykazano również istotnych statystycznie korelacji między BMI a stężeniem NKB i nesfatyny-1, zarówno w grupie FHA, jak i w grupie kontrolnej.

Powyższe obserwacje częściowo pokrywają się z danymi literaturowymi. Brak danych dotyczących korelacji między BMI a NKB nie pozwala na bezpośrednie porównanie z dotychczas przeprowadzonymi badaniami, pośrednio dane te można analizować na podstawie wykazanych zależności między BMI a KISS1. W niektórych do tej pory prezentowanych pracach wykazano istotną statystycznie ujemną korelację między BMI a stężeniem KISS1 w grupie pacjentek z typowym jadłowstrętem psychicznym ($r=-0,60$, $p=0,012$), co może przekładać się na korelację BMI ze stężeniem NKB⁸¹. W tym samym badaniu, biorąc pod uwagę jednak całą grupę pacjentek z jadłowstrętem psychicznym, nie wykazano podobnych zależności⁸¹. Inne doniesienia natomiast wskazują na występowanie pozytywnej korelacji między KISS1 a BMI w grupie pacjentek z jadłowstrętem psychicznym¹³¹. W literaturze opisywany jest również brak opisanej korelacji w innych grupach chorych, m.in. u pacjentek z PCOS czy w grupie chorych z otyłością^{197,198}.

Dane literaturowe dotyczące korelacji nesfatyny-1 a BMI również są niejednoznaczne. Część badań wskazuje na pozytywną korelację między ww. wskaźnikami¹⁶⁹. Zaobserwowano, że stężenie nesfatyny-1 w surowicy pozytywnie koreluje z BMI w badaniu przeprowadzonym na grupie pacjentek z jadłowstrętem psychicznym o charakterze restrykcyjnym ($r= 0,520$, $p< 0,05$)^{170,171,172}. Inne badania natomiast wykazują brak korelacji, lub wręcz korelację ujemną, np. w badaniach przeprowadzonych na grupie pacjentek z przedwczesnym dojrzewaniem płciowym wykazano, że BMI koreluje ujemnie z BMI ($p=0,025$, $r=- 0,81$),

natomiast badania przeprowadzone na grupie pacjentek z jądłowstrętem psychicznym nie wykazały żadnej zależności ($r=0,06$, $p=0,70$)^{173,174,175,180}.

Powyższe rozbieżności w literaturze mogą wynikać zarówno z chorób współtowarzyszących (badanie korelacji nesfatyny-1 z BMI w różnych jednostkach chorobowych), czy też wpływu innych czynników metabolicznych, nie branych do tej pory pod uwagę w powyższych analizach. Podejrzewa się natomiast, że ujemna korelacja między BMI a nesfatyną-1, wykryta w niektórych grupach chorych, może wynikać z faktu, iż obniżone stężenie nesfatyny-1 może stymulować apetyt i powodować wzrost BMI¹⁷⁴.

Nie wykazano istotnej statystycznej korelacji między stężeniem NKB i nesfatyny-1 a czasem trwania wtórnego braku miesiączki w grupie chorej. W przytoczonym badaniu Ogiso K. et al.¹⁷⁰ wykazano, analogiczne do wyników własnych, brak korelacji między stężeniem nesfatyny-1 a długością trwania choroby ($R=-0,591$, $p=0,162$)¹⁷⁰. Niemniej, stwierdzono brak korelacji między stężeniem nesfatyny-1 a wiekiem pacjentek ($R=-0,232$, $P=0,406$), podczas gdy w wynikach własnych zaobserwowano statystycznie istotną ujemną korelację ($R=-0,19$, $p=0,03$) między stężeniem nesfatyny-1 a wiekiem pacjentek w grupie FHA. Podobnych zależności nie zaobserwowano w grupie zdrowej. Również stężenie NKB nie korelowało w żadnej grupie z wiekiem pacjentek.

5.1.3. *NKB i nesfatyna -1 a parametry hormonalne*

U pacjentek cierpiących z powodu FHA odnotowano istotne statystycznie różnice w stężeniu badanych parametrów hormonalnych w porównaniu do grupy zdrowej. Wykazano istotnie statystycznie niższe stężenie FSH, LH i estradiolu w surowicy krwi, pacjentki wykazywały charakterystyczny dla schorzenia profil hormonalny odpowiadający hipogonadyzmowi hipogonadotropowemu. Wykazano również istotne statystycznie różnice w stężeniach porannego kortyzolu (podwyższone), DHEA-S (obniżone), testosteronu (obniżone), PRL (obniżone), TSH (obniżone), i fT4 (obniżone), charakterystyczne i szeroko opisywane w dostępnej literaturze^{199,200}. Wykazano istotną statystycznie korelację pozytywną między stężeniem estradiolu a stężeniem nesfatyny-1 w grupie FHA oraz istotną statystycznie korelację negatywną między stężeniem estradiolu i stężeniem NKB w grupie zdrowej.

W przeprowadzonych dotychczas badaniach wykazano, że u pacjentek z przedwczesnym telarche stężenie nesfatyny-1 nie korelowało ze stężeniem LH ani FSH w surowicy krwi²⁰¹. Podobny brak zależności odnotowano u pacjentek z PCOS (brak korelacji stężenia nesfatyny-1 ze stężeniem LH) oraz centralnym przedwczesnym dojrzewaniem płciowym, ponadto nie zaobserwowano w nich zależności między stężeniem nesfatyny-1 a stężeniem estradiolu^{174,202}. Niemniej, korelacje stężeń hormonów w przedwczesnym dojrzewaniu płciowym czy PCOS są trudne do porównania z korelacjami wykrytymi w FHA ze względu na odmienną etiopatogenezę wymienionych schorzeń. Ponadto, sami autorzy wymienionych badań

podkreślają, że niektóre z wyników trudno interpretować, m.in. ze względu na małą grupę badaną (20 pacjentek z PCOS czy 22 z przedwczesnym dojrzewaniem płciowym)^{201,202}.

Podobnych analiz nie przeprowadzono do tej pory dla stężenia NKB. Analogicznie jak w przypadku zależności z BMI opisanych powyżej, przeprowadzono liczne badania dotyczące korelacji między stężeniem KISS1 i FSH, LH i E2 w surowicy krwi. W badaniach Bacopoulou F. et al. nie wykazano istotnych statystycznie korelacji między stężeniem KISS1 a stężeniem FSH, LH czy E2 w surowicy krwi w grupie pacjentek z jądłowstrętą psychiczną⁸¹. Korelacji między stężeniem KISS1 a E2 w surowicy krwi nie wykazano również w żadnej z 3 faz cyklu: wczesnej folikularnej, okołooowulacyjnej i lutealnej, w grupie pacjentek zdrowych²⁰³. Również w grupie pacjentek zdrowych nie udało się wykazać korelacji między stężeniem KISS1 ani stężeniem FSH i LH²⁰⁴.

Nie wykazano istotnych statystycznie korelacji między stężeniem NKB i nesfatyny-1 a stężeniem testosteronu, DHEA-S i porannego kortyzolu w surowicy krwi w grupie badanej i kontrolnej, niemniej z uwagi na bardzo skąpe dane w literaturze wyniki te są trudne do zinterpretowania. Dotychczas udało się wykazać m.in. pozytywną korelację między stężeniem KISS1 i testosteronu ($R = 0,268$, $p = 0,001$) w grupie pacjentek z PCOS, co jedynie pośrednio może sugerować zależność z NKB¹⁹⁸. Podobnie, w grupie z PCOS wykazano brak statystycznie istotnej korelacji między stężeniem testosteronu i stężeniem nesfatyny-1 ($R = 0,314$, $p = 0,602$)²⁰². Niemniej, jak wcześniej zauważono, zaburzenia hormonalne u pacjentek z PCOS znajdują się w zasadzie na drugim biegunie spektrum zaburzeń miesiączkowania w stosunku do FHA (podwyższone stężenie LH i androgenów w surowicy, podwyższone stężenie KISS1), co powoduje, że obserwacje dotyczące grupy z PCOS powinny być ostrożnie porównywane z zaburzeniami obserwowanymi w FHA.

5.1.4. NKB i nesfatyna -1 a parametry metaboliczne

W grupie pacjentek cierpiących z powodu FHA wykazano istotnie statystycznie niższe stężenie insuliny oraz statystycznie istotnie niższą wartość wskaźnika HOMA-IR w porównaniu do grupy kontrolnej. Jednocześnie wykazano wyższe stężenie TCh oraz frakcji HDL. Nie wykazano natomiast istotnych statystycznie różnic w stężeniach glukozy na czczo, frakcji cholesterolu LDL oraz TG.

W analizie korelacyjnej udało się wykazać istotną statystycznie ujemną zależność między stężeniem glukozy a stężeniem nesfatyny-1 w surowicy krwi. Podobnej zależności nie wykazano dla stężenia NKB w surowicy krwi. Jednocześnie nie wykazano zależności między stężeniem nesfatyny-1 i NKB, a stężeniem insuliny w surowicy krwi i wskaźnikiem HOMA-IR. Analizując zależności między stężeniem NKB i nesfatyny-1 w surowicy krwi a stężeniem poszczególnych frakcji lipidogramu wykazano ujemną istotną statystycznie korelację między

stężeniem niefatyny-1 a stężeniem cholesterolu HDL w grupie FHA. Nie wykazano podobnych zależności dla innych frakcji lipidowych ani NKB, zarówno w grupie FHA, jak i w grupie zdrowej.

W dotychczas opublikowanych badaniach brak jest danych dotyczących zależności między parametrami metabolicznymi a stężeniem NKB i niefatyny-1 w surowicy krwi. Pojedyncze dane pochodzące z literatury opisującej powyższe zależności w różnych jednostkach chorobowych są często sprzeczne i wykluczające się. Catak Z. et al.²⁰² opublikowali w 2019 roku badanie, w którym nie wykazano istotnej statystycznie korelacji między stężeniem niefatyny-1 w surowicy a HOMA-IR w grupie pacjentek z PCOS²⁰². Podobnie w badaniu Abaci A. et al.²⁰⁵ nie wykazano istotnej statystycznie korelacji między stężeniem niefatyny-1 a stężeniami insuliny, glukozy, TG, TCh, LDL, HDL ani wskaźnikiem HOMA-IR zarówno w grupie pacjentów z otyłością, jak i w grupie kontrolnej²⁰⁵. Brak korelacji między stężeniem insuliny i niefatyny-1 w surowicy został opisany również w innych doniesieniach naukowych²⁰⁶. W innych badaniach wykazano natomiast, że stężenie niefatyny-1 pozytywnie koreluje ze stężeniem glukozy na czczo ($r = 0,5$, $p = 0,001$), stężeniem insuliny na czczo ($r = 0,51$, $P = 0,001$), HOMA-IR ($r = 0,6$, $p < 0,001$), TCh ($r = 0,54$, $p < 0,001$) i LDL ($r = 0,5$, $p = 0,001$) w grupie młodych pacjentów z otyłością²⁰⁷. Podobne wyniki uzyskano w badaniu Tan BK et al.²⁰⁸, gdzie stężenie niefatyny-1 korelowało dodatnio ze stężeniem insuliny w surowicy ($r = 0,347$, $p < 0,05$) oraz ze wskaźnikiem HOMA-IR ($r = 0,370$, $p < 0,05$), jednocześnie nie wykazano istotnej statystycznie zależności między stężeniem niefatyny-1 a stężeniem glukozy²⁰⁸. Sprzeczne dane dotyczące korelacji między stężeniem niefatyny-1 a parametrami gospodarki węglowodanowej są dosyć interesujące, bowiem w wielu badaniach w sposób wyraźny wykazano, że niefatyna-1 wywiera działanie hipoglikemizujące. Niefatyna-1 zwiększa bowiem wyrzut insuliny i wzrost ekspresji mRNA dla preproinsuliny w tkance trzustki. Hipoglikemizujące działanie niefatyny-1 potwierdza się również w badaniach u chorych z zaburzeniami glikemii. Wykazano, że u chorych na cukrzycę typu II oraz u pacjentek w ciąży powikłanej cukrzycą ciążową dochodzi do obniżenia stężenia niefatyny-1. Ponadto dożylne podanie niefatyny-1 zmniejsza stężenie glukozy w surowicy krwi^{202,207}. Z drugiej strony insulina zwiększa wewnątrzkomórkowe stężenie niefatyny-1 w adipocytach oraz zwiększa ekspresję receptorów aktywowanych przez proliferatory peroksysomów gamma (ang. peroxisome proliferator-activated receptor gamma, PPAR γ), które kolejno zwiększają ekspresję niefatyny-1²⁰⁷.

Dane literaturowe dotyczące korelacji między NKB i parametrami metabolicznymi są skąpe. W badaniu Andreozzi F. et al.²⁰⁹ z 2017 roku nie wykazano istotnych statystycznie korelacji między stężeniem KISS1 a stężeniami TCh, HDL, TG, glukozy i insuliny na czczo²⁰⁹. Niemniej w grupie pacjentek z PCOS stężenie insuliny na czczo ujemnie korelowało ze stężeniem KISS1 w surowicy ($r = -0,308$, $p < 0,05$)²¹⁰. W innym doniesieniu, również dotyczącym pacjentek z PCOS udowodniono natomiast, że stężenie KISS1 nie korelowało istotnie statystycznie ze stężeniem TCh, HDL oraz glikemii na czczo, podczas gdy wykazano istotne statystycznie korelacje pozytywne ze stężeniem TG ($r = 0,297$, $p = 0,001$), LDL ($r = 0,368$, $p = 0,001$), insuliny na czczo ($r = 0,199$, $p < 0,001$) oraz wartością wskaźnika HOMA-IR ($0,206$, $p < 0,001$)¹⁹⁸. Dane te mogą jedynie pośrednio sugerować możliwe oddziaływania między NKB a parametrami

metabolicznymi. Jak już wcześniej opisano, po pierwsze stężenie KISS1 jedynie pośrednio koreluje ze stężeniem NKB w surowicy, co nie pozwala na wyciągnięcie bezpośrednich wniosków. Po drugie przytoczone wyniki pochodzą z danych dotyczących innych jednostek chorobowych, charakteryzujących się zupełnie innymi zaburzeniami hormonalno-metabolicznymi, co również uniemożliwia bezpośrednie porównywanie uzyskanych wyników.

