

Univerzita Karlova

2. lékařská fakulta

Doktorský studijní program:
Fyziologie a patofyziologie člověka



MUDr. Ledjona Toni

Etiologie, patofyziologie a postnatální terapie intrauterinní růstové retardace s postnatálním
růstovým selháním

Etiology, pathophysiology and postnatal therapy of intrauterine growth restriction with
persistent postnatal growth failure

Disertační práce

Školitel: prof. MUDr. Jan Lebl, CSc.

Praha, 2024

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu.

Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 7.7. 2024

Ledjona Toni

Poděkování

V první řadě bych ráda poděkovala svému školiteli prof. MUDr. Janovi Leblovi, CSc. za vynikající vedení mého postgraduálního studia. Obzvlášť si vážím jeho odborných znalostí, profesionality, ale zároveň i lidského přístupu, trpělivosti, vstřícnosti a schopnosti motivovat. Vděčím mu nejen za jeho nezpochybnitelný přínos při práci na tomto projektu, ale i za příležitost, kterou mi dal jako zahraniční studentce uplatnit se v českém zdravotnictví a za důvěru, kterou ve mne vložil.

Také bych ráda poděkovala své konzultantce prof. MUDr. Štěpánce Průhové, PhD. a dalším svým skvělým kolegům: MUDr. Anne Tharindi Shenali Dias Amaratunga, PhD., MUDr. Lukášovi Plachému, PhD., RNDr. Petře Dušátkové, PhD., Bc. Kláře Veselé a Mgr. Kateřině Kolářové.

Na závěr bych chtěla poděkovat svým rodičům za jejich lásku, podporu a důvěru v mé schopnosti a svému životnímu partnerovi za trpělivost a za to, že je mi hlavní oporou.

Etiologie, patofyziologie a postnatální terapie intrauterinní růstové retardace s postnatálním růstovým selháním

Abstrakt

Přibližně 5 % dětí se rodí s porodní hmotností a/nebo délkou menší než -2 SD ve srovnání s normou pro daný gestační věk a pohlaví. Označují se jako small for gestation age (SGA). Tento stav vzniká jako důsledek intrauterinní růstové restrikce (IUGR). Příčiny SGA/IUGR mohou být exogenní, maternální, placentární nebo endogenní – zpravidla způsobené patogenní genetickou variantou u fétu. U přibližně 90 % SGA/IUGR dětí dojde v prvních dvou letech života k růstovému výšvih, u zbylých 10 % se růstový výšvih nerozvine. Tyto děti se označují jako SGA-SS (small for gestational age with short stature). Hlavním cílem projektu bylo zkoumání genetické etiologie SGA-SS v unikátní velké kohortě 176 dětí léčených růstovým hormonem na Pediatrické klinice Fakultní nemocnice v Motole. U dětí s nápadným fenotypem bylo provedeno cílené testování (karyotyp/FISH/MLPA/cílené Sangerovo sekvenování). Všichni ostatní podstoupili MS-MLPA k identifikaci Silver-Russellova syndromu a ti, u kterých zatím nebyla zjištěna genetická etiologie, byli následně vyšetřeni pomocí celoexomového sekvenování nebo cíleným panelem 398 genů souvisejících s růstem. Genetické varianty jsme klasifikovali pomocí postupů navržených ACMG. Genetická etiologie byla objasněna u 74/176 (42%) dětí. Prokázali jsme, že v řízení růstu hraje ústřední roli růstová ploténka. Dále mají významný podíl geny osy GH-IGF-1 a osy štítné žlázy a dále geny zodpovědné za intracelulární regulaci a signalizaci. Mezi nimi byl také pacient s velmi vzácným syndromem předčasného stárnutí - Hutchinson-Gilfordovou progerií. V další části projektu jsme se zabývali významem acidolabilní podjednotky (ALS) ternárního komplexu IGF-1/IGFBP3/ALS v diagnostice a léčbě dětí s poruchou růstu. U 511 dětí s deficitem růstového hormonu (GHD) a/nebo SGA-SS jsme analyzovali hladiny a vzájemnou korelaci všech tří složek ternárního komplexu a vliv léčby růstovým hormonem na jednotlivé složky. Sangerova sekvenace u dětí s nízkou hladinou ALS neprokázala patogenní ani jinou variantu genu *IGFALS*. Měření hladin ALS není efektivní pro detekci mutací *IGFALS*. Růstový hormon zvyšuje hladiny ALS, ale biochemické stanovení ALS má jen nevýznamnou přidanou hodnotu pro diagnostiku a sledování dětí s malým vzrůstem. Následující podprojekt se týkal účinku léčby růstovým hormonem u podskupiny dětí SGA-SS s patogenní variantou genu *NPR2*, který kóduje receptor natriuretického peptidu typ 2. Ukázalo se, že varianty genu *NPR2* způsobují malý vzrůst u přibližně 5 % dětí s familiárním

malým vzrůstem a jejich odpověď na léčbu růstovým hormonem je slibná. V dalším dílčím projektu jsme z dat české národní databáze příjemců růstového hormonu REPAR analyzovali efekt léčby růstovým hormonem u 397 dětí SGA-SS s ukončeným růstem. Při ukončení léčby většina pacientů dosáhla výšky nad -2 SDS, v rozmezí hodnot běžné populace. U těchto pacientů jsme vyhodnotili vliv prepubertální a pubertální složky růstu na celkový efekt léčby růstovým hormonem. O efektu léčby rozhoduje především prepubertální složka růstu, proto důsledné sledování růstu dětí narozených SGA a včasné zahájení léčby v časném dětství má pro ně klíčový význam. Součástí studií u dětí s poruchou růstu byla také účast v mezinárodní multicentrické klinické studii k posouzení léčby somatrogenem, což je nový dlouhodobě působící růstový hormon aplikovaný jednou týdně. Pomocí standardizovaných dotazníků byl ve skupině 87 dětí zjištěn při léčbě somatrogenem významný pokles subjektivně vnímané zátěže pro dítě a rodinu na jednu třetinu ve srovnání s každodenní injekcí růstového hormonu. Všechny uvedené studie přinesly původní nové poznatky o etiologii, diagnostice a terapii u dětí s poruchou růstu, zejména u dětí SGA-SS.

Klíčová slova: Růst; genetika růstu; SGA-SS; acidolabilní podjednotka; *NPR2*; somatrogen

Abstract

Approximately 5% of children are born with a birth weight and/or length less than -2 SDS if compared to normative values for their gestational age and sex. These are referred to as small for gestational age (SGA). This condition results from intrauterine growth restriction (IUGR). The causes of SGA/IUGR can be exogenous, maternal, placental or endogenous - usually caused by a pathogenic genetic variant in the fetus. Approximately 90% of SGA/IUGR children develop a catch-up growth within the first two years of life, while the remaining 10% do not. These children are referred to as SGA-SS (small for gestational age with short stature). The main aim of the project was to investigate the genetic aetiology of SGA-SS in a unique large cohort of 176 children treated with growth hormone at the Department of Pediatrics, Motol University Hospital. Children with a striking phenotype were subjected to targeted testing (karyotype/FISH/MLPA/targeted Sanger sequencing). All others underwent MS-MLPA to identify Silver-Russell syndrome, and those with no genetic etiology yet identified were subsequently screened by whole-exome sequencing or a targeted panel of 398 growth-related genes. Genetic variants were classified using guidelines suggested by the ACMG. Genetic etiology was elucidated in 74/176 (42%) children. We demonstrated that the growth plate plays a central role in growth control. In addition, genes of the GH-IGF-1 axis and of the thyroid axis, as well as genes responsible for intracellular regulation and signaling, are important. Among them was a patient with a very rare premature aging syndrome - Hutchinson-Gilford progeria. In the next part of the project, we investigated the importance of the acid-labile subunit (ALS) of the IGF-1/IGFBP3/ALS ternary complex in the diagnosis and treatment of children with growth failure. In 511 children with growth hormone deficiency (GHD) and/or SGA-SS, we analyzed the levels and correlation of all three components of the ternary complex and the effect of growth hormone treatment on each component. Sanger sequencing in children with low ALS levels did not show a pathogenic or other variant in the *IGFALS* gene. Measurement of ALS levels is not effective for detecting *IGFALS* mutations. Growth hormone increases ALS levels, but biochemical determination of ALS has only insignificant added value for diagnosis and monitoring of children with short stature. The following subproject concerned the effect of growth hormone treatment in a subgroup of SGA-SS children with a pathogenic variant of the *NPR2* gene, which encodes the natriuretic peptide receptor type 2. *NPR2* gene variants have been shown to cause short stature in approximately 5% of children with familial short stature and their response to growth hormone treatment is promising. In another sub-project we analysed the effect of growth hormone treatment in 397 children with SGA-SS who

reached final height from the Czech national database of growth hormone recipients REPAR. By the end of treatment, most patients reached a height above -2 SDS, within the range of normal population values. In these patients, we evaluated the influence of prepubertal and pubertal growth components on the overall effect of growth hormone treatment. The prepubertal component of growth is the main determinant of the treatment effect; therefore, close monitoring of growth in children born with SGA and early initiation of treatment in infancy is of crucial importance. Studies in children with growth failure also included participation in an international multicentre clinical trial to assess treatment with somatrogen, a new long-acting growth hormone administered once weekly. Using standardized questionnaires, a significant reduction in subjective perceived burden for the child and family was found to be one-third in a group of 87 children when treated with somatrogen compared to daily growth hormone injections.

All of these studies have provided original new insights into the etiology, diagnosis, and treatment of children with growth disorder, particularly SGA-SS children.

Key words: Growth; growth genetics; SGA-SS; acid-labile subunit; *NPR2*; somatrogen

Seznam použitých zkratk a symbolů

ACAN – gen kódující glykoprotein aggrecan

ACMG – American College of Medical Genetics and Genomics

AD – autozomálně dominantní dědičnost

ALS – acidolabilní podjednotka

AR – autozomálně recesivní dědičnost

BA – kostní věk

BMI - body mass index; index tělesné hmotnosti

CA – kalendářní věk

cGMP – cyklický guanosinmonofosfát

CNV - copy number variation

CNP – natriuretický peptid typu C

COL – část kódu genů, které kódují jednotlivé typy kolagenu

EMA – Evropská léková agentura pro léčivé přípravky

FGFR3 – gen kódující receptor pro fibroblastový růstový faktor typ 3

FISH – fluorescenční in situ hybridizace

FLNB – gen kódující filamin typ B

FSS – familiárně malý vzrůst

GH – růstový hormon

GHD – deficit růstového hormonu

GHR – receptor pro růstový hormon; pokud je zkratka kurzívou, označuje gen kódující receptor pro růstový hormon

GTP – guanosintrifosfát

ICR - imprinting control region

IGF-1 – inzulínu podobný růstový faktor 1

IGF-1R – receptor pro inzulínu podobný růstový faktor typ 1

IGF1R – gen kódující receptor pro IGF

IGF-2 – inzulínu podobný růstový faktor 2

IGFBP-3 – vazebný protein pro IGF typ 3

IHH – gen kódující signální molekulu indian hedgehog

IQR – mezikvartilový rozptyl

LP – pravděpodobně patogenní varianta; likely pathogenic

MATN3 – gen kódující matrilin 3

MLPA – Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification (metoda molekulárně-genetické diagnostiky)

NGS – sekvenování nové generace

NPPC – natriuretický peptid typu C

NPR-B – receptor pro natriuretický peptid typu C

NPR2 – gen kódující receptor pro natriuretický peptid typ C

P – patogenní varianta

PAPPA2 – pappalysin 2; pokud je zkratka kurzívou, označuje gen kódující pappalysin 2

PAR1 – pseudoautosomální oblast 1

PWS – syndrom Pradera-Williho

RAS/MAPK – RAS intracelulární signální kaskáda

RR – růstová rychlost

SD – směrodatná odchylka

SGA – narozen malý vzhledem ke gestačnímu věku

SHH – gen kódující signální molekulu sonic hedgehog

SOD – septo-optická dysplázie

SRS – syndrom Silvera-Russella

STAT5b – přenašeč signálu a aktivátor transkripce typ 5b

TS – Turnerův syndrom

TSH – tyreotropní hormon

UPD - uniparentální disomie

WES – celoexomové sekvenování

X – dědičnost vázaná na X chromozom

Obsah

1. Úvod	13
1.1. Poruchy imprintingu a metylační poruchy. Silver-Russellův syndrom a příbuzné syndromy.....	14
1.2. Poruchy osy GH – IGF-1 – růstová ploténka u dětí SGA-SS.....	16
1.2.1. Růstový hormon.....	16
1.2.2. IGF-1, IGF-2.....	16
1.2.3. IGF1R.....	17
1.2.4. Vazebné proteiny pro IGF (IGF binding proteins; IGFBP).....	17
1.2.5. Acidolabilní podjednotka (acid-labile subunit; ALS).....	17
1.2.6. PAPP-A2 (pregnancy associated plasma protein A2).....	18
1.3. Růstová ploténka a její regulace.....	18
1.3.1. Poruchy parakrinní regulace.....	18
1.3.2. Poruchy tvorby extracelulární matrix.....	19
1.3.3. Poruchy intracelulární regulace.....	20
1.3.4. Geny ovlivňující další buněčné procesy.....	20
1.4. Chromozomální aberace a variabilita počtu kopií.....	21
1.5. Algoritmus genetického vyšetření u dětí SGA-SS.....	21
1.6. Léčba růstovým hormonem u dětí SGA-SS.....	22
2. Hypotézy disertační práce	23
3. Cíle disertační práce	24
4. Soubory pacientů a metodiky jednotlivých studií	25
4.1. Klinická kohorta dětí SGA-SS léčených na Pediatrické klinice v Motole v letech 2008-2018.....	25
4.2. Stanovení koncentrace ALS a její diagnostický význam.....	26
4.3. Léčba růstovým hormonem u dětí SGA-SS s poruchou genu NPR2.....	26
4.4. Kazuistická studie u chlapce SGA-SS s Hutchinson-Gilfordovou progerií.....	26

4.5. Dospělá výška dětí SGA-SS z celostátní databáze REPAR.....	26
4.6. Prepubertální a pubertální růst u dětí SGA-SS – data z celostátní databáze REPAR..	27
4.7. První zkušenosti s dlouhodobě působícím růstovým hormonem.....	27
5. Publikace s doprovodnou diskusí.....	28
5.1. J. G. Mendel a řízení růstu dítěte: Geny, molekuly a pediatriká klinická praxe.....	28
5.2. The genetic landscape of children born small for gestational age with persistent short stature (SGA-SS).....	37
5.3. Význam acido-labilní podjednotky (ALS) v etiologii a v diagnostice malého vzrůstu.	52
5.4. Heterozygous NPR2 mutation is a frequent cause of familial short stature with good effect of growth hormone treatment.....	58
5.5. Short stature in a boy with atypical progeria syndrome due to LMNA c.433G>A [p. (Glu145Lys)]: apparent growth hormone deficiency but poor response to growth hormone therapy.....	66
5.6. První zkušenosti s dlouhodobě působícím růstovým hormonem.....	72
5.7. Dospělá výška dětí, které se narodily malé na svůj gestační věk (SGA), s malou výškou v dětství (SGA-SS). Výsledky léčby růstovým hormonem z dat české národní databáze REPAR.....	78
5.8. Pubertální růst dětí, které se narodily malé na svůj gestační věk (SGA), s malou výškou v dětství (SGA- SS). Výsledky léčby růstovým hormonem z dat české národní databáze REPAR.....	87
6. Diskuse.....	95
7. Závěr.....	97
8. Souhrn disertační práce.....	98
9. Seznam citované literatury.....	100

1. Úvod

Přibližně 3-5 % dětí se rodí s porodní hmotností a/nebo délkou nižší než -2 SD ve srovnání s normou pro daný gestační věk. Tyto děti označujeme jako malé pro svůj gestační věk (small for gestational age - SGA) (Lee, 2001). Stav SGA je většinou spojen s intrauterinní růstovou restrikcí (IUGR). I když pojmy SGA a IUGR se někdy zaměňují či užívají jako synonyma, IUGR označuje v porodnictví fetální růstovou restrikci na základě ultrazvukového měření velikosti plodu a dynamiky jeho růstu, zatímco SGA je pojem primárně neonatologický, dokumentovaný přesným změřením porodní hmotnosti a délky a porovnáním s normou pro daný gestační věk a pohlaví.

Stav SGA může být způsoben řadou exogenních, maternálních, placentárních nebo endogenních (embryonálních a fetálních) faktorů (Finken, 2018). U 90 % dětí s SGA dochází během prvních dvou let života k růstovému výšvihu, u zbylých 10 % v této době růstový výšvih nenastává (Hokken-Koelega, 1995). Tyto děti se označují jako „small for gestational age – short stature“ (SGA-SS) neboli růstové selhání navazující na intrauterinní růstovou restrikci. Je známo, že zůstanou malé po celé dětství a dosáhnou významně nižší dospělé tělesné výšky. Proto se na základě studií účinnosti a bezpečnosti stala skupina dětí narozených SGA s postnatálním růstovým selháním (SGA-SS) na základě rozhodnutí Evropské lékové agentury (EMA) od roku 2003 indikací pro léčbu růstovým hormonem (GH) (Clayton, 2007).

Etiologie růstového selhání navazující na SGA není zcela objasněna a je zřejmě heterogenní. Díky novým možnostem genetické diagnostiky se v poslední době dostává v popředí výzkum genetické a epigenetické etiologie této poruchy. Vychází se přitom z premisy o genetické podmíněnosti lidského růstu s tím, že pokud porucha růstu začíná již *in utero*, může se jednat s vyšší pravděpodobností o významnou genetickou predispozici ve srovnání s postnatálním rozvojem růstové poruchy. Ke genetickému vyšetření se používá spektrum metod od stanovení karyotypu, přes komparativní genomovou hybridizaci (aCGH), metylační studie, až po metody sekvenování nové generace (NGS). Tato vyšetření dokážou objasnit příčinu malého vzrůstu navazující na SGA v mnoha případech. V tomto souborném sdělení přinášíme přehled významných geneticky podmíněných příčin SGA-SS – poruch imprintingu, metylačních poruch a přehled základních genových defektů spojených s regulací osy GH – IGF-1 – růstová ploténka.

1.1. Poruchy imprintingu a metylační poruchy. Silver-Russellův syndrom a příbuzné syndromy

Pokud aktivita určitého genu závisí na maternálním či paternálním původu alely, hovoříme o genetickém imprintingu. Ve většině těchto případů se exprimuje (je aktivní) pouze maternální nebo paternální alela, zatímco druhá alela je umlčena. Jedna z častých imprintingových poruch spojená s fenotypem SGA-SS je Silver-Russellův syndrom (SRS). Všechny děti se SRS se rodí malé na svůj gestační věk, zůstávají malé během dětství a mají typické dysmorfické rysy – relativní makrocefalii, trojúhelníkový obličej, prominující čelo, klinodaktylii malíčků a často také stranovou asymetrii včetně rozdílné délky končetin a plosek (Wakeling, 2017). Typické je obtížné krmení a neprospívání v kojeneckém věku (Marsaud, 2015). SRS je primárně klinická diagnóza, k jejíž diagnostice používáme skórovací klinický systém dle Netchinové a Harbisona (Azzi, 2015) (tab. 1).

Genetickou etiologii lze při dnešní úrovni znalostí objasnit cca u 60 % dětí se SRS. Ve většině případů (téměř 50 % všech) je příčinou hypometylace v imprintingové kontrolní oblasti (imprinting control region – ICR) na paternální alele na chromozomu 11p15.5. V této oblasti jsou umístěny geny *IGF2* a *H19*, které se podílejí na regulaci intrauterinního růstu (Netchine, 2007). Vedle toho byly popsány dvě vzácnější genetické odchylky ve stejné oblasti 11p15. Jedna z nich je spojena se zvýšenou expresí genu *CDKN1C* (Brioude, 2013), což vede kromě intrauterinní růstové restrikce také k metafyzární dysplazii, kongenitální adrenální hypoplázii a malformaci genitálu u chlapců. Tento soubor příznaků se označuje jako IMAGE syndrom (Arboleda, 2012).

Příčinou 5-10 % případů SRS je uniparentální disomie (UPD) – přítomnost dvou homologních chromozomů nebo jejich částí, které pocházejí od jednoho rodiče. Nejčastěji se jedná o oblast s geny *GRB10* a *MEST* na 7. chromozomu (UPD7) (Hitchins, 2001). U dalších 40 % pacientů zůstává genetická etiologie SRS neobjasněna.

Dlouhodobé podávání růstového hormonu je u dětí s SRS bezpečné a účinné, avšak během adrenarche a puberty může dojít k urychlení kostního zrání s nepříznivým vlivem na finální výšku (Binder, 2013).

Vedle UPD7 bylo popsáno několik dalších UPD syndromů spojených s malou výškou a typickým fenotypem. Jedním z nich je syndrom Templeové spojený s oblastí dlouhého raménka 14. chromozomu (14q). Může být vyvolán jak UPD 14. chromozomu, tak i paternální delecí, duplikací v oblasti 14q nebo hypometylací. Děti se syndromem Templeové se rodí SGA, jsou hypotonické, mají předčasnou pubertu a výrazně sníženou finální výšku (Ioannides, 2014).

Poruchy imprintingu nebo uniparentální dizomie 15. chromosomu vedou ke vzniku syndromu Pradera-Williho, pro který je vedle dalších fenotypových projevů příznačná porodní hmotnost pod 10. percentilem a perzistující porucha růstu v dětství (Lionti, 2015). Také děti s uniparentální dizomií 20. chromozomu patří mezi SGA-SS a mají potíže s krmením, na rozdíl od SRS dětí ale nemají typické dysmorfické rysy (Mulchandani, 2016).

Klinická kritéria	Definice
SGA (porodní hmotnost a/nebo porodní délka)	≤ -2 SDS pro daný gestační věk
Postnatální růstové selhání	Výška ve 24 ± 1 měsíci ≤ -2 SDS nebo výška ≤ -2 SDS než střední výška rodičů
Relativní makrocefalie	Obvod hlavy při narození $\geq 1,5$ SDS než porodní délka a/nebo hmotnost
Prominující čelo	Prominující čelo je výraznější v prvních 3 letech života
Asymetrie trupu	Jakákoliv asymetrie trupu a/nebo končetin
Potíže s krmením a/nebo nízký BMI	BMI ≤ -2 SDS ve 24 měsících věku a/nebo nutnost krmení nazogastrickou sondou

Tab. 1. Klinický skórovací systém pro Silver-Russellův syndrom (SRS) dle Netchinové a Harbinsona. Klinická diagnóza je pravděpodobná, pokud pacient splňuje nejméně 4 ze 6 kritérií. Jsou-li všechna molekulárně genetická vyšetření negativní a diferenciální diagnostikou byly vyloučeny jiné příčiny, pacienti splňující alespoň 4 ze 6 kritérií se klasifikují klinicky jako SRS. BMI – body mass index; SDS – skóre směrodatné odchylky; SGA – small for gestational age.

1.2. Poruchy osy GH – IGF-1 – růstová ploténka u dětí SGA-SS

1.2.1. Růstový hormon

I když růstový hormon hraje v prenatálním vývoji menší úlohu než IGF-1, je popsána řada stavů spojených s poruchou sekrece i působení (signalizace) růstového hormonu, které vedou k zpomalení intrauterinního růstu. U dětí s deficitem růstového hormonu je nižší průměrná porodní délka (-0,6 SD) i porodní hmotnost (-0,9 SD). Deficit růstového hormonu může být způsoben patogenními variantami řady různých genů, z nichž jsou nejčastější poruchy genů *PROPI*, *GHI* a *GHRH*. Postnatální růstové selhání může být u dětí s deficitem růstového hormonu různě vyjádřené, efekt léčby růstovým hormonem bývá zpravidla příznivý (Mehta, 2005).

Patogenní varianty genu kódující receptor pro růstový hormon (*GHR*) vedou ke vzniku necitlivosti na růstový hormon, tzv. Laronovu syndromu. Ten je charakterizován středně těžkou až těžkou poruchou růstu, poněkud disproporcionální postavou s kratšími končetinami a hypoplázií střední části obličeje, pro kterou je typický zejména vpáčený kořen nosu. Tyto děti mají koncentraci růstového hormonu v krvi normální nebo zvýšenou, zatímco koncentrace IGF-1 je velmi nízká. Léčebné podání růstového hormonu nemá u těchto jedinců žádný efekt, léčbou volby je podání rekombinantního lidského IGF-1 (rhIGF-1) (Laron, 2004).

Patogenní varianty v genech *STAT5b*, *STAT3*, *IKBKB*, a *IL2RG* jsou též spojeny s necitlivostí na růstový hormon a současně s rozvojem závažného imunopatologického stavu (Finken, 2018).

1.2.2. IGF-1, IGF-2

Účinek růstového hormonu na periferní tkáň je zprostředkován především inzulinu podobnými růstovými faktory 1 a 2 (IGF-1, IGF-2). IGF-1 a IGF-2 jsou jednořetězcové polypeptidy, které vzájemně sdílejí přibližně 50 % své aminokyselinové sekvence (Le Roith, 2001). IGF-1, ale zejména IGF-2, hrají významnou roli v časném fetálním vývoji prostřednictvím vazby na receptor IGF 1. typu (IGF1R), který je pro oba polypeptidy společný (Constância, 2002). Po ukončení organogeneze se stává dominantním regulátorem růstu osa GH – IGF-1. Role IGF-2 v postnatálním vývoji není jasná. U myšího modelu vede inaktivace IGF-2 alely paternálního původu k těžké intrauterinní restrikci růstu, zatímco inaktivace alely maternálního původu nemá na růst žádný vliv (DeChiara, 1990). Klíčová role IGF-1 v intrauterinním vývoji byla postupně dokumentována na příkladu čtyř jedinců z nepříbuzných rodin, kteří nesli patogenní varianty na obou alelách *IGF1* genu. Všichni měli extrémně nízkou porodní hmotnost a délku i obvod hlavy a trpěli sensorineurální hluchotou (Woods, 1996; Walenkamp, 2005; Netchine, 2009). Dále

byly popsány dvě rodiny s heterozygotními patogenními variantami *IGF1*, jejichž fenotyp byl mírnější (van Duyvenvoorde, 2010; Fuqua, 2012).

1.2.3. IGF1R

Gen *IGF1R* kóduje IGF receptor 1. typu (IGF1R), který má podobnou strukturu jako inzulinový receptor (Francke, 1986). V literatuře najdeme řadu kazuistik popisujících různé varianty v *IGF1R* genu. Zajímavý je jejich značně variabilní fenotyp. Porodní hmotnost se pohybuje v rozmezí od -3,5 do -1,5 SD, porodní délka od -5,0 do +0,3 SD, výška při první návštěvě endokrinologa od -5 SD do -2,1 SD. Další fenotypické znaky zahrnují klinodaktylii, pectus excavatum, trojúhelníkový obličej, brachycefalii, ale také obtíže s krmením, opoždění psychomotorického vývoje a porušenou glukózovou toleranci. Odpověď na léčbu růstovým hormonem je u dětí s patogenními variantami *IGF1R* genu horší než u dětí SGA-SS bez genového defektu (Finken, 2018).

1.2.4. Vazebné proteiny pro IGF (IGF binding proteins; IGFBP)

Vazebné proteiny pro IGF (IGFBP-1 až IGFBP-6) prodlužují poločas IGF v cirkulující krvi a tím modulují jeho biologickou dostupnost a účinnost. Z šesti známých IGFBP je pro vazbu IGF-1 nejdůležitější IGFBP-3, v menší míře také IGFBP-5. Všechny IGFBP mají větší afinitu k IGF-1 než k receptoru IGF1R – vazba IGF-1 na IGFBP je tedy kompetitivní s vazbou IGF-1 na IGF1R. Zatím nebyly popsány žádné patogenní varianty v genech pro jednotlivé IGFBP (Finken, 2018).

1.2.5. Acidolabilní podjednotka (acid-labile subunit; ALS)

IGF-1 cirkuluje v krvi jako součást ternárního komplexu, který se skládá z IGFBP-3 a acidolabilní podjednotky (ALS). Zatímco poločas volně cirkulujícího IGF-1 je pouhých 10 minut, binární komplex IGF-1–IGFBP-3 přetrvává v krvi 30-90 minut a ternární komplex s ALS prodlužuje poločas na více než 12 hodin (Boisclair, 2001). Studie u 312 dětí SGA-SS ukázala mírně nižší koncentraci ALS v krvi ve srovnání s běžnou dětskou populací (cca -0,5 SD), hladiny IGF-1 a IGFBP-3 byly ale ve srovnání se zdravou populací snižené podstatně významněji (<-1 SD) (Renes, 2014). ALS je kódována genem *IGFALS*. Patogenní varianty genu *IGFALS* způsobují růstovou poruchu, která je mnohem závažnější v případě

homozygotních mutací, delecí nebo duplikací, než u heterozygotů nebo složených heterozygotů (Renes, 2019).

1.2.6. PAPP-A2 (pregnancy associated plasma protein A2)

PAPP-A2 je metaloproteináza, která štěpí vazbu mezi IGF-1 a IGFBP-3 (resp. IGFBP-5) a tím zvyšuje biologickou dostupnost IGF-1 v cílových tkáních. Doposud bylo popsáno 5 homozygotních mutací v genu *PAPPA2*, dvě z těchto pěti dětí byly SGA-SS. Všechny pět dětí mělo zvýšené hladiny IGF-1, IGF-2, IGFBP-3, IGFBP-5 i ALS. Dle hypotézy autorů chybějící aktivita metaloproteinázy znemožňuje uvolnit IGF-1 a IGF-2 z ternárních komplexů. To sice zvyšuje jejich koncentraci v krvi prodloužením jejich poločasu, ale snižuje jejich biologickou dostupnost v cílových tkáních (Dauber, 2016).

1.3. Růstová ploténka a její regulace

1.3.1. Poruchy parakrinní regulace

Genové defekty spojené s parakrinní signalizací v oblasti růstové ploténky vedou zpravidla k určité formě skeletální dysplazie. Většina těchto genů se exprimuje již *in utero*, proto bývá snížena porodní délka – směrodatná odchylka (SD) porodní délky vztažená ke gestačnímu věku je nižší než SD porodní hmotnosti. Těžší formy skeletálních dysplazií lze rozpoznat prenatálně či hned po narození; mírnější poruchy zůstávají nediodagnostikovány a tyto děti se klasifikují jako SGA či v případě dominantní dědičnosti jako děti s familiárním malým vzrůstem (FSS). Při pátrání po možné skeletální dysplazii u dětí s nižší porodní délkou je vhodné hodnotit opakovaně proporcionalitu: u většiny skeletálních dysplazií se postupně vyvíjí „asymetrie“ – končetiny rostou relativně méně než trup, používá se proto označení „short-limbed dysplasias“ (Bonafe, 2015). Asymetrie se zvyrazňuje s věkem a v prvních letech života nemusí být patrná. Úplný výčet parakrinních faktorů v růstové ploténce přesahuje možnosti tohoto sdělení, proto zmíníme jen častější a/nebo klinicky významné poruchy. Fibroblastové růstové faktory (FGFs) hrají v regulaci růstové ploténky důležitou úlohu. Patogenní varianty v genu *FGFR3*, který kóduje třetí typ receptoru pro fibroblastový růstový faktor, ovlivňují růst kostí do délky a vedou k celé řadě fenotypů – od achondroplazie přes hypochondroplazii až k symetrické poruše růstu. I když u dětí s achondroplazií nejsou porodní hmotnost a délka výrazně sníženy (průměr -1 SD resp. -0,7 SD), jejich nápadný fenotyp umožní okamžitou diagnózu (obr. 4). Děti s

hypochondroplazií mají rhizomelické zkrácení končetin a relativní makrocefalii. Porodní délka a hmotnost může rovněž být snížena (Finken, 2018).

Dalším důležitým parakrinním regulátorem je natriuretický peptid typu C (CNP), který se váže na receptor natriuretického peptidu typu B (NPR-B) kódovaný genem *NPR2*. Homozygotní mutace genu *NPR2* působí těžkou akromezomelickou dysplazií typu Maroteaux. Růstová porucha nositelů patogenní heterozygotní varianty v tomto genu je mírnější. Fenotyp bývá nenápadný (klinická diagnóza idiopatického/familiárního malého vzrůstu), v některých případech byl popsán obraz kostní dysplázie podobný Léri-Weilovu syndromu (typický pro jedince s deficitem *SHOX*) se zkrácením předloktí a bérců (mezomelie). U *NPR2* variant ale chybí charakteristická Madelungova deformita (Bartels, 2004). Heterozygotní varianty *NPR2* zodpovídají zřejmě za přibližně 6 % případů dětí SGA-SS a familiárně malého vzrůstu (Olney, 2006).

IHH (Indian HedgeHog) hraje důležitou úlohu v embryonální morfogenezi, je exprimován v chondrocytech a reguluje jejich diferenciaci. Heterozygotní mutace genu *IHH* vedou k brachydaktylii typu A2, ale nedávno byly heterozygotní patogenní varianty nalezeny i u dětí s mírně disproportionálním malým vzrůstem bez specifických skeletálních abnormit. Ve většině případů se tyto děti rodily malé na svůj gestační věk v parametru porodní délky a 50 % z nich mělo skeletální abnormitu na rentgenu ruky (například kratší střední článek III. a V. prstu s kónickým tvarem epifýzy) (Vasques, 2018).

1.3.2. Poruchy tvorby extracelulární matrix

Jendou z příčin poruchy tvorby extracelulární matrix růstové ploténky jsou patogenní varianty genu *ACAN*, který kóduje bílkovinnou frakci proteoglykanu agrekan. Fenotypicky se může projevit mírná skeletální dysplázie, spondyloepifyzální dysplázie typu Kimberley nebo pouze malý vzrůst bez skeletálních abnormit, ale často s urychleným kostním věkem. 30-40 % dětí, které nesou patogenní variantu *ACAN*, se rodí SGA. Nositelé patogenních variant *ACAN* mohou v dospělosti trpět časně nastupující osteoartrózou a/nebo disekující osteochondritidou (Gkourogianni, 2017). Mezi další příčiny stavu SGA-SS s narušenou strukturou extracelulární matrix patří patogenní varianty genů pro některé typy kolagenu, např. *COL11A1*, *COL1A2*, *COL2A1* a jiné (Plachy, 2019).

1.3.3. Poruchy intracelulární regulace

Relativně častou příčinou malého vzrůstu u dětí je aberace v genu *SHOX*, který kóduje SHOX protein (Short stature HOmeoboX-containing gene). Tento gen se nachází v pseudoautosomální oblasti obou pohlavních chromozomů X a Y a kóduje transkripční faktor s významnou úlohou v růstu dlouhých kostí. *SHOX* gen nepodléhá X-inaktivaci a za fyziologických okolností je přítomen ve dvou funkčních kopiích (Rao, 1997). Bialelické inaktivační mutace způsobují závažnou Langerovou mezomelickou dysplázi. Heterozygotní mutace, delece či duplikace způsobují mírnější Léři-Weilův syndrom (často s klasickou Madelungovou deformitou předloktí) anebo pouze SGA, resp. idiopatický či familiární malý vzrůst bez známek kostní dysplazie (Benito-Sanz, 2011). Chybění jedné kopie (haploinsuficience) *SHOX* je příčinou malého vzrůstu u dívek s Turnerovým syndromem.

Dalším významným intracelulárním regulátorem proliferace a diferenciací chondrocytů růstové ploténky je signalizační kaskáda Ras/MAPK. Úkolem Ras/MAPK signalizační kaskády je přenášet informaci mezi membránovým receptorem pro růstové faktory a buněčným jádrem. V buněčném jádře následně reguluje transkripci několika genů zodpovědných za buněčnou proliferaci, migraci, diferenciaci a apoptózu. Abnormální aktivace této kaskády vede k několika překrývajícím se syndromům se společným označením „RASopatie“, mezi které patří syndrom Noonanové, LEOPARD syndrom, Costellův syndrom, Legius syndrom a další. Hlavními příznaky RASopatií jsou malý vzrůst, typický faciální fenotyp, deformita hrudníku a kardiovaskulární abnormality (Lebl, 2020).

1.3.4. Geny ovlivňující další buněčné procesy

Patogenní varianty genů, které kódují proteiny významné pro buněčné a mezibuněčné procesy v růstové ploténce a současně v dalších tkáních a orgánech, vedou ke skupině růstových poruch označovaných jako „primordiální trpaslictví (dwarfism)“. Tito jedinci mají zpravidla významně narušený jak intrauterinní, tak postnatální růst. Do této skupiny řadíme např. Floating Harbor syndrom, Meier-Gorlinův syndrom, 3-M syndrom, syndrom Cornelia de Lange a další. Nositelé těchto syndromů mají příznačné fenotypické rysy, které mohou zkušeného klinického genetika nasměrovat k cílenému genetickému testování. U některých nemusí být fenotyp nápadný a jediná patrná patologie je SGA-SS (Finken, 2018).

1.4. Chromozomální aberace a variabilita počtu kopií

Turnerův syndrom může být diagnostikován již prenatalně nebo hned po narození na základě typických dysmorfických známek – lymfedémů nártů nohou a hřbetů rukou, pterygia colli a dalších. V mnoha případech je diagnóza stanovena až později v dětství, zejména u dívek s mírnějším fenotypem při chromozomální mozaice. Téměř třetina dívek s Turnerovým syndromem se narodí SGA. Jejich prenatalní i postnatální růstové selhání je způsobeno haploinsuficiencí *SHOX* (Ranke, 2007).

Děti se všemi klasickými trizomickými chromozomálními aberacemi autozomů se rodí SGA. Vzhledem ke komplexní patologii těchto stavů zůstává otázka jejich tělesného růstu na okraji klinické významnosti.

Díky novým metodám genetické diagnostiky se dostala do popředí zájmu tzv. variabilita počtu kopií (CNV – copy number variation) lidského genomu. CNV je formou strukturální variability v podobě delecí a duplikací určitých úseků genomu, které jsou četné a mohou mít významný dopad na fenotyp. Z 671 pacientů vyšetřených pro malý vzrůst v rámci SGA-SS nejasné etiologie bylo pomocí aCGH objeveno několik patologických CNV u 87 pacientů (13 %) (Homma, 2018).

1.5. Algoritmus genetického vyšetření u dětí SGA-SS

Finken a spolupracovníci (Finken, 2018) navrhují zahájit vyšetření pečlivou anamnézou, fyzikálním vyšetřením, analýzou antropologických parametrů včetně růstových grafů, RTG levé ruky a předloktí a screeningovým laboratorním vyšetřením s cílem vyloučit jiné než endokrinní příčiny poruchy růstu. Snímek ruky a předloktí doporučují provádět jak k určení kostního věku, tak k identifikaci skeletálních abnormit příznačných pro některé syndromy a genové defekty (*SHOX*, *NPR2*, *ACAN*, *IHH* a další).

U dívek s výškou nižší o více než 1,6 SD oproti cílové výšce doporučují autoři vyloučit Turnerův syndrom pomocí karyotypu a FISH. Po vyloučení Turnerova syndromu, patologického nálezu CNV a uniparentální disomie může být dalším krokem sekvenování nové generace (NGS) s analýzou panelu genů ovlivňujících růst. Podobný diagnostický postup volíme i u chlapců.

Pokud některá fenotypická známka vyvolává silné podezření na určitý syndrom (např. Madelungova deformita u defektů *SHOX*), volí se varianta přímého sekvenování kandidátního genu.

Ve specifických případech, kde máme podezření na přítomnost patogenní varianty v dosud neznámém genu, lze provést celoexomové sekvenování u tripletu (probanda a obou rodičů) (Finken, 2018). Vzhledem k tomu, že genetická etiologie růstového selhání je u SGA dětí velmi různorodá, přináší pátrání ve větších kohortách dětí SGA-SS šanci na rozšíření biomedicínského poznání v této oblasti.

1.6. Léčba růstovým hormonem u dětí SGA-SS

Skupina dětí narozených SGA s postnatálním růstovým selháním (SGA-SS) se stala na základě rozhodnutí Evropské lékové agentury (EMA) od roku 2003 indikací pro léčbu růstovým hormonem. Nejnižší přípustný věk při zahájení terapie jsou v Evropě čtyři roky, v USA se terapie růstovým hormonem v této indikaci může zahájit již ve dvou letech věku. V případě těžké poruchy růstu již v kojeneckém věku a průkazu jasné genetické etiologie s nepříznivou prognózou dalšího růstu (například Silver-Russellův syndrom) lze terapii GH zahájit i dříve. Ve většině evropských států je úvodní dávka GH 0,033-0,035 mg/kg/den.

V dosud zkoumaných kohortách dětí SGA-SS byla odezva na podávání GH poměrně různorodá. Tento jev zřejmě souvisí s heterogenní genetickou etiologií. Medián zlepšení finální výšky po léčbě oproti predikci činí 1,25 SD (Maiorana, 2009). Puberta u dětí SGA-SS nastupuje v průměru ve stejném věku jako u ostatních vrstevníků (Finken, 2018). Kromě pozitivního vlivu na růst má terapie růstovým hormonem poměrně dobře dokumentované lipolytické a anabolické působení, tedy celkově příznivý efekt na kardiovaskulární systém (Lebl, 2011).

2. Hypotézy disertační práce

(1) SGA-SS je nejzávažnější formou růstové poruchy, protože znamená narušení pre- i postnatální fáze růstu. Ve významném počtu případů je tento stav způsoben endogenní, geneticky nebo epigeneticky podmíněnou poruchou, kterou lze současnými metodami diagnostikovat.

(2) Zkoumání etiologie SGA-SS může zásadním způsobem přispět k poznání fyziologie a patofyziologie lidského růstu. Pomůže definovat kaskádu dějů, které řídí růst a rozhodují o tělesné délce in utero a brzy po narození, stejně jako o tělesné výšce v dalším dětství i v dospělosti.

3. Cíle disertační práce

- (1) Sestavení klinické kohorty pacientů SGA-SS léčených růstovým hormonem na Pediatrické klinice Fakultní nemocnice v Motole v období let 2008 až 2018.
- (2) Hledání endogenní (genetické) etiologie u dětí SGA-SS metodami sekvenování nové generace a metylačními studii.
- (3) Stanovení koncentrace ALS (acidolabilní podjednotky) v plazmě u dětí SGA-SS a posouzení jejího diagnostického významu, včetně možnosti detekce patogenních variant genu *IGFALS*
- (4) Analýza vlivu léčby růstovým hormonem na růstovou rychlost u dětí s poruchou parakrinní regulace chondrocytu na podkladě patogenních variant genu *NPR2*
- (5) Kazuistická studie sekrece růstového hormonu a odpovědi na léčbu růstovým hormonem u unikátního pacienta z kohorty SGA-SS s Hutchinson-Gilfordovou progerií na podkladě patogenní varianty *LMNA*
- (6) Analýza prediktorů dospělé výšky po léčbě růstovým hormonem u dětí SGA-SS z dat celostátní databáze příjemců růstového hormonu REPAR
- (7) Analýza příspěvku prepubertálního a pubertálního růstu při léčbě růstovým hormonem na dospělou výšku u dětí SGA-SS z dat celostátní databáze příjemců růstového hormonu REPAR
- (8) Souhrn prvních zkušeností s dlouhodobě působícím růstovým hormonem u dětí.

4. Soubory pacientů a metodiky jednotlivých studií

4.1. Klinická kohorta dětí SGA-SS léčených na Pediatrické klinice v Motole v letech 2008-2018

Studovaná kohorta 176 dětí vycházela z celkového souboru 820 pacientů léčených růstovým hormonem v našem centru v období od května 2008 do prosince 2018, po vyloučení dětí s extrémní nezralostí, se známým jiným onemocněním, a všech dětí, které nesplňovaly kritéria SGA při narození či pokles výšky pod $-2,5$ SD v průběhu dětství ve věku 3 roky či více. Z 256 rodin, jejichž dítě splňovalo vstupní kritéria, 176 (69 %) rodin souhlasilo s genetickým testováním u dítěte i obou rodičů („triplet“ vzorků DNA)

U všech dětí byla k dispozici perinatální data (týden gestace, porodní hmotnost a/nebo délka méně než -2 SD vzhledem ke gestačnímu věku) a série postnatálních měření před zahájením léčby růstovým hormonem vyjádřená jako SD normativních hodnot specifických pro věk a pohlaví (Kobzová, 2004).

Tyto děti v rámci rutinní léčby dostávaly dlouhodobou léčbu růstovým hormonem (GH) dávkou $35 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{den}$ podle mezinárodních doporučení (Clayton, 2007). Tato kohorta byla vyšetřena z hlediska etiologie poruchy a zůstává k dispozici pro následné studie dlouhodobé odpovědi na růstový hormon, včetně zhodnocení budoucí dospělé výšky.

Genetické testování

Některé děti s klinickým podezřením na specifickou genetickou poruchu podstoupily již před touto studií cílené genetické vyšetření (karyotyp, FISH, MLPA, cílené Sangerovo sekvenování). Zbývající děti jsme vyšetřili metodou specifické multiplexní ligační sondy závislé na stimulaci (MS-MLPA). MS-MLPA směsí ME030 a ME032 byla zaměřena na oblasti 11p15, 7q32, 7p12 a 14q32, k následné analýze dat jsme použili software Coffalyser MS-MLPA s cílem vyloučit či potvrdit Silver-Russellův syndrom.

Při negativním výsledku byli pacienti vyšetřeni metodami sekvenování nové generace (NGS). DNA jsme analyzovali pomocí nově vytvořeného cíleného panelu NGS 398 genů se známou nebo potenciální asociací s růstem. Celkem 6 vzorků DNA z probandů prošlo celoexomovým sekvenováním (WES). Zjištěné varianty jsme filtrovali pomocí softwaru Variant Annotation and Filter Tool (VarAFT) (Desvignes, 2018). Vybrané varianty jsme verifikovali přímým

Sangerovým sekvenováním a následně bodovali podle standardů American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) (Richards, 2015).

4.2. Stanovení koncentrace ALS a její diagnostický význam

U 511 dětí s deficitem růstového hormonu (GHD) a/nebo u dětí s poruchou růstu navazující na malou velikost při narození (SGA-SS) jsme při léčbě GH analyzovali hladiny a vzájemnou korelaci všech tří složek ternárního komplexu. U tří dětí s nízkou hladinou ALS jsme následně sekvenovali gen IGFALS. Vliv podání GH na složky ternárního komplexu jsme studovali u 23 dětí s GHD nebo SGA-SS neurčené etiologie.

4.3. Léčba růstovým hormonem u dětí SGA-SS s poruchou genu *NPR2*

Ze 747 pacientů léčených GH v našem centru splnilo 87 kritérium familiárně menšího vzrůstu (FSS) – výška před léčbou ≤ -2 SD jak u pacienta, tak u menšího z obou rodičů. Pro hledání variant genu *NPR2* jsme použili metody sekvenování nové generace. Výsledky byly vyhodnoceny pomocí standardů ACMG a u léčených dětí byla hodnocena odpověď na léčbu GH (vyjádřená jako zlepšení rychlosti růstu a vývoj SD výšky během prvních 5 let léčby).

4.4. Kazuistická studie u chlapce SGA-SS s Hutchinson-Gilfordovou progerií

Kazuisticky jsme popsali osud chlapce narozeného s patogenní variantou *LMNA* c.433G>A, která způsobuje atypický progerický syndrom (APS) a byla dříve popsána u jediného pacienta. Laboratorní testy odhalily nedostatek růstového hormonu (GH) a magnetická rezonance (MRI) mozku ukázala obraz „empty sella“. Léčba GH měla pouze omezený a přechodný účinek. Jeho první ischemická komplikace se manifestovala ve věku 4,2 roku; ve věku 7 let prodělal fatální krvácivou mozkovou příhodu.

4.5. Dospělá výška dětí SGA-SS z celostátní databáze REPAR

Z 1502 dětí SGA-SS evidovaných v české národní databázi příjemců růstového hormonu REPAR již 397 dětí (221 chlapců) ukončilo růst a dosáhlo téměř finální dospělé tělesné výšky. Léčba růstovým hormonem v dávce 0,034 mg/kg/den (medián) byla zahájena u chlapců ve věku 8,5 roku (medián; P5-95: 3,2–15,0), u dívek ve věku 7,3 roku (3,9–13,5). Průměr SDS výšky

(ht-SDS) při zahájení léčby byl $-3,21$ (SD: 0,91). Ke statistickému zhodnocení byl použit jednovzorkový t-test, nepárový t-test s Welchovou korekcí, Wilcoxonův znaménkový test a χ^2 test.

4.6. Prepubertální a pubertální růst u dětí SGA-SS – data z celostátní databáze REPAR.

U kohorty 397 dětí (221 chlapců) SGA-SS z české národní databáze příjemců růstového hormonu REPAR, které již dosáhly své téměř dospělé výšky, jsme vyhodnotili vliv prepubertální a pubertální složky růstu na celkový efekt léčby růstovým hormonem. Odděleně jsme posoudili děti také podle výšky rodičů (oba nad -2 SD výšky, jeden pod -2 SD výšky, oba pod -2 SD výšky) a podle porodních parametrů – nízké porodní hmotnosti, nízké porodní délky či kombinace obojího.

4.7. První zkušenosti s dlouhodobě působícím růstovým hormonem.

V současné době jsou na prahu klinického použití tři modifikované molekuly dlouhodobě působícího růstového hormonu (long-acting growth hormone; LAGH) určené k podávání jednou týdně, které mají růstový účinek srovnatelný s přirozeným růstovým hormonem. Jeden z nich je somatrogen, který má molekulu fúzovanou s přirozeným lidským peptidem (CTP technologie), což zpomaluje renální i jaterní eliminaci a prodlužuje poločas účinku. Zúčastnili jsme se mezinárodní multicentrické klinické studie k posouzení zátěže léčbou somatrogenem ve srovnání s každodenním růstovým hormonem. Mezinárodní multicentrické studie se zúčastnilo 87 dětí s deficitem růstového hormonu ve věku 3-17 let a dlouhodobě zavedenou léčbou, z toho 11 z našeho centra. Děti dostávaly v náhodném pořadí střídavě 12 týdnů každodenní injekci rhGH a 12 týdnů LAGH somatrogen jednou za týden. Rodiče a starší děti hodnotili standardními dotazníky zátěž, jakou léčba pro dítě a rodiče představuje.

5. Publikace s doprovodnou diskusí

5.1. J. G. Mendel a řízení růstu dítěte: Geny, molekuly a pediatriká klinická praxe

Toni L, Plachý L, Amaratunga SA, Dušátková P, Kodytková A, Koloušková S, Průhová Š, Lebl J. J. G. Mendel a řízení růstu dítěte: Geny, molekuly a pediatriká klinická praxe. Čes-Slov Pediat 2022; 77 (4): 206-213

Lidský růst je ovlivněn převážně geneticky. O 80 % růstu člověka rozhodují geny, pouze přibližně 20 % závisí na vnějších faktorech. Pro růst je důležitých několik skupin genů. Patří mezi ně geny, které kódují proteohormony a podobné látky (například růstový hormon, IGF-1, IGF-2, ALS), hormonální receptory (receptory pro růstový hormon, pro IGF a pro hormony řídící činnost hypofýzy – mezi ně patří GHRH a ghrelin) a v určité míře také enzymy (jako PAPP-A2). Důležité jsou také geny, které řídí transkripční faktory a ovlivňují morfogenezi (například sonic hedgehog a další) a diferenciaci adenohypofýzy (například *PROPI*, *POU1F1*). Nezanedbatelný vliv mají také geny kódující transkripční faktory chondrocytů (jako *SHOX*). Mezi strukturální molekuly, které hrají důležitou roli, patří složky chrupavčité mezibuněčné matrix (geny pro aggrecan, kolageny, matrilin, fibrilin a další).

Spektrum „růstových“ genů zahrnuje nejen geny zodpovědné za vážné formy růstové poruchy, ale také geny, které ovlivňují běžnou variabilitu růstu. Mezi ně patří geny pro parakrinní signalizaci chondrocytů (jako systém *FGFR3/NPR2*), pro nitrobuněčnou signalizaci (jako Ras-MAPK kaskáda, JAK-STAT signalizační dráha) a pro základní nitrobuněčné procesy, včetně regulace epigenetických modifikací DNA a kontroly integrity DNA.

Následující text pojednává o vývoji genetického testování, základních genech regulujících růst a významu genetické diagnostiky pro pacienta s malým vzrůstem.

SOUBORNÝ REFERÁT

Gregor Mendel a řízení růstu dítěte: geny, molekuly a pediatrická klinická praxe

Gregor Mendel and regulation of child's growth: genes, molecules, and paediatric clinical routine

Ledjona Toni*, Lukáš Plachý*, Shenali Anne Amaratunga*, Petra Dušátková, Aneta Kodytková, Stanislava Koloušková, Štěpánka Průhová, Jan Lebl

Pediatrická klinika
2. lékařské fakulty UK
a Fakultní nemocnice v Motole,
Praha

SOUHRN

Toni L, Plachý L, Amaratunga SA, Dušátková P, Kodytková A, Koloušková S, Průhová Š, Lebl J. Gregor Mendel a řízení růstu dítěte: geny, molekuly a pediatrická klinická praxe

Růst člověka je řízen z 80 % geneticky, jen 20 % se na něm podílejí vlivy prostředí. Pro růst jsou klíčové geny kódující proteohormony a podobné molekuly (růstový hormon, IGF-1, IGF-2, acidolablní jednotku ALS), hormonální receptory (receptor pro růstový hormon, pro IGF a pro spouštěcí hormony hypofýzy – GHRH a ghrelin) a v omezené míře enzymy (PAPPA2). Důležité jsou geny pro transkripční faktory, které řídí morfogenezi (kaskáda sonic hedgehog a další) a diferenciaci adenohypofýzy (PROP1, POU1F1), ale také geny kódující transkripční faktory chondrocytů (SHOX). Ze strukturálních molekul jsou v popředí zájmu součásti chrupavčité mezibuněčné matrix (geny pro aggrecan, kolageny, matrilin, fibrilin a další). Spektrum genů zodpovědných jak za závažné růstové poruchy, tak za běžnou variabilitu růstu doplňují geny pro parakrinní signalizaci chondrocytu (systém FGFR3/NPR2), pro nitrobuněčnou signalizaci (Ras-MAPK kaskáda, JAK-STAT signalizační dráha) a pro fundamentální nitrobuněčné procesy, mezi které patří regulace epigenetických modifikací DNA a kontrola integrity DNA. Genetické testování má dvojitý smysl: okamžitý, protože přináší důležitou informaci pro pacienta a jeho rodinu o podstatě odchylky, o jejím budoucím vývoji a o dědičném přenosu – a dlouhodobý, protože pomáhá porozumět mechanismu nemoci a navrhnout nové terapie.

