

Adam Dudek

Analiza kliniczna, biochemiczna oraz poszukiwanie delecji mitochondrialnego DNA u dzieci z somatotropinową niedoczynnością przysadki z województwa podkarpackiego, nieskutecznie leczonych ludzkim rekombinowanym hormonem wzrostu.

**Rozprawa doktorska
na stopień
doktora nauk medycznych**

Promotor: Prof. UM dr hab. n. med. Marek Niedziela

Klinika Endokrynologii i Reumatologii Dziecięcej
II Katedra Pediatrii
Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Poznań 2012

SPIS TREŚCI

SPIS TREŚCI	2
OBJAŚNIENIA SKRÓTÓW	4
SPIS TABEL	6
SPIS RYCIN	7
I. WSTĘP	8
1. Wzrost i jego znaczenie	8
2. Fizjologia wzrastania	9
2.1 <i>Etapy wzrastania</i>	10
3. Ocena wzrastania	11
4. Czynniki wpływające na wzrost	12
5. Niski wzrost	14
5.1 <i>Przyczyny niskorosłości</i>	15
6. Genetyczna kontrola wzrastania	16
7. Hormon wzrostu	17
7.1 <i>Działanie hormonu wzrostu</i>	19
8. Somatotropinowa niedoczynność przysadki	22
8.1 <i>Grupy ryzyka i objawy chorobowe</i>	25
9. Ocena wydzielania GH	26
10. Test generacji IGF1	26
11. Leczenie niedoboru hormonu wzrostu	27
12. Ocena skuteczności terapii rhGH	28
13. Cytopatie mitochondrialne	29
14. Zespół Kearns–Sayre'a	31
14.1 <i>Objawy okulistyczne</i>	32
14.2 <i>Objawy neurologiczne</i>	32
14.3 <i>Objawy kardiologiczne</i>	33
14.4 <i>Objawy mięśniowe</i>	33
14.5 <i>Objawy endokrynologiczne</i>	34
14.6 <i>Hormon wzrostu a KSS</i>	35
II. ZAŁOŻENIA PRACY	36
III. CELE PRACY	37
IV. PACJENCI I METODY	38

V. WYNIKI	45
1. Charakterystyka grupy badanej	45
2. Wyniki badań molekularnych	56
3. Opis pacjenta nr 24 ze zdiagnozowanym zespołem Kearns-Sayre'a	62
3.1. <i>Chronologia poszczególnych schorzeń u pacjenta nr 24</i>	62
3.2. <i>Zaburzenia hematologiczne</i>	63
3.3. <i>Zaburzenia endokrynologiczne</i>	63
3.4. <i>Zaburzenia okulistyczne</i>	68
3.5. <i>Zaburzenia kardiologiczne</i>	69
3.6. <i>Zaburzenia neurologiczne</i>	70
3.7. <i>Zaburzenia laryngologiczne</i>	70
3.8. <i>Zaburzenia metaboliczne</i>	71
3.9. <i>Zaburzenia psychofizyczne</i>	71
VI. DYSKUSJA	74
VII. WNIOSKI	90
VIII. STRESZCZENIE	91
IX. SUMMARY	94
X. PIŚMIENNICTWO	96

OBJAŚNIENIA SKRÓTÓW

ALL	ostra białaczka limfoblastyczna (ang. acute lymphoblastic leukemia)
ALS	labilna kwasowo podjednostka (ang. acid-labile subunit)
ATP	adenozynotrifosforan (ang. adenosine triphosphate)
DNA	kwas dezoksyrybonukleinowy (ang. deoxyribonucleic acid)
EBV	wirus Epsteina-Barr (ang. Epstein-Barr Virus)
GH	hormon wzrostu (ang. growth hormone)
GHBP	białko wiążące hormon wzrostu (ang. growth hormone binding protein)
GHD	niedobór hormonu wzrostu (ang. growth hormone deficiency)
GHIH	somatostatyna (ang. growth hormone inhibiting hormone)
GHR	receptor dla hormonu wzrostu (ang. growth hormone receptor)
GHRH	somatoliberyna (ang. growth hormone releasing hormone)
HDL	lipoproteiny o wysokiej gęstości (ang. high density lipoproteins)
ht	wzrost (ang. height)
IGF-1	insulinopodobny czynnik wzrostu 1 (ang. insulin-like growth factor 1)
IGF-1R	receptor insulinopodobnego czynnika wzrostu 1 (ang. insulin-like growth factor 1 receptor)
IGFBP-3	białko wiążące IGF-1 (ang. IGF binding protein)
IRS-1	substrat receptora insuliny 1 (ang. insulin receptor substrate 1)
IUGR	hipotrofia wewnątrzmaciczna (ang. intrauterine growth retardation)
JAK 2	kinaza tyrozynowa Janusa 2 (ang. tyrosine kinase Janus 2)
KSS	Zespół Kearns-Sayre'a
KT	tomografia komputerowa
LDL	lipoproteiny o niskiej gęstości (ang. low density lipoproteins)
MAPK	kinaza białka aktywowanego mitogenem (ang. mitogen activated protein kinase)
MR	rezonans magnetyczny (ang. magnetic resonance)
mtDNA	mitochondrialny DNA
NSD	zaburzenia neurosekrecyjne (ang. neurosecretory dysfunction)
OUN	ośrodkowy układ nerwowy
PEO	zewnętrzna, postępująca oftalmoplegia (ang. progressive external opthalmoplegia)
PI-3K	kinaza fosfatydyloinozytolu-3 (ang. phosphoinositide 3-kinase)

PRL	prolaktyna
rhGH	ludzki rekombinowany hormon wzrostu (ang. recombinant human growth hormone)
RNA	kwas rybonukleinowy (ang. ribonucleic acid)
SCID	ciężkie, złożone niedobory odporności (ang. severe combined immunodeficiency)
SD	odchylenie standardowe (ang. standard deviation)
SDS	wynik odchylenia standardowego (ang. standard deviation score)
SGA	noworodek mały dla wieku ciążowego (ang. small for gestational age)
SHOX	homeotyczny gen niskiego wzrostu (ang. short stature homeobox)
SNP	somatotropinowa niedoczynność przysadki
SOCS	supresor sygnalizacji cytokin (ang. suppressor of cytokine signaling)
STAT	białko przekazujące sygnał i aktywujące transkrypcję (ang. signal transducer and activator of transcription)
TG/IGF-1	test generacji IGF-1
th	wzrost docelowy (ang. target height)
TSH	hormon tyreotropowy (ang. thyroid stimulating hormone)
USG	badanie ultrasonograficzne
WK	wiek kostny
WM	wiek metrykalny
WNP	wielohormonalna niedoczynność przysadki
ZT	zespół Turnera

SPIS TABEL

Tab. 1 Działanie narządowe hormonu wzrostu	22
Tab. 2 Etiologia somatotropinowej i/lub wielohormonalnej niedoczynności przysadki	23
Tab. 3 Zestawy starterów użytych do analizy molekularnej mitochondrialnego DNA pacjentów oraz wielkość prawidłowych produktów amplifikacji	42
Tab. 4 Profil termiczny reakcji PCR wykorzystywany do detekcji delecji w mtDNA pacjentów	43
Tab. 5 Profil termiczny reakcji Real-Time PCR wykorzystywany do ilościowej analizy mitochondrialnego DNA pacjentów	43
Tab. 6 Zestawy starterów wykorzystywane w ilościowej analizie mtDNA techniką Real-Time PCR	43
Tab. 7 Sekwencje nukleotydowe starterów wykorzystywanych w badaniach molekularnych	44
Tab. 8 Grupa badana z uwzględnieniem płci	45
Tab. 9 Dzieci z małą urodzeniową masą ciała w grupie badanej	45
Tab. 10 Charakterystyka auksologiczna, kliniczna i hormonalna grupy badanej	46
Tab. 11 Wiek rozpoczęcia leczenia rhGH grupy badanej	48
Tab. 12 <i>Nadganianie wzrostu</i> w trakcie leczenia (htSDS) grupy badanej	48
Tab. 13 Wiek kostny w poszczególnych okresach leczenia grupy badanej	49
Tab. 14 Stosunek wieku kostnego do wieku metrykalnego w grupie badanej	50
Tab. 15 Wskaźnik PAH (SDS) i jego korelacja z thSDS w grupie dziewczynek	51
Tab. 16 Wskaźnik PAH (SDS) i jego korelacja z thSDS w grupie chłopców	51
Tab. 17 Współistniejące choroby i objawy chorobowe w grupie badanej	53
Tab. 18 Porównanie całkowitego poziomu mtDNA pacjenta nr 24 oraz grupy kontrolnej	61
Tab. 19 Analiza poziomu heteroplazmii u pacjenta nr 24	61
Tab. 20 Charakterystyka hormonalna i biochemiczna pacjenta z zespołem Kearns-Sayre'a	64
Tab. 21 Ocena auksologiczna, hormonalna, wiek kostny oraz przebieg leczenia pacjenta z zespołem Kearns-Sayre'a	67

SPIS RYCIN

Ryc. 1 Schemat podwzgórzowo-przysadkowej osi wzrastania i czynników związanych z jej działaniem	17
Ryc. 2 Struktura przestrzenna receptora GHR i jego zmiana po związaniu z GH	18
Ryc. 3 Regulacja bioaktywności IGF-1	20
Ryc. 4 Transdukcja sygnału indukowanego przez hormon wzrostu	21
Ryc. 5 Zaburzenia związane z nieprawidłowym przekazem sygnału indukowanego przez hormon wzrostu	24
Ryc. 6 Schematyczna reprezentacja położenia starterów do reakcji PCR wykorzystanych w poszukiwaniu delecji w mitochondrialnym DNA	42
Ryc. 7 Poziomy IGF-1 w grupach badanych	52
Ryc. 8 Wzrastanie dziewczynek grupy badanej	54
Ryc. 9 Wzrastanie chłopców grupy badanej	55
Ryc. 10 Żel agarozowy prezentujący wynik reakcji nr 3 u 10 z 32 badanych pacjentów w celu wykrycia delecji w mtDNA	57
Ryc. 11 Schemat położenia wykrytej delecji na tle cząsteczki mitochondrialnego DNA	58
Ryc. 12 Porównanie sekwencji nukleotydowych cząsteczki mitochondrialnego DNA (mtDNA) oraz produktu PCR pacjenta nr 24 (pacjent) uzyskanej w wyniku sekwencjonowania	59
Ryc. 13 Wykres amplifikacji produktów reakcji Real-Time PCR pacjenta nr 24 z analizy ilościowej całkowitego poziomu mtDNA oraz poziomu heteroplazmii	60
Ryc. 14 Wiek wystąpienia poszczególnych chorób i objawów klinicznych u pacjenta nr 24 z rozpoznaniem zespołu Kearns-Sayre'a	62
Ryc. 15 Wzrastanie pacjenta nr 24 z zespołem Kearns-Sayre'a	66
Ryc. 16 Zdjęcie twarzy pacjenta nr 24 wykonane w wieku 12 lat (rozpoznanie KSS)	72
Ryc. 17 Zdjęcie twarzy pacjenta nr 24 wykonane w wieku 16 lat (stan po założeniu rozrusznika serca)	73

I. WSTĘP

1. Wzrost i jego znaczenie.

Granice ludzkich oczekiwań i możliwości w minionych epokach, wiekach i latach wyznaczone były na coraz wyższych poziomach. Także wzrost człowieka stopniowo zwiększał się, kształtując coraz bardziej harmonijnie sylwetkę *homo sapiens*. Wysokość ciała stawała się coraz częściej wyznacznikiem siły i urody. Dochodząc do współczesności, ważnym elementem sylwetki najpiękniejszych kobiet i mężczyzn jest wzrost, zwykle wyższy od średniej populacyjnej. Z tego też powodu istnieje powszechna chęć bycia wysokim. W 1971r. Feldman wprowadził określenie **heightism** co wyraża uprzedzenie lub dyskryminację związaną ze wzrostem i odnosi się do leczenia nie tylko wzrostu niskiego, ale również wzrostu wysokiego [1]. Bycie niskim wiąże się często z istotnymi kompleksami. Charakterystyczna dla ludzkich zachowań jest gorsza ocena i mniejsze poważanie ludzi niskich, a także niższa jest ich samoocena. Osoby niskie przegrywają w konkurencji z wyższymi, mimo że ich wartości intelektualne czy moralne, umiejętności i cechy korzystne dla powierzanego im zadania nie są gorsze niż wyższych, często zaś nawet lepsze. Rzadziej udaje się osobom niskim osiągnąć znaczącą pozycję w hierarchii społecznej i zawodowej [2]. Wykazano, że dzieci o niskim wzroście częściej mają problemy z rozwojem własnej osobowości, z poczuciem własnej wartości oraz relacjami społecznymi. Częściej w porównaniu z rówieśnikami o prawidłowym wzroście popadają w kompleksy, towarzyszą im lęki, depresje oraz trudności w relacjach z rówieśnikami [3,4]. W tym też m.in. należy upatrywać zwiększonej liczby dzieci niskorosłych konsultowanych w Poradniach Endokrynologicznych. Rodzice tych pacjentów mają nadzieję na pomoc i oczekują skutecznego sposobu leczenia ich dziecka. Domeną pediatrii jest zdrowie i choroby człowieka w wieku dziecięcym i rozwojowym (do 18 roku życia) i z tym związana jest wiedza o wzrastaniu i rozwoju. Personel medyczny (lekarz, pielęgniarka, psycholog) sprawujący opiekę nad dziećmi, musi znać prawidłowy przebieg rozwoju dziecka z jego przełomowymi okresami. Odchylenia od stanu prawidłowego, muszą być jak najwcześniej rozpoznawane, aby zidentyfikować ich przyczynę i podjąć odpowiednie postępowanie. Przyczyn niskorosłości jest bardzo wiele, choć najczęściej ta nieprawidłowość kojarzona jest z niedoborem hormonu wzrostu. Możliwości jakie przyniosło ostatnie 20-lecie, tj. większa dostępność

leczenia ludzkim rekombinowanym hormonem wzrostu (rhGH), spowodowały, że najmniejsze dzieci w danej grupie wiekowej - przedszkolnej bądź szkolnej – kierowane są do gabinetów endokrynologicznych z nadzieją poprawy ich wzrostu. Jest to z pewnością zjawisko bardzo pozytywne, chociaż niejednokrotnie brakuje wcześniejszej analizy tempa wzrastania w określonych odstępach czasowych. Z drugiej strony można również zauważyć, że pomimo długiego okresu obserwacji nie wykazano należytej czujności i nie podjęto poszukiwań przyczyny niskorostłości. Zwykły pomiar wzrostu będący najprostszym badaniem może być pierwszym sygnałem o nieprawidłowościach w organizmie dziecka, a wykonywany w określonych odstępach czasu pozwala ocenić tempo wzrastania, będące wyznacznikiem zdrowia lub choroby [5]. Niedobór wzrostu może być jedynym początkowym objawem wielu chorób ogólnych (systemowych) o różnej etiologii [6]. Zaniedbanie pomiaru wzrostu dziecka przez pediatrę lub lekarza rodzinnego może opóźnić rozpoznanie istotnych zaburzeń zdrowotnych u dziecka, a ostatecznie w niektórych przypadkach uniemożliwić poprawę wzrostu końcowego. Dlatego tak ważne są, a niedoceniane często strony w Książeczce Zdrowia Dziecka z badaniami bilansowymi i siatkami centyłowymi.

Oczywiście niski wzrost nie musi wiązać się ze współistnieniem jakiejś określonej choroby ogólnej. Może on bowiem odzwierciedlać rodzinnie niższy potencjał wzrostowy, ale aby bezpiecznie monitorować dalszy rozwój dziecka trzeba wykluczyć szereg patologicznych zjawisk, które mogą upośledzać proces wzrastania. Niski wzrost rodziców nie oznacza, że ich dziecko także musi mieć niski wzrost i nie może usprawiedliwiać zaniechania postępowania medycznego w takich przypadkach.

2. Fizjologia wzrastania

Od początku życia, od momentu zapłodnienia komórki jajowej, rozpoczyna się wzrastanie młodego organizmu, które kończy się dopiero po kilkunastu latach osiągnięciem wzrostu ostatecznego i dojrzałości fizycznej. Największa w życiu osobniczym człowieka szybkość wzrastania (= tempo wzrastania) przypada na okres prenatalny, osiągając ok. 20 tygodnia ciąży 2,5 cm/tydzień (ok. 130 cm/rok) [7]. Wzrastanie w tym okresie jest istotnym czynnikiem prognostycznym rozwoju postnatalnego. Ostateczna wysokość ciała zależy w znacznym stopniu od

intensywności rozwoju w okresie płodowym oraz od potencjału genetycznego [8]. Obserwacja należy w tym okresie do ginekologów i położników, którzy pierwsi mogą zauważyć nieprawidłowości rozwoju wewnątrzmacicznego. Z chwilą urodzenia się dziecka to neonatolodzy, pediatrzy i lekarze rodzinni monitorują proces wzrastania młodego organizmu i tym samym są odpowiedzialni za wczesną diagnostykę niskorosłości. Nie należy jednak zapominać, że to na rodzicach spoczywa największy ciężar odpowiedzialności w zakresie opieki nad ich dzieckiem, a lekarz służy pomocą w tym aby dziecko osiągnęło odpowiedni dobrostan fizyczny i psychiczny.

2.1 Etapy wzrastania

Według modelu ICP (infancy, childhood, puberty) [2,9] okres od urodzenia do zakończenia procesu wzrastania i dojrzewania dzielimy na etapy, częściowo nakładające się na siebie, biorąc pod uwagę rozwój somatyczny i psychoruchowy:

- okres niemowlęcy – do 1 r.ż.
- okres dziecięcy – między 1 r.ż. a początkiem dojrzewania, w tym okres prepubertalny
- okres dojrzewania – od chwili pojawienia się cech dojrzewania do osiągnięcia stanu pełnego dojrzewania; nieodłącznie związany jest ze skokiem pokwitaniowym i osiągnięciem wzrostu ostatecznego.

W pierwszym roku życia niemowlę bardzo szybko zwiększa swoją masę ciała, średnio 3-krotnie w stosunku do masy urodzeniowej, a długość ciała wzrasta około 50% w stosunku do początkowej. Bardzo efektywne jest tempo wzrastania w ciągu dwóch pierwszych miesięcy życia i wynosi ok. 30 cm/rok, stopniowo zmniejszając się do 1/3 tej wartości w następnych 10 miesiącach życia. W 2 i 3 roku życia następuje dalsze zwolnienie szybkości wzrastania [10]. W wieku przedszkolnym przyrosty masy i wysokości ciała są względnie stałe i wynoszą odpowiednio około 2 kg i około 6 cm/rok. To stabilne wzrastanie utrzymuje się przez okres wczesnego wieku szkolnego, osiągając nieco niższy poziom krótko przed skokiem pokwitaniowym, występującym około 10-11 roku życia u dziewcząt i 13-14 roku życia u chłopców. W przebiegu dojrzewania tempo wzrastania u dziewcząt narasta do około 8 cm/rok, a u chłopców do około 12 cm/rok, a często nawet więcej [11]. Po okresie skoku pokwitaniowego wysokość i masa ciała wzrastają nieznacznie, osiągając ostatecznie proporcje i wymiary tzw. młodego dorosłego.

3. Ocena wzrastania.

Precyzyjna ocena rozwoju ma istotne znaczenie dla opieki zdrowotnej niemowląt, dzieci i młodzieży. Wyraźne spowolnienie tempa wzrastania stanowi podstawę do poszukiwań nieprawidłowości zdrowotnych. Także zbyt szybkie wzrastanie musi budzić podejrzenie patologii.

Od dokładności wykonania poszczególnych pomiarów zależy prawidłowa interpretacja danych rozwojowych dziecka. Często pomiary wykonywane są w różnych warunkach, przez różne osoby, wielokrotnie na różnorodnym sprzęcie. Wiadomym jest, że technika pomiaru może spowodować znacząco duży błąd w ocenie danej cechy. Badania antropometryczne powinny być więc dokonywane za każdym razem w możliwie jak najbardziej zbliżonych do siebie i standaryzowanych warunkach. Nawet gdy wykwalifikowany personel użyje dokładnego przyrządu, istnieje nieznaczna różnica pomiędzy poszczególnymi, powtarzanimi po sobie pomiarami [12]. Tak więc, aby zminimalizować nieuniknione przy pomiarze wzrostu u dzieci błędy, badanie to powinno być wykonywane przy użyciu kalibrowanych wzrostomierzy jak np. stadiometr typu Harpenden, które pozwalają mierzyć ten parametr w sposób precyzyjny i powtarzalny, pokazując prawdziwe zmiany we wzroście dziecka nawet w stosunkowo małych odstępach czasowych [13].