5.1.5. NKB i nesfatyna -1 a BMD

Pacjentki z FHA wykazywały charakterystyczne dla tej jednostki chorobowej obniżone BMD, a co za tym idzie istotnie statystycznie niższe T-score i Z-score w porównaniu do grupy kontrolnej. Jednocześnie nie wykazano istotnych statystycznie korelacji między stężeniem NKB i nesfatyny-1 a parametrami BMD, zarówno w grupie badanej, jak i kontrolnej.

U pacjentek z FHA głównym czynnikiem odpowiedzialnym za występowanie obniżonej BMD jest długotrwały hipiestrogenizm^{211,212,213}. Niedobór estrogenów prowadzi do wzrostu perforacji tkanki gąbczastej, zmniejszenia aktywności osteoblastów, wzrostu apoptozy oocytów oraz aktywacji procesu resorpcji kości²¹⁴.

Niemniej, udowodniono, że egzogenne podawanie nesfatyny-1 zwiększa BMD u samic szczurów po ovariectomii, co może sugerować pozytywny wpływ nesfatyny-1 na BMD²¹⁵. Dodatkowo, zaobserwowany wzrost stężenia nesfatyny-1 w trakcie dojrzewania chondrocytów, stymuluje prawidłowe formowanie kości i proces mineralizacji²¹⁵.

W wcześniej przytoczonym badaniu Bacopoulou F. et al. nie wykazano istotnej statystycznie korelacji między Z-score a stężeniem KISS1 w grupie pacjentek z jadłowstrętem psychicznym⁸¹. Analogicznie, jak w przypadku innych analizowanych parametrów, zależności wykryte w przypadku KISS1 jedynie pośrednio mogą odzwierciedlać zależności dla NKB. Z drugiej strony, na powierzchni osteoklastów wykazano obecność NK3R, co sugeruje, że NKB może stymulować różnicowanie osteoklastów oraz proces resorpcji kości²¹⁶.

5.2. Hormonalna terapia zastępcza w FHA

5.2.1. Zmiany w układzie hormonalnym, wyrównaniu metabolicznym oraz gospodarce *kostnej* w trakcie HTZ u pacjentek z FHA

HTZ wykorzystywany jest w ginekologii bardzo powszechnie, służy zarówno do zmniejszania nasilenia objawów wypadowych u pacjentek w okresie postmenopauzalnym, z drugiej strony wykorzystywany jest do leczenia takich schorzeń jak przedwczesna niewydolność jajników czy FHA, wstępujących zazwyczaj u młodych pacjentek. Hormonalna dwuskładnikowa terapia sekwencyjna, wykorzystana w powyższym badaniu, polega na podawaniu estrogenów oraz progestagenu w sposób imitujący naturalne wahania hormonalne występujące w prawidłowym cyklu miesięczkowym. Sekwencyjna dwuskładnikowa HTZ wykorzystywana jest szeroko w leczeniu FHA^{200,217}. Włączenie HTZ w FHA zaleca się po wstępnej krótkiej próbie nieudanego leczenia behawioralnego. Badania wykazały bowiem, że zmiana trybu życia, ograniczenie wysiłku fizycznego oraz zmiana diety powodują przywrócenie prawidłowej gospodarki hormonalnej oraz regularnych cykli miesięczkowych. Niemniej, doświadczenie wskazuje, że uzyskanie poprawy u pacjentek po krótkim okresie jedynie terapii behawioralnej jest bardzo trudne, w związku z czym w większości przypadków zastosowanie HTZ jest konieczne. W niektórych publikacjach udowodniono, że HTZ może poprawiać BMD u pacjentek z FHA^{217,218}. Ponadto w trakcie HTZ odnotowuje się znaczną poprawę jakości życia pacjentek z FHA. Wywołując jednak wymuszony, regularny cykl miesięczkowy może dawać pacjentce poczucie wyleczenia z choroby, pomimo nadal występujących zaburzeń na poziomie neurohormonalnym².

W przedstawianym badaniu zadano sobie więc pytanie: jak standardowo wykorzystywany w leczeniu FHA HTZ wpływa na regulację neurohormonalną, a w związku z tym, czy wpływa na etiopatogenezę FHA i czy może być uznawany za metodę zdolną do wyleczenia choroby.

W powyższym badaniu wykazano, że po zastosowaniu 6-miesięcznej sekwencyjnej hormonalnej terapii estrogenno-progestagennej (2 mg 17- β -estradiolu + 10 mg dydrogesteronu) doszło do statystycznie istotnego wzrostu stężenia E2 w surowicy krwi (wynikającego z suplementacji estradiolu w HTZ), jednocześnie w grupie badanej doszło do istotnego statystycznie obniżenia stężenia FSH w surowicy krwi, podczas gdy stężenie LH w surowicy krwi pozostało bez zmian, pomimo leczenia. Powyższe wyniki wydają się być logiczne, mając na uwadze fizjologiczne mechanizmy regulacji hormonalnej i pętli sprzężenia zwrotnego. W grupie pacjentek z FHA dochodzi jedynie do nieznacznego obniżenia stężenia FSH w surowicy, często pozostaje ono w granicach normy. W związku z faktem, iż stężenie FSH nie jest czynnikiem etiopatogenetycznym, podlega on prawidłowym mechanizmom

regulacyjnym i ulega on obniżeniu pod wpływem dwuskładnikowej HTZ. Stężenie LH natomiast, jako kryterium rozpoznania FHA, nie uległo istotnej statystycznie zmianie po leczeniu. Niemniej, w przypadku braku zaburzeń na poziomie neurohormonalnym, w niektórych badaniach podanie estrogenów zmniejsza wydzielanie LH podczas, gdy w innych wykazano wzrost stężenia LH oraz wzrost amplitudy pulsów LH po podaniu estrogenów^{219,220,221,222}. Zależności dotyczące stężenia FSH potwierdzają się w dostępnej literaturze, gdzie w grupie zdrowych kobiet lub pacjentek po menopauzie podawanie HTZ prowadzi do istotnego statystycznie spadku stężenia FSH w surowicy krwi^{223,224}. W badaniu wykazano również, że pomimo leczenia stężenia FSH, LH oraz E2 w surowicy krwi nadal pozostawały istotnie statystycznie niższe niż w grupie kontrolnej, w związku z czym leczenie nie spowodowało powrotu wymienionych hormonów do normalnych wartości.

Nie wykazano istotnej statystycznie zmiany stężenia testosteronu w surowicy krwi, po leczeniu pozostało statystycznie istotnie niższe niż w grupie kontrolnej, co jest zgodne z dostępnymi danymi literaturowymi²²³. Fakt ten może być również związany z brakiem zmiany stężenia LH w surowicy krwi, które jest głównym czynnikiem stymulującym syntezę testosteronu u kobiet.

Jednocześnie po leczeniu zaobserwowano istotny statystycznie spadek stężenia DHEA-S i wzrost stężenia porannego kortyzolu w surowicy krwi u pacjentek w grupie FHA. Stężenie kortyzolu pozostawało nadal statystycznie istotnie wyższe w porównaniu do grupy kontrolnej, co jest charakterystyczne dla pacjentek z FHA, stężenie DHEA-S w surowicy krwi pozostało natomiast bez istotnej statystycznie różnicy w porównaniu do grupy kontrolnej. Wzrost stężenia kortyzolu w surowicy krwi po leczeniu może być związane ze wzrostem stężenia nesfatyny-1 w surowicy krwi po leczeniu. Wykazano bowiem, że centralne podawanie nesfatyny-1 zwiększa stężenie krążącego ACTH. Jednocześnie obustronna adrenalectomia zwiększa ekspresję mRNA nesfatyny-1 w jądrze przykomorowym podwzgórza u szczura, co sugeruje, że z jednej strony wzrost stężenia nesfatyny-1 powoduje wzrost stężenia kortyzolu, z drugiej wzrost stężenia ACTH powoduje wzrost stężenia nesfatyny-1²²⁵.

Ponadto analiza korelacyjna nie wykazała istotnych statystycznie zależności między stężeniem NKB a stężeniem testosteronu, DHEA-S, i porannego kortyzolu w surowicy krwi po leczeniu. Wykazano natomiast istotną statystycznie dodatnią korelację między stężeniem testosteronu a stężeniem nesfatyny-1 w surowicy krwi, przy braku korelacji między stężeniem nesfatyny-1 a stężeniem DHEA-S i porannego kortyzolu w surowicy krwi. Brak jest w bazach danych jakiegokolwiek literatury dotyczącej wyżej wymienionych korelacji, są to nowe dane, które wymagają weryfikacji w dalszych badaniach nad pacjentkami z FHA.

Analizując parametry metaboliczne, zauważano, że po 6-miesięcznej HTZ doszło do istotnego statystycznie wzrostu BMI, jednocześnie po leczeniu pozostawało ono nadal statystycznie istotnie niższe niż w populacji zdrowej. W związku z tym, że u obserwowanych pacjentek wdrożono jednocześnie modyfikację stylu życia, jak i HTZ, nie można jednoznacznie stwierdzić, który z wymienionych czynników w większym stopniu przyczynił się do odnotowanej zmiany.

Podobnie jak w przypadku stanu przed leczeniem, nie wykazano istotnych statystycznie korelacji między BMI a stężeniami NKB i nesfatyny-1 w surowicy krwi. Wyniki własne pokrywają się z danymi literaturowymi, gdzie wykazano wzrost BMI u pacjentek z FHA w trakcie HTZ²⁰⁰. Jednocześnie w literaturze zaobserwowano statystycznie istotnie większy wzrost BMI u pacjentek z samoistnym powrotem miesiączek w porównaniu do pacjentek z utrzymującym się wtórnym brakiem miesiączki²⁰⁰, co może być wykorzystane jako czynnik prognostyczny powrotu fizjologicznego cyklu miesiączkowego i wyzdrowienia.

Po leczeniu u pacjentek w grupie FHA zaobserwowano wzrost stężenia insuliny w wyniku stosowania HTZ, jednocześnie zaobserwowano statystycznie istotny wzrost wskaźnika HOMA-IR. Wskaźnik HOMA-IR (średnia oraz mediana) po leczeniu pozostawał jednak w zakresie prawidłowych wartości. Wyniki te potwierdzają dane z piśmiennictwa, gdzie zaobserwowano statystycznie istotny wzrost insulinooporności w wyniku HTZ^{226,227}. Niemniej, dane dotyczące wpływu HTZ są sprzeczne, w literaturze wykazywano również brak wpływu HTZ na insulinooporność²²⁸, a także istotne statystycznie obniżenie stężenia insuliny oraz istotne statystycznie obniżenie wskaźnika HOMA-IR po zastosowaniu HTZ²²⁹. Odmienne obserwacje mogą wynikać z różnic w wieku pacjentek włączonych do badań czy różnic w użytych preparatach hormonalnych. W badaniach, w których użyto skoniugowanych estrogenów w dawce 0,625 mg z dodatkiem octanu medroksyprogesteronu (2,5 mg) zaobserwowano wzrost insulinooporności, w przypadku użycia 17- β -estradiolu w dawce 1 mg w połączeniu z octanem noretisteronu w dawce 0,5 mg nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic, natomiast w przypadku zastosowania 1 mg 17- β -estradiolu w połączeniu z 2 mg drospirenonu doszło do istotnego statystycznie spadku insulinooporności^{226,227,228,229}. W prezentowanym obecnie badaniu użyto HTZ o najlepszym profilu działania metabolicznego, pomimo tego zaobserwowano wzrost insulinooporności po leczeniu. Istotny statystycznie wzrost stężenia insuliny może być związany z faktem, że wyjściowo w grupie pacjentek z FHA wykryto istotnie statystycznie niższe stężenie insuliny i wskaźnika HOMA-IR. Na poparcie tej tezy warto przytoczyć fakt, że pomimo istotnego statystycznie wzrostu stężenia insuliny w surowicy krwi i wskaźnika HOMA-IR po leczeniu, oba parametry nadal pozostawały istotnie statystycznie niższe niż w grupie kontrolnej. Ponadto, wzrost stężenia insuliny w surowicy krwi po leczeniu można tłumaczyć wzrostem stężenia nesfatyny-1 w surowicy krwi po leczeniu. Jak wcześniej przytoczono, nesfatyna-1 zwiększa wyrzut insuliny i wzrost ekspresji mRNA dla preproinsuliny w tkankach trzustki. Ponadto wykazano, że u chorych na cukrzycę typu II oraz u pacjentek w ciąży powikłanej cukrzycą ciążową dochodzi do obniżenia stężenia nesfatyny-1^{202,207}. Stężenie glukozy w surowicy krwi po leczeniu, pomimo wzrostu stężenia insuliny w surowicy krwi, pozostało bez statystycznie istotnych różnic w porównaniu zarówno ze stężeniem przed leczeniem w grupie FHA, jak i w porównaniu do grupy kontrolnej.

Wykazano również statystycznie istotną pozytywną korelację między stężeniem insuliny a stężeniem NKB w surowicy krwi oraz negatywną korelację między stężeniem glukozy a stężeniem nesfatyny-1 w surowicy krwi w grupie pacjentek z FHA po leczeniu. Wykryte korelacje przełożyły się na wystąpienie statystycznie istotnych korelacji między wskaźnikiem

HOMA-IR a badanymi neurohormonami. Z uwagi na hipoglikemizujące działanie nesfatyny, ujemna korelacja między stężeniem nesfatyny-1 a stężeniem glukozy wydaje się być logiczna i pozostaje w zgodności ze znaną literaturą^{202,207}.

Po leczeniu nie zaobserwowano istotnych statystycznie zmian w stężeniu frakcji lipidowych, jednocześnie nieistotny statystycznie spadek TCh spowodował, że stężenie TCh u pacjentek z FHA po leczeniu nie wykazało istotnej statystycznie różnicy względem grupy kontrolnej (zmiana w stosunku do stanu przed leczeniem). Jednocześnie nie wykazano statystycznie istotnych korelacji między stężeniami NKB i nesfatyny-1 w surowicy krwi a stężeniem TCh, frakcji LDL i TG, zaobserwowano natomiast statystycznie istotną ujemną korelację między stężeniem frakcji HDL a stężeniem NKB w surowicy krwi.

