

Univerzita Karlova

2. lékařská fakulta
Autoreferát disertační práce



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

Praha, 2024

Disertační práce byla vypracována v rámci *prezenčního* studia doktorského studijního programu Fyziologie a patofyziologie člověka na *Pediatrické klinice 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy*.

Školitel: *prof. MUDr. Jan Lebl, CSc., Pediatrická klinika*

Konzultant: *doc. MUDr. Štěpánka Průhová, Ph.D., Pediatrická klinika*

Oponenti:

Obhajoba se bude konat před komisí pro obhajoby oborové rady Fyziologie a patofyziologie člověka dne v odhod.

Předsedou komise pro obhajobu disertační práce byl jmenován:

Předseda oborové rady a garant doktorského studijního programu:

Děkan fakulty: *prof. MUDr. Marek Babjuk, CSc.*

Tato práce vznikla za podpory grantů *AZV č. 18-07-00283 a GAUK č. 408120*.

S disertační prací je možno se seznámit na Oddělení Ph.D. studia děkanátu 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy, V Úvalu 84, 150 06 Praha 5 (tel. 224 435 836)

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 výšvihu, 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 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 typu 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 a given gestational age and sex. These are referred to as small for gestational age (SGA). This condition arises as a result of 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 will develop a growth spurt within the first two years of life, while the remaining 10% will 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.

An additional sub-project 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

Obsah

1. Úvod do problematiky	8
1.1. Poruchy imprintingu a metylační poruchy. Silver-Russellův syndrom a příbuzné syndromy.	10
1.2. Poruchy osy GH - IGF-1 - růsová ploténka	11
1.3. Epifyzární růstová ploténka a její regulace	14
1.4. Chromozomální aberace a variabilita počtu kopií	17
2. Hypotézy disertační práce	18
3. Cíle disertační práce	20
4. Soubory pacientů a metodiky jednotlivých studií	21
4.1. Klinická kohorta dětí SGA-SS léčených na Pediatrické klinice v Motole v letech 2008-2018	21
4.2. Genetické testování	21
4.3. Stanovení koncentrace ALS a její diagnostický význam.	22
4.4. Léčba růstovým hormonem u dětí SGA-SS s poruchou genu NPR2	22
4.5. Kazuistická studie u chlapce SGA-SS s Hutchinson-Gilfordovou progerií	23
5. Výsledky	24
5.1 Základní klinická kohorta dětí SGA-SS	24
5.3. Léčba růstovým hormonem u dětí SGA-SS s poruchou genu <i>NPR2</i>	25
5.4. Kazuistická studie u chlapce SGA-SS s Hutchinson-Gilfordovou progerií.	25
6. Diskuse	26
7. Závěr	29
8. Souhrn disertační práce	29
9. Seznam literatury	32

1. Úvod do problematiky

Přibližně 5 % dětí se rodí s porodní hmotností a/nebo délkou nižší než -2 směrodatné odchylky (SD) ve srovnání s normou pro daný gestační věk. Tyto děti označujeme jako malé na svůj gestační věk (small for gestational age; SGA) (Lee, 2001). Příčinou SGA je většinou intrauterinní růstová restrikce (intrauterine growth restriction; IUGR). I když pojmy SGA a IUGR se částečně překrývají, někdy se zaměňují či užívají jako synonyma, je mezi nimi obsahový rozdíl. 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 označujeme jako „small for gestational age – short stature“ (SGA-SS), někdy také jako postnatální růstové selhání navazující na intrauterinní růstovou restrikci. Z observačních studií je známo, že děti SGA-SS zůstanou malé po celé dětství a dosáhnou významně nižší dospělé tělesné výšky. Proto na základě studií účinnosti a bezpečnosti Evropská léková agentura (EMA) v roce 2003 schválila stav SGA-SS jako indikaci pro léčbu růstovým hormonem (GH) (Clayton, 2007).

Etiologie růstového selhání navazujícího na SGA není zcela objasněna a je nepochybně 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 lidského jedince začíná již *in utero*, jedná se

s vyšší pravděpodobností o významnou genetickou predispozici ve srovnání s dětmi s postnatálním rozvojem růstové poruchy.

K objasnění genetické etiologie poruchy 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 dalších částech tohoto oddílu uvádíme přehled významných geneticky podmíněných příčin SGA-SS – poruchy imprintingu, metylační poruchy a přehled základních monogenně podmíněných poruch spojených s dysregulací 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. Jednou z častých imprintingových poruch spojenou 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, 2007).

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).