Przy ocenie wzrastania należy uwzględnić poniższe parametry:

- masa ciała urodzeniowa i długość urodzeniowa
- aktualna wysokość i masa ciała dziecka
- wysokość siedzeniowa
- obwód głowy w chwili urodzenia i aktualny
- grubość fałdu skórniego
- stadium pokwitania wg Tannera
- wzrost rodzicielski.

Badając noworodki i niemowlęta szczególną uwagę zwracamy na okresowo wykonywane pomiary obwodu głowy, długości i masy ciała. Dodatkowo obserwujemy stan odżywienia, czas ząbkowania oraz wielkość ciemiączek. U starszych dzieci pomiary wysokości i masy ciała mogą być uzupełnione pomiarami poszczególnych odcinków ciała (np. kończyn czy wysokości siedzeniowej). Odniesienie poszczególnych wartości wymienionych uprzednio parametrów wzrastającego

organizmu do przyjętych norm populacyjnych, przedstawionych w postaci tabel zbiorczych lub siatek centylowych, pozwala w prosty sposób ocenić aktualny stan wzrastania dziecka. W roku 1999, opublikowano w Polsce "Siatki centylowe do oceny rozwoju somatycznego dzieci i młodzieży" autorstwa Palczewskiej i Niedźwieckiej z Instytutu Matki i Dziecka w Warszawie. W roku 2001 te same autorki opublikowały "Wskaźniki rozwoju somatycznego dla dzieci i młodzieży warszawskiej" [14]. Podobne opracowanie wykonał w Poznaniu Prof. M. Krawczyński z Zespołem [15]. Interpretacja danych o rozwoju w okresie pokwitania wymaga, poza pomiarami wysokości i masy ciała, także oceny stopnia dojrzałości płciowej wg Tannera [16,17].

Bardzo ważnym wskaźnikiem dojrzałości biologicznej jest także wiek kostny określany za pomocą zdjęć rentgenowskich. Zwykle ocenia się dojrzałość kostną dłoni i nadgarstka (ocena wieku kostnego wg atlasu Greulich'a i Pyle'a [18]), a wiek kostny jest ściślej związany z dojrzewaniem płciowym niż z wiekiem kalendarzowym.

4. Czynniki wpływające na wzrost.

Proces wzrastania uzależniony jest od bardzo wielu czynników. Główne z nich, warunkujące osiągnięcie charakterystycznego dla danego osobnika wzrostu ostatecznego, to czynniki:

- genetyczne
- hormonalne
- środowiskowe.

Czynniki genetyczne w znacznym stopniu wpływają na wzrost ostateczny dojrzałego człowieka. Wśród nich ważne są uwarunkowania etniczne i rodzinne, które determinują tor wzrastania danego osobnika w kierunku zbliżonym dla mieszkańców danego środowiska, ale też te związane z istotnymi zmianami w materiale genetycznym, powodujące zaburzenia wzrastania. Do tych najbardziej znanych należą m.in. zespół Turnera (niedobór wzrostu) czy też zespół Klinefeltera (wzrost nadmierny).

Proces wzrastania i dojrzewania podlega regulacji wielu hormonów. Zasadniczy wpływ na dojrzewanie szkieletowe i wzrost somatyczny mają: hormon wzrostu, hormony tarczycy, hormony płciowe, insulina, leptyna, steroidy nadnerczowe, parathormon i insulinopodobne czynniki wzrostowe 1 i 2. Ich

prawidłowe stężenia pozwalają na osiągnięcie przewidywanego wzrostu ostatecznego.

Czynniki środowiskowe to bardzo często niedoceniane składowe prawidłowego wzrastania. Jedną z nich jest odżywianie, odgrywające fundamentalną rolę determinującą wzrost. Prawidłowy pokarm zabezpieczający zapotrzebowanie białkowo-energetyczne oraz zawierający odpowiednią ilość witamin i soli mineralnych sprzyja prawidłowemu wzrastaniu. I odwrotnie, niedobory ilościowe i jakościowe spożywanego pokarmu mogą wpływać na obniżenie toru wzrastania dzieci i młodzieży. Udowodniono, że zmiany w stanie odżywiania wpływają na zmianę stężenia czynników wzrostowych. Wśród pacjentów z tzw idiopatycznym niskim wzrostem znajdujemy takich, u których z powodu niedoborów pokarmowych ulegają obniżeniu poziomy IGF-1 [19]. Także czynniki psychosocjalne odgrywają dużą rolę w procesie wzrastania. Zaburzenia emocjonalne, szczególnie te długo utrzymujące się, mogą zaburzać optymalną ścieżkę rozwoju dziecka [20].

Na poszczególnych etapach życia osobniczego można wyszczególnić czynniki, które w zasadniczy sposób wpływają na prawidłowość rozwoju.

Przyczyn zaburzeń wzrastania w okresie płodowym poszukujemy w nieprawidłowościach ze strony płodu, matki lub łożyska. Powszechnie znanymi określeniami charakteryzującymi podobne, lecz nie zawsze tożsame stany niedoboru masy ciała nowonarodzonych dzieci są: noworodek „mały dla wieku ciążowego” (small for gestational age - SGA) i noworodek z hipotrofią wewnątrzmaciczną (intrauterine growth retardation – IUGR). Oba te określenia bardzo często niewłaściwie stosowane są w sposób zamienny. SGA to najczęściej genetycznie, konstytucjonalne małe dziecko. Drugim określeniem definiujemy udokumentowane upośledzenie wewnątrzmacicznego wzrastania płodu w następstwie czynników ograniczających jego rozwój, dotyczących samego płodu lub zewnętrznych nieprawidłowości. Nie zawsze dziecko IUGR jest „zbyt małe do wieku ciążowego” i odwrotnie, nie zawsze dziecko jest zbyt małe w odniesieniu do wieku ciążowego (SGA) w następstwie upośledzenia wewnątrzmacicznego wzrastania (IUGR). SGA nie musi być IUGR, a IUGR nie musi być SGA [21].

Do 1 roku życia proces wzrastania prawie całkowicie uzależniony jest od stanu odżywienia.

Wzrastanie w okresie dziecięcym warunkowane jest przede wszystkim poprzez:

- odżywianie
- hormony tarczycy
- hormon wzrostu.

Pomiędzy 5 a 9 rokiem życia (6-8) obserwuje się łagodny skok wzrostowy (z ang. *mid-childhood growth spurt*) związany z czynnością kory nadnerczy (z warstwą siatkowatą, wydzielającą hormony płciowe). W tym też czasie zaobserwować można pojawienie się owłosienia łonowego, szczególnie u dziewcząt, jednakże wymaga to konsultacji endokrynologicznej z uwagi na ryzyko występowania późnej postaci wrodzonego przerostu nadnerczy lub guza wirylizującego nadnerczy bądź jajnika [22].

Skok pokwitaniowy zależny jest od hormonów płciowych (od estrogenów u obu płci; u płci męskiej estrogeny są produktem aromatyzacji testosteronu pod wpływem działania aromatazy). Proces wzrastania ulega zakończeniu wówczas, gdy dochodzi do fuzji nasad z trzonem kości długich, a zanikowi ulega płytka wzrostu (chrząstka nasadowa).

5. Niski wzrost.

Powszechnie przyjmuje się, że dziecko niskie to takie, którego wysokość ciała jest poniżej 3 centyla na siatkach obowiązujących dla danej populacji lub poniżej dwóch odchyłeń standardowych od średniej dla danej populacji [23].

Definicja niskorosłości jest jednak szersza i obejmuje:

1. Wzrost poniżej 3 centyla w odniesieniu do wieku metrykalnego
2. Tempo wzrastania poniżej -1 SD dla danego wieku i płci
3. Wzrost docelowy na podstawie rodziców różniący się od aktualnego wzrostu dziecka o co najmniej 2 kanały centylowe

Ww. zwykle towarzyszy znacząco opóźniony wiek kostny (WK) w stosunku do wieku metrykalnego - stosunek WK:WM <0.8

Podjezwajac zaburzenia wzrastania powinniemy opierac sie nie tylko na ocenie wzrostu na siatce centylowej, lecz brac pod uwage wzajemne zalezności wieku metrykalnego, wieku wzrostowego, wieku kostnego, pozycje centylowa masy ciała w stosunku do wieku wzrostowego, szybkość wzrastania oraz wzrost rodziców.

U każdego dziecka niskorosłego konieczna jest ocena tempa wzrastania (przyrosty wysokości w obserwacji co najmniej 6-miesięcznej) – zebranie danych z wywiadu i ich analiza poprzez naniesienie na siatkę centylową. Istotne jest czy budowa ciała jest proporcjonalna, jak np. w przypadku niedoboru GH, czy nieproporcjonalna (dysplazja kostna, krzywica). Istotne jest także czy dziecko ma prawidłowy wygląd, tzn. czy nie ma cech dysmorfii, jak np. w zespole Turnera. Konsultację genetyczną powinno przeprowadzić się w każdym przypadku występowania dysmorfii, a także w przypadku braku cech dymorficznych jeśli u dziewczynki stwierdzamy niski wzrost z utratą tempa wzrastania po 6-7 roku życia lub jeśli oprócz niskorosłości stwierdza się także brak cech pokwitania w 11-12 roku życia. Niskorosłość i pierwotna niewydolność jajników to dwie podstawowe cechy zespołu Turnera, w którym inne stygmaty zespołu mogą być nieobecne w badanym okresie rozwojowym.

Niejednokrotnie niski wzrost jest uwarunkowany wieloczynnikowo i dlatego konsultacja endokrynologiczna powinna uwzględniać problemy mogące być jego przyczyną.

5.1 Przyczyny niskorosłości:

1. zaburzenia genetyczne prowadzące do zmniejszonego potencjału wzrastania:
 - konstytucjonalnie opóźniony przebieg wzrastania i dojrzewania
 - obniżony potencjał wzrostowy [m.in. rodzinny niedobór wzrostu, aberracje chromosomowe (z. Downa, z. Turnera), dysplazje kostne]
2. zaburzenia metaboliczne m.in. glikogenozy, mukopolisacharydozy, galaktozemia
3. zaburzenia neurohormonalne
 - niedobór wzrostu towarzyszący zespołom mózgowym (z. Angelmana, z. Seckela)
 - zaburzenia sfery emocjonalnej (np. choroba sieroca)
 - niedoczynność podwzgórzowo-przysadkowa albo zaburzenie reaktywności na hormon wzrostu lub czynniki wzrostowe oraz nieklasyczne postaci niedoboru hormonu wzrostu
 - zaburzenie wytwarzania hormonów płciowych
 - nadczynność kory nadnerczy

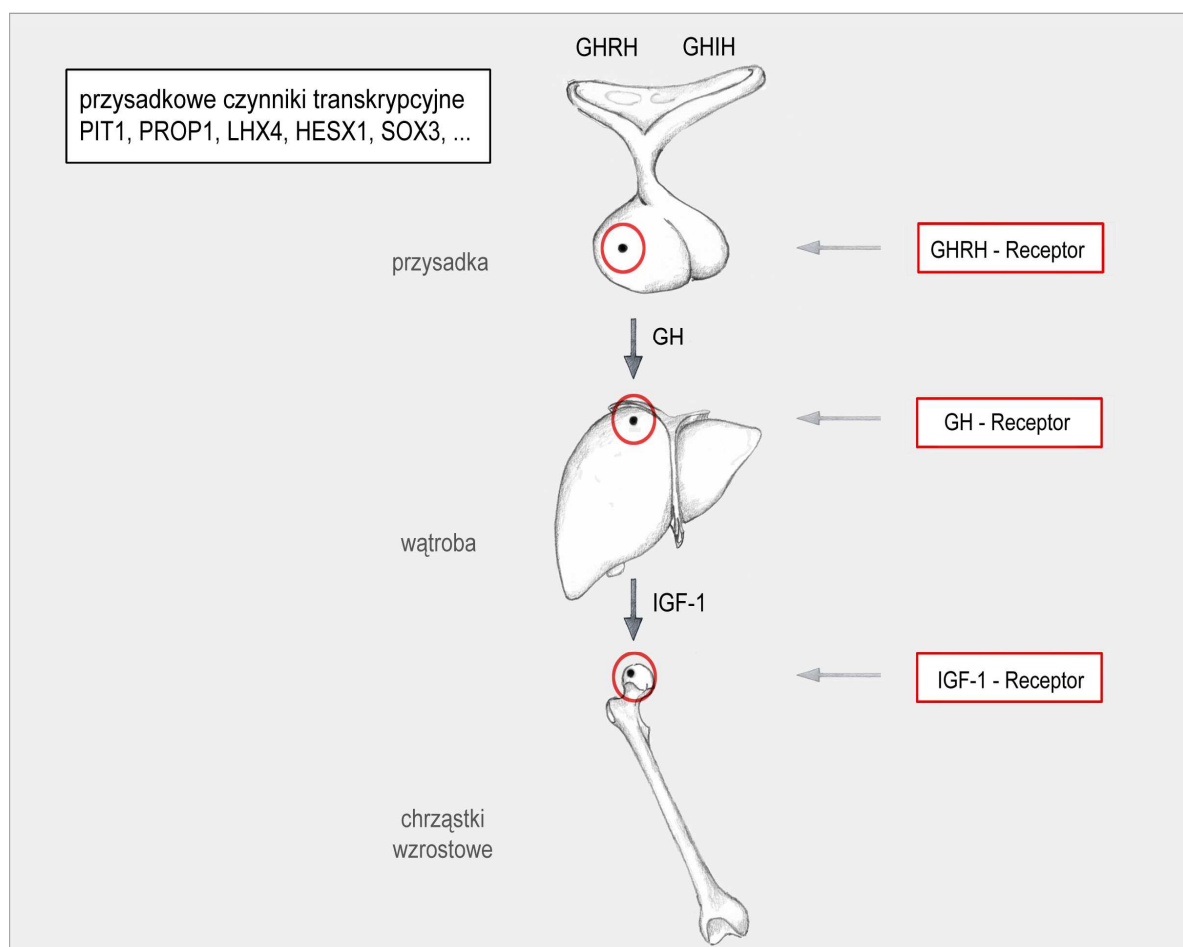
- niedoczynność tarczycy
 - zaburzenia hormonalnej regulacji gospodarki wapniowo–fosforanowej
 - jatrogeny niedobór wzrostu (hormony płciowe, glikokortykosteroidoterapia, steroidy anaboliczne)
4. inne szkodliwe czynniki, prowadzące do niedożywienia lub niedoboru tlenu
- ilościowe i/lub jakościowe niedobory pokarmowe
 - zaburzenia trawienia (m.in. niedobór enzymów trzustkowych i jelitowych)
 - zaburzenia wchłaniania (m.in. celiakia)
 - choroby przewlekłe, przebiegające z niedostatecznym utlenowaniem tkanek obwodowych (np. wrodzone choroby serca, choroby przewlekłe układu oddechowego, niedokrwistość)
 - przewlekłe choroby układowe [np. choroby nerek, wątroby, przewodu pokarmowego (choroba Crohna), młodzieńcze idiopatyczne zapalenie stawów, mukowiscydoza] [2, 24].

6. Genetyczna kontrola wzrastania.

Wzrastanie wymaga zintegrowanego funkcjonowania wielu czynników wchodzących w skład osi podwzgórzowo-przysadkowej z uwzględnieniem głównego, obwodowego narządu docelowego dla hormonu wzrostu - wątroby (**Rycina 1**).

Jakakolwiek nieprawidłowość, nawet nieznaczna, dotycząca jednej z jej składowych (czy to w zakresie syntezy, uwalniania i działania hormonów), może w zasadniczy sposób wpłynąć na osiągnięcie przewidywanego wzrostu ostatecznego. Odkrycie czynników transkrypcyjnych takich m.in. jak HESX1, PROP1, PIT1, LHX3, LHX4, GLI2 czy SOX3, odpowiedzialnych za różnicowanie komórek przysadki i jej sekwencyjny rozwój, miało bezpośredni wpływ na zrozumienie i rozpoznanie niedoborów hormonalnych przysadki. Co ważne, te złożone zaburzenia zostały powiązane z mutacjami genów kodujących czynniki transkrypcyjne kontrolujące organogenezę [25]. Na podstawie objawów klinicznych oraz będących ich przyczyną niedoborów hormonalnych możemy prognozować rodzaj zaburzenia na poziomie molekularnym jak np. mutację genu PIT1, skutkującą hypoplazją przysadki z niedoborem GH, TSH i PRL, a dodatkowy deficyt gonadotropin nakierowuje na mutację genu LHX3 [26-30].

Rycina 1. Schemat podwzgórzowo-przysadkowej osi wzrastania i czynników związanych z jej działaniem.



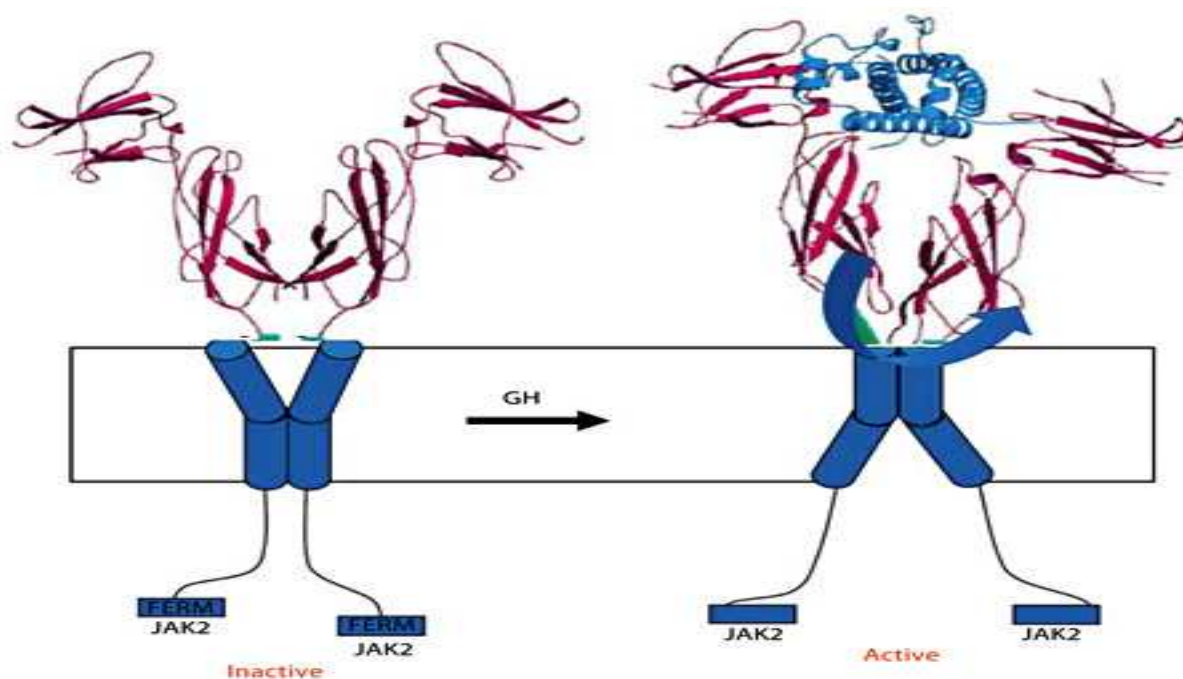
Wykorzystanie olbrzymiego postępu jaki dokonał się w dziedzinie biologii molekularnej przyczyniło się do pełniejszego zrozumienia mechanizmów sterujących procesem wzrastania i aplikacji nowoczesnych metod leczenia ludzkim rekombinowanym hormonem wzrostu (rhGH) czy rekombinowanym insulinopodobnym czynnikiem wzrostu 1 (IGF-1).

7. Hormon wzrostu.

Czynnikiem, który odgrywa najistotniejszą rolę we wzrastaniu jest **hormon wzrostu (GH)**. Jest to polipeptyd syntetyzowany i wydzielany przez komórki somatotropowe przedniego płata przysadki, złożony ze 191 aminokwasów, o strukturze przestrzennej uwarunkowanej obecnością dwóch mostków siarczkowych [31]. GH jest wydzielany cyklicznie, a jego stężenie w surowicy krwi w okresach

pomiędzy pulsami wydzielniczymi jest bardzo niskie i może być nieoznaczalne w badaniach laboratoryjnych. Fizjologicznie około 70-80% hormonu wzrostu wydzielają się w okresie snu [32]. Większość krążącego we krwi GH jest związana ze specyficznym białkiem wiążącym (GHBP), które jest identyczne z zewnątrzkomórkową domeną receptora GH (GHR). Działanie hormonu wzrostu jest możliwe dopiero po jego połączeniu z receptorem w formie dimeru (**Rycina 2**) [33,34]. Zaburzenie tego procesu spowodowane nieprawidłowościami cząsteczki hormonu wzrostu (niepełna aktywność biologiczna) bądź receptora (zespół niewrażliwości) jest przyczyną częściowego lub całkowitego braku działania GH, a tym samym zaburzonego wzrastania.