Efekt pozytywny HTZ na profil lipidowy jest w szeroki sposób opisywany w literaturze. Udowodniono, że HTZ powoduje spadek stężenia TCh, jak i frakcji HDL ale również HDL, ponadto obniża stężenie TG²³⁰. W prezentowanym badaniu udało się wykazać jedynie nieistotny statystycznie spadek TCh, niemniej pierwotnie nie zaobserwowano podwyższonego stężenia ani TG, ani LDL w grupie chorych przed leczeniem.

Ponadto nie zaobserwowano zmiany gęstości mineralnej kości po leczeniu w grupie FHA, BMD nadal pozostawało statystycznie istotnie niższe niż w grupie kontrolnej. Zaobserwowano natomiast istotną statystycznie ujemną korelację między stężeniem NKB w surowicy krwi a BMD oraz T-score. Badania dotyczące wpływu HTZ na BMD w FHA są sprzeczne. Niektóre z nich wykazują brak poprawy BMD u pacjentek leczonych z powodu FHA^{231,232,11}. Obserwacje te potwierdziły się w wynikach prezentowanego badania. Niemniej, część badań wskazuje na pozytywny wpływ suplementacji estrogenowej w HTZ na BMD u pacjentek z jądłowstrętem psychicznym^{217,218}. W prezentowanym badaniu nie zaobserwowano zmiany BMD, niemniej leczenie oraz obserwacja pacjentek trwała 6 miesięcy. Być może w dłuższej obserwacji pacjentek uzyskanoby istotny statystycznie wzrost BMD, niemniej projekt prezentowanego badania obejmował obserwację sześciomiesięczną. Podczas gdy dane dotyczące wpływu HTZ na BMD wahają się od braku wpływu do pozytywnego działania na BMD, w literaturze dostępne są badania wyraźnie wykazujące negatywny efekt doustnej antykoncepcji na stan kości u pacjentek z FHA^{2,4,232,233}. Ponadto u pacjentek, z uwagi na ich preferencje, zdecydowano się na włączenie HTZ doustnego. Pewne dane z literatury sugerują, iż terapia transdermalna może wywierać istotnie lepszy efekt na BMD niż terapia doustna, niemniej dane te są niejednoznaczne^{2,234}.

W badaniu wykazano statystycznie istotne zmiany stężenia NKB i nesfatyny-1 w surowicy krwi po 6 miesiącach HTZ. Jak opisano wcześniej, egzogenne podawanie nesfatyny-1 zwiększa BMD u samic szczurów po owariektomii²¹⁵. Zaobserwowany w badaniu wzrost stężenia nesfatyny-1 w surowicy krwi mógłby potencjalnie mieć wpływ na wzrost BMD, takich zależności jednak nie wykazano. Zaobserwowano natomiast ujemną korelację między stężeniem NKB w surowicy krwi a BMD, co może mieć związek z aktywacją osteoklastów przez NKB i jej

potencjałem do indukcji kościogubienia. Z drugiej strony, u pacjentek z FHA, również po leczeniu, obserwowano obniżone stężenie NKB w surowicy krwi w porównaniu do grupy kontrolnej (po leczeniu bez istotności statystycznej), co raczej powinno hamować proces kościogubienia potencjalnie wywołany przez NKB²¹⁶.

5.2.2. Zmiany stężenia NKB i nesfatyny-1 w trakcie HTZ u pacjentek z FHA

U pacjentek w grupie FHA po leczeniu zaobserwowano istotny statystycznie wzrost stężenia nesfatyny-1 w surowicy krwi w porównaniu do stanu przed leczeniem ($6,21 \pm 4,79$ mmol/L vs. $6,63 \pm 4,15$ mmol/L; mediany odpowiednio 4,64 mmol/L oraz 6,10 mmol/L; $p=0,006$). Jednocześnie porównując stężenie nesfatyny-1 w surowicy krwi po leczeniu ze stężeniem w grupie kontrolnej nie wykazano istotnej statystycznie różnicy, co wskazuje, że po leczeniu pacjentki osiągnęły stężenie nesfatyny-1 w surowicy krwi bez statystycznej różnicy z grupą kontrolną.

W tym miejscu warto zadać pytanie, czy zmiana stężenia nesfatyny-1 spowodowana została samym leczeniem hormonalnym, czy zmianami w dodatkowych badanych parametrach, które, jak udowodniono, mogą w znaczący sposób wpływać na stężenie nesfatyny-1 w surowicy.

Istotny statystycznie wzrost BMI po leczeniu oraz istotny statystycznie wzrost stężenia insuliny wydają się być najważniejszymi zmianami mogącymi mieć wpływ na wzrost stężenia nesfatyny-1 w surowicy krwi. Jak opisano powyżej, wpływ BMI na stężenie nesfatyny-1 w surowicy krwi jest niespójny w danych literaturowych. Niemniej, część badań wskazuje na pozytywną korelację między ww. wskaźnikami^{169,171,172}. Najistotniejszą obserwacją wydaje się być fakt, iż stężenie nesfatyny-1 w surowicy krwi pozytywnie korelowało z BMI w badaniu przeprowadzonym na grupie pacjentek z jadłowstrętem psychicznym o charakterze restrykcyjnym ($R=0,520$; $p<0,05$)¹⁷⁰, czyli na grupie badanej podobnej do grupy z prezentowanego badania. Wzrost BMI po leczeniu w tym przypadku może powodować wzrost stężenia nesfatyny-1 w surowicy krwi. Dodatkowo, w grupie pacjentek z FHA po leczeniu wykryto istotnie statystycznie wyższe stężenie insuliny w surowicy w porównaniu do stanu przed leczeniem. Jak przytoczono powyżej, nesfatyna-1 zwiększa wyrzut insuliny i wzrost ekspresji mRNA dla preproinsuliny w tkance trzustki^{202,207}. Z drugiej strony insulina zwiększa wewnątrzkomórkowe stężenie nesfatyny-1 w adipocytach oraz zwiększa ekspresję receptorów aktywowanych przez proliferatory peroksysomów gamma (ang. peroxisome proliferator-activated receptor gamma, PPAR γ), które kolejno zwiększają ekspresję nesfatyny-1²⁰⁷. W związku z tym trudno jest jednoznacznie stwierdzić, czy to podwyższone stężenie nesfatyny-1 po leczeniu powoduje wzrost stężenia insuliny, czy raczej wzrost stężenia insuliny spowodowany HTZ indukuje wzrost stężenia nesfatyny-1.

W przypadku stężenia NKB w surowicy krwi, nie zaobserwowano istotnej statystycznie różnicy między stężeniem po leczeniu w porównaniu do stężenia przed leczeniem w grupie FHA ($628,35 \pm 324,92$ ng/L vs. $623,54 \pm 296,07$ ng/L; mediany odpowiednio 494,11 ng/L oraz 523,29 ng/L; $p=0,93$). Podobnie jednak, jak w przypadku nesfatyny-1, u pacjentek z FHA po leczeniu nie zaobserwowano istotnej statystycznie różnicy w porównaniu do grupy kontrolnej (jednak z nieistotną statystycznie tendencją do niższych stężeń w grupie badanej).

Brak różnicy w stężeniu NKB w surowicy krwi w grupie FHA przed i po leczeniu wydaje się rzucać wyjątkowe światło na sposób leczenia pacjentek z FHA. Pod wpływem HTZ bowiem pacjentki zaczynają regularnie miesiączkować, co daje złudne poczucie wychodzenia z choroby, podczas gdy główne czynniki etiopatogenetyczne wywołujące chorobą nie ulegają poprawie. FSH, które nie jest co prawda głównym czynnikiem powodującym FHA ulega w mechanizmie sprzężenia zwrotnego dalszemu obniżeniu, LH nie ulega żadnej istotnej statystycznie zmianie, najprawdopodobniej przez brak istotnej statystycznie zmiany stężenia NKB w surowicy krwi, które jest jednym z głównych regulatorów układu rozrodczego i ulega ewidentnemu obniżeniu w FHA.

Oczywiście, HTZ w FHA ma nie tylko za zadanie przywracanie miesiączek. Przede wszystkim jest wykorzystywane w celu zapobiegania odległym skutkom przewlekłego hipostrogenizmu, czyli obniżeniu BMD, chorobom układu sercowo-naczyniowego czy inwolucji układu rozrodczego. Powyższe badanie udowadnia jednak, że HTZ nie wpływa na przyczynę choroby. Należy podczas leczenia o tym pamiętać oraz uczulić pacjentkę na ten fakt i dążyć do wprowadzenia u takich pacjentek skutecznej terapii behawioralnej.

Po leczeniu, analogicznie jak w sytuacji przed leczeniem w grupie FHA czy w grupie zdrowej, nie zaobserwowano korelacji między stężeniem NKB i nesfatyny-1 w surowicy krwi. Brak istotnej statystycznie korelacji między stężeniem NKB i stężeniem nesfatyny-1 w surowicy krwi może wynikać z faktu, że oba neurohormony znajdują się w innym szlaku regulacji. Jednocześnie pewne przesłanki z literatury sugerują możliwość połączenia tych dwóch układów regulacyjnych, niemniej dane te są skąpe i niejednoznaczne, co utrudnia analizę powyższych wyników.

5.2.3. Czynniki prognostyczne wystąpienia wtórnego braku miesiączki- krzywe ROC, analizy wielowymiarowe

Dane literaturowe dotyczące ryzyka wystąpienia wtórnego braku miesiączki w przebiegu FHA są niejednoznaczne. Nie zaobserwowano, aby o rozwinięciu wtórnego braku miesiączki decydował spadek BMI, spadek bezwzględnej masy ciała czy spadek procentowy tkanki tłuszczowej. Wobec tego, w prezentowanym badaniu starano się znaleźć modele umożliwiające prognozowanie wystąpienia wtórnego braku miesiączki u pacjentek

z czynnikami ryzyka FHA. Wykorzystując analizy wielowymiarowe uzyskano 2 modele, cechujące się największą czułością i swoistością w poszukiwaniu wtórnego braku miesiączki u pacjentek z FHA (patrz rozdział 4.4 i 4.5).

W analizie krzywych ROC porównano m.in. potencjał oceny stężenia nefatyny-1 i NKB w surowicy krwi jako czynników predykcyjnych wystąpienia wtórnego braku miesiączki. Wykazano, że ocena stężenia NKB w surowicy krwi cechuje się większą specyficznością (AUB 0,6, punkt odcięcia 468,78 ng/L, specyficzność 79,31%), podczas gdy ocena stężenia nefatyny-1 w surowicy krwi cechuje się większą czułością, na poziomie 57,36% (AUC 0,63, punkt odcięcia 5,2mmol/L. Nie wykazano istotnej statystycznie różnicy między krzywymi ROC dla NKB i nefatyny-1 ($p=0,074$)

Porównanie krzywych ROC dla najlepszych parametrów hormonalnych i metabolicznych wykazało, że BMI jest istotnie statystycznie najlepszym pojedynczym czynnikiem prognostycznym (punkt odcięcia 21,7 kg/m²; czułość: 84,14%; swoistość: 51,14%).

Wykorzystując analizy wielowymiarowe 3 metodami uzyskano 2 modele, spośród których najlepszy wydaje się być model zbudowany metodą drzew klasyfikacyjnych, wykorzystujący stężenie FSH, testosteronu oraz insuliny do prognozy wystąpienia wtórnego braku miesiączki u pacjentek z czynnikami ryzyka FHA. Czułość modelu wynosi odpowiednio 88,73%; swoistość 80,68%; wartość predykcyjna dodatnia 0,88; wartość predykcyjna ujemna 0,82. Jedynie dwa z 6 zbudowanych modeli charakteryzowały się większą czułością na poziomie 89,06% oraz 92,97% (Tabela XXVII). Niemniej, wykazywały one również zdecydowanie niższą swoistość, odpowiednio 31,03% oraz 53,45%. Ponadto, w ich budowie wykorzystano ocenę stężenia nefatyny-1, co sprawia, że model okazuje się dużo trudniejszy do zastosowania w postępowaniu klinicznym.

Podsumowanie

Czynnościowy podwzgórzowy brak miesiączki jest przewlekłym schorzeniem endokrynnym spowodowanym zaburzeniem pulsacyjnego wydzielania hormonów na poziomie podwzgórza, co doprowadza do rozwoju wtórnego braku miesiączki. Jednymi z neurohormonów odpowiadających za wydzielanie GnRH przez podwzgórze są NKB oraz nesfatyna-1. Badanie udowodniło występowanie istotnie statystycznie niższego stężenia NKB oraz nesfatyny-1 w surowicy krwi u pacjentek chorych na FHA.

W badaniu zanalizowano również stężenie NKB i nesfatyny-1 w surowicy krwi po 6 miesiącach leczenia sekwencyjną hormonalną terapią estrogenno-progestagenną (2 mg 17- β -estradiolu + 10 mg dydrogesteronu). Zaobserwowano statystycznie istotny wzrost stężenia nefatyny-1 w surowicy krwi (mediana stężenia przed leczeniem 4,64 mmol/L, mediana stężenia po leczeniu 6,10 mmol/L, $p=0,006$). Jednocześnie nie zaobserwowano istotnej statystycznie różnicy w stężeniu NKB w surowicy krwi między pacjentkami w grupie FHA przed i po leczeniu.

Brak różnicy w stężeniu NKB w surowicy krwi w grupie FHA przed i po leczeniu wydaje się rzucać wyjątkowe światło na sposób leczenia pacjentek z FHA. Pod wpływem HTZ bowiem pacjentki zaczynają regularnie miesiączkować, co może dawać pacjentce poczucie wyzdrowienia, podczas gdy regulacja neurohormonalna w jądrach podwzgórza może nadal pozostawać zaburzona.

FSH nie jest co prawda głównym czynnikiem powodującym FHA, natomiast jego stężenie w surowicy krwi ulega w mechanizmie sprzężenia zwrotnego obniżeniu, stężenie LH w surowicy krwi nie ulega żadnej istotnej statystycznie zmianie. Brak zmian stężenia LH w surowicy krwi wynika najprawdopodobniej z braku istotnej statystycznie zmiany stężenia NKB w surowicy krwi, które jest jednym z głównych regulatorów układu rozrodczego i ulega ewidentnemu obniżeniu w FHA.