Klíčová slova: Mendel, geny, regulace longitudinálního růstu, hypofýza, chondrocyt

SUMMARY

Toni L, Plachý L, Amaratunga SA, Dušátková P, Kodytková A, Koloušková S, Průhová Š, Lebl J. Gregor Mendel and regulation of child's growth: genes, molecules, and paediatric clinical routine

Determination of human growth is mostly genetic (80%) and only partially environmental (20%). The key genes regulating growth include genes encoding proteohormones and related molecules (growth hormone, IGF-1, IGF-2, acid-labile subunit ALS), hormonal receptors (receptors for growth hormone, IGF and pituitary releasing hormones – GHRH and ghrelin), with a limited role of enzymes (PAPPA2). Genes encoding transcription factors regulate pituitary morphogenesis (sonic hedgehog cascade and others) and differentiation (PROP1, POU1F1) and also chondrocytes (SHOX). Structural molecules include components of cartilaginous extracellular matrix (genes encoding aggrecan, collagens, matrilin, fibrillin and others). The spectrum of genes responsible for both severe growth failure and minor variability of height includes genes for paracrine chondrocyte signalisation (FGFR3/NPR2 system), for intracellular signalisation (Ras-MAPK cascade, JAK-STAT signalling pathway) and for fundamental intracellular processes – regulation of DNA epigenetic modifications and control of DNA integrity. Genetic testing offers dual benefits: Immediate, as it bears an important information for the patient and his/her family about the disease nature, its future outcome and its inheritance – and a long-term – each testing contributes to understanding of disease mechanisms and to proposing novel therapies.

Key words: Mendel, genes, regulation of longitudinal growth, pituitary, chondrocyte

*tito tři autoři přispěli ke vzniku článku stejnou měrou

Korespondenční adresa:

prof. MUDr. Jan Lebl, CSc.
Pediatrická klinika 2. lékařské fakulty a FN Motol
V Úvalu 84
150 06 Praha
jan.lebl@lfmotol.cuni.cz

Gregor Johann Mendel představil výsledky svých experimentů a základní zákony dědičnosti na setkání Brněnského přírodovědného spolku (Naturforschendes Verein in Brunn) v roce 1865.⁽¹⁾ O několik let později, v roce 1869, objevil Friedrich Miescher v jádře buňky sloučeninu s nejasnou funkcí – deoxyribonukleovou kyselinu (DNA). V roce 1896 začal Archibald Edward Garrod studovat původ alkaptonurie – nápadné enzymatické poruchy. Nositelé patogenní varianty genu *HGD*, který kóduje enzym homogentisát 1,2-dioxygenázu, vylučují moč tmavnoucí na vzduchu. Na příkladu alkaptonurie ukázal, že enzymatické poruchy se v rodinách přenášejí podle Mendelových zákonů dědičnosti. Mendelovy zákony přenesl do klinické medicíny.⁽²⁾

V roce 1941 George Beadle a Edward Tatum prokázali, že geny kódují proteiny a předložili hypotézu „jeden gen = jeden protein“. Nastával zlatý věk genetiky. V roce 1953 Francis Crick a James Watson rozpoznali dvoušroubovici DNA jako nositelku genetické informace a za svůj objev byli oceněni Nobelovou cenou. V roce 1958 Crick navrhl systém tripletů jako klíčový princip zápisu genetické informace v DNA, rozpoznal výkonnou roli molekuly RNA a definoval „centrální dogma“ transkripce a translace genetické informace.

V roce 1961 další budoucí nobelista Marshall Nirenberg, mladý biochemik v americkém Národním institutu kloubních a metabolických onemocnění, identifikoval první triplet kódující aminokyselinu (TTT pro fenylalanin) a v následujících pěti letech se osobně přičinil o identifikaci kompletní sady 64 tripletů.⁽³⁾ Začalo čtení genetické informace.

V roce 1972 Walter Fiers určil první genovou sekvenci a Fred Sanger v roce 1977 přečetl genom prvního celého organismu, řávu Phi-X174. Jeho tým v roce 1981 sekvenoval genom lidské mitochondrie.

Na přelomu tisíciletí byla postupně publikována sekvence celého lidského genomu jako výsledek jednoho z nejambicióznějších vědeckých projektů historie biomedicíny – Human Genome Project.⁽⁴⁾ Díky technikám sekvenování nové generace (NGS) poznáváme v posledním desetiletí téměř každý týden funkce dalších a dalších genů, stále lépe rozumíme etiopatogenezi geneticky přenosných znaků, vývojových a funkčních variant i skutečných nemocí a umíme je mnohem lépe diagnostikovat a některé z nich cíleně léčit.

GENY, BÍLKOVINY A RŮST DÍTĚTE

Poznávání spektra strukturálních i funkčních proteinů a jejich biologické úlohy v lidském organismu krok za krokem odhalovalo podstatu biologických procesů.

Geny kódují: (1) proteohormony, (2) hormonální receptory, (3) enzymy, (4) transkripční faktory, (5) strukturální proteiny, (6) parakrinní regulační molekuly a jejich receptory, (7) nitrobuňkové signální molekuly, (8) molekuly řídící epigenetické modifikace – které řídí strukturu a přístupnost chromatinu, acetylaci a metylaci histonů či metylaci DNA, (9) reparační molekuly potřebné k zachování integrity DNA, (10) řadu dalších. Tyto jednotlivé skupiny proteinů se uplatňují také v řízení longitudinálního růstu člověka.



Obr. 1: Dívka s patogenní variantou *GH1* genu. Pro děti s těžkým deficitem růstového hormonu je typický vpáčený kořen nosu a široce prominující čelo. (foto archiv autorů)

Genetické testování má dvojí smysl. Okamžitý – protože přináší důležitou informaci pro pacienta a jeho rodinu o podstatě poruchy, o jejím budoucím vývoji a dědičném přenosu. A dlouhodobý – protože pomáhá porozumět mechanismu nemocí a vývojových odchylek a navrhnout nové léčebné postupy.

PROTEOHORMONY

Prvními kandidáty při hledání genetické podmíněnosti růstu byly geny, které kódují cirkulující hormony s přímým vlivem na tělesný růst. Patří mezi ně gen *GH1* pro molekulu lidského růstového hormonu a geny *IGF1* a *IGF2*, které kódují oba růstové faktory podobné inzulinu – IGF-1 a IGF-2.

Těžký izolovaný deficit růstového hormonu (IGHD) je vzácnou nemocí s incidencí 1 : 4000 až 1 : 10 000.⁽⁵⁾ Patogenní varianty *GH1* genu jsou málo častou příčinou IGHD. Autozomálně recesivní přenos IGHD byl nejdříve prokázán u dětí s homozygotní delecí celého *GH1* genu.⁽⁶⁾ Děti s delecí genu *GH1* mají nulové hladiny růstového hormonu a těžce zaostávají v růstu od prvního půlroku života. Některé z nich při léčbě růstovým hormonem začnou vytvářet neutralizační protilátky, protože si vůči molekule růstového hormonu nevyvinuly imunologickou toleranci (obr. 1).

Patogenní varianty genu *IGF1* byly u člověka dlouho považované za neslučitelné s přežitím, i když knock-out model myši s chybějícím *Igf1* genem je dlouho známý a přežití umožňuje. Až v roce 1996 Woods se spolupracovníky popsal 15letého chlapce s částečnou delecí *IGF1*. Po těžké intrauterinní růstové restrikci (37. t.t., 1400 g / 38 cm, obvod hlavy 27 cm) následovala postnatálně závažná růstová retardace spojená s progredující mikrocefalií, sensorineurální hluchotou a mentálním deficitem (obr. 2).⁽⁷⁾

IGF-1 cirkuluje v krvi převážně ve formě ternárního komplexu – ve spojení s vazebným proteinem IGFBP-3 a s acidolabilní podjednotkou (ALS). Tento ternární komplex chrání IGF-1 před rychlou degradací, významně prodlužuje jeho biologický poločas, a zajišťuje tak jeho dlouhodobé



Obr. 2: První pacient s prokázanou delecí *IGF1* genu ve věku 15 let. Převzato ze⁽⁷⁾

a vyvážené působení. Zatímco v genu *IGFBP3* dosud patogenní varianty popsány nebyly, patogenní varianty genu *IGFALS*, který kóduje molekulu ALS, způsobují mírnou až střední růstovou retardaci a mohou se přenášet autozomálně dominantně (monoalelicky).⁽⁸⁾

Molekula IGF-2 je důležitá zejména pro intrauterinní růst. Exprese genu *IGF2* je narušena u nejčastější varianty **Silverova–Russelova syndromu (11p15-SRS)**, v tomto případě ale jde o imprintingovou poruchu, nikoliv o mendelovskou dědičnost. Nedávno byla nalezena autozomálně dominantně přenesená patogenní varianta genu *IGF2*. Klinický obraz a růstový vzorec intrauterinní růstové restriktce s pomalým růstem v dětství se podobá Silverovu–Russelovu syndromu, nejsou vyznačené další známky syndromu.⁽⁹⁾

Zatím nebyly nalezeny patogenní varianty v genech, které kódují regulátory hypofyzární sekrece růstového hormonu – GHRH, somatostatin a ghrelin.⁽¹⁰⁾



Obr. 3: Fenotyp chlapce s necitlivostí k růstovému hormonu (Laronovým syndromem) v důsledku patogenní varianty *GHR* genu (foto laskavě poskytl prof. M. Savage ze svého archivu)

HORMONÁLNÍ RECEPTORY

Patogenní varianty genu *GHR*, který kóduje **receptor pro lidský růstový hormon**, jsou příčinou **necitlivosti k růstovému hormonu**, pro kterou se vžil název Laronův syndrom – na počest objevitele této poruchy, žijícího klasika dětské endokrinologie prof. Zvi Laron z Izraele, který ji popsal již v roce 1966 v populaci aškenázských Židů (obr. 3).⁽¹¹⁾ Nositelé poruchy měli vysoké hladiny růstového hormonu, ale nízké IGF-1. Podávání růstového hormonu po dobu 7 dnů hladinu IGF-1 nezvýšilo.⁽¹²⁾ Její molekulární podstata – neschopnost vazby růstového hormonu na receptor – byla prokázána v roce 1984.⁽¹³⁾

Stejná porucha byla rozpoznána v židovských i arabských populacích severní Afriky, Blízkého východu a v importované podobě v několika vesnicích v ekvádorských Andách. V oblastech se zvýšeným výskytem je příčinou kombinace příbuzenských sňatků a tzv. efektu zakladatele – tedy vznik patogenní varianty u dávného předka, od kterého se varianta začala šířit v uzavřených populacích. Úlohu konsanguinity v hledání molekulární podstaty autozomálně recesivně podmíněných onemocnění, včetně porušené regulace růstu, jsme nedávno popsali v souborném článku, ze kterého částečně čerpá i tento přehled.⁽¹⁴⁾

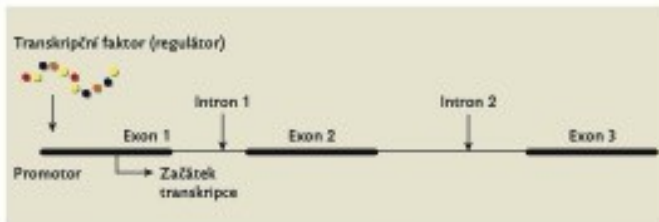
Gen *GHRHR* kóduje **receptor pro growth hormone-releasing hormone (GHRH)**. Tento receptor se exprimuje na somatotrofních buňkách adenohypofýzy a jeho stimulace prostřednictvím molekuly GHRH je předpokladem pro syntézu a sekreci růstového hormonu. Patogenní varianty *GHRHR* tedy vedou ke geneticky odlišné, ale klinicky podobné formě **izolovaného deficitu růstového hormonu**. Tato porucha byla poprvé popsána u sourozenecké dvojice z konsanguinní rodiny v Indii⁽¹⁵⁾ a následně ve větším rozsahu u dětí i dospělých ze dvou vesnic v provincii Sindh v jižním Pákistánu – opět v důsledku kombinace efektu zakladatele a konsanguinity. Nositelé poruchy mají extrémně nízkou tělesnou výšku, prominující čelo, jsou obézní, ale zpravidla nemají jiné zdravotní problémy a jsou fertillní.⁽¹⁶⁾ V jiných populacích jsou patogenní varianty *GHRHR* vzácné, ale při cíleném vyšetřování je lze mezi osobami s těžkým izolovaným deficitem růstového hormonu občas nalézt.

V nedávné době byl popsán také deficit růstového hormonu způsobený patogenní variantou genu *GHSR* (growth hormone secretagogue receptor), který kóduje receptor pro ghrelin – druhý ze „spouštěcích“ hormonů, který se podílí na řízení somatotrofních buněk hypofýzy.⁽¹⁷⁾

Gen *IGFR* kóduje receptor pro obě molekuly IGF – pro IGF-1 i IGF-2. Jeho monoalelické patogenní varianty jsou spojené s malým vzrůstem, který se v rodinách může dědit autozomálně dominantně. Jedná se o jednu z poměrně častých geneticky podmíněných forem familiárně malého vzrůstu s různým stupněm závažnosti podle tíže genové mutace.⁽¹⁸⁾

ENZYMY

Enzymy se v regulaci růstu uplatňují omezeně, protože na rozdíl od steroidních a tyreoidálních hormonů je syntéza proteohormonů na enzimech nezávislá.



Obr. 4: Schematické znázornění funkce transkripčního faktoru. Transkripční faktor (regulátor) se váže na promotor cílového genu. Touto vazbou indukuje (případně potlačuje) transkripci tohoto genu.



Obr. 5: Dívka se semilobární holoprosencefalií v důsledku mutace *SHH* genu. Narodila se s rozštěpem rtu a patra, deformací nosu, hypotelorismem, mikrocefalií a závažnou deformací mozku. Trpěla poruchami termoregulace, neurogení hypernatremií, deficitem ACTH, ale zejména progredujícími křečemi s apnoickými pauzami a desaturacemi na podkladě heteropie mozkové tkáně. A – ve věku 2 měsíců. B – fetální MR v gestačním věku 30 týdnů. (foto archiv autorů)

Jednou z mála výjimek je nedávno objevený enzym PAPP2 (pregnancy-associated plasma protein A2), kódovaný genem *PAPP2*. Tento enzym štěpí ternární komplex IGF-1/IGFBP3/ALS a zajišťuje dostupnost a biologickou účinnost volného IGF-1. Děti s bíalelickými patogenními variantami genu *PAPP2* špatně rostou, přestože mají nápadně vysoké



Obr. 6: Fenotyp sedmiletého chlapce, který je složeným heterozygotem s dvěma patogenními variantami *PROP1* genu. Měří 99 cm (–4,5 SD), výškový věk odpovídá 3,4 roku. (foto archiv autorů)



Obr. 7: Příznačný faciální fenotyp při mutaci *POU1F1* genu. Chlapec měl ve věku 2,5 roku 70 cm, měl růstový hormon po stimulaci 0,6 µg/l, centrální hypotyreózu a hladinu prolaktinu pod dolní hranici detekce. (foto archiv autorů)

hladiny celkového IGF-1, IGFBP-3, acidolabilní podjednotky, ale také IGF-2 a IGFBP-5.⁽¹⁰⁾

TRANSKRIPČNÍ FAKTORY

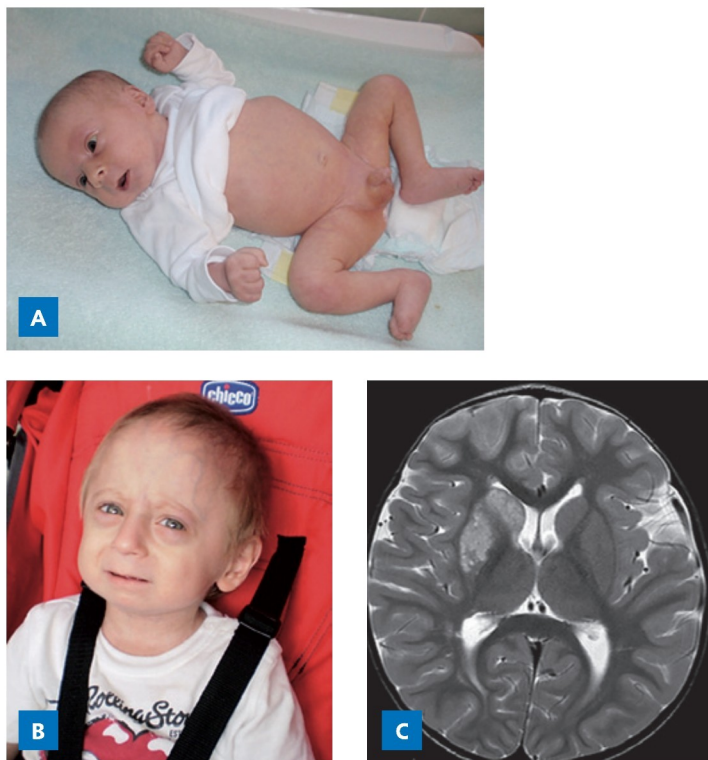
Morfogeneze hypofýzy je součástí embryonálního vývoje středěčárových struktur mozku, očí, zrakových nervů, chiasmatu a zrakových drah. Tento proces koordinuje kaskáda transkripčních faktorů, která v dokonalé souhře zajišťuje časově ohraničenou transkripci cílových genů a diferenciaci buněčných populací, které utvářejí struktury CNS (obr. 4). Čím dříve ve vývoji nastává porucha, tím závažnější dysmorfie vznikají – od anencefalie přes kyklopii, anoftalmii, různě vyjádřené formy holoprosencefalie (obr. 5) až po nezřídka klinicky málo nápadný obraz **septo-optické dysplazie**. Tyto poruchy jsou spojeny s variabilními formami hypopituitarismu – **izolovaného deficitu růstového hormonu (IGHD)** či **kombinovaného deficitu hypofyzárních hormonů (CPHD)**.⁽²⁰⁾

Typickou příčinou poruchy morfogeneze hypofýzy jsou patogenní varianty genů kaskády sonic hedgehog (*SHH*, *PTCH1*, *GLI2*) a dále např. genů *OTX2*, *FGF8*, *HESX1*, *RIEG*, *SOX2*, *SOX3*, *LHX3*, *LHX4* a *FOXA2*, které kódují jednotlivé transkripční faktory.^(11,21)

Na morfogenezi hypofýzy navazuje **diferenciace hypofýzy** – vznik pěti buněčných linií se specifickou hormonální produkcí, tedy somatotrofů (růstový hormon), tyreotrofů (TSH), gonadotrofů (FSH, LH), kortikotrofů (ACTH) a laktotrofů (prolaktin). Tuto fázi koordinují především transkripční faktory kódované geny *PROP1* a *POU1F1*. Patogenní varianty *PROP1* jsou nejčastější příčinou kombinovaného deficitu hypofyzárních hormonů ve střední a východní Evropě (obr. 6).^(22–24)

Bíalelická patogenní varianta genu *POU1F1* (původně nazvaného *PIT1*) byla poprvé popsána v roce 1992 u dvou sester z konsanguinní rodiny s klinickým obrazem podobným kretenismu. Dívky měly téměř nulové hladiny růstového hormonu, TSH a prolaktinu. Na tomto příkladu se podařilo poprvé prokázat, že defekt transkripčního faktoru ovlivní transkripci několika cílových genů (obr. 7).⁽²⁵⁾

Transkripční faktory se uplatňují nejen v embryonálním a fetálním vývoji tkání a orgánů, ale mohou být



Obr. 8: Chlapec s Hutchinsoninovou–Gilfordovou progerií (HGPS) v důsledku patogenní varianty genu *LMNA*. A – ve věku 1 měsíc. B – ve věku 3 roky. C – příčinou smrti ve 4 letech byla ischemie oblasti bazálních ganglií vpravo a kortexu a subkortikálních oblastí frontálního laloku vpravo. (foto archiv autorů)

i předpokladem jejich další funkce. Jedním z příkladů je SHOX protein, který je kódován genem *SHOX* – short stature homeobox-containing gene na X chromozomu. Ten je potřebný pro správnou funkci chondrocytů v růstové chrupavce. I když jeho přesná úloha není jasná, je zřejmé, že homozygotní mutace způsobují těžkou kostní dysplazii Langerova typu, zatímco monoalelické patogenní varianty stejně jako chybění genu u Turnerova syndromu vyvolávají růstovou poruchu, která je někdy spojena s mírnou mezomelickou kostní dysplazií a s Madelungovou deformitou předloktí.^(26,27)

STRUKTURÁLNÍ MOLEKULY

Longitudinální růst probíhá v chrupavčité **epifyzární růstové ploténce**. Ta je efektorovou tkání, která zajišťuje prodloužení dlouhých kostí, zvyšování tělesné délky a výšky. Chondrocyty epifyzární růstové chrupavky procházejí řízenou buněčnou diferenciací z pluripotentních progenitorových buněk směrem k rychle proliferujícím buňkám a konečně k chondrocytům hypertrofické zóny novotvořené kosti.

Aktivní chondrocyty růstové chrupavky secernují chrupavčitou matrix, mezibuněčnou strukturu bohatou na kolageny a proteoglykany s řadou funkčních molekul významných pro tělesný růst.⁽¹¹⁾

Gen *ACAN* kóduje bílkovinnou část proteoglykanu **aggrecan**. Aggrecan je hydrofilní proteoglykan, který přispívá

k pružnosti chrupavky a podílí se na absorpci dynamického zatížení kloubů, kostí i páteře. Monoalelické patogenní varianty genu *ACAN* vedou ke klinickému obrazu familiárně malého vzrůstu, který může být u dospělých nositelů poruchy spojen s časnými kloubními a páteřními obtížemi.⁽²⁸⁾

Mezi další součásti mezibuněčné matrix patří některé **kolageny, fibrilin a matrilin**, kódované geny *COL2A1*, *COL9A1*, *COL10A1*, *COL11A1*, *FBN1*, *MATN3*.^(26,29,30) Patogenní varianty těchto genů v heterozygotní (monoalelické) formě způsobují mírnější růstovou poruchu, která může být dominantně dědičná (familiárně malý vzrůst). Homozygotní (bialelické) mutace se vyskytují častěji v konsanguinních rodinách – např. mutace *MATN3* způsobuje těžkou formu autozomálně recesivní spondyloepimetafyzeální dysplazie (SEMD).⁽³¹⁾

Také poruchy strukturálních proteinů mimo epifyzární chrupavku mohou způsobit růstovou poruchu. Jedním z nich je lamin, protein tvořící vnitřní skelet membrány buněčného jádra. Je kódován genem *LMNA*. Některé patogenní varianty *LMNA* způsobují velmi závažný klinický obraz **Hutchinsonovy–Gilfordovy progerie**, syndromu předčasněho stárnutí, který vede k časným úmrtím v důsledku cévních mozkových příhod (obr. 8).⁽³²⁾

PARAKRINNÍ REGULAČNÍ MOLEKULY A JEJICH RECEPTORY

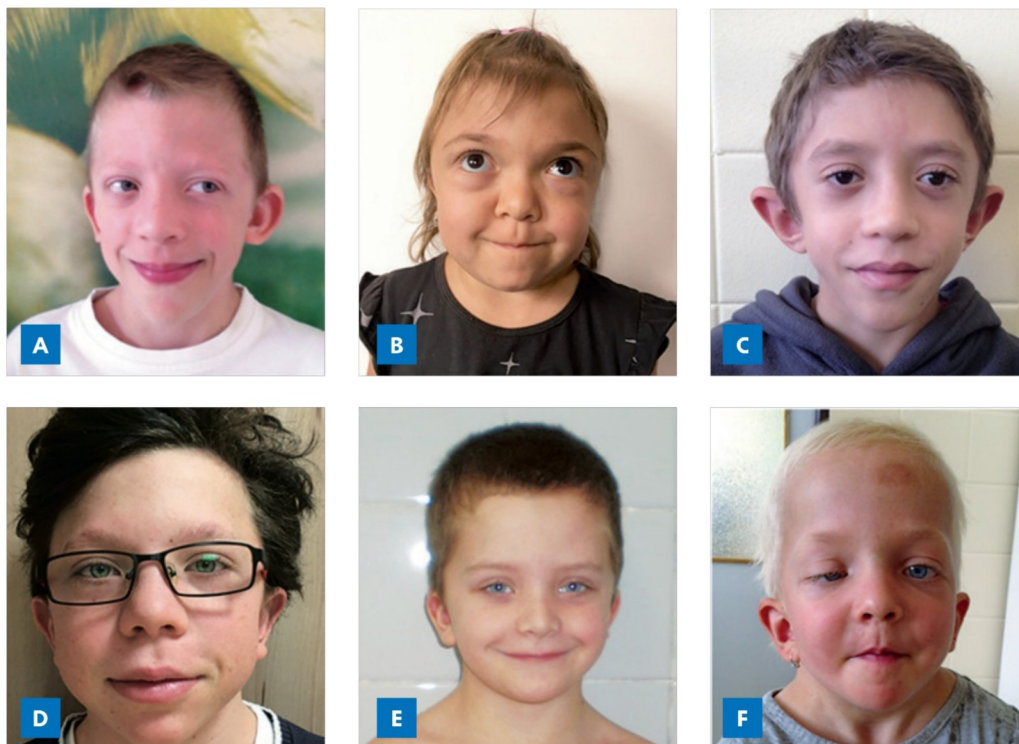
Parakrinní signalizace je součástí řízení proliferace a diferenciace chondrocytů růstové ploténky a tvorby extracelulární matrix.⁽³³⁾ Důležité místo v parakrinní regulaci mají fibroblastové růstové faktory (FGF). Patogenní varianty genu *FGFR3*, který kóduje receptor pro FGF 3. typu, nepříznivě ovlivňují růst kostí a vedou ke spektru klinických fenotypů od **tanatoforní dysplazie** (fatální forma při bialelických patogenních variantách) přes **achondroplazii**, **hypochondroplazii** a „**idiopatický malý vzrůst**“ při monoalelických variantách různé tíže.⁽²⁶⁾

Natriuretický peptid typu C (CNP) a jeho receptor NPR2 představují další parakrinní systém přímo spřažený se systémem FGF. Homozygotní inaktivační mutace genu *NPR2* způsobují závažnou akromezomelickou **kostní dysplazii typu Maroteaux**, zatímco heterozygotní inaktivační mutace vedou k mírnější formě růstové poruchy, která se dědí autozomálně dominantně, a představuje tak další formu familiárně menšího vzrůstu. Vzhledem k odhadované četnosti heterozygotů 1 : 700 v běžné populaci je častou formou monogenně dědičného malého vzrůstu.^(26,34,35) Aktivační mutace genu *NPR2* způsobují naopak vysoký vzrůst, také dominantně dědičný.⁽³⁶⁾

Mezi další geny zodpovědné za parakrinní regulaci chondrocytu patří například *IHH*, *PTH1H* a kostní morfogenní faktory (BMPs).⁽²⁶⁾

NITROBUNĚČNÉ SIGNALIZAČNÍ MOLEKULY

Poruchy nitrobuněčné signalizace způsobují široké spektrum poruch, pro jejichž klinický obraz je typická také porucha růstu. Nejčastějšími jsou tzv. **RASopatie**, poruchy Ras/



Obr. 9: **Faciální fenotypy dětí se syndromem Noonanové na podkladě patogenních variant jednotlivých genů Ras/MAPK signální kaskády.** A – *SOS1*; B – *KRAS*; C – *SOS1*; D – *PTPN11*; E – *PTPN11*; F – *SHOC2* (foto archiv autorů)

MAPK signální kaskády, které podle odhadů postihují 1 : 1000 osob. RASopatie zahrnují skupinu příbuzných stavů – syndrom Noonanové, Coffinův–Lowryho syndrom, Costelloův syndrom, syndrom LEOPARD, Noonan-like syndrom with loose anagen hair a několik dalších.

Příčinou je abnormální aktivace Ras/MAPK signální dráhy, která přenáší informaci mezi membránovým receptorem pro růstové faktory a buněčným jádrem, ve kterém ovlivňuje transkripci genů důležitých pro buněčnou proliferaci, migraci, diferenciaci a apoptózu.^(26,37) Pro Ras/MAPK kaskádu jsou klíčové geny *PTPN11*, *KRAS*, *HRAS*, *SOS1*, *BRAF* a *SHOC2*. 60 % případů vzniká jako *de novo* heterozygotní patogenní varianta, ve 40 % případů se varianta přenáší autozomálně dominantně (obr. 9).⁽³⁷⁾

Další nitrobuněčnou signální kaskádou důležitou pro růst je **JAK-STAT systém**. Přenáší do jádra buňky informaci

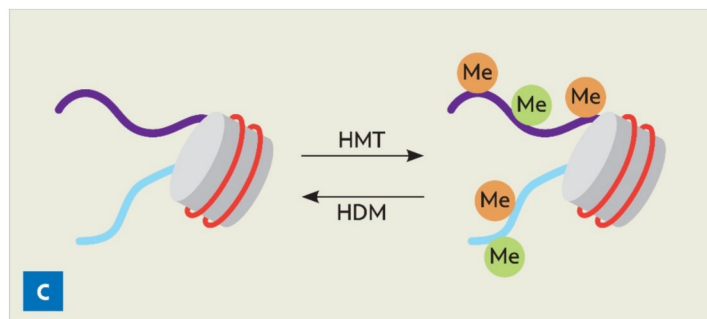
o stimulaci receptoru pro růstový hormon. Patogenní varianty genu *STAT5B*,⁽³⁸⁾ které znemožňují přenos signálu, vedou k rezistenci vůči růstovému hormonu (jedna z variant Laronova syndromu), často ve spojení se závažnými infekcemi, protože stejná signalizace je klíčová pro funkci imunitního systému. Nedávno jsme popsali chlapce s patogenní variantou genu *STAT3*, který měl rezistenci vůči růstovému hormonu a spektrum časné nastupujících imunopatologických projevů – diabetes 1. typu, tyreoiditidu, bicytopenii, lymfoproliferaci a časté závažné infekce.⁽³⁹⁾

ŘÍZENÍ EPIGENETICKÝCH MODIFIKACÍ

Molekuly, které řídí epigenetické modifikace, ovlivňují strukturu a přístupnost chromatinu, acetylaci a metylaci



Obr. 10: **Syndrom kabuki.** A – fenotyp chlapce se syndromem kabuki na podkladě patogenní varianty genu *KMT2D*. B – způsob líčení herců při tradičním japonském divadle kabuki. C – dynamická metylace histonů, která zvyšuje či tlumí expresi jednotlivých genů. HMT – H3-lysin-4-metyltransferáza (kódována genem *KMT2D*); HDM – histon-H3-lysin-27-demetyláza (kódována genem *UTX/KDM6A*). Mutace těchto genů mohou způsobit syndrom kabuki. (foto archiv autorů)



histonů či metylaci DNA. Tím mohou zvyšovat či tlumit expresi jednotlivých cílových genů.

Syndrom kabuki způsobují patogenní varianty genu *KMT2D*, který kóduje H3-lysín-4-metyltransferázu (autozomálně dominantní nebo *de novo* mutace), nebo vzácněji genu *UTX/KDM6A*, kódujícího histon-H3-lysín-27-demetylázu (X-vázaný). Příznaky syndromu kabuki vznikají v důsledku **nestability chromatinu**, a tím nevyváženým prepisem určitých cílových genů.⁽⁴⁰⁾ Děti s tímto syndromem jsou hypotonické, vývojově poněkud opožděné s autistickými rysy a mají příznačný faciální fenotyp – obličej připomíná způsob líčení herců divadla kabuki, jedné ze tří forem tradičního japonského divadla (obr. 10). Všechny děti se syndromem kabuki mají poruchu růstu, často také orgánové anomálie srdce, ledvin a gastrointestinálního traktu a v dospělosti jim hrozí zvýšené riziko nádorů. Je zřejmé, že nestabilita chromatinu ovlivňuje jak časné embryonální a fetální období, tak i postnatální růst a vývoj.⁽⁴¹⁾

KONTROLA INTEGRITY DNA

Systémy, které opravují DNA, jsou potřebné pro optimální funkci všech buněk v lidském těle. Jejich porucha je příčinou těžké růstové retardace ze skupiny **primordiálního nanismu**. Příkladem je gen *PCNT*, který kóduje centrozomální

protein **pericentrin**, důležitý pro zachování struktury DNA. Homozygotní patogenní varianty *PCNT* způsobují **mikrocefalický osteodysplastický primordiální nanismus typu II** – vzácnou poruchu, jejíž nositelé se rodí s hmotností pod 1500 g při porodu v termínu a nedosahují dospělé výšky ani 100 cm.⁽⁴²⁾

ZÁVĚR

Lidský růst je komplexním biologickým fenoménem, který má snadno měřitelný průběh a výsledek. Až 80 % longitudinálního růstu člověka je podmíněno geneticky, jen přibližně z 20 % k němu přispívají vlivy prostředí. V nepřeberném množství genových variant se učíme nacházet ty, které pravděpodobně nebo s jistotou způsobují poruchu, a pomocí kritérií ACMG (American College of Clinical Genetics and Genomics) je odlišujeme od variant nevinných (benigních), pravděpodobně nevinných či od variant nejasného významu. Od „velké patologie“ pronikáme k subtilnějším variantám normy, uvědomujeme si obtížnost definice „zdraví“ a „nemoci“ a lépe rozumíme i vlivu genů na běžně přijímanou variabilitu tělesných znaků, mezi kterými má různorodost tělesné výšky významné místo. Bezděčně se tak vracíme k Mendelovi, který poznával principy genetiky na barvě květu a tvaru semen – tedy na variantách normy. |

Poděkování

Výzkum genetické podmíněnosti růstu probíhá s podporou grantů AZV NV18-07-00283, NU21-07-00335, NU22J-07-00014 a grantů GA UK 340420 a 408120. Autoři děkují všem spolupracujícím lékařům, kteří jim posílají svoje komplikované dětské pacienty, a také rodičům dětí a dětem samotným za jejich spolupráci. Fotografie dětských pacientů jsou zveřejněny se souhlasem rodičů, kteří si přejí, aby přispěly ke vzdělávání lékařů a studentů medicíny.

LITERATURA

1. Mendel G. Versuche über Pflanzenhybriden. Verhandlungen des naturforschenden Vereines in Brünn, Bd. IV für das Jahr 1865: 3–47.
2. Garrod AE. The incidence of alkaptonuria: a study in clinical individuality. *Lancet* 1902; 2(4137): 1616–1620.
3. Nirenberg M. Historical review: Deciphering the genetic code – a personal account. *Trends Biochem Sci* 2004; 29: 46–54.
4. Green ED, Watson JD, Collins FS. Human Genome Project: Twenty-five years of big biology. *Nature* 2015; 526: 29–31.
5. Mullis PE. Genetics of growth hormone deficiency. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2007; 36: 17–36.
6. Phillips JA 3rd, Hjelle BL, Seeburg PH, Zachmann M. Molecular basis for familial isolated growth hormone deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 6372–6375.
7. Woods KA, Camacho-Hübner C, Savage MO, Clark AJL. Intrauterine growth retardation and postnatal growth failure associated with deletion of the insulin-like growth factor I gene. *N Engl J Med* 1996; 335: 1363–1367.
8. Toni L, Pádrová K, Plachý L, et al. Význam acidolabilní podjednotky (ALS) v etiologii a v diagnostice malého vzrůstu. *Ces-Slov Pediat* 2021; 75: 214–218.
9. Begemann M, Zirn B, Santen G, et al. Paternally Inherited *IGF2* mutation and growth restriction. *N Engl J Med* 2015; 373: 349–56.
10. Dauber A, Rosenfeld RG, Hirschhorn JN. Genetic evaluation of short stature. *J Clin Endocrinol Metab* 2014; 99: 3080–92.
11. Laron Z, Pertzalan A, Mannheimer S. Genetic pituitary dwarfism with high serum concentration of growth hormone--a new inborn error of metabolism? *Isr J Med Sci* 1966; 2: 152–155.
12. Amselem S, Duquesnoy P, Attree O, et al. Laron dwarfism and mutations of the growth hormone-receptor gene. *N Engl J Med* 1989; 321: 989–995.
13. Eshet R, Laron Z, Pertzalan A, et al. Defect of human growth hormone receptors in the liver of two patients with Laron-type dwarfism. *Isr J Med Sci* 1984; 20: 8–11.
14. Amaratunga SA, Tayeb TH, Dusatkova P, et al. Invaluable role of consanguinity in providing insight into paediatric endocrine conditions: Lessons learnt from congenital hyperinsulinism, monogenic diabetes, and short stature. *Horm Res Paediatr* 2022; 95: 1–11.
15. Wajnrajch MP, Gertner JM, Harbison MD, et al. Nonsense mutation in the human growth hormone-releasing hormone receptor causes growth failure analogous to the little (lit) mouse. *Nat Genet* 1996; 12: 88–90.
16. Baumann G, Maheshwari H. The Dwarfs of Sindh: severe growth hormone (GH) deficiency caused by a mutation in the GH-releasing hormone receptor gene. *Acta Paediatr Suppl* 1997; 423: 33–38.
17. Chanoine JP, De Waele K, Walia P. Ghrelin and the growth hormone secretagogue receptor in growth and development. *Int. J. Obes* 2009; 33(51): S48–S52.

18. **Klammt J, Kiess W, Pfäffle R.** *IGF1R* mutations as cause of SGA. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2011; 25: 191–206.
19. **Dauber A, Muñoz-Calvo MT, Barrios V, et al.** Mutations in pregnancy-associated plasma protein A2 cause short stature due to low IGFI availability. *EMBO Mol Med* 2016; 8: 363–74.
20. **Riedl S, Vosahlo J, Battelino T, et al.** Refining clinical phenotypes in septo-optic dysplasia based on MRI findings. *Eur J Pediatr* 2008; 167: 1269–76.
21. **Gregory LC, Dattani MT.** The molecular basis of congenital hypopituitarism and related disorders. *J Clin Endocrinol Metab* 2020; 105: dgz184.
22. **Lebl J, Vosáhlo J, Pfaeffle RW, et al.** Auxological and endocrine phenotype in a population-based cohort of patients with *PROP1* gene defects. *Eur J Endocrinol* 2005; 153: 389–96.
23. **Navardauskaite R, Dusatkova P, Obermannova B, et al.** High prevalence of *PROP1* defects in Lithuania: phenotypic findings in an ethnically homogeneous cohort of patients with multiple pituitary hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2014; 99: 299–306.
24. **Dusatkova P, Pfäffle R, Brown MR, et al.** Genesis of two most prevalent *PROP1* gene variants causing combined pituitary hormone deficiency in 21 populations. *Eur J Hum Genet* 2016; 24: 415–20.
25. **Tatsumi K, Miyai K, Notomi T, et al.** Cretinism with combined hormone deficiency caused by a mutation in the *PIT1* gene. *Nat Genet* 1992; 1: 56–58.
26. **Jee YH, Andrade AC, Baron J, Nilsson O.** Genetics of Short Stature. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2017; 46: 259–281.
27. **Shears DJ, Vassal HJ, Goodman FR, et al.** Mutation and deletion of the pseudoautosomal gene *SHOX* cause Leri-Weill dyschondrosteosis. *Nat Genet* 1998; 19: 70–73.
28. **Gkourogianni A, Andrew M, Tyzinski L, et al.** Clinical characterization of patients with autosomal dominant short stature due to Aggrecan mutations. *J Clin Endocrinol Metab* 2017; 102: 460–469.
29. **Plachy L, Dusatkova P, Maratova K, et al.** Familial Short Stature - a novel phenotype of growth plate collagenopathies. *J Clin Endocrinol Metab* 2021; 106: 1742–1749.
30. **Plachy L, Strakova V, Elblova L, et al.** High prevalence of growth plate gene variants in children with familial short stature treated with growth hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 2019; 104: 4273–4281.
31. **Borochowitz ZU, Scheffer D, Adir V, et al.** Spondylo-epi-metaphyseal dysplasia (SEMD) matrilin 3 type: homozygote matrilin 3 mutation in a novel form of SEMD. *J Med Genet* 2004; 41: 366–372.
32. **Toni L, Dušátková P, Novotná D, et al.** Short stature in a boy with atypical progeria syndrome due to *LMNA* c.433G>A.(p.(Glu145Lys)): apparent growth hormone deficiency but poor response to growth hormone therapy. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2019; 32: 775–779.
33. **Kronenberg HM.** Developmental regulation of the growth plate. *Nature* 2003; 423(6937): 332–6.
34. **Bartels CF, Bükülmez H, Padayatti P, et al.** Mutations in the transmembrane natriuretic peptide receptor NPR-B impair skeletal growth and cause acromesomelic dysplasia, type Maroteaux. *Am J Hum Genet* 2004; 75: 27–34.
35. **Plachy L, Dusatkova P, Maratova K, et al.** *NPR2* variants are frequent among children with familial short stature and respond well to growth hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 2020; 105: dgaa037.
36. **Miura K, Namba N, Fujiwara M, et al.** An overgrowth disorder associated with excessive production of cGMP due to a gain-of-function mutation of the natriuretic peptide receptor 2 gene. *PLoS One* 2012; 7: e42180.
37. **Lebl J, Kolouskova S, Toni L, et al.** Syndrom Noonanové a další RASopatie: Etiologie, diagnostika a terapie. *Ces-Slov Pediat* 2020; 75: 219–226.
38. **Klammt J, Neumann D, Gevers EF, et al.** Dominant-negative *STAT5B* mutations cause growth hormone insensitivity with short stature and mild immune dysregulation. *Nat Commun* 2018; 9: 2105.
39. **Sediva H, Dusatkova P, Kanderova V, et al.** Short stature in a boy with multiple early-onset autoimmune conditions due to a *STAT3* activating mutation: Could intracellular growth hormone signalling be compromised? *Horm Res Paediatr* 2017; 88: 160–166.
40. **Wang YR, Xu NX, Wang J, Wang XM.** Kabuki syndrome: review of the clinical features, diagnosis and epigenetic mechanisms. *World J Pediatr* 2019; 15: 528–535.
41. **Boniel S, Szymańska K, Śmigiel R, Szczaluba K.** Kabuki syndrome – clinical review with molecular aspects. *Genes (Basel)* 2021; 12: 468.
42. **Rauch A, Thiel CT, Schindler D, et al.** Mutations in the pericentrin (*PCNT*) gene cause primordial dwarfism. *Science* 2008; 319(5864): 816–819.

5.2. The genetic landscape of children born small for gestational age with persistent short stature (SGA-SS)

Toni L, Plachy L, Dusatkova P, Amaratunga SA, Elblova L, Sumnik Z, Kolouskova S, Snajderova M, Obermannova B, Pruhova S, Lebl J. The genetic landscape of children born small for gestational age with persistent short stature (SGA-SS). Horm Res Paediatr. 2024; 97(1): 40-52 (publikováno online 5.4.2023)

Následující publikovaná původní práce představuje výsledky genetického vyšetření v naší kohortě. Celkově mezi lety 2008-2018 bylo na Pediatrické klinice Fakultní nemocnice v Motole a 2. lékařské fakulty UK léčeno růstovým hormonem (GH) 820 pacientů. Z nich bylo 256 klasifikováno jako SGA-SS (porodní délka a/nebo porodní hmotnost <-2 SD pro gestační věk a výška při zahájení terapie GH $<-2,5$ SD). Do studie byli zahrnuti ty děti, u kterých byl k dispozici triplet DNA (dítě a oba rodiče) (176/256). Cílené testování (karyotyp/FISH/MLPA/cílené Sangerovo sekvenování) bylo provedeno u dětí se sugestivním fenotypem a jasným podezřením na určitou genetickou poruchu. Všichni zbývající pacienti podstoupili MS-MLPA k identifikaci Silver-Russellova syndromu a ti, u kterých zatím nebyla zjištěna genetická etiologie, byli následně vyšetřeni pomocí celoexomového sekvenování nebo vyšetřením cíleného panelu 398 genů souvisejících s růstem. Genetické varianty jsme klasifikovali pomocí postupů navržených ACMG. Genetická etiologie byla objasněna u 74/176 (42%) dětí. Z nich 12/74 (16%) mělo patogenní nebo pravděpodobně patogenní genové varianty (P/LP) ovlivňující vývoj hypofýzy (*LHX4, OTX2, PROKR2, PTCH1, POU1F1*), osu GH-IGF-1 nebo IGF-2 (*GHSR, IGFALS, IGF1R, STAT3, HMGA2*), 2/74 (3%) měli patogenní varianty v genech osy štítné žlázy (*TRHR, THRA*), 17/74 (23%) mělo defekt v genech důležitých pro tvorbu a funkci chrupavčité matrix (*ACAN*, různé kolageny, *FLNB, MATN3*) a 7/74 (9%) mělo porušenou parakrinních regulaci chondrocytů (*FGFR3, FGFR2, NPR2*). V 12/74 (16%) jsme odhalili P/LP varianty ovlivňující základní intracelulární a intranukleární procesy (*CDC42, KMT2D, LMNA, NSD1, PTPN11, SRCAP, SON, SOS1, SOX9, TLK2*). Deficit SHOX byl zjištěn u 7/74 (9%), Silver-Russellův syndrom u 12/74 (16%) (11p15, UPD7) a různé chromozomální aberace u 5/74 (7%) dětí. Vysoký podíl dětí s objasněnou příčinou růstové poruchy pomohl nově porozumět genetické etiologii SGA-SS. Ukázali jsme, že v řízení růstu hraje ústřední roli růstová ploténka. Dále mají významný podíl geny osy GH-IGF-1 a štítné žlázy a dále geny zodpovědné za intracelulární regulaci a signalizaci.

The Genetic Landscape of Children Born Small for Gestational Age with Persistent Short Stature

Ledjona Toni Lukas Plachy Petra Dusatkova Shenali Anne Amaratunga
Lenka Elblova Zdenek Sumnik Stanislava Kolouskova Marta Snajderova
Barbora Obermannova Stepanka Pruhova Jan Lebl

Department of Paediatrics, 2nd Faculty of Medicine, Charles University in Prague and Motol University Hospital, Prague, Czech Republic

Keywords

Small for gestational age · Short stature · Genetics · GH-IGF-1 axis · Growth plate

Abstract

Introduction: Among children born small for gestational age, 10–15% fail to catch up and remain short (SGA-SS). The underlying mechanisms are mostly unknown. We aimed to decipher genetic aetiologies of SGA-SS within a large single-centre cohort. **Methods:** Out of 820 patients treated with growth hormone (GH), 256 were classified as SGA-SS (birth length and/or birth weight <-2 SD for gestational age and life-minimum height <-2.5 SD). Those with the DNA triplet available (child and both parents) were included in the study (176/256). Targeted testing (karyotype/FISH/MLPA/specific Sanger sequencing) was performed if a specific genetic disorder was clinically suggestive. All remaining patients underwent MS-MLPA to identify Silver-Russell syndrome, and those with unknown genetic aetiology were subsequently examined using whole-exome sequencing or targeted panel of 398 growth-related genes. Genetic variants were classified using ACMG guidelines. **Results:** The genetic aetiology was elucidated in 74/176 (42%) children. Of these,

12/74 (16%) had pathogenic or likely pathogenic (P/LP) gene variants affecting pituitary development (*LHX4*, *OTX2*, *PROKR2*, *PTCH1*, *POU1F1*), the GH-IGF-1 or IGF-2 axis (*GHSR*, *IGFALS*, *IGF1R*, *STAT3*, *HMG2*), 2/74 (3%) the thyroid axis (*TRHR*, *THRA*), 17/74 (23%) the cartilaginous matrix (*ACAN*, various collagens, *FLNB*, *MATN3*), and 7/74 (9%) the paracrine chondrocyte regulation (*FGFR3*, *FGFR2*, *NPR2*). In 12/74 (16%), we revealed P/LP affecting fundamental intracellular/intranuclear processes (*CDC42*, *KMT2D*, *LMNA*, *NSD1*, *PTPN11*, *SRCAP*, *SON*, *SOS1*, *SOX9*, *TLK2*). *SHOX* deficiency was found in 7/74 (9%), Silver-Russell syndrome in 12/74 (16%) (11p15, UPD7), and miscellaneous chromosomal aberrations in 5/74 (7%) children. **Conclusions:** The high diagnostic yield sheds a new light on the genetic landscape of SGA-SS, with a central role for the growth plate with substantial contributions from the GH-IGF-1 and thyroid axes and intracellular regulation and signalling.

© 2023 The Author(s).

Published by S. Karger AG, Basel

Based on the abstract that was granted the Henning-Andersen Prize at the 60th ESPE Annual Meeting, Rome, September 2022.

Introduction

Approximately 5% of children are born small for gestational age (SGA) – with a birth weight and/or length below -2 SD compared to normative values for their gestational age [1]. The aetiology of SGA is heterogeneous (environmental, maternal, placental, and endogenous factors, including defined gene variants [2]). Up to 90% of SGA children develop catch-up growth during the first 2 years of life, while the remaining fail to catch up and are referred to as ‘small for gestational age – short stature’ (SGA-SS). These children are known to remain small throughout childhood and reach a substantially reduced adult body height [3, 4]. They are therefore indicated for treatment with growth hormone (GH) [1, 5, 6]. Nevertheless, the response to GH administration is variable among individual SGA-SS children, which may reflect the heterogeneous aetiology of their growth failure [7, 8].

In SGA-SS, several genetic mechanisms should be taken into consideration: imprinting disorders and abnormal methylation patterns such as Silver-Russell syndrome (SRS), Temple syndrome, IMAGE syndrome, and others [9–11]. In addition, a long list of single gene conditions has been associated with the regulation of human growth and thus impact on final height, albeit not necessarily associated with prenatal growth restriction [12, 13]. Some of these genes regulate the structural development of the cerebral midline and pituitary and functional components of the GH-IGF-1 axis (hormones, their receptors, and post-receptor signalisation). Moreover, new genes have been discovered which code for important growth plate paracrine factors, proteins of cartilage extracellular matrix, components of intracellular regulating cascades, and proteins involved in fundamental intranuclear processes [2].

The elucidation of the genetic background of SGA-SS was initiated no more than 2 decades ago [2]. In some cases, a child might present with typical features, leading to targeted genetic testing. A typical example is the genetic diagnosis of SRS in individuals fulfilling the Netchine-Harbisson clinical criteria [9]. However, most SGA-SS children present with no apparent syndromic features; therefore, genetic diagnosis is challenging.

New possibilities of genetic testing such as next-generation sequencing (NGS) allowed new advancements in discovering the genetic aetiology of short stature within the past decade [14]. Knowledge of the genetic basis of growth disorders in these children not only helps in better understanding the pathophysiology of growth but may have important consequences for their treatment and

follow-up as well. The aim of this study was to decipher genetic aetiologies among a large single-centre cohort of SGA-SS children treated with GH and to stratify them according to molecular mechanisms leading to combined pre- and postnatal growth failure.

Patients

The study cohort was selected from 820 children treated with GH in our centre between May 2008 and December 2018 using a stepwise selection process as displayed in Figure 1. Other causes of growth failure were considered and appropriately evaluated before starting GH therapy. Extremely preterm children (gestational age <28 weeks) were excluded due to missing relevant normative values for their size at birth. After exclusion of children treated with GH for other causes (chronic kidney disease, acquired GH deficiency (GHD), Turner syndrome, Prader-Willi syndrome, and primary GHD born either appropriate for gestational age or SGA but with life-minimum height >-2.5 SD), 256 children with SGA-SS (birth weight or length <-2 SD and body height <-2.5 SD after 3 years of life) remained for further evaluation. Out of them, 176/256 (69%) families agreed to genetic testing; therefore, the child and both of his/her parents were enrolled in the study (Fig. 1). The clinical assessment of all children included measurements of weight (using an electronic scale) and height (mean of three measurements using a calibrated stadiometre to the nearest 1 mm). These results were converted to the SDS using age- and sex-specific normative values [15]. The height of the parents was either obtained during the patients' visit using the same method or referred from their medical records. Birth parameters were obtained from medical records.

The cohort included 93 males and 83 females. The median birth term was 39 weeks (interquartile range [IQR] 37; 40), median birth weight was 2,485 g (IQR 2,108; 2,788), and median birth length was 45 cm (IQR 43; 47). The median age at initiation of GH therapy was 4.95 years (IQR 3.13; 7.18), and the median life-minimum height SDS was -3.04 (IQR -3.49 ; -2.72).

All SGA-SS children underwent long-term GH treatment with a dosage of 35 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ as suggested in the consensus from Clayton et al. [5]. If the child was also found to have GHD, the dose was in the range of 25–35 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ in accordance with summary of product characteristics, and in the case of SHOX deficiency, 50 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ as recommended in previous studies [16].

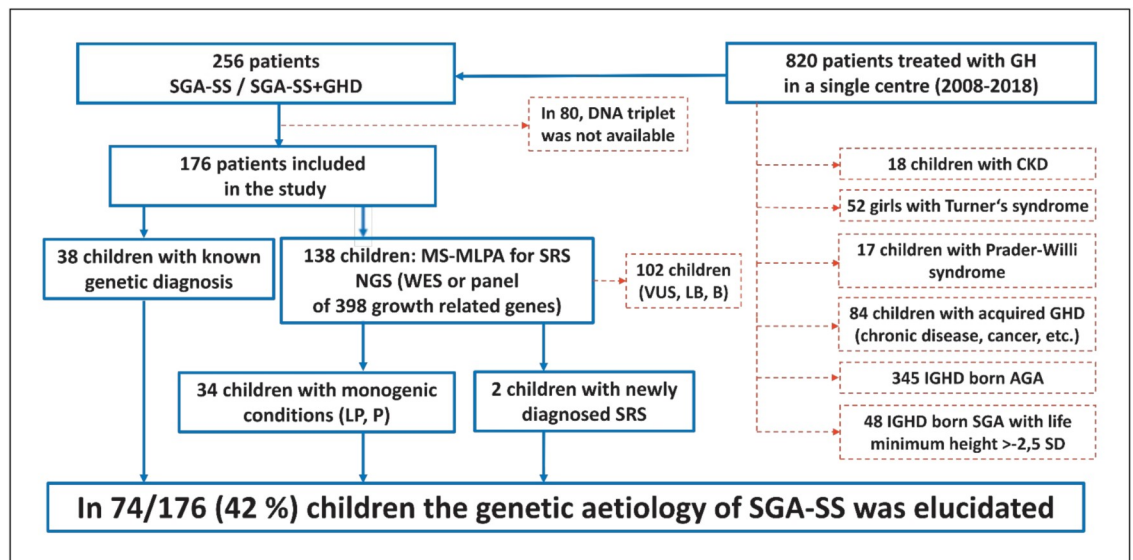


Fig. 1. Flowchart of the study. GH, growth hormone; CKD, chronic kidney disease; GHD, growth hormone deficit; IGHD, idiopathic growth hormone deficit; AGA, appropriate for gestational age; MS-MLPA, methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification; WES, whole-exome sequencing; SRS, Silver-Russell syndrome; VUS, variant of uncertain significance; LB, likely benign; B, benign; LP, likely pathogenic; P, pathogenic.

Methods

Genetic Testing

Genetic Testing Prior to the Study

All children with a clinical suspicion of a specific genetic disorder underwent genetic examination with an appropriate method (karyotype, FISH, MLPA, targeted Sanger sequencing) prior to the study. The remaining children were examined for SRS. After its' exclusion, patients were examined by NGS methods.