Rycina 2. Struktura przestrzenna receptora GHR i jego zmiana po związaniu z GH [34].



Procesy syntezy i uwalniania hormonu wzrostu regulowane są na wielu poziomach układu endokrynnego i przez wiele różnych czynników. Główną rolę w tej regulacji odgrywają dwa peptydy podwzgórzowe: GHIH zwany somatostatyną, który hamuje wydzielanie GH, a także neurohormon uwalniający GH, zwany somatoliberyną [GHRH]. Receptory błonowe dla obu tych peptydów zlokalizowane są w płacie przednim przysadki, a ich wydzielanie podlega regulacji zwrotnej [35, 36]. Również ghrelina pobudza wydzielanie GH. Ghrelina, hormon wytwarzany przede wszystkim w żołądku, a także m.in. w podwzgórzcu i przysadce, działa na innej drodze niż GHRH [37].

Na wydzielanie GH, poza neurohormonami podwzgórza, wpływają także zmiany neurotransmisji. Zwiększenie przewodnictwa noradrenergicznego, działając poprzez receptory α_2 pobudza, a poprzez receptory β hamuje wydzielanie GH [38]. Zwiększenie neurotransmisji dopaminergicznej również pobudza wydzielanie GH. Te właśnie drogi wydzielania GH wykorzystywane są w diagnozowaniu niedoboru GH, poprzez zastosowanie odpowiednich testów stymulacyjnych, odpowiednio klonidyny jako agonisty receptora α_2 oraz L-DOPA, jako prekursora dopaminy [39]. Istotny spadek poziomu glukozy we krwi także pobudza wydzielanie GH i zjawisko to, m.in. w teście hipoglikemii poinsulinowej oraz w teście z glukagonem, również znalazło zastosowanie w diagnostyce niedoboru GH [40].

Działanie GH na proces wzrastania ma charakter pośredni i odbywa się poprzez wytwarzanie w wątrobie i uwalnianie do krwi insulinopodobnego czynnika wzrostu 1 (IGF-1) (**Rycina 3**). IGF-1 syntetyzowany w wątrobie jest związany z białkami, głównie z IGFBP-3, krążąc w dużych kompleksach z podjednostką labilną kwasowo (ALS). Kompleks IGFBP-3/ALS/IGF-1 dostarcza IGF-1 do receptora na komórce chrząstki nasadowej (płytki wzrostu) kości. Związanie IGF-1 z receptorem zwiększa syntezę białek, prowadząc do wydłużania kości. Krążący we krwi i wytwarzany głównie w wątrobie IGF-1, powstaje również miejscowo w innych tkankach, szczególnie w płytce wzrostu u dzieci, gdzie poprzez mechanizm parakryny i autokryny dodatkowo wpływa na wzrost [41]. IGF-1 działa bezpośrednio na chrząstkę wzrostową, jak również wpływa na inne procesy biologiczne. Jest hormonem anabolicznym, działającym promitotycznie i hamującym procesy apoptozy [42]. W ramach ujemnego sprzężenia zwrotnego IGF-1 spełnia ważną rolę w regulacji wydzielania GH.

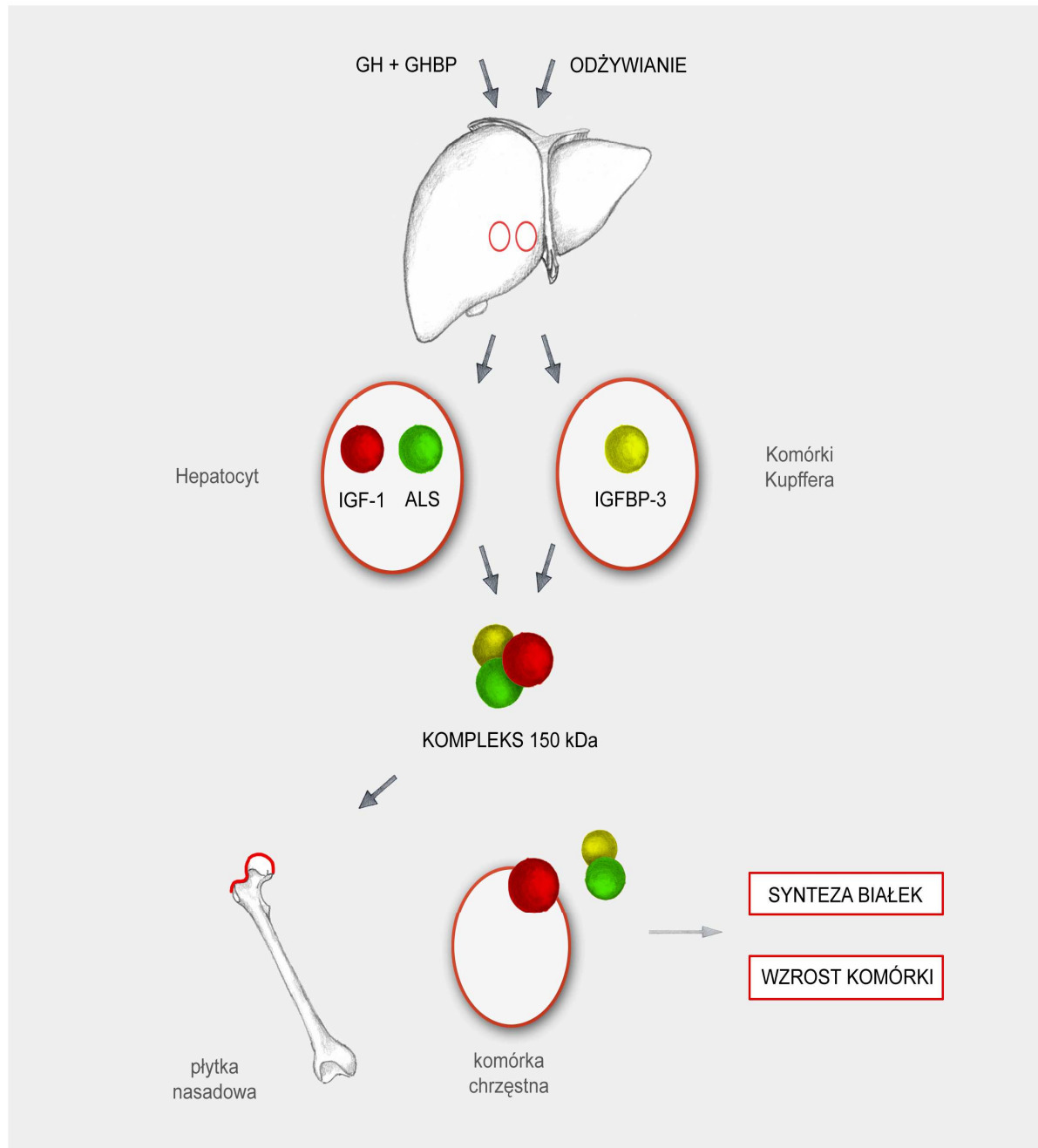
Na stężenie GH we krwi wpływają także inne hormony jak np. estrogeny, glukagon i wazopresyna, które powodują wzrost jego wydzielania, natomiast zmniejszenie sekrecji GH stwierdza się w niedoczynności tarczycy i w stanach przebiegających z nadmiarem kortyzolu. Otyłość obniża stężenie GH w surowicy, a niedożywienie obniża z kolei wytwarzanie IGF-1 i wzmaga sekrecję GH [43-46].

7.1 Działanie hormonu wzrostu.

Funkcja GH jest zależna od okresu rozwojowego. W okresie wzrastania GH stymuluje wzrost i podziały komórek, w tym komórki chrząstki wzrostu, powodując tym samym wzrost kości na długość. GH wpływa także na gospodarkę lipidową,

węglowodanową i białkową, a ponadto na gospodarkę wodno-elektrolitową, mineralizację kości, układ mięśniowy i układ krążenia (**Tabela 1**). GH działa bezpośrednio poprzez swój receptor błonowy (GHR) należący do rodziny receptorów cytokin, a także pośrednio z udziałem generowanego przezeń IGF-1 (**Rycina 3, Rycina 4**).

Rycina 3. Regulacja bioaktywności IGF-1.



Rycina 4. Transdukcja sygnału indukowanego przez hormon wzrostu [47].

Szlaki przekazywania sygnału indukowane przez hormon wzrostu. **a** GH przyłącza się do dimeru GHR, wywołując zmianę konformacji, która aktywuje dwie cząsteczki JAK2. **b** Aktywacja JAK2 prowadzi do autofosforylacji JAK2 i fosforylacji JAK2 na wielu resztach tyrozynowych GHR. JAK2 aktywowana przez GH również fosforyluje i aktywuje wiele cząsteczek sygnałowych i szlaków w tym **c** Stats **d** Kinazy IRS i PI-3 oraz **e** MAPK. **f** Przyłączenie GH do GHR może również aktywować kinazę tyrozyny Src, inicjując inne szlaki sygnałowe. **g** GH wywołuje zmiany w dynamice cytoszkieletu

Objaśnienia:

kinaza tyrozynowa Janusa 2 (JAK2)

białka przekazujące sygnał i aktywujące transkrypcję (Stats)

kinaza białka aktywowanego mitogenem (MAPK)

supresor sygnalizacji cytokin (SOCS)

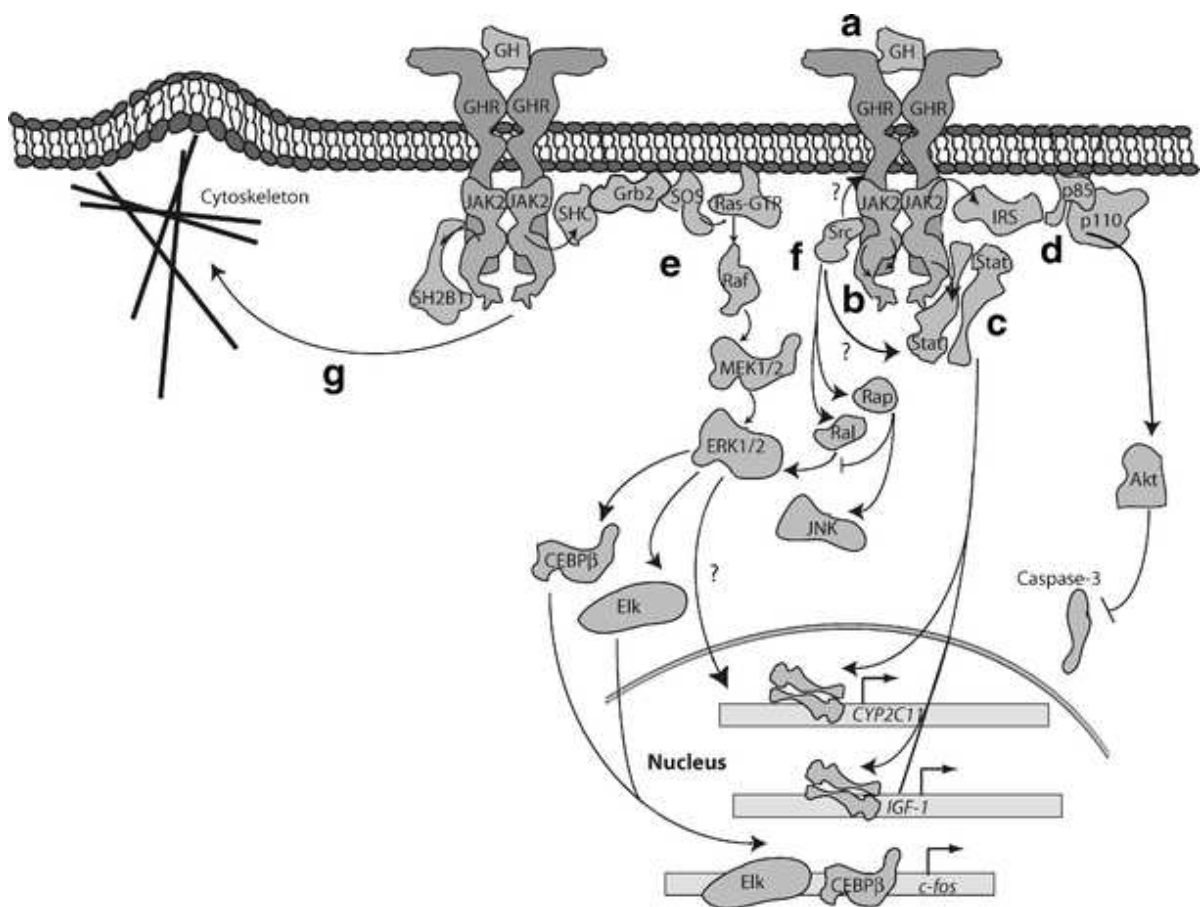


Tabela 1. Działanie narządowe hormonu wzrostu [48-53].

Obszar działania GH	Mechanizm działania GH
Układ kostny	pobudzenie wzrostu kości na długość, mineralizacja kośćca (zwiększenie obrotu kostnego z przewagą procesu osteogenezy; działanie poprzez swoiste receptory na osteoblastach i osteoklastach)
Przemiana białkowa	ułatwienie transportu aminokwasów do komórki, stymulacja syntezy białek w wątrobie i mięśniach; szczególne działanie anaboliczne na mięśnie szkieletowe i mięsień sercowy
Przemiana tłuszczowa	działanie lipolityczne; stymulacja hydrolizy triglicerydów w tkance tłuszczowej; zwiększenie procesu utleniania lipidów; zmniejszenie procentowego udziału tłuszczu w składzie ciała, obniżenie stężenia cholesterolu, LDL cholesterolu i triglicerydów, a zwiększenie odsetka HDL cholesterolu
Przemiana węglowodanowa	pobudzenie glukoneogenezy w wątrobie, zmniejszenie transportu glukozy do tkanek, zwiększenie oporności na insulinę
Gospodarka wodno-elektrolitowa	poprzez stymulację układu renina-angiotensyna-aldosteron istnieje tendencja do zatrzymywania wody i sodu, zwłaszcza w przestrzeni pozakomórkowej

8. Somatotropinowa niedoczynność przysadki.

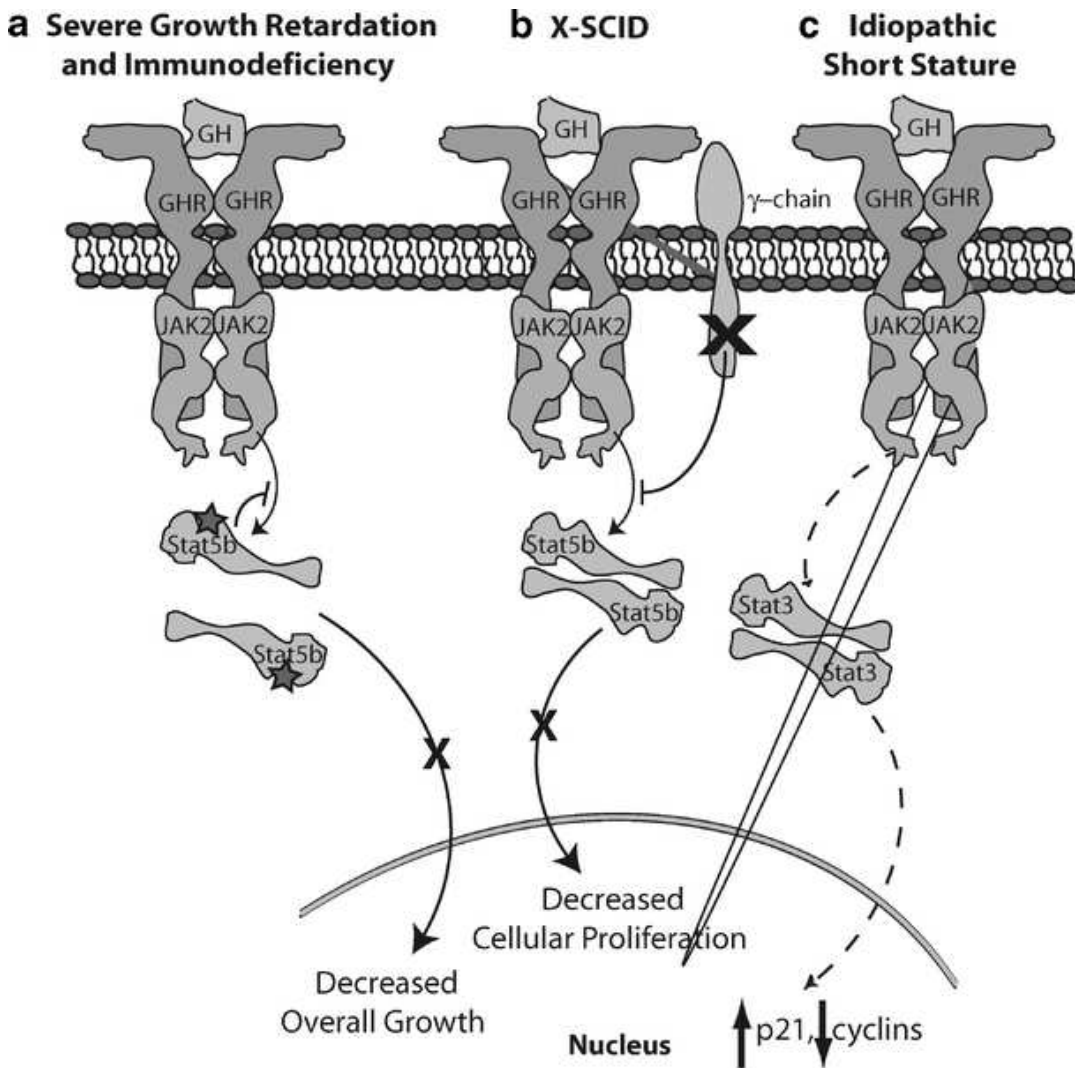
Somatotropinowa niedoczynność przysadki (SNP) to stan niedostatecznego wydzielania GH przez komórki somatotropowe płata przedniego przysadki. Jeśli niedoborowi wydzielania GH towarzyszy obniżenie sekrecji jeszcze innych hormonów przysadkowych, mówimy o wielohormonalnej niedoczynności przysadki (WNP), która oprócz upośledzenia wzrastania prowadzi do innych zaburzeń w zależności od stwierdzonych niedoborów hormonalnych. Częstość występowania SNP w populacji dziecięco-młodzieżowej szacuje się na 1:4000-1:10000 [54]. Przy wielkiej

różnorodności przyczyn somatotropinowej lub wielohormonalnej niedoczynności przysadki ich wspólną cechą jest niedobór wzrostu (**Tabela 2**).

Tabela 2. Etiologia somatotropinowej i/lub wielohormonalnej niedoczynności przysadki [2].

I.	Przyczyny wrodzone
1.	Delecje lub mutacje genów: PROP-1, PIT-1, HESX1, LHX3, GHRH, GH
2.	Idiopatyczny niedobór GHRH
3.	Wrodzone wady linii środkowej mózgowia lub inne wady ośrodkowego układu nerwowego
4.	Aplazja lub hipoplazja przysadki i inne wady embrionalne okolicy podwzgórzowo–przysadkowej
5.	Nieaktywna cząsteczka GH (zespół Kowarskiego)
6.	Następstwa infekcji wewnątrzmacicznych
II.	Przyczyny nabyte
1.	Guzy wewnątrzczaszkowe
2.	Infekcje ośrodkowego układu nerwowego
3.	Urazy czaszkowo-mózgowe, perinatalne i w okresie dzieciństwa
4.	Nacieki komórkowe w obrębie ośrodkowego układu nerwowego
5.	Zaburzenia krążeniowo–naczyniowe w obrębie ośrodkowego układu nerwowego
6.	Powikłania leczenia procesów rozrostowych, szczególnie ośrodkowego układu nerwowego i białaczki (radio- i chemioterapia)
7.	Choroby autoimmunologiczne np. limfocytarne zapalenie przysadki
III.	Przyczyny idiopatyczne
1.	Postać klasyczna izolowana lub wielohormonalna
2.	Zaburzenia neurosekrecyjnej regulacji wydzielania GH
IV.	Hiposomatotropinizm hipersomatotropowy
1.	Zespół niewrażliwości na GH - defekt receptora GH (zespół Larona)
2.	Zaburzenie postreceptorowe (STAT5, JAK2) - Rycina 5
3.	Zespół niewrażliwości na IGF-1 – defekt receptora IGF-1 (zespół Biericha)
4.	Pierwotny defekt wytwarzania IGF-1
5.	Nabyte zespoły zmniejszonej wrażliwości na GH (np. przewlekła niewydolność nerek)

Rycina 5. Zaburzenia związane z nieprawidłowym przekazem sygnału indukowanego przez hormon wzrostu [47].



a ciężkie opóźnienie wzrastania i zaburzenia odporności wynikające z mutacji w genie Stat 5b anulującej fosforylację JAK2 - zależną i lokalizację Stat 5b w jądrze komórkowym. **b** w zespole SCID sprzężonym z chromosomem X, limfocyty EBV-transformowane nie posiadają wspólnego receptora dla cytokiny łańcucha γ i tym sposobem dochodzi do osłabienia indukowanej przez GH fosforylacji JAK2 i zaburzenia translokacji Stat 5b do jądra komórkowego **c** W fibroblastach wielu pacjentów z idiopatyczną niskorosłością dochodzi do osłabienia fosforylacji JAK2-zależnej wywołanej GH i jądrowej translokacji Stat 3 oraz do zwiększenia poziomu inhibitora p21 cyklu komórkowego i obniżenia poziomu cyklin.