6. WNIOSKI

Na podstawie powyższych badań zostały sformułowane następujące wnioski:

1. Pacjentki z czynnościowym podwzgórzowym brakiem miesiączki charakteryzują się zaburzonym wydzielaniem NKB oraz nesfatyny-1.
2. Obniżone stężenia NKB i nesfatyny-1 w surowicy krwi mogą stanowić potencjalne markery w diagnostyce czynnościowego braku miesiączki.
3. Hormonalna terapia zastępcza może w istotny sposób wpływać na stężenie nesfatyny-1 w surowicy krwi, jednocześnie nie zmieniając stężenia NKB w surowicy krwi, co może sugerować brak wpływu na główny czynnik etiopatogenetyczny FHA.

7. STRESZCZENIE

Wstęp: Czynnościowy podwzgórzowy brak miesiączki (ang. functional hypothalamic amenorrhea, FHA) jest przewlekłym schorzeniem endokrynnym spowodowanym zaburzeniem pulsacyjnego wydzielania hormonów na poziomie podwzgórza, co doprowadza do rozwoju wtórnego braku miesiączki. Udowodniono, że „nad” neuronami GnRH w szlaku regulacji znajdują się neurony, które dzięki szerokiej gamie receptorów zlokalizowanych na swojej powierzchni są w stanie odbierać impulsy z różnych układów regulacyjnych podwzgórza, wydzielają substancję zarówno autoregulując pracę swoją oraz okolicznych neuronów oraz mają zdolność pobudzania neuronów GnRH do pulsacyjnego wydzielania GnRH do krążenia wrotnego. Neurony te wydzielają m.in. NKB oraz nesfatynę-1, regulujące niższe partie układu, co skutkuje synchronicznym, skoordynowanym pobudzaniem lub hamowaniem neuronów wydzielających GnRH.

Cel: Ocena wydzielania NKB oraz nefatyny-1 u pacjentek z FHA, porównanie stężenia NKB oraz nesfatyny-1 w surowicy krwi pacjentek z FHA z grupą kontrolną oraz ocena stężenia wymienionych neurohormonów w surowicy krwi po 6 miesiącach terapii estrogenno-progestagennej w grupie FHA.

Materiał: Do badania włączono 147 kobiet w wieku od 15 do 39 lat u których rozpoznano czynnościowy podwzgórzowy brak miesiączki na podstawie kryteriów zgodnych z wytycznymi Endocrine Society z 2017 roku. Grupę kontrolną stanowiło 88 zdrowych kobiet dobranych pod względem wieku do grupy badanej.

Metody: U wszystkich kobiet przeprowadzono badanie podmiotowe. Ponadto, u wszystkich pacjentek przeprowadzono badanie przedmiotowe, obejmujące: masę ciała, wzrost, BMI, badanie ginekologiczne, badanie ultrasonograficzne narządu rodowego. W grupie badanej krew pobrana została po zakwalifikowaniu pacjentki do grupy z FHA oraz po 6 miesiącach hormonalnej terapii estrogenno-progestagennej. W grupie kontrolnej krew pobierana była w fazie folikularnej, około 11-13 dnia cyklu, przy współistnieniu pęcherzyka dominującego w jajniku (10 lub więcej mm średnicy) oraz stężeniu 17-β- estradiolu >90 pg/ml. U każdej pacjentki oznaczono stężenie FSH, LH, 17-β- estradiolu, prolaktyny, testosteronu, DHEA-S, porannego kortyzolu, TSH oraz fT4 w surowicy krwi. Oznaczono również parametry wyrównania metabolicznego pacjentek: stężenie glukozy oraz insuliny na czczo (wyliczono wskaźnik HOMA-IR), stężenie cholesterolu całkowitego, frakcji HDL, frakcji LDL oraz trójglicerydów w surowicy krwi. U wszystkich pacjentek włączonych do badania wykonano również badanie gęstości mineralnej kości. U każdej pacjentki w grupie badanej przed i po 6 miesiącach terapii estrogenno - progestagennej oraz w grupie kontrolnej zostało wykonane oznaczenie stężenia NKB oraz nesfatyny-1 w surowicy krwi. U 55 pacjentek z FHA w momencie diagnozy została włączona sekwencyjna hormonalna terapia estrogenno-progestagenna (2 mg

17- β -estradiolu + 10 mg dydrogesteronu) na okres 6 miesięcy. Badanie otrzymało zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (uchwała nr 1265/18)

Wyniki: Grupa FHA wykazała istotnie statystycznie niższe BMI w porównaniu do grupy kontrolnej, ponadto prezentowała charakterystyczny dla jednostki chorobowej hipogonadyzm hipogonadotropowy. Analiza stężeń NKB oraz nesfatyny-1 w surowicy krwi w grupie FHA oraz w grupie kontrolnej wykazała istotnie statystycznie niższe stężenia NKB oraz nesfatyny-1 w surowicy krwi w grupie FHA. Mediana stężenia nesfatyny-1 w surowicy krwi w grupie FHA wynosiła 4,64 mmol/L, natomiast w grupie kontrolnej 6,91 mmol/L ($p=0,005$), mediana stężenia NKB w surowicy krwi wynosiła odpowiednio 494,11 ng/L w grupie FHA oraz 636,07 ng/L w grupie kontrolnej. Po 6 miesiącach leczenia sekwencyjną hormonalną terapią estrogenno-progestagenną w grupie FHA zaobserwowano statystycznie istotny wzrost stężenia nefatyny-1 w surowicy krwi (mediana stężenia przed leczeniem 4,64 mmol/L, mediana stężenia po leczeniu 6,10 mmol/L, $p=0,006$). Jednocześnie nie zaobserwowano istotnej statystycznie różnicy w stężeniu NKB w surowicy krwi między pacjentkami w grupie FHA przed i po leczeniu. Zaobserwowano istotną statystycznie korelację między stężeniem NKB a stężeniem E2 w surowicy krwi w grupie kontrolnej ($R=-0,26$; $p=0,046$). Nie wykazano natomiast statystycznie istotnych zależności między BMI a stężeniem NKB i nesfatyny-1 w surowicy krwi, zarówno w grupie badanej przed i po leczeniu, jak i w grupie kontrolnej.

Wnioski: W grupie pacjentek z FHA zaobserwowano statystycznie istotnie niższe stężenia NKB oraz nesfatyny-1 w surowicy krwi w porównaniu do grupy kontrolnej, co może zostać wykorzystane jako potencjalny czynnik diagnostyczny choroby. Po 6 miesiącach leczenia sekwencyjną hormonalną terapią estrogenno-progestagenną w grupie FHA zaobserwowano statystycznie istotny wzrost stężenia nefatyny-1 w surowicy krwi, bez istotnych statystycznie zmian stężenia NKB w surowicy krwi, co może sugerować brak wpływu HTZ na główne czynniki etiopatogenetyczne FHA.

Słowa kluczowe: Czynnościowy podwzgórzowy brak miesiączki, neurokinina B, KNDy, nesfatyna-1

8. SUMMARY

Introduction: Functional hypothalamic amenorrhea (FHA) is a chronic endocrine disorder caused by abnormal pulsatile secretion of neurohormones in the hypothalamus. This leads to the development of secondary amenorrhea.

Secretion of GnRH is regulated by neurohormones produced by the neurons that present wide range of receptors on their surface, thus are able to receive information from various hypothalamic regulatory systems. These neurons secrete, among other neurohormones, NKB and nesfatin-1, regulating the lower parts of the hypothalamus, which results in synchronous, coordinated stimulation or inhibition of GnRH secreting neurons.

Aim of the study: Comparison of NKB and nesfatin-1 serum concentration in patients with FHA with the control group and assessment of the serum NKB and nesfatin-1 concentration after 6 months of estrogen-progestagen therapy in the FHA group.

Material: One hundred and forty-seven patients with functional hypothalamic amenorrhea diagnosed according to 2017 Endocrine Society guidelines criteria, aged 15-39, were included to the study. The control group consisted of 88 healthy age-matched women.

Methods: Information about age of menarche, past hospitalizations, past treatment, obstetric history, chronic illness, medications, hormone therapy, drug sensitization and family history were taken from anamnesis in both FHA and control group. Weight and height were measured for each patient and BMI was calculated. Every patient underwent gynecological and ultrasound examination of the reproductive system.

Venous blood samples were collected in a fasting state in order to determine the serum concentrations of: follicle stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH), 17- β -estradiol (E2), prolactin (PRL), testosterone (T) and dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA-S), thyroid-stimulating hormone (TSH) and free thyroxine (fT4). Fasting glucose and insulin were also determined (HOMA-IR index was calculated). Additionally, the lipid profile containing total cholesterol, HDL fraction, LDL fraction and triglycerides was measured. In FHA group blood samples were collected after FHA diagnosis and after 6 months of hormone replacement therapy. In the control group, blood was collected in the late follicular phase (10–12th day of the cycle). BMD (g/cm²) was measured on the lumbar spine (L1–L4) by dual-energy X-ray absorptiometry in each patient in the studied group and in the control group. 55 patients with FHA were prescribed at the diagnosis with sequential estrogen-progestogen hormonal therapy (2 mg of 17- β -estradiol + 10 mg of dydrogesterone) for 6 months. Serum NKB and nesfatin-1 concentration was measured in every patient in the FHA group before and after 6 months of estrogen-progestogen therapy and in the control group.

The study was approved by the Poznan University of Medical Sciences Bioethics Committee (resolution no. 1265/18)

Results: The study group presented hormonal profile corresponding to hypogonadotropic hypogonadism, characteristic for the FHA. FHA group had statistically significantly lower BMI compared to the control group. Analysis of NKB and nesfatin-1 levels in the FHA group and in the control group showed significantly lower NKB and nesfatin-1 levels in the FHA group. The median concentration of nesfatin-1 in the FHA group was 4.64 mmol/L, while in the control group 6.91 mmol/L ($p = 0.005$), the median NKB concentration was 494.11 ng/L in the FHA group and 636.07 respectively ng/L in the control group. After 6 months of sequential estrogen-progestogen hormone therapy, a significant increase in nefatin-1 (median pre-treatment concentration 4.64 mmol/L, median post-treatment concentration 6.10 mmol/L, $p = 0.006$) was observed in the FHA group. At the same time, no statistically significant difference in NKB concentration was observed between patients in the FHA group before and after treatment. A significant correlation was observed between NKB concentration and E2 concentration in the control group ($R = -0.26$; $p = 0.046$). However, no significant relationship between BMI and NKB and nesfatin-1 was demonstrated, both in the pre-and post-treatment group and in the control group

Conclusions: FHA patients presented significantly lower serum NKB and nesfatin-1 concentration when compared to the control group. Taking this into consideration, serum NKB and nesfatin-1 concentration can be used as a potential diagnostic factor for FHA. After 6 months of sequential estrogen-progestogen hormone therapy, a significant increase in nefatin-1 concentration was observed in the FHA group, without significant changes in NKB levels, which may suggest a lack of HRT effect on major FHA etiopathogenetic factors.

Key words: Functional hypothalamic amenorrhea, neurokinin B, nesfatin-1, KNDy

Bibliografia

1. Lania A, Gianotti L, Gagliardi I, Bondanelli M, Vena W, Ambrosio MR. Functional hypothalamic and drug-induced amenorrhea: an overview. *J Endocrinol Invest*. 2019;42(9):1001-1010.
2. Gordon CM, Ackerman KE, Berga SL, et al. Functional Hypothalamic Amenorrhea: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. March 2017.
3. Klein DA, Paradise SL, Reeder RM. Amenorrhea: A Systematic Approach to Diagnosis and Management. *Am Fam Physician*. 2019;100(1):39-48.
4. Shufelt CL, Torbati T, Dutra E. Hypothalamic Amenorrhea and the Long-Term Health Consequences. *Semin Reprod Med*. 2017;35(3):256-262.
5. De Souza MJ, Nattiv A, Joy E, et al. 2014 Female Athlete Triad Coalition Consensus Statement on Treatment and Return to Play of the Female Athlete Triad: 1st International Conference held in San Francisco, California, May 2012 and 2nd International Conference held in Indianapolis, Indiana, May 2013. *Br J Sports Med*. 2014;48(4):289.
6. Golden NH, Jacobson MS, Schebendach J, Solanto M V, Hertz SM, Shenker IR. Resumption of Menses in Anorexia Nervosa. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 1997;151(1):16.
7. Meczekalski B, Katulski K, Czyzyk A, Podfigurna-Stopa A, Maciejewska-Jeske M. Functional hypothalamic amenorrhea and its influence on women's health. *J Endocrinol Invest*. 2014;37(11):1049-1056.
8. Ouyang P, Michos ED, Karas RH. Hormone Replacement Therapy and the Cardiovascular System. *J Am Coll Cardiol*. 2006;47(9):1741-1753.
9. Ostberg JE, Donald AE, Halcox JPJ, Storry C, McCarthy C, Conway GS. Vasculopathy in Turner Syndrome: Arterial Dilatation and Intimal Thickening without Endothelial Dysfunction. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(9):5161-5166.
10. Bairey Merz CN, Johnson BD, Sharaf BL, et al. Hypoestrogenemia of hypothalamic origin and coronary artery disease in premenopausal women: a report from the NHLBI-sponsored WISE study. *J Am Coll Cardiol*. 2003;41(3):413-419.
11. Dadgostar H, Soleimany G, Movaseghi S, Dadgostar E, Lotfian S. The effect of hormone therapy on bone mineral density and cardiovascular factors among Iranian female athletes with amenorrhea/oligomenorrhea: A randomized clinical trial. *Med J Islam Repub Iran*. 2018;32(1):151-157.
12. Sowińska-Przepiera E, Andrysiak-Mamos E, Jarząbek-Bielecka G, et al. Czynnościowy podwzgórzowy brak miesiączki – trudności diagnostyczne, monitorowanie i leczenie.

Endokrynol Pol. 2015;66(3):252-268.