Examination of SRS

Methylation-specific multiplex ligation-dependent Probe amplification (MS-MLPA) was done in all patients. MS-MLPA (probe mixes ME030 and ME032 examining regions of 11p15, 7q32, 7p12, and 14q32, respectively) and subsequent data analyses by software Coffalyser were performed according to the manufacturer's instructions (MRC Holland, Amsterdam, The Netherlands).

Targeted NGS

Genomic DNA was extracted from peripheral blood using QIAmp DNA Blood Mini (Qiagen, Hilden, Germany) or from saliva (collected into Oragene OG-500) according to the manufacturer's instructions (DNA Genotek, Ontario, Canada). DNA of patients without a verified genetic cause of their growth failure was analysed using a custom-targeted NGS panel of 398 genes with a known or potential association with growth [17] using SureSelect Custom Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), and the indexed products were sequenced by synthesis on an Illumina MiSeq platform (San Diego, CA, USA) with $\times 100$ average coverage. Altogether 6 DNA samples from probands

underwent the whole-exome sequencing using SureSelect Human All Exon v6+UTR Kit (Agilent Technologies). The indexed products were sequenced by synthesis on an Illumina MiSeq or NextSeq platform (San Diego, CA, USA) with $\times 100$ average coverage. Obtained sequences were annotated and mapped to reference genome followed by variant calling as described previously [17]. Detected variants were filtered using software Variant Annotation and Filter Tool [18] with filter settings described previously [17].

Evaluation of Genetic Findings

Confirmation of all variants of interest in the patient and segregation analyses in available family members were performed by direct Sanger sequencing [19]. Subsequently, variants were scored according to the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) standards and guidelines [20] implemented in the VarSome software [21] as pathogenic (P), likely pathogenic (LP), benign (B), likely benign (LB), or as variants of uncertain significance (VUS). Consideration of co-segregation in the pathogenicity classification of variants (criterion PP1 in the ACMG guidelines) was applied based on recommendations by Jarvik and Browning [22].

Ethics Statement

This study protocol was reviewed and approved by the Institutional Ethics Committees of the 2nd Faculty of Medicine, Charles University in Prague, and University Hospital Motol, Czech Republic (date of approval: June 30, 2017; not numbered). Written informed consent was obtained from the parents/legal guardians of the patients for publication of the details of their medical cases and any accompanying images.

Table 1. Clinical findings in children born small for gestational age with persistent short stature (SGA-SS) with elucidated genetic diagnosis

Patient No.	Gender	GW g	BW g	BW (SDS)	BL cm	BL (SDS)	Father's height (SDS)	Mother's height (SDS)	Age at start of GH therapy, years	Height (SDS) at start of GH therapy	Height (SDS) 1 year of GH therapy	Height (SDS) after 3 years of GH therapy	Final height (SDS)	IGF-1 (SDS) prior to therapy	BA-CA, years	Primary diagnosis leading to GH treatment	Brain MRI	Dysmorphic features
1	F	37	1,860	-2.8	42	-3.8	-1.3	-2.7	6.3	-3.2	-2.0	-1.6	N/A	1.09	-1.2	GHD+SGA	Normal	No
2	M	42	2,890	-2.1	50	-1.4	0.4	-3.9	4.1	-3.1	-2.4	-1.9	N/A	-2.01	-0.4	GHD+SGA	Normal	No
3	M	40	2,840	-1.9	47	-2.4	-1.7	-0.7	7.7	-2.7	-2.3	-1.6	-2.6	0.11	N/A	GHD+SGA	Normal	No
4	F	36	1,690	-3.0	37	-6.4	0.0	-0.5	3.2	-4.2	-3.3	-3.2	N/A	N/A	N/A	SGA	N/A	Yes
5	F	39	2,210	-2.9	44	-3.4	-1.5	0.1	3.5	-2.7	-2.0	-1.4	N/A	1.27	-1.5	SGA	N/A	No
6	M	32	1,260	-1.9	38	-3.9	-1.6	-2.7	7.0	-3	-2.2	-1.7	N/A	0.02	-0.3	SGA	N/A	No
7	F	39	2,480	-2.2	45	-2.8	-0.7	-0.4	7.4	-4.3	-4.0	-3.4	-2.8	-1.73	N/A	SGA	N/A	No
8	M	37	2,060	-2.5	44	-2.8	0.3	0.6	2.3	-3.8	-3.8	-2.7	N/A	-5.37	N/A	GHD+SGA	Bilateral anophthalmia, agenesis of optic nerves, and chiasm	Yes
9	M	33	1,750	-1.1	41	-2.7	-0.6	0.4	1.1	-5.0	-3.1	-1.9	N/A	-4.40	-1.1	GHD+SGA	N/A	No
10	F	40	2,350	-2.9	48	-1.6	0.4	-1.2	13.5	-3.3	-2.3	-1.1	-1.0	-4.78	-1.4	GHD+SGA	Rathke cleft cyst	No
11	M	30	1,120	-1.3	36	-4.0	0.4	0.4	2.8	-2.6	-1.9	-0.7	N/A	-1.84	-1.8	GHD+SGA	Normal	No
12	M	35	2,200	-1.1	44	-2.1	-0.03	-1.2	6.3	-2.5	N/A	N/A	N/A	-2.74	-0.8	SGA	N/A	No
13	M	40	2,750	-2.1	48	-1.9	-0.7	-0.8	7.1	-3.1	-2.6	-2.2	N/A	-1.78	-2.3	GHD+SGA	N/A	No
14	M	40	2,900	-1.8	47	-2.4	-2.9	-2.0	11.6	-3.7	-3.9	-2.9	-2.6	-3.22	-3.3	SGA	N/A	No
15	F	39	2,850	-1.6	46	-2.2	-1.7	-2.9	5.7	-3.0	-2.7	-2.5	N/A	0.74	1.9	SGA	N/A	No
16	M	38	2,670	-0.6	45	-2.7	0.7	-1.6	3.6	-2.5	-1.5	-1.0	-0.5	0.91	N/A	SGA	N/A	No
17	F	40	2,960	-1.3	46	-2.6	0.7	-1.2	4.4	-3.1	-2.4	-1.9	-3.6	1.19	0.1	SGA	N/A	No
18	M	40	2,920	-1.8	45	-3.4	-3.6	-0.8	7.4	-3.3	-2.7	-2.1	-2.0	-3.10	0.5	SGA	Normal	No
19	F	33	1,350	-2.1	38	-4.3	-2.4	-2.3	3.3	-2.7	-2.6	-2.1	-1.5	-1.51	0.2	SGA	N/A	No
20	M	39	2,450	-2.4	46	-2.55	-2.3	-2.7	12.6	-2.7	-2.3	-2.7	-3.1	0.73	-0.3	SGA	N/A	No
21	F	40	2,350	-2.9	46	-2.7	-1.0	-1.5	5.4	-3	-2.8	-1.9	N/A	-1.35	-0.3	GHD+SGA	Normal	Yes
22	M	40	2,520	-2.6	49	-1.4	-2.0	0.0	4.3	-2.5	-2.0	-1.9	-2.3	-0.64	-0.9	GHD+SGA	N/A	No
23	F	39	2,270	-2.7	42	-4.4	-1.5	-3.4	5.7	-2.8	-2.1	-0.8	-2.7	0.49	-0.4	SGA	N/A	No
24	M	39	2,450	-2.5	45	-3.1	-2.9	-1.3	12.0	-3.4	-2.7	-2.1	-2.2	-1.51	-1.6	SGA	N/A	No
25	F	40	2,500	-2.5	43	-4.3	-2.2	-0.4	7.0	-3.1	-2.4	-2.1	N/A	0.93	-2.5	SGA	N/A	No
26	M	39	2,660	-2.0	47	-2.1	-3.2	-1.5	6.0	-3.7	-3.2	-2.8	N/A	-3.16	N/A	SGA	Cyst of cisterna magna	No
27	M	40	2,750	-2.1	48	-1.9	-1.3	-1.5	9.2	-2.7	-2.2	-1.4	N/A	0.34	-1.4	SGA	N/A	No
28	M	40	2,400	-2.9	48	-1.9	-1.5	-1.2	10.2	-2.8	-2.0	-0.6	-1.5	-1.26	N/A	GHD+SGA	N/A	Yes
29	F	40	3,000	-1.3	45	-3.2	0.8	-1.5	6.4	-2.8	-2.2	-1.5	-2.1	-0.15	-0.2	SGA	Normal	No
30	M	40	3,200	-1.0	47	-2.4	-3.2	0.8	1.5	-2.5	-1.8	-1.5	N/A	-0.27	N/A	SGA	N/A	No
31	M	40	2,650	-2.3	47	-2.4	0.4	-2.3	9.1	-2.5	-1.6	-0.8	N/A	0.09	0.1	SGA	N/A	No
32	F	41	3,190	-1.0	47	-2.4	-1.2	-1.2	7.1	-2.5	-1.6	0.1	N/A	-0.90	-2.1	GHD+SGA	Pituitary microadenoma	No
33	F	40	2,600	-2.3	45	-3.2	-1.1	-1.2	6.0	-2.9	-2.3	-1.4	N/A	0.32	N/A	SGA	Normal	No
34	F	41	2,880	-1.8	47	-2.4	0.8	-2.4	4.0	-2.9	-2.9	-1.9	N/A	0.15	N/A	GHD+SGA	Normal	No
35	M	39	2,710	-1.9	46	-2.6	N/A	-1.8	3.3	-2.8	-2.4	-2.2	N/A	-2.01	-0.4	GHD+SGA	Normal	No
36	F	41	2,800	-2.0	48	-1.8	-2.0	-2.3	3.1	-3.6	-3.0	-2.5	N/A	-6.04	N/A	SGA	N/A	No
37	F	40	2,630	-2.2	47	-2.1	-2.0	-1.3	3.4	-3.5	-2.7	-2.5	-2.7	-1.65	-0.3	SGA	N/A	No
38	M	38	2,460	-2	44	-3.2	-1.5	-3.7	4.5	-3.5	-2.9	-2.5	N/A	-2.48	N/A	GHD+SGA	Normal	No
39	M	39	2,490	-2.4	48	-1.6	-2.9	-1.2	1.5	-2.9	-2.9	-2.5	N/A	-2.50	-0.8	SGA	Normal	Yes
40	M	40	2,460	-2.8	49	-1.4	-0.5	0.4	2.2	-2.5	-1.1	-0.9	N/A	-0.45	0.0	GHD+SGA	Small pituitary	Yes
41	M	40	3,270	-0.9	46	-2.9	-0.46	0.43	1.9	-4	-3.0	-4.8	N/A	-1.37	-0.5	GHD+SGA	Small pituitary	Yes
42	F	39	2,444	-2.3	44	-3.4	-1.4	0.2	3.9	-2.9	-2.3	-2.5	N/A	0.88	N/A	SGA	N/A	Yes

Table 1 (continued)

Patient No.	Gender	GW g	BW (SDS)	BL, cm	BL (SDS)	Father's height (SDS)	Mother's height (SDS)	Age at start of GH therapy, years	Height (SDS) at start of GH therapy	Height (SDS) after 1 year of GH therapy	Height (SDS) after 3 years of GH therapy	Final height (SDS)	IGF-1 (SDS) prior to therapy	BA-CA, years	Primary diagnosis leading to GH treatment	Brain MRI	Dysmorphic features
43	F	35	2,050	-1.3	42	-2.9	0.8	2.3	-3.9	-3.3	-2.9	N/A	0.12	N/A	SGA	N/A	Yes
44	F	42	2,800	-2.0	46	-3.1	-1.6	5.2	-3.3	-3.0	-2.5	-3.0	-0.42	-0.8	GHD+SGA	Normal	No
45	M	38	2,390	-2.2	N/A	N/A	-0.7	2.1	-4.3	-3.5	-3.1	N/A	<-2.5	N/A	GHD+SGA	Pachygyria, heterotopia of grey matter, thinning of corpus callosum	Yes
46	F	39	2,500	-2.2	46	-2.3	-2.3	2.9	-3.4	-2.9	-2.0	-1.9	-1.26	N/A	GHD+SGA	Normal	No
47	M	40	3,350	-0.7	47	-2.4	-1.0	4.2	-3.0	-2.2	-1.7	N/A	-2.85	N/A	GHD+SGA	Normal	No
48	F	42	2,820	-2.0	48	-1.9	1.7	3.1	-3.7	-3.0	-3.1	-3.7	0.15	-1.9	SGA	N/A	Yes
49	F	38	2,480	-1.8	45	-2.4	-1.2	1.6	-3.4	-2.8	-2.0	N/A	-0.37	N/A	GHD+SGA	Small pituitary, thin pituitary stalk	Yes
50	M	38	2,900	-1.0	45	-2.7	-1.5	3.0	-3.6	-2.9	-2.4	N/A	-1.60	N/A	SGA	N/A	No
51	F	40	2,790	-1.8	46	-2.7	0.8	9.8	-3.0	-2.3	-1.8	-2.6	N/A	-2.2	SHOX	N/A	Yes
52	M	40	3,200	-1.0	47	-2.4	-3.2	11.5	-2.9	-2.3	-2.1	-3.0	0.48	1.1	SHOX	N/A	Yes
53	F	34	2,130	-0.5	43	-1.9	-1.7	8.4	-2.8	-2.3	-1.7	N/A	0.67	-1.2	SHOX	N/A	Yes
54	F	40	3,400	-0.3	44	-3.8	-2.9	1.7	-2.5	-2.3	-1.8	N/A	0.45	N/A	SHOX	N/A	Yes
55	M	30	1,280	-0.8	38	-2.7	-1.9	4.1	-3.8	-3.1	-2.2	N/A	-2.47	N/A	SHOX	N/A	Yes
56	M	38	2,860	-1.1	43	-3.7	0.8	5.4	-3.6	-3.7	-2.8	-3.8	-1.14	-0.8	SHOX	N/A	Yes
57	F	40	2,500	-2.5	46	-2.7	-2.6	7.5	-3.1	-2.7	-1.7	N/A	N/A	N/A	SHOX	N/A	Yes
58	F	37	2,090	-2.3	45	-2.1	-0.3	2.9	-3.3	-2.8	-1.7	N/A	N/A	N/A	SGA	N/A	Yes
59	F	40	2,190	-3.3	42	-4.9	-0.6	1.2	-3.5	-2.8	-2.8	N/A	0.53	N/A	SGA	N/A	Yes
60	M	34	1,345	-2.7	37	-5.5	0.0	2.2	-2.6	-2.3	-0.9	N/A	-2.72	-1.1	GHD+SGA	N/A	No
61	M	30	840	-2.2	N/A	N/A	-1.5	1.0	-5.3	-4.9	-4.2	N/A	-1.89	N/A	SGA	N/A	Yes
62	F	38	1,750	-3.6	41	-4.5	0.0	0.8	-2.5	-1.6	-0.9	N/A	2.30	N/A	SGA	N/A	Yes
63	M	35	1,700	-2.3	38	-5.4	-1.0	3.3	-3.4	-3.3	-3.2	N/A	-1.17	-1.1	SGA	N/A	No
64	F	38	1,700	-3.8	42	-3.9	-1.6	1.4	-4.2	-3.4	-2.9	N/A	0.71	-0.2	SGA	N/A	Yes
65	F	37	2,100	-2.2	45	-2.1	1.4	1.5	-3.2	-3.0	-2.0	N/A	-2.44	N/A	SGA	N/A	Yes
66	M	35	1,900	-1.8	42	-3.2	N/A	1.0	-4.8	-3.7	-2.9	N/A	-2.50	N/A	SGA	N/A	Yes
67	M	30	775	-2.4	N/A	N/A	1.4	1.5	-4.2	-3.3	-2.6	-1.9	1.09	N/A	SGA	N/A	Yes
68	F	38	1,670	-3.8	39	-5.5	-0.6	2.3	-4.3	-3.5	-2.4	N/A	0.93	N/A	SGA	N/A	Yes
69	M	40	2,150	-3.5	43	-4.5	-0.7	1.1	-3.0	-2.2	-1.7	N/A	0.02	N/A	SGA	N/A	Yes
70	F	33	1,210	-2.6	37	-4.9	-1.5	4.1	-4.8	-2.3	-3.6	-4.7	0.88	N/A	SGA	Normal	Yes
71	M	33	1,645	-1.4	38	-4.4	-1.5	2.8	-3.5	-3.4	-3.0	N/A	0.93	0.2	GHD+SGA	Normal	Yes
72	F	42	2,950	-1.7	46	-3.1	0.5	7.5	-3.3	-1.8	-1.8	-1.6	0.23	-0.3	GHD+SGA	Normal	Yes
73	F	40	3,350	-0.4	47	-2.1	0.0	12.6	-4.1	-4.1	-3.3	-2.8	-1.51	-3.0	SGA	Normal	Yes
74	M	41	2,720	-2.4	48	-2.2	-0.5	1.7	-3.7	-3.2	-3.1	-3.8	-2.45	-1.7	GHD+SGA	Absent posterior pituitary, frontal atrophy	Yes

BA-CA, difference between bone age and chronological age; BL (cm), birth length (cm); BW (g), birth weight (grams); GW, gestational week; GH, growth hormone; GHD, growth hormone deficiency; MRI, magnetic resonance imaging; N/A, not available; SDS, standard deviation score.

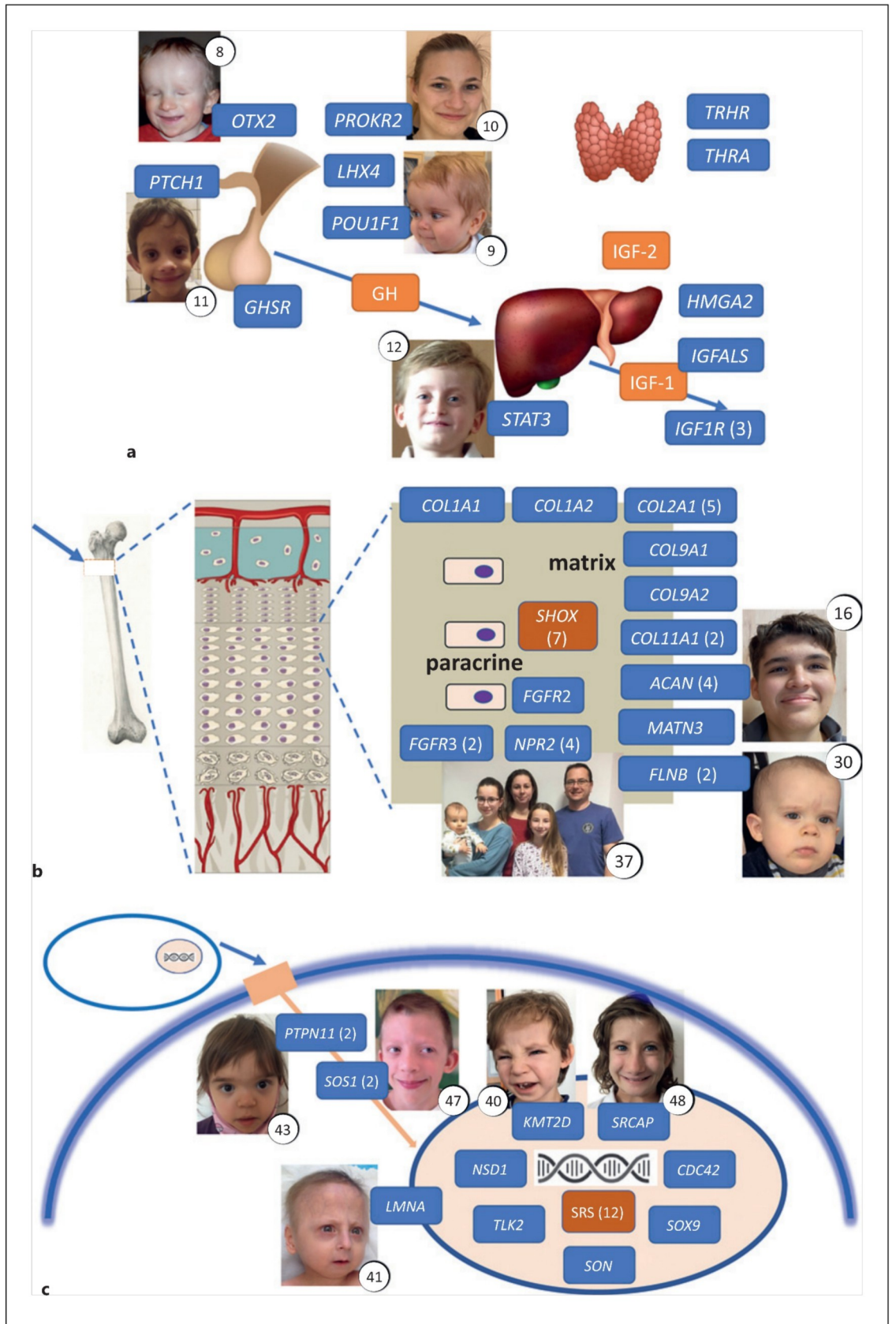
Table 2. Genetic results in children born small for gestational age with persistent short stature (SGA-SS)

Patient No.	Gene	Transcript/ karyotype variant	Reference	Protein variant	Reference	Zygosity	Classification*	Previously published variant	MAF
1 ^a	GHSR	c.526G>A	NM_198407.2	p.Gly176Arg	NP_940799.1	Het	LP	[17]	-
2 ^a	HMG2A2	c.233C>T	NM_003483.6	p.Arg751Trp	NP_003474.1	Het	LP	[17]	-
3	IGF1R	c.2215C>T	NM_000875.5	p.Arg739Trp	NP_000866.1	Het	LP	[41]	-
4	IGF1R	del15q26.3				Het	P	[42]	-
5	IGF1R	c.807C>G	NM_000875.5	p.Tyr269Ter	NP_000866.1	Het	P	Novel	-
6 ^a	IGFALS	c.589C>T	NM_004970.3	p.Arg197Cys	NP_004961.1	Het	LP	[17]	-
7	LHX4	del11q25.1q25.3				Het	P	Novel	-
8 ^a	OTX2	del14q22q23				Het	P	[43]	-
9	POU1F1	c.437T>G	NM_000306.4	p.Leu146Ter	NP_000297.1	Het	P	Novel	-
10	PROKR2	c.254G>A	NM_144773.4	p.Arg85His	NP_658986.1	Het	P	[44]	0.00119
11	PTCH1	c.3912G>T	NM_000264.5	p.Arg1304Ser	NP_000255.2	Het	LP	Novel	0.0000179
12 ^a	STAT3	c.2144C>T	NM_139276.3	p.Pro715Leu	NP_644805.1	Het	P	[45]	0.0000088
13	THRA	c.725T>C	NM_003250.6	p.Leu242Pro	NP_003241.2	Het	P	Novel	-
14 ^a	TRHR	c.392T>C	NM_003301.7	p.Ile131Thr	NP_003292.1	Hom	P	[46]	0.0000176
15 ^a	ACAN	c.916A>T	NM_001135.4	p.Ser306Cys	NP_001126.3	Het	P	[47]	-
16	ACAN	c.7162T>A	NM_001135.4	p.Glu2388Lys	NP_001126.3	Het	LP	Novel	0.0000355
17	ACAN	c.4927delC	NM_001135.4	p.Pro1643fs	NP_001126.3	Het	LP	Novel	-
18 ^a	ACAN	c.1425delA	NM_001135.4	p.Val478fs	NP_001126.3	Het	P	[47]	-
19 ^a	COL11A1	c.475A>G	NM_001854.4	p.Ile159Val	NP_001845.3	Het	LP	[24]	-
20 ^a	COL11A1	c.1543C>G	NM_001854.4	p.Gln515Glu	NP_001845.3	Het	LP	[17]	-
21	COL1A1	c.4369G>A	NM_000088.4	p.Asp1457Asn	NP_000079.2	Het	LP	Novel	0.0000353
22 ^a	COL1A2	c.577G>A	NM_000089.4	p.Gly193Ser	NP_000080.2	Het	P	[17]	0.000008794
23 ^a	COL2A1	c.410G>A	NM_001844.5	p.Arg137His	NP_001835.3	Het	LP	[48]	0.0001009
24 ^a	COL2A1	c.3106C>G	NM_001844.5	p.Arg1036Gly	NP_001835.3	Het	LP	[17]	0.00006200
25 ^a	COL2A1	c.3106C>G	NM_001844.5	p.Arg1036Gly	NP_001835.3	Het	LP	[17]	0.00006200
26 ^a	COL2A1	c.2129C>T	NM_001844.5	p.Pro710Leu	NP_001835.3	Het	LP	[17]	0.000007776
27	COL9A1	c.876+2T>A	NM_001851.6			Het	P	[49]	0.0001403
28	COL9A2	c.1918C>T	NM_001852.4	p.Arg640Ter	NP_001843.1	Het	P	[49]	0.00005501
29	FLNB	c.4388G>A	NM_001457.4	p.Arg1463Gln	NP_001448.2	Het	LP	Novel	0.00002760
30	FLNB	c.1599C>T	NM_001457.4	p.Pro250Leu	NP_001448.2	Het	P	Novel	-
31	MA7N3	c.671G>A	NM_002381.5	p.Arg224Gln	NP_002372.1	Het	LP	Novel	0.0001716
32	FGFR2	c.28C>G	NM_000141.5	p.Leu10Val	NP_000132.3	Het	LP	Novel	0.00002323
33	FGFR3	c.1633C>T	NM_000142.5	p.Arg545Cys	NP_000133.1	Het	LP	Novel	0.000008856
34 ^a	FGFR3	c.251C>T	NM_000142.5	p.Ser84Leu	NP_000133.1	Het	LP	[50]	-
35	NPR2	c.2864G>C	NM_003995.4	p.Arg955Thr	NP_003986.2	Het	LP	Novel	-
36 ^a	NPR2	c.1670G>A	NM_003995.4	p.Arg557His	NP_003986.2	Het	LP	[23]	0.00001759
37 ^a	NPR2	c.1673T>C	NM_003995.4	p.Ile558Thr	NP_003986.2	Het	P	[23]	0.00001759
38 ^a	NPR2	c.1808G>C	NM_003995.4	p.Ser603Thr	NP_003986.2	Het	LP	[23]	-
39	CDC42	c.191A>G	NM_001791.4	p.Thr64Cys	NP_001782.1	Het	P	[51]	-
40	KMT2D	c.1967delT	NM_003482.4	p.Leu656fs	NP_003473.3	Het	P	[52]	-
41 ^a	LMNA	c.433G>A	NM_005572.4	p.Glu145Lys	NP_005563.1	Het	P	[53]	-
42	NSD1	dup5q35.2q35.3				Het	P	[54]	-
43	PTPN11	c.236A>G	NM_002834.5	p.Gln79Arg	NP_002825.3	Het	P	[55]	-
44	PTPN11	c.802G>A	NM_002834.5	p.Gly268Ser	NP_002825.3	Het	P	[56]	0

Table 2 (continued)

Patient No.	Gene	Transcript/ karyotype variant	Reference	Protein variant	Reference	Zygoty	Classification*	Previously published variant	MAF
45	SON	c.2680C>T	NM_138927.4	p.Gln894Ter	NP_620305.3	Het	P	Novel	-
46	SOS1	c.2105A>G	NM_005633.4	p.Tyr702Cys	NP_005624.2	Het	LP	[57]	0.00001555
47	SOS1	c.755T>C	NM_005633.4	p.Ile252Thr	NP_005624.2	Het	LP	[58]	0.00007039
48	SRCAP	c.7330C>T	NM_006662.3	p.Arg2444Ter	NP_006653.2	Het	P	[59]	-
49	TLK2	c.968+1G>A	NM_006852.6			Het	P	[60]	-
50	SOX9	c.673G>A	NM_000346.4	p.Gly225Ser	NP_000337.1	Het	LP	Novel	0.00005492
51	SHOX	delXp22.3				Het	P	[61]	-
52	PPP2R3B	dupXp22.33				Het	P	Novel	-
53	SHOX	delXp22.3				Het	P	[62]	-
54	SHOX	delXp22.3				Het	P	[61]	-
55	SHOX	c.-10delG	NM_000451.4			Het	P	Novel	-
56	PPP2R3B	dupXp22.33				Het	P	Novel	-
57	SHOX	delXp22.3				Het	P	[61]	-
58	-	UPD7				-	P	[62]	-
59	-	Hypometh 11p15				-	P	[63]	-
60	-	UPD7				-	P	[62]	-
61	-	UPD7				-	P	[62]	-
62	-	Hypometh 11p15				-	P	[63]	-
63	-	Hypometh 11p15				-	P	[63]	-
64	-	Hypometh 11p15				-	P	[63]	-
65	-	UPD7				-	P	[62]	-
66	-	UPD7				-	P	[62]	-
67	-	Hypometh 11p15				-	P	[63]	-
68	-	Hypometh 11p15				-	P	[63]	-
69	-	Hypometh 11p15				-	P	[63]	-
70	-	del17q24.2				Het	P	N/A	-
71	-	del1p31.1p31.3				Het	P	[64]	-
72	-	del22q11.2				Het	P	N/A	-
73	-	del6q24.3q25.1				Het	P	[65]	-
74	-	dupXq				-	P	N/A	-

Het, heterozygous; Hom, homozygous; hypometh 11p15, hypomethylation 11p15; LP, likely pathogenic; MAF, minor allele frequency in the European, non-Finnish population in the gnomAD database; N/A, not available; P, pathogenic; UPD7, uniparental disomy of chromosome 7. *Based on American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) standards and guidelines [20] implemented to the VarSome software [20] (on the date December 16, 2021). ^aProbands who carried these variants have been reported previously in our studies.



2

(For legend see next page.)

Results

In total, the genetic diagnosis was elucidated in 74/176 (42%) children (Fig. 1). We confirmed pathogenic or likely pathogenic (P/LP) gene variants affecting pituitary development or GH secretion (*LHX4*, *OTX2*, *PROKR2*, *PTCH1*, *POU1F1*, *GHSR*) and/or the GH-IGF-1 axis and IGF-2 axis (*IGFALS*, *IGF1R*, *STAT3*, *HMGA2*) in 12/74 (16%) patients. Two out of 74 children (3%) had P/LP gene variants affecting the thyroid axis (*TRHR*, *THRA*). P/LP gene variants affecting the growth plate were revealed in 31/74 (42%). Of these, 17/74 children had P/LP variants in genes responsible for components of the cartilaginous matrix (*ACAN* [in four], *COL1A1*, *COL1A2*, *COL2A1*, *COL9A1*, *COL9A2*, *COL11A1*, *FLNB*, *MATN3*), 7/74 had impaired paracrine regulation of chondrocytes (*FGFR3*, *FGFR2*, *NPR2*), and 7/74 had *SHOX* gene defects. In 12/74 children (16%), we revealed P/LP variants in genes involved in fundamental intracellular and intranuclear processes (*CDC42*, *KMT2D*, *LMNA*, *NSD1*, *PTPN11*, *SRCAP*, *SON*, *SOS1*, *SOX9*, *TLK2*). SRS was diagnosed in 12/74 (16%) (11p15, UPD7), and miscellaneous chromosomal aberrations were identified in 5/74 (7%) children.

Overall, in our cohort, 40 out of 74 patients (54%) had positive genetic findings and no dysmorphic features. Part of these results were published in our previous reports on children from families with vertical transmission of short stature (“familiar short stature”) [17] and/or in a paper summarising the effect of GH therapy in children with pathogenic *NPR2* variants [23] and non-syndromic collagenopathies [24]. The principal clinical and growth data are summarised in Table 1. All the genetic findings are presented in Table 2. The single-gene conditions (and SRS) and their significance at three levels of growth regulation are displayed in Figure 2a–c.

Fig. 2. Three levels of the genetic growth regulation in children born small for gestational age with persistent short stature (SGA-SS). The numbers in brackets in blue boxes show the numbers of patients identified with P/LP variants of the entire gene (if more than one). The numbers in closed circles refer to patient numbering in Table 1. **a** Genes involved in cerebral midline and pituitary development, and in the GH-IGF-1 and thyroid axes. **b** Genes encoding growth plate matrix components and elements of chondrocyte paracrine regulation. **c** Genes involved in intracellular signalling, in the stability of nuclear membrane, and in the fundamental intranuclear processes. A brief description of selected patients’ facial phenotypes: (8) *OTX2*: bilateral anophthalmia; (9) *POU1F1*: depressed nasal bridge and frontal bossing; (10) *PROKR2*: no apparent facial dysmorphism; (11) *PTCH1*: mild orbital hypotelorism, midface

Discussion

In our study, we examined a unique large single-centre cohort of SGA-SS children by NGS methods. We elucidated the genetic cause of growth disorder in 42% (74/176) of them. The results demonstrate a multifarious genetic landscape of SGA-SS and further contributed to the understanding of its aetiology.

Advances in genetic diagnostics led to better knowledge regarding the mechanisms causing short stature. Depending on the study cohort, NGS methods elucidated the aetiology of a growth disorder in 14.5–52% of cases [17, 26–30]. Two of these studies focused on SGA-SS children. Freire et al. identified monogenic SGA-SS in 8/55 (15%) children with no apparent syndromic features. The aetiologies of their short stature were mostly primary growth plate disorders accompanied by the disruption of the RAS/MAPK signalling pathway [29]. Li et al. [26] demonstrated that including syndromic SGA-SS children can substantially increase the detection rate of genetic variants elucidating the aetiology of SGA-SS (17% in non-syndromic SGA-SS vs. 31% in syndromic SGA-SS). In our study, we have managed to find the genetic cause of SGA-SS in a higher number of children (42%), even in the case of non-syndromic SGA-SS (54%).

The aetiology of SGA-SS in our study cohort was rather heterogeneous. Not surprisingly, 42% of children with genetic aetiology elucidated carried a causal variant in the gene that is essential for correct growth plate function. This finding is in line with previous studies [26, 29] and corresponds with the new paradigm with the growth plate playing a key role in short stature pathogenesis [31]. As expected, other relatively frequent genetic diagnoses in our SGA-SS study cohort were causal variants in genes affecting fundamental intracellular

hypoplasia, and anteverted ears; (12) *STAT3*: no specific facial signs in a boy with severe immune dysregulation leading to early onset diabetes, hypothyroidism, cytopenia and lymphoproliferation, and short stature due to defective *STAT3* signalling; (16) *ACAN*: mild facial dysmorphism similar to previously published cases; (30) *FLNB*: facial phenotype of atelosteogenesis type I – prominent forehead, depressed nasal bridge with a grooved tip, and micrognathia; (37) *NPR2*: the father and two daughters with vertical transmission of an *NPR2* pathogenic variant, no facial phenotype; (40) *KMT2D*: Kabuki syndrome resembling the makeup in traditional Japanese theatre; (41) *LMNA*: gradually developing phenotype of Hutchinson-Gilford progeria syndrome; (43) *PTPN11* and (47) *SOS1*: facial signs of Noonan syndrome; (48) *SRCAP*: typical face of Floating-Harbour syndrome. Image adapted from [25].

Results

In total, the genetic diagnosis was elucidated in 74/176 (42%) children (Fig. 1). We confirmed pathogenic or likely pathogenic (P/LP) gene variants affecting pituitary development or GH secretion (*LHX4*, *OTX2*, *PROKR2*, *PTCH1*, *POU1F1*, *GHSR*) and/or the GH-IGF-1 axis and IGF-2 axis (*IGFALS*, *IGF1R*, *STAT3*, *HMGA2*) in 12/74 (16%) patients. Two out of 74 children (3%) had P/LP gene variants affecting the thyroid axis (*TRHR*, *THRA*). P/LP gene variants affecting the growth plate were revealed in 31/74 (42%). Of these, 17/74 children had P/LP variants in genes responsible for components of the cartilaginous matrix (*ACAN* [in four], *COL1A1*, *COL1A2*, *COL2A1*, *COL9A1*, *COL9A2*, *COL11A1*, *FLNB*, *MATN3*), 7/74 had impaired paracrine regulation of chondrocytes (*FGFR3*, *FGFR2*, *NPR2*), and 7/74 had *SHOX* gene defects. In 12/74 children (16%), we revealed P/LP variants in genes involved in fundamental intracellular and intranuclear processes (*CDC42*, *KMT2D*, *LMNA*, *NSD1*, *PTPN11*, *SRCAP*, *SON*, *SOS1*, *SOX9*, *TLK2*). SRS was diagnosed in 12/74 (16%) (11p15, UPD7), and miscellaneous chromosomal aberrations were identified in 5/74 (7%) children.

Overall, in our cohort, 40 out of 74 patients (54%) had positive genetic findings and no dysmorphic features. Part of these results were published in our previous reports on children from families with vertical transmission of short stature (“familiar short stature”) [17] and/or in a paper summarising the effect of GH therapy in children with pathogenic *NPR2* variants [23] and non-syndromic collagenopathies [24]. The principal clinical and growth data are summarised in Table 1. All the genetic findings are presented in Table 2. The single-gene conditions (and SRS) and their significance at three levels of growth regulation are displayed in Figure 2a–c.

Fig. 2. Three levels of the genetic growth regulation in children born small for gestational age with persistent short stature (SGA-SS). The numbers in brackets in blue boxes show the numbers of patients identified with P/LP variants of the entire gene (if more than one). The numbers in closed circles refer to patient numbering in Table 1. **a** Genes involved in cerebral midline and pituitary development, and in the GH-IGF-1 and thyroid axes. **b** Genes encoding growth plate matrix components and elements of chondrocyte paracrine regulation. **c** Genes involved in intracellular signalling, in the stability of nuclear membrane, and in the fundamental intranuclear processes. A brief description of selected patients’ facial phenotypes: (8) *OTX2*: bilateral anophthalmia; (9) *POU1F1*: depressed nasal bridge and frontal bossing; (10) *PROKR2*: no apparent facial dysmorphism; (11) *PTCH1*: mild orbital hypotelorism, midface

Discussion

In our study, we examined a unique large single-centre cohort of SGA-SS children by NGS methods. We elucidated the genetic cause of growth disorder in 42% (74/176) of them. The results demonstrate a multifarious genetic landscape of SGA-SS and further contributed to the understanding of its aetiology.

Advances in genetic diagnostics led to better knowledge regarding the mechanisms causing short stature. Depending on the study cohort, NGS methods elucidated the aetiology of a growth disorder in 14.5–52% of cases [17, 26–30]. Two of these studies focused on SGA-SS children. Freire et al. identified monogenic SGA-SS in 8/55 (15%) children with no apparent syndromic features. The aetiologies of their short stature were mostly primary growth plate disorders accompanied by the disruption of the RAS/MAPK signalling pathway [29]. Li et al. [26] demonstrated that including syndromic SGA-SS children can substantially increase the detection rate of genetic variants elucidating the aetiology of SGA-SS (17% in non-syndromic SGA-SS vs. 31% in syndromic SGA-SS). In our study, we have managed to find the genetic cause of SGA-SS in a higher number of children (42%), even in the case of non-syndromic SGA-SS (54%).

The aetiology of SGA-SS in our study cohort was rather heterogeneous. Not surprisingly, 42% of children with genetic aetiology elucidated carried a causal variant in the gene that is essential for correct growth plate function. This finding is in line with previous studies [26, 29] and corresponds with the new paradigm with the growth plate playing a key role in short stature pathogenesis [31]. As expected, other relatively frequent genetic diagnoses in our SGA-SS study cohort were causal variants in genes affecting fundamental intracellular

hypoplasia, and anteverted ears; (12) *STAT3*: no specific facial signs in a boy with severe immune dysregulation leading to early onset diabetes, hypothyroidism, cytopenia and lymphoproliferation, and short stature due to defective *STAT3* signalling; (16) *ACAN*: mild facial dysmorphism similar to previously published cases; (30) *FLNB*: facial phenotype of atelosteogenesis type I – prominent forehead, depressed nasal bridge with a grooved tip, and micrognathia; (37) *NPR2*: the father and two daughters with vertical transmission of an *NPR2* pathogenic variant, no facial phenotype; (40) *KMT2D*: Kabuki syndrome resembling the makeup in traditional Japanese theatre; (41) *LMNA*: gradually developing phenotype of Hutchinson-Gilford progeria syndrome; (43) *PTPN11* and (47) *SOS1*: facial signs of Noonan syndrome; (48) *SRCAP*: typical face of Floating-Harbour syndrome. Image adapted from [25].

processes including RASopathies which corresponds with the results of previous studies as well [26, 29].

Another condition typically associated with SGA-SS is SRS [9]. Not surprisingly, SRS was another frequent diagnosis in our study cohort (16% of cases with genetic aetiology elucidated). Importantly, SRS is diagnosed clinically using the Netchine-Harbison scoring system (NHS). Genetic examination may consequently provide useful confirmation of the clinical diagnosis [9]. In our study, we took a different approach – genetic examination of SRS was performed in all SGA-SS children. Surprisingly, we have genetically diagnosed SRS in 2 children who do not fulfil NHS criteria. Genetic examination of SRS can therefore be considered in all SGA-SS children, regardless of the presence of its typical clinical features.

In our study, we also had several less expected findings. GH is essential for normal growth, and children with GHD may have severe short stature [32]. However, GH is generally considered to affect mainly the postnatal phase of growth, and children with GHD should therefore be born with normal birth parameters [32]. In contrast with this concept, we have found causative genetic variants in genes affecting pituitary development or directly influencing GH production in 6/74 (8%) of SGA-SS children with genetic diagnosis in our study cohort. Some of them might have different causes of prenatal growth failure (e.g., patient no. 1 with LP *GHSR* variant whose mother suffered from HELLP syndrome during pregnancy); however, in other children, we found no additional explanation of prenatal growth impairment. On the other hand, other studies also have discovered genetic findings typical for GHD in SGA children [2]. We can speculate that GH might play a role in prenatal growth in some children or genetic variants found might affect growth on other levels besides affecting GH.

Another interesting result was the pathogenic variant found in the gene *THRA* encoding thyroid hormone receptor type A, which has also been previously associated with short stature [33]. In one patient, we diagnosed a homozygous variant in the gene *TRHR*, leading to central hypothyroidism. Since its first observation in 1997 [34], short stature has been recognised as one of the consistent features of central congenital hypothyroidism due to *TRHR* defects and their bi-allelic pathogenic variants. However, perinatal data were not displayed in patients published so far. Thus, we are adding the *TRHR* gene as a novel causative gene for SGA. These two findings in the thyroid axis increase the diagnostic yield by additional 3% and clearly show that pre- and postnatal growth is affected by the thyroid axis far beyond the classical hypothyroidism. The other variants found in our

study were genes involved in the regulation of growth plates and other fundamental processes of intracellular signalling.

The clinical response to GH treatment has not been systematically studied in the sub-cohorts of SGA-SS with defined genetic aetiology, with the exception of children with SRS [35]. Thus, the currently available reports have their origin in retrospective analysis of children genetically diagnosed at a late stage of their therapy. The currently available data are scarce, as summarised in the latest consensus [36]. In our cohort, the long-term growth data are available only in a minority of children; therefore, we present short-time growth data following 1 year and 3 years of GH administration and, when available, final height SDS. Continuing the observation of the study cohort might bring important new data on the impact on the individual of the new genetic finding.

Some genetic studies in short stature tend to suffer from selection bias as the study population originates mostly from tertiary centres [26, 37, 38]. This questions the extrapolation of the genetic spectrum of growth disorders to the general population. The strength of our study is its population-based principle: all newborns in the Czech Republic have their birth weight and length measured and carefully recorded together with their gestational week. All children subsequently undergo regular, mandatory body height examinations that enable the identification of growth failure, an early referral to a paediatric endocrinologist, and the start of GH treatment if indicated. Our centre provides GH to about 30% of children in our country [39]; their selection depends mainly on their residence. Thus, our study should be relatively free of selection bias with the exception of those who neglected regular body height checkups (which is rare) or refused either GH therapy or genetic testing.

Our study had some limitations as well. Chromosomal analysis including microarrays was performed only in children whose phenotype led to the initial referral to the department of clinical genetics. Moreover, non-coding variants (with the exception of the disruption in exon-intron boundaries), epigenetic, and somatic changes were not captured by NGS. Finally, our study lacks the functional studies to help evaluate the pathogenicity of the discovered variants.

To conclude, our study elucidated the genetic aetiology of 42% of SGA-SS children from a genetically relatively homogenous, non-consanguineous population. The results demonstrate a complex aetiology of short stature affecting all the three key levels of growth regulation including the endocrine system, growth plate function,

and fundamental processes of intracellular regulation and signalling. A conclusive genetic finding not only provides a clear explanation of the growth disorder but also enables focussing on possible associated hidden comorbidities and genetic consulting [40]. In our opinion, routine genetic testing may therefore become a standard of diagnostic care in resource-rich countries for all SGA-SS children after other causes of growth failure are ruled out.

Acknowledgments

We are grateful to the children and their parents for consenting to display the portrait photographs without covering their eyes, in favour to support the general medical knowledge and understanding.

Statement of Ethics

This study protocol was reviewed and approved by the Institutional Ethics Committees of the 2nd Faculty of Medicine, Charles University in Prague, and University Hospital Motol, Czech Republic (date of approval: June 30, 2017; not numbered). Written informed consent was obtained from the parents/legal guardians of the patients for publication of the details of their medical cases and any accompanying images. The research was conducted ethically in accordance with the World Medical Association Declaration of Helsinki. Written informed consent was obtained from the participants' parents/legal guardians to participate in the study.

References

- 1 Lee PA, Chernausek SD, Hokken-Koelega ACS, Czernichow P; International Small for Gestational Age Advisory Board. International Small for Gestational Age Advisory Board consensus development conference statement: management of short children born small for gestational age, April 24–October 1, 2001. *Pediatrics*. 2003 Jun;111(6 Pt 1):1253–61.
- 2 Finken MJ, van der Steen M, Smeets CCJ, Walenkamp MJE, de Bruin C, Hokken-Koelega ACS, et al. Children born small for gestational age: differential diagnosis, molecular genetic evaluation, and implications. *Endocr Rev*. 2018 Dec 1;39(6):851–94.
- 3 Labarta JI, Ruiz JA, Molina I, De Arriba A, Mayayo E, Longás AF. Growth and growth hormone treatment in short stature children born small for gestational age. *Pediatr Endocrinol Rev*. 2009 Feb;6(Suppl 3):350–7.
- 4 Hokken-Koelega AC, De Ridder MA, Lemmen RJ, Den Hartog H, De Muinck Keizer-Schrama SM, Drop SL. Children born small for gestational age: do they catch up? *Pediatr Res*. 1995 Aug;38(2):267–71.
- 5 Clayton PE, Cianfarani S, Czernichow P, Johannsson G, Rapaport R, Rogol A. Management of the child born small for gestational age through to adulthood: a consensus statement of the international societies of pediatric endocrinology and the growth hormone research society. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007 Mar;92(3):804–10.
- 6 Tanaka T. Growth hormone treatment in Japan: past, present, and future. *Pediatr Endocrinol Rev*. 2012 Oct;10(Suppl 1):89–97.
- 7 Karlberg J, Kwan CW, Gelander L, Albertsson-Wikland K. Pubertal growth assessment. *Horm Res*. 2003;60(Suppl 1):27–35.
- 8 Renes JS, van Doorn J, Hokken-Koelega ACS. Current insights into the role of the growth hormone-insulin-like growth factor system in short children born small for gestational age. *Horm Res Paediatr*. 2019;92(1):15–27.
- 9 Wakeling EL, Brioude F, Lokulo-Sodipe O, O'Connell SM, Salem J, Blik J, et al. Diagnosis and management of Silver-Russell syndrome: first international consensus statement. *Nat Rev Endocrinol*. 2017 Feb;13(2):105–24.
- 10 Ioannides Y, Lokulo-Sodipe K, Mackay DJG, Davies JH, Temple IK. Temple syndrome: improving the recognition of an underdiagnosed chromosome 14 imprinting disorder: an analysis of 51 published cases. *J Med Genet*. 2014 Aug;51(8):495–501.
- 11 Arboleda VA, Lee H, Parnaik R, Fleming A, Banerjee A, Ferraz-de-Souza B, et al. Mutations in the PCNA-binding domain of CDKN1C cause IMAGE syndrome. *Nat Genet*. 2012 May 27;44(7):788–92.

Conflict of Interest Statement

The authors have no conflicts of interest to declare.

Funding Sources

This study was supported by the Ministry of Health of the Czech Republic – conceptual development of research organisation (Grant No. NV18-07-00283), Motol University Hospital, Prague, Czech Republic (Grant No. 00064203), and Grant Agency of Charles University (Grant No. 4018120).

Author Contributions

Prof. Dr. Jan Lebl and Dr. Ledjona Toni designed the study. Dr. Ledjona Toni, Dr. Lukas Plachy, and Prof. Dr. Jan Lebl wrote the manuscript. Dr. Petra Dusatkova did the NGS data analysis and coordinated the study. Prof. Dr. Zdenek Sumnik, Dr. Stanislava Kolouskova, Dr. Marta Snajderova, Dr. Barbora Obermannova, Dr. Stepanka Pruhova, and Prof. Dr. Jan Lebl referred patients and provided their clinical information. Dr. Petra Dusatkova, Dr. Lenka Elblova, and Dr. Shenali Anne Amaratunga provided insight on variant analysis. All authors contributed to the discussion and reviewed or edited the manuscript.

Data Availability Statement

The datasets presented in this article are not readily available for ethical and legal reasons relating to the participants' privacy rights. The raw sequencing data are available upon reasonable request to the corresponding author.

- 12 Wit JM, Oostdijk W, Losekoot M, van Duyvenvoorde HA, Ruivenkamp CAL, Kant SG. Mechanisms in endocrinology: novel genetic causes of short stature. *Eur J Endocrinol*. 2016 Apr;174(4):R145–173.
- 13 Marouli E, Graff M, Medina-Gomez C, Lo KS, Wood AR, Kjaer TR, et al. Rare and low-frequency coding variants alter human adult height. *Nature*. 2017 Feb 9;542(7640):186–90.
- 14 Wit JM, Dunkel L, Mullis P. Overview: developments in idiopathic short stature. *Horm Res Paediatr*. 2011 Feb;76(Suppl 3):1–2.
- 15 Kobzová J, Vignerová J, Bláha P, Krejčovský L, Riedlová J. The 6th nationwide anthropological survey of children and adolescents in the Czech Republic in 2001. *Cent Eur J Public Health*. 2004 Sep;12(3):126–30.
- 16 Blum WF, Ross JL, Zimmermann AG, Quigley CA, Child CJ, Kalifa G, et al. GH treatment to final height produces similar height gains in patients with SHOX deficiency and Turner syndrome: results of a multicenter trial. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013 Aug;98(8):E1383–1392.
- 17 Plachy L, Strakova V, Elblova L, Obermannova B, Kolouskova S, Snajderova M, et al. High prevalence of growth plate gene variants in children with familial short stature treated with GH. *J Clin Endocrinol Metab*. 2019 Oct 1;104(10):4273–81.
- 18 Desvignes JP, Bartoli M, Delague V, Krahn M, Miltgen M, Bérout C, et al. VarAFT: a variant annotation and filtration system for human next generation sequencing data. *Nucleic Acids Res*. 2018 Jul 2;46(W1):W545–53.
- 19 Pruhova S, Dusatkova P, Sumnik Z, Kolouskova S, Pedersen O, Hansen T, et al. Glucokinase diabetes in 103 families from a country-based study in the Czech Republic: geographically restricted distribution of two prevalent GCK mutations. *Pediatr Diabetes*. 2010 Dec;11(8):529–35.
- 20 Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of medical genetics and Genomics and the association for molecular pathology. *Genet Med*. 2015 May;17(5):405–24.
- 21 Kopanos C, Tsiolkas V, Kouris A, Chapple CE, Albarca Aguilera M, Meyer R, et al. VarSome: the human genomic variant search engine. *Bioinforma Oxf Engl*. 2019 Jun 1;35(11):1978–80.
- 22 Jarvik GP, Browning BL. Consideration of cosegregation in the pathogenicity classification of genomic variants. *Am J Hum Genet*. 2016 Jun 2;98(6):1077–81.
- 23 Plachy L, Dusatkova P, Maratova K, Petruzelkova L, Zemkova D, Elblova L, et al. NPR2 variants are frequent among children with familial short stature and respond well to growth hormone therapy. *J Clin Endocrinol Metab*. 2020 Mar 1;105(3):dga037.
- 24 Plachy L, Dusatkova P, Maratova K, Petruzelkova L, Elblova L, Kolouskova S, et al. Familial short stature-A novel phenotype of growth plate collagenopathies. *J Clin Endocrinol Metab*. 2021 May 13;106(6):1742–9.
- 25 Amaratunga SA, Tayeb TH, Dusatkova P, Pruhova S, Lebl J. Invaluable role of consanguinity in providing insight into paediatric endocrine conditions: lessons learnt from congenital hyperinsulinism, monogenic diabetes, and short stature. *Horm Res Paediatr*. 2022;95(1):1–11.
- 26 Li X, Yao R, Chang G, Li Q, Song C, Li N, et al. Clinical profiles and genetic spectra of 814 Chinese children with short stature. *J Clin Endocrinol Metab*. 2022 Mar 24;107(4):972–85.
- 27 Guo MH, Shen Y, Walvoord EC, Miller TC, Moon JE, Hirschhorn JN, et al. Whole exome sequencing to identify genetic causes of short stature. *Horm Res Paediatr*. 2014;82(1):44–52.
- 28 Huang Z, Sun Y, Fan Y, Wang L, Liu H, Gong Z, et al. Genetic evaluation of 114 Chinese short stature children in the next generation era: a single center study. *Cell Physiol Biochem*. 2018;49(1):295–305.
- 29 Freire BL, Homma TK, Funari MFA, Lerario AM, Vasques GA, Malaquias AC, et al. Multi-gene sequencing analysis of children born small for gestational age with isolated short stature. *J Clin Endocrinol Metab*. 2019 Jun 1;104(6):2023–30.
- 30 Plachy L, Amaratunga SA, Dusatkova P, Maratova K, Neuman V, Petruzelkova L, et al. Isolated growth hormone deficiency in children with vertically transmitted short stature: what do the genes tell us? *Front Endocrinol*. 2022;13:1102968.
- 31 Baron J, Säwendahl L, De Luca F, Dauber A, Phillip M, Wit JM, et al. Short and tall stature: a new paradigm emerges. *Nat Rev Endocrinol*. 2015 Dec;11(12):735–46.
- 32 Mehta A, Hindmarsh PC, Stanhope RG, Turton JPG, Cole TJ, Preece MA, et al. The role of growth hormone in determining birth size and early postnatal growth, using congenital growth hormone deficiency (GHD) as a model. *Clin Endocrinol*. 2005 Aug;63(2):223–31.
- 33 Onigata K, Szinnai G. Resistance to thyroid hormone. *Endocr Dev*. 2014;26:118–29.
- 34 Collu R, Tang J, Castagné J, Lagacé G, Masson N, Huot C, et al. A novel mechanism for isolated central hypothyroidism: inactivating mutations in the thyrotropin-releasing hormone receptor gene. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997 May;82(5):1561–5.
- 35 Smeets CCJ, Zandwijken GRJ, Renes JS, Hokken-Koelega ACS. Long-term results of GH treatment in silver-russell syndrome (SRS): do they benefit the same as non-SRS short-SGA? *J Clin Endocrinol Metab*. 2016 May;101(5):2105–12.
- 36 Hokken-Koelega ACS, van der Steen M, Boguszewski MCS, Cianfarani S, Dahlgren J, Horikawa R, et al. International consensus guideline on small for gestational age: etiology and management from infancy to early adulthood. *Endocr Rev*. 2023 Jan 13:bnad002.
- 37 Hauer NN, Popp B, Schoeller E, Schuhmann S, Heath KE, Hisado-Oliva A, et al. Clinical relevance of systematic phenotyping and exome sequencing in patients with short stature. *Genet Med*. 2018 Jun;20(6):630–8.
- 38 Homma TK, Freire BL, Honjo Kawahira RS, Dauber A, Funari MFA, Lerario AM, et al. Genetic disorders in prenatal onset syndromic short stature identified by exome sequencing. *J Pediatr*. 2019 Dec;215:192–8.
- 39 Kodytková A, Al Lababidi E, Čermáková I, Černá J, Čížek J, Dvořáková M, et al. Data analysis of REPAR: country-wide register of growth hormone treatment recipients (in Czech). *Ces-Slov Pediat*. 2020;75(4):205–12.
- 40 Dauber A, Rosenfeld RG, Hirschhorn JN. Genetic evaluation of short stature. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014 Sep;99(9):3080–92.
- 41 Kawashima Y, Kanzaki S, Yang F, Kinoshita T, Hanaki K, Nagaishi JJ, et al. Mutation at cleavage site of insulin-like growth factor receptor in a short-stature child born with intrauterine growth retardation. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005 Aug;90(8):4679–87.
- 42 van Duyvenvoorde HA, Lui JC, Kant SG, Oostdijk W, Gijsbers ACJ, Hoffer MJV, et al. Copy number variants in patients with short stature. *Eur J Hum Genet*. 2014 May;22(5):602–9.
- 43 Brisset S, Slamova Z, Dusatkova P, Briand-Suleau A, Milcent K, Metay C, et al. Anophthalmia, hearing loss, abnormal pituitary development and response to growth hormone therapy in three children with microdeletions of 14q22q23. *Mol Cytogenet*. 2014 Feb 28;7(1):17.
- 44 Dodé C, Teixeira L, Leveilliers J, Fouveaut C, Bouchard P, Kottler ML, et al. Kallmann syndrome: mutations in the genes encoding prokineticin-2 and prokineticin receptor-2. *PLoS Genet*. 2006 Oct 20;2(10):e175.
- 45 Sediva H, Dusatkova P, Kanderova V, Obermannova B, Kayserova J, Sramkova L, et al. Short stature in a boy with multiple early-onset autoimmune conditions due to a STAT3 activating mutation: could intracellular growth hormone signalling be compromised? *Horm Res Paediatr*. 2017;88(2):160–6.
- 46 García M, González de Buitrago J, Jiménez-Rosés M, Pardo L, Hinkle PM, Moreno JC. Central hypothyroidism due to a TRHR mutation causing impaired ligand affinity and transactivation of gg. *J Clin Endocrinol Metab*. 2017 Jul 1;102(7):2433–42.
- 47 Gkourogianni A, Andrew M, Tyzinski L, Crocker M, Douglas J, Dunbar N, et al. Clinical characterization of patients with autosomal dominant short stature due to aggrecan mutations. *J Clin Endocrinol Metab*. 2017 Feb 1;102(2):460–9.