8.1 Grupy ryzyka i objawy chorobowe.

Dzieci z niedoborem GH rodzą się zwykle z prawidłową masą i długością ciała [55, 56]. Im cięższy jest wrodzony niedobór GH tym większe jest prawdopodobieństwo wystąpienia noworodkowej hipoglikemii. Hipoglikemia to jeden z pierwszych, a czasem jedyny objaw niedoboru GH i ta przyczyna stanów niedocukrzenia, oprócz przyczyn metabolicznych, hiperinsulinizmu czy hipokortyzolemii, powinna być uwzględniona u noworodków i małych niemowląt. Dodatkowymi nieprawidłowościami w tym okresie może być przedłużająca się żółtaczka i małe prącie (*mikropenis*) u chłopców, a w późniejszym okresie życia opóźnione wyrzynanie się zębów [57,58]. W przypadku wrodzonej postaci SNP obserwuje się zmniejszenie tempa wzrastania już wkrótce po urodzeniu, ale najczęściej objawia się pod koniec 1-2 r.ż [59]. Do grupy ryzyka niedoboru GH należą też dzieci, które nie osiągają odpowiedniego przyrostu długości ciała pomiędzy kolejnymi pomiarami wykonywanymi w ramach badań bilansowych odpowiednio 2-, 4- i 6-latka. Zwolnienie tempa wzrastania w każdym okresie wieku rozwojowego poniżej 1 odchylenia standardowego (SDS) w stosunku do normy dla wieku wymaga również wyjaśnienia, poprzez wykonanie badań diagnostycznych w kierunku SNP/WNP.

Dzieci, u których występują bóle głowy i zwolnienie tempa wzrastania stanowią grupę zwiększonego ryzyka SNP/WNP pochodzenia organicznego. Także dzieci niskie, z powolnym wzrastaniem, o proporcjach ciała dziecka młodszego, aniżeli wynika to z wieku kalendarzowego, prawidłowo odżywione, z prawidłową masą ciała przy urodzeniu, powinny być diagnozowane w kierunku niedoboru GH.

Proporcje ciała dzieci z niedoborem GH są najczęściej zgodne z wiekiem wzrostowym. Skóra jest zwykle blada, delikatna, gładka i o prawidłowej ciepłocie. Najczęściej obserwuje się drobne stopy, dłonie oraz twarz, natomiast czoło zwykle jest duże i wypukłe. Wiek kostny w miarę upływu czasu ulega znacznemu opóźnieniu w stosunku do wieku metrykalnego.

Ww. objawy kliniczne i auksologiczne upoważniają do podejrzenia niedoboru GH i są podstawą kwalifikacji pacjentów do badań diagnostycznych, potwierdzających bądź wykluczających ostatecznie niedobór GH.

9. Ocena wydzielania GH.

Ze względu na pulsacyjny charakter spontanicznego wydzielania GH, diagnostyka jego niedoboru opiera się na oznaczaniu maksymalnego wydzielania hormonu wzrostu w testach stymulacyjnych i w trakcie fizjologicznego snu. Klasyczną postacią SNP u dzieci rozpoznaje się na podstawie obniżonego wydzielania GH, tj. gdy wartość szczytowa wyrzutu GH jest poniżej 10 ng/ml. W diagnostyce niedoczynności przysadki u dzieci w Polsce obowiązuje zasada wykonania dwóch testów stymulacyjnych, bez preferencji co do kolejności użytego stymulatora farmakologicznego. Dla potwierdzenia rozpoznania niedoboru GH niezbędne jest także wykonanie testu wydzielania GH po zaśnięciu [60]. Problem stanowi jednak interpretacja tego ostatniego testu z powodu braku jego standaryzacji oraz wartości granicznej określającej prawidłowy poziom sekrecji. W testach farmakologicznych wykorzystuje się bodźce wydzielnicze jak wywołanie bezwzględnej hipoglikemii (po zastosowaniu insuliny) lub względnej (po zastosowaniu glukagonu), stymulację receptorów α 2-adrenergicznych (po zastosowaniu klonidyny), pobudzenie receptorów dopaminergicznych (z wykorzystaniem preparatu L-DOPA) lub też przez bezpośrednią stymulację komórek somatotropowych (po zastosowaniu GHRH lub syntetycznych analogów ghreliny). Prawidłowe wartości stężeń GH uzyskanych w warunkach stymulacji farmakologicznej nie wykluczają zaburzeń jego spontanicznej sekrecji. U pacjentów z tzw. dysfunkcją neurosekrecyjną (NSD; NeuroSecretory Dysfunction) dopiero ocena dobowego lub nocnego profilu wydzielania GH ujawnia brak lub obniżenie amplitudy pulsów wydzielniczych GH [61]. Pulsacyjne wydzielanie GH odbywa się zarówno w dzień jak i w nocy. Fizjologiczne nocne wyrzuty GH są znacznie wyższe i w tym właśnie okresie, gdy obniża się fizjologiczne stężenie kortyzolu, zachodzi najistotniejsze dla procesu wzrastania działanie GH na chrząstkę wzrostową. W ciągu dnia stężenie GH we krwi jest niskie, stąd badanie jego stężenia w tym okresie, poprzez jednorazowe pobranie, nie ma żadnego znaczenia diagnostycznego w niedoborze wzrostu [62,63].

10. Test generacji IGF1.

Bardziej zaawansowaną formą diagnostyki niskorosłości jest test generacji IGF-1 (TG/IGF-1). Test ten jest wykonywany w sytuacji gdy stwierdzimy prawidłowe, albo nawet nadmierne wydzielanie GH w testach diagnostycznych przy jednocześnie

niskich wartościach IGF-1 i wykluczeniu stanów chorobowych z obniżonym wydzielaniem IGF-1 jak np. w niedożywieniu. Protokół obejmuje podanie ludzkiego rekombinowanego hormonu wzrostu codziennie w godzinach wieczornych przez 4 dni trwania testu w dawce substytucyjnej (rekomendowana dawka: 0.033 mg/kg/dzień sc) [64]. Test jest dodatni jeśli uzyskujemy wyraźny wzrost stężenia IGF-1 w 5 dniu testu, tj. po podaniu ostatniej, 4-tej dawki rhGH w porównaniu do wyjściowego stężenia (przed 1-szą dawką rhGH). Możemy wówczas przypuszczać, że przyczyną niskorosłości jest nieaktywna cząsteczka endogennego hormonu wzrostu (zespół Kowarskiego) a tym samym mamy podstawy aby stosując rhGH uzyskać istotną poprawę prognozy wzrostu ostatecznego.

11. Leczenie niedoboru hormonu wzrostu.

Podstawowym sposobem leczenia niedoboru hormonu wzrostu jest jego substytucja. Ludzki hormon wzrostu jest stosowany od czasu jego izolacji z ekstraktu przysadek przez Rabena w 1958r [65]. W latach 80-tych uzyskano biosyntetyczną postać hormonu wzrostu poprzez rekombinację DNA na szczepach bakterii E.coli lub z hodowli komórek ssaków. Przed rozpoczęciem leczenia w każdym przypadku SNP/WNP obowiązuje wykonanie badania MR lub KT okolicy podwzgórzowo-przysadkowej w celu wykluczenia procesu nowotworowego względnie stwierdzenia innych zmian wymagających np. interwencji neurochirurgicznej. Wykrycie jakiegokolwiek czynnego procesu nowotworowego (nie tylko w obrębie ośrodkowego układu nerwowego) jest przeciwwskazaniem do podawania preparatów GH. Możliwe natomiast jest leczenie dzieci po doszczętnych zabiegach neurochirurgicznych z przyczyn nowotworowych, pod warunkiem, że nie stwierdza się cech wznowy procesu nowotworowego po około 6 miesiącach obserwacji od zabiegu lub od zakończenia chemio- czy radioterapii [61]. Nie stwierdzono różnicy w częstości nawrotów guzów ośrodkowego układu nerwowego u dzieci leczonych rhGH w porównaniu z grupą dzieci nie leczonych tym hormonem [66]. Nie udowodniono również związku przyczynowego pomiędzy podawaniem rhGH, a częstszym występowaniem białaczek u dzieci [67]. Zwrócono natomiast uwagę na możliwość częstszego powstawania guzów nowotworowych u dzieci wyleczonych z białaczki, otrzymujących przewlekle rhGH [68]. W przypadku ALL opisano ryzyko osteosarcoma, a *meningioma* w przypadku nowotworów mózgu.

Rekombinowany ludzki hormon wzrostu (rhGH) podaje się w codziennych iniekcjach podskórnych (lub domięśniowych), w dawce 0,5 – 0,7 jednostek międzynarodowych na 1 kg masy ciała na tydzień (0,16 – 0,23 mg/kg/tydzień; 0,025-0,033 mg/kg/dzień), przy użyciu specjalnych wstrzykiwaczy podobnych do tych, jakimi podaje się insulinę [61]. Zaleca się podawanie rhGH przed snem, aby w ten sposób naśladować jego fizjologiczne wydzielanie. Szybkość wzrastania zależna jest od wieku dziecka, stosowanej dawki, a także częstości podawania rhGH.

Niezbędne jest monitorowanie leczenia hormonem wzrostu celem oceny skuteczności stosowanej dawki oraz ze względu na bezpieczeństwo prowadzonej terapii. Działania uboczne to rzadkie zjawisko przy stosowaniu rhGH. Do tej grupy możemy zaliczyć zwiększenie ciśnienia śródczaszkowego z objawami *pseudotumor cerebri*, upośledzenie tolerancji glukozy czy złuszczenie się głowy kości udowej [69]. Inne objawy uboczne to wtórna niedoczynność tarczycy, zespół kanału nadgarstka, ginekomastia, insulinooporność czy cukrzyca. Szczegółowy wywiad przy każdej wizycie kontrolnej jak i wykonywane regularnie badania laboratoryjne pozwalają na szybkie wychwycenie ewentualnych nieprawidłowości i odpowiednie postępowanie (zmniejszenie dawki bądź zaprzestanie podawania rhGH) [70]. Dzieci z organicznymi przyczynami SNP powinny być szczególnie monitorowane poprzez okresowo powtarzane badania obrazowe OUN. Podobnie, ścisłego nadzoru wymagają dzieci z innymi procesami rozrostowymi, poza OUN.

12. Ocena skuteczności terapii rhGH.

Odpowiedź na leczenie rhGH (poprawa tempa wzrastania) zależy od wielu czynników, m.in. od stopnia zaburzenia wydzielania GH przez przysadkę oraz od stosowanej dawki leku [71-73]. Spektakularnie szybkie tempo wzrastania obserwuje się w trakcie terapii dzieci z głębokim niedoborem hormonu wzrostu, a wolniejsze u pacjentów z częściową niedomogą przysadki w zakresie wydzielania GH. Szybkość wzrastania jest największa w pierwszych miesiącach leczenia i może wynieść nawet 10-16 cm/rok, a następnie zmniejsza się do 6-10 cm/rok [74]. Przyspieszenie wzrastania osiąmane w pierwszym okresie leczenia określane jest jako „*catch up growth*” czyli „nadganianie” wzrostu. Po tym okresie szybkość wzrastania ulega zmniejszeniu i osiąga poziom jak u dziecka zdrowego [75].

U części dzieci leczonych rhGH nie uzyskujemy *catch up growth* pomimo stosowania standardowego leczenia. Zdarza się też, że po początkowym okresie dobrej odpowiedzi na leczenie dochodzi do wyraźnego pogorszenia tempa wzrastania pomimo kontynuowania terapii w dotychczasowej, skutecznej dawce. Niepowodzenie leczenia dotyczy 5-30% pacjentów [74].

Przyczyny braku efektów leczenia rhGH mogą być różne, a najczęstsze z nich to:

- niewłaściwa kwalifikacja do leczenia / błędne rozpoznanie
- niewłaściwa dawka rhGH
- nieprawidłowe lub nieregularne podawanie rhGH
- wytworzenie przeciwciał o wysokiej aktywności wiązania GH
- współistniejąca i nie leczona niedoczynność tarczycy
- stosowanie glikokortykosteroidów z powodu innych schorzeń
- zaburzenia emocjonalne
- niedożywienie
- choroby, w przebiegu których występuje zmniejszenie wytwarzania IGF-I
- **choroby z zaburzeniem wykorzystania prawidłowo produkowanych czynników wzrostowych (np. mitochondriopatie)**

W przypadku niezadawalającego efektu leczenia, gdy pomimo prowadzonej terapii rhGH przyrost wysokości ciała jest mniejszy niż 3 cm/rok, to wówczas decydujemy o zakończeniu terapii. Wiek kostny na poziomie 18 lat u chłopców i 16 lat u dziewczynek jest także wskazaniem do zakończenia podawania rhGH [76]. Wymienione powyżej kryteria uwzględniają wyłącznie aspekt wzrostowy. Jeżeli weźmiemy pod uwagę inne oprócz wzrostu korzystne efekty biologiczne związane z terapią rhGH, jak np. poprawa metabolizmu (gospodarka lipidowa) wówczas należałoby kontynuować leczenie, ale już w innej, niższej dawce.

13. Cytopatie mitochondrialne.

Cytopatie mitochondrialne są złożoną grupą wieloukładowych zaburzeń metabolicznych o podłożu genetycznym, w których proces chorobowy preferencyjnie upośledza funkcję mięśni oraz układu nerwowego [77]. Jedną z cech ww. choroby może być niskorosłość. U podstaw genetycznych choroby leżą uszkodzenia DNA

genomu mitochondrialnego [78]. W większości przypadków są to mutacje punktowe, jednak zdarzają się także delecje dużych fragmentów mitochondrialnego DNA (mtDNA). Każde mitochondrium zawiera do dziesięciu kopii swojego własnego, autonomicznego DNA w formie kolistej cząsteczki, długości 16 569 par zasad [79]. Mitochondrialny DNA koduje m.in. 13 białek łańcucha oddechowego i wiele cząsteczek RNA niezbędnych do prawidłowej funkcji mitochondriów [80]. Uszkodzenia mtDNA prowadzą do upośledzenia jednego lub większej ilości procesów metabolicznych w mitochondriach, co powoduje zaburzenia w ich funkcji. Każda komórka organizmu zawiera setki tych organelli, które są niezbędne dla prawidłowego przebiegu procesu oddychania i produkcji energii. Końcowym etapem w produkcji energii mitochondrialnej jest łańcuch oddechowy. Większość białek kompleksów łańcucha oddechowego kodowana jest przez genom mitochondrialny. Mutacje w genach kodujących składniki kompleksów prowadzą do upośledzenia funkcji całego łańcucha oddechowego. Gdy poziom produkcji energii obniży się poniżej określonej granicy, to wówczas następuje zaburzenie struktury i funkcji całej komórki [81]. Charakterystyczną zmianą w komórkach z zaburzeniem fosforylacji oksydacyjnej są zgrupowania nieprawidłowych mitochondriów pod błoną komórkową, co jest łatwo zauważalne w mikroskopie elektronowym. Inną charakterystyczną cechą tych komórek jest zmiana zabarwienia w metodzie Gomoriego – barwią się one na czerwono. Takie komórki mięśniowe nazywane są włóknami szmatowatymi (ang. ragged red fibres) [82]. Z powodu niejednorodnego rozmieszczenia mitochondriów w tkankach i współwystępowania zmutowanego i prawidłowego mtDNA w tych organellach (heteroplazmia), cytopatie mitochondrialne mogą prowadzić do wielu zróżnicowanych objawów, nawet jeżeli są wynikiem tego samego uszkodzenia genetycznego [83]. Z kolei różne uszkodzenia genu mogą dawać wspólne, przenikające się w różnych zespołach objawy. Ta heterogenność obrazu klinicznego jest po części wynikiem złożonych zmian genetycznych, będących przyczyną choroby, a także faktu, że tkanki o wysokim zapotrzebowaniu energetycznym, takie jak tkanka mięśniowa i nerwowa, są bardziej podatne na zmniejszoną podaż energii spowodowanej upośledzeniem łańcucha oddechowego. Kiedy uszkodzony i prawidłowy mtDNA występują w tej samej komórce, funkcje łańcucha oddechowego nie będą upośledzone tak długo, jak długo jest wystarczająca ilość prawidłowego mtDNA aby zniwelować efekty uszkodzonego mtDNA. Jeżeli stosunek uszkodzonego do prawidłowego mtDNA przekroczy pewien graniczny próg, wtedy

pojawiają się objawy kliniczne upośledzenia funkcji łańcucha oddechowego [84]. Ten próg, przy którym następuje manifestacja objawów klinicznych zależy od rodzaju tkanki. W tkankach o wysokim zapotrzebowaniu energetycznym, takich jak mięśnie szkieletowe, tkanka nerwowa, serce i wątroba, próg ten jest niższy, aniżeli w innych tkankach. mtDNA często ulega replikacji, nawet w nie dzielących się komórkach. Kiedy uszkodzony i prawidłowy mtDNA ulegają replikacji z różną częstością, wówczas prowadzi to do zmian poziomu heteroplazmii u pacjentów i wpływa na czas wystąpienia pierwszych objawów choroby. Dodatkowym czynnikiem ryzyka w przypadku cytopatii mitochondrialnej jest fakt szybkiej akumulacji uszkodzeń w mtDNA [85]. Mutacje te narastają z wiekiem i nierzadko obserwuje się włókna szmatowate i mutacje mtDNA w próbkach z biopsji mięśni starszych pacjentów [86]. Także fakt, iż część białek mitochondrialnych jest kodowana przez genom jądrowy, zmienia obraz molekularny cytopatii mitochondrialnych. Stwarza to dodatkowe pole do wystąpienia mutacji/delecji/insercji, które są trudniejsze do wykrycia. To wszystko sprawia, że diagnostyka tych zaburzeń klasycznymi metodami jest bardzo utrudniona, a czasem wręcz niemożliwe jest na jej podstawie rozróżnienie poszczególnych zespołów chorobowych. Mnogość objawów chorobowych oraz wzajemne przenikanie się tychże objawów utrudniają postawienie ostatecznej diagnozy [87].

W chwili obecnej nie jest znana żadna skuteczna terapia cytopatii mitochondrialnych. Terapie farmakologiczne mają ograniczoną skuteczność i pozwalają jedynie na leczenie objawowe. Daje to przejściową poprawę stanu zdrowia pacjentów w sytuacji przełomu, lecz nie usuwa przyczyny choroby. Najbardziej obiecujące efekty daje podawanie oczyszczonych składników łańcucha oddechowego, kofaktorów i witamin takich jak: koenzym Q10, tiamina, ryboflawina, biotyna, kwas askorbinowy, witaminy K i E, choć zdania co do efektów takiego leczenia są podzielone [88-90].

14. Zespół Kearns–Sayre’a.

Zespół Kearns-Sayre’a (KSS) jest przykładem cytopatii mitochondrialnej. W 1958 roku Kearns i Sayre jako pierwsi opisali specyficzne, wielosystemowe nieprawidłowości składające się z triady zaburzeń: zwyrodnienia barwnikowego siatkówki, przewlekłej, postępującej oftalmoplegii zewnętrznej z opadaniem powiek

oraz bloku przedsionkowo-komorowego serca [91]. Dzieci z KSS po urodzeniu nie odbiegają zwykle od norm morfologiczno-ruchowych. Nie ma preferencji płciowej w występowaniu tego zespołu, a rozwój we wczesnym dzieciństwie przebiega prawidłowo. Objawy choroby zazwyczaj pojawiają się przed 20 rokiem życia, najczęściej w okresie dojrzewania, nasilając się wraz z wiekiem.