13. Meczekalski B, Podfigurna-Stopa A, Genazzani AR. Hypoestrogenism in young women and its influence on bone mass density. *Gynecol Endocrinol.* 2010;26(9):652-657.
14. Hind K. Recovery of bone mineral density and fertility in a former amenorrheic athlete. *J Sports Sci Med.* 2008;7(3):415-418.
15. Fazeli PK, Klibanski A. Effects of Anorexia Nervosa on Bone Metabolism. *Endocr Rev.* 2018;39(6):895-910.
16. Frusztajer NT, Dhuper S, Warren MP, Brooks-Gunn J, Fox RP. Nutrition and the incidence of stress fractures in ballet dancers. *Am J Clin Nutr.* 1990;51(5):779-783.
17. Ackerman KE, Sokoloff NC, De Nardo Maffazioli G, Clarke HM, Lee H, Misra M. Fractures in relation to menstrual status and bone parameters in young athletes. *Med Sci Sports Exerc.* 2015;47(8):1577-1586.
18. Crandall CJ, Tseng C-H, Karlamangla AS, et al. Serum Sex Steroid Levels and Longitudinal Changes in Bone Density in Relation to the Final Menstrual Period. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(4):E654-E663.
19. Taes Y, Lapauw B, Vandewalle S, et al. Estrogen-specific action on bone geometry and volumetric bone density: Longitudinal observations in an adult with complete androgen insensitivity. *Bone.* 2009;45(2):392-397.
20. Seeman E. Pathogenesis of bone fragility in women and men. *Lancet.* 2002;359(9320):1841-1850.
21. Khosla S, Oursler MJ, Monroe DG. Estrogen and the skeleton. *Trends Endocrinol Metab.* 2012;23(11):576-581.
22. Meczekalski B, Podfigurna-Stopa A, Genazzani AR. Hypoestrogenism in young women and its influence on bone mass density. *Gynecol Endocrinol.* 2010;26(9):652-657.
23. Weitzmann MN, Pacifici R. Estrogen deficiency and bone loss: an inflammatory tale. *J Clin Invest.* 2006;116(5):1186-1194.
24. Misra M. What is the best strategy to combat low bone mineral density in functional hypothalamic amenorrhea? *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2008;4(10):542-543.
25. Giles DE, Berga SL. Cognitive and psychiatric correlates of functional hypothalamic amenorrhea: a controlled comparison. *Fertil Steril.* 1993;60(3):486-492.
26. Dundon CM, Rellini AH, Tonani S, Santamaria V, Nappi R. Mood disorders and sexual functioning in women with functional hypothalamic amenorrhea. *Fertil Steril.* 2010;94(6):2239-2243.
27. Cano Sokoloff N, Eguiguren ML, Wargo K, et al. Bone parameters in relation to attitudes and feelings associated with disordered eating in oligo-amenorrheic athletes,

- eumenorrheic athletes, and nonathletes. *Int J Eat Disord*. 2015;48(5):522-526.
28. Keski-Rahkonen A, Mustelin L. Epidemiology of eating disorders in Europe. *Curr Opin Psychiatry*. 2016;29(6):340-345.
 29. Bomba M, Corbetta F, Bonini L, et al. Psychopathological traits of adolescents with functional hypothalamic amenorrhea: a comparison with anorexia nervosa. *Eat Weight Disord - Stud Anorexia, Bulim Obes*. 2014;19(1):41-48.
 30. Lawson EA, Donoho D, Miller KK, et al. Hypercortisolemia Is Associated with Severity of Bone Loss and Depression in Hypothalamic Amenorrhea and Anorexia Nervosa. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94(12):4710-4716.
 31. Marcus MD, Loucks TL, Berga SL. Psychological correlates of functional hypothalamic amenorrhea. *Fertil Steril*. 2001;76(2):310-316.
 32. Samsioe B. Urogenital aging—A hidden problem. *Am J Obstet Gynecol*. 1998;178(5):S245-S249.
 33. Perkins RB, Hall JE, Martin KA. Neuroendocrine abnormalities in hypothalamic amenorrhea: spectrum, stability, and response to neurotransmitter modulation. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84(6):1905-1911.
 34. De Souza MJ, Toombs RJ, Scheid JL, O'Donnell E, West SL, Williams NI. High prevalence of subtle and severe menstrual disturbances in exercising women: confirmation using daily hormone measures. *Hum Reprod*. 2010;25(2):491-503.
 35. Easter A, Treasure J, Micali N. Fertility and prenatal attitudes towards pregnancy in women with eating disorders: results from the Avon Longitudinal Study of Parents and Children. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol*. 2011;118(12):1491-1498.
 36. Morris SN, Missmer SA, Cramer DW, Powers RD, McShane PM, Hornstein MD. Effects of lifetime exercise on the outcome of in vitro fertilization. *Obstet Gynecol*. 2006;108(4):938-945.
 37. Brinch M, Isager T, Tolstrup K. Anorexia nervosa and motherhood: Reproduction pattern and mothering behavior of 50 women. *Acta Psychiatr Scand*. 1988;77(5):611-617.
 38. Morgan JF, Lacey JH, Chung E. Risk of Postnatal Depression, Miscarriage, and Preterm Birth in Bulimia Nervosa: Retrospective Controlled Study. *Psychosom Med*. 2006;68(3):487-492.
 39. Eagles JM, Lee AJ, Raja EA, Millar HR, Bhattacharya S. Pregnancy outcomes of women with and without a history of anorexia nervosa. *Psychol Med*. 2012;42(12):2651-2660.
 40. Valsamakis G, Chrousos G, Mastorakos G. Stress, female reproduction and pregnancy. *Psychoneuroendocrinology*. 2019;100:48-57.
 41. Devoto E, Aravena L. [Favorable reproductive and menstrual evolution in adult women,

- who presented in the adolescence, menstrual disturbances by hypothalamic dysfunction and lack of response to clomiphene]. *Rev Med Chil*. 2002;130(7):745-752.
42. Decourt C, Robert V, Anger K, et al. A synthetic kisspeptin analog that triggers ovulation and advances puberty. *Sci Rep*. 2016;6(1):26908.
 43. Jayasena CN, Nijher GMK, Chaudhri OB, et al. Subcutaneous Injection of Kisspeptin-54 Acutely Stimulates Gonadotropin Secretion in Women with Hypothalamic Amenorrhea, But Chronic Administration Causes Tachyphylaxis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94(11):4315-4323.
 44. Jayasena CN, Nijher GMK, Abbara A, et al. Twice-Weekly Administration of Kisspeptin-54 for 8 Weeks Stimulates Release of Reproductive Hormones in Women With Hypothalamic Amenorrhea. *Clin Pharmacol Ther*. 2010;88(6):840-847.
 45. Navarro VM, Gottsch ML, Chavkin C, Okamura H, Clifton DK, Steiner RA. Regulation of Gonadotropin-Releasing Hormone Secretion by Kisspeptin/Dynorphin/Neurokinin B Neurons in the Arcuate Nucleus of the Mouse. *J Neurosci*. 2009;29(38):11859-11866.
 46. Wakabayashi Y, Nakada T, Murata K, et al. Neurokinin B and Dynorphin A in Kisspeptin Neurons of the Arcuate Nucleus Participate in Generation of Periodic Oscillation of Neural Activity Driving Pulsatile Gonadotropin-Releasing Hormone Secretion in the Goat. *J Neurosci*. 2010;30(8):3124-3132.
 47. Abel TW, Voytko M Lou, Rance NE. The Effects of Hormone Replacement Therapy on Hypothalamic Neuropeptide Gene Expression in a Primate Model of Menopause ¹. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84(6):2111-2118.
 48. RANCE NE, YOUNG WS. Hypertrophy and Increased Gene Expression of Neurons Containing Neurokinin-B and Substance-P Messenger Ribonucleic Acids in the Hypothalami of Postmenopausal Women*. *Endocrinology*. 1991;128(5):2239-2247.
 49. Rometo AM, Rance NE. Changes in prodynorphin gene expression and neuronal morphology in the hypothalamus of postmenopausal women. *J Neuroendocrinol*. 2008;20(12):1376-1381.
 50. Salio C, Lossi L, Ferrini F, Merighi A. Neuropeptides as synaptic transmitters. *Cell Tissue Res*. 2006;326(2):583-598.
 51. Krajewski SJ, Burke MC, Anderson MJ, McMullen NT, Rance NE. Forebrain projections of arcuate neurokinin B neurons demonstrated by anterograde tract-tracing and monosodium glutamate lesions in the rat. *Neuroscience*. 2010;166(2):680-697.
 52. Burke MC, Letts PA, Krajewski SJ, Rance NE. Coexpression of dynorphin and neurokinin B immunoreactivity in the rat hypothalamus: Morphologic evidence of interrelated function within the arcuate nucleus. *J Comp Neurol*. 2006;498(5):712-726.
 53. Moore AM, Coolen LM, Lehman MN. Kisspeptin/Neurokinin B/Dynorphin (KNDy) cells as integrators of diverse internal and external cues: evidence from viral-based

- monosynaptic tract-tracing in mice. *Sci Rep*. 2019;9(1):14768.
54. Young J, George JT, Tello JA, et al. Kisspeptin restores pulsatile LH secretion in patients with neurokinin B signaling deficiencies: physiological, pathophysiological and therapeutic implications. *Neuroendocrinology*. 2013;97(2):193-202.
 55. Lehman MN, Coolen LM, Goodman RL. Minireview: kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) cells of the arcuate nucleus: a central node in the control of gonadotropin-releasing hormone secretion. *Endocrinology*. 2010;151(8):3479-3489.
 56. Herbison AE, de Tassigny X d'Anglemont, Doran J, Colledge WH. Distribution and postnatal development of Gpr54 gene expression in mouse brain and gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology*. 2010;151(1):312-321.
 57. Hrabovszky E. Neuroanatomy of the human hypothalamic kisspeptin system. *Neuroendocrinology*. 2014;99(1):33-48.
 58. Hrabovszky E, Ciofi P, Vida B, 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):1984-1998.
 59. Krajewski SJ, Anderson MJ, Iles-Shih L, Chen KJ, Urbanski HF, Rance NE. Morphologic evidence that neurokinin B modulates gonadotropin-releasing hormone secretion via neurokinin 3 receptors in the rat median eminence. *J Comp Neurol*. 2005;489(3):372-386.
 60. Todman MG, Han S-K, Herbison AE. Profiling neurotransmitter receptor expression in mouse gonadotropin-releasing hormone neurons using green fluorescent protein-promoter transgenics and microarrays. *Neuroscience*. 2005;132(3):703-712.
 61. Hrabovszky E, Steinhauser A, Barabás K, et al. Estrogen Receptor- β Immunoreactivity in Luteinizing Hormone-Releasing Hormone Neurons of the Rat Brain. *Endocrinology*. 2001;142(7):3261-3264.
 62. Page NM, Woods RJ, Lowry PJ. A regulatory role for neurokinin B in placental physiology and pre-eclampsia. *Regul Pept*. 2001;98(3):97-104.
 63. Delovade TL, Merchenthaler I. Estrogen Regulation of Neurokinin B Gene Expression in the Mouse Arcuate Nucleus Is Mediated by Estrogen Receptor α . *Endocrinology*. 2004;145(2):736-742.
 64. Skorupskaite K, George JT, Anderson RA. The kisspeptin-GnRH pathway in human reproductive health and disease. *Hum Reprod Update*. 2014;20(4):485-500.
 65. Navarro VM, Kaiser UB. Metabolic influences on neuroendocrine regulation of reproduction. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2013;20(4):335-341.
 66. Evans MC, Rizwan M, Mayer C, Boehm U, Anderson GM. Evidence that Insulin Signalling in Gonadotrophin-Releasing Hormone and Kisspeptin Neurones does not Play an Essential Role in Metabolic Regulation of Fertility in Mice. *J Neuroendocrinol*.

2014;26(7):468-479.

67. Donato J, Cravo RM, Frazão R, et al. Leptin's effect on puberty in mice is relayed by the ventral premammillary nucleus and does not require signaling in Kiss1 neurons. *J Clin Invest*. 2011;121(1):355-368.
68. Lee JH, Miele ME, Hicks DJ, et al. KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. *J Natl Cancer Inst*. 1996;88(23):1731-1737.
69. Ohtaki T, Shintani Y, Honda S, et al. Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature*. 2001;411(6837):613-617.
70. Kotani M, Detheux M, Vandenbogaerde A, et al. The Metastasis Suppressor Gene KiSS-1 Encodes Kisspeptins, the Natural Ligands of the Orphan G Protein-coupled Receptor GPR54. *J Biol Chem*. 2001;276(37):34631-34636.
71. Gottsch ML, Clifton DK, Steiner RA. From KISS1 to kisspeptins: An historical perspective and suggested nomenclature. *Peptides*. 2009;30(1):4-9.
72. Teles MG, Bianco SDC, Brito VN, et al. A *GPR54* -Activating Mutation in a Patient with Central Precocious Puberty. *N Engl J Med*. 2008;358(7):709-715.
73. de Roux N, Genin E, Carel J-C, Matsuda F, Chaussain J-L, Milgrom E. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proc Natl Acad Sci*. 2003;100(19):10972-10976.
74. Teles MG, Bianco SDC, Brito VN, et al. A GPR54-activating mutation in a patient with central precocious puberty. *N Engl J Med*. 2008;358(7):709-715.
75. Backholer K, Smith JT, Rao A, et al. Kisspeptin Cells in the Ewe Brain Respond to Leptin and Communicate with Neuropeptide Y and Proopiomelanocortin Cells. *Endocrinology*. 2010;151(5):2233-2243.
76. Wolfe A, Hussain MA. The Emerging Role(s) for Kisspeptin in Metabolism in Mammals. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9(APR):184.
77. Dudek M, Ziarniak K, Sliwowska JH. Kisspeptin and Metabolism: The Brain and Beyond. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9:145.
78. Navarro VM, Tena-Sempere M. Neuroendocrine control by kisspeptins: role in metabolic regulation of fertility. *Nat Rev Endocrinol*. 2012;8(1):40-53.
79. Todd BJ, Fraley GS, Peck AC, Schwartz GJ, Etgen AM. Central Insulin-Like Growth Factor 1 Receptors Play Distinct Roles in the Control of Reproduction, Food Intake, and Body Weight in Female Rats. *Biol Reprod*. 2007;77(3):492-503.
80. Hiney JK, Srivastava VK, Pine MD, Dees W Les. Insulin-Like Growth Factor-I Activates KiSS-1 Gene Expression in the Brain of the Prepubertal Female Rat. *Endocrinology*. 2009;150(1):376-384.