Příčinou dalších 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). Ojediněle je příčinou SRS patogenní varianta genů *IGF2* (Begemann, 2015) nebo *CDKN1C* (Binder, 2020). U dalších 40 % pacientů zůstává genetická etiologie SRS zatím neobjasněna.

Vedle UPD7 bylo popsáno několik dalších UPD syndromů spojených s malou výškou a typickým fenotypem. Jedním z nich je syndrom Templeové spojený s abnormitou 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). 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).

1.2. Poruchy osy GH - IGF-1 - růsová ploténka

Růstový hormon

I když růstový hormon hraje v prenatálním vývoji menší úlohu než růstové faktory IGF-1 a IGF-2, je popsána řada stavů spojených s poruchou sekrece i působení (signalizace) růstového hormonu, které vedou k zpomalení intrauterinního růstu. Děti s deficitem růstového hormonu mají nižší průměrnou porodní délku (-0,6 SD) i porodní hmotnost (-0,9 SD). Deficit růstového hormonu může být způsoben patogenními variantami řady genů, které se

podílejí na morfogenezi či diferenciaci hypofýzy nebo které kódují sekvenci příslušných hormonů a jejich receptorů. Nejčastější jsou poruchy genů *PROPI*, *GHI* a *GHRH*. Postnatální růstové selhání je u dětí s deficitem růstového hormonu různě závažné, efekt léčby růstovým hormonem bývá zpravidla příznivý (Mehta, 2005).

Patogenní varianty genu kódující receptor růstového hormonu (*GHR*) vedou k necitlivosti na růstový hormon, tzv. Laronovu syndromu. Ten je charakterizován středně těžkou až těžkou poruchou růstu, poněkud disproportionální postavou s kratšími končetinami a hypoplázií střední části obličeje, pro kterou je typický zejména vpáčený kořen nosu. Patogenní varianty v genech *STAT5b*, *STAT3*, *IKBKB*, a *IL2RG* jsou též spojeny s necitlivostí na růstový hormon a současně s rozvojem závažného imunopatologického stavu, protože zasahují také do přenosu signálu v rámci imunitní odpovědi (Finken, 2018).

IGF-1, IGF-2

Účinek růstového hormonu na periferní tkáň je zprostředkován především inzulinu podobnými růstovými faktory 1 a 2 (*IGF-1*, *IGF-2*). Oba 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. 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 a těžkým intelektovým deficitem (Woods, 1996, Walenkamp, 2005, Netchine, 2009). Dále byly popsány dvě rodiny s

heterozygotními patogenními variantami *IGF1*, jejichž fenotyp byl mírnější (van Duyven, 2010, Fuqua, 2015).

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 obtížné krmení, 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).

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).

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).

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 splňovaly kritéria SGA-SS. 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 pro cílové tkáně (Dauber, 2016).

1.3. Epifyzární růstová ploténka a její regulace

Poruchy parakrinní regulace

Genové defekty spojené s parakrinní signalizací v oblasti epifyzární 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 prenatalně či hned po narození; mírnější poruchy zůstávají nediagnostikovány 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: většina skeletálních dysplazií je postupně „asymetrická“ – končetiny jsou relativně zkrácené proti trupu, používá se označení „short-limbed dysplasias“ (Bonafe, 2015). Asymetrie se ale zvyrazňuje s věkem a v prvních letech života nemusí být patrná. Mezi klíčové parakrinní regulátory epifyzární růstové ploténky patří fibroblastové růstové faktory (FGFs) a natriuretický peptid typu C.

Patogenní varianty v genu *FGFR3*, který kóduje třetí typ receptoru pro fibroblastový růstový faktor, ovlivňují růst kostí do délky a vedou k celé šíři fenotypů – od achondroplazie přes hypochondroplazii až k symetrické poruše růstu. Děti s hypochondroplazií mají rhizomelické zkrácení končetin a relativní makrocefalii. Porodní délka a hmotnost mohou být rovněž sníženy (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 *NPR2* způsobují těžkou akromezomelickou dysplazii typu Maroteaux. Růstová porucha nositelů patogenní heterozygotní varianty 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). Heterozygotní varianty *NPR2* zodpovídají zřejmě až za 6 % případů dětí SGA-SS a familiárně malého vzrůstu (Olney, 2006).

Poruchy tvorby extracelulární matrix

Pro optimální funkci epifyzární růstové ploténky jsou klíčové také jednotlivé složky chrupavčité extracelulární matrix. Patří mezi ně jednotlivé typy kolagenu, agrekan, fibrilin, matrilin a další.