14.1 Objawy okulistyczne

Tak jak w innych mitochondriopatiach przebiegających z zajęciem układu mięśniowego, charakterystyczną manifestacją oczną w KSS jest postępująca, oftalmoplegia zewnętrzna (PEO). Jest to grupa objawów klinicznych, charakteryzujących się osłabieniem ruchomości oczu, związanych z powolnym, postępującym zmęczeniem mięśni okoruchowych. Także opadanie powiek towarzyszy zwykle PEO i jest zazwyczaj pierwszym sygnałem rozpoznania KSS. Dolegliwości oczne zaczynają się najczęściej po 5 roku życia [81]. To osłabienie mięśniowe obejmuje w równym stopniu wszystkie mięśnie zewnętrzne oka, występując ze szczególną ekspresją u dzieci w wieku szkolnym. Obserwuje się charakterystyczne nadmierne używanie mięśni czoła dla lepszego otwarcia powiek. Siatkówka, a w szczególności jej nabłonek barwnikowy, jest wrażliwa na defekty mtDNA prowadzące do zaburzeń oddychania komórkowego. Zwrodnienie barwnikowe siatkówki z obrazem „soli i pieprzu” jest kolejnym charakterystycznym objawem dla KSS (92-94).

14.2 Objawy neurologiczne

Ośrodkowy układ nerwowy (OUN) jako tkanka o dużym zapotrzebowaniu energetycznym jest również często objęty procesem chorobowym w przebiegu KSS. Gospodarka energetyczna mózgu, będąc w dużym stopniu uzależniona od metabolizmu tlenowego, jest szczególnie podatna na zaburzenia zachodzące w mitochondriach [95]. Uszkodzenia mtDNA w KSS, których efektem jest zaburzenie procesu fosforylacji tlenowej, prowadzą do wielu zaburzeń neurologicznych. Najbardziej rozpowszechnionym jest upośledzenie funkcji poznawczych, począwszy od stopnia lekkiego aż do ciężkiej niepełnosprawności intelektualnej [96]. Także typowymi objawami są: hipotonia, ataksja, mioklonie i dystonia ruchowa [97,98]. Utrata słuchu pochodzenia sensorycznego jest istotnym i podlegającym leczeniu objawem [99]. Może rozwinąć się również oczopląs i otępienie. W obrębie substancji

białej kory mózgowej, zwojów podstawy i pnia mózgu może dochodzić do zwyrodnienia gąbczastego [100]. Te zmiany patologiczne mogą obejmować jądra mózgu, m.in. jądro okoruchowe. Zaburzenia w obrębie rdzenia przedłużonego mogą być przyczyną zaburzeń oddychania i tendencji do epizodów śpiączki u pacjentów z KSS. Upośledzenie funkcji metabolicznych mózgu występuje nawet u pacjentów bez ewidentnych zmian w układzie nerwowym. Obrazy uzyskiwane przy zastosowaniu rezonansu magnetycznego ujawniają rozległe zaburzenia, które mogą być odpowiedzialne za różnego rodzaju objawy neurologiczne [101]. Często spotyka się zmiany zanikowe w obrębie mózgu i mózdzku oraz zwapnienia [102]. Wykazano, że w KSS nieprawidłowości w MR OUN pogłębiają się wraz z postępem objawów neurologicznych.

14.3 Objawy kardiologiczne

Zaburzenia kardiologiczne dominują zwykle w późniejszych etapach klinicznej manifestacji KSS [103]. Serce jest narządem niezwykle energochłonnym i mitochondria dostarczające energii do ciągłej pracy zajmują około 1/3 objętości cytoplazmy kardiomiocytów. Ich uszkodzenie prowadzi bezpośrednio do deficytu energii, a tym samym do niewydolności mięśnia sercowego. Kliniczna manifestacja chorób serca pojawia się u więcej niż połowy (57%) pacjentów z KSS [81]. Na te objawy składają się napadowe omdlenia, zastoinowa niewydolność serca i zawał [104]. Pacjenci z KSS, którzy mają zaburzenia przewodnictwa komorowego wykazują także nieprzewidywalny i przyśpieszony postęp choroby w kierunku pełnego bloku przedsionkowo-komorowego [105,106]. Także typową kardiologiczną nieprawidłowością w KSS jest zaburzenie przewodnictwa w zakresie podwęzłowego odcinka pęczka Hisa i jego odnóg [107].

14.4 Objawy mięśniowe

Postępujące osłabienie mięśniowe i nietolerancja wysiłku fizycznego występują często u pacjentów z KSS, powodując wiele trudności w codziennym życiu. Osłabienie mięśniowe dotyczy w szczególności twarzy, gardła, tułowia i ramion, prowadząc do zaburzeń mowy i połykania u wielu pacjentów oraz często do niedożywienia z ww. powodu [108]. Wiele informacji można uzyskać z charakterystycznego wyglądu włókien mięśniowych z wycinka mięśnia pacjentów z KSS. Kiedy produkcja energii w komórkach z zaburzonymi procesami fosforylacji

tlenowej obniży się poniżej pewnego krytycznego poziomu, wówczas pojawia się kompensacyjna proliferacja wszystkich mitochondriów, włączając także te objęte procesem chorobowym. Dlatego też w zmienionych włóknach mięśniowych znajduje się duża liczba atypowych mitochondriów, barwiących się na czerwono pod wpływem zmodyfikowanego trójchromianu Gomoriego i ze względu na ten charakterystyczny wygląd nazywane są czerwonymi włóknami szmatowatymi [109]. Takie pojedyncze włókna szmatowate można oglądać pod mikroskopem po wykonaniu wycinka/biopsji z mięśnia. Oceniając aktywność enzymatyczną w homogenatach uzyskanych z chorobowo zmienionych mięśni można także wykazać niedobory oksydazy cytochromu c.

14.5 Objawy endokrynologiczne

We wczesnych stadiach choroby mitochondrialnej takiej jak KSS, możliwe jest pierwotne zajęcie jednego tylko układu, często endokrynologicznego. Początkowo nieprawidłowości endokrynne u większości pacjentów są maskowane przez encefalomiopatię. Często też nie stawiamy prawidłowej diagnozy przyczynowej, gdyż choroba pierwotnie manifestuje się jako endokrynopatia bez towarzyszących zaburzeń funkcji nerwowo-mięśniowych i dodatniego wywiadu rodzinnego. Najczęściej występującymi zaburzeniami endokrynologicznymi w przebiegu KSS wydają się być: cukrzyca, niewydolność nadnerczy oraz niedobór hormonu wzrostu [110-113]. Także tężyczka wywołana hipokalcemią w przebiegu niedoczynności przytarczyc może być pierwszą manifestacją KSS [114]. Najczęściej dotkniętymi patologią gruczołami dokrewnymi w KSS są: przysadka (prowadząc w przebiegu niedoczynności do upośledzenia wzrostu, niewydolności tarczycy i gonad), gruczoł tarczowy (niedoczynność i nadczynność tarczycy, zapalenie typu Hashimoto), przytarczycy (niedoczynność i nadczynność), trzustka (cukrzyca mitochondrialna), nadnercza (niewydolność z hipoaldosteronizmem, hiponatremią i chorobą Addisona) lub gonady (opóźnione dojrzewanie i hipogonadyzm) [115-117]. Objawy niedoczynności przysadki lub tarczycy mogą pokrywać się z dolegliwościami w obrębie mięśni szkieletowych, manifestując się zmęczeniem, ogólnym osłabieniem, spowolnieniem i dystonią mięśniową. Niski wzrost obserwuje się u około 38% chorych z KSS, a cukrzycę u ok. 20% [118].

14.6 Hormon wzrostu a KSS.

Pomimo, że zaburzenie wzrostu jest dość powszechne w encefalopatiach mitochondrialnych, to jednak informacje o skuteczności leczenia hormonem wzrostu są bardzo skąpe. Niedobór GH występuje tylko u niektórych pacjentów. U tych, u których zastosowano terapię rhGH obserwowano początkowe zwiększenie tempa wzrastania tak jak ma to miejsce u niskorosłych pacjentów z niedoborem GH. Jednakże nie obserwowano charakterystycznego *catch-up growth* u pacjentów z encefalopatią mitochondrialną [119]. Większość pacjentów z KSS prezentuje utratę masy ciała i przewlekłe zmęczenie, dlatego też leczenie rhGH przyczyniając się do wzrostu syntezy białek, może zmniejszać wyniszczenie występujące skrajnie u niektórych pacjentów, lecz należy zachować ostrożność, aby uniknąć możliwych efektów ubocznych. Niektórym pacjentom można tymczasowo poprawić jakość życia, ale u innych, w trakcie tej samej terapii, może wystąpić niewydolność wielonarządowa. Pacjenci z KSS i z niedoborem wzrostu, mogą być leczeni rhGH, ale muszą podlegać bardzo ścisłemu monitorowaniu nie tylko pod względem efektywności leczenia (poprawa wzrostu), ale także bezpieczeństwa leczenia. W przypadku kiedy tempo wzrastania jest niezadowalające, gdy nasilają się inne wcześniej występujące dolegliwości, albo gdy pojawiają się nowe objawy, wówczas należy zakończyć leczenie rhGH.

II. ZAŁOŻENIA PRACY

Terapia rhGH dzieci z niedoborem GH nie zawsze przynosi zadowalający efekt terapeutyczny pomimo spełnienia wszystkich kryteriów diagnostycznych oraz leczniczych. Wśród przyczyn nieskutecznej terapii rhGH uwzględnić należy:

1. niewłaściwie dobraną dawkę rhGH
2. obniżoną jakość leku (nieprawidłowy transport leku i/lub jego przechowywanie)
3. nieprawidłowe podawanie czy wręcz zaniechanie stosowania leku przez pacjenta.

Niezbędna jest wtedy dokładna (jeszcze bardziej wnikliwa niż poprzednio) analiza stanu zdrowia pacjenta, która może wskazać na istnienie innych schorzeń, które nie były dotąd rozpoznane lub pojawiły się w trakcie leczenia rhGH.

Wśród pacjentów z SNP, nie odpowiadających w oczekiwany przez nas sposób na zastosowane leczenie rhGH, zaobserwowano chłopca, u którego po dokładnej analizie towarzyszących dolegliwości (słabe tempo wzrastania, opadanie powiek i uogólnione osłabienie mięśniowe, zwyrodnienie barwnikowe siatkówki) postawiono wstępne rozpoznanie kliniczne KSS.

W zaistniałej sytuacji pojawiły się pytania:

- czy analizując dotychczasowy „model” wzrastania pacjenta z podejrzeniem KSS, który początkowo manifestował wyłącznie zaburzenia auksologiczne, można wyselekcjonować grupę dzieci leczonych rhGH z podobnymi trudnościami w „nadganianiu wzrostu” i czy w tej grupie należy poszukiwać tego samego schorzenia?
- czy opierając się tylko na objawach klinicznych dotyczących jednego układu można wysunąć podejrzenie KSS?
- czy dysponując wiedzą o podłożu zaburzeń w KSS można jeszcze skuteczniej pomóc pacjentom dotkniętym tym schorzeniem poprzez zastosowanie innej niż standardowa terapia?

Rozpoznanie KSS opierało się do niedawna na ocenie histologicznej mięśnia szkieletowego pobranego za pomocą biopsji chirurgicznej, oprócz stwierdzenia charakterystycznego obrazu klinicznego i badań dodatkowych (m.in. biochemicznych i EKG). W klasycznym opisie potwierdzającym KSS w obrazie mikroskopowym

stwierdza się charakterystyczne włókna szmatowate. Ta inwazyjna metoda nie daje jednak 100% pewności co do potwierdzenia lub wykluczenia choroby. Przy pomocy badań molekularnych innego materiału biologicznego (krwi) można precyzyjnie ustalić miejsce uszkodzenia mitochondrialnego DNA, czyli przyczynę KSS i ten rodzaj diagnostyki można zaproponować wyselekcjonowanym pacjentom spełniającym poniższe kryteria.

Podsumowanie założeń pracy

1. Somatotropinowa niedoczynność przysadki jest przyczyną niedoboru wzrostu i wskazaniem do leczenia rhGH.
2. Nie wszystkie dzieci z udowodnionym niedoborem hormonu wzrostu dobrze odpowiadają na leczenie rhGH, nie prezentując charakterystycznego „*nadganiania wzrostu*” („*catch-up growth*”).
3. Jedną z przyczyn braku „*catch-up growth*”, nieuwzględnianą w końcowej analizie efektywności leczenia rhGH, może być utajona bądź jawna postać zespołu Kearns-Sayre’a, zespołu chorobowego związanego z delecją mtDNA.

III. CELE PRACY

1. Wyselekcjonowanie z grupy dzieci z somatotropinową niedoczynnością przysadki leczonych rhGH w województwie podkarpackim tych chorych, u których obserwuje się słabszą niż oczekiwano odpowiedź na zastosowane leczenie rhGH i brak charakterystycznego „*nadganiania wzrostu*” w trakcie leczenia oraz ich szczegółowa charakterystyka.
2. Charakterystyka grupy badanej pod kątem współistnienia innych nieprawidłowości (endokrynologicznych i nieendokrynologicznych).
3. Analiza molekularna mtDNA u ww., wyselekcjonowanych pacjentów, w poszukiwaniu delecji mtDNA jako przyczyny SNP.
4. Ocena kliniczna, biochemiczna i hormonalna pacjentów z delecją mtDNA i ich odpowiedź na prowadzone leczenie rhGH.

IV. PACJENCI I METODY

1. Poradnia Endokrynologiczna Szpitala Wojewódzkiego nr 2 w Rzeszowie prowadzi leczenie dzieci z SNP przy zastosowaniu rhGH. Ww. Poradnia obejmuje opieką endokrynologiczną dzieci województwa podkarpackiego i należy domniemywać, że zdecydowana większość pacjentów z tego regionu Polski, ze zdiagnozowaną SNP, jest leczona właśnie w tym ośrodku. Pacjenci zakwalifikowani do terapii rhGH posiadają dokumentację, która jest źródłem informacji o parametrach morfologicznych, o wynikach badań biochemicznych, hormonalnych oraz obrazowych.

2. Podstawowym kryterium kwalifikacyjnym włączenia do grupy badanej było występowanie u pacjentów niskorosłych:

- somatotropinowej niedoczynności przysadki* (postać izolowana lub wielohormonalna)

- słabszej niż oczekiwano odpowiedzi na wprowadzone leczenie rhGH (brak charakterystycznego *catch-up growth* po 1 roku leczenia: $\Delta hSDS \leq 0,5$).

Niedoczynność przysadki w zakresie wydzielania hormonu wzrostu w grupie badanej była potwierdzona obniżonym wyrzutem maksymalnym GH w testach stymulacyjnych (*maksymalny wyrzut GH <10 ng/ml), przy jednoczesnym wykluczeniu innych przyczyn niskorosłości.

Po spełnieniu kryteriów „Ogólnopolskiego programu leczenia niedoboru wzrostu u dzieci i młodzieży w następstwie somatotropinowej niedoczynności przysadki, zespołu Turnera i przewlekłej niewydolności nerek, przez zastosowanie hormonu wzrostu” [76] i ostatecznej akceptacji wniosku przez Zespół Koordynacyjny ds. Stosowania Hormonu Wzrostu, inicjowano terapię rhGH.

3. Z grupy 202 dzieci leczonych rhGH w latach 2005 – 2007 w Oddziale Dziecięcym oraz Poradni Endokrynologicznej dla Dzieci Szpitala Wojewódzkiego nr 2 w Rzeszowie wyselekcjonowano grupę **32** dzieci, które pomimo standardowego leczenia nie wykazywały charakterystycznego „*nadgania* wzrostu” i po dwóch latach leczenia pozostawały nadal niskie. Wszystkie dzieci leczone były tym samym lekiem (Genotropin; Pfizer) w dawkach ustalonych dla SNP: 0,1 - 0,33mg (0,3 -1,0

IU)/kg/tydz., (0,015– 0,045 mg/kg/d) sc [76]. Wśród 32 dzieci w wieku od 4,2 do 16,0 lat było 8 dziewcząt (25%) i 24 chłopców (75%) (K/M = 1/3).

4. Pomiar wysokości ciała trakcie prowadzonej terapii był dokonywany każdorazowo przez ten sam przeszkolony personel, przy użyciu wzrostomierza firmy Harpenden, z dokładnością pomiaru do 1 mm.

Analiza auksologiczna wyselekcjonowanych pacjentów oparta była o siatki centylowe wg Niedźwieckiej i Palczewskiej [14] i obejmowała tempo wzrastania (TW), htSDS oraz htSDS – thSDS, gdzie htSDS wyliczano z poniższego wzoru [7]

$$\text{htSDS} = \frac{\text{wysokość ciała} - \text{wysokość 50c [cm]}}{0.5 (\text{wysokość 50c} - \text{wysokość 3c}) [\text{cm}]}$$

Obliczanie wzrostu docelowego (th) dokonywano wg poniższych wzorów [120]:

$$\text{Chłopcy} = [(\text{wzrost matki} + 13 \text{ cm}) + \text{wzrost ojca}] / 2$$

$$\text{Dziewczynki} = [\text{wzrost matki} + (\text{wzrost ojca} - 13 \text{ cm})] / 2$$

Ocenę TW przeprowadzono wg Pradera i wsp. [121].

5. Ocena stadium dojrzewania była przeprowadzona wg Tannera [16,17], ocena wieku kostnego wg Greulich'a i Pyle'a [18], a PAH wg Bayley-Pinneau [122].

6. Badania molekularne były prowadzone w 2 etapach: (1) izolacja całkowitego DNA z limfocytów krwi obwodowej wszystkich zakwalifikowanych pacjentów (krew była zawsze zabezpieczana w trakcie pobierania krwi do innych planowych badań niezbędnych dla monitorowania terapii rhGH), (2) amplifikacja fragmentów mitochondrialnego DNA (mtDNA) w oparciu o zestaw starterów obejmujący całą kolistą cząsteczkę mtDNA. Badania wykonano w Pracowni Endokrynologii Molekularnej Kliniki Endokrynologii i Diabetologii Wieku Rozwojowego UM w Poznaniu (kierownik: prof. M. Niedziela) (aktualnie Klinika Endokrynologii i Reumatologii Dziecięcej). Ww. badania były częścią projektu badawczego finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach projektu badawczego 2 P05A 070 30 (kierownik: dr n. biol. J. Maceluch) (2006-2008).

Metodyka badań molekularnych

Ocena kliniczna pacjentów grupy badanej (brak „*nadganiania wzrostu*”) wskazywała, że jedną z przyczyn ww. stanu w trakcie leczenia rhGH może być delecja mtDNA, w tym zespół Kearns-Sayre'a. Charakterystyczną cechą KSS są delecje dużych fragmentów cząsteczki mtDNA. Delecje te występują w stanie heteroplazmii (występowanie jednocześnie cząsteczek mtDNA z delecją oraz prawidłowych cząsteczek w tej samej komórce) w różnej proporcji, w zależności od tkanki.

Analiza molekularna mitochondrialnego DNA pacjentów grupy badanej została wykonana na matrycy całkowitego DNA wyizolowanego z krwi obwodowej za pomocą zestawu QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen). Stężenie i jakość wyizolowanego DNA zostały określone przy użyciu spektrofotometru (BioPhotometer, Eppendorf). Aby uprościć i ujednoczyć procedurę reakcji, wszystkie próbki DNA po izolacji były rozcieńczane do jednakowego stężenia 20 ng/ul. Z tak rozcieńczonych próbek do analiz używano 1 ul, a więc 20 ng całkowitego DNA. W celu wykrycia i lokalizacji delecji w mitochondrialnym DNA wykonano cztery reakcje PCR (**Tab. 3**), w których 20 ng DNA posłużyło jako matryca do amplifikacji produktów z różnymi parami starterów specyficznych dla sekwencji mtDNA. Jednocześnie wykonywano reakcje kontrolne na DNA zdrowej osoby w celu uwidocznienia prawidłowych produktów reakcji dla porównania. Pary starterów zostały zaprojektowane tak, aby przeanalizować całą sekwencję genomu mitochondrialnego i wykryć każdą możliwą delecję (**Ryc. 6**). Amplifikację przeprowadzono przy użyciu zestawu Expand Long Range Polymerase (Roche) zgodnie z zaleceniami producenta zestawu. Profil termiczny reakcji PCR przedstawiono w **Tab. 4**. Produkty reakcji zostały następnie rozdzielone w 0,8% żelu agarozowym, wybarwione bromkiem etydyny i uwidocznione w świetle UV. Produkty reakcji, które wskazywały na możliwość wystąpienia delecji (mniejszy rozmiar niż oczekiwany) były ekstrahowane z żelu zestawem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). Dokładny rozmiar i lokalizacja delecji zostały określone w wyniku bezpośredniego sekwencjonowania produktów reakcji PCR oczyszczonych z żelu agarozowego. Sekwencjonowanie prowadzono systemem BigDye Terminator v3.1 z wykorzystaniem urządzenia ABI Prism 3130XL (Applied Biosystems).