81. Bacopoulou F, Lambrou GI, Rodanaki M-E, et al. Serum kisspeptin concentrations are negatively correlated with body mass index in adolescents with anorexia nervosa and amenorrhea. *Hormones*. 2017;16(1):33-41.
82. Pałasz A, Tyszkiewicz-Nwafor M, Suszka-Świtek A, et al. Longitudinal study on novel neuropeptides phoenixin, spexin and kisspeptin in adolescent inpatients with anorexia nervosa – association with psychiatric symptoms. *Nutr Neurosci*. November 2019:1-11.
83. Podfigurna A, Czyżyk A, Męczekalski B. [Serum kisspeptin levels in patients with anorexia nervosa]. *Pol Merkur Lekarski*. 2018;45(265):24-27.
84. Podfigurna A, Szeliga A, Meczekalski B. Serum kisspeptin and corticotropin-releasing hormone levels in patients with functional hypothalamic amenorrhea. *Gynecol Reprod Endocrinol Metab*. 2020;1(1):37-42.
85. Topaloglu AK, Reimann F, Guclu M, et al. TAC3 and TACR3 mutations in familial hypogonadotropic hypogonadism reveal a key role for Neurokinin B in the central control of reproduction. *Nat Genet*. 2009;41(3):354-358.
86. Almeida TA, Rojo J, Nieto PM, et al. Tachykinins and Tachykinin Receptors: Structure and Activity Relationships. *Curr Med Chem*. 2004;11(15):2045-2081.
87. Thyrotoxicosis of other Etiologies - PubMed - NCBI.
88. Khawaja AM, Rogers DF. Tachykinins: receptor to effector. *Int J Biochem Cell Biol*. 1996;28(7):721-738.
89. Satake H, Kawada T. Overview of the Primary Structure, Tissue-Distribution, and Functions of Tachykinins and their Receptors. *Curr Drug Targets*. 2006;7(8):963-974.
90. Chawla MK, Gutierrez GM, Young WS, McMullen NT, Rance NE. Localization of neurons expressing substance P and neurokinin B gene transcripts in the human hypothalamus and basal forebrain. *J Comp Neurol*. 1997;384(3):429-442.
91. Ramaswamy S, Seminara SB, Ali B, Ciofi P, Amin NA, Plant TM. Neurokinin B Stimulates GnRH Release in the Male Monkey (*Macaca mulatta*) and Is Colocalized with Kisspeptin in the Arcuate Nucleus. *Endocrinology*. 2010;151(9):4494-4503.
92. Foradori CD, Amstalden M, Goodman RL, Lehman MN. Colocalisation of Dynorphin A and Neurokinin B Immunoreactivity in the Arcuate Nucleus and Median Eminence of the Sheep. *J Neuroendocrinol*. 2006;18(7):534-541.
93. Gianetti E, Tusset C, Noel SD, et al. TAC3/TACR3 mutations reveal preferential activation of gonadotropin-releasing hormone release by neurokinin B in neonatal life followed by reversal in adulthood. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95(6):2857-2867.
94. Young J, Bouligand J, Francou B, et al. TAC3 and TACR3 defects cause hypothalamic congenital hypogonadotropic hypogonadism in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95(5):2287-2295.

95. Tusset C, Noel SD, Trarbach EB, et al. Mutational analysis of TAC3 and TACR3 genes in patients with idiopathic central pubertal disorders. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2012;56(9):646-652.
96. Guran T, Tolhurst G, Bereket A, et al. Hypogonadotropic hypogonadism due to a novel missense mutation in the first extracellular loop of the neurokinin B receptor. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94(10):3633-3639.
97. Rance NE, Krajewski SJ, Smith MA, Cholanian M, Dacks PA. Neurokinin B and the hypothalamic regulation of reproduction. 2010;1364.
98. Rance NE. Menopause and the human hypothalamus: Evidence for the role of kisspeptin/neurokinin B neurons in the regulation of estrogen negative feedback. *Peptides.* 2009;30(1):111-122.
99. Rance NE, McMullen N, Smialek JE, Price DL, Young WS. Postmenopausal hypertrophy of neurons expressing the estrogen receptor gene in the human hypothalamus. *J Clin Endocrinol Metab.* 1990;71(1):79-85.
100. Abel TW, Rance NE. Stereologic study of the hypothalamic infundibular nucleus in young and older women. *J Comp Neurol.* 2000;424(4):679-688.
101. Rometo AM, Krajewski SJ, Voytko M Lou, Rance NE, Lou Voytko M, 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):2744-2750.
102. Goodman RL, Coolen LM, Anderson GM, et al. Evidence That Dynorphin Plays a Major Role in Mediating Progesterone Negative Feedback on Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons in Sheep. *Endocrinology.* 2004;145(6):2959-2967.
103. Foradori CD, Goodman RL, Adams VL, Valent M, Lehman MN. Progesterone Increases Dynorphin A Concentrations in Cerebrospinal Fluid and Preprodynorphin Messenger Ribonucleic Acid Levels in a Subset of Dynorphin Neurons in the Sheep. *Endocrinology.* 2005;146(4):1835-1842.
104. Frisch RE. Critical fatness hypothesis. *Am J Physiol Metab.* 1997;273(1):E231-E232.
105. Frisch RE, McArthur JW. Menstrual Cycles: Fatness as a Determinant of Minimum Weight for Height Necessary for Their Maintenance or Onset. *Science (80-).* 1974;185(4155):949-951.
106. ABRAHAM SF, BEUMONT PJ V., FRASER IS, LLEWELLYN-JONES D. Body weight, exercise and menstrual status among ballet dancers in training. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol.* 1982;89(7):507-510.
107. Hill JW, Elmquist JK, Elias CF. Hypothalamic pathways linking energy balance and reproduction. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008;294(5):E827-32.
108. Yeo S-H, Colledge WH. The Role of Kiss1 Neurons As Integrators of Endocrine,

- Metabolic, and Environmental Factors in the Hypothalamic–Pituitary–Gonadal Axis. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9.
109. Mountjoy K, Robbins L, Mortrud M, Cone R. The cloning of a family of genes that encode the melanocortin receptors. *Science (80-)*. 1992;257(5074):1248-1251.
 110. Ollmann MM, Wilson BD, Yang Y-K, et al. Antagonism of Central Melanocortin Receptors in Vitro and in Vivo by Agouti-Related Protein. *Science (80-)*. 1997;278(5335):135-138.
 111. Myers MG, Olson DP. Central nervous system control of metabolism. *Nature*. 2012;491(7424):357-363.
 112. Pralong FP. Insulin and NPY pathways and the control of GnRH function and puberty onset. *Mol Cell Endocrinol*. 2010;324(1-2):82-86.
 113. Backholer K, Smith J, Clarke IJ. Melanocortins May Stimulate Reproduction by Activating Orexin Neurons in the Dorsomedial Hypothalamus and Kisspeptin Neurons in the Preoptic Area of the Ewe. *Endocrinology*. 2009;150(12):5488-5497.
 114. Luque RM, Kineman RD, Tena-Sempere M. Regulation of Hypothalamic Expression of KiSS-1 and GPR54 Genes by Metabolic Factors: Analyses Using Mouse Models and a Cell Line. *Endocrinology*. 2007;148(10):4601-4611.
 115. Hill JW, Elias CF, Fukuda M, et al. Direct Insulin and Leptin Action on Pro-opiomelanocortin Neurons Is Required for Normal Glucose Homeostasis and Fertility. *Cell Metab*. 2010;11(4):286-297.
 116. Kamegai J, Tamura H, Shimizu T, Ishii S, Sugihara H, Wakabayashi I. Chronic Central Infusion of Ghrelin Increases Hypothalamic Neuropeptide Y and Agouti-Related Protein mRNA Levels and Body Weight in Rats. *Diabetes*. 2001;50(11):2438-2443.
 117. Osterstock G, Escobar P, Mitutsova V, et al. Ghrelin Stimulation of Growth Hormone-Releasing Hormone Neurons Is Direct in the Arcuate Nucleus. Lu X-Y, ed. *PLoS One*. 2010;5(2):e9159.
 118. Baskin DG, Breininger JF, Schwartz MW. Leptin receptor mRNA identifies a subpopulation of neuropeptide Y neurons activated by fasting in rat hypothalamus. *Diabetes*. 1999;48(4):828-833.
 119. Williams KW, Margatho LO, Lee CE, et al. Segregation of Acute Leptin and Insulin Effects in Distinct Populations of Arcuate Proopiomelanocortin Neurons. *J Neurosci*. 2010;30(7):2472-2479.
 120. Cowley MA, Smith RG, Diano S, et al. The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron*. 2003;37(4):649-661.
 121. Andrews ZB. Central mechanisms involved in the orexigenic actions of ghrelin. *Peptides*. 2011;32(11):2248-2255.

122. Israel DD, Sheffer-Babila S, de Luca C, et al. Effects of Leptin and Melanocortin Signaling Interactions on Pubertal Development and Reproduction. *Endocrinology*. 2012;153(5):2408-2419.
123. Roa J, Herbison AE. Direct Regulation of GnRH Neuron Excitability by Arcuate Nucleus POMC and NPY Neuron Neuropeptides in Female Mice. *Endocrinology*. 2012;153(11):5587-5599.
124. Nestor CC, Kelly MJ, Rønnekleiv OK. Cross-talk between reproduction and energy homeostasis: central impact of estrogens, leptin and kisspeptin signaling. *Horm Mol Biol Clin Investig*. 2014;17(3):109-128.
125. Roa J, Tena-Sempere M. Connecting metabolism and reproduction: Roles of central energy sensors and key molecular mediators. *Mol Cell Endocrinol*. 2014;397(1-2):4-14.
126. Gautron L, Elmquist JK. Sixteen years and counting: an update on leptin in energy balance. *J Clin Invest*. 2011;121(6):2087-2093.
127. Margetic S, Gazzola C, Pegg G, Hill R. Leptin: a review of its peripheral actions and interactions. *Int J Obes*. 2002;26(11):1407-1433.
128. Briggs DI, Andrews ZB. Metabolic Status Regulates Ghrelin Function on Energy Homeostasis. *Neuroendocrinology*. 2011;93(1):48-57.
129. Varela L, Horvath TL. Leptin and insulin pathways in POMC and AgRP neurons that modulate energy balance and glucose homeostasis. *EMBO Rep*. 2012;13(12):1079-1086.
130. Chan JL, Mantzoros CS. Role of leptin in energy-deprivation states: normal human physiology and clinical implications for hypothalamic amenorrhoea and anorexia nervosa. *Lancet*. 2005;366(9479):74-85.
131. Hofmann T, Elbelt U, Haas V, et al. Plasma kisspeptin and ghrelin levels are independently correlated with physical activity in patients with anorexia nervosa. *Appetite*. 2017;108:141-150.
132. Polińska B, Matowicka-Karna J, Kemonia H. The role of ghrelin in the organism. *Postepy Hig Med Dosw*. 2011;65:1-7.
133. Lebrethon MC, Aganina A, Fournier M, Gérard A, Parent AS, Bourguignon JP. Effects of In Vivo and In Vitro Administration of Ghrelin, Leptin and Neuropeptide Mediators on Pulsatile Gonadotrophin-Releasing Hormone Secretion from Male Rat Hypothalamus Before and After Puberty. *J Neuroendocrinol*. 2007;19(3):181-188.
134. El-Eshmawy MM, Abdel Aal IA, El hawary AK. Association of ghrelin and leptin with reproductive hormones in constitutional delay of growth and puberty. *Reprod Biol Endocrinol*. 2010;8(1):153.
135. Ogata R, Matsuzaki T, Iwasa T, et al. Hypothalamic Ghrelin Suppresses Pulsatile Secretion of Luteinizing Hormone via β -Endorphin in Ovariectomized Rats.

Neuroendocrinology. 2009;90(4):364-370.

136. Small CJ, Stanley SA, Bloom SR. Appetite Control and Reproduction: Leptin and Beyond. *Semin Reprod Med*. 2002;20(4):389-398.
137. Scheid JL, De Souza MJ. Menstrual Irregularities and Energy Deficiency in Physically Active Women: The Role of Ghrelin, PYY and Adipocytokines. In: *Cytokines, Growth Mediators and Physical Activity in Children during Puberty*. Vol 55. Basel: KARGER; 2010:82-102.
138. Schneider LF, Monaco SE, Warren MP. Elevated ghrelin level in women of normal weight with amenorrhea is related to disordered eating. *Fertil Steril*. 2008;90(1):121-128.
139. Kadoglou NPE, Vrabas IS, Kapelouzou A, et al. The impact of aerobic exercise training on novel adipokines, apelin and ghrelin, in patients with type 2 diabetes. *Med Sci Monit*. 2012;18(5):CR290-5.
140. Misra M, Miller KK, Tsai P, et al. Elevated Peptide YY Levels in Adolescent Girls with Anorexia Nervosa. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(3):1027-1033.
141. Pfluger PT, Kampe J, Castaneda TR, et al. Effect of Human Body Weight Changes on Circulating Levels of Peptide YY and Peptide YY3–36. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(2):583-588.
142. Scheid JL, Williams NI, West SL, VanHeest JL, Souza MJ De. Elevated PYY is associated with energy deficiency and indices of subclinical disordered eating in exercising women with hypothalamic amenorrhea. *Appetite*. 2009;52(1):184-192.
143. Russell M, Stark J, Nayak S, et al. Peptide YY in adolescent athletes with amenorrhea, eumenorrheic athletes and non-athletic controls. *Bone*. 2009;45(1):104-109.
144. Grzelak T, Tyszkiewicz-Nwafor M, Dutkiewicz A, et al. Neuropeptide B and Vaspin as New Biomarkers in Anorexia Nervosa. *Biomed Res Int*. 2018;2018:9727509.
145. Kang ES, Magkos F, Sienkiewicz E, Mantzoros CS. Circulating vaspin and visfatin are not affected by acute or chronic energy deficiency or leptin administration in humans. *Eur J Endocrinol*. 2011;164(6):911-917.
146. Oh-I S, Shimizu H, Satoh T, et al. Identification of nesfatin-1 as a satiety molecule in the hypothalamus. *Nature*. 2006;443(7112):709-712.
147. Hatef A, Unniappan S. Gonadotropin-releasing hormone, kisspeptin, and gonadal steroids directly modulate nucleobindin-2/nesfatin-1 in murine hypothalamic gonadotropin-releasing hormone neurons and gonadotropes†. *Biol Reprod*. 2017;96(3):635-651.
148. Miura K, Titani K, Kurosawa Y, Kanai Y. Molecular cloning of nucleobindin, a novel DNA-binding protein that contains both a signal peptide and a leucine zipper structure. *Biochem Biophys Res Commun*. 1992;187(1):375-380.