- 48 Barat-Houari M, Sarrabay G, Gatinois V, Fabre A, Dumont B, Genevieve D, et al. Mutation update for COL2A1 gene variants associated with type II collagenopathies. *Hum Mutat*. 2016 Jan;37(1):7–15.
- 49 Posey JE, Harel T, Liu P, Rosenfeld JA, James RA, Coban Akdemir ZH, et al. Resolution of disease phenotypes resulting from multilocus genomic variation. *N Engl J Med*. 2017 Jan 5; 376(1):21–31.
- 50 Heuertz S, Le Merrer M, Zabel B, Wright M, Legeai-Mallet L, Cormier-Daire V, et al. Novel FGFR3 mutations creating cysteine residues in the extracellular domain of the receptor cause achondroplasia or severe forms of hypochondroplasia. *Eur J Hum Genet*. 2006 Dec;14(12):1240–7.
- 51 Takenouchi T, Kosaki R, Niizuma T, Hata K, Kosaki K. Macrothrombocytopenia and developmental delay with a de novo CDC42 mutation: yet another locus for thrombocytopenia and developmental delay. *Am J Med Genet A*. 2015 Nov;167A(11):2822–5.
- 52 Normand EA, Braxton A, Nassef S, Ward PA, Vetrini F, He W, et al. Clinical exome sequencing for fetuses with ultrasound abnormalities and a suspected Mendelian disorder. *Genome Med*. 2018 Sep 28;10(1):74.
- 53 Toni L, Dušátková P, Novotná D, Zemková D, Průhová Š, Lebl J. Short stature in a boy with atypical progeria syndrome due to LMNA c.433G>A [p.(Glu145Lys)]: apparent growth hormone deficiency but poor response to growth hormone therapy. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2019 Jul 26; 32(7):775–9.
- 54 Rosenfeld JA, Kim KH, Angle B, Troxell R, Gorski JL, Westemeyer M, et al. Further evidence of contrasting phenotypes caused by reciprocal deletions and duplications: duplication of NSD1 causes growth retardation and microcephaly. *Mol Syndromol*. 2013 Jan; 3(6):247–54.
- 55 Tartaglia M, Mehler EL, Goldberg R, Zampino G, Brunner HG, Kremer H, et al. Mutations in PTPN11, encoding the protein tyrosine phosphatase SHP-2, cause Noonan syndrome. *Nat Genet*. 2001 Dec;29(4):465–8.
- 56 Tartaglia M, Martinelli S, Stella L, Bocchinfuso G, Flex E, Cordeddu V, et al. Diversity and functional consequences of germline and somatic PTPN11 mutations in human disease. *Am J Hum Genet*. 2006 Feb;78(2): 279–90.
- 57 Ganapathy A, Mishra A, Soni MR, Kumar P, Sadagopan M, Kanthi AV, et al. Multi-gene testing in neurological disorders showed an improved diagnostic yield: data from over 1,000 Indian patients. *J Neurol*. 2019 Aug; 266(8):1919–26.
- 58 Lepri F, De Luca A, Stella L, Rossi C, Baldassarre G, Pantaleoni F, et al. SOS1 mutations in Noonan syndrome: molecular spectrum, structural insights on pathogenic effects, and genotype-phenotype correlations. *Hum Mutat*. 2011 Jul;32(7):760–72.
- 59 Nikkel SM, Dauber A, de Munnik S, Connolly M, Hood RL, Caluseriu O, et al. The phenotype of Floating-Harbor syndrome: clinical characterization of 52 individuals with mutations in exon 34 of SRCAP. *Orphanet J Rare Dis*. 2013 Apr 27;8:63.
- 60 Reijnders MRF, Miller KA, Alvi M, Goos JAC, Lees MM, de Burca A, et al. De novo and inherited loss-of-function variants in TLK2: clinical and genotype-phenotype evaluation of a distinct neurodevelopmental disorder. *Am J Hum Genet*. 2018 Jun 7;102(6): 1195–203.
- 61 Chen J, Wildhardt G, Zhong Z, Röth R, Weiss B, Steinberger D, et al. Enhancer deletions of the SHOX gene as a frequent cause of short stature: the essential role of a 250 kb downstream regulatory domain. *J Med Genet*. 2009 Dec;46(12):834–9.
- 62 Kotzot D, Schmitt S, Bernasconi F, Robinson WP, Lurie IW, Ilyina H, et al. Uniparental disomy 7 in Silver-Russell syndrome and primordial growth retardation. *Hum Mol Genet*. 1995 Apr;4(4):583–7.
- 63 Gicquel C, Rossignol S, Cabrol S, Houang M, Steunou V, Barbu V, et al. Epimutation of the telomeric imprinting center region on chromosome 11p15 in Silver-Russell syndrome. *Nat Genet*. 2005 Sep;37(9):1003–7.
- 64 Tassano E, Gamucci A, Celle ME, Ronchetto P, Cuoco C, Gimelli G. Clinical and Molecular Cytogenetic Characterization of a de novo Interstitial 1p31.1p31.3 Deletion in a Boy with Moderate Intellectual Disability and Severe Language Impairment. *Cytogenet Genome Res*. 2015;146(1):39–43.
- 65 Nowaczyk MJM, Carter MT, Xu J, Huggins M, Raca G, Das S, et al. Paternal deletion 6q24.3: a new congenital anomaly syndrome associated with intrauterine growth failure, early developmental delay and characteristic facial appearance. *Am J Med Genet A*. 2008 Feb 1;146A(3):354–60.

5.3. Význam acido-labilní podjednotky (ALS) v etiologii a v diagnostice malého věku

Toni L, Pádrová K, Plachý L, Petra Dušátková, Lenka Elblová, Stanislava Koloušková, Marta Pechová, Marta Šnajderová, Zdeněk Šumník, Štěpánka Průhová, Jan Lebl Význam acido-labilní podjednotky (ALS) v etiologii a v diagnostice malého věku. *Čes-Slov Pediat* 2020; 75 (4): 214-218

Následující publikovaná práce představuje výsledky dílčího projektu zaměřeného na acido-labilní podjednotku (ALS). ALS je glykoproteinová složka ternárního komplexu IGF-1/IGFBP-3/ALS, která ovlivňuje bioaktivitu IGF-1 a prodlužuje jeho biologický poločas. Cílem studie bylo prozkoumat vliv růstového hormonu (GH) a léčby GH na hladiny ALS a dalších komponent ternárního komplexu a zjistit, zda lze identifikovat pacienty s patogenními variantami genu *IGFALS* na základě nízkých hladin ALS. Metody zahrnovaly analýzu hladin a korelaci všech tří složek ternárního komplexu během léčby GH u 511 dětí s nedostatkem růstového hormonu (GHD) a/nebo s poruchou růstu klasifikovanou jako SGA-SS. U tří dětí s nízkými hladinami ALS jsme provedli sekvenaci genu *IGFALS*.

Studie rovněž zkoumala účinky podávání GH na složky ternárního komplexu u 23 dětí s neurčitou etiologií GHD nebo SGA-SS. Výsledky ukázaly, že koncentrace ALS silně koreluje s IGF-1 ($r=0,70$; $p<0,0001$) a IGFBP-3 ($r=0,61$; $p<0,0001$). Sekvence genu *IGFALS* u dětí s nízkými hladinami ALS neodhalila žádné patogenní ani jiné varianty. U 23 dětí s GHD nebo SGA-SS vedla léčba GH ke zvýšení hladin všech složek ternárního komplexu. Vliv GH na IGF-1 (213 % výchozí hodnoty) byl významnější než na IGFBP-3 (132 %; $p<0,0001$) a ALS (139 %; $p<0,0001$).

Výsledky ukázaly, že měření hladin ALS není účinnou metodou pro detekci mutací v genu *IGFALS*. Ačkoli GH zvyšuje hladiny ALS, biochemické stanovení ALS má minimální přidanou hodnotu pro diagnostiku a sledování léčby u dětí s malým věkem.

SYMPOZIUM: PORUCHY RŮSTU

Význam acidolabilní podjednotky (ALS) v etiologii a v diagnostice malého vzrůstu

Toni L.*¹, Pádřová K.*², Plachý L.¹, Dušátková P.¹, Elblová L.¹, Koloušková S.¹, Pechová M.², Šnajderová M.¹, Šumník Z.¹, Průhová Š.¹, Lebl J.¹

¹Pediatrická klinika a ²Ústav lékařské chemie a klinické biochemie 2. lékařské fakulty UK a Fakultní nemocnice Motol, Praha

*obě autorky přispěly k této práci stejným dílem

Čes-slov Pediat 2020; 75 (4): 214–218

SOUHRN

Cíl studie: Acidolabilní podjednotka (ALS) jako glykoproteinová součást ternárního komplexu IGF-1/IGFBP-3/ALS reguluje bioaktivitu a prodlužuje poločas IGF-1, čímž přispívá k řízení tělesného růstu. Proteinovou složku ALS kóduje gen *IGFALS*. Zkoumali jsme vliv růstového hormonu (GH) na hladiny ALS a dalších složek ternárního komplexu a možnost identifikovat podle nízkých hladin ALS pacienty s patogenními variantami genu *IGFALS*.

Metody: U 511 dětí s deficitem GH (GHD) a/nebo u dětí s poruchou růstu navazující na malou velikost při narození (SGA-SS) jsme při léčbě GH analyzovali hladiny a vzájemnou korelaci všech tří složek ternárního komplexu. U tří dětí s nízkou hladinou ALS jsme následně sekvenovali gen *IGFALS*. Vliv podání GH na složky ternárního komplexu jsme studovali u 23 dětí s GHD nebo SGA-SS neurčené etiologie.

Výsledky: U 511 dětí s GHD a/nebo SGA-SS na dlouhodobé léčbě GH byla hladina ALS 8750 µg/l (medián; Q1-Q3: 6353–10 963), hladina IGF-1 233 µg/l (Q1-Q3: 147–329), což odpovídalo +1,21 SD (Q1-Q3: -0,11 až +2,45), a hladina IGFBP-3 5660 µg/l (Q1-Q3: 4668–6800), což odpovídalo +3,65 SD (Q1-Q3: +1,81 až +5,97 SD). Hladiny ALS těsně korelovaly s IGF-1 ($r = 0,70$; $p < 0,0001$) i s IGFBP-3 ($r = 0,61$; $p < 0,0001$). Sangerova sekvenace *IGFALS* u dětí s nízkou hladinou ALS (369, 487 a 1490 µg/l) neprokázala patogenní ani jinou variantu genu. U 23 dětí s GHD nebo SGA-SS stoupla po 3–4 měsících podávání GH hladina ALS z 4859 (medián; Q1-Q3: 4176–6240) na 6681 (5413–8332) µg/l ($p = 0,0004$), hladina IGF-1 z 68 (46–114) na 146 (84–178) µg/l ($p < 0,0001$) a hladina IGFBP-3 z 3390 (2820–4030) na 4700 (3940–5300) µg/l ($p < 0,0001$). Vliv GH na IGF-1 (213 % výchozí hodnoty) je výraznější než na IGFBP-3 (132 %; $p < 0,0001$) a ALS (139 %; $p < 0,0001$).

Závěry: Měření hladin ALS není efektivní pro detekci mutací *IGFALS*. GH zvyšuje hladiny ALS, ale biochemické stanovení ALS má jen nevýznamnou přidanou hodnotu pro diagnostiku a sledování dětí s malým vzrůstem.

KLÍČOVÁ SLOVA

acidolabilní podjednotka, IGF-1, IGFBP-3, ternární komplex, růstový hormon, *IGFALS*

SUMMARY

The role of acid-labile subunit (ALS) in aetiology and diagnostic procedures of short stature

Aims: Acid-labile subunit (ALS) as a glycoprotein component of the ternary complex IGF-1/IGFBP-3/ALS co-regulates bioactivity and prolongs half-life of IGF-1 and thus substantially contributes to regulation of stature and growth. Protein component of ALS is encoded by *IGFALS* gene. We studied the impact of growth hormone (GH) on circulating levels of ALS and additional ternary complex components, and the option to identify carriers of pathogenic variants of *IGFALS* gene according to low ALS levels.

Methods: We studied interrelations between ternary complex components in 511 children on GH therapy. Children with low ALS levels underwent *IGFALS* sequencing. We monitored the effect of GH therapy on the ternary complex in 23 children treated for GH deficiency (GHD) or for short stature after having been born small for gestational age (SGA-SS).

Results: In 511 children with GHD and/or SGA-SS on long-term GH therapy ALS level was 8750 µg/l (median; Q1-Q3: 6353–10963), IGF-1 was 233 µg/l (Q1-Q3: 147–329), corresponding to +1.21 SD (Q1-Q3: from -0.11 to +2.45), and IGFBP-3 was 5660 µg/l (Q1-Q3: 4668–6800), corresponding to +3.65 SD (Q1-Q3: from +1.81 to +5.97 SD). ALS is strongly interrelated with IGF-1 ($r=0.70$; $p<0.0001$) and with IGFBP-3 ($r=0.61$; $p<0.0001$). *IGFALS* Sanger sequencing in three children with low ALS levels (369, 487 and 1490 µg/l) displayed normal results. In 23 children following 3–4 months of GH therapy, ALS increased from 4859 (median; Q1-Q3: 4176–6240) to 6681 (5413–8332) µg/l ($p=0.0004$), IGF-1 from 68 (46–114) to 146 (84–178) µg/l ($p<0.0001$) and IGFBP-3 from 3390 (2820–4030) to 4700 (3940–5300) µg/l ($p<0.0001$). The impact of GH is more pronounced in IGF-1 (213% increase) compared to IGFBP-3 (132%; $p<0.0001$) and ALS (139%; $p<0.0001$).

Conclusions: Our results suggest that estimation of ALS levels is ineffective to detect *IGFALS* gene mutations. Biochemical measurements of ALS do not substantially contribute to diagnostic work-up and to follow-up in short stature children, according to our experience.

KEY WORDS

acid-labile subunit, IGF-1, IGFBP-3, ternary complex, growth hormone, *IGFALS*

ÚVOD

Inzulinu-podobné růstové faktory IGF-1 a IGF-2 (insulin-like growth factor-1 a -2) hrají klíčovou roli v růstu a vývoji. Oba IGF se syntetizují v játrech v endokrinně aktivních hepatocytech, odkud přecházejí do cirkulující krve a působí na cílové buňky ve vzdálených tkáních. Vedle toho se část IGF-1 a IGF-2 produkuje lokálně v řadě typů buněk a působí autokrinně a parakrinně. Oba IGF ovlivňují lineární růst, proliferaci a diferenciaci buněk a apoptózu [1].

V cirkulující krvi jsou téměř všechny molekuly IGF-1 a IGF-2 vázány v ternárním komplexu o velikosti 150 kDa, který se skládá z molekuly IGF, z molekuly vazebného proteinu pro IGF (IGF-binding protein; IGFBP), nejčastěji zastoupeného IGFBP-3 a v menším rozsahu IGFBP-5, a z acidolabilní podjednotky (acid-labile subunit; ALS)

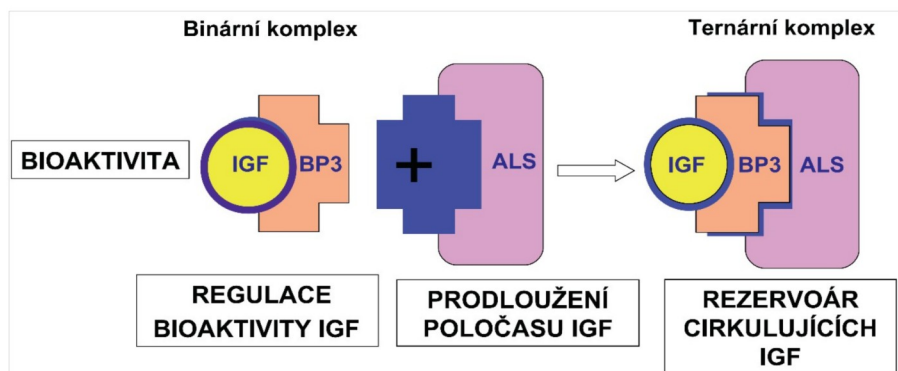
– glykoproteinu o velikosti 85 kDa [2]. Vedle IGFBP-3 a IGFBP-5 jsou v omezeném množství přítomny další vazebné proteiny – IGFBP-1, 2, 4 a 6, které mají menší molekulovou hmotnost 50 kDa. Zatímco binární komplex tvořený IGF a některým z IGFBP může pronikat přes endoteliální bariéru, navázání ALS a vytvoření ternárního komplexu prodlužuje dobu, kdy je IGF přítomen v cirkulující krvi a zároveň chráněn před destrukcí [3] (obr. 1). Poločas volně cirkulujícího IGF-1 je pouhých 10 minut; binární komplex IGF-1 – IGFBP-3 přetrvává v krvi 30–90 minut a ternární komplex s ALS prodlužuje poločas na více než 12 hodin [3].

ALS je kódována genem *IGFALS* [4]. Patogenní varianty *IGFALS* snižují nebo zvyšují stabilitu ternárního komplexu a způsobují růstovou poruchu, která je závažná zvláště v případě homozygotních mutací, delecí nebo duplikací. U heterozygotních patogenních variant je porucha růstu mírnější [5–8].

I když brzy po objevu ALS v 90. letech 20. století proběhlo několik *in vitro* studií u různých živočišných druhů a později i některé klinické studie [9], zatím není jasný diagnostický význam stanovení hladiny ALS u dětí s růstovou poruchou ani u dětí s poruchou růstu na podkladě patogenních variant *IGFALS* genu [10].

Cílem naší studie bylo:

(1) Stanovit hladiny složek ternárního komplexu IGF-1/IGFBP-3/ALS v periferní krvi v rozsáhlé skupině 511 dětí dlouho-



Obr. 1. IGF-1 a IGF-2 cirkulují v krvi v podobě ternárního komplexu s vazebným proteinem (převážně vazebným proteinem 3. typu; IGFBP-3) a s acidolabilní podjednotkou (ALS). Tato vazba prodlužuje poločas jejich působení a zajišťuje jejich rezervoár v krvi.

době léčených růstovým hormonem (GH) a klasifikovaných jako deficit GH (GHD) nebo jako porucha růstu navazující na malou velikost při narození (small for gestational age – short stature; SGA-SS). Cílem tohoto vyšetření bylo nalézt dosud neznámé nositele homozygotních nebo heterozygotních patogenních variant genu IGFALS a ověřit hypotézu, že nízká hladina ALS při léčbě růstovým hormonem může predikovat nerozpoznanou patogenní variantu genu IGFALS.

(2) Formou semilongitudinální studie s párovým měřením posoudit vliv zahájení léčby GH na hladiny složek ternárního komplexu IGF-1/IGFBP-3/ALS v periferní krvi u nově diagnostikovaných dětí s GHD a u dětí SGA-SS.

SOUBOR PACIENTŮ A METODIKA

Všichni pacienti zařazení do studie jsou dlouhodobě sledováni na Pediatrické klinice 2. lékařské fakulty UK a Fakultní nemocnice v Motole a jsou léčeni růstovým hormonem z indikace GHD nebo SGA-SS.

Studie 1 – Stanovení složek ternárního komplexu u velké kohorty dětí s GHD a SGA-SS léčených GH

V této studii jsme vyšetřili jednotlivé složky ternárního komplexu během dlouhodobé léčby GH u 511 dětí (321 chlapců, 190 dívek) ve věku 2–18 let (medián 10 let). V případech nízké hladiny ALS bylo pacientům nabídnuto molekulárně genetické vyšetření genu IGFALS. Po podpisu informovaného souhlasu byla odebrána krev na izolaci DNA. Studie byla schválena Etickou komisí Fakultní nemocnice v Motole.

Studie 2 – Semilongitudinální studie vlivu GH na vývoj hladin složek ternárního komplexu

U 23 dětí (18 chlapců, 5 dívek) ve věku 3–15 let (medián 7 let) s GHD (n = 19) nebo SGA-SS (n = 4) jsme vyšetřili hladiny IGF-1, IGFBP-3 a ALS před zahájením léčby a po 3–4 měsících podávání GH, který byl aplikován v přesně definované dávce 0,033 mg/kg/den v každodenní s.c. injekci.

Stanovení acidolabilní podjednotky (ALS)

Stanovení ALS v séru bylo provedeno ELISA sendvičovou metodou za použití komerčního kitu (Human ALS, Mediagnost, Německo). Principem metody je vazba molekul ALS obsaže-

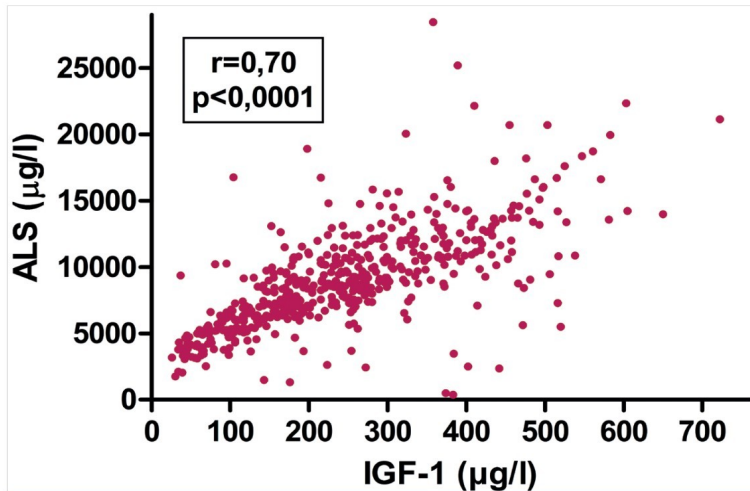
ných ve vzorku na protilátky, které jsou imobilizovány na povrchu jamek mikrotitrační destičky. Následně se k imobilizovaným molekulám ALS přidá biotinizovaná protilátka anti-ALS, která s nimi interaguje a vzniklý komplex následně váže konjugát streptavidin/peroxidáza, který v závěrečném kroku katalyzuje přeměnu přidaného substrátu. Enzymatická reakce dává vznik barevnému produktu, který je kvantitativně závislý na množství ALS ve vzorku a jehož množství se detekuje spektrofotometricky (450 nm). Linearita systému měření byla deklarována v rozsahu 0,5330 µg/mL ALS. Pro více koncentrované vzorky bylo měření opakováno po větším naředění. Analýza všech vzorků, kontrolních a kalibračních roztoků byla provedena duplicitně. Koncentrace ALS ve vzorku byla vypočítána z rovnice získané nelineární regresí kalibrační křivky.

Stanovení IGF-1 a IGFBP-3

Stanovení IGF-1 a IGFBP-3 v séru bylo provedeno pomocí automatického imunoanalýzátoru Immulite 1000 (Siemens Healthcare Diagnostics). Princip metody je založen na enzymatické chemiluminiscenční imunochemické reakci v pevné fázi.

Sekvenace genu IGFALS

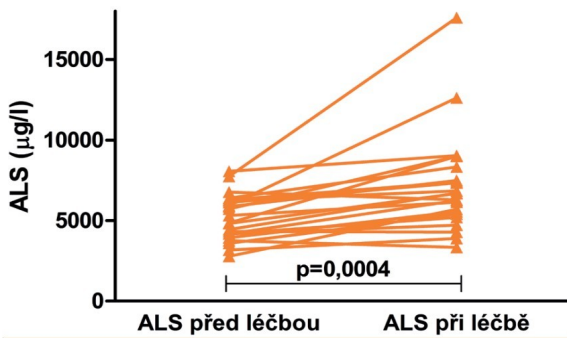
DNA byla izolována pomocí QIAmp DNA Blood Mini kit, Sangerovo sekvenování genu IGFALS jsme prováděli s využitím metodiky publikované v naší předchozí studii [11].



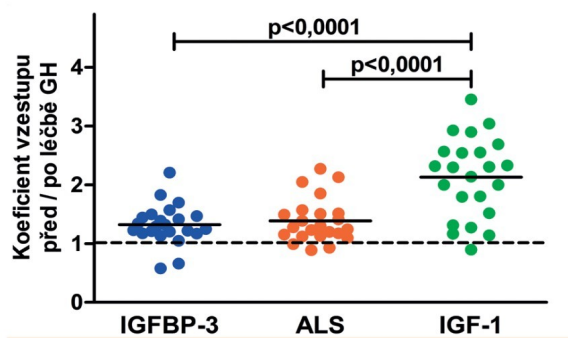
Obr. 2. Korelace mezi hladinami IGF-1 a ALS u dětí s GHD a/nebo SGA-SS, které jsou léčené růstovým hormonem. Měření hladin ALS nepřináší novou významnou informaci o průběhu léčeni.

Tab. 1. Laboratorní výsledky při léčbě růstovým hormonem u tří dětí s nízkými hladinami ALS, u kterých byla následně provedena sekvenace genu IGFALS.

Pohlaví	Věk (roky)	ALS (µg/l)	IGF-1 (µg/l)	IGF-1 SD	IGFBP-3 (µg/l)	IGFBP-3 (SD)	Sekvenace IGFALS
dívka	15	487	374	1,78	6730	5,11	normální nález
dívka	12	369	383	1,26	6250	4,12	normální nález
chlapec	9	1490	143	0,45	5190	2,68	normální nález



Obr. 3. Hladiny ALS před zahájením léčby růstovým hormonem a za 3–4 měsíce trvání léčby u 23 dětí s GHD a/nebo SGA-SS.



Obr. 4. Koefficient vzestupu hladin IGF-1, ALS a IGFBP-3 po 3–4 měsících trvání léčby růstovým hormonem u 23 dětí s GHD a/nebo SGA-SS.

Statistika

Ke statistickému hodnocení výsledků byl použit párový a nepárový t-test a test lineární regrese se stanovením korelačního koeficientu „r“. Za statisticky významné byly považovány výsledky s hodnotou $p < 0,05$.

VÝSLEDKY

Studie 1 – Stanovení složek ternárního komplexu u velké kohorty dětí s GHD a SGA-SS na léčbě růstovým hormonem

U 511 dětí s GHD a/nebo SGA-SS na dlouhodobé léčbě GH jsme našli střední hladinu ALS 8750 $\mu\text{g/l}$ (medián; Q1-Q3: 6353–10 963), střední hladinu IGF-1 233 $\mu\text{g/l}$ (Q1-Q3: 147–329), což odpovídalo standardizované hodnotě +1,21 SD (Q1-Q3: -0,11 až +2,45), a střední hladinu IGFBP-3 5660 $\mu\text{g/l}$ (Q1-Q3: 4668–6800), což odpovídalo standardizované hodnotě +3,65 SD (Q1-Q3: +1,81 až +5,97 SD).

Hladiny ALS těsně korelovaly s hladinami IGF-1 ($r = 0,70$; $p < 0,0001$ – obr. 2) i s hladinami IGFBP-3 ($r = 0,61$; $p < 0,0001$).

V tabulce 1 jsou uvedeny nálezy u 3 pacientů s mimořádně nízkými hodnotami ALS a současně s nenápadnými hodnotami IGF-1 a IGFBP-3 na léčbě GH. U těchto pacientů jsme provedli sekvenaci genu IGFALS. Sangerovým sekvenováním jsme nenalezli patogenní ani jinou variantu genu IGFALS.

Studie 2 – Semilongitudinální studie vlivu GH na hladiny složek ternárního komplexu

U 23 dětí stoupla během 3–4 měsíců léčby GH hladina ALS z 4859 (medián; Q1-Q3: 4176–6240) na 6681 (5413–8332) $\mu\text{g/l}$ ($p = 0,0004$; obr. 3), hladina IGF-1 z 68 (46–114) na 146 (84–178) $\mu\text{g/l}$ ($p < 0,0001$) a hladina IGFBP-3 z 3390 (2820–4030) na 4700 (3940–5300) $\mu\text{g/l}$ ($p < 0,0001$). GH tedy ovlivňuje všechny složky ternárního komplexu, ale jeho vliv na IGF-1 (vzestup na 213 % výchozí hodnoty) je výraznější než vliv na IGFBP-3 (132 %; $p < 0,0001$) a ALS (139 %; $p < 0,0001$, obr. 4).

DISKUSE

Přestože zájem o ALS trvá již přes tři desetiletí, jsou údaje o jejím fyziologickém významu a o její patofyziologii

fragmentární. Pro pochopení role ALS v organismu v roce 2001 Ueki se spolupracovníky [12] modelovali inaktivací IGFALS genu u myši. Zjistili, že tato myš má jen mírnou růstovou retardaci, přestože cirkulující složky IGF systému jsou závažně alterované. O několik let později byl genový defekt IGFALS a jeho fenotyp poprvé popsán u člověka [6]. Byl identifikován u 17letého mladého muže s opožděným nástupem a pomalým průběhem puberty, ale jen s hraniční růstovou poruchou. Tento původní fenotyp byl na základě pozorování u dalších desítek nositelů mutace zpřesněn: Narušení pubertálního vývoje může být jedním z příznaků, ale porucha růstu je konzistentní, i když v jednotlivých případech různě závažná [8].

Identifikace chlapce s patogenní variantou IGFALS v naší předchozí studii [13] vzbudila náš zájem o ALS. Proto jsme se v několika dílčích studiích pokusili doplnit chybějící poznatky, které mohou mít význam pro klinickou praxi v dětské endokrinologii.

S cílem identifikovat patogenní varianty genu IGFALS jsme vyšetřili koncentraci ALS v cirkulující krvi u kohorty pacientů při léčbě GH. U tří z nich s nízkými hladinami ALS jsme sekvenovali gen IGFALS. U žádného z nich jsme neprokázali patogenní ani jinou variantu genu. K podobnému závěru dospěli i Renes se spolupracovníky [9], kteří sekvenovali gen IGFALS u 34 dětí s nízkou koncentrací ALS v séru a též nenašel patogenní variantu. Naše studie byla limitována chybním pacientů s potvrzenou patogenní variantou IGFALS, u kterých bychom stanovili nativní hladiny ALS.

Je zajímavé, že většina dosud identifikovaných pacientů s patogenními variantami IGFALS nebyla zjištěna na základě měření ALS, ale na základě velmi nízkých hladin IGF-1 a IGFBP-3 v době diagnostiky – protože chybní aktivní ALS výrazně zkracuje jejich poločas. Teprve dodatečně byly u některých těchto pacientů změřeny nízké až neměřitelné hladiny ALS a následně sekvenování IGFALS prokázalo patogenní variantu [14–16]. V jiných případech byly varianty IGFALS nalezeny metodami celoexomového sekvenování dětí s malým vzrůstem, podobně jako v naší předchozí studii [13].

Vliv GH na všechny složky ternárního komplexu jsme jednoznačně prokázali v semilongitudinální studii u 23 dětí s GHD nebo SGA-SS. Působení na sekreci IGF-1 je výraznější (vzestup na 213 % výchozí hodnoty) než vliv na IGFBP-3 (132 %), což je v souladu s předchozími studiemi

[17, 18]. Signifikantní byl i vzestup koncentrace ALS po zahájení terapie růstovým hormonem ALS (139 %), který dosud publikován nebyl a který prokazuje, že exprese genu *IGFALS* je řízena růstovým hormonem – ALS patří mezi tzv. „GH-dependenční peptidy“.

Měření hladin IGF-1, IGFBP-3 a ALS v početné skupině 511 dětí s GHD a/nebo SGA-SS dlouhodobě léčených GH ukázalo, že stanovení ALS nepřináší o diagnóze ani o průběhu léčby další významnou novou informaci v porovnání s měřením IGF-1, případně IGFBP-3, vzhledem k těsné korelaci mezi naměřenými hodnotami těchto peptidů.

Uvedené závěry naznačují, že laboratorní stanovení ALS má v současné době jen nevýznamnou přidanou hodnotu pro diagnostiku a další sledování dětí s malým vzrůstem.

Poděkování

Studie byla provedena s podporou grantu Agentury pro zdravotnický výzkum (AZV) č. 18-07-00283.

LITERATURA

1. **Werner H, Stannard B, Bach MA.** Regulation of insulin-like growth factor I receptor gene expression in normal and pathological states. *Adv Exp Med Biol* 1991; 293: 263–272.
2. **Allard JB, Duan C.** IGF-binding proteins: Why do they exist and why are there so many? *Front Endocrinol* 2018; 9: 117.
3. **Boisclair Y, Rhoads RP, Ueki I, et al.** The acid-labile subunit (ALS) of the 150 kDa IGF-binding protein complex: an important but forgotten component of the circulating IGF system. *J Endocrinol* 2001; 170 (1): 63–70.
4. **Domené HM, Bengolea SV, Martínez AS, et al.** Deficiency of the circulating insulin-like growth factor system associated with inactivation of the acid-labile subunit gene. *N Engl J Med* 2004; 350 (6): 570–577.
5. **Renes JS, van Doorn J, Hokken-Koelega A, et al.** Current insights into the role of the growth hormone–insulin-like growth factor system in short children born small for gestational age. *Horm Res Paediatr* 2019; 92: 15–27.
6. **Fofanova-Gambetti OV, Hwa V, Wit JM, et al.** Impact of heterozygosity for acid-labile subunit (*IGFALS*) gene mutations on stature: results from the international acid-labile subunit consortium. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95 (9): 4184–4191.
7. **Högler W, Martin DD, Crabtree N, et al.** *IGFALS* gene dosage effects on serum IGF-I and glucose metabolism, body composition, bone growth in length and width, and the pharmacokinetics of recombinant human IGF-I administration. *J Clin Endocrinol Metab* 2014; 99 (4): 703–712.
8. **Domené HM, Scaglia PA, Martínez AS, et al.** Heterozygous *IGFALS* gene variants in idiopathic short stature and normal children: impact on height and the IGF system. *Horm Res Paediatr* 2013; 80 (6): 413–423.
9. **Renes JS, van Doorn J, Breukhoven PE, et al.** Acid-labile subunit levels and the association with response to growth hormone treatment in short children born small for gestational age. *Horm Res Paediatr* 2014; 8 (2): 126–132.
10. **Ertl D, Gleiss A, Sagmeister S, et al.** Determining the normal range for IGF-I, IGFBP-3, and ALS: new reference data based on current internal standards. *Wien Med Wochenschr* 2014; 164: 343–352.
11. **Pruhova S, Dusatkova P, Sumnik Z, et al.** Glucokinase diabetes in 103 families from a country based study in the Czech Republic: geographically restricted distribution of two prevalent GCK mutations. *Pediatr Diabetes* 2010; 11 (8): 529–535.
12. **Ueki I, Ooi GT, Tremblay ML, et al.** Inactivation of the acid labile subunit gene in mice results in mild retardation of postnatal growth despite profound disruptions in the circulating insulin-like growth factor system. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97 (12): 6868–6873.
13. **Plachy L, Strakova V, Elblova L, et al.** High prevalence of growth plate gene variants in children with familial short stature treated with GH. *J Clin Endocrinol Metab* 2019; 104 (10): 4273–4281.
14. **Heath KE, Argente J, Barrios V, et al.** Primary acid-labile subunit deficiency due to recessive *IGFALS* mutations results in postnatal growth deficit associated with low circulating insulin growth factor (IGF)-I, IGF binding protein-3 levels, and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93 (5): 1616–1624. Erratum in: *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93 (6): 2426.
15. **Dominguez-Menéndez G, Poggi Mayorga H, Arancibia M, et al.** ALS deficiency caused by an exon 2 deletion and a novel missense variant in the gene encoding ALS. *Growth Horm IGF Res* 2019; 48–49: 5–8.
16. **Hwa V, Haeusler G, Pratt KL, et al.** Total absence of functional acid labile subunit, resulting in severe insulin-like growth factor deficiency and moderate growth failure. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91 (5): 1826–1831.
17. **Shanxiang R., Yuxiang N, Aihong W.** Effects of recombinant human growth hormone in the treatment of dwarfism and relationship between IGF-1, IGFBP-3 and thyroid hormone. *Exp Ther Med* 2016; 12: 3579–3582.
18. **Ballerini MG, Braslavsky D, Scaglia PA, et al.** Circulating IGF-I, IGFBP-3 and the IGF-I/IGFBP-3 molar ratio concentration and height outcome in prepubertal short children on rhGH treatment over two years of therapy. *Horm Res Paediatr* 2013; 80: 413–423.

MUDr. Ledjona Toni

Pediatrická klinika 2. lékařské fakulty UK
a FN Motol
V Úvalu 84
150 06 Praha 5
e-mail: ledjonatoni@gmail.com

5.4. Heterozygous NPR2 mutation is a frequent cause of familial short stature with good effect of growth hormone treatment

Plachy L, Dusatkova P, Maratova K, Petruzalkova L, Zemkova D, Elblova L, Kucerova P, Toni L, Kolouskova S, Snajderova M, Sumnik Z, Lebl J, Pruhova S. NPR2 Variants Are Frequent among Children with Familial Short Stature and Respond Well to Growth Hormone Therapy. J Clin Endocrinol Metab. 2020 Mar 1;105(3)

Receptor C-typu natriuretického peptidu, kódovaný genem *NPR2*, je významným parakrinním regulátorem růstové ploténky. Patogenní varianty *NPR2* vedou ke spektru fenotypů – od závažné akromesomelické dysplázie v případě bialelických variant až po mírnější monoalelické, autosomálně dominantní formy růstové poruchy. Předešla hodnocení účinků léčby růstovým hormonem (GH) u nositelů patogenních variant *NPR2* přinesla nekonzistentní závěry.

Cílem této studie bylo identifikovat varianty genu *NPR2* u dětí s familiárním malým vzrůstem (FSS), které již byly léčeny GH, a popsat fenotyp postižených dětí včetně jejich reakce na léčbu. Z celkového počtu 747 pacientů léčených GH v našem centru splnilo 87 kritéria pro zařazení do studie (před léčbou výška ≤ -2 SD u pacienta a menšího z obou rodičů, neznámá genetická etiologie). Tyto pacienty jsme vyšetřili metodami sekvenování nové generace a výsledky jsme vyhodnotili pomocí standardů a pokynů ACMG. Zhodnotili jsme také účinek léčby GH – zlepšení růstové rychlosti a vývoj SD výšky během pěti let léčby.

U 5 dětí (5,7 %) jsme prokázali (pravděpodobně) patogenní variantu v genu *NPR2*. Tato studie ukázala, že varianty genu *NPR2* přispívají významnou měrou k výskytu FSS. Většina dětí má zdánlivě symetrickou nízkou postavu. Pětileté podávání GH výšku těchto dětí významně zlepšilo.

***NPR2* Variants Are Frequent among Children with Familial Short Stature and Respond Well to Growth Hormone Therapy**

Lukas Plachy¹, Petra Dusatkova¹, Klara Maratova¹, Lenka Petruzelkova¹, Dana Zemkova¹, Lenka Elblova¹, Petra Kucerova¹, Ledjona Toni¹, Stanislava Kolouskova¹, Marta Snajderova¹, Zdenek Sumnik¹, Jan Lebl¹, and Stepanka Pruhova¹

¹Department of Pediatrics, 2nd Faculty of Medicine, Charles University in Prague and University Hospital Motol, Prague, 150 06, Czech Republic

ORCID number: 0000-0003-2076-115X (S. Pruhova).

Context: The C-type natriuretic peptide receptor encoded by the *NPR2* gene is a paracrine regulator of the growth plate; heterozygous *NPR2* variants cause short stature with possible presence of different signs of bone dysplasia. To date, the effect of growth hormone (GH) treatment has been described in a few individuals with *NPR2* gene variants with inconsistent results.

Objectives: To identify *NPR2* gene variants among children with familial short stature (FSS) and to describe their phenotype, including GH treatment response.

Design, Settings and Patients: Out of 747 patients with short stature treated with GH in a single center, 87 with FSS met the inclusion criteria (pretreatment height ≤ -2 standard deviation in both the patient and the shorter parent, unknown genetic etiology). Next-generation sequencing methods were performed to search for *NPR2* gene variants. The results were evaluated using the American College of Medical Genetics and Genomics guidelines. The GH treatment response (growth velocity improvement and height standard deviation score development over the first 5 years of treatment) was evaluated.

Results: In 5/87 children (5.7%), a (likely) pathogenic variant in the *NPR2* gene was identified (p.Ile558Thr [in 2], p.Arg205*, p.Arg557His, p.Ser603Thr). Two children had disproportionate short-limbed short stature, 1 a dysplastic 5th finger phalanx. The growth velocity in the first year of GH treatment accelerated by 3.6 to 4.2 cm/year; the height improved by 1.2 to 1.8 SD over 5 years of treatment.

Conclusions: *NPR2* gene variants cause FSS in a significant proportion of children. Their GH treatment response is promising. Studies including final height data are necessary to assess the long-term efficacy of this therapy. (*J Clin Endocrinol Metab* 105: e746–e752, 2020)

Key Words: *NPR2*, familial short stature, next-generation sequencing, growth hormone treatment, growth plate disorders

ISSN Print 0021-972X ISSN Online 1945-7197

Printed in USA

© Endocrine Society 2020. All rights reserved. For permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com

Received 24 September 2019. Accepted 27 January 2020.

First Published Online 28 January 2020.

Corrected and Typeset 21 February 2020.

Abbreviations: AGA, appropriate for gestational age; B, benign; FSS, familial short stature; GH, growth hormone; GHD, growth hormone deficiency; ISS, idiopathic short stature; LB, likely benign; LP, likely pathogenic; NGS, next-generation sequencing; P, pathogenic; SD, standard deviation; SDS, standard deviation score; SGA, small for gestational age; SHOX, Short Stature Homeobox; VUS, variants of uncertain significance; WES, whole-exome sequencing.

Natriuretic peptide receptor type B is encoded by the *NPR2* gene and plays an important role in the complex paracrine regulation of the growth plate. After binding the ligand (C-type natriuretic peptide) to the receptor, cell proliferation, cell differentiation, and extracellular matrix synthesis are stimulated (1,2). Alteration of the *NPR2* signaling cascade leads to growth disorders; downregulation leads to short stature (1), and upregulation leads to excessive growth (3).

Biallelic pathogenic variants in the *NPR2* gene lead to severe skeletal dysplasia (acromesomelic dysplasia, Maroteaux type) characterized by disproportionate acromesomelic short stature (height < -5 standard deviation [SD]), bone deformities, and other stigmata (1,4). Heterozygous pathogenic variants are responsible for milder growth disorders; the height SDS ranges from -1.5 to -4.3. Although these children may have some signs of bone dysplasia (eg, disproportionate mesomelic short stature, high-arched palate, bone bowing, or brachydactyly), they are mostly clinically classified as idiopathic short stature (ISS) (5–8). The effect of growth hormone (GH) treatment has only been described in 10 individual patients, and the reported therapy response varied greatly (4–7,9,10).

The prevalence of pathogenic variants in the *NPR2* gene among children with short stature has been only roughly estimated. In previous studies, *NPR2* gene variants were found in 3% of children with clinical suspicion of Léri–Weil syndrome with excluded Short Stature Homeobox (*SHOX*) deficiency (4) and in 2% to 6% of children clinically classified as ISS (5–8). It was presumed that heterozygous *NPR2* gene variants could cause ISS at an even greater frequency in case the affected child has a short parent - familial short stature (FSS) (7). However, no study focusing on *NPR2* gene variants in FSS has been performed thus far.

The aim of our study was to evaluate the frequency of pathogenic *NPR2* variants among children with FSS treated with GH in our center using next-generation sequencing (NGS) methods, to describe the detailed phenotype of affected children, and to assess their response to GH within the first 5 years of treatment.

Materials and Methods

Patients

Inclusion criteria. The database of children treated with GH in our center currently includes 747 individuals. After exclusion of patients with known genetic causes of their short stature (genetic diagnoses established in routine practice prior to the study after clinical suspicion of a specific genetic disorder; no pathogenic variant in the *NPR2* gene was elucidated prior the

study) and those with secondary causes of their short stature (eg, chronic renal insufficiency, secondary GH deficiency due to intracranial tumor and/or irradiation), 522 children remained for further evaluation. Within this group, 117 children had FSS defined as life-minimum height ≤ -2 SD in both the patient and his/her shorter parent. In 87 children with FSS, their legal guardians agreed with genetic testing and were enrolled in the study. All study participants or their legal guardians signed written informed consent prior to genetic testing. The study was approved by the institutional Ethics Committees of the 2nd Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Czech Republic.

Clinical evaluation prior to the study. All children's heights were obtained during an anthropometric measurement that also focused on body proportionality (sitting height to total height ratio). Information about their birth parameters was obtained from medical records. All the parents' heights were measured to the nearest 1 mm, and the heights of more distant relatives were obtained from the parents. All the data were standardized according to recent normative values (11–13). The growth hormone deficiency (GHD) and small for gestational age (SGA) were evaluated according to current guidelines (14,15) as previously described (16).

The median age of children with FSS at inclusion in the study was 12 years (range 5–19 years), their life minimum height was -3.0 SD (-2.1 to -6.3 SD) and their shorter parent's height was -2.6 SD (-2.0 to -4.2 SD). The children had been treated with GH for 5 years (1–14 years) with an initial dose of 33 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ (21–45 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$). Within this group, 59/87 (68%) children were classified as GHD. Their maximum GH level after stimulation was 6.4 $\mu\text{g}/\text{L}$ (median; range 1.7–9.7 $\mu\text{g}/\text{L}$). Fifty-one children (59%) within the study cohort were born SGA. Their birth weights ranged from -0.6 to -3.0 SD (median -2.1 SD) and their birth lengths ranged from -1.2 to -4.7 SD (median -2.6 SD). Twenty-three children (26%) had both GHD and SGA.

Genetic examination

Genomic DNA was extracted from peripheral blood using the QIAmp DNA blood mini kit (Qiagen, Hilden, Germany). DNA of 28 patients with severe FSS (life minimum height < -2.5 SD both in the patient and his/her shorter parent) was analyzed using whole-exome sequencing (WES) as described previously (16). DNA of the remaining 59 patients was analyzed using a custom-targeted NGS panel of 398 genes known or potentially associated with growth (all supplementary material and figures are located in a digital research materials repository (17)). This analysis was performed using a SureSelect custom kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), and the indexed products were sequenced by synthesis on an Illumina MiSeq platform (San Diego, CA, USA) with 100 \times average coverage. Sequencing data analysis was performed as previously described for the WES (16), and detected variants were filtered using Ingenuity Variant Analysis (Qiagen, Hilden, Germany) or the in-house software Variant Annotation and Filter Tool (VarAFT) (18) with similar filter settings (16).

Evaluation of the genetic results

All variants in the *NPR2* gene obtained from the NGS examination were confirmed using Sanger sequencing as

described previously (19) and subsequently evaluated using the American College of Medical Genetics and Genomics standards and guidelines (20). For the evaluation of segregation of genetic variants with short stature within the families, DNA and height information about further relatives was obtained via probands' parents. Finally, all variants were classified as pathogenic (P), likely pathogenic (LP), benign (B), likely benign (LB) or as variants of uncertain significance (VUS).

Evaluation of the efficiency of growth hormone treatment

In all children with causative genetic variants in the *NPR2* gene, the treatment response was retrospectively evaluated. Firstly, the growth velocity in the first year of treatment was compared with the corresponding values from the year before the therapy. Secondly, the change of height SDS was evaluated within the first 5 years of treatment.

Results

Out of 87 patients with FSS, the *NPR2* gene variants were found in 5 children (5.7%) from 4 families. Genetic variant p. Ile558Thr found in 2 sisters was classified as pathogenic, variants p.Arg205*, p.Ser603Thr, and p.Arg557His in the remaining 3 children were likely pathogenic. No (likely) benign variants or variants with uncertain significance in the *NPR2* gene were discovered in our study. All the results are summarized in Table 1. For detailed information about variant evaluation in specific patients, see (17).

In the 5 children (3 girls) with causative *NPR2* gene variants, the median age at the last follow-up was 11 years (range 9–15 years), their height before the therapy was -3.7 SD (-2.9 to -4.0 SD) and their shorter parent's height was -2.4 SD (-2.1 to -3.7 SD). All shorter parents carried the same *NPR2* variant as the probands. The median birth weight and length of the affected children was -1.8 SD (-0.9 to -2.0 SD) and -2.0 SD (-1.2 to -3.1 SD), respectively; 3 of them were born SGA. Before treatment, the median IGF1 level was -1.5 SD (-1.4 to -1.7 SD), and the maximal stimulated GH was 5.8 $\mu\text{g/L}$ (4.5 – 13.1 $\mu\text{g/L}$). Three affected children were classified as GHD; all of them had a normal magnetic resonance imaging of the pituitary and normal production of other pituitary hormones. Two children had disproportionate short stature with shorter limbs. Of them, 1 had a dysplastic middle phalanx of the fifth finger. The remaining 3 affected children had apparently proportionate short stature with no apparent signs of bone dysplasia.

In all children, GH therapy was initiated before the onset of puberty, at the age ranging from 3 to 10 years. However, puberty in Patient 3 started after 1 year of GH treatment initiation and could have influenced the

height SDS development. The duration of GH therapy ranged from 2 to 9 years; 4 out of 5 affected children completed 5 years of GH therapy. In all affected children, GH treatment was started with a dose of 33 $\mu\text{g/kg/day}$, and individual doses fluctuated during therapy from 31 to 38 $\mu\text{g/kg/day}$. The growth velocity in the first year of GH treatment accelerated by 3.6 to 4.2 cm/year (Table 1). Height improved by 0.33 to 0.79 SD, 0.43 to 1.34 SD, and 1.2 to 1.8 SD over 1, 2 and 5 years of treatment, respectively (Fig. 1). For individual evaluations, see (17).

Discussion

This is the first study focusing on the *NPR2* gene as a cause of FSS in children treated with GH. We have described that variants in the *NPR2* gene are responsible for a substantial number of FSS cases. Most of the affected children from our study cohort had apparently symmetric short stature with no apparent signs of bone dysplasia and responded well to GH therapy.

In our study cohort, 5.7% (5/87) of children with FSS have (likely) pathogenic variants in the *NPR2* gene. Previous studies have assessed the frequency of *NPR2* gene alterations in children with short stature. Amano et al. found a causative variant in the *NPR2* gene in 2/101 (2.0%) Japanese children (6), Wang et al. in 4/192 (2.1%) American children (7), and Vasques et al. in 3/47 (6.4%) Brazilian children (5) with idiopathic short stature. Moreover, Hisado-Oliva et al. described that the *NPR2* gene variants were responsible for 5/173 (2.9%) patients with clinical suspicion of Léri–Weil syndrome with excluded *SHOX* deficiency (4), and Freire et al. discovered pathogenic *NPR2* gene variants in 2/55 (3.6%) Brazilian children born SGA (8). The results of our study correspond to these findings. Our results do not confirm the assumption made by Wang et al. that variants in the *NPR2* gene will explain FSS with a substantially greater frequency (7).

With advances in genetic investigation, knowledge about genetic disorder-specific reactions to GH treatment is slowly expanding. Studies published so far have evaluated the response to GH therapy in 10 individual children with heterozygous *NPR2* gene variants in the form of case reports. Vasques et al. described a poor treatment response in 3 affected boys; however, all of them started the therapy quite late, around the age of 13 years when their puberty had already started (5). Other authors presented individual cases with good GH treatment response with height improved by 0.7 to 2.5 SD after 2 to 6 years of treatment (4–7,9,10); for further details, see Table 1.