Ilościowe oznaczenie poziomu heteroplazmii mitochondrialnego DNA pacjenta zostało wykonane techniką Real-Time PCR. 20 ng całkowitego DNA z krwi zostało poddanych analizie z wykorzystaniem zestawu QuantiTect SYBR Green PCR Kit

(Qiagen) na urządzeniu Mastercycler ep *realplex* (Eppendorf). Reakcje wykonywano według zaleceń producenta zestawu. Profil termiczny reakcji przedstawiono w **Tab. 5**. Przeprowadzono cztery niezależne reakcje amplifikacji (**Tab. 6**): w reakcji pierwszej oznaczano ilość mRNA genu referencyjnego GAPDH; w reakcji drugiej oznaczano całkowity poziom mtDNA pacjenta; w reakcji trzeciej analizowano tylko normalne, niezmutowane cząsteczki mtDNA pacjenta (startery były zlokalizowane wewnątrz regionu ulegającego delecji); w czwartej reakcji badano wyłącznie poziom cząsteczek mtDNA z delecją (startery okalające miejsce delecji, produkt reakcji powstaje jedynie w przypadku obecności delecji). Jako kontrolę w tym badaniu przeprowadzono analizę poziomu mtDNA u pięciu zdrowych osób z wykorzystaniem tych samych par starterów (reakcja 1 i 2) i warunków reakcji, co w przypadku DNA pacjenta z delecją. Wynik analizy ilościowej był obliczony jako względny poziom mitochondrialnego DNA w stosunku do poziomu ekspresji jądrowego genu GAPDH, który ulega konstytutywnej ekspresji na stałym poziomie we wszystkich komórkach organizmu człowieka. Następnie przeprowadzono właściwe badanie poziomu heteroplazmii cząsteczek mtDNA, analizując w oddzielnych reakcjach wyłącznie cząsteczki mtDNA bez delecji (reakcja 3) oraz wyłącznie cząsteczki mtDNA z delecją (reakcja 4). Wszystkie reakcje zostały wykonane w trzech powtórzeniach na tej samej płytce PCR w tej samej reakcji. Na końcu reakcji przeprowadzono analizę krzywej topnienia produktów aby upewnić się, że w reakcji otrzymano wyłącznie specyficzne produkty reakcji (funkcja domyślnie zaimplementowana w oprogramowaniu urządzenia Mastercycler ep *realplex*). Względny poziom ekspresji poszczególnych frakcji mtDNA został obliczony z uzyskanych wyników za pomocą metody ΔC_T .

Sekwencjonowanie mtDNA przeprowadzono w Wydziałowej Pracowni Techniki Biologii Molekularnej, Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, ul. Umultowska 89, 61-614 Poznań.

Tabela 4. Profil termiczny reakcji PCR wykorzystywany do detekcji delecji w mtDNA pacjentów.

Etap	Temperatura	Czas	Ilość powtórzeń
Denaturacja wstępna	92°C	2 min	1x
Denaturacja Przyłączanie startera Elongacja	92°C 60°C 68°C	10 s 15 s 8 min	10x
Denaturacja Przyłączanie startera Elongacja	92°C 60°C 68°C	10 s 15 s 8 min + 20 s dla każdego kolejnego cyklu	20x
Końcowa elongacja	68°C	5 min	1x

Tabela 5. Profil termiczny reakcji Real-Time PCR wykorzystywany do ilościowej analizy mitochondrialnego DNA pacjentów.

Etap	Temperatura	Czas	Ilość powtórzeń
Denaturacja wstępna	95°C	15 min	1x
Denaturacja Przyłączanie startera Elongacja	94°C 55°C 72°C	15 s 30 s 30 s	30x
Analiza krzywej topnienia produktów	95°C	15 s	1x
	60°C	15 s	
	powolny wzrost temp. od 60°C do 95°C	20 min	
	95°C	15 s	

Tabela 6. Zestawy starterów wykorzystywane w ilościowej analizie mtDNA techniką Real-Time PCR.

Reakcja nr	Użyte startery	Amplifikowany region	Wielkość produktu
1	GAPDHq7F + GAPDHq7R	nt 7-99 mRNA GAPDH	93 pz
2	mtQset3F + mtQset3R	nt 3244-3319 mtDNA	76 pz
3	mtQset1F + mtQset1R	nt 11 142-11 206 mtDNA	65 pz
4	KR-Q-for + KR-Q-rev	nt 8421-15 549 mtDNA	154 pz

Tabela 7. Sekwencje nukleotydowe starterów wykorzystywanych w badaniach molekularnych.

Nazwa startera	Długość startera	Sekwencja 5'→3'
mtF1	23 nt	TGGTACTGAACCTACGAGTACAC
mtR2	21 nt	ATGAGTGAGGCAGGAGTCCGA
mtF3	23 nt	AGGCTTCAACATCGAATACGCCG
mtR3	23 nt	CGGCGTATTCGATGTTGAAGCCT
mtF4	24 nt	GGCTTACGACCCCTTATTTACCGA
mtR4	24 nt	TCGGTAAATAAGGGGTCGTAAGCC
mtF5	24 nt	TGCCAGCCACCATGAATATTGTAC
mtR5	24 nt	GTACAATATTCATGGTGGCTGGCA
GAPDHq7F	20 nt	CAGTCAGCCGCATCTTCTTT
GAPDHq7R	20 nt	ACGACCAAATCCGTTGACTC
mtQset1F	20 nt	CCACCTTGGCTATCATCACC
mtQset1R	20 nt	GAAGTATGTGCCTGCGTTCA
mtQset3F	21 nt	CCCGGTAATCGCATAAACTT
mtQset3R	19 nt	TTGGCCATGGGTATGTTGT
KR-Q-for	21 nt	CACTATTCCTCATCACCCAAC
KR-Q-rev	21 nt	TTGTGTATGATATGTTTGCGG

7. Na ww. badania molekularne uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Akademii Medycznej (aktualnie Uniwersytetu Medycznego) w Poznaniu nr 258/01 a rodzice badanych dzieci podpisali świadomą zgodę na badania i otrzymywali informację o rodzaju planowanych badań.

8. Analiza statystyczna: w ramach statystyki opisowej dla cech ilościowych obliczono wartości średnie, mediany i odchylenia standardowe. Dla porównywania grup niepowiązanych oraz różnic pomiędzy średnimi zastosowano test parametryczny analizy wariancji (ANOVA), określając graniczny poziom istotności przyjęcia hipotezy zerowej.

Obliczenia wykonano przy pomocy pakietu statystycznego STATISTICA PL.

V. WYNIKI

1. Charakterystyka grupy badanej

Wstępnej analizie poddano 202 dzieci leczonych rhGH z powodu somatotropinowej niedoczynności przysadki, które w latach 2005-2007 znajdowały się w opiece Poradni Endokrynologicznej Szpitala Wojewódzkiego nr 2 Rzeszowie. Wszyscy pacjenci po określonym czasie obserwacji wzrastania i po przeprowadzeniu pełnej diagnostyki zostali zakwalifikowani do leczenia rhGH zgodnie z wytycznymi „Ogólnopolskiego Programu”. W okresie obserwacji, przed kwalifikacją do grupy badanej, pacjenci byli leczeni w tym samym lekiem [Genotropin (*Pfizer*)], i stosowano standardowe dawki leku tj. 0.025-0.045 mg/kg/dzień sc.

Wśród ww. grupy wyodrębniono 32 pacjentów (co stanowiło 15,8% ww. dzieci), którzy pomimo prowadzonej terapii nie wykazywali, po 2 latach od jej rozpoczęcia, charakterystycznego „nadganiań wzrostu” i pozostawali nadal niscy (**Rycina 8, Rycina 9**). Ta grupa była przedmiotem analiz auksologicznych oraz badań molekularnych w kierunku delecji mtDNA. Grupa badana liczyła 8 dziewcząt oraz 24 chłopców (**Tabela 8**).

Tabela 8. Grupa badana z uwzględnieniem płci.

	dziewczynki	chłopcy	ogółem
Liczba	8	24	32
% badanych	25	75	100

Tylko dwóch chłopców było wcześniakami urodzonymi pomiędzy 36 a 37 tyg. ciąży, natomiast sześćcioro dzieci spełniało kryteria małej urodzeniowej masy ciała (**Tabela 9**), ale na podstawie dokumentacji medycznej nie można ustalić kryteriów kwalifikacji do grupy IUGR bądź SGA.

Tabela 9. Dzieci z małą urodzeniową masą ciała w grupie badanej (n=6).

płeć	M	M	K	M	K	M
masa urodzeniowa (g)	1920	2150	2230	2400	2450	2520
wiek ciążowy (tyg.)	38	38	43	39	40	42

Grupa badana (n=32) była dość jednorodna pod względem urodzeniowego wieku ciążowego, masy urodzeniowej i długości ciała (**Tabela 10**).

Tabela 10. Charakterystyka auksologiczna, kliniczna i hormonalna grupy badanej
(w tabeli podano wartości średnie wraz z odchyleniem standardowym)

	Dziewczynki	Chłopcy	Ogółem	KSS
Liczebność grupy	8	24	32	1
Wiek urodzeniowy (tyg.)	39,6±1,7	38,9±1,4	39,1±1,5	39,0
Długość urodzeniowa (cm)	52,0±1,7	51,3±4,9	51,5±4,3	54,0
Masa urodzeniowa (g)	3055±654	2933±536	2963±559	3500
Masa urodzeniowa (wt SDS)	-0,61±1,7	-0,91±1,09	-0,83±1,25	0,07
Wiek rozpoczęcia leczenia (WM) (lat)	11,1±2,1	12,2±3,1	11,9±2,9	7,4
Wiek kostny (WK) rozpoczęcie leczenia (lat)	8,9±1,8	9,7±3,6	9,5±3,2	5,0
WK/WM	0,80±0,11	0,79±0,17	0,79±0,17	0,68
Wzrost matki (cm)	155,3±7,3	157,8±5,5	157,1±6,0	156,5
Wzrost matki (htSDS)	-1,79±1,26	-1,36±0,93	-1,47±1,02	-1,57
Wzrost ojca (cm)	167,8±7,7	171,2±6,8	170,3±7,1	180,3
Wzrost ojca (htSDS)	-1,83±1,28	-1,26±1,12	-1,40±1,17	0,25
Wzrost średni rodziców th (cm)	155,0±5,8	171,0±5,0	167,0±8,7	174,9
thSDS	-1,85±0,95	-1,29±0,82	-1,43±0,87	-0,64
Wzrost w chwili rozpoczęcia leczenia (cm)	122,4±8,1	127,7±18,6	-	109,2
Wzrost w chwili rozpoczęcia leczenia (htSDS)	-4,04±0,71	-4,03±1,15	-4,03±1,05	-3,48
Wzrost po 1 roku leczenia (cm)	129,5±7,9	134,8±18,8	-	116,0
Wzrost po 1 roku leczenia (htSDS)	-3,78±0,64	-3,82±1,16	-3,81±1,0	-3,04
Wzrost po 2 latach leczenia (cm)	136,4±8,0	141,5±19,2	-	122,0
Wzrost po 2 latach leczenia (htSDS)	-3,48±0,43	-3,62±1,26	-3,58±1,10	-2,70
PAH w chwili rozpoczęcia leczenia (cm)	146,2±6,2	163,5±8,1	-	-
PAH SDS	-3,33±1,06	-2,53±1,33	-2,77±1,30	-
PAH po 1 roku leczenia (cm)	148,2±4,5	164,5±7,1	-	161,6
PAH SDS po 1 roku leczenia	-2,99±0,79	-2,36±1,16	-2,54±1,09	-2,84
PAH po 2 latach leczenia (cm)	149,7±2,3	166,1±7,0	-	162,2
PAH SDS po 2 latach leczenia	-2,74±0,39	-2,10±1,17	-2,27±1,05	-2,74
htSDS –thSDS w chwili rozpoczęcia leczenia	-2,19±1,26	-2,74±1,35	-2,60±1,33	-2,84
htSDS –thSDS po 1 roku leczenia	-1,93±1,20	-2,53±1,34	-2,38±1,32	-2,40
htSDS –thSDS po 2 latach leczenia	-1,63±1,07	-2,33±1,39	-2,15±1,34	-2,06
TW w chwili rozpoczęcia leczenia (cm/rok)	3,9±0,5	3,5±0,9	3,6±0,9	3,0
TW SDS w chwili rozpoczęcia leczenia	-1,09±0,74	-1,50±1,11	-1,40±1,04	-3,50
TW po 1 roku leczenia (cm/rok)	7,2±0,9	7,1±1,5	7,1±1,3	7,9
TW SDS po 1 roku leczenia	1,09±0,81	0,70±1,21	0,80±1,12	3,30
TW po 2 latach leczenia (cm/rok)	6,9±0,8	6,7±1,3	6,8±1,2	6,0
TW SDS po 2 latach leczenia	1,58±1,22	1,18±1,61	1,28±1,61	1,40
Masa ciała w chwili rozpoczęcia leczenia (kg)	24,7±3,5	28,6±10,5	-	17,6
Masa ciała w chwili rozpoczęcia leczenia (SDS)	-2,7±0,7	-2,6±1,1	-2,6±1,0	-2,6
Masa ciała po 1 roku leczenia (kg)	27,4±3,9	32,6±11,0	-	19,2
Masa ciała po 1 roku leczenia (SDS)	-2,6±0,6	-2,4±0,9	-2,5±0,9	-2,5
Masa ciała po 2 latach leczenia (kg)	31,9±5,3	37,1±11,6	-	21,1
Masa ciała po 2 latach leczenia (SDS)	-2,5±0,8	-2,3±0,8	-2,4±0,8	-2,5

Tabela 10 (cd). Charakterystyka auksologiczna, kliniczna i hormonalna grupy badanej (w tabeli podano wartości średnie wraz z odchyleniem standardowym)

	Dziewczynki	Chłopcy	Ogółem	KSS
BMI w chwili rozpoczęcia leczenia (kg/m ²)	16,5±1,2	17,1±3,4	-	15,0
BMI w chwili rozpoczęcia leczenia (SDS)	-0,6±1,0	-0,8±1,9	-0,7±1,9	-0,6
BMI po 1 roku leczenia (kg/m ²)	16,3±1,3	17,4±3,0	-	14,2
BMI po 1 roku leczenia (SDS)	-1,0±1,0	-1,0±1,6	-1,0±1,6	-1,4
BMI po 2 latach leczenia (kg/m ²)	17,1±1,9	18,0±2,5	-	14,2
BMI po 2 latach leczenia (SDS)	-0,9±1,2	-1,0±1,3	-0,9±1,3	-1,6
Cechy dojrzewania płciowego w chwili rozpoczęcia leczenia	1	9	10	0
Cechy dojrzewania (%)	12,5	37,5	31,25	0
Maksymalny wyrzut GH w testach (ng/ml) 5-10	6	22	28	1
Maksymalny wyrzut GH w testach (ng/ml) <5	2	2	4	0
Poziom IGF-1 przed leczeniem (ng/ml)	143,1±46,8	120,1±55,6	125,8	39,0
Poziom IGF-1 po 1 roku leczenia (ng/ml)	372,6±119,7	253,6±117,1	286,4	183,0
Poziom IGF-1 po 2 latach leczenia (ng/ml)	441,5±168,5	376,5±139,5	394,4	-
Średnia dawka rhGH (mg/kg/dzień)	0,029	0,028	0,028	0,027

Pomiary rodziców pozwalały na prognozowanie wzrostu docelowego poszczególnych pacjentów jak i całej grupy badanej. Uwagę zwraca niski wzrost rodziców pacjentów obu płci. Średnia wysokość rodziców była niższa w przypadku rodziców dziewczynek, jednak znajdowała się powyżej 3 centyla.

Wykazano znamiennej różnicę pomiędzy średnim wzrostem (cm) rodziców dziewczynek i chłopców (analiza wariancji; p<0,05).

W obu grupach, zarówno u dziewczynek jak i chłopców, wzrost matki i ojca wyrażony w htSDS znajdował się na bardzo zbliżonym poziomie. Rodzice chłopców byli nieco wyżsi od rodziców dziewczynek, zatem przyjmując średni wzrost rodziców jako prognozowany wzrost docelowy (th) to chłopcy mieli nieznacznie lepszą prognozę wzrostu końcowego (**Tabela 10**).

Nie wykazano znamiennej różnicy pomiędzy thSDS grup dziewczynek i chłopców (analiza wariancji; p>0,05).

Włączenie do leczenia rhGH w grupie badanej następowało w różnych okresach ich życia. Najmłodszy z pacjentów rozpoczynali leczenie jeszcze w okresie przedszkolnym, najstarsi już w zaawansowanym stadium dojrzewania, przy czym średnia wieku włączenia leczenia u obu płci przypadła na okres związany z początkiem dojrzewania płciowego (**Tabela 11**).

Tabela 11. Wiek rozpoczęcia leczenia rhGH grupy badanej.

Wiek rozpoczęcia leczenia	dziewczynki	chłopcy	ogółem
Minimalny (w latach)	4,8	4,2	4,5
Maksymalny (w latach)	13,6	16,0	14,8
Średni (w latach)	11,1	12,2	11,9

Dojrzewanie płciowe w chwili rozpoczęcia leczenia stwierdzono zdecydowanie częściej w grupie chłopców (n=9) niż u dziewczynek (n=1), co stanowiło odpowiednio 37,5% i 12,5% badanych grup (**Tabela 10**).

Podczas diagnozowania niskorosłości zostały wykonane testy stymulacyjne określające maksymalny wyrzut GH i potwierdzające nieprawidłową sekrecję GH w grupie badanej. U 4 pacjentów (2 dziewcząt i 2 chłopców) zdiagnozowano ciężki niedobór GH, w którym wydzielanie GH nie przekraczało poziomu 5 ng/ml (**Tabela 10**). W grupie dziewczynek stanowiło to 25% badanych, a u chłopców 8,3%. W chwili rozpoczęcia leczenia rhGH niedobór wzrostu był bardzo znaczny, a wyrażony w htSDS był zbliżony dla obu płci tj. -4.04 i -4.03 odpowiednio dla dziewczynek i chłopców. Biorąc jednak pod uwagę średni wzrost rodziców, to chłopcy mieli większy niedobór do „nadganiań wzrostu” aniżeli dziewczynki. Pomiar w poszczególnych grupach ze względu na płeć przedstawiono w **Tabela 10**.

U wszystkich pacjentów zastosowano rhGH (Genotropin; Pfizer amp. 5,3 mg i 12 mg) w dawce standardowej, przewidzianej przez program leczniczy dla SNP (**Tabela 10**). Po 1 roku leczenia ww. dawką rhGH, pomimo zwiększonego tempa wzrastania, nie nastąpiło oczekiwane wyraźne „nadganie wzrostu” i nadal jego niedobór w stosunku do średniego wzrostu rodziców pozostawał dość znaczny w obu grupach dzieci, z niewielką poprawą wzrostu w grupie dziewczynek (**Tabela 10**). Po 2 latach terapii rhGH nadal obserwowano nieznaczne „nadganie wzrostu” w obu grupach z utrzymującą się przewagą poprawy wzrastania w grupie dziewczynek. W przebiegu 2-letniej obserwacji po rozpoczęciu leczenia „nadganie wzrostu” było podobne w obydwu grupach pacjentów (**Tabela 12**)

Tabela 12. Nadganie wzrostu w trakcie leczenia (htSDS) grupy badanej.

„nadganie wzrostu”	dziewczynki	chłopcy	ogółem
W 1 roku leczenia	0,26	0,21	0,22
W 2 roku leczenia	0,30	0,20	0,23
Łącznie po 2 latach leczenia	0,56	0,41	0,45

Nie wykazano znamiennej różnicy we wzroście (*thSDS*) pomiędzy grupą dziewczynek a grupą chłopców przed leczeniem, po 1 roku leczenia i po 2 latach leczenia *rhGH*; (test analizy wariancji; $p>0,05$).