Bílkovinnou frakci proteoglykanu agrekan kóduje gen *ACAN*. Jeho patogenní varianty vedou k fenotypu mírné skeletální dysplázie, spondyloepifyzární dysplázie typu Kimberley nebo pouze malého vzrůstu bez skeletálních abnormalit, 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 (Gkourogiani, 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).

Poruchy intracelulární regulace

Relativně častou příčinou malého vzrůstu u dětí jsou patogenní varianty genu *SHOX*, umístěného v pseudoautozomální oblasti X chromozomu, který kóduje SHOX protein (Short stature HOmeoboX-containing gene). *SHOX* gen nepodléhá X-inaktivaci a za fyziologických okolností je u obou pohlaví přítomen ve dvou funkčních kopiích (Rao, 1997). Bialelické inaktivační mutace způsobují závažnou Langerovou mezomelickou dysplázií. Heterozygotní mutace, delece či duplikace způsobují mírnější Léri-Weilův syndrom (často s klasickou Madelungovou deformitou předloktí) anebo pouze varianty růstu typu SGA, resp. idiopatického či familiárního malého vzrůstu bez známek kostní dysplázie (Benito-Sanz, 2011).

Dalším významným intracelulárním regulátorem proliferace a diferenciaci chondrocytů růstové ploténky je signální kaskáda Ras/MAPK. Úkolem Ras/MAPK signální kaskády je přenášet informaci mezi membránovým receptorem pro růstové faktory a buněčným jádrem. V buněčném jádře následně reguluje transkripci 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).

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 (nanismus, dwarfismus)“. 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 nasměřovat k cílenému genetickému testování. U některých nemusí být fenotyp nápadný a jedinou patrnou patologií je stav SGA-SS (Finken, 2018).

1.4. Chromozomální aberace a variabilita počtu kopií

Turnerův syndrom může být diagnostikován již prenatálně ultrazvukem 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 prenatální 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).

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.

4.2. 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).

4.3. 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 růstovým hormonem analyzovali hladiny a vzájemnou korelaci všech tří složek ternárního komplexu. U tří dětí s nízkou hladinou ALS jsme následně sekvenovali gen *IGFALS*. Vliv podání růstového hormonu na složky ternárního komplexu jsme studovali u 23 dětí s GHD nebo SGA-SS neurčené etiologie.

4.4. 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).

4.5. 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 a magnetická rezonance (MR) mozku ukázala obraz „empty sella“. Léčba růstovým hormonem 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.

4.6. 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.

4.7. 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.

4.8. 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 somatrogon, 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 somatrogonem 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 somatrogon jednou za týden. Rodiče a starší děti hodnotili standardními dotazníky zátěž, jakou léčba pro dítě a rodiče představuje.

5. Výsledky

5.1 Základní klinická kohorta dětí SGA-SS

Genetickou etiologii jsme objasnili u 74 ze 176 (42 %) dětí. U 12 ze 74 (16 %) pacientů byly potvrzeny patogenní nebo pravděpodobné patogenní (P/LP) genové varianty ovlivňující vývoj hypofýzy nebo sekreci růstového hormonu (*LHX4*, *OTX2*, *PROKR2*, *PTCH1*, *POU1F*, *GHSR*) a/nebo osu GH-IGF-1 a osu IGF-2 (*IGFALS*, *IGF1R*, *STAT3*, *HMGA2*). Dvě ze 74 dětí (3%) měly P/LP genové varianty v ose štítné žlázy (*TRHR*, *THRH*). P/LP genové varianty ovlivňující růstovou ploténku byly odhaleny u 31 ze 74 (42%), z toho u 17 dětí v genech kódujících složky chrupavčité matrix (*ACAN* [ve čtyřech], *COL1A1*, *COL1A2*, *COL2A1*, *COL9A1*, *COL9A2*, *COL11A1*, *FLNB*, *MATN3*), u 7 byla

porušena parakrinní regulace chondrocytů (*FGFR3*, *FGFR2*, *NPR2*) a 7 mělo defekty genu *SHOX*. U 12 ze 74 (16 %) byly odhaleny P/LP varianty v genech zodpovědných za základní intracelulární a intranukleární procesy (*CDC42*, *KMT2D*, *LMNA*, *NSD1*, *PTPN11*, *SRCAP*, *SON*, *SOS1*, *SOX9*, *TLK2*). Silver-Russellův syndrom byl diagnostikován u 12/74 (16 %) (11p15, UPD7) a různé chromozomální aberace byly identifikovány u 5/74 (7 %) dětí.