Table 1. Phenotype description and growth hormone treatment response in children with NPR2 gene variants from our study cohort and those described in the literature

Patient no.	Sex	Age at last follow-up (years)	Birth weight (SDS)	Birth length (SDS)	IGF1 before GH treatment (SDS)	Peak GH after stimulation (µg/L)	Shorter parent's height (SDS)	Sitting height to height ratio (SDS)	Age at GH therapy onset (years)	GH treatment duration (years)	Initial GH dose (µg/kg/day)	Height before treatment (SD)	Height on GH treatment (x years of treatment) (cm/year)	Growth velocity before GH treatment (cm/year)	Growth velocity in the first year of treatment (cm/year)	Additional phenotypic features	Transcript variant	Protein variant	Variant evaluation	Reference
1	M	9	-0.9	-1.7	-1.4	4.7 ^b	-2.4	0.3	7	2	33	-2.9	-1.5 (2)	5.5	9.1	—	c.613C>T	p.Arg205*	LP	—
2 ^a	F	12	-2.0	-2.1	-1.5	13.1	-2.1	1.9	3	9	33	-3.7	-2.1 (5)	5.1	9.3	Brachycephalic skull	c.1673T>C	p.Ile558Thr	P	—
3 ^a	F	15	-1.4	-1.2	-1.6	5.8 ^b	-2.1	2.2	10	5	33	-3.0	-1.8 (5)	3.7	7.4	Dysplastic middle phalanx of the 5th finger	c.1673T>C	p.Ile558Thr	P	—
4	M	9	-2.0	-3.1	-1.5	4.5	-3.7	1.2	4	5	33	-4.0	-2.2 (5)	4.2	8.4	—	c.1808G>C	p.Ser603Thr	LP	—
5	F	11	-1.8	-2.0	-1.7	12.7	-2.4	1.0	3	7	33	-3.8	-2.2 (5)	5.3	9.0	—	c.1670G>A	p.Arg557His	LP	—
6	M	A	-1.7	-1.0	NA	NA	-1.3	NA	5	2	50	-2.1	-1.3 (2)	NA	NA	NA	c.328C>T	p.Arg110Cys	P	(6)
7	F	A	-0.2	-1.0	NA	NA	-2.5	NA	—	0	—	-2.1	—	—	NA	NA	c.1249C>G	p.Gln417Glu	P	(6)
8	M	7	NA	NA	NA	NA	-2.9	0.6	—	—	—	-2.5	—	—	—	High-arched palate, cubitus valgus, cone-shaped epiphysis, muscular hypertrophy	c.766G>T	p.Asp256Tyr	P	(4)
9	M	14	NA	NA	NA	NA	-2.7	0.5	—	—	—	-2.9	—	—	—	Radius bowing, mesomelic limbs shortening, short fourth metacarpal	c.1641_1643 del	p.Val548del	P	(4)
10	M	10	NA	NA	NA	NA	-3.0	0.5	—	—	—	-2.3	—	—	—	Muscular hypertrophy	c.2455C>T	p.Arg819Cys	P	(4)
11	F	12	NA	NA	NA	NA	-1.4	0.5	8	5	40	-2.5	-0.9 (5)	NA	NA	High-arched palate, short fifth phalanx, cone-shaped epiphysis, dental malpositioning, muscular hypertrophy	c.2972A>G	p.Glu991Gly	P	(4)
12	F	9	NA	NA	NA	NA	NA	NA	—	—	—	-1.5	—	—	—	Disproportionate short stature, mesomelic limb shortening, lower-leg bowing, limited extensions of the elbows, brachydactyly especially of the fifth digit, flattened forehead, hypertelorism, strabismus, high-arched palate, dental malpositioning	c.3058C>T	p.Arg1020Trp	P	(4)
13	M	15	NA	NA	NA	19.4	-4.5	2.3	13	2	50	-2.1	-2.1 (2)	NA	NA	Disproportionate short stature	c.226T>C	p.Ser76Pro	P	(5)
14	M	A	NA	NA	0.3	5.9	-2.8	0.0	14	3	33	-2.8	-2.5 (FH)	NA	NA	Sublingual thyroid	c.788G>C	p.Arg263Pro	P	(5)
15	M	17	NA	NA	0.2	NA	-1.7	1.3	13	4	50	-2.8	-2.4 (4)	NA	NA	Shortened metacarpal	c.2455C>T	p.Arg819Cys	P	(5)
16	M	13	NA	NA	N	NA	-0.6	NA	7	6	NA	-3.1	-2.2 (6)	NA	NA	Short-limbed stature	c.1352-1 G>A	Splice site	P	(7)

Table 1. Continued

Patient no.	Sex	Age at last follow-up (years)	Birth weight (SDS)	Birth length (SDS)	IGF1 before GH treatment initiation (SDS)	Peak GH after stimulation (μg/L)	Shorter parent's height (SDS)	Sitting height to height ratio (SDS)	Age at GH therapy onset (years)	GH treatment duration (years)	Initial GH dose (μg/kg/day)	Height before treatment (SD)	Height on GH treatment (x-years of treatment)	Growth velocity before GH treatment (cm/year)	Growth velocity in the first year of treatment (cm/year)	Additional phenotypic features	Transcript variant	Protein variant	Variant evaluation	Reference
17	M	NA	NA	NA	N	NA	-3.0	NA	-	-	-	-4.2	-	-	Short-limbed short stature, clinodactyly, brachyolmia with known <i>TRPV4</i> variant	c.142G>T	p.Ala48Ser	P	(7)	
18	F	A	SGA	NA	N	NA	-2.7	NA	6	12	NA	-3.8	-3.1 (FH)	NA	NA	-	c.1167G>T	p.Glu389Asp	P	(7)
19	F	13	NA	NA	N	NA	-3.5	NA	8	5	NA	-3.6	-1.8 (5)	NA	NA	-	c.1481T>G	p.Ile494Ser	P	(7)
20	M	9	-0.3	-1.9	-2.3	9.9	-2.6	2.1	6	3	50	-3.2	-1.6 (3)	3.4	10.4	Disproportionate short-limbed short stature, prominent forehead, depressed nasal bridge, mild decrease in anterior pituitary	c.2905C>G	p.Val69Leu	P	(9)
21	F	11	AGA	NA	N	NA	-2.7	NA	8	3	30	-2.5	0.0 (2)	4.4	9.3	Bilateral fifth finger brachydactyly, clinodactyly, short broad thumbs and first toes, shortened metacarpals, mild mesomelia of upper limbs, eleven rib pairs	c.2761C>T	p.Arg921Ter	P	(10)
22	F	11	-1.8	-2.5	NA	NA	-1.5	1.3	-	-	-	-2.0	-	-	-	Triangular face, frontal bossing	c.1249C>G	p.Gln417Glu	P	(8)
23	F	2	-0.2	-2.5	NA	NA	-2.9	-1.0	-	-	-	-4.3	-	-	-	-	c.94C>A	p.Pro32Thr	LP	(8)

A, adult; F, female; FH, final height; GH, growth hormone; IGF1, insulin-like growth factor 1; LP, likely pathogenic; M, male; N, normal result without precise numeric specification; NA, not available; No, number; P, pathogenic; SDS, standard deviation score; SGA, small for gestational age.

^aThese patients are sisters; their father has the same gene variant and has a height -2.1 SD with shorter limbs.

^bSex steroid priming before GH stimulating tests.

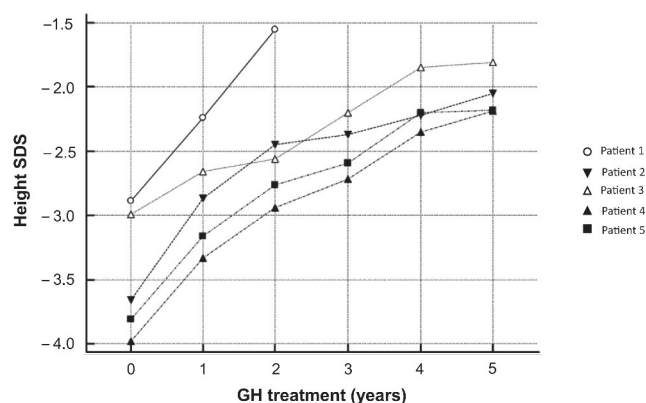


Figure 1. Growth hormone treatment response in 5 children with *NPR2* gene variants. Graph demonstrating height SDS development in individual children with (likely) pathogenic *NPR2* gene variants over 5 years of GH treatment. In Patient 3, puberty started 1 year after GH treatment initiation and may have therefore influenced her height SDS development. GH, growth hormone; SDS, standard deviation score.

Our study evaluates GH treatment in the largest cohort of patients with pathogenic *NPR2* gene variants published to date. There is no clear definition of successful GH treatment. However, compared with our study cohort, children with SHOX-D (a growth plate disorder with approved GH therapy and known treatment outcomes (21,22)) have similar treatment outcomes. In the 521 children with SHOX-D included in the GeNeSIS observational program, the mean first year height gain was 0.53 SD (in children with *NPR2* gene variants in our study, it was 0.79 SD) (23). Moreover, in the original study that led to the legal approval of GH treatment in SHOX-D children, Blum et al. (24) described a growth velocity increase from 4.8 to 8.7 cm/year in the first year of treatment and a height SDS increase of 1.2 SD after the first 2 years of therapy, which also corresponds to our observation. Thus, although no data on final height are available, GH treatment of short stature caused by *NPR2* gene variants seems to be promising.

Despite the apparently good effect of GH therapy, the real-life treatment indication in children with pathogenic *NPR2* gene variants may encounter legal barriers. According to our results and cases described so far (8–10), approximately half of the affected individuals may fulfill the criteria of the SGA indication. In Europe, the remaining children do not have a legal possibility of obtaining GH therapy unless they are (due to the low specificity of the testing (16,25)) diagnosed with GHD. Illustrative examples of this situation are the 2 sisters from our study cohort (Patients 2 and 3) with the same *NPR2* gene variant. The younger sister was born SGA and could therefore benefit from GH treatment at an early stage. The older sister was born appropriate for gestational age (AGA). Finally, the diagnosis of GHD (which was apparently not correct) allowed her to also

start with GH therapy. In the end, both her treatment and her sister's treatment were similarly successful.

Clarifying the genetic disorder specific reactions to GH treatment that would lead to further refinement of indications for GH therapy poses one of the important current challenges of pediatric endocrinology. In patients with SHOX-D, the treatment indication was based on an international prospective randomized study conducted by a pharmaceutical company (24), which may be too laborious and costly to be reproduced in additional genetically defined groups of patients. Thus, the identification of significant cohorts of homogeneous, genetically defined patients in academic settings and a precise re-evaluation of their previous growth response to GH therapy may form a future basis for treatment decisions. Until then, children with monogenic short stature can profit from GH treatment due to GHD or SGA indications.

We acknowledge that our study had several limitations. First, no functional studies have been performed. However, according to current guidelines, other methods can be used to prove the pathogenicity of genetic variants (20). In our cohort of patients with FSS, the most important of these was the segregation of the variants with short stature within the families. The supportive methods to evaluate the genetic variants included determining their frequency in population databases or various in silico studies (for information about specific families, see (17)). Second, noncoding variants (except for disruptions in the exon–intron boundaries) were not captured by the NGS methods used in our study. Third, the number of children with proven pathogenic variants in the *NPR2* gene in our study was relatively small. Thus, larger studies involving information from even more affected individuals with final height data available for analysis may help to confirm these results indicating an adequate effect of GH treatment in children with short stature due to *NPR2* gene variants.

Conclusions

NPR2 gene variants are causative of familiar short stature in a significant proportion of GH-treated children; their GH treatment response seems to be promising. Longitudinal studies including final height data are necessary to assess the long-term efficacy of GH in these children.

Acknowledgments

We would like to thank Professor Ondrej Cinek for the logistical support of the GH treatment database and for valuable laboratory consultations and to Jana Kaprova, MD, for her

help in updating the database. We also thank Pavla Kanková and Klara Vesela, laboratory workers at our center, for their devoted work and dedication to the study.

Supported by the Ministry of Health of the Czech Republic, grant number 16-31211A.

Additional Information

Correspondence and Reprint Requests: Stepanka Pruhova, MD, PhD. Department of Pediatrics, 2nd Faculty of Medicine, Charles University in Prague, University Hospital Motol, V Uvalu 84, 150 06 Prague 5, Czech Republic. E-mail: stepanka.pruhova@fnmotol.cz

Disclosure Summary: The authors have nothing to disclose.

Data Availability: The datasets generated during and/or analyzed during the current study are not publicly available but are available from the corresponding author on reasonable request.

References

- Irfanullah, Zeb A, Shinwari N, et al. Molecular and in silico analyses validates pathogenicity of homozygous mutations in the NPR2 gene underlying variable phenotypes of scromesomic dysplasia, type Maroteaux. *Int J Biochem Cell Biol.* 2018;102:76–86.
- Dickey DM, Edmund AB, Otto NM, Chaffee TS, Robinson JW, Potter LR. Catalytically active guanylyl cyclase B requires endoplasmic reticulum-mediated glycosylation, and mutations that inhibit this process cause Dwarfism. *J Biol Chem.* 2016;291(21):11385–11393.
- Hannema SE, van Duyvenvoorde HA, Premisler T, et al. An activating mutation in the kinase homology domain of the natriuretic peptide receptor-2 causes extremely tall stature without skeletal deformities. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(12):E1988–E1998.
- Hisado-Oliva A, Garre-Vázquez AI, Santaolalla-Caballero F, et al. Heterozygous NPR2 mutations cause disproportionate short stature, similar to Léry-Weill dyschondrosteosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015;100(8):E1133–E1142.
- Vasques GA, Amano N, Docko AJ, et al. Heterozygous mutations in natriuretic peptide receptor-B (NPR2) gene as a cause of short stature in patients initially classified as idiopathic short stature. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(10):E1636–E1644.
- Amano N, Mukai T, Ito Y, et al. Identification and functional characterization of two novel NPR2 mutations in Japanese patients with short stature. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(4):E713–E718.
- Wang SR, Jacobsen CM, Carmichael H, et al. Heterozygous mutations in natriuretic peptide receptor-B (NPR2) gene as a cause of short stature. *Hum Mutat.* 2015;36(4):474–481.
- Freire BL, Homma TK, Funari MFA, et al. Multigene sequencing analysis of children born small for gestational age with isolated short stature. *J Clin Endocrinol Metab.* 2019;104(6):2023–2030.
- Vasques GA, Hisado-Oliva A, Funari ME, et al. Long-term response to growth hormone therapy in a patient with short stature caused by a novel heterozygous mutation in NPR2. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2017;30(1):111–116.
- Jacob M, Menon S, Botti C, Marshall I. Heterozygous NPR2 mutation in two family members with short stature and skeletal dysplasia. *Case Rep Endocrinol.* 2018;2018:7658496.
- Voigt M, Fusch C, Olbertz D, et al. Analyse des Neugeborenenkollektivs der Bundesrepublik Deutschland. *Geburtshilfe Frauenheilkd.* 2006;66(10):956–970.
- Kobzová J, Vignerová J, Bláha P, Krejčovský L, Riedlová J. The 6th nationwide anthropological survey of children and adolescents in the Czech Republic in 2001. *Cent Eur J Public Health.* 2004;12(3):126–130.
- Fredriks AM, van Buuren S, van Heel WJ, Dijkman-Neerincx RH, Verloove-Vanhorick SP, Wit JM. Nationwide age references for sitting height, leg length, and sitting height/height ratio, and their diagnostic value for disproportionate growth disorders. *Arch Dis Child.* 2005;90(8):807–812.
- Kommunehospital A. Consensus guidelines for the diagnosis and treatment of growth hormone (GH) deficiency in childhood and adolescence: summary statement of the GH Research Society. GH Research Society. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85(11):3990–3993.
- Clayton PE, Cianfarani S, Czernichow P, Johannsson G, Rapaport R, Rogol A. Management of the child born small for gestational age through to adulthood: a consensus statement of the International Societies of Pediatric Endocrinology and the Growth Hormone Research Society. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(3):804–810.
- Plachy L, Strakova V, Elblova L, et al. High prevalence of growth plate gene variants in children with familial short stature treated with GH. *J Clin Endocrinol Metab.* 2019;104(10):4273–4281.
- Plachy L, Dusatkova P, Maratova K, et al. *NPR2 variants are frequent among children with familial short stature and respond well to growth hormone therapy.* *Open Science Framework* 2019. Deposited 17 September 2019. https://osf.io/bt67e/?view_only=2726e3018543453fa7099531e4643485
- Desvignes JP, Bartoli M, Delague V, et al. VarAFT: a variant annotation and filtration system for human next generation sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(W1):W545–W553.
- Pruhova S, Dusatkova P, Sumnik Z, et al. Glucokinase diabetes in 103 families from a country-based study in the Czech Republic: geographically restricted distribution of two prevalent GCK mutations. *Pediatr Diabetes.* 2010;11(8):529–535.
- Richards S, Aziz N, Bale S, et al.; ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015;17(5):405–424.
- Blum WF, Ross JL, Zimmermann AG, et al. GH treatment to final height produces similar height gains in patients with SHOX deficiency and Turner syndrome: results of a multicenter trial. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(8):E1383–E1392.
- Loche S, Carta L, Ibba A, Guzzetti C. Growth hormone treatment in non-growth hormone-deficient children. *Ann Pediatr Endocrinol Metab.* 2014;19(1):1–7.
- Benabbad I, Rosilio M, Child CJ, et al. Safety outcomes and near-adult height gain of growth hormone-treated children with SHOX deficiency: data from an observational study and a clinical trial. *Horm Res Paediatr.* 2017;87(1):42–50.
- Blum WF, Crowe BJ, Quigley CA, et al.; SHOX Study Group. Growth hormone is effective in treatment of short stature associated with short stature homeobox-containing gene deficiency: two-year results of a randomized, controlled, multicenter trial. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(1):219–228.
- Ghigo E, Bellone J, Aimaretti G, et al. Reliability of provocative tests to assess growth hormone secretory status. Study in 472 normally growing children. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996;81(9):3323–3327.

5.5. Short stature in a boy with atypical progeria syndrome due to *LMNA* c.433G>A [p.(Glu145Lys)]: apparent growth hormone deficiency but poor response to growth hormone therapy

Toni L, Dušátková P, Novotná D, Zemková D, Průhová Š, Lebl J. Short stature in a boy with atypical progeria syndrome due to LMNA c.433G>A [p.(Glu145Lys)]: apparent growth hormone deficiency but poor response to growth hormone therapy. J Pediatr Endocrinol Metab. 2019 Jul 26; 32(7): 775-779.

Kazuistické sdělení představuje výjimečného pacienta z naší kohorty, který trpěl extrémně vzácným syndromem předčasného stárnutí, známým jako Hutchinson-Gilford progeria syndrome (HGPS). Incidence HGPS se odhaduje na 1:10⁶. HGPS je způsoben patogenními variantami v genu *LMNA*, který kóduje protein lamin, nezbytný pro udržení konzistentního tvaru buněk a struktury buněčné membrány. Pacienti umírají ve věku průměrně 13 let v důsledku kardiovaskulárních komplikací.

Náš pacient byl doporučen k vyšetření pro růstovou poruchu typu SGA-SS již v necelých dvou letech věku, před rozvojem klinických projevů předčasného stárnutí. Laboratorní testy potvrdily deficit růstového hormonu a na MR byl zjištěn obraz „partial empty sella“. Byla zahájena terapie růstovým hormonem, avšak vzhledem k nedostatečnému účinku byla později ukončena.

Klinické známky progerie se začaly rozvíjet ve třetím roce věku a vedly nás k indikaci Sangerovy sekvenace genu *LMNA*. Prokázali jsme patogenní variantu *LMNA* c.433G>A. Tato varianta způsobuje atypický progeriální syndrom (APS) a byla do té doby popsána u jediného pacienta. Ve věku 4,2 let došlo k první ischemické komplikaci a ve věku 7 let chlapec utrpěl smrtelnou hemoragickou cévní mozkovou příhodu.

Podle dostupných informací se jedná o prvního pacienta s HGPS a/nebo APS, u kterého byl diagnostikován obraz „partial empty sella“ spojený s nedostatkem růstového hormonu. Ten může přispívat k růstové retardaci dětí s HGPS. Ukázalo se, že zřejmě vzhledem k dalším interferujícím faktorům léčba růstovým hormonem nezlepšila růstovou dynamiku.

Case Report

Ledjona Toni*, Petra Dušátková, Dana Novotná, Daniela Zemková, Štěpánka Průhová and Jan Lebl

Short stature in a boy with atypical progeria syndrome due to *LMNA* c.433G > A [p.(Glu145Lys)]: apparent growth hormone deficiency but poor response to growth hormone therapy

<https://doi.org/10.1515/jpem-2019-0107>

Received February 28, 2019; accepted March 31, 2019; previously published online June 13, 2019

Abstract

Background: Hutchinson-Gilford progeria syndrome (HGPS) is a rare disease caused by pathogenic variants in the *LMNA* gene, which leads to premature aging. The median life expectancy is shortened to 13 years due to cardiovascular complications.

Case report: We present a boy born with a pathogenic *LMNA* variant c.433G > A, which causes atypical progeria syndrome (APS) and was previously described in one single patient. When investigated for poor growth prior to the diagnosis of APS, his laboratory tests revealed growth hormone (GH) deficiency and magnetic resonance imaging (MRI) of the midbrain showed partial empty sella. GH treatment had only a limited and transient effect. His first ischemic complication manifested at age 4.2 years; at the age of 7 years, he had a fatal haemorrhagic stroke.

Conclusion: To the best of our knowledge, this is the first patient with APS showing partial empty sella and GH deficiency that might have contributed to his poor growth. GH failed to improve long-term outcome.

Keywords: atypical progeria syndrome; growth hormone deficiency; *LMNA*.

Introduction

Hutchinson-Gilford progeria syndrome (HGPS) is an extremely rare genetic condition associated with several features of premature aging. The estimated incidence is one per four to eight million live births, and to date, there are 156 patients identified with progeria in 48 countries [1]. Progeria manifests with growth retardation, gradual progression of characteristic facial features, loss of hair and subcutaneous fat, restricted joint mobility and rapidly progressing severe atherosclerosis [2]. Children with HGPS mostly appear phenotypically normal in early infancy, but start developing profound growth delay since the second half-year of life. Subsequently, symptoms worsen with the progression of time. The median life expectancy of affected children is 13 years and the most common causes of death are cardiovascular complications such as stroke or myocardial infarction [3].

HGPS is caused by *de novo* mutations in the *LMNA* gene which is localised on chromosome 1q.22 and provides instructions for producing two major lamin A isoforms – lamin A and lamin C, and two minor isoforms – C2 and A10. Lamins are major structural and supporting components of the nuclear lamina, which is a protein meshwork underneath the inner nuclear membrane. They provide stability to the nuclear envelope and are also engaged in DNA replication, cell division, chromatin organisation and additional basic cellular events [4].

Laminopathic variants of *LMNA* either affect particular tissues or have a systemic impact. *LMNA*-associated laminopathies with systemic presentation are characterised by premature aging, mandibuloacral dysplasia and additional typical phenotypic features of progeria (HGPS) and/or atypical progeria syndromes (APSs) [5, 6].

Most HGPS patients carry the c.1824C > T [p.(Gly608=)] variant of the *LMNA* gene encoding lamins A and C. The gene variant leads to activation of a cryptic splice site and accumulation of a pathological protein named progerin. In addition to the typical substitution found in HGPS patients, several patients were reported with APS carrying

*Corresponding author: Ledjona Toni, MD, Department of Paediatrics, 2nd Faculty of Medicine, Charles University and University Hospital Motol, V Úvalu 84, Prague 5, 150 06, Praha, Czech Republic, Phone: +420 224 432 001, Fax: +420 224 432 020, E-mail: ledjonatoni@gmail.com

Petra Dušátková, Daniela Zemková, Štěpánka Průhová and Jan Lebl: Department of Paediatrics, 2nd Faculty of Medicine, Charles University and University Hospital Motol, Praha, Czech Republic
Dana Novotná: Department of Paediatrics, Faculty of Medicine, Masaryk University and University Hospital Brno, Brno, Czech Republic

other heterozygous, homozygous or compound heterozygous pathogenic variants in the *LMNA* gene [7]. These patients shared similar features with patients suffering from classic HGPS but their cells do not accumulate progerin or other pathological proteins [8].

We present here a case of a male patient who was diagnosed at the age of 2.5 years with APS caused by a pathogenic variant of the *LMNA* gene. This variant was previously described in only one patient. We discuss here the diagnosis of growth hormone (GH) deficiency, administration of GH and its effect on physical growth and development.

Case study

A 20-month-old boy was referred to our clinic for growth retardation, failure to thrive and unusual facial appearance. He was born in the 39th gestational week with a birth weight of 3.27 kg (-0.6 standard deviation [SD]) and a birth length of 46 cm (-2.5 SD). Neonatal jaundice persisted for 4 weeks and required phototherapy. Failure to thrive was apparent since early life. Recurrent vomiting and signs of gastro-oesophageal reflux were speculatively attributed to intolerance of different food components (cow's milk, gluten, etc.) and led to diet modifications without any particular effect. Developmental hip dysplasia was recognised by the age of 7 weeks and led to closed reduction under general anaesthesia which was performed in the 12th week of life. Speech development was initially normal but motor development was slightly delayed with first steps taken at 18 months. Early closure of the large fontanelle (at 3 months) was in contradiction

with markedly delayed dental eruption (first tooth at 12 months).

Diagnosis of GH deficiency and GH treatment

During the initial visit when the patient was 20 months of age, his height was 76.5 cm (-2.2 standard deviation score [SDS]) and weight was 8.3 kg (-3.2 SDS). Laboratory test showed low insulin-like growth factor-I (IGF-I) levels at two separate occasions (39 and 40 $\mu\text{g/L}$; -1.45 and -1.43 SDS) and failure to increase GH release following clonidine (60 min after clonidine: 2.43 $\mu\text{g/L}$). A subsequent brain magnetic resonance imaging (MRI) focused on midline structures revealed a partial empty sella with a normal posterior pituitary (Figure 1A); thus, diagnosis of GH deficiency was established and GH administration was initiated at a dose of 0.025 mg/kg/day at age 23 months.

The biochemical response to GH therapy apparently exceeded its growth effect. Whereas IGF-I levels increased to 94 $\mu\text{g/L}$ (-0.63 SDS) at month 12 of therapy and to 71 $\mu\text{g/L}$ (-1.00 SDS) at month 24, the growth velocity increased only within the first 6 months to 6 cm/year and declined thereafter. Following a year of treatment, his height and weight dropped to 84.5 cm (-3.2 SDS) and 9.3 kg (-4.5 SDS), respectively, and after 2 years to 86.4 cm (-4.0 SDS) and 9.7 kg (-5.1 SDS). Due to poor response, therapy with GH was finally terminated at age 4.5 years (Figure 1B, C).

By age 2.5 years, evolving facial appearance was finally suggestive of progeria, with the face being disproportionately small in comparison to the skull, scalp

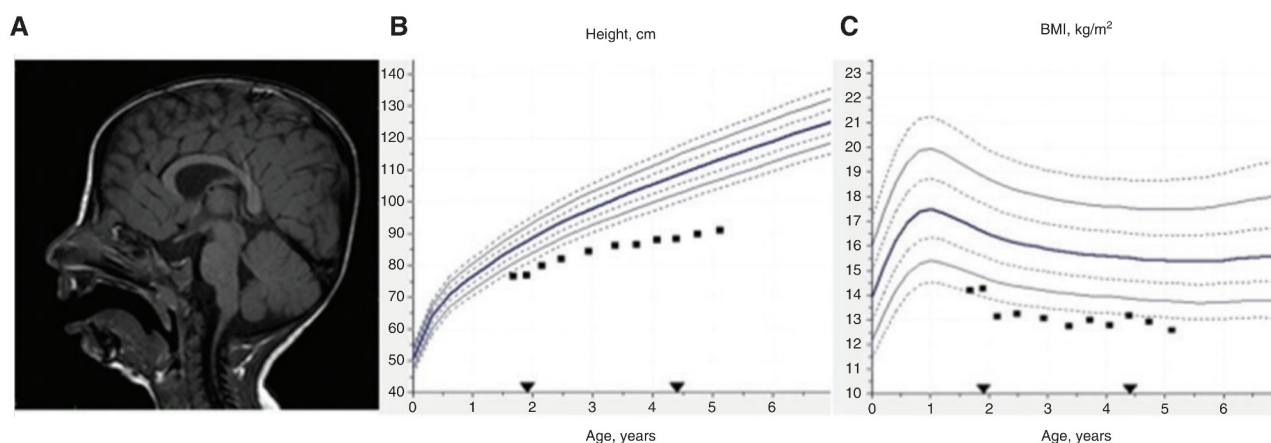


Figure 1: (A) MRI of the brain showing partial empty sella. (B and C) Growth charts showing failure to thrive. (A) Partial empty sella on MRI, (B) height-for-age chart and (C) body mass index (BMI)-for-age chart. Arrows indicate the start and termination of GH therapy.

hair becoming sparse and being replaced by fine, downy, blond hairs. In addition, prominent veins on the scalp were noticeable (Figure 2).

Informed consent was obtained from the patient's parents prior to genetic testing. Blood samples were obtained from the proband, his parents and sister. Genetic testing showed a heterozygous *de novo* pathogenic variant of *LMNA* within exon 2, c.433G>A, that most likely leads to amino-acid substitution p.(Glu145Lys). This variant was neither found in the patient's parents, nor in his sister while it has been reported in the literature in a single patient [9].

Subsequent vascular events

Our patient had his first ischemic cerebral complication which caused transient hemiparesis at age 4.2 years. MRI revealed severe ischemia of the basal ganglia, subcortical ischemic changes in the right frontal lobe and

severely reduced flow in the right internal carotid artery (Supplementary Figure 1). Several subsequent episodes of transitory ischemic attacks occurred despite combined anticoagulation and antiplatelet therapy. At the age of 7 years, he presented with seizures and unconsciousness due to a massive haemorrhagic stroke with fatal outcome (Supplementary Figure 2).

Discussion

We present a case of a patient with an APS caused by a DNA change in the 1B segment of the central rod domain LA/C. Taimen et al. [10] proved that this variant alters the lamin structure and assembly, leading to profound changes in nuclear architecture, a reduction in B-type lamin expression, and premature senescence. Kaufmann et al. [11] investigated the mechanical properties of lamin A of isolated amphibian oocytes with the same



Figure 2: Gradual progression of progeroid features. Facial appearance in the boy with atypical progeria syndrome at age 1 month (A), 1.5 years (B), 1.7 years (C), 2.5 years (D) and 4 years (E) showing gradual progression of progeroid features.

pathological variant and compared them with those of wild-type lamin A. The study showed increased rigidity which was in concordance with the findings by Apte et al. [12] who compared the mechanical properties of nuclei of a progeria patient with the same variant with those of a 61-year-old donor. In both cases the nuclear stiffness was increased, which indicates an interesting feature of the aging process, under natural or even abnormal conditions.

The patient described previously had atypical clinical features such as persistence of coarse hair over the head, ample subcutaneous tissue over the legs and arms and multiple severe strokes beginning in early childhood [13]. These unique features are in full concordance with our patient's appearance and clinical course.

Our patient was identified with laboratory signs suggestive of GH deficiency and significant anterior pituitary hypoplasia ("partial empty sella") prior to the appearance of the progeroid phenotype. Therefore, we initiated long-term GH administration that continued for over 2.5 years. Only the early effect of GH seemed to be mildly promising, with respect to both growth velocity and increasing IGF-I levels. Nevertheless, despite a continuous increase in IGF-I levels, the growth promoting effect of GH soon receded.

GH deficiency with pituitary hypoplasia was in our patient apparently a part of the clinical presentation of APS; however, due to the complex nature of the condition, it probably only partly contributed to failure to growth and to thrive and could not simply be reverted by GH administration.

Abdenur and colleagues [14] published the results of nutritional intervention and GH therapy in three out of five patients with HGPS. Only one of these patients had been proved as GH deficient. All three patients showed a temporary increase in growth rate, which decreased over time. In concordance with these findings, Sadeghi-Nejad and Demmer [15] described administration of GH in a patient with HGPS with another substitution c.1822G>A [p.(Gly608Ser)]. The patient showed a normal GH response to provocative stimuli and treatment with GH hormone increased the levels of IGF-I, but the weight gain and growth rate were poor. To the best of our knowledge, none of the patients described in the literature with APS had confirmed empty sella or partial empty sella on MRI.

Conclusions and learning points

- APS can present with GH deficiency.
- MRI of the midbrain might show partial empty sella.
- GH treatment led to a temporary increase in IGF-I but did not improve long-term outcome in our single case observation.

Acknowledgments: This work was supported by a grant from AZV of Czech Ministry of Health No. 18-07-00283. We would like to thank our case patient's parents for their cooperation and providing consent for the publication of the pictures above.

Author contributions: All the authors have accepted responsibility for the entire content of this submitted manuscript and approved submission.

Research funding: This work was supported by a grant from AZV of Czech Ministry of Health No. 18-07-00283.

Employment or leadership: None declared.

Honorarium: None declared.

Competing interests: The funding organisation(s) played no role in the study design; in the collection, analysis, and interpretation of data; in the writing of the report; or in the decision to submit the report for publication.

References

1. Progeria Research Foundation (PRF) webpage. Available at: <https://www.progeriaresearch.org/>. Accessed 17 Feb 2019.
2. DeBusk FL. The Hutchinson-Gilford progeria syndrome. Report of 4 cases and review of the literature. *J Pediatr* 1972;80:697–724.
3. Hennekam RC. Hutchinson-Gilford progeria syndrome: review of the phenotype. *Am J Med Genet A* 2006;140:2603–24.
4. Goldman RD, Gruenbaum Y, Moir RD, Shumaker DK, Spann TP. Nuclear lamins: building blocks of nuclear architecture. *Genes Dev* 2002;16:533–47.
5. De Sandre-Giovannoli A, Bernard R, Cau P, Navarro C, Amiel J, et al. Lamin A truncation in Hutchinson-Gilford progeria. *Science* 2003;300:2055.
6. Garg A, Subramanyam L, Agarwal AK, Simha V, Levine B, et al. Atypical progeroid syndrome due to heterozygous missense LMNA mutations. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94:4971–83.
7. Doubaj Y, De Sandre-Giovannoli A, Vera EV, Navarro CL, Elaloui SC, et al. An inherited LMNA gene mutation in atypical progeria syndrome. *Am J Med Genet Part A* 2012;158A:2881–7.
8. Barthelemy F, Navarro C, Fayek R, Da Silva N, Roll P, et al. Truncated prelamin A expression in HGPS-like patients: a transcriptional study. *Eur J Hum Genet* 2015;23:1051–61.
9. Eriksson M, Brown WT, Gordon LB, Glynn MW, Singer J, et al. Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature* 2003;423:293–8.
10. Taimen P, Pfliegerhaer K, Shimi T, Moller D, Ben-Harush K, et al. A progeria mutation reveals functions for lamin A in nuclear assembly, architecture, and chromosome organization. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:20788–93.
11. Kaufmann A, Heinemann F, Radmacher M, Stick R. Amphibian oocyte nuclei expressing lamin A with the progeria mutation E145K exhibit an increased elastic modulus. *Nucleus* 2011;2:310–19.
12. Apte K, Stick R, Radmacher M. Mechanics in human fibroblasts and progeria: lamin A mutation E145K results in stiffening of nuclei. *J Mol Recognit* 2016;30:1–11.

13. Smith AS, Wiznitzer M, Karaman BA, Horwitz SJ, Lanzieri CF. MRA detection of vascular occlusion in a child with progeria. *Am J Neuroradiol* 1993;14:441–3.
14. Abdenur J, Brown WT, Friedman S, Smith M, Lifshitz F. Response to nutritional and growth hormone treatment in progeria. *Metabolism* 1997;46:851–6.
15. Sadeghi-Nejad A, Demmer L. Growth hormone therapy in progeria. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2007;20:633–7.

Supplementary Material: The online version of this article offers supplementary material (<https://doi.org/10.1515/jpem-2019-0107>).

5.6. První zkušenosti s dlouhodobě působícím růstovým hormonem

Lebl J, Toni L, Dankovčiková A, Košťálová E, Magnová O, Koloušková S. První zkušenosti s dlouhodobě působícím růstovým hormonem. Ces-slov Pediat. 2022;77(Suppl.3):S36-40

První setkání s novým lékem je pro lékaře velkou výzvou. Následující text se zaměřuje na naši první zkušenost s dlouhodobě působícím růstovým hormonem.

Růstový hormon se v léčbě používá již 65 let, a přestože došlo ke změnám ve výrobních postupech, molekula léku zůstala nezměněna. Jeho aplikace probíhá formou každodenních podkožních injekcí, což představuje dlouhodobou zátěž pro dítě i pro jeho rodinu. V nedávné době byly vyvinuty tři modifikované molekuly dlouhodobě působícího růstového hormonu (LAGH), které umožňují podávání jednou týdně a mají podobný růstový účinek jako přirozený růstový hormon. Lonapegsomatropin je upravená forma molekuly spojená s nosičem, která postupně uvolňuje přirozený růstový hormon. Somapacitan obsahuje molekulu růstového hormonu s jednou změněnou aminokyselinou, na kterou je připojena mastná kyselina s plazmatickým albuminem. Díky výrazně prodlouženému poločasů se postupně přeměňuje na aktivní molekulu. Somatrogon je spojen s lidským peptidem pomocí CTP technologie, což zpomaluje jeho eliminaci z těla a výrazně prodlužuje jeho účinky.

Zúčastnili jsme se mezinárodní studie, která hodnotila zátěž spojenou s léčbou somatrogonem ve srovnání s každodenním podáváním růstového hormonu. Dotazníky vyplněné 87 dětmi a jejich rodiči ukázaly významné snížení vnímané zátěže pro dítě a rodinu při léčbě somatrogonem o téměř dvě třetiny oproti každodenním injekcím. Z této kohorty dětí byla největší skupina z našeho pracoviště. LAGH se i díky této studii stal novou alternativou pro léčbu dětí s některými formami malého vzrůstu.

KRÁTKÉ SDĚLENÍ

První zkušenosti s dlouhodobě působícím růstovým hormonem

First experience with long-acting growth hormone

Jan Lebl¹, Ledjona Toni¹, Adriana Dankovčíková², Ludmila Košťálová³, Olga Magnová⁴, Stanislava Koloušková¹

¹Pediatrická klinika,
2. lékařská fakulta Univerzity
Karlovy a FN Motol, Praha

²Klinika dětí a dorastu,
Detská fakultná nemocnica,
Košice

³Detská klinika,
Lekárska fakulta Univerzity
Komenského a Národný ústav
detských chorôb, Bratislava

⁴Pediatrická klinika, FN Brno

SOUHRN

Lebl J, Toni L, Dankovčíková A, Košťálová L, Magnová O, Koloušková S. První zkušenosti s dlouhodobě působícím růstovým hormonem

Růstový hormon se používá v léčbě již 65 let. I když se změnila výrobní technologie, molekula léku zůstala stejná. Podává se ve formě každodenních podkožních injekcí, léčba trvá obvykle řadu let a pro dítě i rodinu může představovat významnou zátěž. V současné době jsou na prahu klinického použití tři modifikované molekuly dlouhodobě působícího růstového hormonu (long-acting growth hormone, LAGH) určené k podávání jednou týdně, které mají růstový účinek srovnatelný s přirozeným růstovým hormonem. Lonapegsomatropin je pegylovaná promolekula přechodně konjugovaná s nosičem, ze které se rovnoměrně uvolňuje nativní růstový hormon. Somapacitan má v molekule růstového hormonu zaměněnou jednu aminokyselinu, na kterou se ukotví mastná kyselina s navázaným plazmatickým albuminem. Má významně prodloužený poločas, během kterého dochází k postupné konverzi na aktivní molekulu. Somatrogon má molekulu fúzanou s přirozeným lidským peptidem (CTP technologie), což zpomaluje renální i jaterní eliminaci a sedminásobně prodlužuje poločas účinku. Zúčastnili jsme se mezinárodní multicentrické klinické studie k posouzení zátěže léčbou somatrogonem ve srovnání s každodenním růstovým hormonem. Pomocí standardizovaných dotazníků byl ve skupině 87 dětí zjištěn při léčbě somatrogonem významný pokles subjektivně vnímané zátěže pro dítě a rodinu na jednu třetinu ve srovnání s každodenní injekcí. LAGH bude brzy novou alternativou pro léčbu dětí s některými formami malého vzrůstu.

Klíčová slova: růstový hormon, dlouhodobě působící růstový hormon, lonapegsomatropin, somapacitan, somatrogon

SUMMARY

Lebl J, Toni L, Dankovčíková A, Košťálová L, Magnová O, Koloušková S. First experience with long-acting growth hormone

Therapeutic use of growth hormone spans back over 65 years. The drug molecule remained unchanged, despite a switch in production technology. It is being administered in form of subcutaneous daily injections for multiple years in most patients, which may represent a significant burden for the child and his/her family. Three modified molecules of long-acting growth hormone (LAGH) with once weekly administration have been developed and are approaching clinical use. Their growth effect is equivalent to daily growth hormone injections. Lonapegsomatropin is a pegylated pro-molecule temporarily conjugated with a carrier, allowing regular release of native growth hormone. Somapacitan has one amino acid substitute in growth hormone molecule, serving as an anchor for a fatty acid with bound plasmatic albumin. Its substantially prolonged half-life allows gradual conversion into active molecule. Somatrogon is growth hormone fused with natural human peptide (CTP technology) which slows down its renal and hepatic clearance and prolongs sevenfold its half-life. We participated at an international multicentre clinical study to test treatment burden of somatrogon administration in comparison to daily growth hormone, using standardised questionnaires. The cohort of 87 children and their families reported significantly declined treatment burden during somatrogon therapy to one third in comparison to daily injections. LAGH will soon become a novel treatment option for children with some forms of short stature.

Key words: growth hormone, long-acting growth hormone, lonapegsomatropin, somapacitan, somatrogon

Poděkování. Problematiku růstového hormonu řeší pracoviště autorů s podporou grantu AZV NV18-07-00283. Klinickou studii subjektivního vnímání zátěže léčbou somatrogonem jednou týdně ve srovnání s každodenní injekcí rhGH navrhla a podpořila společnost Pfizer.

Korespondenční adresa:

prof. MUDr. Jan Lebl, CSc.
Pediatrická klinika 2. LF UK a FN Motol
V Úvalu 84
150 06 Praha 5
Jan.Lebl@Lfmotol.cuni.cz

Růstový hormon se používá jako lék již 65 let.⁽¹⁾ Po celou tuto dobu se pacientům podává stejná molekula lidského růstového hormonu (hGH), i když výrobní postup se mezitím zcela proměnil. Do roku 1985 se růstový hormon získával extrakcí z kadaverózních lidských hypofýz, v roce 1985 byl registrován ke klinickému použití první přípravek vyráběný biotechnologicky – rekombinantní technologií. Touto metodou se rekombinantní lidský růstový hormon (rhGH) vyrábí dosud.^(2,3)

V současné době je připraveno k použití několik přípravků růstového hormonu s modifikovanou molekulou, které není nutné podávat injekčně s.c. denně, ale které mají srovnatelný účinek při s.c. podání jednou týdně.

FYZIOLOGIE RŮSTOVÉHO HORMONU

Přirozený hGH je peptidová molekula s jedním řetězcem o délce 191 aminokyselin. Její terciární strukturu dotváří jeden disulfidický můstek (obr. 1). Růstový hormon patří mezi hormony s **pulzatilní sekrecí** (obr. 2), která je řízena souhrou tří hypothalamických regulačních peptidů – growth hormone-releasing hormonu (GHRH), somatostatinu a ghrelinu. Po vyplavení ze somatotrofních buněk hypofýzy do krve má hGH **poločas účinku 17 minut**, protože se rychle vylučuje ledvinami. Jak ukazuje graf přirozené sekrece hGH na obr. 2, po naprostou většinu dne i podstatnou část noci hladina nepřesahuje 10 µg/l, což je obvyklá minimální arbitrání hodnota pro průkaz dostatečné produkce. Stanovení růstového hormonu z jednoho krevního odběru tedy zpravidla neodliší dítě s normální nebo se sníženou sekrecí – hladina bude v obou případech nízká. K diagnostice sekrece růstového hormonu používáme **stimulační testy**.

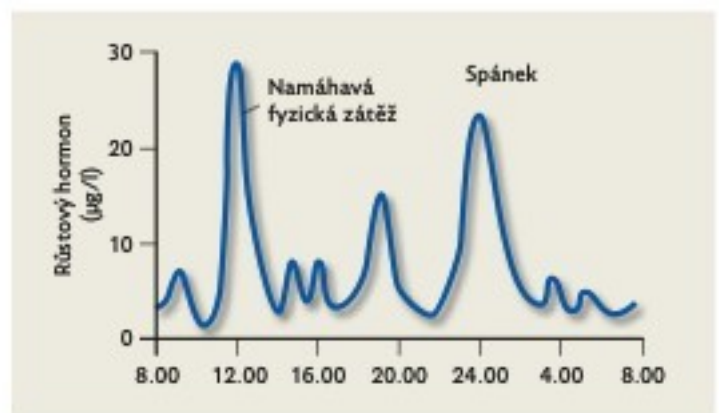
Receptor pro růstový hormon (GHR) je homodimer, složený ze dvou totožných podjednotek. Molekula hGH se váže na jeho extracelulární část (doménu). Tato vazba změní vzájemnou orientaci obou složek homodimeru – obě části navzájem rotují (obr. 3). Tím se aktivuje napojená JAK2 kináza a cestou JAK-STAT signalizační kaskády uvnitř buňky se následně změní genová transkripce v buněčném jádře. Tímto mechanismem se předává informace nesená růstovým hormonem cílovým buňkám.^(4,5)

SOUČASNÉ LÉČENÍ RŮSTOVÝM HORMONEM

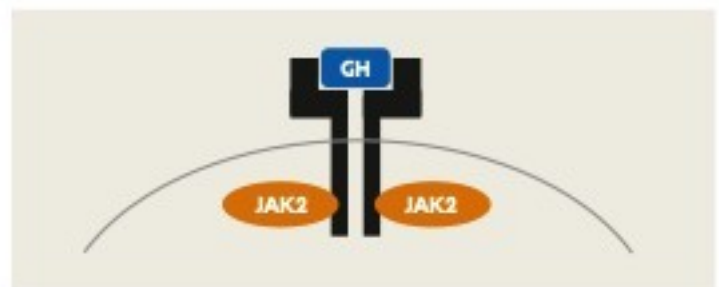
Mezi roky 1957 a 1985 se k léčbě používal výhradně růstový hormon extrahovaný z kadaverózních lidských hypofýz. V té době se přípravek podával obvykle třikrát týdně i.m., děti chodily na injekce do ordinace svého dětského lékaře. Od zavedení biotechnologické výroby rhGH v roce 1985 začal být přípravek k dispozici v potenciálně neomezených množstvích a velká pozornost byla věnována optimalizaci jeho užití.^(6,7) Studie ukázaly, že **každodenní s.c. injekce večer před spaním** jsou nejen příjemnější, ale také účinnější než dřívější podávání třikrát týdně i.m.⁽⁸⁾ O něco lépe napodobují přirozenou pulzatilní sekreci růstového hormonu



Obr. 1: Molekula lidského růstového hormonu



Obr. 2: Diurnální variace sekrece růstového hormonu. Růstový hormon se vyplavuje do krve pulzatilně. V první fázi spánku sekrece vrcholí. Přes den je silným podnětem pro vyplavení růstového hormonu namáhavá fyzická zátěž.



Obr. 3: Homodimer receptoru pro růstový hormon. Vazbou molekuly růstového hormonu (modře) se spouští JAK-STAT signalizační kaskáda, která přeneše informaci do buněčného jádra, kde změní transkripční chování buňky.

s vzestupem v prvních hodinách spánku – poločas molekuly rhGH po s.c. podání je 3,5 hodiny.

Léčba růstovým hormonem je **dlouhodobá**. Trvá zpravidla od stanovení diagnózy do ukončení růstu, u pacientů

s těžší nedostatečností vlastní sekrece dokonce i v dospělosti. Klinická zkušenost a následně i řada studií prokázala, že při léčbě růstovým hormonem postupně **klesá adherence a compliance**. Je to způsobeno nejen únavou z mnohaletého léčení a nepohodlím každodenních injekcí, ale také opožděným účinkem léčby – příznivý vliv na růst je patrný až v horizontu týdnů či měsíců, což je pro dítě i adolescenta obtížné pojmout. I když se vynechání jednotlivých dávek bezprostředně neprojeví, bylo jasně dokumentováno, že nedostatečná adherence snižuje účinek léčby.

Je 30 % pacientů je plně compliantních, tj. vynechá méně než 1 dávku za týden. Adherence klesá zvláště u adolescentů – také proto často končí růst s nižší výškou, než je jejich individuální predikce dle rodičů i populační průměr.

Pro měření adherence lze použít několik metod – pouhý zápis podaných dávek, elektronické přístroje se záznamem aplikovaných injekcí, sledování spotřeby léku či počítání vrácených použitých ampulí či per. Tyto metody ukázaly, že **non-adherence kolísá mezi 21–70 %**, u většiny pacientů je tedy významná a vede k poklesu růstové rychlosti.^(9,10)

KONCEPT DLOUHODOBĚ PŮSOBÍCÍHO RŮSTOVÉHO HORMONU (LAGH)

Vývoj dlouhodobě působícího růstového hormonu (long-acting growth hormone, LAGH) vychází z předpokladu, že nižší četnost injekcí přinese nejen příjemnější léčení, ale zlepší adherence.

Zájem o dlouhodobě působící růstový hormon je dokonce starší než výroba rhGH – již v éře extrakčního růstového hormonu se zkoušela gelová suspenze s obsahem extrahovaného léku (tab. 1). Nevedla ale k účinným systémovým koncentracím hGH a od dalších pokusů s LAGH bylo na řadu let upuštěno.⁽¹¹⁾

V roce 1999 schválila FDA první skutečný LAGH – **Nutropin DepotTM**, rhGH enkapsulovaný do mikrokuliček z biokompatibilního a biodegradabilního polyaktid-koglykolidového polymeru. Podával se jednou nebo dvakrát za měsíc.⁽¹²⁾ Výroba byla ukončena v roce 2004 pro lokální reakce v místě vpichu a pro technologické výrobní obtíže (viz tab. 1).

V minulých 20 letech se hledaly další cesty prodloužení biologické účinnosti rhGH. Ukázalo se, že přípravky založené na principu podkožního depo rhGH mají tendenci vyvolávat lokální lipoatrofie.^(13,14) Pro děti s deficitem růstového hormonu jsou registrované dva podkožní přípravky

s pomalým s.c. uvolňováním, určené k aplikaci jednou týdně – jeden v Jižní Koreji a jeden v Číně.⁽¹⁵⁾ V Evropě se neuplatnily.

V současné době jsou v Evropě a v USA v závěrečné fázi klinického zkoušení nebo na prahu klinického použití tři přípravky LAGH (viz tab. 1). Jednou z metod prodlouženého účinku je princip **promolekuly** přechodně **konjugované s nosičem**, ze které se předvídatelně a rovnoměrně uvolňuje nativní růstový hormon (**lonapegsomatropin, Skytrofa[®]**).⁽¹⁶⁾

Druhou možností je **záměna aminokyseliny v molekule rhGH**, která ukotví mastnou kyselinu, na niž se nekovalentně, a tedy **reverzibilně naváže plazmatický albumin (somapacitan, Sogroya[®])**.⁽¹⁷⁾ Tento postup významně zpomalí clearance léku z krevního oběhu a umožní postupnou konverzi na aktivní molekulu. Podobný princip byl použit u inzulínů detemir a degludec a také u liraglutidu a semaglutidu (obr. 4).

Třetí cestou je fúzní protein se sekvencí převzatou z jiných cirkulujících proteinů (**somatrogon, Ngenla[®]**). Somatrogon je rhGH **fúzovaný s třemi kopiemi karboxyl-terminálního peptidu (CTP)** β -podjednotky lidského choriového gonadotropinu (hCG) o velikosti 47,5 kDa. Jedná se tedy o spojení s přirozeným lidským peptidem, který pro člověka není antigenní.⁽¹⁸⁾ Právě díky CTP má přirozený hCG prodloužený poločas na hodiny ve srovnání s přirozenou molekulou luteinizačního hormonu (LH) s poločasem v řádu minut.

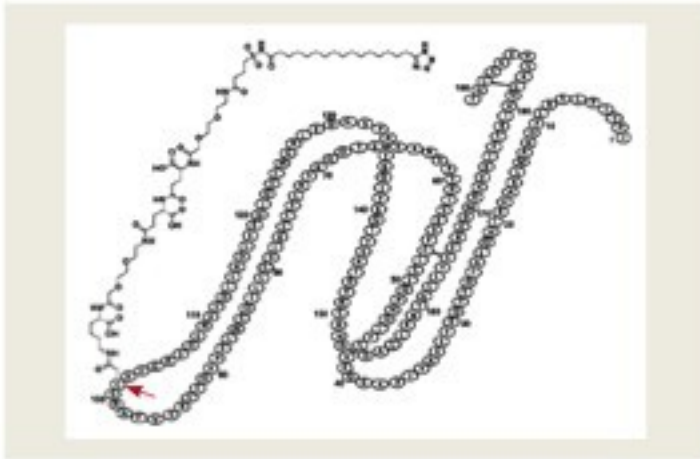
Technologie CTP zpomaluje eliminaci – prodloužení hydrofilního terminálu snižuje renální a hepatální clearance. Somatrogon má **poločas účinku 28,2 hodiny**, sedmkrát delší než rhGH.

Fúzní proteiny ale mají vyšší molekulární hmotnost, což může omezit průnik do méně prokrvených tkání včetně tuku, kosti a růstové ploténky. Proto se během klinických studií nejdříve hledala bioekvivalentní dávka, která zajistí růstový účinek srovnatelný s rhGH.⁽¹⁹⁾

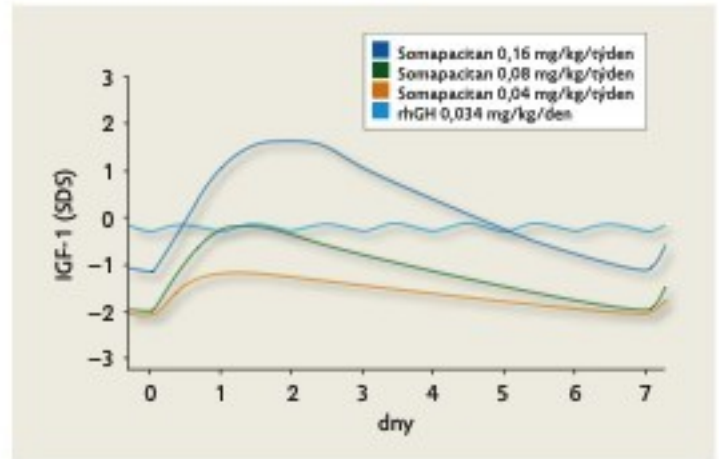
Všechny tyto tři molekuly byly navrženy a testovány tak, aby je bylo možné aplikovat jednou týdně a aby měly účinek srovnatelný s rhGH. Je přirozené, že po podávání injekce jednou týdně se mění profil hladin IGF-1 jinak než u každodenní injekce rhGH (obr. 5).⁽²⁰⁾ U všech tří molekul byly ve fázi 3 klinického zkoušení prokázány příznivé parametry účinnosti a bezpečnosti.⁽²¹⁾ Somatrogon byl jako první molekula LAGH v únoru 2022 registrován v EU a v ČR pro léčbu dětí a dospívajících s deficitem růstového hormonu od 3 let věku.