Nie wykazano znamiennej różnicy w „nadganiu wzrostu” pomiędzy grupami dziewczynek i chłopców zarówno w 1 jak i 2 roku leczenia; (test analizy wariancji; $p>0,05$).

Nie wykazano znamiennej różnicy w „nadganiu wzrostu” pomiędzy 1 i 2 rokiem leczenia zarówno w grupie dziewczynek jak i chłopców; (test analizy wariancji; $p>0,05$).

Tempo wzrastania (TW) przed włączeniem leczenia było wyraźnie obniżone zarówno u dziewczynek jak i chłopców, w odniesieniu do norm przyjętych dla odpowiedniego wieku metrykalnego oraz płci. Wyrażna zmiana była związana z rozpoczęciem terapii *rhGH*. Największe TW odnotowano u obu płci po 1 roku leczenia. Po 2 latach stosowania *rhGH* było ono nieco niższe niż po 1 roku leczenia, ale nadal wyższe aniżeli przed leczeniem (**Tabela 10**).

Wykazano znamienne różnice pomiędzy tempem wzrastania (TW) przed leczeniem i po 1 roku leczenia *rhGH* w grupach dziewczynek i chłopców; (test analizy wariancji; $p<0,05$).

Nie wykazano istotnie statystycznych różnic pomiędzy tempem wzrastania (TW) po 1 roku i 2 latach leczenia *rhGH* w grupach dziewczynek i chłopców; (test analizy wariancji; $p>0,05$).

Nie wykazano znamienych różnic pomiędzy tempem wzrastania (TW) grupy dziewczynek i grupy chłopców przed leczeniem, po 1 roku leczenia i po 2 latach leczenia *rhGH*; (test analizy wariancji; $p>0,05$).

Przed leczeniem i co 12 miesięcy w trakcie leczenia wykonywano u każdego pacjenta radiogram ręki celem oceny wieku kostnego. W okresie obserwacji różnice wieku kostnego w poszczególnych grupach utrzymywały się na podobnym poziomie (**Tabela 13**).

Tabela 13. Wiek kostny w poszczególnych okresach leczenia grupy badanej.

Wiek kostny (w latach)	dziewczynki	chłopcy	ogółem
W chwili rozpoczęcia leczenia	8,9	9,7	9,5
Po 1 roku leczenia	10,0	10,8	10,6
Po 2 latach leczenia	11,2	12,0	11,8

Pomimo początkowych różnic w przebiegu dojrzewania, z przewagą stanu prepubertalnego po stronie dziewczynek (**Tabela 10**), stosunek wieku kostnego (WK) do wieku metrykalnego (WM), który był początkowo taki sam w obu grupach, w trakcie leczenia rhGH powiększał się stopniowo, z niewielką przewagą u płci żeńskiej (**Tabela 14**).

Tabela 14. Stosunek wieku kostnego do wieku metrykalnego w grupie badanej.

WK/WM	dziewczynki	chłopcy	ogółem
W chwili rozpoczęcia leczenia	0,80	0,80	0,80
Po 1 roku leczenia	0,83	0,82	0,82
Po 2 latach leczenia	0,86	0,85	0,85

Przed rozpoczęciem leczenia rhGH, w oparciu o wiek kostny i aktualny wzrost pacjenta, oceniono prognozę wzrostu ostatecznego (PAH) wg metody Bayley i Pinneau [120]. PAH wyznaczano także po 1 roku i po 2 latach leczenia. Na początku terapii gorsze rokowanie co do końcowego wzrostu prezentowały dziewczynki (htSDS -3.33) w porównaniu z chłopcami (htSDS -2.53). W trakcie 2-letniej obserwacji prognozy wzrostu ostatecznego uległy niewielkiej poprawie, jednakże PAH był nadal poniżej 3 centyla (**Tabela 10**).

Nie wykazano znamiennej różnicy pomiędzy PAH (SDS) przed rozpoczęciem leczenia i po 1 roku leczenia rhGH tak w grupie dziewczynek jak i chłopców; (test analizy wariancji; $p > 0,05$).

Nie wykazano znamiennej różnicy pomiędzy PAH (SDS) przed rozpoczęciem leczenia i po 2 latach leczenia rhGH tak w grupie dziewczynek jak i chłopców; (test analizy wariancji; $p > 0,05$).

Nie wykazano znamiennej różnicy pomiędzy PAH (SDS) po 1 roku i 2 latach leczenia rhGH tak w grupie dziewczynek jak i chłopców; (test analizy wariancji; $p > 0,05$).

Nie wykazano znamiennej różnicy pomiędzy PAH (SDS) grupy dziewczynek, a PAH (SDS) grupy chłopców przed rozpoczęciem leczenia, po 1 roku leczenia i po 2 latach leczenia rhGH; (test analizy wariancji; $p > 0,05$).

Porównano także PAH (SDS) ze średnim wzrostem rodziców thSDS, określającym wzrost docelowy. Pomimo poprawy prognozy wzrostowej na każdym z obserwowanych etapów leczenia PAH nadal różnił się od wzrostu docelowego (th) (**Tabela 15, Tabela 16**).

Poprawa PAH SDS była zbliżona do „nadganiania wzrostu” w obu wyselekcjonowanych grupach: dziewczynek (0,59 / 0,56) i chłopców (0,43 / 0,41).

Tabela 15. Wskaźnik PAH SDS i jego korelacja z thSDS w grupie dziewczynek (n=8).

Dziewczynki	PAH SDS	PAH - thSDS
W chwili rozpoczęcia leczenia (n=8)	-3,33	-1,48
Po 1 roku leczenia (n=8)	-2,99	-1,14
Po 2 latach leczenia (n=8)	-2,74	-0,89

Tabela 16. Wskaźnik PAH SDS i jego korelacja z thSDS w grupie chłopców (n=24).

Chłopcy	PAH SDS	PAH - thSDS
W chwili rozpoczęcia leczenia (n=19)	-2,53	-1,24
Po 1 roku leczenia (n=21)	-2,36	-1,07
Po 2 latach leczenia (n=21)	-2,10	-0,81

Podczas terapii rhGH, oprócz parametrów auksologicznych, monitorowano także parametry biochemiczne w tym m.in. insulinopodobny czynnik wzrostu 1 (IGF-1). Przed rozpoczęciem leczenia średnie stężenia IGF-1 były niskie dla wieku metrykalnego. Szczególnie było to widoczne u chłopców, u których wartość początkowa IGF-1 [120,1 ng/ml (n:183-850)] znajdowała się znacząco poniżej zakresu wartości referencyjnych, a u dziewczynek wynosiła 143,1 ng/ml (n:143-693)].

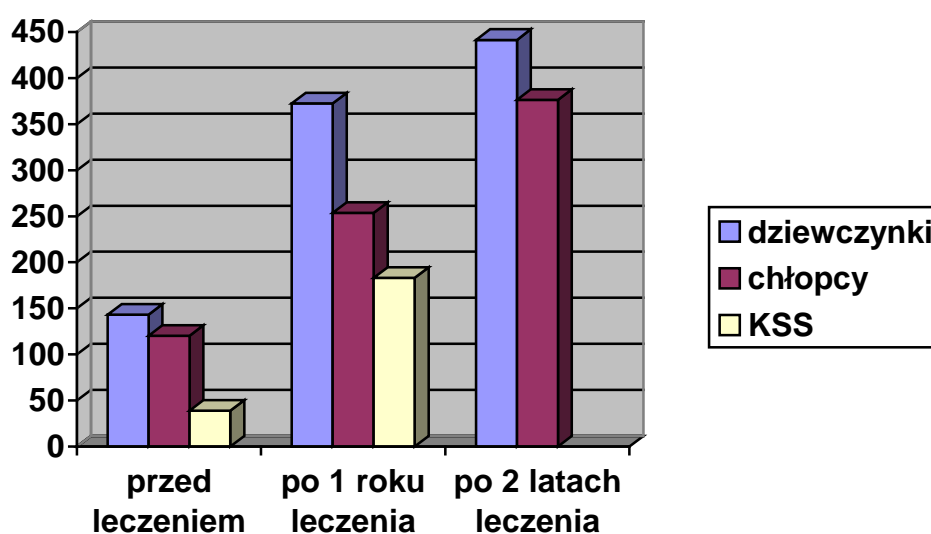
Kontrolne badania wykonane po 1 roku i po 2 latach leczenia rhGH wykazały bardzo wyraźny wzrost IGF-1 w obu grupach, szczególnie widoczny po 1 roku leczenia (**Tabela 10, Rycina 7**).

W grupie dziewczynek wykazano znamiennej różnicę pomiędzy poziomami IGF-1 przed leczeniem i po 1 roku leczenia; (test analizy wariancji; p<0,05); nie wykazano statystycznej istotności pomiędzy poziomami IGF-1 po 1 i po 2 roku leczenia; (test analizy wariancji; p>0,05).

W grupie chłopców wykazano znamienne różnice pomiędzy poziomami IGF-1 przed leczeniem i po 1 roku leczenia, jak również pomiędzy poziomami IGF-1 po 1 i po 2 roku leczenia; (test analizy wariancji; $p < 0,05$).

Nie wykazano znamiennej różnicy pomiędzy poziomami IGF-1 w grupie dziewczynek i w grupie chłopców przed rozpoczęciem leczenia i po 2 latach leczenia; (test analizy wariancji; $p > 0,05$); wykazano znamienne różnicę w ww. parametrach po 1 roku leczenia; (test analizy wariancji; $p < 0,05$).

Rycina 7. Poziomy IGF-1 (ng/ml) w grupach badanych.



W trakcie 2-letniej obserwacji grupy badanej dostrzeżono nie tylko zmianę długości ciała, ale również zmianę masy ciała co odzwierciedlał wskaźnik masy ciała (BMI) (**Tabela 10**).

Nie wykazano znamiennej różnicy pomiędzy BMI (SDS) na poszczególnych etapach leczenia (0/1; 1/2; 0/2) w grupie dziewczynek i w grupie chłopców; (test analizy wariancji; $p > 0,05$).

Nie wykazano znamiennej różnicy pomiędzy BMI (SDS) dziewczynek i chłopców przed leczeniem, po 1 roku i po 2 latach leczenia rhGH; (test analizy wariancji; $p > 0,05$).

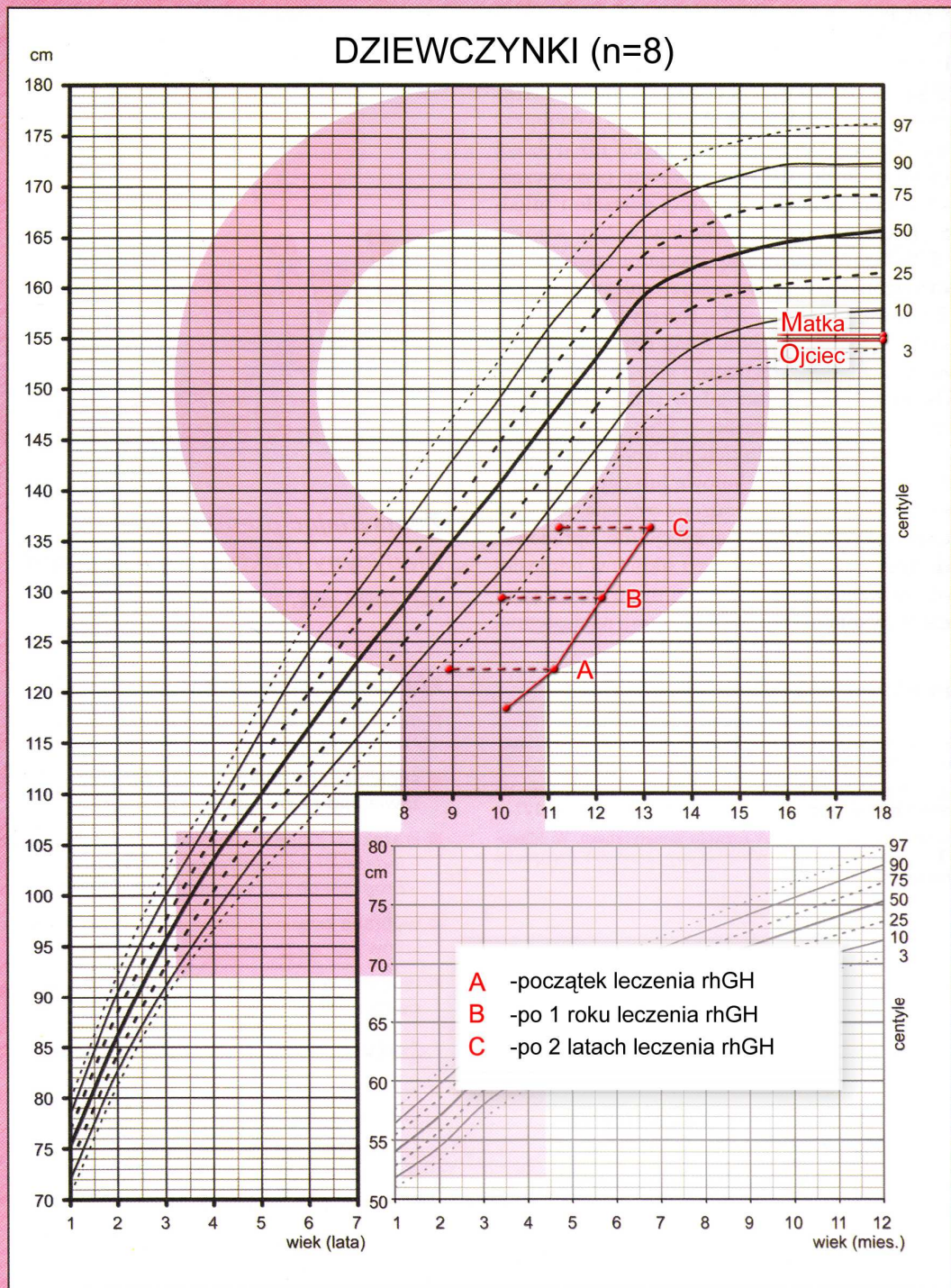
W poszukiwaniu przyczyn słabszego niż oczekiwano „nadgania wzrostu” wraz z leczeniem rhGH, grupę badaną przeanalizowano pod kątem innych nieprawidłowości występujących zarówno przed leczeniem rhGH, jak i w trakcie terapii rhGH (**Tabela 17**).

Tabela 17. Współistniejące choroby i objawy chorobowe w grupie badanej.

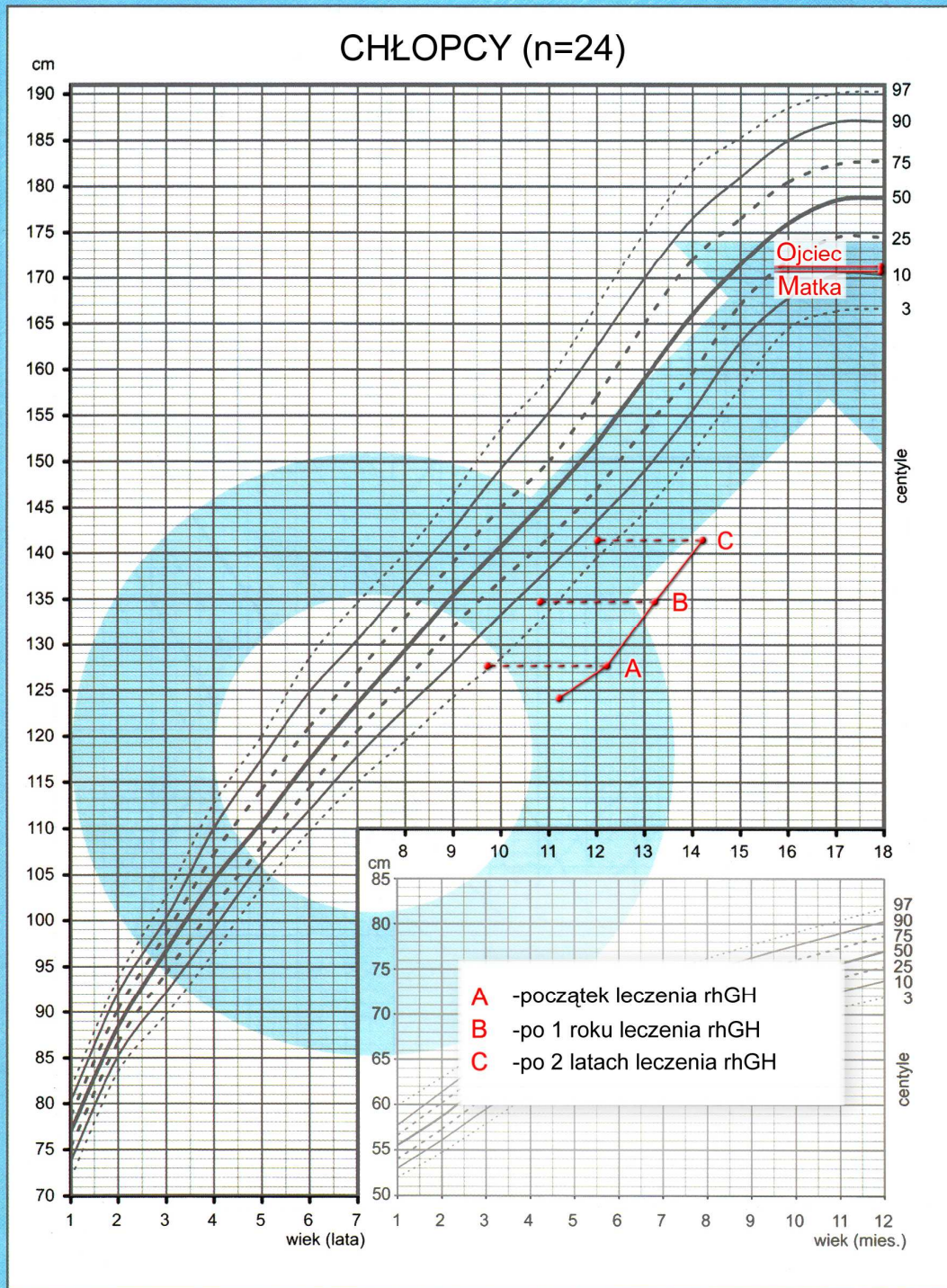
Rodzaj schorzenia i objawów	Liczba pacjentów z dodatkowymi schorzeniami; n=21 (3 objawy u pacjenta nr 24)
Wielohormonalna niedoczynność przysadki	2
Pierwotna niedoczynność tarczycy (rozpoznanie przed leczeniem rhGH)	3*
Wtórna niedoczynność tarczycy (w trakcie leczenia rhGH)	3
Skrzywienie boczne kręgosłupa (przed leczeniem)	1
ESS (<i>empty sella syndrome</i>)	4
Inne nieprawidłowości w obrębie przysadki:	
- hipoplazja szypuły	1
- zmiana pokrwotoczna	1
Zwyrodnienie barwnikowe siatkówki	1*
Opadanie powiek	1*
Hipochondroplazja	1
Padaczka	1
Zespół nerczycowy	1
Torbiel szyszynki	2
Zespół Turnera	1

* objawy występujące u pacjenta nr 24

Rycina 8. Wzrastanie dziewczynek grupy badanej.



Rycina 9. Wzrastanie chłopców grupy badanej.