149. Gonzalez R, Tiwari A, Unniappan S. Pancreatic beta cells colocalize insulin and pronesfatin immunoreactivity in rodents. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;381(4):643-648.
150. Stengel A, Goebel M, Yakubov I, et al. Identification and Characterization of Nesfatin-1 Immunoreactivity in Endocrine Cell Types of the Rat Gastric Oxyntic Mucosa. *Endocrinology.* 2009;150(1):232-238.
151. Shimizu H, Oh-I S, Okada S, Mori M. Nesfatin-1: an overview and future clinical application. *Endocr J.* 2009;56(4):537-543.
152. Kim J, Chung Y, Kim H, Im E, Lee H, Yang H. The Tissue Distribution of Nesfatin-1/NUCB2 in Mouse. *Dev Reprod.* 2014;18(4):301-309.
153. Brailoiu GC, Dun SL, Brailoiu E, et al. Nesfatin-1: Distribution and Interaction with a G Protein-Coupled Receptor in the Rat Brain. *Endocrinology.* 2007;148(10):5088-5094.
154. Goebel M, Stengel A, Wang L, Lambrecht NWG, Taché Y. Nesfatin-1 immunoreactivity in rat brain and spinal cord autonomic nuclei. *Neurosci Lett.* 2009;452(3):241-246.
155. Treen AK, Luo V, Belsham DD. Phoenixin Activates Immortalized GnRH and Kisspeptin Neurons Through the Novel Receptor GPR173. *Mol Endocrinol.* 2016;30(8):872-888.
156. Pan W, Hsueh H, Kastin AJ. Nesfatin-1 crosses the blood–brain barrier without saturation. *Peptides.* 2007;28(11):2223-2228.
157. Price TO, Samson WK, Niehoff ML, Banks WA. Permeability of the blood–brain barrier to a novel satiety molecule nesfatin-1. *Peptides.* 2007;28(12):2372-2381.
158. Tsuchiya T, Shimizu H, Yamada M, et al. Fasting Concentrations of Nesfatin-1 Are Negatively Correlated with Body Mass Index in Non-Obese Males. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2010;73(4):no-no.
159. Prinz P, Teuffel P, Lembke V, et al. Nesfatin-130–59 Injected Intracerebroventricularly Differentially Affects Food Intake Microstructure in Rats Under Normal Weight and Diet-Induced Obese Conditions. *Front Neurosci.* 2015;9:422.
160. Shimizu H, Oh-I S, Hashimoto K, et al. Peripheral Administration of Nesfatin-1 Reduces Food Intake in Mice: The Leptin-Independent Mechanism. *Endocrinology.* 2009;150(2):662-671.
161. Pałasz A, Janas-Kozik M, Borrow A, Arias-Carrión O, Worthington JJ. The potential role of the novel hypothalamic neuropeptides nesfatin-1, phoenixin, spexin and kisspeptin in the pathogenesis of anxiety and anorexia nervosa. *Neurochem Int.* 2018;113:120-136.
162. Yosten GLC, Redlinger L, Samson WK. Evidence for a Role of Endogenous Nesfatin-1 in the Control of Water Drinking. *J Neuroendocrinol.* 2012;24(7):1078-1084.
163. Xia Z-F, Fritze DM, Li J-Y, et al. Nesfatin-1 inhibits gastric acid secretion via a central

- vagal mechanism in rats. *Am J Physiol Liver Physiol*. 2012;303(5):G570-G577.
164. Darambazar G, Nakata M, Okada T, et al. Paraventricular NUCB2/nesfatin-1 is directly targeted by leptin and mediates its anorexigenic effect. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015;456(4):913-918.
 165. Atsuchi K, Asakawa A, Ushikai M, et al. Centrally administered nesfatin-1 inhibits feeding behaviour and gastroduodenal motility in mice. *Neuroreport*. 2010;21(15):1.
 166. Merali Z, Cayer C, Kent P, Anisman H. Nesfatin-1 increases anxiety- and fear-related behaviors in the rat. *Psychopharmacology (Berl)*. 2008;201(1):115-123.
 167. Yosten GLC, Samson WK. The anorexigenic and hypertensive effects of nesfatin-1 are reversed by pretreatment with an oxytocin receptor antagonist. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2010;298(6):R1642-7.
 168. Mortazavi S, Gonzalez R, Ceddia R, Unniappan S. Long-term infusion of nesfatin-1 causes a sustained regulation of whole-body energy homeostasis of male Fischer 344 rats. *Front Cell Dev Biol*. 2015;3:22.
 169. Ramanjaneya M, Chen J, Brown JE, et al. Identification of Nesfatin-1 in Human and Murine Adipose Tissue: A Novel Depot-Specific Adipokine with Increased Levels in Obesity. *Endocrinology*. 2010;151(7):3169-3180.
 170. Ogiso K, Asakawa A, Amitani H, et al. Plasma nesfatin-1 concentrations in restricting-type anorexia nervosa. *Peptides*. 2011;32(1):150-153.
 171. Saldanha JF, Carrero JJ, Lobo JC, et al. The newly identified anorexigenic adipokine nesfatin-1 in hemodialysis patients: Are there associations with food intake, body composition and inflammation? *Regul Pept*. 2012;173(1-3):82-85.
 172. Aydin S, Dag E, Ozkan Y, et al. Nesfatin-1 and ghrelin levels in serum and saliva of epileptic patients: Hormonal changes can have a major effect on seizure disorders. *Mol Cell Biochem*. 2009;328(1-2):49-56.
 173. Hofmann T, Elbelt U, Ahnis A, Rose M, Klapp BF, Stengel A. Sex-specific regulation of NUCB2/nesfatin-1: Differential implication in anxiety in obese men and women. *Psychoneuroendocrinology*. 2015;60:130-137.
 174. Altıncık A, Sayın O. Serum Nesfatin-1 Levels in Girls with Idiopathic Central Precocious Puberty. *J Clin Res Pediatr Endocrinol*. 2018;10(1):8-12.
 175. Li Q-C, Wang H-Y, Chen X, Guan H-Z, Jiang Z-Y. Fasting plasma levels of nesfatin-1 in patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus and the nutrient-related fluctuation of nesfatin-1 level in normal humans. *Regul Pept*. 2010;159(1-3):72-77.
 176. Stengel A, Goebel M, Wang L, Taché Y. Ghrelin, des-acyl ghrelin and nesfatin-1 in gastric X/A-like cells: Role as regulators of food intake and body weight. *Peptides*. 2010;31(2):357-369.

177. Xu Y-Y, Ge J-F, Qin G, et al. Acute, but not chronic, stress increased the plasma concentration and hypothalamic mRNA expression of NUCB2/nesfatin-1 in rats. *Neuropeptides*. 2015;54:47-53.
178. Ari M, Ozturk OH, Bez Y, Oktar S, Erduran D. High plasma nesfatin-1 level in patients with major depressive disorder. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry*. 2011;35(2):497-500.
179. Gunay H, Tutuncu R, Aydin S, Dag E, Abasli D. Decreased plasma nesfatin-1 levels in patients with generalized anxiety disorder. *Psychoneuroendocrinology*. 2012;37(12):1949-1953.
180. Hofmann T, Ahnis A, Elbelt U, Rose M, Klapp BF, Stengel A. NUCB2/nesfatin-1 Is Associated with Elevated Levels of Anxiety in Anorexia Nervosa. Gaetani S, ed. *PLoS One*. 2015;10(7):e0132058.
181. García-Galiano D, Tena-Sempere M. Emerging Roles of NUCB2/Nesfatin-1 in the Metabolic Control of Reproduction. *Curr Pharm Des*. 2013;19(39):6966-6972.
182. Garcia-Galiano D, Navarro VM, Roa J, et al. The anorexigenic neuropeptide, nesfatin-1, is indispensable for normal puberty onset in the female rat. *J Neurosci*. 2010;30(23):7783-7792.
183. Dore R, Levata L, Lehnert H, Schulz C. Nesfatin-1: functions and physiology of a novel regulatory peptide. *J Endocrinol*. 2017;232(1):R45-R65.
184. García-Galiano D, Pineda R, Ilhan T, et al. Cellular Distribution, Regulated Expression, and Functional Role of the Anorexigenic Peptide, NUCB2/Nesfatin-1, in the Testis. *Endocrinology*. 2012;153(4):1959-1971.
185. Saito R, Tanaka K, Nishimura H, et al. Centrally administered kisspeptin suppresses feeding via nesfatin-1 and oxytocin in male rats. *Peptides*. 2019;112:114-124.
186. Gao X, Zhang K, Song M, et al. Role of Nesfatin-1 in the Reproductive Axis of Male Rat. *Sci Rep*. 2016;6(1):32877.
187. Pałasz A, Rojczyk E, Bogus K, Worthington JJ, Wiaderkiewicz R. The novel neuropeptide phoenixin is highly co-expressed with nesfatin-1 in the rat hypothalamus, an immunohistochemical study. *Neurosci Lett*. 2015;592:17-21.
188. Yosten GLC, Lyu R-M, Hsueh AJW, et al. A Novel Reproductive Peptide, Phoenixin. *J Neuroendocrinol*. 2013;25(2):206-215.
189. Stein LM, Tullock CW, Mathews SK, et al. Hypothalamic action of phoenixin to control reproductive hormone secretion in females: importance of the orphan G protein-coupled receptor *Gpr173*. *Am J Physiol Integr Comp Physiol*. 2016;311(3):R489-R496.
190. Ullah K, ur Rahman T, Wu D-D, et al. Phoenixin-14 concentrations are increased in association with luteinizing hormone and nesfatin-1 concentrations in women with polycystic ovary syndrome. *Clin Chim Acta*. 2017;471:243-247.

191. Maroń P. Wyobrażenia ontologiczna w działaniu. Standaryzowanie męskiej anoreksji a praktyka użycia kalkulatora BMI. *ZAGADNIENIA Nauk.* 2017;3 (213):323-342.
192. Olivares JL, Ortiz VA, Mayer M, Demaria CI, Nancucheo E, Cresto JC. [An approach to a sanitary and social problem: urinary iodine excretion in pregnant women from a iodine deficient region]. *Arch Latinoam Nutr.* 2009;59(4):378-382.
193. Berga SL, Mortola JF, Gorton L, et al. Neuroendocrine aberrations in women with functional hypothalamic amenorrhea. *J Clin Endocrinol Metab.* 1989;68(2):301-308.
194. Crabtree DR, Chambers ES, Hardwick RM, Blannin AK. The effects of high-intensity exercise on neural responses to images of food. *Am J Clin Nutr.* 2014;99(2):258-267.
195. Pinilla L, Aguilar E, Dieguez C, Millar RP, Tena-Sempere M. Kisspeptins and reproduction: physiological roles and regulatory mechanisms. *Physiol Rev.* 2012;92(3):1235-1316.
196. Jayasena CN, Abbara A, Veldhuis JD, et al. Increasing LH Pulsatility in Women With Hypothalamic Amenorrhoea Using Intravenous Infusion of Kisspeptin-54. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(6):E953-E961.
197. Rafique N, Latif R. Serum kisspeptin levels in normal and overweight Saudi females and its relation with anthropometric indices. *Ann Saudi Med.* 2015;35(2):157-160.
198. Rashad NM, Al-sayed RM, Yousef MS, Saraya YS. Kisspeptin and body weight homeostasis in relation to phenotypic features of polycystic ovary syndrome; metabolic regulation of reproduction. *Diabetes Metab Syndr Clin Res Rev.* 2019;13(3):2086-2092.
199. Zumoff B, Walsh BT, Katz JL, et al. Subnormal plasma dehydroisoandrosterone to cortisol ratio in anorexia nervosa: a second hormonal parameter of ontogenic regression. *J Clin Endocrinol Metab.* 1983;56(4):668-672.
200. Falsetti L, Gambera A, Barbetti L, Specchia C. Long-term follow-up of functional hypothalamic amenorrhea and prognostic factors. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(2):500-505.
201. Çatlı G, Anık A, Küme T, et al. Serum nesfatin-1 and leptin levels in non-obese girls with premature thelarche. *J Endocrinol Invest.* 2015;38(8):909-913.
202. Catak Z, Yavuzkir S, Kocdemir E, et al. NUCB2/nesfatin-1 in the blood and follicular fluid in patients with polycystic ovary syndrome and poor ovarian response. *J Reprod Infertil.* 2019;20(4):225-230.
203. Latif R, Rafique N. Serum kisspeptin levels across different phases of the menstrual cycle and their correlation with serum oestradiol. *Neth J Med.* 2015;73(4):175-178.
204. Katagiri F, Kotani M, Hirai T, Kagawa J. The relationship between circulating kisspeptin and sexual hormones levels in healthy females. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015;458(3):663-666.