Tab. 1: Metody prodloužení účinku rhGH a příklady jednotlivých molekul

Technologie prodloužení poločasu rhGH	Generický, případně prodejní název	Doba vzniku a výroby
Hydrogel	–	před 1979
Mikrokuličky	Nutropin Depot TM	1999–2004
„Pegylace“ – konjugace s polyetylen glykolem (PEG)	Lonapegsomatropin – Skytrofa [®]	současnost
Záměna aminokyseliny k ukotvení mastné kyseliny a následná vazba na albumin	Somapacitan – Sogroya [®]	současnost
Fúze s peptidem na C-terminálu	Somatrogon – Ngenla [®]	současnost



Obr. 4: Schematické znázornění molekuly somapacitanu. V původní molekule rhGH byla na pozici 101 zaměněna aminokyselina (označena šipkou). Na tuto aminokyselinu je ukotvena mastná kyselina, na kterou se nekovalentně reverzibilně váže plazmatický albumin.



Obr. 5: Kolísání hladin IGF-1 (SDS) v průběhu jednoho týdne po třech různých dávkách somapacitanu a po každodenní injekci rhGH. Model vytvořený podle skutečných měření u pacientů ve studiích. Upraveno dle^[20]

NOVÉ VÝZVY PŘI LÉČBĚ LAGH

Miller se spolupracovníky nedávno formulovali několik bodů, které označili jako nové výzvy při léčbě LAGH.^[34]

Pootevřenou otázkou zůstává **interpretace hladin IGF-1** při potřebě upravovat dávkování LAGH či monitorovat spolupráci při léčení. Zatímco při každodenní injekci rhGH jsou hladiny IGF-1 v průběhu dne stabilní, při injekci LAGH jednou týdně má hladina IGF-1 specifickou dynamiku – dosahuje vrcholu a poté po zbytek týdne klesá (viz obr. 5).^[20] K posouzení účinku je tedy třeba znát odstup od injekce v okamžiku krevního odběru a mít k dispozici podklady pro standardní konverzi změřené hodnoty.

Jinou otázkou je skutečný **vliv nižšího počtu injekcí na adherenci**. I když léčba LAGH vypadá ve srovnání s každodenní injekcí atraktivně, nevíme, zda skutečně zlepšuje adherenci. Příčiny nízké adherence a compliance jsou komplexní – nejen každodenní aplikace. Navíc u některých dětí **nemusí být LAGH přínosem** – u dětí s těžkým deficitem růstového hormonu se může vrátit riziko hypoglykemie v době klesajícího účinku. A konečně – zatímco možnost recidivy či rozvoje tumoru je při každodenních injekcích rhGH a při stabilním IGF-1 nízké až zanedbatelné, zatím nejsou k dispozici údaje o účinku LAGH u dětí s anamnézou onkologického onemocnění.

SUBJEKTIVNÍ VNÍMÁNÍ ZÁTĚŽE LÉČBOU

Naše první zkušenosti s LAGH vycházejí ze studie **subjektivního vnímání zátěže léčbou** u dětí, které dostávaly somatrogon jednou týdně ve srovnání s každodenní aplikací klasického rhGH. Mezinárodní multicentrické studie se zúčastnilo 87 dětí s deficitem růstového hormonu ve věku 3–17 let a dlouhodobě zavedenou léčbou, z toho 21 v našich čtyřech centrech v Česku a na Slovensku. Děti dostávaly v náhodném pořadí střídavě 12 týdnů každodenní injekci rhGH a 12 týdnů LAGH somatrogon jednou za týden. Rodiče a starší děti hodnotili standardními dotazníky zátěž, jakou léčba pro dítě a rodiče představuje. Celkové skóre zásahu léčby do života bylo během podávání somatrogonu třetinové (8,63 proti 24,13 bodu). Zlepšení bylo zřejmé ve většině parametrů, zejména v ukazatelích „spokojenost s celkovou zkušeností z léčby“ a „přání pokračovat ve stejném léčebném schématu“.^[22] Subjektivně tedy vnímají možnost léčit přípravkem LAGH děti i rodiče příznivě. |

LITERATURA

1. Raben MS. Treatment of a pituitary dwarf with human growth hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 1958; 18: 901–903.
2. Reh CS, Geffner ME. Somatotropin in the treatment of growth hormone deficiency and Turner syndrome in pediatric patients: a review. *Clin Pharmacol* 2010; 2: 111–122.
3. Ranke MB, Wit JM. Growth hormone – past, present and future. *Nat Rev Endocrinol* 2018; 14: 285–300.
4. Brooks AJ, Waters MJ. The growth hormone receptor: mechanism of activation and clinical implications. *Nat Rev Endocrinol* 2010; 6: 515–525.
5. Waters MJ. The growth hormone receptor. *Growth Horm IGF Res* 2016; 28: 6–10.
6. Albertsson-Wikland K, Westphal O, et al. Daily subcutaneous administration of human growth hormone in growth hormone deficient children. *Acta Paediatr Scand* 1986; 75: 89–97.
7. Ranke MB. Clinical experience with authentic recombinant human growth hormone. *Acta Paediatr Scand Suppl* 1986; 325: 90–92.
8. Kastrup KW, Christiansen JS, Andersen JK, et al. Increased growth rate following transfer to daily sc administration from three weekly im injections

- of hGH in growth hormone deficient children. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1983; 104: 148–152.
9. **Cutfield WS, Derraik JGB, Gunn AJ, et al.** Non-compliance with growth hormone treatment in children is common and impairs linear growth. *PLoS One* 2011; 6: e16223–e16223.
 10. **Kapoor RR, Burke SA, Sparrow SE, et al.** Monitoring of concordance in growth hormone therapy. *Arch Dis Child* 2008; 93: 147–148.
 11. **Lippe B, Frasier SD, Kaplan SA.** Use of growth hormone-gel. *Arch Dis Child* 1979; 54: 609–613.
 12. **Johnson OL, Cleland JL, Lee HJ, et al.** A month-long effect from a single injection of microencapsulated human growth hormone. *Nat Med* 1996; 2: 795–799.
 13. **Cai Y, Xu M, Yuan M, et al.** Developments in human growth hormone preparations: sustained-release, prolonged half-life, novel injection devices, and alternative delivery routes. *Int J Nanomedicine* 2014; 9: 3527–3538.
 14. **Miller BS, Velazquez E, Yuen KCJ, et al.** Long-acting growth hormone preparations – current status and future considerations. *J Clin Endocrinol Metab* 2020; 105: e2121–e2133.
 15. **Luo X, Hou L, Liang L, et al.** Long-acting PEGylated recombinant human growth hormone (Jintrolong) for children with growth hormone deficiency: phase II and phase III multicenter, randomized studies. *Eur J Endocrinol* 2017; 177: 195–205.
 16. **Thornton PS, Maniatis AK, Aghajanova E, et al.** Weekly lonapegsomatropin in treatment naïve children with growth hormone deficiency: the phase 3 height trial. *J Clin Endocrinol Metab* 2021; 106: 3184–3195.
 17. **Thygesen P, Andersen HS, Behrens C, et al.** Nonclinical pharmacokinetic and pharmacodynamic characterisation of somapacitan: A reversible non-covalent albumin-binding growth hormone. *Growth Horm IGF Res* 2017; 35: 8–16.
 18. **Fisher DM, Rosenfeld RG, Jaron-Mendelson M, et al.** Pharmacokinetic and pharmacodynamic modeling of MOD-4023, a long-acting human growth hormone, in growth hormone deficiency children. *Horm Res Paediatr* 2017; 87: 324–332.
 19. **Zelinska N, Iotova V, Skorodok J, et al.** Long-acting C-terminal peptide-modified hGH (MOD-4023): Results of a safety and dose-finding study in GHD children. *J Clin Endocrinol Metab* 2017; 102: 1578–1587.
 20. **Sävendahl L, Battelino T, Brod M, et al.** Once weekly somapacitan vs daily GH in children with GH deficiency: results from a randomized phase 2 trial. *J Clin Endocrinol Metab* 2020; 105: e1847–e1861.
 21. **Allen DB, Merchant N, Miller BS, et al.** Evolution and future of growth plate therapeutics. *Horm Res Paediatr* 2021; 94: 319–332.
 22. **Maniatis AK, Carakushansky M, Galcheva S, et al.** Treatment burden of weekly somatrogen vs daily genotropin in children with growth hormone deficiency: a randomized study. *J Endocr Soc* 2022; in press.

5.7. Dospělá výška dětí, které se narodily malé na svůj gestační věk (SGA), s malou výškou v dětství (SGA-SS). Výsledky léčby růstovým hormonem z dat české národní databáze REPAR

Toni L, Kodytková A, Plachý L, et al. Dospělá výška dětí, které se narodily malé na svůj gestační věk (SGA), s malou výškou v dětství (SGA-SS). Výsledky léčby růstovým hormonem z dat české národní databáze REPAR. Čes-slov Pediat 2023; 78 (S3): 22-29.

Následující analýza prezentuje výsledky léčby růstovým hormonem u dětí SGA-SS z dat české národní databáze REPAR. Z celkem 1502 dětí SGA-SS, zaznamenaných v České národní databázi růstového hormonu (REPAR), dokončilo léčbu a dosáhlo téměř finální tělesné výšky 397 dětí (221 chlapců). Léčba růstovým hormonem byla zahájena u chlapců ve středním věku 8,5 roku (medián; rozmezí: 3,2–15,0) a u dívek ve středním věku 7,3 roku (rozmezí: 3,9–13,5). Průměrné výškové skóre směrodatné odchylky (ht-SDS) při začátku léčby činilo $-3,21$ (SD: 0,91). U chlapců léčba skončila ve středním věku 16,2 roku (medián; rozmezí: 14,0–18,7 roku) a u dívek ve věku 14,3 roku (rozmezí: 12,4–17,3).

Léčba vedla k průměrnému nárůstu ht-SDS o 1,59 a (téměř) finální výška dosáhla ht-SDS $-1,62$; SD: 0,97; $p < 0,0001$ ve srovnání s výškou před léčbou). Po ukončení léčby tak většina pacientů dosáhla výšky nad -2 SDS, což odpovídá běžné hodnotě populace. Po korekci na ht-SDS ve věku 18 let tato výška odpovídá ht-SDS $-2,30$ (SD: 1,09; $p < 0,0001$ ve srovnání s výškou před léčbou). Dokonce i po této korekci, která mírně snižuje efekt léčby, byla léčba růstovým hormonem úspěšná a průměrně vedla ke zlepšení o 0,91 ht-SDS.

Analýza dat z databáze REPAR potvrzuje účinnost léčby růstovým hormonem u dětí SGA-SS a potenciál významného zlepšení tělesné výšky v dospělosti.

PŮVODNÍ PRÁCE

Dospělá výška dětí, které se narodily malé na svůj gestační věk (SGA), s malou výškou v dětství (SGA-SS). Výsledky léčby růstovým hormonem z dat české národní databáze REPAR

Adult height in children born small for gestational age (SGA) with persistent short stature (SGA-SS). Growth hormone treatment outcomes from data of the Czech nationwide REPAR database

Ledjona Toni^{#1}, Aneta Kodytková^{#1}, Lukáš Plachý¹, Barbora Jírová¹, Irena Aldhoon Hainerová², Darina Aleksijević³, Jana Černá⁴, Marcela Dvořáková⁵, Eva El-Lababidi², Božena Kalvachová⁵, Kamila Kocourková⁶, Ivana Kotvalová⁷, Olga Magnová⁸, Dana Novotná⁸, Barbora Obermannová¹, Renata Pomahačová⁹, Štěpánka Průhová¹, Ondřej Souček¹, Jiří Strnadel⁴, Lucie Šíchová¹⁰, Jaroslav Škvor¹⁰, Marta Šnajderová¹, Zdeněk Šumník¹, Jiřina Zapletalová³, Jiří Šilar¹¹, Stanislava Koloušková¹, Jan Lebl¹

¹Pediatrická klinika, 2. lékařská fakulta, Univerzita Karlova a Fakultní nemocnice v Motole, Praha

²Klinika dětí a dorostu, 3. lékařská fakulta, Univerzita Karlova a Fakultní nemocnice Královské Vinohrady, Praha

³Dětská klinika, Lékařská fakulta, Univerzita Palackého a Fakultní nemocnice Olomouc

⁴Klinika dětského lékařství, Lékařská fakulta, Ostravská univerzita a Fakultní nemocnice Ostrava

⁵Endokrinologický ústav, Praha

⁶Dětské oddělení, Nemocnice České Budějovice

⁷Dětská klinika, Lékařská fakulta, Univerzita Karlova a Fakultní nemocnice Hradec Králové

⁸Pediatrická klinika, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita a Fakultní nemocnice Brno

⁹Dětská klinika, Lékařská fakulta, Univerzita Karlova a Fakultní nemocnice Plzeň

¹⁰Dětská klinika, Masarykova nemocnice, Krajská zdravotní, a. s., Ústí nad Labem

¹¹Institut biostatistiky a analýz, s. r. o., Brno

[#]tyto dvě autorky přispěly ke vzniku článku stejným dílem
Podpořeno grantem AZV NU22J-07-00014.

SOUHRN

Toni L, Kodytková A, Plachý L, Jírová B, Aldhoon Hainerová I, Aleksijević D, Černá J, Dvořáková M, El-Lababidi E, Kalvachová B, Kocourková K, Kotvalová I, Magnová O, Novotná D, Obermannová B, Pomahačová R, Průhová Š, Souček O, Strnadel J, Šíchová L, Škvor J, Šnajderová M, Šumník Z, Zapletalová J, Šilar J, Koloušková S, Lebl J. Dospělá výška dětí, které se narodily malé na svůj gestační věk (SGA), s malou výškou v dětství (SGA-SS). Výsledky léčby růstovým hormonem z dat české národní databáze REPAR

Přibližně u 10 % dětí, které se narodily malé na svůj gestační věk (SGA; small for gestational age) s porodní hmotností a/nebo délkou nižší než -2 SD, nedojde po narození k růstovému výšvihu. Tyto děti zůstávají malé po celé dětství (s výškovým skóre směřovatně odchytky [ht-SDS] pod $-2,5$ SDS) a skončí jako malí dospělí. Označujeme je jako SGA-SS (small for gestational age with short stature). Evropská léková agentura schválila již v roce 2003 SGA-SS jako indikaci pro léčbu růstovým hormonem.

Z 1502 dětí SGA-SS evidovaných v české národní databázi příjemců růstového hormonu REPAR již 397 dětí (221 chlapců) ukončilo růst a dosáhlo téměř finální dospělé tělesné výšky. Léčba růstovým hormonem v dávce 0,034 mg/kg/den (medián) byla zahájena u chlapců ve věku 8,5 roku (medián; P5-95: 3,2–15,0), u dívek ve věku 7,3 roku (3,9–13,5). Průměr ht-SDS při zahájení léčby byl $-3,21$ (SD: 0,91). Léčba byla ukončena u chlapců ve věku 16,2 roku (medián; P5-95: 14,0–18,7 roku), u dívek ve věku 14,3 roku (12,4–17,3).

Léčba vedla do okamžiku ukončení léčby k průměrnému přírůstku ht-SDS o 1,59 a k dosažení téměř dospělé výšky (near-final height) ht-SDS $-1,62$ (SD: 0,97; $p < 0,0001$ proti výšce před léčbou). Při ukončení léčby tedy většina pacientů dosáhla výšky nad -2 SDS, v rozmezí hodnot běžné populace. Po adjustaci na ht-SDS v 18 letech věku tato výška odpovídá ht-SDS $-2,30$ (SD: 1,09; $p < 0,0001$ proti výšce před léčbou). I po této adjustaci, která efekt léčby mírně podhodnocuje, byla léčba růstovým hormonem úspěšná a vedla ke zlepšení v průměru o 0,91 ht-SDS.

Výsledky analýzy z databáze REPAR prokazují u dětí SGA-SS účinnost léčby růstovým hormonem a její potenciál významně zlepšit dospělou tělesnou výšku.

Klíčová slova: small-for-gestational-age, SGA-SS, růstový hormon, dospělá výška, adjustovaná finální výška

SUMMARY

Toni L, Kodytková A, Plachý L, Jírová B, Aldhoon Hainerová I, Aleksijević D, Černá J, Dvořáková M, El-Lababidi E, Kalvachová B, Kocourková K, Kotvalová I, Magnová O, Novotná D, Obermannová B, Pomahačová R, Průhová Š, Souček O, Strnadel J, Šíchová L, Škvor J, Šnajderová M, Šumník Z, Zapletalová J, Šilar J, Koloušková S, Lebl J. Adult height in children born small for gestational age (SGA) with persistent short stature (SGA-SS). Growth hormone treatment outcomes from data of the Czech nationwide REPAR database

Of children born small for gestational age (SGA) with birth weight and/or birth length below -2 SD, about 10% fail to catch-up after birth. These children remain short over childhood (with height standard deviation score [ht-SDS] below -2.5 SDS) and end up as short adults. They are assigned as SGA-SS (small for gestational age with short stature). European Medicine Agency approved growth hormone therapy in SGA-SS already in 2003.

Out of 1502 SGA-SS children that are registered in the Czech national database of growth hormone recipients REPAR, 397 children (221 boys) already completed growth and achieved near-final height. Growth hormone therapy (median dose 0.034 mg/kg/day) was initiated at age 8.5 years in boys (median; P5-95: 3.2-15.0) and 7.3 years in girls (3.9-13.5). The mean ht-SDS at treatment initiation was -3.21 (SD: 0.91). Treatment was terminated at age 16.2 years in boys (median; P5-95: 14.0-18.7) and 14.3 years in girls (12.4-17.3).

By treatment termination, the patients have had gained 1.59 ht-SDS (mean) and have achieved near-final height -1.62 ht-SDS (SD: 0.97; $p < 0.0001$ if compared to pre-treatment). Thus, majority of patients exceeded -2 SDS at treatment completion and achieved height within normal limits. After adjusting for ht-SDS at age 18 years, their height corresponded to ht-SDS -2.30 (SD: 1.09; $p < 0.0001$ if compared to pre-treatment). Growth hormone therapy was successful even after this adjustment that mildly underestimates the treatment effect, and led to mean height increase of 0.91 ht-SDS.

Analysis results of the REPAR database confirm efficacy of growth hormone therapy in SGA-SS children and its potential to significantly improve the adult height.

Key words: small-for-gestational-age, SGA-SS, growth hormone, adult height, adjusted final height

Korespondenční adresa:

MUDr. Ledjona Toni
Pediatrická klinika UK 2.LF a FN v Motole
V Úvalu 84
150 06 Praha 5
ledjonatoni@gmail.com

Světová zdravotnická organizace (WHO) definuje nízkou porodní hmotnost jako hmotnost při narození pod 2500 g.⁽¹⁾ Tato definice zahrnuje nedonošené děti, které většinou mají přiměřenou porodní hmotnost a délku vzhledem ke gestačnímu věku, a vedle nich i děti narozené v očekávaném termínu, ale s malou velikostí. Pojem „malý na svůj gestační věk“ (small for gestational age; SGA) se používá pro novorozence, jejichž porodní hmotnost a/nebo délka je pod normou pro daný gestační věk.

Přiměřená porodní hmotnost a délka jsou důležitým ukazatelem dobrého zdravotního stavu fetu i novorozence. Navíc to jistě míry predikují budoucí zdraví v dospělosti. Postupný nárůst porodní hmotnosti a délky a paralelní pokles novorozenecké úmrtnosti jsou průvodním jevem stoupající socioekonomické úrovně určité země. V neonatologii se za kritérium normality považuje minimálně 10. percentil porodní hmotnosti a délky pro daný gestační věk. Při použití tohoto kritéria se v průměru 16 % dětí celosvětově rodí SGA. Tento podíl kolísá od 7 % ve vyspělých zemích až po 41,5 % v jižní Asii.⁽²⁾

Poradní skupina dětských endokrinologů definovala v roce 2001 pojem SGA jako porodní hmotnost a/nebo porodní délku nižší než -2 směrodatné odchylky od průměru pro daný gestační věk v porovnání s referenční populací.^(3,4) Takové děti představují ve vyspělých zemích 3,1–5,5 % všech novorozenců. Tato hranice byla zvolena proto, že definuje děti ohrožené závažnějšími zdravotními riziky.^(5,6)

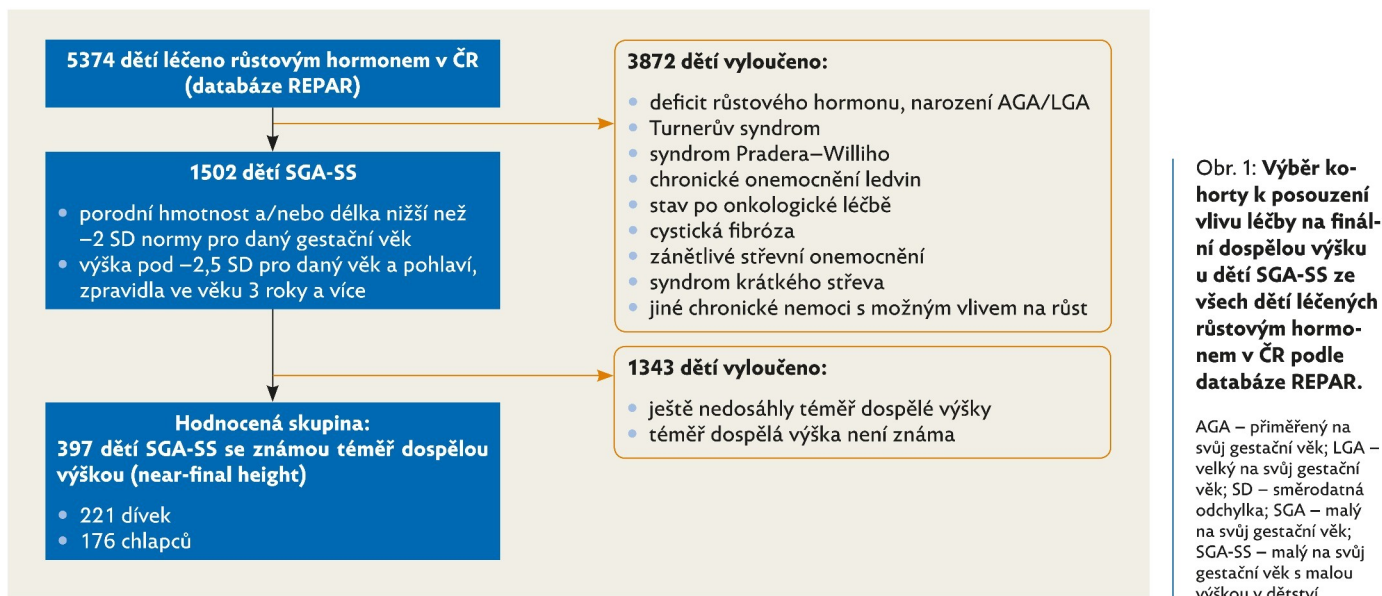
Příčiny SGA jsou vícečetné, exogenní i endogenní. Globální příčinou SGA je nižší socioekonomická úroveň dané země, oblasti, komunity či rodiny. K exogenním příčinám počítáme i další faktory prostředí, například toxiny nebo

vysokou nadmořskou výšku. Mezi maternální faktory řadíme preeklampsii, anomálie dělohy, nízký BMI, kouření či abúzus drog. Placentární příčiny zahrnují snížení krevního průtoku placentou, anomálie, hypoplazie, infarkty či předčasné odlučování placenty. K endogenním (fetálním) příčinám SGA patří intrauterinní infekce, chromozomální aberace a stále narůstající výčet monogenně podmíněných poruch nebo poruch genové exprese.

Přes tento obsáhlý výčet při běžném posouzení u významné části dětí důvod nižší porodní hmotnosti a/nebo délky neurčíme. Podíl nejasných příčin nižší porodní délky a/nebo hmotnosti se pohybuje kolem 40 %.⁽⁷⁾

U větší části dětí narozených SGA dochází ke spontánnímu růstovému výšvihu (catch-up růstu). Projeví se již během prvních šesti měsíců života a vyrovnávání tělesné délky zpravidla pokračuje do druhých narozenin. Jen u menší části těchto dětí se výšková pozice v percentilových grafech zlepšuje až do 4. roku věku – zejména u některých předčasně narozených dětí.^(8,9) Catch-up růst je v individuálním případě obtížné predikovat – s výjimkou dětí, u kterých brzy po narození diagnostikujeme známou poruchu s jasně chybějícím catch-up růstem, například syndrom Silvera–Russella. Nedávno publikovaná studie u monozygotních dvojčat s diskordantním prenatálním růstem prokázala, že na postnatální catch-up růst mají vliv nejen genetické faktory, ale i intrauterinní prostředí – tedy klasický epigenetický faktor.⁽¹⁰⁾

Přetrvávající malá tělesná výška je pro děti narozené SGA častou a významnou komplikací. Ze sledování velkých skupin dětí víme, že přibližně u 10 % SGA dětí k růstovému výšvihu nedojde. Takové děti se označují SGA-SS (SGA-short stature). Jde svojí podstatou o nejzávažnější formu růstové



poruchy, protože postihuje obě fáze tělesného růstu – prenatální i postnatální. Pokud budou tyto děti ponechány přirozenému vývoji, budou mít velmi pravděpodobně abnormálně nízkou finální dospělou výšku.

Evropská léková agentura (EMA, tehdy EMEA) schválila v roce 2003 indikaci léčby růstovým hormonem pro děti SGA-SS.⁽⁸⁾ Ve stejném roce jsme začali růstový hormon podávat v této indikaci i v České republice.⁽¹¹⁾ Podle analýzy publikované v roce 2020 představuje tato indikace v České republice podíl cca 32 % ze všech dětí aktuálně léčených růstovým hormonem.⁽¹²⁾

Krátkodobou i dlouhodobou účinnost růstového hormonu u těchto dětí dokumentovaly klinické studie, které předcházely schválení indikace,^(13–15) stejně jako řada následných observačních studií.

Od zahájení rutinní léčby růstovým hormonem u dětí SGA-SS uběhlo 20 let. Díky tomu lze posoudit početné kohorty dětí, které dostávaly růstový hormon v běžném režimu, ukončily růst a dosáhly dospělé finální výšky.^(16,17) Právě v tomto novém kontextu se ukazuje, že přes celkový příznivý efekt existuje v odpovědi na léčbu významná interindividuální variabilita. Nepochybně souvisí s různorodou etiologií stavu SGA-SS. Právě podrobnější zkoumání větších kohort dětí léčených až do dosažení dospělé výšky může napovědět, které faktory o úspěchu léčby rozhodují. Posouzení očekávané odpovědi na léčbu by se tak v budoucnu mohlo stát součástí úvodního posouzení dítěte, které přichází do ordinace dětského endokrinologa pod klinickým obrazem SGA-SS.

Od roku 2014 jsou údaje o dětech léčených růstovým hormonem v České republice soustředěny v celonárodní databázi REPAR, a to včetně retrospektivních dat o léčbě jednotlivých dětí. Do této databáze byla navíc integrována data o sledování pacientů v předchozích letech v databázích KIGS, NordiNet, GeNeSIS a Patro.⁽¹²⁾ Databáze REPAR tedy obsahuje údaje o převážné většině dětských pacientů, kteří

dostávali růstový hormon v České republice v posledních 20 letech, včetně dětí SGA-SS.

Cílem této studie bylo zhodnotit kohortu dětí SGA-SS, u kterých již byla ukončena léčba růstovým hormonem a které dosáhly finální dospělé výšky.

PACIENTI A METODIKA

K 13. 3. 2023 obsahovala česká národní databáze REPAR údaje o 5374 dětech léčených růstovým hormonem. Léčba dětí probíhala v 10 centrech v celé České republice. Z této kohorty dostávalo 1502 dětí růstový hormon v indikační skupině „malé na svůj gestační věk s malou výškou v dětství“ (SGA-SS).

Tyto děti splnily obě indikační kritéria SGA-SS:

- (1) porodní hmotnost a/nebo délka nižší než -2 SD od průměru pro daný gestační věk a pohlaví⁽⁴⁾ a současně
- (2) aktuální výška nižší než $-2,5$ SD od průměru pro daný věk a pohlaví, zpravidla ve věku 3 roky a více.⁽⁸⁾ Výjimkou z kritéria věku mohly být prokázány zdravotní poruchy s progresivní růstovou retardací, u kterých nedochází ke spontánnímu růstovému výšvihu – např. syndrom Silvera–Russella.⁽¹⁹⁾

Z analýzy byly vyloučeny děti s poruchou růstu po onkologické léčbě, děti s chronickým onemocněním ledvin, dívky s Turnerovým syndromem, děti se syndromem Pradera–Williho a děti s jiným chronickým onemocněním s možným vlivem na tělesný růst (cystická fibróza, zánětlivé střevní onemocnění, syndrom krátkého střeva a další). U těchto dětí mohou do tělesného růstu zasahovat další interferující faktory.

U 397 pacientů (221 chlapců, 176 dívek) ze skupiny 1502 dětí byl již k dispozici údaj o téměř finální dospělé výšce (near-final height; obr. 1). Téměř finální dospělá výška byla definována jako výška jedince s plnou pohlavní zralostí (u chlapců stadium P5 G5, u dívek stav po menarché)

a současně s růstovou rychlostí pod 2 cm za rok (přepočítáno z časového úseku nejméně 6 měsíců, při měření v ambulanci dětského endokrinologa s využitím stadiometru upevněného na stěně).

Výchozí doporučená dávka růstového hormonu pro tuto indikační skupinu je 0,033 mg/kg v každodenní injekci, která se podává doma večer před spaním s.c.⁽⁸⁾ Tato dávka se může v ojedinělých odůvodněných případech přechodně poněkud lišit.

Ke statistickému zhodnocení byl použit jednovýběrový t-test, nepárový t-test s Welchovou korekcí, Wilcoxonův znaménkový test a χ^2 test.

VÝSLEDKY

Perinatální údaje

Ve 37.–42. gestačním týdnu se narodilo 333 dětí (84 %), před 37. gestačním týdnem 64 dětí (16 %).

173 dětí (44 %) mělo při narození délku i hmotnost nižší než -2 SD pro daný gestační týden; 169 dětí (43 %) mělo pouze nižší porodní délku a 55 dětí (14 %) pouze nižší porodní hmotnost. U tří dětí nebyl známý údaj o porodní délce; tyto děti měly porodní hmotnost nižší než -2 SD.

Snižená porodní délka má tedy významně vyšší prediktivní hodnotu pro pokračující růstovou retardaci (chybějící catch-up růst) než snížená porodní hmotnost, a je tedy častěji indikací pro budoucí zařazení do léčby růstovým hormonem v indikaci SGA-SS ($p < 0,001$).

Rodičovská výška

Oba rodiče v pásmu normální výšky mělo 258 dětí (65 %). 111 dětí (28 %) mělo jednoho rodiče s výškou pod -2 skóre směrodatné odchylky výšky (ht-SDS), 28 dětí (7 %) oba rodiče s výškou pod -2 ht-SDS. Více než třetina dětí tedy měla alespoň jednoho rodiče v pásmu nízké dospělé výšky.

Medián výšky otců dětí byl 174 cm (P5-95: 164–189 cm), což odpovídá mediánu ht-SDS $-0,78$ (P5-95: $-2,30$ až $+1,46$) ve srovnání se střední výškou českých dospělých mužů.

Medián výšky matek dětí byl 160 cm (P5-95: 148–170 cm), což odpovídá mediánu ht-SDS $-1,05$ (P5-95: $-2,98$ až $+0,57$) ve srovnání se střední výškou českých dospělých žen.

Jak otcové, tak matky dětí ze skupiny SGA-SS mají nižší tělesnou výšku ve srovnání s běžnou českou populací ($p < 0,001$). Výška matek je snížena více než výška otců ($p < 0,01$). Vzhledem k tomu, že genetický vliv obou rodičů na výšku dítěte se považuje za shodný, naznačuje tato skutečnost přidatný vliv intrauterinního prostředí na růst plodu – nižší výška maminek vytváří předpoklad pro menší perinatální rozměry novorozence, a to nad rámec dědičné vlohy.

Charakteristika dětí při zahájení a při ukončení léčby

Věk při zahájení a ukončení léčby a při nástupu puberty u 397 dětí se známou dospělou výškou shrnuje tab. 1.

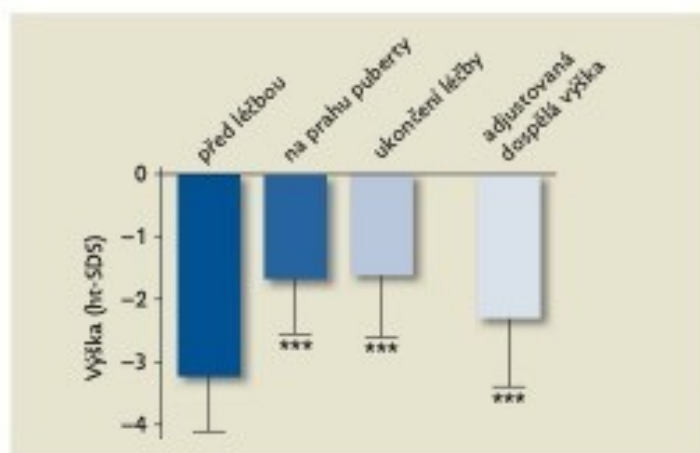
Tab. 1: Věk chlapců a dívek SGA-SS při zahájení léčby růstovým hormonem, při prvním záznamu o nástupu puberty a při skončení léčby růstovým hormonem

	Chlapci (n = 221)	Dívky (n = 176)
Věk při zahájení léčby (roky)		
Průměr (SD)	8,8 (3,8)	7,7 (3,5)
Medián (5%; 95%)	8,5 (3,2; 15,0)	7,3 (3,0; 13,5)
Věk při nástupu puberty (roky)		
Průměr (SD)	11,9 (1,7)	11,0 (1,7)
Medián (5%; 95%)	11,6 (9,6; 15,0)	11,0 (8,5-14,1)
Věk při ukončení léčby (roky)		
Průměr (SD)	16,2 (1,7)	14,5 (1,5)
Medián (5%; 95%)	16,2 (14,0; 18,7)	14,3 (12,4; 17,3)

SD – směrodatná odchylka

Při zahájení léčby měly děti výraznou růstovou poruchu. Průměrné ht-SDS při zahájení léčby bylo $-3,21$ (SD: 0,91).

Růstový hormon byl podáván v reálné dávce 0,034 mg/kg/den (medián). Do začátku pubertálního vývoje stoupla výška na ht-SDS $-1,64$ (SD: 0,93; $p < 0,0001$ proti výšce před léčbou) a v podobné úrovni setrvala do ukončení léčby (ht-SDS $-1,62$; SD: 0,97; $p < 0,0001$ proti výšce před léčbou). Do okamžiku ukončení léčby tedy pacienti získali v průměru 1,59 ht-SDS a většina dosáhla výšky v rozmezí hodnot běžné populace, tedy nad -2 SDS (obr. 2). Vzhledem k poklesu růstové rychlosti pod 2 cm za rok ze dvou měření v odstupe nejméně 6 měsíců tuto výšku označujeme jako téměř dospělou výšku (near-final height). Lze očekávat, že v průběhu několika dalších let se může tělesná výška ještě mírně zvýšit, avšak zpravidla o méně než 2 cm.



Obr. 2: Výška dětí SGA-SS (vyjádřená jako skóre směrodatné odchylky tělesné výšky, ht-SDS) před zahájením léčby růstovým hormonem, na prahu puberty a po jejím skončení. Poslední sloupec ukazuje adjustovanou dospělou výšku – výšku při ukončení léčby ve vztahu k normativní hodnotě pro věk 18 let.

*** $p < 0,0001$ vzhledem k výšce před léčbou

Tab. 2: Průměrné zlepšení skóre směrodatné odchylky tělesné výšky (Δ ht-SDS) mezi stavem při zahájení léčby a finální výškou na prahu dospělosti po léčbě růstovým hormonem u dětí narozených SGA s malou výškou v dětství (SGA-SS). Přehled dostupných publikovaných studií.

Studie	Počet dětí	Dávka růstového hormonu (μ g/kg/den)	Benefit léčby růstovým hormonem (Δ ht-SDS mezi zahájením léčby a finální výškou; průměr)
Ranke et al. ⁽²³⁾	613	40	0,7
Van Pareren et al. ⁽²⁴⁾	17 20	33 66	1,8 2,1
Carel et al. ⁽²⁵⁾	91	67	0,6
Dahlgren et al. ⁽²⁶⁾	77	33	0,8
Van Dijk et al. ⁽²⁷⁾	37	33–66	1,5
Lem et al. ⁽²⁸⁾	65 (růstový hormon + GnRHa) 121 (jen růstový hormon)	33–67 33–67	1,1 (dívky); 0,7 (chlapci) 1,3 (dívky); 1,6 (chlapci)
Thomas et al. ⁽²⁹⁾	27	45	1,1
Adler et al. ⁽¹⁷⁾	132 (jen růstový hormon) 120 (růstový hormon + GnRHa)	65 65	0,8 0,8
Ruiz et al. ⁽¹⁶⁾	28 chlapců 33 dívek	35	0,99 1,49
Naše studie	397	34	1,59 (near-final height) 0,91 (výška adjustovaná na věk 18 let)

GnRHa – analoga gonadotropin-releasing hormonu k odložení pubertálního vývoje

Normativní hodnoty tělesné výšky se od okamžiku ukončení růstu jednotlivých pacientů do dosažení plné dospělé hodnoty v 18 letech ještě mění. Proto jsme v zájmu objektivnosti zavedli ukazatel „adjustované ht-SDS při ukončení léčby na 18 let věku“ – tedy vztahujeme výšku při ukončení léčby k normě pro věk 18 let. Po této adjustaci dosahují pacienti na prahu dospělosti ht-SDS $-2,30$ (SD: 1,09; $p < 0,0001$ proti výšce před léčbou). I po této adjustaci, která efekt léčby mírně podhodnocuje, byla léčba růstovým hormonem úspěšná a vedla ke zlepšení ht-SDS v průměru o 0,91 ht-SDS.

Výška dětí při zahájení léčby, při nástupu pubertálního vývoje ani při ukončení léčby se nelišila mezi dětmi narozenými před 37. gestačním týdnem nebo později. Gestační stáří o efektu léčby nerozhoduje.

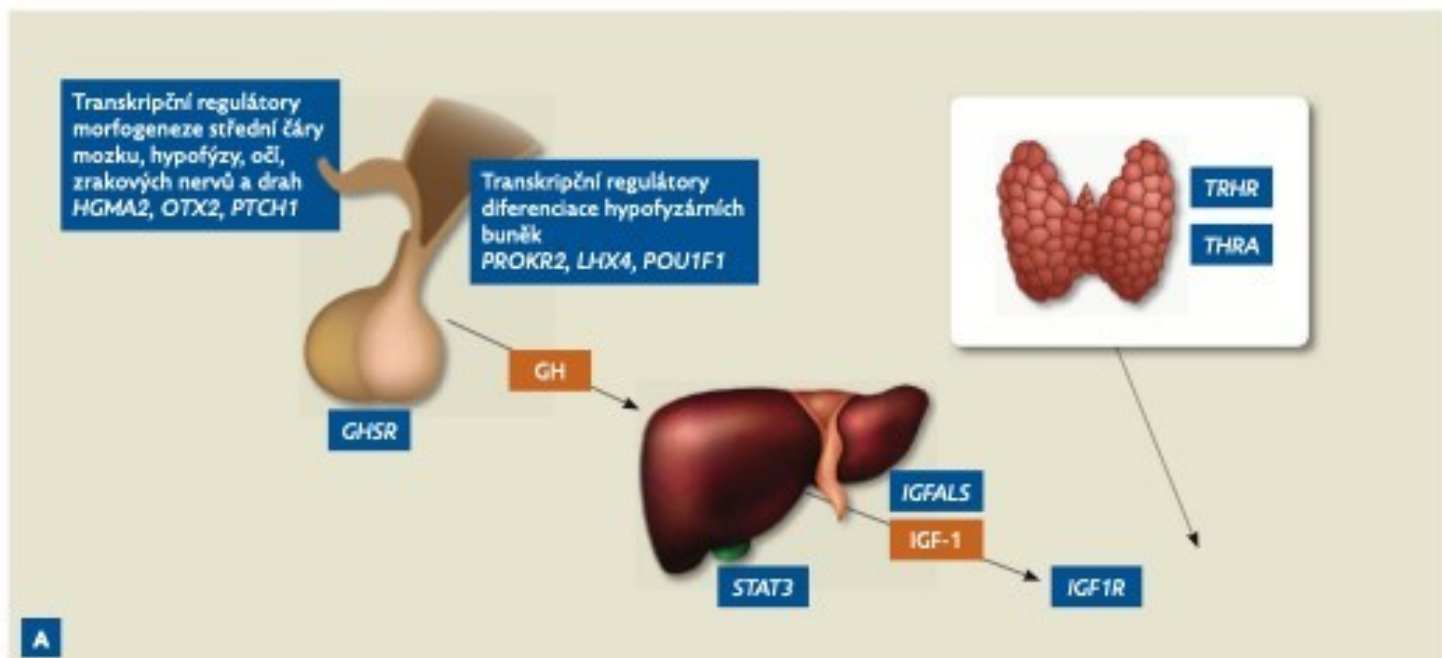
DISKUSE

Děti narozené malé na svůj gestační věk (SGA) čeká během jejich života několik kritických fází. V útlém věku se může, ale nemusí rozvinout růstový výšvih (catch-up růst), který vyrovnává nebo zmírňuje růstový handicap; v pozdějším životě mohou být problémem nízká tělesná výška, psychosociální strádání a jednotlivé složky metabolického syndromu.^(1,20) U těch dětí narozených SGA, u kterých nedošlo v prvních letech života k růstovému urychlení a které zůstávají malé, patří mezi doporučené postupy podávání růstového hormonu.^(8,21) Také vzhledem k jejich metabolickému riziku je důležité sledovat, že léčba růstovým hormonem je účinná a bezpečná – a to nejen v klinických studiích, ale i v běžné klinické praxi.⁽²²⁾

Naše retrospektivní celonárodní analýza početné skupiny 397 těchto dětí, které již dosáhly své téměř finální výšky

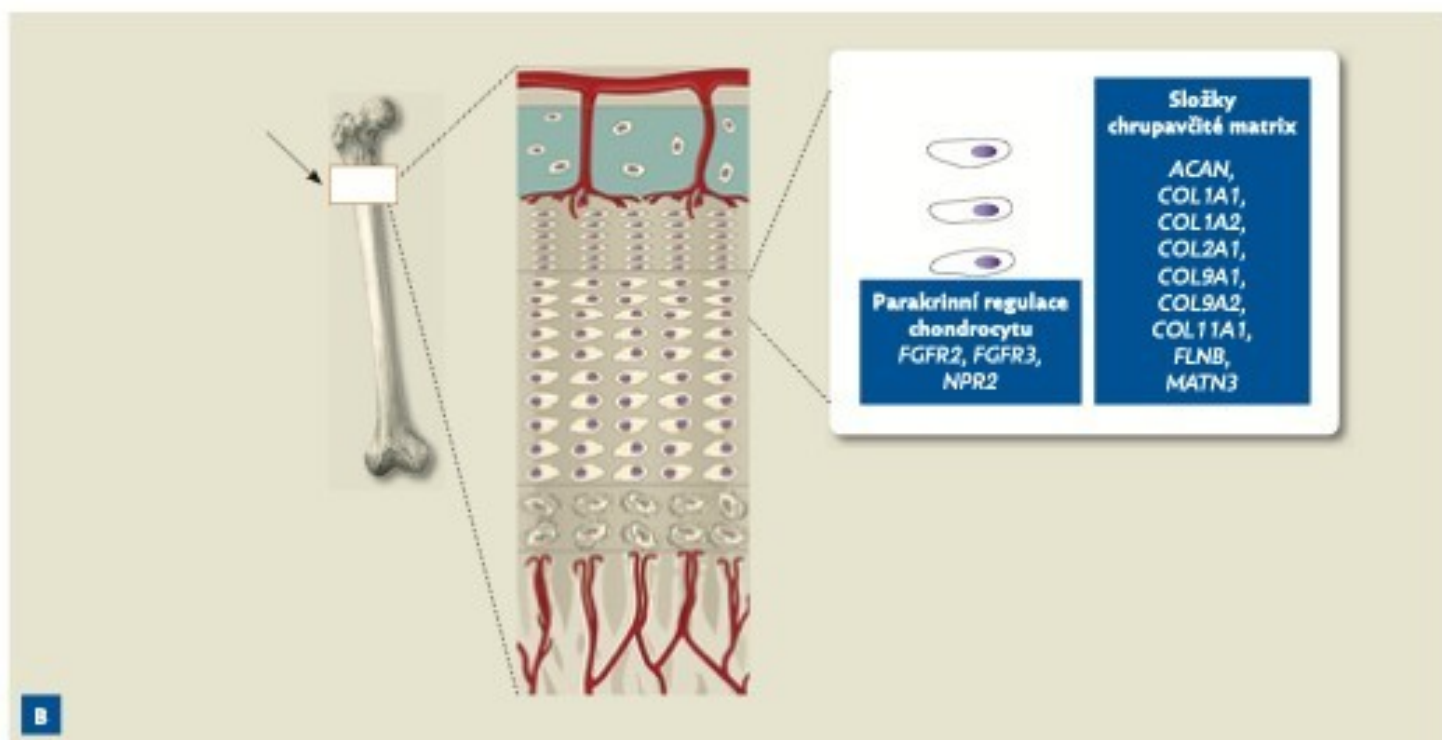
(near-final height), prokázala zlepšení skóre směrodatné odchylky tělesné výšky (ht-SDS) v průměru o 1,59. Pokud adjustujeme dosaženou téměř dospělou výšku na věk 18 let, došlo ke zlepšení ht-SDS o 0,91. Vzhledem k tomu, že jedna směrodatná odchylka tělesné výšky na prahu dospělosti představuje cca 7–8 cm, přispěla léčba ke zlepšení dospělé výšky v průměru o 11–13 cm do okamžiku dosažení téměř dospělé výšky a o 6–7 cm do dosažení dospělé výšky adjustované na věk 18 let (toto je pravděpodobně podhodnocený údaj). Významné části pacientů léčba umožnila prožívat dospělý život v normálním pásmu výšky, tj. nad -2 ht-SDS, nebo v jeho blízkosti. Tabulka 2 přináší srovnání výsledků jednotlivých publikovaných studií, které hodnotily finální dospělou výšku po léčbě u dětí narozených SGA. V některých souborech část dětí navíc dostávala analoga gonadotropin-releasing hormonu (GnRHa) k oddálení puberty. S výjimkou Rankeho studie, která vycházela z dat největší nadnárodní databáze KIGS, je naše studie nejpočetnější. Podle porovnání výsledků je pravděpodobné, že jednotliví autoři používali pro definici dospělé výšky nejednotnou metodologii a zpravidla není zřejmé, zda se uvedený údaj týká téměř dospělé výšky (near-final height) nebo výšky při ukončení léčby adjustované na věk 18 let. Při obou způsobech hodnocení patří naše výsledky mezi velmi úspěšné, zejména při zohlednění podávané dávky růstového hormonu, která respektovala doporučení EMA, a patřila tedy k nejnižším užívaným.

Mezi známé a opakovaně prokázané prediktory zlepšení tělesné výšky vlivem léčby u dětí SGA-SS patří dávka růstového hormonu, věk při zahájení léčby, opoždění kostního věku o více než 1 rok a v některých studiích také podávání analogů gonadotropin-releasing hormonu (GnRHa) k oddálení nástupu puberty, pokud je to potřebné



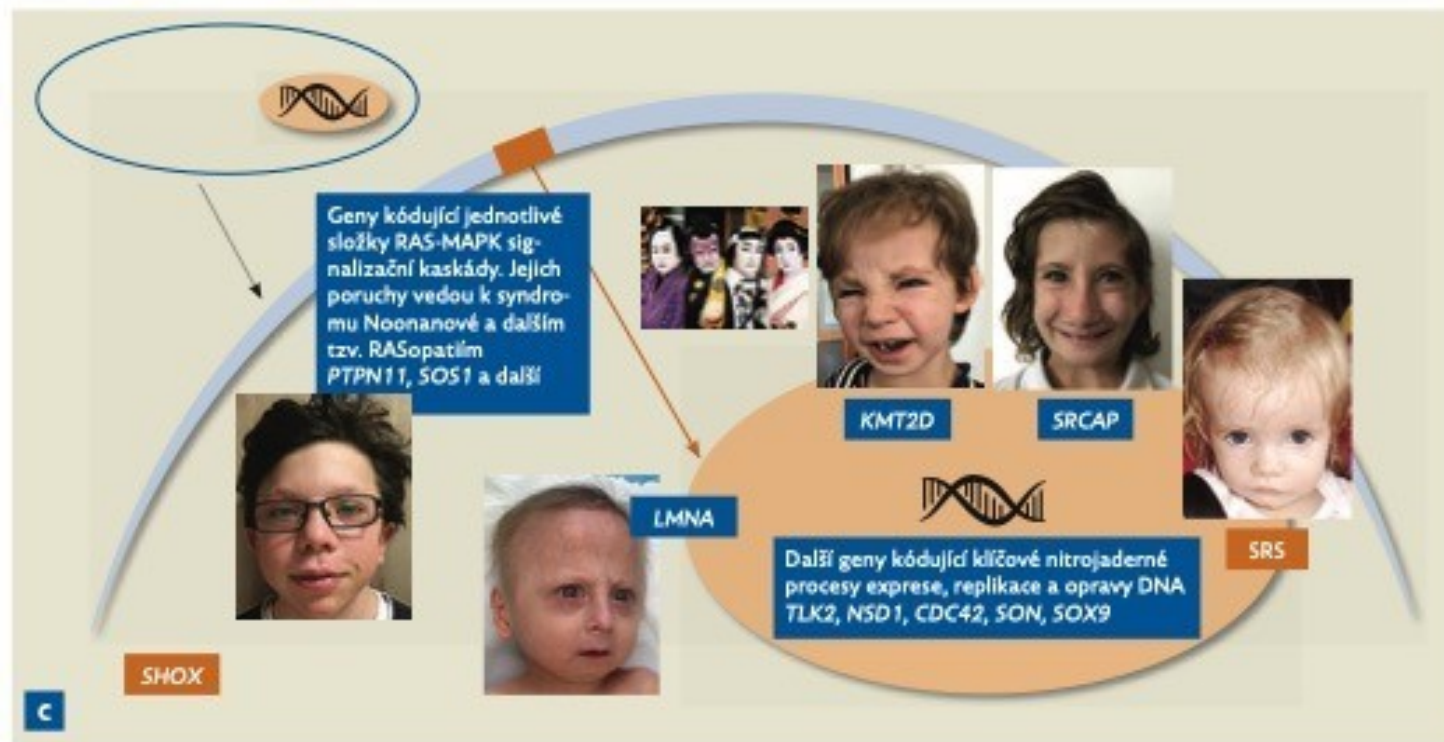
Obr. 3A: Genetická etiologie poruchy růstu u dětí, které se narodily malé na svůj gestační věk a u kterých přetrvávala malá výška v dětství (SGA-SS). Vliv genů spojených s osou růstový hormon – IGF-1 a s tyreoidální osou. Upraveno dle Toni et al.^[20] Kurzívou jsou uvedeny příklady kauzálních genů z téhož zdroje.

GH – růstový hormon; *GHSR* – gen kódující receptor pro ghrelin; IGF-1 – růstový faktor podobný inzulínu typ 1; *IGFALS* – gen kódující acidolabílní podjednotku; *IGF1R* – gen kódující receptor pro IGF-1; *STAT3* – gen kódující nitrobuňečnou signální molekulu *STAT3*; *THRA* – gen kódující typ A receptoru pro hormony štítné žlázy; *TRHR* – gen kódující receptor pro tyreotropin-releasing hormon



Obr. 3B: Genetická etiologie poruchy růstu u dětí, které se narodily malé na svůj gestační věk a u kterých přetrvávala malá výška v dětství (SGA-SS). Vliv genů spojených se strukturou a funkcí růstové chrupavky. Upraveno dle Toni et al.^[21] Kurzívou jsou uvedeny příklady kauzálních genů z téhož zdroje.

ACAN – gen kódující agrekan; *COL* – geny kódující jednotlivé typy kolagenu; *FGFR2*, *FGFR3* – geny kódující receptory pro fibroblastový růstový faktor; *FLNB* – gen kódující fibrin B; *MATN3* – gen kódující matrilin; *NPR2* – gen kódující receptor pro natriuretický peptid typu C



Obr. 3C: Genetická etiologie poruchy růstu u dětí, které se narodily malé na svůj gestační věk a u kterých přetrvávala malá výška v dětství (SGA-SS). Některé z poruch intracelulárních mechanismů – nitrobuňkové signalizace, nitrojaderných procesů nezbytných pro expresi, replikaci a opravy DNA a dalších. Děti s touto formou SGA-SS mají často tzv. syndromický malý vzrůst, proto jsou do schématu vázány vybrané fotografie typických faciálních fenotypů. Upraveno dle Toni et al.⁽²⁰⁾ Kurzívou jsou uvedeny příklady kauzálních genů z téhož zdroje. Fotografie jsou otištěny se souhlasem rodičů.

KMT2D – gen kódující metyltransferázu histonů, jehož patologické varianty narušují expresi DNA a vedou k obrazu syndromu kabuki (foto) – facies dětí připomíná make-up tradičního japonského divadla kabuki (foto); LMNA – gen kódující lamin, určité patologické varianty vedou ke klinickému obrazu Hutchinsonovy–Gilfordovy progerie (foto); SHOX – „short stature homeobox gene“, intracelulární transkripční faktor esenciální pro vývoj a růst skeletu; SRCAP – gen kódující chromatinový remodelační komplex, jehož patologické varianty narušují stabilitu DNA a vedou k obrazu Floating–Harbor syndromu (foto); SRS – syndrom Silvera–Russella (foto), imprintingová porucha s narušenou metylací genů a abnormální genovou expresí

a indikované.^(16,27,21,23–28) Přesto předchozí analýzy dokázaly vysvětlit jen menší část individuální variability odpovědi na léčbu.