Celkově v naší kohortě 40 ze 74 pacientů (54 %) s pozitivním genetickým nálezem nemělo žádné nápadné dysmorfické rysy.

5.2. Studie ALS

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 $\mu\text{g/l}$) neprokázala patogenní ani jinou variantu genu. Vliv GH na vzestup hladiny IGF-1 (213 % výchozí hodnoty) je výraznější než na IGFBP-3 (132 %; $p<0,0001$) a ALS (139 %; $p<0,0001$).

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.

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

U 5/87 dětí s FSS (5,7 %) byla identifikována patogenní či pravděpodobně patogenní varianta v genu *NPR2*. Rychlost růstu v prvním roce léčby GH se zvýšila o 3,6 až 4,2 cm/rok; výška během 5 let léčby stoupla o 1,2 až 1,8 SD.

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

Podle dostupných informací jsme poprvé u dítěte s APS prokázali obraz částečné „empty selly“ a nedostatek růstového hormonu, který může přispívat k poruše růstu. Terapie růstovým hormonem nedokázala zlepšit dlouhodobý výsledek růstu.

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

Léčba GH u kohorty dětí SGA-SS z databáze REPAR vedla do okamžiku ukončení léčby k průměrnému přírůstku výškového skóre směrodatné odchylky (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.

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

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.

5.7. První zkušenosti s dlouhodobě působícím růstovým hormonem

Celkové skóre zásahu léčby do života bylo během podávání somatogonu jednou týdně významně menší ve srovnání s každodenními injekcemi růstového hormonu (8,63 proti 24,13 bodů). Zlepšení bylo zřejmé ve většině parametrů, zejména v ukazatelích „spokojenost s celkovou zkušeností z léčby“ a „přání pokračovat ve stejném léčebném schématu“.

6. Diskuse

V naší hlavní studii jsme zkoumali metodami NGS 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 (SRS) 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 dvou 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 také měli několik méně očekávaných nálezů. Růstový hormon (GH) je nezbytný pro normální růst a děti s nedostatkem GH mohou mít těžkou růstovou poruchu. Obecně se však má za to, že GH ovlivňuje hlavně postnatální fázi růstu a děti s nedostatkem GH by se proto měly rodit s normálními parametry. V rozporu s tímto konceptem jsme v naší studijní kohortě našli kauzální genetické varianty v genech, které ovlivňují vývoj hypofýzy nebo přímo produkci GH 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.

Dalším zajímavým výsledkem byla patogenní varianta nalezená 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 prenatální a postnatální růst je ovlivněn osou štítné žlázy.

Podprojektem našeho výzkumu bylo zkoumání acidolabilní podjednkty (ALS) a posouzení účelnosti jejího eventuelní rutinní stanovení při sledování efektu léčby růstovým hormonem. Naše výsledky ukázaly, že rutinní stanovení ALS má 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 měli možnost studovat 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 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 dlouhodobě působícím růstovým hormonem (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 prokázalo, že děti a jejich rodiny vnímají možnost léčit přípravkem LAGH děti i rodiče příznivě

7. Závěr

Naše studie objasnila genetickou etiologii u 42 % SGA-SS dětí z geneticky relativně homogenní, non-konsanguinní populace. Výsledky ukazují komplexní etiologii malého vzrůstu, na které se podílejí všechny tři klíčové úrovně regulace růstu – endokrinní systém, struktura a funkce růstových plotének a fundamentální procesy intracelulární regulace a signalizace. Genetický nález poskytuje nejen jasné vysvětlení příčiny malého vzrůstu, ale také umožňuje zaměřit se na možné 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, kdy 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, které syndrom potvrdilo.

Zajímavým doplněním projektu je naše první 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 dospělé 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 literatury

- 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
- Begemann M, Zirn B, Santen G, et al. Paternally Inherited *IGF2* mutation and growth restriction. *N Engl J Med*. 2015; 373: 349-56
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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

- 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- Lee PA, Chernausek 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

- 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
- Lebl J, Kolouskova S, Toni L, et al. Syndrom Noonanové a další RASopatie: Etiologie, diagnostika a terapie. *Ces-Slov Pediat* 2020; 75: 219-26
- Le Roith D, Bondy C, Yakar S, et al. The somatomedin hypothesis: 2001. *Endocr Rev* 2001; 22: 53-74
- 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
- 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
- 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
- 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

- 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
- 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
- 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.
- 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
- 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
- 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

- 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
- 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
- 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