205. Abaci A, Catli G, Anik A, Kume T, Bober E. The relation of serum nesfatin-1 level with metabolic and clinical parameters in obese and healthy children. *Pediatr Diabetes*. 2013;14(3):n/a-n/a.
206. Tsuchiya T, Shimizu H, Yamada M, et al. Fasting Concentrations of Nesfatin-1 Are Negatively Correlated with Body Mass Index in Non-Obese Males. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2010;73(4):no-no.
207. Anwar GM, Yamamah G, Ibrahim A, El-Lebedy D, Farid TM, Mahmoud R. Nesfatin-1 in childhood and adolescent obesity and its association with food intake, body composition and insulin resistance. *Regul Pept*. 2014;188:21-24.
208. Tan BK, Hallschmid M, Kern W, Lehnert H, Randeve HS. Decreased Cerebrospinal Fluid/Plasma Ratio of the Novel Satiety Molecule, Nesfatin-1/NUCB-2, in Obese Humans: Evidence of Nesfatin-1/NUCB-2 Resistance and Implications for Obesity Treatment. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(4):E669-E673.
209. Andreozzi F, Chiara Mannino G, Mancuso E, Spiga R, Perticone F, Sesti G. Plasma kisspeptin levels are associated with insulin secretion in nondiabetic individuals. 2017.
210. PANIDIS D, ROUSSO D, KOLIAKOS G, et al. Plasma metastin levels are negatively correlated with insulin resistance and free androgens in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2006;85(6):1778-1783.
211. Misra M, Aggarwal A, Miller KK, et al. Effects of Anorexia Nervosa on Clinical, Hematologic, Biochemical, and Bone Density Parameters in Community-Dwelling Adolescent Girls. *Pediatrics*. 2004;114(6):1574-1583.
212. Parfitt AM, Villanueva AR, Foldes J, Rao DS. Relations between histologic indices of bone formation: Implications for the pathogenesis of spinal osteoporosis. *J Bone Miner Res*. 2009;10(3):466-473.
213. Riggs BL, Khosla S, Melton LJ. A Unitary Model for Involutional Osteoporosis: Estrogen Deficiency Causes Both Type I and Type II Osteoporosis in Postmenopausal Women and Contributes to Bone Loss in Aging Men. *J Bone Miner Res*. 1998;13(5):763-773.
214. Khosla S, Melton LJ, Atkinson EJ, O'Fallon WM, Klee GG, Riggs BL. Relationship of Serum Sex Steroid Levels and Bone Turnover Markers with Bone Mineral Density in Men and Women: A Key Role for Bioavailable Estrogen 1. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998;83(7):2266-2274.
215. Puzio I, Tymicki G, Pawłowska M, Bieńko M, Radzki RP. Nesfatin-1 prevents negative changes in bone in conditions of developing osteopenia. *Ann Agric Environ Med*. 2020;27(1):66-75.
216. Ichiki T, Kuroishi KN, Gunjigake KK, Kobayashi S, Goto T. Neurokinin B activates the formation and bone resorption activity of rat osteoclasts. *Neuropeptides*. 2011;45(3):239-244.

217. Misra M, Katzman D, Miller KK, et al. Physiologic estrogen replacement increases bone density in adolescent girls with anorexia nervosa. *J Bone Miner Res.* 2011;26(10):2430-2438.
218. DiVasta AD, Feldman HA, Beck TJ, LeBoff MS, Gordon CM. Does Hormone Replacement Normalize Bone Geometry in Adolescents With Anorexia Nervosa? *J Bone Miner Res.* 2014;29(1):151-157.
219. Barb CR, Hausman GJ, Kraeling RR. Luteinizing hormone secretion as influenced by age and estradiol in the prepubertal gilt. *Anim Reprod Sci.* 2010;122(3-4):324-327.
220. Rabii J, Ganong WF. Responses of Plasma 'Estradiol' and Plasma LH to Ovariectomy, Ovariectomy Plus Adrenalectomy, and Estrogen Injection at Various Ages. *Neuroendocrinology.* 1976;20(3):270-281.
221. Genazzani AD, Meczekalski B, Podfigurna-Stopa A, et al. Estriol administration modulates luteinizing hormone secretion in women with functional hypothalamic amenorrhea. *Fertil Steril.* 2012;97(2):483-488.
222. Genazzani AR, Facchinetti Vincenzo Leo F DE, Picciolini E, et al. *EFFECT OF EPIMESTROL ON GONADOTROPIN AND PROLACTIN PLASMA LEVELS AND RESPONSE TO LUTEINIZING HORMONE-RELEASING HORMONE/THYROTROPIN-RELEASING HORMONE IN SECONDARY AMENORRHEA AND OLIGOMENORRHEA.* Vol 30.; 1978.
223. Castelo-Branco C, Martínez de Osaba MJ, Fortuny A, Iglesias X, González-Merlo J. Circulating hormone levels in menopausal women receiving different hormone replacement therapy regimens. A comparison. *J Reprod Med.* 1995;40(8):556-560.
224. Skorupskaite K, George JT, Veldhuis JD, Millar RP, Anderson RA. Interactions Between Neurokinin B and Kisspeptin in Mediating Estrogen Feedback in Healthy Women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016;101(12):4628-4636.
225. Ramanjaneya M, Tan BK, Rucinski M, et al. Nesfatin-1 inhibits proliferation and enhances apoptosis of human adrenocortical H295R cells. *J Endocrinol.* 2015;226(1):1-11.
226. Cooper BC, Burger NZ, Toth MJ, Cushman M, Sites CK. Insulin resistance with hormone replacement therapy: associations with markers of inflammation and adiposity. *Am J Obstet Gynecol.* 2007;196(2):123.e1-123.e7.
227. Goodrow GJ, L'Hommedieu GD, Gannon B, Sites CK. Predictors of worsening insulin sensitivity in postmenopausal women. *Am J Obstet Gynecol.* 2006;194(2):355-361.
228. Kimmerle R, Heinemann L, Heise T, et al. Influence of continuous combined estradiol-norethisterone acetate preparations on insulin sensitivity in postmenopausal nondiabetic women. *Menopause.* 1999;6(1):36-42.
229. Bitoska I, Krstevska B, Milenkovic T, et al. Effects of hormone replacement therapy on insulin resistance in postmenopausal diabetic women. *Open Access Maced J Med Sci.*

2016;4(1):83-88.

230. Ki EY, Hur SY, Park JS, Do Han K, Park YG. Differences in the lipid profile and hormone replacement therapy use in Korean postmenopausal women: the Korea National Health and Nutrition Examination Survey (KNHANES) 2010–2012. *Arch Gynecol Obstet*. 2016;294(1):165-173.
231. Altayar O, Al Nofal A, Gisella B, et al. Treatments to Prevent Bone Loss in Functional Hypothalamic Amenorrhea: A Systematic Review and Meta-Analysis. 2017.
232. Warren MP, Brooks-Gunn J, Fox RP, et al. Persistent osteopenia in ballet dancers with amenorrhea and delayed menarche despite hormone therapy: a longitudinal study. *Fertil Steril*. 2003;80(2):398-404.
233. COBB KL, BACHRACH LK, SOWERS M, et al. The Effect of Oral Contraceptives on Bone Mass and Stress Fractures in Female Runners. *Med Sci Sport Exerc*. 2007;39(9):1464-1473.
234. WEISSBERGER AJ, HO KKY, LAZARUS L. Contrasting Effects of Oral and Transdermal Routes of Estrogen Replacement Therapy on 24-Hour Growth Hormone (GH) Secretion, Insulin-Like Growth Factor I, and GH-Binding Protein in Postmenopausal Women*. *J Clin Endocrinol Metab*. 1991;72(2):374-381.
235. Szeliga A, Czyzyk A, Podfigurna A, Genazzani ADARAD, Genazzani ADARAD, Meczekalski B. The role of kisspeptin/neurokinin B/dynorphin neurons in pathomechanism of vasomotor symptoms in postmenopausal women: from physiology to potential therapeutic applications. *Gynecol Endocrinol*. 2018;34(11):1-7.



UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Medycznym
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Collegium Stomatologicum
ul. Bukowska 70
60-812 Poznań

tel. (+48 61) 854 73 36
www.bioetyka.ump.edu.pl

Uchwała nr 244/19

Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodach lekarza i lekarza dentysty (t.j. Dz. U. z 2018 r., poz. 617 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999 r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz. U. z 1999 r., Nr 47, poz. 480); Ustawy z dnia 6 września 2001 r. Prawo farmaceutyczne (t.j. Dz. U. z 2017 r., poz. 2211 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 30 kwietnia 2004 r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. z 2004 Nr 101, poz. 1034 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 18 maja 2005 r. zmieniającego rozporządzenie w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. z 2005 r. Nr 101, poz. 845); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004 r. w sprawie sposobu prowadzenia badań klinicznych z udziałem małoletnich (Dz. U. z 2004 r. Nr 104, poz. 1108); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004 r. w sprawie zgłaszania niespodziewanego ciężkiego niepożądanego działania produktu leczniczego (Dz. U. z 2004 r. Nr 104, poz. 1107); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 17 lutego 2016 r. w sprawie wzorów wniosków związanych z badaniem klinicznym wyrobu medycznego lub aktywnego wyrobu medycznego do implantacji oraz wysokości opłat za złożenie tych wniosków (Dz. U. z 2016 r., poz. 208); Ustawy z dnia 20 maja 2010 r. o wyrobach medycznych (t.j. Dz. U. z 2017 r. poz. 211, z późn. zm.); Rozporządzenie Ministra Finansów z dnia 6 października 2010 r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej sponsora i badacza klinicznego w związku z prowadzeniem badania klinicznego wyrobów (Dz. U. z 2010 r. Nr 194, poz. 1290); Ustawy z dnia 18 marca 2011 r. o Urzędzie Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych (t.j. Dz. U. z 2016 r., poz. 1718 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 2 maja 2012 r. w sprawie Dobrej Praktyki Klinicznej (Dz. U. z 2012 r., poz. 489); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 12 października 2018 r. w sprawie wzorów dokumentów przedkładanych w związku z badaniem klinicznym produktu leczniczego oraz opłat za złożenie wniosku o rozpoczęcie badania klinicznego (Dz. U. z 2018 r., poz. 1994); w oparciu o Deklarację Helsińską - Zasady Etycznego Postępowania w Eksperymentach Medycznych z Udziałem Ludzi oraz przepisy ICH GCP.

Komisja Bioetyczna, na posiedzeniu w dniu 07 lutego 2019 r.

rozpatrzyła wniosek dotyczący prowadzenia badań naukowych.

Kierownik projektu: prof. dr hab. n. med. Błażej Męczekalski

Miejsce prowadzenia badań:

**Katedra i Klinika Endokrynologii Ginekologicznej
Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu**

Główny badacz: lek. Anna Szeliga

Członkowie zespołu

badawczego:

lek. Anna Szeliga

prof. dr hab. n. med. Błażej Męczekalski

dr n. med. Agnieszka Podfigurna

Temat badań:

„Ocena stężenia neurokininy B i nesfatyny-1 w surowicy krwi pacjentek z czynnościowym podwzgórzowym brakiem miesiączki przed leczeniem i po 6 miesiącach terapii estrogenno-progestagennej”.

Komisja podjęła Uchwałę o pozytywnym zaopiniowaniu zmian wprowadzonych do protokołu powyższego badania, polegających na zmianie tematu badania z „Ocena stężenia wybranych neurohormonów i adipokin w surowicy pacjentek z czynnościowym podwzgórzowym brakiem miesiączki przed i w trakcie hormonalnej terapii zastępczej” na powyższy, zgodnie z Aneks nr 1 z dnia 07.02.2019r. do Uchwały Komisji Bioetycznej nr 1265/18 z dnia 06.12.2019r.

Metodyka badania pozostaje bez zmian.

Przewodniczący Komisji

prof. zw. dr hab. med. Paweł Chęciński



UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Medycznym
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Collegium Stomatologicum
ul. Bukowska 70
60-812 Poznań

tel. (+48 61) 854 73 36
www.bioetyka.ump.edu.pl

Uchwała nr 1265/18

Na podstawie przepisów Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodach lekarza i lekarza dentysty (t.j. Dz. U. z 2017, poz. 125 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz. U. Nr 47, poz. 480); Ustawy z dnia 6 września 2001r. Prawo farmaceutyczne (t.j. Dz. U. z 2016, poz. 2142 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. 2004 nr 101, poz. 1034 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 18 maja 2005r. zmieniające rozporządzenie w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. Nr 101, poz. 845); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie sposobu prowadzenia badań klinicznych z udziałem małoletnich (Dz. U. 2004 Nr 104, poz. 1108); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie zgłaszania niespodziewanego ciężkiego niepożądanego działania produktu leczniczego (Dz. U. Nr 104, poz. 1107); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 17 lutego 2016 r. I w sprawie wzorów wniosków związanych z badaniem klinicznym wyrobu medycznego lub aktywnego wyrobu medycznego do implantacji oraz wysokości opłat za złożenie tych wniosków (Dz. U. z 2016 r., poz. 208); Ustawy z dnia 20 maja 2010 r. o wyrobach medycznych (t.j. Dz. U. z 2017r. poz. 211, z późn. zm.); Rozporządzenie Ministra Finansów z dnia 6 października 2010 r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej sponsora i badacza klinicznego w związku z prowadzeniem badania klinicznego wyrobów (Dz. U. 2010, Nr 194 poz. 1290); Ustawy z dnia 18 marca 2011 r. o Urzędzie Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych (t.j. Dz. U. z 2016 r., poz. 1718); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 2 maja 2012r. w sprawie Dobrej Praktyki Klinicznej (Dz. U. 2012, poz. 489); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 2 maja 2012r. w sprawie wzorów dokumentów przedkładanych w związku z badaniem klinicznym produktu leczniczego oraz w sprawie wysokości i sposobu uiszczania opłat za złożenie wniosku o rozpoczęcie badania klinicznego (Dz. U. 2012, Nr 0 poz. 491); w oparciu o Deklarację Helsińską - Zasady Etycznego Postępowania w Eksperymentach Medycznych z Udziałem Ludzi oraz przepisy ICH GCP.

Komisja Bioetyczna, na posiedzeniu w dniu

06 grudnia 2018 r.

rozpatrzyła wniosek dotyczący prowadzenia badań naukowych.

Kierownik projektu: prof. dr hab. n. med. Błażej Męczekalski

Miejsce prowadzenia badań:

**Katedra i Klinika Endokrynologii Ginekologicznej
Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu**

Główny badacz: lek. Anna Szeliga

Członkowie zespołu

badawczego: lek. Anna Szeliga

prof. dr hab. n. med. Błażej Męczekalski

dr n. med. Agnieszka Podfigurna

Temat badań:

„Ocena stężenia wybranych neurohormonów i adipokin w surowicy pacjentek z czynnościowym podwzgórzowym brakiem miesiączki przed i w trakcie hormonalnej terapii zastępczej”.

Komisja wydała uchwałę o pozytywnym zaopiniowaniu tego wniosku

Przewodniczący Komisji

prof. zw. dr hab. med. Paweł Chęciński