Skupina dětí SGA-SS je etiopatogeneticky různorodá. Společně je jim pouze splnění indikačních kritérií z hlediska velikosti při narození a tělesné výšky při zahájení léčby, jde tedy o numericky definovaný stav. U některých dětí SGA-SS lze klinicky rozpoznat určitou diagnózu a následně ji laboratorně ověřit – například u části dětí se syndromem Silvera–Russella.⁽²⁹⁾ Teprve v posledních letech se s využitím metod sekvenování nové generace a panelů vybraných genů daří ve větší míře objasnit molekulárně genetickou podstatu SGA-SS.^(30,31) Díky publikovaným studiím víme, že až 40 % dětí SGA-SS má monogenně podmíněnou příčinu růstové poruchy nebo poruchu genové exprese. U většiny dětí nacházíme monoalelické, tedy autozomálně dominantní poruchy. Stav SGA-SS proto často koresponduje s familiárně malým vzrůstem a reakce na léčbu růstovým hormonem se liší podle výšky menšího z obou rodičů i podle toho, zda dítě mělo sníženou porodní délku, nebo jen sníženou porodní hmotnost. Tyto faktory jsou podrobněji diskutovány v následujícím článku, který se věnuje zejména pubertálnímu růstovému období u těchto dětí.⁽³²⁾ V neposlední řadě přispělo poznání genové podstaty

SGA-SS k přesnějšímu objasnění genetické regulace růstu (obr. 3A–C).

Naše observační studie má určitá omezení. Je obtížné zjistit skutečnou finální výšku pacientů léčených růstovým hormonem v indikační skupině SGA-SS. Jejich skutečná dospělá výška může být o jednotlivé centimetry vyšší než výška změřená při poslední návštěvě. Tito mladí lidé po skončení léčby zpravidla nemají motivaci přicházet ke kontrolnímu měření výšky v odstupech jednoho, dvou či více let a není v silách lékařů tuto situaci změnit. Observační studie byla multicentrická, jednotlivá centra pro léčení růstovým hormonem v České republice zadávala údaje o léčbě a jejich výsledcích do databáze REPAR autonomně. Ukázalo se ale, že všechna centra respektují doporučenou společnou metodiku léčby a jejího sledování, a validita všech dat byla tedy srovnatelná.

ZÁVĚR

Studie prokázala, že léčba růstovým hormonem u dětí SGA-SS je účinná, a navíc rozšířila spektrum parametrů, které výsledek léčení spoluovlivňují a které mohou být do značné míry spojeny s genetickou různorodostí této závažné formy růstové poruchy. |

LITERATURA

1. **Brundtland GH.** From the World Health Organization. Reducing risks to health, promoting healthy life. *JAMA* 2002; 288(16): 1974.
2. **Lee AC, Katz J, Blencowe H, et al.** National and regional estimates of term and preterm babies born small for gestational age in 138 low-income and middle-income countries in 2010. *Lancet Glob Health* 2013; 1: e26–e36
3. **Lee PA, Chernausk SD, Hokken-Koelega AC, Czernichow P; International Small for Gestational Age Advisory Board.** International Small for Gestational Age Advisory Board consensus development conference statement: management of short children born small for gestational age, April 24–October 1, 2001. *Pediatrics* 2003; 111(6 Pt 1): 1253–1261.
4. **Lawrence C, Fryer JG, Karlberg P, et al.** Modelling of reference values for size at birth. *Acta Paediatr Scand* 1989; Suppl 350: 55–69.
5. **Zeve D, Regelman MO, Holzman IR, Rapaport R.** Small at birth, but how small? The definition of SGA revisited. *Horm Res Paediatr* 2016; 86(5): 357–360.
6. **Xu H, Simonet F, Luo ZC.** Optimal birth weight percentile cut-offs in defining small- or large-for-gestational-age. *Acta Paediatr* 2010; 99(4): 550–555.
7. **Saenger P, Czernichow P, Hughes I, Reiter EO.** Small for gestational age: short stature and beyond. *Endocr Rev* 2007; 28: 219–251.
8. **Clayton PE, Cianfarani S, Czernichow P, et al.** Management of the child born small for gestational age through to adulthood: a consensus statement of the International Societies of Pediatric Endocrinology and the Growth Hormone Research Society. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92: 804–810.
9. **Pfäffle R, Knüpfer M, Göbert M, et al.** Growth patterns of children with short stature in adulthood according to auxological status and maturity at birth. *J Clin Endocrinol Metab* 2022; 107: 3320–3327
10. **Groene SG, Gremmen IJ, van Zwet EW, et al.** Fetal growth restriction inhibits childhood growth despite catch-up in discordant identical twins: an observational cohort study *Eur J Endocrinol* 2023; 189: 183–189.
11. **Lebl J, Koloušková S, Průhová Š, Zapletalová J.** Léčba růstovým hormonem – historie, současnost a budoucnost. *Farmakoter Revue* 2017; 2: 224–230.
12. **Kodytková A, Al Lababidi E, Čermáková I, et al.** Analýza dat z celostátního registru pacientů léčených růstovým hormonem REPAR. *Ces-Slov Pediat* 2020; 75: 205–212.
13. **Sas T, de Waal W, Mulder P, et al.** Growth hormone treatment in children with short stature born small for gestational age: 5-year results of a randomized, double-blind, dose-response trial. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 3064–70.
14. **Boguszewski M, Albertsson-Wikland K, Aronsson S, et al.** Growth hormone treatment of short children born small-for-gestational-age: Nordic Multicentre Trial. *Acta Paediatr* 1998; 87: 257–63.
15. **Karlberg J, Albertsson-Wikland K.** Growth in full-term small-for-gestational-age infants: from birth to final height. *Pediatr Res* 1995; 38: 733–739.
16. **Ruiz RA, Pérez AB, Leiva-Gea I, et al.** Factors influencing height gain in children born small for gestational age treated with recombinant growth hormone: what extent is puberty involved? *Ther Adv Endocrinol Metab* 2022; 13: 1–14.
17. **Adler E, Lambert AS, Bouvattier C, et al.** Determinants of final height in patients born small for gestational age treated with recombinant growth hormone. *Horm Res Paediatr* 2021; 94: 52–62
18. **Bláha P, Vignerová J, Riedlová J, et al.** VI. celostátní antropologický výzkum dětí a mládeže 2001. *Ces-Slov Pediat* 2003; 58: 766–770.
19. **Wakeling EL, Brioude F, Lokulo-Sodipe O, et al.** Diagnosis and management of Silver-Russell syndrome: first international consensus statement. *Nat Rev Endocrinol* 2017; 13: 105–124.
20. **Lebl J, Lebenthal Y, Koloušková S, et al.** Metabolic impact of growth hormone treatment in short children born small for gestational age. *Horm Res Paediatr* 2011; 76: 254–61.
21. **Hokken-Koelega ACS, van der Steen M, Boguszewski MCS, et al.** International Consensus Guideline on Small for Gestational Age: Etiology and management from infancy to early adulthood. *Endocr Rev* 2023; 44: 539–565.
22. **de Zegher F, Ong KK, Ibáñez L, Dunger DB.** Growth hormone therapy in short children born small for gestational age. *Horm Res* 2006; 65(Suppl 3): 145–52.
23. **Ranke MB, Lindberg A, Cowell CT, et al.** Prediction of response to growth hormone treatment in short children born small for gestational age: Analysis of data from KIGS (Pharmacia International Growth Database). *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 125–31.
24. **Van Pareden Y, Mulder P, Houdijk M, et al.** Adult height after long-term, continuous growth hormone (GH) treatment in short children born small for gestational age: results of a randomized, double-blind, dose-response GH trial. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 3584–90.
25. **Carel J-C, Chatelain P, Rochiccioli P, Chaussain J-L.** Improvement in adult height after growth hormone treatment in adolescents with short stature born small for gestational age: results of a randomized controlled study. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 1587–93.
26. **Dahlgren J, Wikland KA; Swedish Study Group for Growth Hormone Treatment.** Final height in short children born small for gestational age treated with growth hormone. *Pediatr Res* 2005; 57: 216–22.
27. **van Dijk M, Bannink EMN, van Pareden YK, et al.** Risk factors for diabetes mellitus type 2 and metabolic syndrome are comparable for previously growth hormone-treated young adults born small for gestational age (sga) and untreated short SGA controls. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92: 160–5.
28. **Lem AJ, van der Kaay DCM, de Ridder MAJ, et al.** Adult height in short children born SGA treated with growth hormone and gonadotropin releasing hormone analog: results of a randomized, dose-response GH trial. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97: 4096–105.
29. **Thomas M, Beckers D, Brachet C, et al.** Adult height after growth hormone treatment at pubertal onset in short adolescents born small for gestational age: results from a Belgian registry-based study. *Int J Endocrinol* 2018; 2018: 6421243.
30. **Li X, Yao R, Chang G, et al.** Clinical profiles and genetic spectra of 814 chinese children with short stature. *J Clin Endocrinol Metab* 2022; 107: 972–985.
31. **Toni L, Plachy L, Dusatkova P, et al.** The genetic landscape of children born small for gestational age with persistent short stature (SGA-SS). *Horm Res Paediatr* 2023. doi: 10.1159/000530521
32. **Kodytková A, Toni L, Plachý L, et al.** Prepubertální růst a pubertální růstový výšvih dětí, které se narodily malé na svůj gestační věk (SGA) s malou výškou v dětství (SGA-SS). Vliv léčby růstovým hormonem z dat české národní databáze REPAR. *Ces-Slov Pediat* 2023; 78(53): 530–36.

5.8. Pubertální růst dětí, které se narodily malé na svůj gestační věk (SGA), s malou výškou v dětství (SGA- SS). Výsledky léčby růstovým hormonem z dat české národní databáze REPAR.

Kodytková A, Toni L, Plachý L, et al. Dospělá výška dětí, které se narodily malé na svůj gestační věk (SGA), s malou výškou v dětství (SGA-SS). Výsledky léčby růstovým hormonem z dat české národní databáze REPAR. Čes-slov Pediat 2023; 78 (S3): 30-36.

Úspěch léčby růstovým hormonem a dosažení optimální dospělé výšky závisí jednak na růstu před nástupem puberty, jednak na intenzitě růstového spurtu během puberty. Pro skupinu 397 dětí (221 chlapců) z české databáze REPAR, které se narodily s nízkou porodní hmotností a/nebo délkou s perzistující malou výškou (SGA-SS) a dosáhly téměř dospělé výšky, jsme analyzovali vliv růstu před pubertou a během puberty na celkový výsledek léčby růstovým hormonem. Vedle toho jsme odděleně hodnotili děti podle výšky jejich rodičů (oba nad -2 SD výšky, jeden pod -2 SD výšky, oba pod -2 SD výšky) a podle porodních parametrů – nízké porodní hmotnosti, nízké porodní délky nebo kombinace obou.

Léčba růstovým hormonem přinesla průměrný nárůst ht-SDS o 1,59 do chvíle ukončení léčby, z toho 1,57 SD v prepubertálním období. Během puberty již ani při pokračující léčbě nedošlo k dalšímu zlepšení výšky. Po korekci na ht-SDS ve věku 18 let výška vzrostla o 0,91 ht-SDS při porovnání se stavem při zahájení léčby (všechny tři parametry $p < 0,0001$ ve srovnání s výškou před léčbou). Děti s oběma rodiči nad -2 SD výšky i ty, které měly sníženou porodní hmotnost, nikoliv délku, vykazaly výraznější nárůst.

I tyto analýzy z databáze REPAR potvrzují účinnost léčby růstovým hormonem u dětí SGA.SS. Klíčovým faktorem pro efekt léčby je růst před nástupem puberty, což zdůrazňuje důležitost pravidelného monitorování růstu dětí narozených SGA a zahájení léčby v raném dětství.

PŮVODNÍ PRÁCE

Pubertální růst dětí, které se narodily malé na svůj gestační věk (SGA), s malou výškou v dětství (SGA-SS). Výsledky léčby růstovým hormonem z dat české národní databáze REPAR

Pubertal growth in children born small for gestational age (SGA) with persistent short stature (SGA-SS). Growth hormone treatment outcomes from data of the Czech countywide REPAR database

Aneta Kodytková^{#1}, Ledjona Toni^{#1}, Lukáš Plachý¹, Barbora Jírová¹, Irena Aldhoon Hainerová², Darina Aleksijević³, Jana Černá⁴, Marcela Dvořáková⁵, Eva El-Lababidi², Božena Kalvachová⁵, Kamila Kocourková⁶, Ivana Kotvalová⁷, Olga Magnová⁸, Dana Novotná⁸, Barbora Obermannová¹, Renata Pomahačová⁹, Štěpánka Průhová¹, Ondřej Souček¹, Jiří Strnadel⁴, Lucie Šíchová¹⁰, Jaroslav Škvor¹⁰, Marta Šnajderová¹, Zdeněk Šumník¹, Jiřina Zapletalová³, Jiří Šilar¹¹, Stanislava Koloušková¹, Jan Lebl¹

¹Pediatrická klinika, 2. lékařská fakulta, Univerzita Karlova a Fakultní nemocnice v Motole, Praha

²Klinika dětí a dorostu, 3. lékařská fakulta, Univerzita Karlova a Fakultní nemocnice Královské Vinohrady, Praha

³Dětská klinika, Lékařská fakulta, Univerzita Palackého a Fakultní nemocnice Olomouc

⁴Klinika dětského lékařství, Lékařská fakulta, Ostravská univerzita a Fakultní nemocnice Ostrava

⁵Endokrinologický ústav, Praha

⁶Dětské oddělení, Nemocnice České Budějovice

⁷Dětská klinika, Lékařská fakulta, Univerzita Karlova a Fakultní nemocnice Hradec Králové

⁸Pediatrická klinika, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita a Fakultní nemocnice Brno

⁹Dětská klinika, Lékařská fakulta, Univerzita Karlova a Fakultní nemocnice Plzeň

¹⁰Dětská klinika, Masarykova nemocnice, Krajská zdravotní, a. s., Ústí nad Labem

¹¹Institut biostatistiky a analýz, s. r. o., Brno

SOUHRN

Kodytková A, Toni L, Plachý L, Jírová B, Aldhoon Hainerová I, Aleksijević D, Černá J, Dvořáková M, El-Lababidi E, Kalvachová B, Kocourková K, Kotvalová I, Magnová O, Novotná D, Obermannová B, Pomahačová R, Průhová Š, Souček O, Strnadel J, Šíchová L, Škvor J, Šnajderová M, Šumník Z, Zapletalová J, Šilar J, Koloušková S, Lebl J. Pubertální růst dětí, které se narodily malé na svůj gestační věk (SGA), s malou výškou v dětství (SGA-SS). Výsledky léčby růstovým hormonem z dat české národní databáze REPAR

O úspěchu léčby růstovým hormonem a dosažení optimální dospělé výšky rozhoduje jednak růst před zahájením puberty a jednak vydatnost pubertálního růstového výšvihu.

U kohorty 397 dětí (221 chlapců) z české národní databáze příjemců růstového hormonu REPAR, které se narodily malé na svůj gestační věk, měly malou výšku v dětství (SGA-SS) a již dosáhly své téměř dospělé výšky, jsme vyhodnotili vliv prepubertální a pubertální složky růstu na celkový efekt léčby růstovým hormonem. Odděleně jsme posoudili děti také podle výšky rodičů (oba nad -2 SD výšky, jeden pod -2 SD výšky, oba pod -2 SD výšky) a podle porodních parametrů – nízké porodní hmotnosti, nízké porodní délky či kombinace obojího.

Léčba růstovým hormonem vedla do okamžiku ukončení léčby k průměrnému přírůstku ht-SDS o 1,59, z toho za prepubertální období o 1,57. Během puberty se již výška při pokračující léčbě nezlepšila. Po adjustaci na ht-SDS v 18 letech věku stoupla výška ve srovnání se stavem při zahájení léčby o 0,91 ht-SDS (všechny tři parametry $p < 0,0001$ proti výšce před léčbou). Významně více vyrostly děti s oběma rodiči vyššími než -2 SD a také děti, které měly sníženou výlučně porodní hmotnost, nikoliv porodní délku.

Výsledky analýzy z databáze REPAR prokazují účinnost léčby růstovým hormonem u dětí SGA-SS. O efektu léčby rozhoduje především prepubertální složka růstu, proto důsledné sledování růstu dětí narozených SGA a včasné zahájení léčby v časném dětství má pro ně klíčový význam.

Klíčová slova: small-for-gestational-age, SGA-SS, růstový hormon, puberta, pubertální růstový výšvih, dospělá výška

SUMMARY

Kodytková A, Toni L, Plachý L, Jírová B, Aldhoon Hainerová I, Aleksijević D, Černá J, Dvořáková M, El-Lababidi E, Kalvachová B, Kocourková K, Kotvalová I, Magnová O, Novotná D, Obermannová B, Pomahačová R, Průhová Š, Souček O, Strnadel J, Šíchová L, Škvor J, Šnajderová M, Šumník Z, Zapletalová J, Šilar J, Koloušková S, Lebl J. Pubertal growth in children born small for gestational age (SGA) with persistent short stature (SGA-SS). Growth hormone treatment outcomes from data of the Czech countywide REPAR database

#tyto dvě autorky přispěly ke vzniku článku stejným dílem

Podpořeno grantem AZV
NU22J-07-00014

Both pre-pubertal growth and magnitude of the pubertal growth spurt are the prerequisites of potential of growth hormone therapy to optimize final height. We analyzed impact of pre-pubertal and pubertal growth components on the total effect of growth hormone therapy in a cohort of 397 children (221 boys) registered in the Czech national database of growth hormone recipients REPAR. All were born small for gestational age, had persistent short stature in childhood (SGA-SS) and already achieved their near-final height. We separately evaluated children according to parental heights (with both parents over -2 ht-SDS, one below -2 ht-SDS, both below -2 ht-SDS) and according to their size at birth – low birth weight, low birth length, low both parameters.

Up to treatment completion, treatment led to a height gain of 1,59 ht-SDS; of this, the pre-pubertal gain was 1,57 ht-SDS. Thus, ht-SDS remained unchanged within puberty, despite continuous growth hormone administration. The final ht-SDS gain adjusted for age 18 years was 0,91 (all three parameters $p < 0.0001$ if compared to pre-treatment). Children with both parents taller than -2 SD and children with exclusively low birth weight had significantly better treatment outcomes.

Analysis results of the REPAR database confirm efficacy of growth hormone therapy in SGA-SS children. The treatment success is based on pre-pubertal growth component. Therefore, a careful follow-up of children born SGA and a timely initiation of growth hormone therapy in early childhood are of crucial importance.

Key words: small-for-gestational-age, SGA-SS, growth hormone, puberty, pubertal growth spurt, adult height

Korespondenční adresa:

Mgr. Aneta Kodytková
Pediatrická klinika UK 2.LF a FN v Motole
V Úvalu 84
150 06 Praha 5
aneta.kodytkova@gmail.com

Pubertální růstové období je závěrečnou fází tělesného růstu člověka.⁽¹⁾ Přispívá konečnými 12–18 % k celkové dospělé výšce – více u chlapců (v průměru 26 cm) než u dívek (v průměru 20 cm).^(2–4) Finální dospělou výšku ovlivňují tři parametry spojené s pubertou: (a) věk při nástupu puberty, (b) výška při nástupu puberty a (c) vydatnost pubertálního růstového výšvihu.

Pubertální růstové období se podílí na úspěchu léčby růstovým hormonem. Některé děti narozené malé na svůj gestační věk (small for gestational age; SGA), které neprošly fází postnatálního růstového výšvihu (catch-up růstu), měly malou výšku v dětství (small for gestational age – short stature; SGA-SS) a dostávaly růstový hormon,⁽⁵⁾ ukončily růst s nižší výškou, než se očekávalo podle výšky ve středním dětství.^(6–9) Příčinou může být časnější nástup puberty, málo vydatný pubertální růstový výšvih nebo kombinace obou faktorů.

V kohortě českých dětí SGA-SS, které dosáhly své finální výšky po léčbě růstovým hormonem, jsme analyzovali parametry pubertálního růstu s cílem zjistit jejich vliv na dospělou výšku a celkový příspěvek k úspěchu podávání růstového hormonu.

PACIENTI A METODIKA

Do studie pubertálního růstu byly zařazeny děti SGA-SS vedené v české národní databázi příjemců růstového hormonu REPAR, u kterých byl ke dni 13. 3. 2023 již k dispozici údaj o finální dospělé výšce. Geneze celé kohorty, detailní popis zařazovacích kritérií, podávaná léčba i definice finální výšky jsou uvedeny v souběžném sdělení.⁽⁵⁾ Celkem bylo analyzováno 397 pacientů (221 chlapců, 176 dívek).

V této studii jsme se zaměřili na posouzení efektivity prepubertálního a pubertálního růstu dětí SGA-SS při léčbě růstovým hormonem a na jejich příspěvek k celkovému účinku léčby. Jako klíčové ukazatele jsme hodnotili:

- výšku v čase zahájení léčby růstovým hormonem vyjádřenou jako skóre směrodatné odchylky tělesné výšky (ht-SDS);
- výšku (vyjádřenou jako ht-SDS) při prvním záznamu o počínající pubertě – stadium B2 (dívký) nebo objem testes více než 3 ml (chlapci);
- finální výšku (vyjádřenou jako ht-SDS) – poslední známou výšku jedince s plnou pohlavní zralostí (u chlapců stadium P5 G5, u dívek stav po menarché) a současně s růstovou rychlostí pod 2 cm za rok (přepočítáno z časového úseku 6–12 měsíců, při měření v ambulanci dětského endokrinologa s využitím stadiometru upevněného na stěně).

Pro posouzení adnálních parametrů na průběh růstu před začátkem dospívání, na vydatnost pubertálního růstu a na dospělou výšku jsme studijní kohortu 397 dětí rozdělili na podskupiny jednak podle výšky rodičů, jednak podle porodní hmotnosti a porodní délky ve vztahu ke gestačnímu věku. Odděleně jsme také zhodnotili ukazatele růstu u dětí narozených předčasně a u dětí narozených v očekávaném termínu porodu.

VÝSLEDKY

Jak uvádíme v souběžné studii,⁽⁵⁾ léčba růstovým hormonem vedla k průměrnému přírůstku ht-SDS o 1,59 a k dosažení průměrné téměř finální výšky (near-final height) ht-SDS $-1,62$ (SD: 0,97; $p < 0,001$ proti výšce před léčbou).

Tab. 1: Prepubertální a pubertální růst u dětí SGA-SS při léčbě růstovým hormonem. Skupiny jsou rozděleny podle výšky rodičů. Výsledky ukazují vliv výšky rodičů na prepubertální a pubertální složku růstu.

	Všichni (n = 397)	Oba rodiče nad -2 ht-SDS (n = 258)	Jeden rodič pod -2 ht-SDS (n = 111)	Oba rodiče pod -2 ht-SDS (n=28)	p-hodnota
ht-SDS při zahájení léčby (průměr [SD])	-3,21 (0,91)	-3,09 (0,50)	-3,26 (0,79)	-3,40 (0,81)	0,278
ht-SDS při počátku puberty* (průměr [SD])	-1,64 (0,93)	-1,49 (0,94)	-1,97 (0,97)	-1,67 (0,81)	0,008
Změna ht-SDS výšky za prepubertální fázi léčby růstovým hormonem (průměr)	+1,57	+1,60	+1,29	+1,73	
ht-SDS při ukončení léčby (průměr [SD])	-1,62 (0,97)	-1,48 (0,94)	-1,89 (0,96)	-1,89 (1,00)	< 0,001
Změna ht-SDS výšky za pubertální fázi léčby růstovým hormonem (průměr)	+0,02	+0,01	+0,08	-0,21	
ht-SDS při ukončení léčby adjustované na 18 let věku (průměr [SD])	-2,30 (1,09)	-2,10 (1,06)	-2,51 (1,08)	-2,79 (1,17)	< 0,001

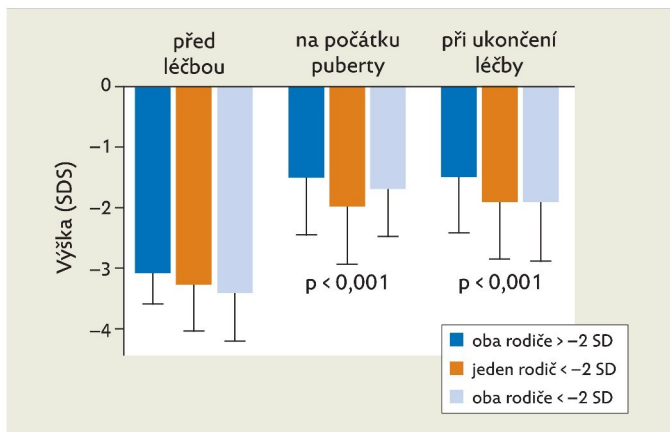
ht-SDS – skóre směrodatné odchylky tělesné výšky

*Počátek puberty je definován jako věk při prvním záznamu o B2 u dívek nebo testes více než 3 ml u chlapců. Statistické hodnocení bylo provedeno Kruskalovým–Wallisovým testem.

Po adjustaci výšky při ukončení léčby na 18 let věku dosáhli pacienti na prahu dospělosti ht-SDS -2,30 (SD: 1,09; $p < 0,001$ proti výšce před léčbou). Významná část chlapců i dívek tedy při skončení léčby dosáhla výšky v rozmezí hodnot běžné populace, tj. nad -2 ht-SDS.

Tabulka 1 a obrázek 1 ukazují odděleně výsledky prepubertálního a pubertálního růstu u tří podskupin dětí rozdělených podle výšky rodičů – u skupiny s oběma rodiči s výškou v obvyklém rozmezí (nad -2 ht-SDS), s jedním rodičem pod -2 ht-SDS a s oběma rodiči pod -2 ht-SDS.

Zatímco před léčbou se děti svoji výškou ve všech skupinách významně nelišily, na počátku puberty, při ukončení



Obr. 1: Výška dětí SGA-SS (vyjádřená jako skóre směrodatné odchylky [SDS] tělesné výšky) před zahájením léčby růstovým hormonem, na počátku puberty a při ukončení léčby. Samostatně je hodnocena skupina dětí, jejichž oba rodiče mají tělesnou výšku v obvyklém rozmezí (nad -2 SDS), skupina dětí s jedním rodičem pod -2 SDS a skupina dětí s oběma rodiči pod -2 SDS. Zatímco před léčbou byla výška dětí ve všech skupinách srovnatelná, děti rodičů obvyklé výšky byly na počátku puberty i na prahu dospělosti významně vyšší než děti s jedním nebo oběma rodiči pod -2 SD.

léčby i na prahu dospělosti byly děti rodičů obvyklé výšky významně vyšší než děti s jedním nebo oběma rodiči pod -2 ht-SDS. Za přírůstek výšky během léčení tedy plně zodpovídala prepubertální fáze růstu. Během puberty se již výška vyjádřená jako ht-SDS u žádné z podskupin dětí významně nezměnila.

Tabulka 2 ukazuje odděleně výsledky prepubertálního a pubertálního růstu u tří podskupin dětí rozdělených podle perinatálních parametrů – u dětí, které se narodily s porodní délkou (PD) pod -2 SD ke gestačnímu věku, s porodní hmotností (PH) pod -2 SD ke gestačnímu věku a s oběma parametry pod -2 SD ke gestačnímu věku.

Zatímco před léčbou, na počátku puberty a při ukončení léčby se výška dětí v těchto třech skupinách nelišila, adjustovaná dospělá výška je významně vyšší u podskupiny s výlučně nízkou porodní hmotností. Tato podskupina se tedy vymyká obecnému trendu a jako jediná má předpoklad i během puberty ještě zlepšit svoje ht-SDS.

Nebyl prokázán významný rozdíl změny ht-SDS během trvání léčby mezi dětmi narozenými předčasně (před začátkem 37. gestačního týdne; $n = 64$) a dětmi narozenými v termínu (ve 37. gestačním týdnu a později; $n = 333$).

DISKUSE

Švédský auxolog Karlberg před téměř 40 lety matematicky analyzoval růstovou křivku člověka a doložil její tři oddělené, aditivní a částečně se překrývající složky. Označil je „I“ (infancy), „C“ (childhood) a „P“ (puberty). Bylo zřejmé, že každá z těchto složek lidského růstu má jinou regulaci. Karlberg usuzoval, že složka „I“ je řízena oběma inzulinu podobnými růstovými faktory (IGF-1 a IGF-2), složka „C“ osou růstový hormon – IGF-1 a složka „P“ pohlavními hormony.^(1,10)

V současné době považujeme za klíčovou složku regulace lidského růstu aktivitu chondrocytů. Chondrocyty se

Tab. 2: Prepubertální a pubertální růst u dětí SGA-SS při léčbě růstovým hormonem. Skupiny jsou rozděleny podle porodní délky a porodní hmotnosti. Výsledky ukazují rozdílný vliv snížené porodní hmotnosti a snížené porodní délky na prepubertální a pubertální složku růstu i na adjustovanou dospělou výšku.

	Všichni (n = 397)	Porodní délka pod -2 SD, porodní hmotnost v normě (n = 169)	Porodní délka v normě, porodní hmotnost pod -2 SD (n = 55)	Porodní délka i porodní hmotnost pod -2 SD (n=173)	p-hodnota
ht-SDS při zahájení léčby (průměr [SD])	-3,21 (0,91)	-3,20 (1,04)	-3,30 (0,87)	-3,18 (0,78)	0,248
ht-SDS při zahájení puberty* (průměr [SD])	-1,64 (0,93)	-1,53 (0,85)	-1,90 (0,98)	-1,67 (0,99)	0,216
Změna ht-SDS za prepubertální fázi léčby růstovým hormonem (průměr)	+1,57	+1,67	+1,40	+1,51	
ht-SDS při ukončení léčby (průměr [SD])	-1,62 (0,97)	-1,60 (1,00)	-1,51 (0,98)	-1,68 (0,93)	0,553
Změna ht-SDS za pubertální fázi léčby růstovým hormonem (průměr)	+0,02	-0,07	+0,39	-0,01	
ht-SDS při ukončení léčby adjustované na 18 let věku (průměr [SD])	-2,30 (1,09)	-2,31 (1,10)	-1,90 (1,12)	-2,39 (1,05)	0,030

ht-SDS – skóre směrodatné odchylky tělesné výšky

*Počátek puberty je definován jako věk při prvním záznamu o B2 u dívek nebo testes více než 3 ml u chlapců. Statistické hodnocení provedeno Kruskalovým–Wallisovým testem.

aktivují v klidové zóně epifyzární růstové chrupavky konverzí z nezralých chondroprogenitorů. Vyrábějící chondrocyty se organizují do sloupců v zóně proliferace a následně se mění ve velké chondrocyty utvářející zónu hypertrofie (obr. 2).⁽¹¹⁾ V zóně hypertrofie dochází k postupné mineralizaci chrupavčité extracelulární matrix, na rentgenovém snímku vidíme zónu provizorní kalcifikace. Do osifikační zóny přiléhající k diafýze prorůstají cévy a vzniká nová kostní tkáň. Hypertrofické chondrocyty podléhají apoptóze a jsou nahrazeny osteoblasty.^(12,13) Tento proces je řízen humorálně, ovšem komplexněji, než navrhl Karlberg před čtyřmi desítkami let.

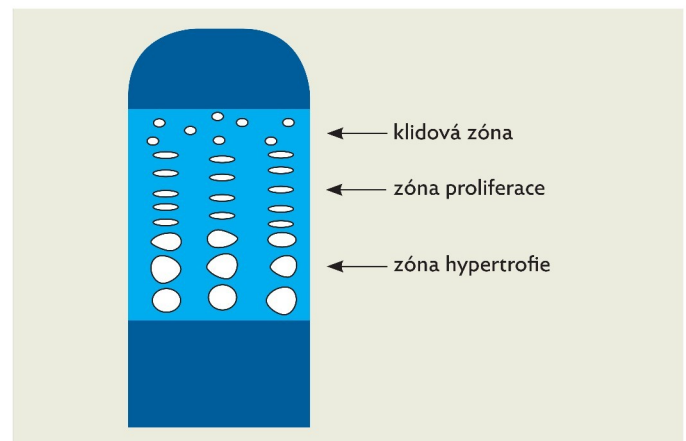
Pohlavní hormony se produkují ve třech vývojových fázích člověka: u fétu od 21. gestačního týdne, u novorozence a kojence v prvních měsících po narození („minipuberta“) a po klidném období dětství následně ve stoupajícím množství od počátku „skutečné“ puberty (obr. 3). Těmto obdobím života s produkcí pohlavních hormonů odpovídají tři fáze růstové akcelerace: rychlý fetální růst ve 2. trimestru, infantní (kojenecké) růstové období po narození a pubertální růstový výšvih, který přechází do definitivního ukončení růstu.⁽¹²⁾ Z tohoto výčtu je zřejmé, že růstová urychlení jsou navázána na produkci pohlavních hormonů.

Zásadními regulátory kostního růstu a mineralizace jsou estrogény (obr. 4). Přispívají ke zrání růstové ploténky, vedou k epifyzární fúzi (zániku růstové ploténky) a stimulují akumulaci kostního minerálu.⁽¹⁴⁾

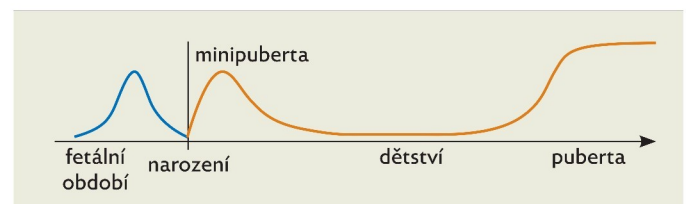
Na růstovou chrupavku působí především pohlavní hormony gonadálního původu. Jde tedy o endokrinní působení. Estrogény vznikají díky enzymu aromatáze i lokálně v růstové chrupavce konverzí z testosteronu a dalších androgenů. Tento mechanismus označujeme jako intrakrinní působení. Androgeny stimulují růst kosti i přímo, bez konverze na estrogény. Vliv pohlavních hormonů na růst zprostředkují také další mediátory – růstový hormon, IGF-1 a parathormon-related peptid (PTHrP), jejichž sekrece v pubertálním období stoupá. Chondrocyty exprimují jak membránové

receptory pro tyto tři proteohormony, tak jaderné receptory pro estrogény a androgeny (viz obr. 4).⁽¹³⁾

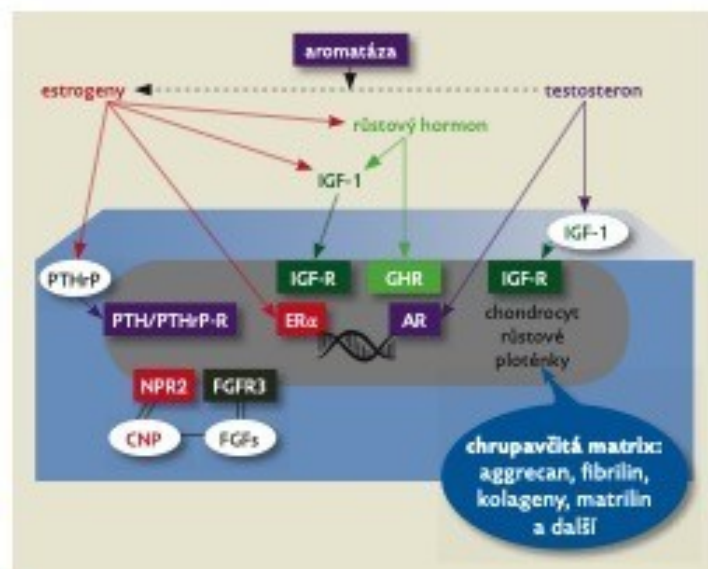
I v pubertálním období řídí aktivitu chondrocytů parakrinní mechanismy – sprážené systémy natriuretického peptidu C (CNP) s receptorem NPR2 a fibroblastových růstových faktorů (FGFs) s jejich receptorem 3. typu (FGFR3),^(15–18)



Obr. 2: Tři zóny epifyzární růstové chrupavky – klidová zóna, zóna proliferace a zóna hypertrofie



Obr. 3: Produkce pohlavních hormonů u fétu, novorozence a kojence a ve vlastní „skutečné“ pubertě



Obr. 4: Schematické znázornění regulace chondrocytu v pubertálním růstovém období. Estrogeny jsou klíčovým hormonálním regulátorem pubertální růstové akcelerace i závěrečné fáze růstové ploténky, která vede k ukončení růstu. Estrogeny působí přímo vazbou na estrogenní receptor α ($ER\alpha$) i zprostředkovaně – posílením endokrinní sekrece růstového hormonu a IGF-1 a parakrinní sekrece parathormon-related peptidu (PTHrP). Chondrocyty exprimují membránové receptory pro růstový hormon (GHR), pro IGF-1 (IGF-R), pro parathormon-related peptid (PTH/PTHrP-R) a nukleární receptory pro estrogeny a androgeny. Testosteron je aromatázou konvertován na estrogeny, navíc posiluje parakrinní sekreci IGF-1 a vazbou na androgenní receptor (AR) přímo působí na chondrocyty. Vedle hormonální regulace je i v pubertálním růstovém období pro aktivitu chondrocytu důležitá parakrinní regulace, např. spřaženými systémy natriuretického peptidu C (CNP) s receptorem NPR2 a fibroblastových růstových faktorů (FGFs) s jejich receptorem 3. typu (FGFR3). Na regulaci chondrocytu a aktivitu růstové chrupavky mají i v pubertě významný vliv složky chrupavčité matrix, např. aggrecan, fibrilin, kolageny a matrilin.

Upraveno dle⁽¹⁾, zdrojová data dle⁽¹⁾

významný vliv mají složky chrupavčité matrix – aggrecan, fibrilin, kolageny, matrilin a další (viz obr. 4).⁽¹⁾

Naše analýza růstových dat u dětí SGA-SS léčených růstovým hormonem ukázala, že o úspěchu léčení se rozhoduje v prepubertálním období. Mezi časem zahájení léčby a prvními známkami fyzické puberty skóre směrodatné odchylky tělesné výšky (ht-SDS) významně stoupá – dítě se výškou sblíží s vrstevníky. Mezi počátkem puberty a finální výškou už v celé skupině ke zlepšení ht-SDS nedochází. Z podrobnější analýzy ale vyplývá, že děti SGA-SS nejsou homogenní skupinou a že mezi jednotlivými podskupinami se pubertální růst odlišuje.

Děti SGA-SS lze rozčlenit podle parametrů při narození – na skupinu se sníženou výlučně porodní délkou (pod -2 SD ke gestačnímu věku), se sníženou výlučně porodní hmotností (pod -2 SD ke gestačnímu věku) a se sníženými oběma parametry. V prepubertálním období rostou tyto tři skupiny podobně, v pubertálním období ale dojde k diferenciaci: lepší finální výšky dosáhnou děti se sníženou výlučně porodní

hmotností, nikoliv porodní délkou. Pro tyto děti je příznačný normální růst do délky *in utero*. To může signalizovat normální funkci růstové ploténky a pravděpodobně exogenní příčinu intrauterinního strádání – environmentální, maternální či placentární. Léčba růstovým hormonem těmto dětem zlepšuje prepubertální i pubertální růst. Naopak děti se sníženou porodní délkou (bez ohledu na porodní hmotnost) méně rostly do délky *in utero* a chyběl jim catch-up růst po narození. Následně sice zlepšily svoji výšku na léčbě růstovým hormonem, ale mechanismy pubertálního růstového období jim nedovolily růst v pubertě dále akcelarovat. Můžeme spekulovat, že tyto děti mají endogenní příčinu růstové poruchy, která může být monogenně podmíněná a může zasahovat dynamiku růstové ploténky nebo další endogenní mechanismy řídící růst.⁽²⁸⁾

Dále lze děti SGA-SS rozdělit také podle výšky rodičů. Některé mají oba rodiče normální výšky, některé jednoho rodiče pod -2 SD výšky, jiné mají oba rodiče pod -2 SD výšky. Pubertální růst nezlepší výšku v žádné z těchto tří skupin. Přesto nejlepší finální dospělé výšky dosahují děti s rodiči normální výšky, a to díky svému prepubertálnímu růstu. To jsou děti, u kterých mohla mít intrauterinní růstová restrikce exogenní příčinu. Právě tyto děti mají zřetelně lepší šanci na úspěch léčení růstovým hormonem. Naopak děti s alespoň jedním rodičem menším než -2 SD mají zřetelnou endogenní vložku pro malý vzrůst, která může být monogenně podmíněná s vertikálním (dominantním) přenosem. Dopad této vložky na tělesný růst léčba růstovým hormonem zmírní, ale nedokáže jej zcela překonat.

Jinými slovy: familiárně malý vzrůst zhoršuje vyhlídky na optimální úspěch léčby růstovým hormonem. Do odpovědi na růstový hormon tedy zasahuje genetika, která se u dětí SGA-SS projevuje jednak sníženou porodní délkou (častěji bez snížené porodní hmotnosti), jednak nižší výškou jednoho nebo obou rodičů. Nerozhoduje přitom, zda výšku pod -2 SD má jeden rodič, nebo oba rodiče. Tato pozorování do jisté míry narušují Tannerův axiom o vlivu střední rodičovské výšky na růst dítěte,⁽²⁹⁾ přinejmenším ve skupině dětí SGA-SS, a naznačují, že rozhodující vliv má dominantní vložka právě od jednoho z rodičů. Zatímco nízká výška jednoho nebo obou rodičů limituje odpověď na léčbu zejména v prepubertální fázi růstu, nízká porodní délka zhoršuje odpověď na léčbu v období pubertálního růstového výšvihu a rozhoduje o úspěchu více než porodní hmotnost. Naše skupina v předešlých studiích prokázala, že právě dominantně dědičné monogenní poruchy zasahují často regulaci růstové ploténky a genealogicky se projevují jako familiárně malý vzrůst.^(15,21,22)

Co je tedy důvodem menšího efektu léčby v pubertálním růstovém období? Nedostatečná výška při nástupu puberty, příliš časná puberta, nebo nedostatečný pubertální růstový výšvih?

Podle většiny studií puberta u celé skupiny dětí SGA-SS začíná v obvyklém věkovém rozmezí, i když poměrně časně vzhledem k aktuální tělesné výšce.^(23–27) Metaanalýza Denga se spolupracovníky ale ukázala, že nástup puberty je zejména u dívek přece jen časnější, než je průměr ostatních dětí.⁽²⁸⁾ Puberta nastává jednoznačně časně u obou podskupin dětí

se syndromem Silvera–Russella – zejména u nositelů maternální uniparentální disomie na 7. chromozomu (mUPD7), ale také u dětí se ztrátou metylace v oblasti 11p15 (11p15 LOM).⁽²⁹⁾

Naše výsledky prokazují, že hlavní příčinou menšího úspěchu pubertálního růstového období je nedostatečný pubertální růstový výšvih. Léčba růstovým hormonem již nedává většině dětí s endogenní příčinou SGA šanci v pubertě výšku dále zlepšit. Tyto nálezy odpovídají jiným obdobným pozorováním.^(22,30,31) Prioritní je zjištění, že v pubertě svoji výšku relativně zlepši jen děti se zřejmou exogenní příčinou SGA. To může znamenat, že hlavní překážkou růstové akcelerace v pubertě jsou patogenní varianty genů důležitých pro funkci růstové chrupavky.

Některé pracovní týmy navrhovaly překonat relativní rezistenci k růstovému hormonu v pubertě zvýšením dávky, což v některých studiích skutečně poněkud zlepšilo dospělou výšku.^(32,33) Později se ale ukázalo, že dávka růstového hormonu má na dospělou výšku malý vliv a důležitějšími prediktory jsou věk a výška na počátku puberty, kostní věk a střední rodičovská výška.^(8,9)

Další možností jak farmakologicky modulovat pubertální období je oddálení puberty podáváním analogů gonadotropin-releasing hormonu. Při extrémně malé výšce na prahu puberty může být tato léčba prospěšná a může zlepšit dospělou výšku. Důkazy pro efekt takového postupu u jiných dětí s SGA-SS chybí.^(2,6,7)

Racionální odpovědí na nedostatečný pubertální růst je prodloužit fázi prepubertálního růstu včasným zahájením léčby, a zlepšit tak výšku na prahu puberty. Recentní metaanalýza robustních retrospektivních dat potvrdila, že věk při zahájení léčby je silným prediktorem konečného

úspěchu.^(34,35) Pro klinickou pediatrikou praxi z toho vyplývá úkol pravidelně sledovat růst u dětí narozených SGA. Jakmile jejich výška klesne pod $-2,5$ SD počínaje věkem 3 roky, je třeba odeslat je k posouzení do centra pro léčbu růstovým hormonem.

Naše studie má limitace podobné jako jiné studie z dat multicentrických databází. Vzhledem k hlášení údajů o léčených dětech nejvýše dvakrát ročně může být údaj o věku při nástupu puberty nepřesný. První databázový záznam o počátku pubertálního vývoje znamená, že první známky puberty se objevily v časovém intervalu 0–6 měsíců předtím, v průměru tedy 3 měsíce. Skutečný nástup puberty byl tedy dřívější oproti záznamům, což ve svém důsledku může změnit podíl prepubertálního a pubertálního růstu. Proto jsme také nehodnotili ukazatel věku při začátku pubertálního vývoje. Vzhledem k posunu záznamu o začátku puberty v průměru o tři měsíce je ale vliv nepřesnosti na hodnocení jednotlivých fází růstu málo významný. O limitaci v hodnocení finální tělesné výšky hovoříme podrobněji v paralelním článku.⁽⁵⁾ Možná nepřesnost i v tomto ukazateli však nemůže podle názoru autorů výsledky hodnocení obou fází růstu podstatně ovlivnit.

ZÁVĚR

Léčba růstovým hormonem je u dětí SGA s malou výškou v dětství (SGA-SS) účinná.⁽⁵⁾ Proto doporučujeme jejich pečlivé sledování. Pokud dojde k selhání růstu a dítě splní indikační kritéria, je pro optimální efekt dobré zahájit léčbu co nejdříve po 3. roce věku – protože u většiny dětí rozhoduje o celkovém úspěchu právě výškový přírůstek před nástupem pubertálního vývoje. |

LITERATURA

1. **Karlberg J.** On the modelling of human growth. *Stat Med* 1987; 6: 185–92.
2. **Carel JC.** Management of short stature with GnRH agonist and co-treatment with growth hormone: a controversial issue. *Mol Cell Endocrinol* 2006; 254–255: 226–233.
3. **Carrascosa Lezcano A, Fernández García JM, Fernández Ramos C, et al.** Spanish cross-sectional growth study 2008. Part II. Height, weight and body mass index values from birth to adulthood. *An Pediatr* 2008; 68: 552–569.
4. **Bláha P, Vignerová J, Riedlová J, et al.** VI. celostátní antropologický výzkum dětí a mládeže 2001. *Ces-Slov Pediat* 2003; 58: 766–770.
5. **Toni L, Kodytková A, Plachý L, et al.** Dospělá výška dětí, které se narodily malé na svůj gestační věk (SGA) s malou výškou v dětství (SGA-SS). Výsledky léčby růstovým hormonem z dat české národní databáze REPAR. *Ces-Slov Pediat* 2023; 78 (53): 522–29.
6. **Adler E, Lambert A-S, Bouvattier C, et al.** Determinants of final height in patients born small for gestational age treated with recombinant growth hormone. *Horm Res Paediatr* 2021; 94: 52–62.
7. **van der Steen M, Lem AJ, van der Kaay DC, et al.** Puberty and pubertal growth in GH-treated SGA children: effects of 2 years of GnRHα versus no GnRHα. *J Clin Endocrinol Metab* 2016; 101: 26964733.
8. **Tanaka T, Yokoya S, Seino Y, et al.** Onset of puberty and near adult height in short children born small for gestational age and treated with GH: interim analysis of up to 10 years of treatment in Japan. *Clin Pediatr Endocrinol* 2015; 24: 15–25.
9. **de Ridder MAJ, Stijnen T, Hokken-Koelega ACS.** Prediction model for adult height of small for gestational age children at the start of growth hormone treatment. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93: 477–483.
10. **Lebl J, Krásničanová H.** Růst dětí a jeho poruchy. Praha: Galén 1996
11. **Newton PT, Li L, Zhou B, et al.** A radical switch in clonality reveals a stem cell niche in the epiphyseal growth plate. *Nature* 2019; 567(7747): 234–238.
12. **Lebl J, Plachý L, Toni L, et al.** Mysteria skeletálního růstu: Jak růstová chrupavka určuje tělesnou výšku. In: Onemocnění skeletu u dětí. Motolské pediatrické semináře 4. Praha: Galén 2019: 99–115.
13. **Emons J, Chagin AS, Sävendahl L, et al.** Mechanisms of growth plate maturation and epiphyseal fusion. *Horm Res Paediatr* 2011; 75: 383–391.
14. **Weise M, De-Levi S, Barnes KM, et al.** Effects of estrogen on growth plate senescence and epiphyseal fusion. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 6871–6876.
15. **Plachý L, Strakova V, Elblova L, et al.** High prevalence of growth plate gene variants in children with familial short stature treated with growth hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 2019; 104: 4273–4281.
16. **Shuhaibar LC, Robinson JW, Vigone G, et al.** Dephosphorylation of the NPR2 guanylyl cyclase contributes to inhibition of bone growth by fibroblast growth factor. *eLife* 2017; 6: pii: e31343.
17. **Vasques GA, Arnhold IJ, Jorge AA.** Role of the natriuretic peptide system in normal growth and growth disorders. *Horm Res Paediatr* 2014; 82: 222–229.
18. **Wang SR, Jacobsen CM, Carmichael H, et al.** Heterozygous mutations in natriuretic peptide receptor-B (NPR2) gene as a cause of short stature. *Hum Mutat* 2015; 36: 474–481.
19. **Hodax JK, Quintos JB, Gruppiso PA, et al.** Aggrecan is required for chondrocyte differentiation in ATDC5 chondroprogenitor cells. *PLoS One* 2019; 14: e0218399.

20. **Tanner JM, Goldstein H, Whitehouse RH.** Standards for children's height at age 2–9 years allowing for height of parents. *Arch Dis Child* 1970; 45: 755–762.
21. **Plachy L, Dusatkova P, Maratova K, et al.** Familial short stature—a novel phenotype of growth plate collagenopathies. *J Clin Endocrinol Metab* 2021; 106: 1742–1749.
22. **Plachy L, Dusatkova P, Maratova K, et al.** NPR2 variants are frequent among children with familiar short stature and respond well to growth hormone therapy. *J Clin Endocrinol Metab* 2020; 105: dgaa037.
23. **Ruiz RA, Pérez AB, Leiva-Gea I, et al.** Factors influencing height gain in children born small for gestational age treated with recombinant growth hormone: what extent is puberty involved? *Ther Adv Endocrinol Metab* 2022; 13: 1–14.
24. **Renes JS, Willemsen RH, Mulder JC, et al.** New insights into factors influencing adult height in short SGA children: results of a large multicentre growth hormone trial. *Clin Endocrinol* 2015; 82: 854–861.
25. **Boguszewski MCS, Carlsson M, Lindberg A, et al.** Near-adult height after growth hormone treatment in children born prematurely – data from KIGS. *J Clin Endocrinol Metab* 2020; 105: 2457–2463.
26. **Gaddas M, Périn L, Le Bouc Y.** Evaluation of IGF1/IGFBP3 molar ratio as an effective tool for assessing the safety of growth hormone therapy in small-for-gestational-age, growth hormone-deficient and Prader-Willi children. *J Clin Res Pediatr Endocrinol* 2019; 11: 253–261.
27. **Persson I, Ahlsson F, Ewald U, et al.** Influence of perinatal factors on the onset of puberty in boys and girls: implications for interpretation of link with risk of long term diseases. *Am J Epidemiol* 1999; 150: 747–755.
28. **Deng X, Li W, Luo Y, et al.** Association between small fetuses and puberty timing: a systematic review and meta-analysis. *Int J Environ Res Public Health* 2017; 14: 1377.
29. **Patti G, Malerba F, Calevo MG, et al.** Pubertal timing in children with Silver Russell syndrome compared to those born small for gestational age. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2022; PMID: 36093089.
30. **Vicens-Calvet E, Espadero RM, Carrascosa A, et al.** Longitudinal study of the pubertal growth spurt in children born small for gestational age without postnatal catch-up growth. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2002; 15: 381–388.
31. **Lazar L, Pollak U, Kalter-Leibovici O, et al.** Pubertal course of persistently short children born small for gestational age (SGA) compared with idiopathic short children born appropriate for gestational age (AGA). *Eur J Endocrinol* 2003; 149: 425–432.
32. **Mauras N, Attie KM, Reiter EO, et al.** High dose recombinant human growth hormone (GH) treatment of GH-deficient patients in puberty increases near-final height: a randomized, multicenter trial. Genentech, Inc., Cooperative Study Group. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 3653–3660.
33. **Lem AJ, van der Kaay DC, de Ridder MA, et al.** Adult height in short children born SGA treated with growth hormone and gonadotropin releasing hormone analog: results of a randomized, dose-response GH trial. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97: 4096–4105.
34. **Juul A, Backeljauw P, Cappa M, et al.** Early growth hormone initiation leads to favorable long-term growth outcome in children born small for gestational age. *J Clin Endocrinol Metab* 2023; 108: 1043–1052.
35. **de Bruin C, Dauber A.** Growth hormone therapy in the short SGA child: Does time matter? *J Clin Endocrinol Metab* 2023; 108: e495–e496.

6. Diskuse

V naší hlavní studii jsme metodami NGS zkoumali unikátní rozsáhlou kohortu SGA-SS dětí sledovaných v jednom centru. Genetickou příčinu poruchy růstu jsme objasnili u 42 % (74/176) z nich. Etiologie SGA-SS byla heterogenní a jasně dokumentovala klíčové etáže regulace růstu. Nebylo překvapivé, že 42 % dětí s objasněnou genetickou etiologií mělo kauzální variantu některého z genů zodpovědných za správnou funkci epifyzární růstové ploténky. Toto zjištění je v souladu s novým paradigmatem, že růstová ploténka hraje klíčovou roli v patogenezi malého vzrůstu. Další relativně častou genetickou diagnózou v naší kohortě SGA-SS byly kauzální varianty v genech ovlivňujících základní intracelulární procesy včetně RASopatií.

Silver-Russellův syndrom byl další častou diagnózou v naší studijní kohortě (16 % případů s objasněnou genetickou etiologií). SRS je diagnostikován klinicky pomocí skórovacího systému podle Netchinové a Harbsona (NHS). Genetické vyšetření může následně poskytnout užitečné potvrzení klinické diagnózy. V naší studii jsme zvolili jiný přístup – genetické vyšetření SRS bylo provedeno u všech SGA-SS dětí. Překvapivě jsme geneticky diagnostikovali SRS také u 2 dětí nesplňujících kritéria NHS. Genetické vyšetření SRS lze proto zvážit u všech SGA-SS dětí bez ohledu na přítomnost jeho typických klinických znaků.

V naší studii jsme získali také několik méně očekávaných nálezů. Je dlouho známo, že růstový hormon (GH) je nezbytný pro normální postnatální růst a děti s nedostatkem GH mohou mít těžkou růstovou poruchu. Obecně se však má za to, že GH jen málo či vůbec neovlivňuje prenatální fázi růstu a děti s nedostatkem GH by se proto měly rodit s normálními parametry. Přesto jsme v naší studijní kohortě našli kauzální genetické varianty v genech, které ovlivňují vývoj hypofýzy nebo přímo produkci GH, a to u 6/74 (8 %) ze všech dětí SGA-SS s prokázanou genetickou diagnózou. Ukazuje se, že GH může u některých dětí hrát roli i v prenatálním růstu, případně že nalezené genové varianty mohou ovlivnit růst i na jiné úrovni kromě ovlivnění GH.

Mezi další nečekané nálezy patřila patogenní varianta v genu *THRA*, který kóduje receptor hormonů štítné žlázy typu A, a homozygotní varianta v genu *TRHR*, která vede k centrální hypotyreóze. Tyto dva nálezy jasně ukazují, že i v éře screeningu kongenitální hypotyreózy je nutné pomýšlet na ovlivnění prenatálního a postnatálního růstu osou štítné žlázy.

Dalším zajímavým podprojektem bylo zkoumání ALS a smyslu jejího eventálního rutinního sledování při léčbě růstovým hormonem. Naše výsledky ukázaly, že rutinní stanovení ALS má pro sledování léčby pouze nepatrnou přidanou hodnotu a že nízké hladiny ALS nejsou indikátorem možného genetického defektu v kódujícím genu *IGFALS*.

Ve dvou dalších studiích jsme studovali efekt léčby růstovým hormonem u pacientů s patogenními variantami v genu *NPR2* a u unikátního pacienta s vzácným syndromem Hutchinson-Gilfordovy progerie (HGP). V první studii GH zlepšil růstovou rychlost za první rok léčby a celkové SDS výšky během 5 let léčby. U pacienta s HGP bohužel byla léčba bez efektu.

Díky unikátní celostátní databázi REPAR jsme studovali efekt léčby GH na dospělou výšku a také vliv puberty na růst dětí SGA-SS. Prokázali jsme, že léčba růstovým hormonem u dětí SGA s malou výškou v dětství (SGA-SS) je účinná. Pro optimální efekt je dobré zahájit ji co nejdříve po 3-4 letech věku, pokud dítě splní indikační kritéria – protože u většiny dětí o celkovém úspěchu rozhoduje výškový přírůstek před nástupem pubertálního vývoje.

Naše první zkušenosti s LAGH vycházejí ze studie subjektivního vnímání zátěže léčbou u dětí, které dostávaly somatogon jednou týdně ve srovnání s každodenní aplikací klasického rhGH. Díky standardizovaným dotazníkům se zjistilo, že děti a jejich rodiny vnímají možnost léčit přípravkem LAGH děti i rodiče jednoznačně příznivě.

7. Závěr

Naše klíčová studie objasnila genetickou etiologii u 42 % SGA-SS dětí z geneticky relativně homogenní, non-konsanguinní populace – nejvyšší podíl, jakého bylo kdy dosaženo. Výsledky jasně ukázaly jednotlivé etáže patofyziologické regulace růstu a vedle toho i komplexní etiologii malého vzrůstu, na které se podílí vedle endokrinního systému také struktura a funkce růstových plotének a fundamentální procesy intracelulární regulace a signalizace.

Ukázali jsme, že genetický nálezn poskytuje nejen jasné vysvětlení příčiny malého vzrůstu, ale umožňuje se také zaměřit na přidružené skryté komorbidity a na genetické poradenství. Podle našeho názoru se proto rutinní genetické testování může stát standardem diagnostické péče u všech SGA-SS dětí poté, co jsou vyloučeny jiné příčiny poruchy růstu – přinejmenším v zemích, kde to socioekonomická situace a financování zdravotní péče umožňuje.

8. Souhrn disertační práce

Tato disertační práce přináší nový pohled na problematiku malého vzrůstu navazujícího na intrauterinní růstovou restrikcí (SGA-SS), která se díky novým možnostem genetického výzkumu v posledních letech stala významným tématem. Právě díky objasnění genetické etiologie malého vzrůstu jsme schopni lépe porozumět obecně regulaci lidského růstu, stejně jako etiologii a patofyziologii malého vzrůstu. V rámci našeho výzkumu jsme sestavili unikátní rozsáhlou kohortu pacientů SGA-SS a pomocí metod sekvenování nové generace se nám podařilo objasnit genetickou etiologii malého vzrůstu u 42 % dětí (kapitola 5.1.). Zásadním mechanismem, který vede ke stavu označovanému jako SGA-SS, je porucha růstové ploténky. Významný je také podíl osy růstový hormon – IGF-1, osy vývoje a funkce štítné žlázy a také poruchy intracelulární regulace a signalizace.

Základní studii jsme doplnili o několik vedlejších projektů, zaměřených na další aspekty etiologie, diagnostiky a léčby růstové poruchy, zejména u dětí SGA-SS. Zkoumali jsme vliv růstového hormonu na koncentraci ALS (acidolabilní podjednotky) s cílem identifikovat jedince s patogenní variantou v genu *IGFALS*. Výsledky ukázaly, že i jedinci, kteří měli nejnižší koncentrace ALS v krvi, neměli korelující genetický defekt a že hladiny ALS souvisejí s hladinami IGF-1, která se rutinně stanovuje v ordinaci dětského endokrinologa. Pravidelné vyšetřování ALS tedy nepřináší žádnou přidanou hodnotu.

Součástí disertační práce je také unikátní kazuistika pacienta s velmi vzácným syndromem předčasného stárnutí (Hutchinson-Gilford progeria syndrom), který byl poslán na naši kliniku z důvodu malého vzrůstu po intrauterinní růstové restrikcí (SGA-SS). Na základě nápadného fenotypu bylo indikováno cílené genetické vyšetření, který syndrom potvrdil.

Zajímavým doplněním projektu je naše zkušenost s dlouhodobě působícím růstovým hormonem v rámci klinické studie. Dotazníky vyplněné 87 dětmi ukázaly významné snížení vnímané zátěže pro dítě a rodinu při léčbě LAGH oproti každodenním injekcím. LAGH se stává novou možností pro léčbu dětí s některými formami poruchy růstu.

V závěru dizertační práce prezentujeme dvě publikace, které vycházejí z analýzy dat získaných z českého národního registru REPAR. V první studii jsme analyzovali efekt léčby růstovým hormonem u dětí SGA-SS na dospělou výšku. Výsledky ukázaly, že růstový hormon má potenciál významně zlepšit finální výšku. Druhá navazující práce se zaměřuje na pubertální růst dětí SGA-SS. Ukázali jsme, že o efektu léčby růstovým hormonem rozhoduje primárně prepubertální růst. Pro úspěch léčby je důležité zahájit léčbu včas a sledovat nástup puberty.

9. Seznam citované literatury

- Abdenur J, Brown WT, Friedman S, et al. Response to nutritional and growth hormone treatment in progeria. *Metabolism* 1997; 46: 851–6.
- Adler E, Lambert AS, Bouvattier C, et al. Determinants of final height in patients born small for gestational age treated with recombinant growth hormone. *Horm Res Paediatr* 2021; 94: 52–62.
- Albertsson-Wikland K, Westphal O, Westgren U. Daily subcutaneous administration of human growth hormone in growth hormone deficient children. *Acta Paediatr Scand* 1986; 75: 89-97.
- Allard JB, Duan C. IGF-Binding Proteins: Why Do They Exist and Why Are There So Many? *Front Endocrinol* 2018; 9: 117.
- Allen DB, Merchant N, Miller BS, et al. Evolution and Future of Growth Plate Therapeutics. *Horm Res Paediatr* 2021; 94: 319-32.
- Amano N, Mukai T, Ito Y, et al. Identification and functional characterization of two novel NPR2 mutations in Japanese patients with short stature. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014; 99: 713-8.
- Amaratunga SA, Tayeb TH, Dusatkova P, et al. Invaluable role of consanguinity in providing insight into paediatric endocrine conditions: Lessons learnt from congenital hyperinsulinism, monogenic diabetes, and short stature. *Horm Res Paediatr.* 2022; 95: 1-11
- Amselem S, Duquesnoy P, Attree O, et al. Laron dwarfism and mutations of the growth hormone-receptor gene. *N Engl J Med.* 1989; 321: 989-95
- Arboleda VA, Lee H, Parnaik R, et al. Mutations in the PCNA-binding domain of CDKN1C cause IMAGE syndrome. *Nat Genet* 2012; 44: 788-92.
- Apte K, Stick R, Radmacher M. Mechanics in human fibroblasts and progeria: lamin A mutation E145K results in stiffening of nuclei. *J Mol Recognit* 2016; 30: 1–11.
- Azzi S, Salem J, Thibaud N, et al. A prospective study validating a clinical scoring system and demonstrating phenotypical-genotypical correlations in Silver-Russell syndrome. *J Med Genet* 2015; 52: 446-53.
- Ballerini MG, Braslavsky D, Scaglia PA, et al. Circulating IGF-I, IGFBP-3 and the IGF-I/IGFBP-3 Molar Ratio Concentration and Height Outcome in Prepubertal Short Children on rhGH Treatment over Two Years of Therapy. *Horm Res Paediatr* 2013; 80: 413-23.

- Barat-Houari M, Sarrabay G, Gatinois V, et al. Mutation Update for COL2A1 Gene Variants Associated with Type II Collagenopathies. *Hum Mutat.* 2016; 37: 7-15.
- Baron J, Säwendahl L, De Luca F, et al. Short and tall stature: a new paradigm emerges. *Nat Rev Endocrinol.* 2015; 11: 735-46.
- Bartels CF, Bükülmez H, Padayatti P, et al. Mutations in the transmembrane natriuretic peptide receptor NPR-B impair skeletal growth and cause acromesomelic dysplasia, type Maroteaux. *Am J Hum Genet* 2004; 75: 27-34.
- Barthelemy F, Navarro C, Fayek R, et al. Truncated prelamin A expression in HGPS-like patients: a transcriptional study. *Eur J Hum Genet* 2015; 23: 1051-61.
- Baumann G, Maheshwari H. The Dwarfs of Sindh: severe growth hormone (GH) deficiency caused by a mutation in the GH-releasing hormone receptor gene. *Acta Paediatr Suppl.* 1997; 423: 33-8.
- Begemann M, Zirn B, Santen G, et al. Paternally Inherited *IGF2* mutation and growth restriction. *N Engl J Med.* 2015; 373: 349-56.
- Benabbad I, Rosilio M, Child CJ, et al. Safety Outcomes and Near-Adult Height Gain of Growth Hormone-Treated Children with SHOX Deficiency: Data from an Observational Study and a Clinical Trial. *Horm Res Paediatr.* 2017; 87: 42-50.
- Benito-Sanz S, Barroso E, Heine-Suñer D, et al. Clinical and molecular evaluation of SHOX/PAR1 duplications in Leri-Weill dyschondrosteosis (LWD) and idiopathic short stature (ISS). *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96: 404-12.
- Binder G, Liebl M, Woelfle J, et al. Adult height and epigenotype in children with Silver-Russell syndrome treated with GH. *Horm Res Paediatr* 2013; 80: 193–200.
- Bláha P, Vignerová J, Riedlová J, et al. VI. celostátní antropologický výzkum dětí a mládeže 2001. *Ces-Slov Pediat* 2003; 58: 766-70.
- Blum WF, Crowe BJ, Quigley et al.; SHOX Study Group. Growth hormone is effective in treatment of short stature associated with short stature homeobox-containing gene deficiency: Two-year results of a randomized, controlled, multicenter trial. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007; 92: 219-28.
- Blum WF, Ross JL, Zimmermann AG, et al. GH treatment to final height produces similar height gains in patients with SHOX deficiency and Turner syndrome: results of a multicenter trial. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013; 98: 1383-92.

- Boisclair YR, Rhoads RP, Ueki I, et al. The acid-labile subunit (ALS) of the 150 kDa IGF-binding protein complex: an important but forgotten component of the circulating IGF system. *J Endocrinol* 2001; 170: 63–70.
- Bonafe L, Cormier-Daire V, Hall C, et al. Nosology and classification of genetic skeletal disorders: 2015 revision. *Am J Med Genet* 2015; 167: 2869-92.
- Boniel S, Szymańska K, Śmigiel R, et al. Kabuki Syndrome-clinical review with molecular aspects. *Genes* 2021; 12: 468.
- Boguszewski M, Albertsson-Wikland K, Aronsson S, et al. Growth hormone treatment of short children born small-for-gestational-age: the Nordic Multicentre Trial. *Acta Paediatr.* 1998; 87: 257-63.
- Boguszewski MCS, Carlsson M, Lindberg A, et al. Near-adult height after growth hormone treatment in children born prematurely – data from KIGS. *J Clin Endocrinol Metab* 2020; 105: 2457-63.
- Borochowitz ZU, Scheffer D, Adir V, et al. Spondylo-epi-metaphyseal dysplasia (SEMD) matrilin 3 type: homozygote matrilin 3 mutation in a novel form of SEMD. *J Med Genet.* 2004; 41: 366-372.
- Brioude F, Oliver-Petit I, Blaise A, et al. CDKN1C mutation affecting the PCNA-binding domain as a cause of familial Russell Silver syndrome. *J Med Genet* 2013; 50: 823-30.
- Brooks AJ, Waters MJ. The growth hormone receptor: mechanism of activation and clinical implications. *Nat Rev Endocrinol* 2010; 6: 515-25.
- Brisset S, Slamova Z, Dusatkova P, et al. Anophthalmia, hearing loss, abnormal pituitary development and response to growth hormone therapy in three children with microdeletions of 14q22q23. *Mol Cytogenet* 2014; 7: 17.
- Brundtland GH. From the World Health Organization. Reducing risks to health, promoting healthy life. *JAMA* 2002; 288: 1974.
- Cai Y, Xu M, Yuan M, et al. Developments in human growth hormone preparations: sustained-release, prolonged half-life, novel injection devices, and alternative delivery routes. *Int J Nanomedicine* 2014; 9: 3527-38.
- Carel JC, Chatelain P, Rochiccioli P, et al. Improvement in adult height after growth hormone treatment in adolescents with short stature born small for gestational age: results of a randomized controlled study. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 1587–93.
- Carel JC. Management of short stature with GnrH agonist and co-treatment with growth hormone: a controversial issue. *Mol cell endocrinol* 2006; 254-255: 226-33.

- Carrascosa Lezcano A, Fernández García JM, Fernández Ramos C, et al. Spanish cross-sectional growth study 2008. part II. Height, weight and body mass index values from birth to adulthood. *An Pediatr* 2008; 68: 552-69.
- Chanoine JP, De Waele K, Walia P. Ghrelin and the growth hormone secretagogue receptor in growth and development. *Int. J. Obes* 2009; 33: 48-52.
- Chen J, Wildhardt G, Zhong Z, et al. Enhancer deletions of the SHOX gene as a frequent cause of short stature: the essential role of a 250 kb downstream regulatory domain. *J Med Genet* 2009; 46: 834-9.
- Clayton P, Cianfarani S, Czernichow G, et al. Management of the child born small for gestational age through to adulthood: a consensus statement of the International Societies of Pediatric Endocrinology and the Growth Hormone Research Society. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92: 804-10.
- Collu R, Tang J, Castagné J, et al. A novel mechanism for isolated central hypothyroidism: inactivating mutations in the thyrotropin-releasing hormone receptor gene. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 1561-5.
- Constância M, Hemberger M, Hughes J, et al. Placental-specific IGF-II is a major modulator of placental and fetal growth. *Nature* 2002; 417: 945-8.
- Cutfield WS, Derraik JGB, Gunn AJ, et al. Non-compliance with growth hormone treatment in children is common and impairs linear growth. *PloS one*. 2011; 6: e16223.
- Dahlgren J, Wikland KA; Swedish Study Group for Growth Hormone Treatment. Final height in short children born small for gestational age treated with growth hormone. *Pediatr Res* 2005; 57: 216-22.
- Dauber A, Muñoz-Calvo MT, Barrios V, et al. Mutations in pregnancy-associated plasma protein A2 cause short stature due to low IGFI availability. *EMBO Mol Med* 2016; 8: 363-74.
- Dauber A, Rosenfeld RG, Hirschhorn JN. Genetic evaluation of short stature. *J Clin Endocrinol Metab* 2014; 99: 3080-92.
- DeBusk FL. The Hutchinson-Gilford progeria syndrome. Report of 4 cases and review of the literature. *J Pediatr* 1972; 80: 697-724.
- de Bruin C, Dauber A. Growth hormone therapy in the short SGA child: does time matter? *J Clin Endocrinol Metab* 2023; 108: e495–e496.

- DeChiara TM, Efstratiadis A, Robertson EJ. A growth-deficiency phenotype in heterozygous mice carrying an insulin-like growth factor II gene disrupted by targeting. *Nature* 1990; 345: 78-80.
- Deng X, Li W, Luo Y, et al. Association between small fetuses and puberty timing: a systematic review and meta-analysis. *Int J Environ Res Public Health* 2017; 14: 1377.
- de Ridder MAJ, Stijnen T, Hokken-Koelega ACS. Prediction model for adult height of small for gestational age children at the start of growth hormone treatment. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93: 477-83.
- De Sandre-Giovannoli A, Bernard R, Cau P, et al. Lamin a truncation in Hutchinson-Gilford progeria. *Science* 2003; 300: 2055.
- Desvignes JP, Bartoli M, Delague V, et al. VarAFT: a variant annotation and filtration system for human next generation sequencing data. *Nucleic Acids Res* 2018; 46: 545–53.
- de Zegher F, Ong KK, Ibáñez L, et al. Growth hormone therapy in short children born small for gestational age. *Horm Res* 2006; 65:145-52.
- Dickey DM, Edmund AB, Otto NM, et al. Catalytically Active Guanylyl Cyclase B Requires Endoplasmic Reticulum-mediated Glycosylation, and Mutations That Inhibit This Process Cause Dwarfism. *J Biol Chem* 2016; 291: 11385-93.
- Dodé C, Teixeira L, Levilliers J, et al. Kallmann syndrome: mutations in the genes encoding prokineticin-2 and prokineticin receptor-2. *PLoS Genet* 2006; 2: e175.
- Domené HM, Bengolea SV, Martínez AS, et al. Deficiency of the circulating insulin-like growth factor system associated with inactivation of the acid-labile subunit gene. *N Engl J Med* 2004; 350: 570-7.
- Domené HM, Scaglia PA, Martínez AS et al. Heterozygous *IGFALS* gene variants in idiopathic short stature and normal children: impact on height and the IGF system. *Horm Res Paediatr* 2013; 80: 413-23.
- Dominguez-Menéndez G, Poggi Mayorga H, Arancibia M et al. ALS deficiency caused by an exon 2 deletion and a novel missense variant in the gene encoding ALS. *Growth Horm IGF Res* 2019; 48-49: 5-8.
- Doubaj Y, De Sandre-Giovannoli A, Vera EV, et al. An inherited LMNA gene mutation in atypical progeria syndrome. *Am J Med Genet Part A* 2012; 158: 2881–7.
- Dusatkova P, Pfäffle R, Brown MR, et al. Genesis of two most prevalent *PROPI* gene variants causing combined pituitary hormone deficiency in 21 populations. *Eur J Hum Genet* 2016; 24: 415-20.

- Emons J, Chagin AS, Sävendahl L, et al. Mechanisms of growth plate maturation and epiphyseal fusion. *Horm Res Paediatr* 2011; 75: 383-91.
- Eriksson M, Brown WT, Gordon LB, et al. Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature* 2003; 423: 293-8.
- Ertl D, Gleiss A, Sagmeister S et al. Determining the normal range for IGF-I, IGFBP-3, and ALS: new reference data based on current internal standards. *Wien Med Wochenschr* 2014; 164: 343-52.
- Eshet R, Laron Z, Pertzalan A, et al. Defect of human growth hormone receptors in the liver of two patients with Laron-type dwarfism. *Isr J Med Sci* 1984; 20: 8-11.
- Finken MJ, van der Steen M, Smeets CC, et al. Children Born Small for Gestational Age: Differential Diagnosis, Molecular Genetic Evaluation, and Implications. *Endocr Rev* 2018; 39: 851-94.
- Fisher DM, Rosenfeld RG, Jaron-Mendelson M, et al. Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Modeling of MOD-4023, a Long-Acting Human Growth Hormone, in Growth Hormone Deficiency Children. *Horm Res Paediatr* 2017; 87: 324-32.
- Fofanova-Gambetti OV, Hwa V, Wit JM et al. Impact of heterozygosity for acid-labile subunit (*IGFALS*) gene mutations on stature: results from the international acid-labile subunit consortium. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95: 4184-91.
- Francke U, Yang-Feng TL, Brissenden JE, et al. Chromosomal mapping of genes involved in growth control. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1986; 51: 855-66.
- Freire BL, Homma TK, Funari MFA, et al. Multigene Sequencing Analysis of Children Born Small for Gestational Age With Isolated Short Stature. *J Clin Endocrinol Metab* 2019; 104: 2023-30.
- Fuqua JS, Derr M, Rosenfeld RG, et al. Identification of a novel heterozygous IGF1 splicing mutation in a large kindred with familial short stature. *Horm Res Paediatr* 2012; 78: 59–66.
- Gaddas M, Périn L, Le Bouc Y. Evaluation of IGF1/IGFBP3 molar ratio as an effective tool for assessing the safety of growth hormone therapy in small-for-gestational-age, growth hormone-deficient and Prader-Willi children. *J Clin Res Pediatr Endocrinol* 2019; 11: 253-61.
- Ganapathy A, Mishra A, Soni MR, et al. Multi-gene testing in neurological disorders showed an improved diagnostic yield: data from over 1000 Indian patients. *J Neurol* 2019; 266: 1919–26.

- Garg A, Subramanyam L, Agarwal AK, et al. Atypical progeroid syndrome due to heterozygous missense LMNA mutations. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94: 4971-83.
- Garrod AE. The incidence of alkaptonuria: a study in clinical individuality. *Lancet* 1902; 2: 1616-20.
- García M, González de Buitrago J, Jiménez-Rosés M, et al. Central Hypothyroidism Due to a TRHR Mutation Causing Impaired Ligand Affinity and Transactivation of Gq. *J Clin Endocrinol Metab*. 2017; 102: 2433-42.
- Ghigo E, Bellone J, Aimaretti G, et al. Reliability of provocative tests to assess growth hormone secretory status. Study in 472 normally growing children. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 3323-7.
- Gicquel C, Rossignol S, Cabrol S, et al. Epimutation of the telomeric imprinting center region on chromosome 11p15 in Silver-Russell syndrome. *Nat Genet* 2005; 37:1003–7.
- Gkourogianni A, Andrew M, Tyzinski L, et al. Clinical characterization of patients with autosomal dominant short stature due to aggrecan mutations. *J Clin Endocrinol Metab* 2017; 102: 460-9.
- Goldman RD, Gruenbaum Y, Moir RD, et al. Nuclear lamins: building blocks of nuclear architecture. *Genes Dev* 2002; 16: 533-47.
- Green ED, Watson JD, Collins FS. Human Genome Project: Twenty-five years of big biology. *Nature* 2015; 526: 29-31.
- Gregory LC, Dattani MT. The molecular basis of congenital hypopituitarism and related disorders. *J Clin Endocrinol Metab* 2020; 105: dgz184.
- Groene SG, Gremmen IJ, van Zwet EW, et al. Fetal growth restriction inhibits childhood growth despite catch-up in discordant identical twins: an observational cohort study. *Eur J Endocrinol* 2023; 189: 183-9.
- Growth Hormone Research Society. Consensus guidelines for the diagnosis and treatment of growth hormone (GH) deficiency in childhood and adolescence: summary statement of the GH Research Society. GH Research Society. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 3990-3.
- Guo MH, Shen Y, Walvoord EC, et al. Whole exome sequencing to identify genetic causes of short stature. *Horm Res Paediatr* 2014; 82: 44-52.
- Hannema SE, van Duyvenvoorde HA, Premisler T, et al. An activating mutation in the kinase homology domain of the natriuretic peptide receptor-2 causes extremely tall stature without skeletal deformities. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 98: 1988-98.

- Hauer NN, Popp B, Schoeller E, et al. Clinical relevance of systematic phenotyping and exome sequencing in patients with short stature. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet* 2018; 20: 630-8.
- Heath KE, Argente J, Barrios V et al. Primary acid-labile subunit deficiency due to recessive IGFALS mutations results in postnatal growth deficit associated with low circulating insulin growth factor (IGF)-I, IGF binding protein-3 levels, and hyperinsulinemia. *Clin Endocrinol Metab* 2008; 93: 1616-1624.
- Hennekam RC. Hutchinson-Gilford progeria syndrome: review of the phenotype. *Am J Med Genet A* 2006; 140: 2603-24.
- Heuertz S, Le Merrer M, Zabel B, et al. Novel FGFR3 mutations creating cysteine residues in the extracellular domain of the receptor cause achondroplasia or severe forms of hypochondroplasia. *Eur J Hum Genet EJHG* 2006; 14: 1240-7.
- Hitchins MP, Stanier P, Preece MA, et al. Silver-Russell syndrome: a dissection of the genetic aetiology and candidate chromosomal regions. *J Med Genet* 2001; 38: 810-19.
- Hisado-Oliva A, Garre-Vázquez AI, Santaolalla-Caballero F, et al. Heterozygous NPR2 Mutations Cause Disproportionate Short Stature, Similar to Léri-Weill Dyschondrosteosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2015;100: 1133-42
- Hodax JK, Quintos JB, Gruppuso PA, et al. Aggrecan is required for chondrocyte differentiation in ATDC5 chondroprogenitor cells. *PLoS One* 2019; 14: e0218399
- Högl W, Martin DD, Crabtree N et al. *IGFALS* gene dosage effects on serum IGF-I and glucose metabolism, body composition, bone growth in length and width, and the pharmacokinetics of recombinant human IGF-I administration. *J Clin Endocrinol Metab* 2014; 99: 703-12
- Hokken-Koelega AC, De Ridder MA, Lemmen RJ, et al. Children born small for gestational age: do they catch up? *Pediatr Res* 1995; 38: 267-71
- Hokken-Koelega ACS, van der Steen M, Boguszewski MCS, et al. International Consensus Guideline on Small for Gestational Age (SGA): Etiology and Management from Infancy to Early Adulthood. *Endocr Rev* 2023; 44: 539-65
- Homma TK, Freire BL, Honjo Kawahira RS, et al. Genetic Disorders in Prenatal Onset Syndromic Short Stature Identified by Exome Sequencing. *J Pediatr* 2019; 215: 192-8
- Homma TK, Krepischi ACV, Furuya TK, et al. Recurrent copy number variants associated with syndromic short stature of unknown cause. *Horm Res Paediatr* 2018; 89: 13-21.

- Huang Z, Sun Y, Fan Y, et al. Genetic Evaluation of 114 Chinese Short Stature Children in the Next Generation Era: a Single Center Study. *Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol* 2018; 49: 295-305.
- Hwa V, Haeusler G, Pratt KL et al. Total absence of functional acid labile subunit, resulting in severe insulin-like growth factor deficiency and moderate growth failure. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 9: 1826-31.
- Ioannides Y, Lokulo-Sodipe K, Mackay DJ, et al. Temple syndrome: improving the recognition of an underdiagnosed chromosome 14 imprinting disorder: an analysis of 51 published cases. *J Med Genet* 2014; 5: 495-501.
- Irfanullah, Zeb A, Shinwari N, et al. Molecular and in silico analyses validates pathogenicity of homozygous mutations in the NPR2 gene underlying variable phenotypes of Acromesomelic dysplasia, type Maroteaux. *Int J Biochem Cell Biol* 2018; 102:76-86.
- Jacob M, Menon S, Botti C, et al. Heterozygous NPR2 Mutation in Two Family Members with Short Stature and Skeletal Dysplasia. *Case Rep Endocrinol* 2018; 28: 7658496.
- Jarvik GP, Browning BL. Consideration of Cosegregation in the Pathogenicity Classification of Genomic Variants. *Am J Hum Genet* 2016; 98: 1077-81.
- Jee YH, Andrade AC, Baron J, et al. Genetics of Short Stature. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2017; 46: 259-81.
- Johnson OL, Cleland JL, Lee HJ, et al. A month-long effect from a single injection of microencapsulated human growth hormone. *Nat Med* 1996; 2: 795-99.
- Juul A, Backeljauw P, Cappa M, et al. Early growth hormone initiation leads to favorable long-term growth outcome in children born small for gestational age. *J Clin Endocrinol Metab* 2023; 108: 1043-52.
- Kaufmann A, Heinemann F, Radmacher M, et al. Amphibian oocyte nuclei expressing lamin A with the progeria mutation E145K exhibit an increased elastic modulus. *Nucleus* 2011; 2: 310-19.
- Kapoor RR, Burke SA, Sparrow SE, et al. Monitoring of concordance in growth hormone therapy. *Arch Dis Child* 2008; 93: 147-8.
- Karlberg J. On the modelling of human growth. *Stat Med* 1987; 6: 185-92.
- Karlberg J, Albertsson-Wikland K. Growth in full-term small-for-gestational-age infants: from birth to final height. *Pediatr Res* 1995; 38: 733-9.
- Karlberg J, Kwan CW, Gelande L, et al. Pubertal growth assessment. *Horm Res* 2003; 60: 27-35.

- Kastrup KW, Christiansen JS, Andersen JK, et al. Increased growth rate following transfer to daily sc administration from three weekly im injections of hGH in growth hormone deficient children. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1983; 104: 148-52.
- Kawashima Y, Kanzaki S, Yang F, et al. Mutation at cleavage site of insulin-like growth factor receptor in a short-stature child born with intrauterine growth retardation. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 4679-87.
- Klammt J, Kiess W, Pfäffle R. *IGF1R* mutations as cause of SGA. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2011; 25: 191-206.
- Klammt J, Neumann D, Gevers EF, et al. Dominant-negative *STAT5B* mutations cause growth hormone insensitivity with short stature and mild immune dysregulation. *Nat Commun* 2018; 9: 2105.
- Kobzová J, Vignerová J, Bláha P, et al. The 6th nationwide anthropological survey of children and adolescents in the Czech Republic in 2001. *Cent Eur J Public Health* 2004; 12: 126-30.
- Kodytková A, Al Lababidi E, Čermáková I, et al. Analýza dat z celostátního registru pacientů léčených růstovým hormonem REPAR. *Ces-Slov Pediat* 2020; 75: 205-12.
- Kodytková A, Toni L, Plachý L, et al. Prepubertální růst a pubertální růstový výšvih dětí, které se narodily malé na svůj gestační věk (SGA) s malou výškou v dětství (SGA-SS). Vliv léčby růstovým hormonem z dat české národní databáze REPAR. *Ces-Slov Pediat* 2023, 78, S3, 30-36.
- Kopanos C, Tsiolkas V, Kouris A, et al. VarSome: the human genomic variant search engine. *Bioinforma Oxf Engl* 2019; 35: 1978-80.
- Kronenberg HM. Developmental regulation of the growth plate. *Nature* 2003; 332–6.
- Kotzot D, Schmitt S, Bernasconi F, et al. Uniparental disomy 7 in Silver-Russell syndrome and primordial growth retardation. *Hum Mol Genet* 1995; 4: 583-7.
- Labarta JI, Ruiz JA, Molina I, et al. Growth and growth hormone treatment in short stature children born small for gestational age. *Pediatr Endocrinol Rev* 2009; 6: 350-7.
- Laron Z, Pertzalan A, Mannheimer S. Genetic pituitary dwarfism with high serum concentration of growth hormone--a new inborn error of metabolism? *Isr J Med Sci* 1966; 2: 152-5.
- Laron, Z. Laron Syndrome (Primary Growth Hormone Resistance or Insensitivity): The Personal Experience 1958–2003. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 1031-44.

- Lawrence C, Fryer JG, Karlberg P, et al. Modelling of reference values for size at birth. *Acta Paediatr Scand* 1989; 350: 55-69.
- Lazar L, Pollak U, Kalter-Leibovici O, et al. Pubertal course of persistently short children born small for gestational age (SGA) compared with idiopathic short children born appropriate for gestational age (AGA). *Eur J Endocrinol* 2003; 149: 425-32.
- Le Roith D, Bondy C, Yakar S, et al. The somatomedin hypothesis: 2001. *Endocr Rev* 2001; 22: 53-74.
- Lebl J, Lebenthal Y, Kolouskova S, et al. Metabolic impact of growth hormone treatment in short children born small for gestational age. *Horm Res Paediatr* 2011; 76: 254-61.
- Lebl J, Kolouskova S, Steensberg A, et al. Metabolic impact of growth hormone treatment in short children born small for gestational age. *Horm Res Paediatr* 2011; 76: 254-61.
- Lebl J, Kolouskova S, Toni L, et al. Syndrom Noonanové a další RASopatie: Etiologie, diagnostika a terapie. *Ces-Slov Pediat* 2020; 75: 219-26.
- Lebl J, Koloušková S, Průhová Š, et al. Léčba růstovým hormonem – historie, současnost a budoucnost. *Farmakoter Revue* 2017; 2: 224-30.
- Lebl J, Krásničanová H. Růst dětí a jeho poruchy. Praha: *Galén* 1996.
- Lebl J, Plachý L, Toni L, et al. Mysteria skeletálního růstu: Jak růstová chrupavka určuje tělesnou výšku. In: onemocnění skeletu u dětí. Motolské pediatrické semináře 4. Praha: *Galén* 2019: 99-15.
- Lebl J, Vosáhlo J, Pfaeffle RW, et al. Auxological and endocrine phenotype in a population-based cohort of patients with PROP1 gene defects. *Eur J Endocrinol* 2005; 153: 389-96.
- Lee AC, Katz J, Blencowe H, et al. National and regional estimates of term and preterm babies born small for gestational age in 138 low-income and middle-income countries in 2010. *Lancet Glob Health* 2013; 1:26-36.
- Lee PA, Chernausk SD, Hokken-Koelega AC, et al. International Small for Gestational Age Advisory Board consensus development conference statement: management of short children born small for gestational age, April 24–October 1, 2001. *Pediatrics* 2003; 111: 1253-61.
- Lem AJ, van der Kaay DCM, de Ridder MAJ, et al. Adult height in short children born SGA treated with growth hormone and gonadotropin releasing hormone analog: results of a randomized, dose-response GH trial. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97: 4096-105.

- Lepri F, De Luca A, Stella L, et al. SOS1 mutations in Noonan syndrome: molecular spectrum, structural insights on pathogenic effects, and genotype-phenotype correlations. *Hum Mutat* 2011; 32: 760-72.
- Lippe B, Frasier SD, Kaplan SA. Use of growth hormone-gel. *Arch Dis Child* 1979; 54: 609-13.
- Li X, Yao R, Chang G, et al. Clinical Profiles and Genetic Spectra of 814 Chinese Children With Short Stature. *J Clin Endocrinol Metab* 2022;107: 972-85.
- Lioni T, Reid SM, White SM, et al. A population-based profile of 160 Australians with Prader-Willi syndrome: trends in diagnosis, birth prevalence and birth characteristics. *Am J Med Genet A* 2015; 167: 371-8.
- Loche S, Carta L, Ibba A, et al. Growth hormone treatment in non-growth hormone-deficient children. *Ann Pediatr Endocrinol Metab* 2014; 19: 1-7.
- Luo X, Hou L, Liang L, et al. Long-acting PEGylated recombinant human growth hormone (Jintrolong) for children with growth hormone deficiency: phase II and phase III multicenter, randomized studies. *Eur J Endocrinol* 2017; 177: 195-205.
- Maiorana A, Cianfarani S. Impact of growth hormone therapy on adult height of children born small for gestational age. *Pediatrics* 2009; 124: 519-31.
- Maniatis AK, Carakushansky M, Galcheva S, et al. Treatment Burden of Weekly Somatogon vs Daily Genotropin in Children with Growth Hormone Deficiency: a Randomized Study. *J Endocr Soc* 2022; 6: bvac117.
- Marouli E, Graff M, Medina-Gomez C, et al. Rare and low-frequency coding variants alter human adult height. *Nature* 2017; 542: 186–90.
- Marsaud C, Rossignol S, Tounian P, et al. Prevalence and management of gastrointestinal manifestations in Silver-Russell syndrome. *Arch Dis Child* 2015; 100: 353-8.
- Mauras N, Attie KM, Reiter EO, et al. High dose recombinant human growth hormone (GH) treatment of GH-deficient patients in puberty increases near-final height: a randomized, multicenter trial. Genentech, Inc., Cooperative Study Group. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 3653-60.
- Mehta A, Hindmarsh PC, Stanhope RG, et al. The role of growth hormone in determining birth size and early postnatal growth, using congenital growth hormone deficiency (GHD) as a model. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2005; 63: 223-31.
- Mendel, G. Versuche über Pflanzenhybriden. Verhandlungen des naturforschenden Vereines in Brünn, Bd. IV für das Jahr 1865; 3-47.

- Miller BS, Velazquez E, Yuen KCJ, et al. Long-Acting Growth Hormone Preparations – Current Status and Future Considerations. *J Clin Endocrinol Metab* 2020; 105: 2121-33.
- Miura K, Namba N, Fujiwara M, et al. An overgrowth disorder associated with excessive production of cGMP due to a gain-of-function mutation of the natriuretic peptide receptor 2 gene. *PLoS One* 2012; 7: e42180.
- Mulchandani S, Bhoj EJ, Luo M, et al. Maternal uniparental disomy of chromosome 20: a novel imprinting disorder of growth failure. *Genet Med* 2016; 18: 309-15.
- Mullis PE. Genetics of growth hormone deficiency. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2007; 36: 17-36.
- Navardauskaite R, Dusatkova P, Obermannova B, et al. High prevalence of *PROPI* defects in Lithuania: phenotypic findings in an ethnically homogenous cohort of patients with multiple pituitary hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2014; 99: 299-306.
- Netchine I, Azzi S, Houang M, et al. Partial primary deficiency of insulin-like growth factor (IGF)-I activity associated with IGF1 mutation demonstrates its critical role in growth and brain development. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94: 3913-21.
- Netchine I, Rossignol S, Dufourg MN, et al. 11p15 Imprinting center region 1 loss of methylation is a common and specific cause of typical Russell-Silver syndrome: clinical scoring system and epigenetic-phenotypic correlations. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92: 3148-54.
- Newton PT, Li L, Zhou B, et al. A radical switch in clonality reveals a stem cell niche in the epiphyseal growth plate. *Nature* 2019; 567: 234-8.
- Nikkel SM, Dauber A, de Munnik S, et al. The phenotype of Floating-Harbor syndrome: clinical characterization of 52 individuals with mutations in exon 34 of SRCAP. *Orphanet J Rare Dis* 2013; 8: 63.
- Nirenberg M. Historical review: Deciphering the genetic code – a personal account. *Trends Biochem Sci* 2004; 29: 46-54.
- Normand EA, Braxton A, Nassef S, et al. Clinical exome sequencing for fetuses with ultrasound abnormalities and a suspected Mendelian disorder. *Genome Med* 2018 Sep 28; 10: 74.
- Nowaczyk MJ, Carter MT, Xu J, et al. Paternal deletion 6q24.3: a new congenital anomaly syndrome associated with intrauterine growth failure, early developmental delay and characteristic facial appearance. *Am J Med Genet A* 2008; 146: 354-60.

- Olney RC, Bükülmez H, Bartels CF, et al. Heterozygous mutations in natriuretic peptide receptor-B (NPR2) are associated with short stature. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 1229-32.
- Onigata K, Szinnai G. Resistance to thyroid hormone. *Endocr Dev* 2014; 26:118–29.
- Patti G, Malerba F, Calevo MG, et al. Puberetal timing in children with Silver Russell syndrome compared to those born small for gestational age. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2022; 4:1172736.
- Persson I, Ahlsson F, Ewald U, et al. Influence of perinatal factors on the onset of puberty in boys and girls: implications for interpretation of link with risk of long term diseases. *Am J Epidemiol* 1999; 150: 747-55.
- Pfäffle R, Knüpfer M, Göbert M, et al. Growth Patterns of Children With Short Stature in Adulthood According to Auxological Status and Maturity at Birth. *J Clin Endocrinol Metab* 2022; 107: 3320-27.
- Phillips JA 3rd, Hjelle BL, Seeburg PH, et al. Molecular basis for familial isolated growth hormone deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 6372-5.
- Plachy L, Amaratunga SA, Dusatkova P, et al. Isolated growth hormone deficiency in children with vertically transmitted short stature: What do the genes tell us? *Front Endocrinol* 2022; 13:1102968.
- Plachy L, Dusatkova P, Maratova K, et al. Familial Short Stature - a novel phenotype of growth plate collagenopathies. *J Clin Endocrinol Metab* 2021; 106: 1742-49.
- Plachy L, Dusatkova P, Maratova K, et al. *NPR2* variants are frequent among children with familiar short stature and respond well to growth hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 2020; 105: dgaa037.
- Plachy L, Strakova V, Elblova L et al. High Prevalence of Growth Plate Gene Variants in Children With Familial Short Stature Treated With GH. *J Clin Endocrinol Metab* 2019; 104: 4273-81.
- Posey JE, Harel T, Liu P, et al. Resolution of Disease Phenotypes Resulting from Multilocus Genomic Variation. *N Engl J Med* 2017; 376: 21-31.
- Progeria Research Foundation (PRF) webpage. Available at:<https://www.progeriaresearch.org/>. Accessed 17 Feb 2019.
- Pruhova S, Dusatkova P, Sumnik Z et al. Glucokinase diabetes in 103 families from a country based study in the Czech Republic: geographically restricted distribution of two prevalent GCK mutations. *Pediatr Diabetes* 2010; 11: 529-35.

- Raben MS. Treatment of a pituitary dwarf with human growth hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 1958; 18: 901-3.
- Ranke MB. Clinical experience with authentic recombinant human growth hormone. *Acta Paediatr Scand Suppl* 1986; 325: 90-2.
- Ranke MB, Lindberg A, Cowell CT, et al. Prediction of response to growth hormone treatment in short children born small for gestational age: Analysis of data from KIGS (Pharmacia International Growth Database). *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:125-31.
- Ranke MB. Turner and Noonan syndromes: disease-specific growth and growth-promoting therapies. In: Kelnar CJ, Savage MO, Saenger P, Cowell CT, eds. *Growth Disorders*. 2nd ed. London, UK: Hodder Arnold; 2007: 512-25.
- Ranke MB, Wit JM. Growth hormone – past, present and future. *Nat Rev Endocrinol* 2018; 14: 285-300.
- Rao E, Weiss B, Fukami M, et al. Pseudoautosomal deletions encompassing a novel homeobox gene cause growth failure in idiopathic short stature and Turner syndrome. *Nat Genet* 1997; 16: 54–63.
- Rauch A, Thiel CT, Schindler D, et al. Mutations in the pericentrin (*PCNT*) gene cause primordial dwarfism. *Science* 2008; 319: 816-9.
- Reh CS, Geffner ME. Somatotropin in the treatment of growth hormone deficiency and Turner syndrome in pediatric patients: a review. *Clin Pharmacol* 2010; 2: 111-22.
- Reijnders MRF, Miller KA, Alvi M, et al. De Novo and Inherited Loss-of-Function Variants in *TLK2*: Clinical and Genotype-Phenotype Evaluation of a Distinct Neurodevelopmental Disorder. *Am J Hum Genet* 2018;102:1195–203.
- Renes JS, van Doorn J, Breukhoven PE, et al. Acid-labile subunit levels and the association with response to growth hormone treatment in short children born small for gestational age. *Horm Res Paediatr* 2014; 8: 126-32.
- Renes JS, van Doorn J, Hokken-Koelega A et al. Current Insights into the Role of the Growth Hormone–Insulin-Like Growth Factor System in Short Children Born Small for Gestational Age. *Horm Res Paediatr* 2019; 92: 15-27.
- Renes JS, Willemsen RH, Mulder JC, et al. New insights into factors influencing adult height in short SGA children: results of a large multicentre growth hormone trial. *Clin Endocrinol* 2015; 82: 854-61.
- Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics

and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet* 2015;17: 405-24.

- Riedl S, Vosahlo J, Battelino T, et al. Refining clinical phenotypes in septo-optic dysplasia based on MRI findings. *Eur J Pediatr* 2008; 167: 1269-76.
- Rosenfeld JA, Kim KH, Angle B, et al. Further Evidence of Contrasting Phenotypes Caused by Reciprocal Deletions and Duplications: Duplication of NSD1 Causes Growth Retardation and Microcephaly. *Mol Syndromol* 2013; 3: 247-54.
- Ruiz RA, Pérez AB, Leiva-Gea I, et al. Factors influencing height gain in children born small for gestational age treated with recombinant growth hormone: what extent is puberty involved? *Ther Adv Endocrinol Metab* 2022; 13: 1-14.
- Saenger P, Czernichow P, Hughes I, et al. Small for gestational age: short stature and beyond. *Endocr Rev* 2007; 28:219-51.
- Sas T, de Waal W, Mulder P, et al. Growth hormone treatment in children with short stature born small for gestational age: 5-year results of a randomized, double-blind, dose-response trial. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 3064-70.
- Säwendahl L, Battelino T, Brod M, et al. Once weekly Somapacitan vs daily GH in children With GH Deficiency: Results From a Randomized Phase 2 Trial. *J Clin Endocrinol Metab* 2020; 105: 1847-61.
- Sediva H, Dusatkova P, Kanderova V, et al. Short stature in a boy with multiple early-onset autoimmune conditions due to a *STAT3* activating mutation: Could intracellular growth hormone signalling be compromised? *Horm Res Paediatr.* 2017; 88: 160-6.
- Shanxiang R., Yuxiang N, Aihong W. Effects of recombinant human growth hormone in the treatment of dwarfism and relationship between IGF-1, IGFBP-3 and thyroid hormone. *Experimental and Therapeutic Medicine* 2016; 12: 3579-82.
- Shears DJ, Vassal HJ, Goodman FR, et al. Mutation and deletion of the pseudoautosomal gene *SHOX* cause Leri-Weill dyschondrosteosis. *Nat Genet* 1998; 19: 70-3.
- Shuhaibar LC, Robinson JW, Vigone G, et al. Dephosphorylation of the NPR2 guanylyl cyclase contributes to inhibition of bone growth by fibroblast growth factor. *eLife* 2017; 6: pii: e31343.
- Smeets CCJ, Zandwijken GRJ, Renes JS, et al. Long-Term Results of GH Treatment in Silver-Russell Syndrome (SRS): Do They Benefit the Same as Non-SRS Short-SGA? *J Clin Endocrinol Metab* 2016;101: 2105-12.

- Smith AS, Wiznitzer M, Karaman BA, et al. MRA detection of vascular occlusion in a child with progeria. *Am J Neuroradiol* 1993; 14: 441–3.
- Taimen P, Pflieger K, Shimi T, et al. A progeria mutation reveals functions for lamin A in nuclear assembly, architecture, and chromosome organization. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 20788-93.
- Tanner JM, Goldstein H, Whitehouse RH. Standards for children's height at age 2–9 years allowing for height of parents. *Arch Dis Child* 1970; 45: 755-62.
- Takenouchi T, Kosaki R, Niizuma T, et al. Macrothrombocytopenia and developmental delay with a de novo CDC42 mutation: Yet another locus for thrombocytopenia and developmental delay. *Am J Med Genet A* 2015 Nov;167: 2822–5.
- Tanaka T. Growth hormone treatment in Japan: past, present, and future. *Pediatr Endocrinol Rev PER* 2012; 10: 89-97.
- Tanaka T, Yokoya S, Seino Y, et al. Onset of puberty and near adult height in short children born small for gestational age and treated with GH: interim analysis of up to 10 years of treatment in Japan. *Clin Pediatr Endocrinol* 2015; 24: 15–25.
- Tartaglia M, Martinelli S, Stella L, et al. Diversity and functional consequences of germline and somatic PTPN11 mutations in human disease. *Am J Hum Genet* 2006 ; 78: 279–90.
- Tartaglia M, Mehler EL, Goldberg R, et al. Mutations in PTPN11, encoding the protein tyrosine phosphatase SHP-2, cause Noonan syndrome. *Nat Genet* 2001 Dec; 29: 465–8.
- Tassano E, Gamucci A, Celle ME, et al. Clinical and Molecular Cytogenetic Characterization of a de novo Interstitial 1p31.1p31.3 Deletion in a Boy with Moderate Intellectual Disability and Severe Language Impairment. *Cytogenet Genome Res* 2015; 146: 39-43.
- Tatsumi K, Miyai K, Notomi T, et al. Cretinism with combined hormone deficiency caused by a mutation in the *PIT1* gene. *Nat Genet* 1992; 1: 56-58.
- Thomas M, Beckers D, Brachet C, et al. Adult height after growth hormone treatment at pubertal onset in short adolescents born small for gestational age: results from a Belgian Registry-Based Study. *Int J Endocrinol* 2018; 64:21243.
- Thornton PS, Maniatis AK, Aghajanova E, et al. Weekly Lonapegsomatropin in Treatment-Naïve Children With Growth Hormone Deficiency: The Phase 3 heiGHt Trial. *J Clin Endocrinol Metab* 2021; 106: 3184-95.

- Thygesen P, Andersen HS, Behrens C, et al. Nonclinical pharmacokinetic and pharmacodynamic characterisation of somapacitan: A reversible non-covalent albumin-binding growth hormone. *Growth Horm IGF Res* 2017; 35: 8-16.
- Toni L, Dušátková P, Novotná D, et al. Short stature in a boy with atypical progeria syndrome due to *LMNA* c.433G>A[p.(Glu145Lys)]: apparent growth hormone deficiency but poor response to growth hormone therapy. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2019; 32: 775-9.
- Toni L, Kodytková A, Plachý L, et al. Dospělá výška dětí, které se narodily malé na svůj gestační věk (SGA) s malou výškou v dětství (SGA-SS). Výsledky léčby růstovým hormonem z dat české národní databáze REPAR. *Ces-slov Pediat* 2023; 78 (S3): 22-9.
- Toni L, Pádrová K, Plachý L, et al. Význam acidolabilní podjednotky (ALS) v etiologii a v diagnostice malého vzrůstu. *Ces-Slov Pediat* 2021; 75: 214-8.
- Toni L, Plachy L, Dusatkova P, et al. The genetic landscape of children born small for gestational age with persistent short stature (SGA-SS). *Horm Res Paediatr* 2023; doi: 10.1159/000530521.
- Ueki I, Ooi GT, Tremblay ML et al. Inactivation of the acid labile subunit gene in mice results in mild retardation of postnatal growth despite profound disruptions in the circulating insulin-like growth factor system. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 6868-73.
- van Dijk M, Bannink EMN, van Pareren YK, et al. Risk factors for diabetes mellitus type 2 and metabolic syndrome are comparable for previously growth hormone-treated young adults born small for gestational age (sga) and untreated short SGA controls. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92:160–5.
- van der Steen m, Lem AJ, van der Kaay DC, et al. Puberty and pubertal growth in GH-treated SGA children: effects of 2 years of GnRHa versus no GnRHa. *J Clin Endocrinol Metab* 2016; 101: 26964733.
- van Duyvenvoorde HA, Lui JC, Kant SG, et al. Copy number variants in patients with short stature. *Eur J Hum Genet EJHG* 2014; 22: 602-9.
- van Duyvenvoorde HA, van Setten PA, Walenkamp MJ, et al. Short stature associated with a novel heterozygous mutation in the insulin-like growth factor 1 gene. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95: 363-7.
- Van Pareren Y, Mulder P, Houdijk M, et al. Adult height after long-term, continuous growth hormone (GH) treatment in short children born small for gestational age: results of a

- randomized, double-blind, dose-response GH trial. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 3584–90.
- Vasques GA, Amano N, Docko AJ, et al. Heterozygous mutations in natriuretic peptide receptor-B (NPR2) gene as a cause of short stature in patients initially classified as idiopathic short stature. *J Clin Endocrinol Metab* 2013 Oct; 98: 1636-44.
 - Vasques GA, Arnhold IJ, Jorge AA. Role of the natriuretic peptide system in normal growth and growth disorders. *Horm Res Paediatr* 2014; 82: 222-9.
 - Vasques GA, Funari MFA, Ferreira FM, et al. IHH gene mutations causing short stature with nonspecific skeletal abnormalities and response to growth hormone therapy. *J Clin Endocrinol Metab* 2018; 103: 604-14.
 - Vasques GA, Hisado-Oliva A, Funari MF, et al. Long-term response to growth hormone therapy in a patient with short stature caused by a novel heterozygous mutation in NPR2. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2017; 30: 111-6.
 - Vicens-Calvet E, Espadero RM, Carrascosa A, et al. Longitudinal study of the pubertal growth spurt in children born small for gestational age without postnatal catch-up growth. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2002; 15: 381-8.
 - Voigt M, Fusch C, Olbertz D, et al. Analyse des Neugeborenenkollektivs der Bundesrepublik Deutschland. *Geburtshilfe Frauenheilkd.* 2006; 66(10): 956–70.
 - Wajnrajch MP, Gertner JM, Harbison MD, et al. Nonsense mutation in the human growth hormone-releasing hormone receptor causes growth failure analogous to the little (lit) mouse. *Nat Genet* 1996; 12: 88-90.
 - Wakeling EL, Brioude F, Lokulo-Sodipe O, et al. Diagnosis and management of Silver–Russell syndrome: first international consensus statement. *Nat Rev Endocrinol* 2017; 13: 105–124.
 - Walenkamp MJ, Karperien M, Pereira AM, et al. Homozygous and heterozygous expression of a novel insulin-like growth factor-I mutation. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 2855-64.
 - Wang SR, Jacobsen CM, Carmichael H et al. Heterozygous mutations in natriuretic peptide receptor-B (NPR2) gene as a cause of short stature. *Hum Mutat* 2015; 36: 474-81.
 - Wang YR, Xu NX, Wang J, et al. Kabuki syndrome: review of the clinical features, diagnosis and epigenetic mechanisms. *World J Pediatr* 2019; 15: 528-35.
 - Waters MJ. The growth hormone receptor. *Growth Horm IGF Res* 2016; 28: 6-10.

- Weise M, De-Levi S, Barnes KM, et al. Effects of estrogen on growth plate senescence and epiphyseal fusion. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 6871-6.
- Werner H, Stannard B, Bach MA. Regulation of insulin-like growth factor I receptor gene expression in normal and pathological states. *Adv Exp Med Biol* 1991; 293: 263-72.
- Wit JM, Kiess W, Mullis P. Genetic evaluation of short stature. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2011; 25:1-17.
- Wit JM, Oostdijk W, Losekoot M, et al. MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: Novel genetic causes of short stature. *Eur J Endocrinol* 2016; 174: 145-73.
- Woods KA, Camacho-Hübner C, Savage MO, et al. Intrauterine growth retardation and postnatal growth failure associated with deletion of the insulin-like growth factor I gene. *N Engl J Med* 1996; 335: 1363-7.
- Xu H, Simonet F, Luo ZC. Optimal birth weight percentile cut-offs in defining small- or large-for-gestational-age. *Acta Paediatr* 2010; 99: 550-5.
- Zelinska N, Iotova V, Skorodok J, et al. Long-acting C-terminal peptide-modified hGH (MOD-4023): Results of a safety and dose-finding study in GHD children. *J Clin Endocrinol Metab* 2017; 102: 1578-87.
- Zeve D, Regelman MO, Holzman IR, et al. Small at birth, but how small? The definition of SGA revisited. *Horm Res Paediatr* 2016; 86: 357-60.