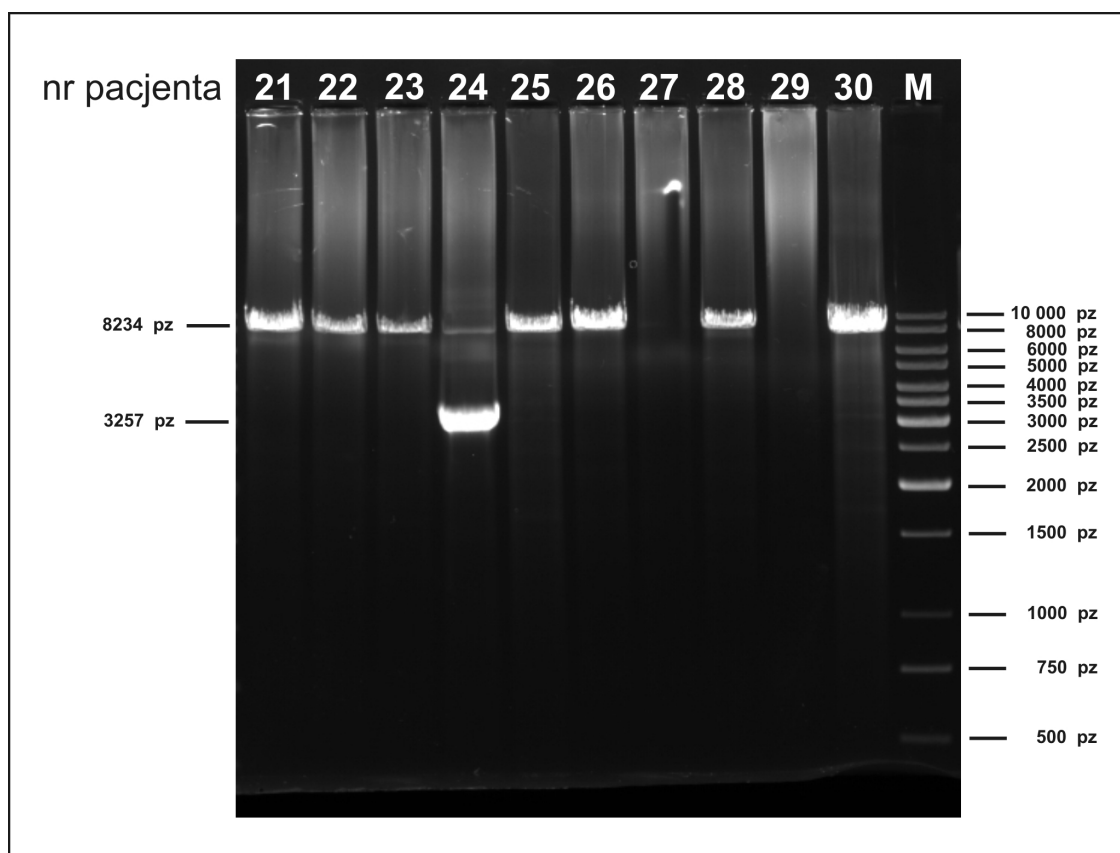


2. Wyniki badań molekularnych

W wyniku analizy DNA mitochondrialnego u 31 z 32 pacjentów obserwowano wyłącznie prawidłowe produkty wszystkich reakcji, co wykluczało delecję mtDNA. Wynik ten nie wyklucza jednak możliwości wystąpienia cytopatii mitochondrialnej innego typu, o podobnych objawach klinicznych. Te inne zespoły chorobowe charakteryzują się innymi rodzajami uszkodzeń DNA (np. mutacje punktowe). Tego typu nieprawidłowości nie były analizowane w tym badaniu. **W jednym przypadku** (pacjent nr 24) analiza DNA mitochondrialnego ujawniła dodatkowy produkt amplifikacji PCR w reakcji nr 3. Poza spodziewanym, prawidłowym produktem reakcji o wielkości 8,2 tys. par zasad (pz) wykryto w żelu dodatkowy prążek (mniejszy produkt), wskazujący na obecność delecji wielkości około 5 tys. pz (**Rycina 10**). Ten mniejszy produkt został wyekstrahowany z żelu i poddany bezpośrednio sekwencjonowaniu przy użyciu tych samych starterów, które wykorzystano do amplifikacji. Analiza uzyskanych sekwencji umiejscowiła delecję pomiędzy nukleotydami 8482 w genie syntazy ATP 8 (ATP8) oraz nukleotydami 13458 w genie 5 podjednostki dehydrogenazy NADH (ND5). Delecja ma więc wielkość 4977 pz i powoduje usunięcie z cząsteczki mtDNA genów kodujących podjednostki syntazy ATP, oksydazy cytochromowej, dehydrogenazy NADH oraz 5 genów tRNA (**Rycina 11**).

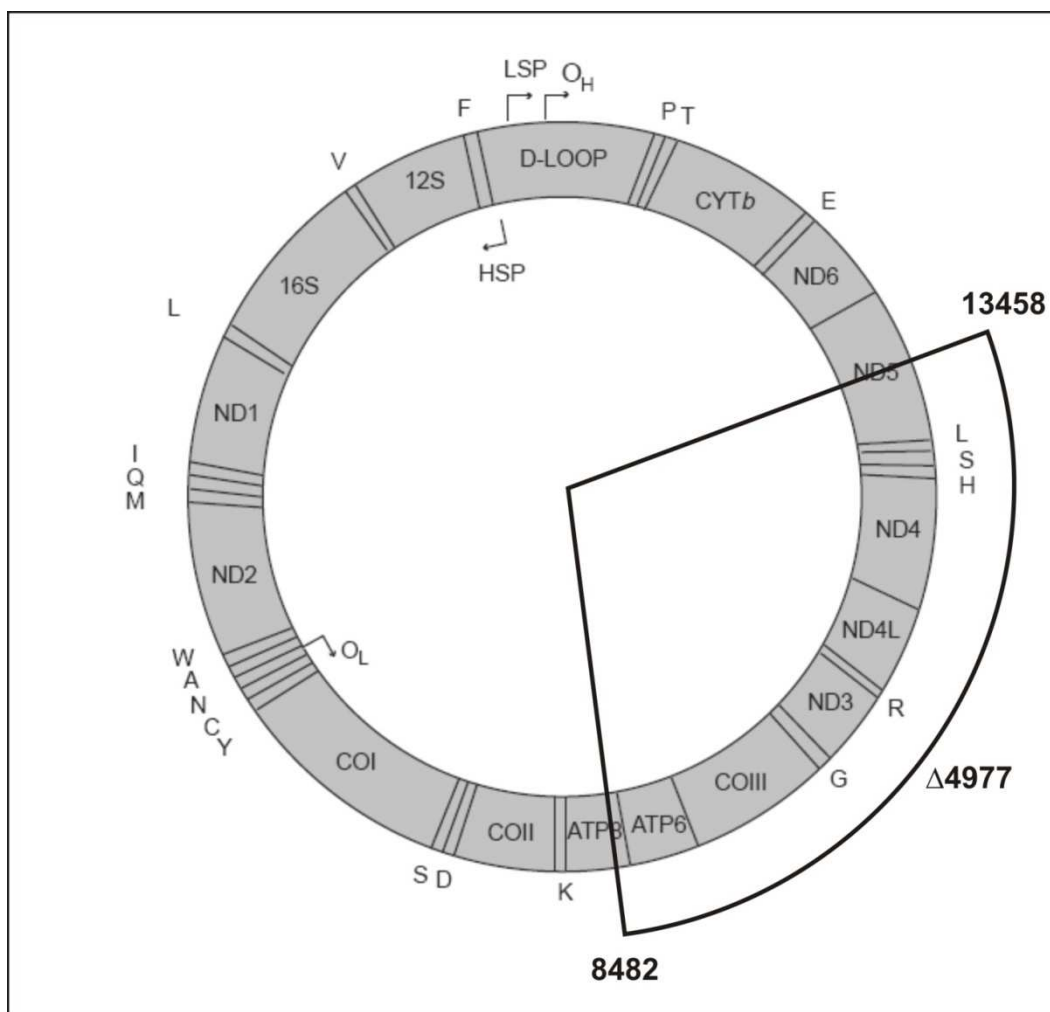
W pracy nie przedstawiono obrazów wyników pozostałych przeprowadzonych badań, w których nie stwierdzono delecji mtDNA.

Rycina 10. Żel agarozowy prezentujący wynik reakcji nr 3 u 10 z 32 badanych pacjentów w celu wykrycia delekcji w mtDNA.



Podwójny produkt reakcji u pacjenta nr 24 wskazuje na obecność delekcji. W przypadku próbek nr 27 i 29, w których nie uzyskano produktu reakcji, analiza była powtarzana, aż do uzyskania wiarygodnego wyniku. M - oznacza marker wielkości DNA - 1 kb DNA Ladder.

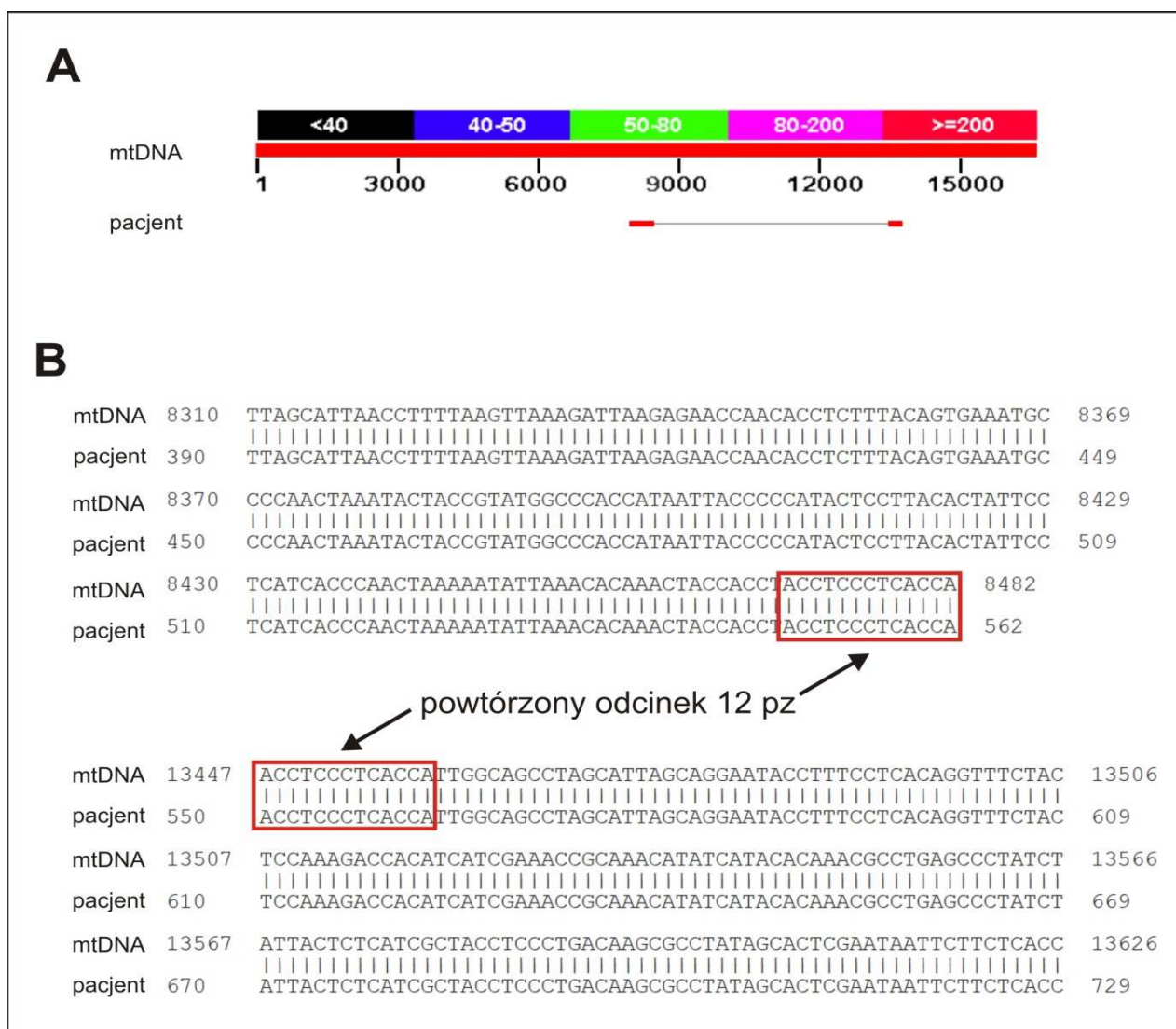
Rycina 11. Schemat położenia wykrytej delecji na tle cząsteczki mitochondrialnego DNA.



Delecja w tym rejonie jest najczęściej spotykanym wariantem rearanżacji mitochondrialnego DNA w zespole Kearns-Sayre'a i stąd nazywana jest „common deletion” (wg. bazy danych MITOMAP <http://www.mitomap.org> [123]). Delecja taka występuje powszechnie u chorych na cytopatii mitochondrialne oraz w tkankach starzejących się lub narażonych na działanie czynników mutagennych (np. promieniowanie jonizujące, UV czy mitogenne chemikalia). W rejonie pomiędzy nukleotydami 8470-8482 oraz 13 447-13 459 znajduje się bezpośrednio powtórzony odcinek sekwencji o długości 12 nukleotydów (5'-ACCTCCCTCACCA-3'), który może sprzyjać powstawaniu delecji na drodze nierównomiernej rekombinacji (**Rycina 12**).

Na podstawie obrazu klinicznego (niskorosłość, zwyrodnienie barwnikowe siatkówki, opadanie powiek) oraz współistniejącej, wyżej opisanej delecji mtDNA, u pacjenta nr 24 rozpoznano zespół Kearns-Sayre'a.

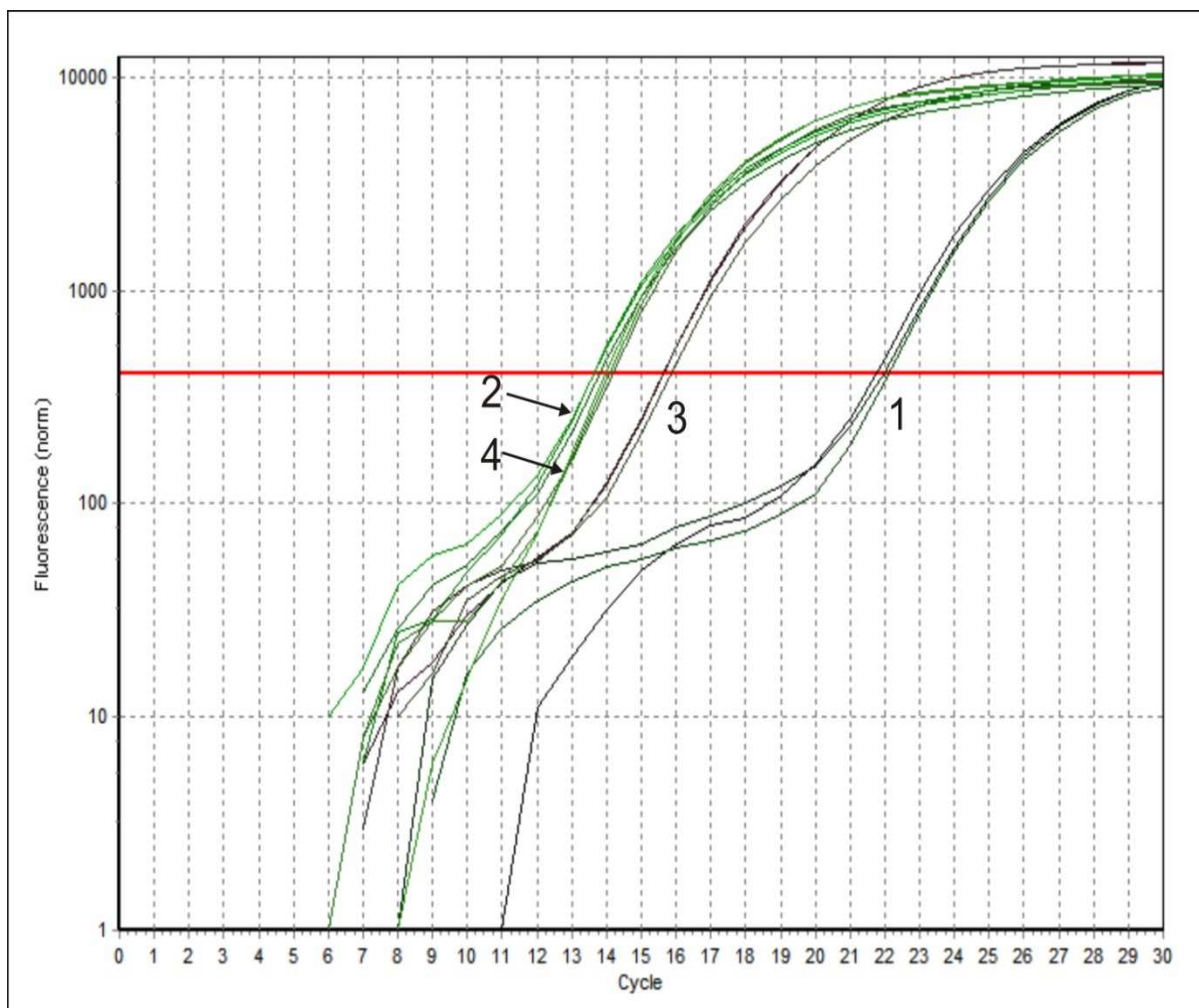
Rycina 12. Porównanie sekwencji nukleotydowych cząsteczki mitochondrialnego DNA (mtDNA) oraz produktu PCR pacjenta nr 24 (pacjent) uzyskanej w wyniku sekwencjonowania.



A – schematyczna lokalizacja fragmentu DNA pacjenta (cienka czerwona linia na dole) na tle całej długości cząsteczki mtDNA (gruba czerwona linia), cienka szara linia pośrodku fragmentu DNA pacjenta pokazuje brakujący odcinek sekwencji (delecja), kolor fragmentu DNA pacjenta odzwierciedla stopień identyczności z referencyjną sekwencją mtDNA – od najmniejszego oznaczonego kolorem czarnym do pełnej zgodności oznaczonej kolorem czerwonym. B – bezpośrednie porównanie sekwencji nukleotydowych mitochondrialnego DNA i produktu PCR pacjenta. Widać przeskok w sekwencji mtDNA (z nt 8482 do nt 13447) przy zachowaniu ciągłości sekwencji produktu PCR pacjenta, na czerwono zaznaczono bezpośrednio powtórzony odcinek sekwencji o długości 12 nukleotydów (5'-ACCTCCCTCACCA-3'), który może sprzyjać powstawaniu delecji na zasadzie rekombinacji.

U ww. pacjenta wykonano także badanie ilościowe całkowitego poziomu mtDNA we krwi pacjenta oraz analizę poziomu heteroplazmii. Badania te przeprowadzono za pomocą techniki Real-Time PCR (**Rycina 13**).

Rycina 13. Wykres amplifikacji (fluorescencja vs numer cyklu) produktów reakcji Real-Time PCR pacjenta nr 24 z analizy ilościowej całkowitego poziomu mtDNA oraz poziomu heteroplazmii.



Cyfry oznaczają reakcje: 1 – amplifikacja genu referencyjnego GAPDH, 2 – analiza całkowitego mtDNA, 3 – amplifikacja tylko cząsteczek mtDNA bez delecji, 4 – amplifikacja tylko cząsteczek mtDNA z delecją. Każda reakcja była wykonana w trzech powtórzeniach. Czerwona linia wyznacza punkt graniczny odcięcia tła reakcji.

Wynik badania poziomu mtDNA we krwi pacjenta ujawnił, że całkowity poziom mitochondrialnego DNA był znacząco wyższy w stosunku do średniej z grupy kontrolnej – średnio był on 2,3 razy wyższy (**Tabela 18**).

Tabela 18. Porównanie całkowitego poziomu mtDNA pacjenta nr 24 oraz grupy kontrolnej.

	Kontrola 1	Kontrola 2	Kontrola 3	Kontrola 4	Kontrola 5	Uśrednione	Pacjent 24 (analiza 1)	Pacjent 24 (analiza 2)
C _T reakcja 1	22,71	22,40	22,46	21,45	22,55	-	21,94	22,12
C _T reakcja 2	14,49	14,97	15,04	15,21	14,96	-	13,68	13,07
Względny poziom mtDNA	298,17	172,44	171,25	75,58	192,67	182,02	306,55	530,05
	różnica poziomów	$306,55 : 182,02 = 1,68$ $530,05 : 182,02 = 2,91$ średnio 2,295 razy wyższy						

Analizę przeprowadzono w oparciu o wyniki ilościowej reakcji Real-Time PCR. W reakcji 1 amplifikowano mRNA genu referencyjnego GAPDH, w reakcji 2 amplifikowano całkowity mtDNA pacjenta. Próbkę pacjenta 24 była analizowana dwukrotnie, wyniki odniesiono do próby kontrolnej osobno, a następnie uśredniono. W tabeli pokazano wartości liczbowe C_T poszczególnych reakcji oraz względny poziom mtDNA obliczony metodą ΔC_T według wzoru (poziom ekspresji = $2^{(C_{T,r.1} - C_{T,r.2})}$).

Wynik analizy poziomu heteroplazmii był równie interesujący (**Tabela 19**). Z analizy porównawczej wyników reakcji 3 i 4 wynika, że cząsteczki mtDNA z delecją stanowią ogromną większość (75,7%) wszystkich cząsteczek mtDNA we krwi w stosunku do normalnych cząsteczek mtDNA bez delecji (24,3%). Jest to mniej więcej zgodne z ilością produktów reakcji PCR obserwowanych w żelu agarozowym (**Rycina 10**).

Tabela 19. Analiza poziomu heteroplazmii u pacjenta nr 24.

	Wartości C _T	Względny poziom mtDNA	Procent całości
Reakcja 1	21,94	-	-
Reakcja 3	15,71	75,06	24,3 %
Reakcja 4	14,07	233,94	75,7 %

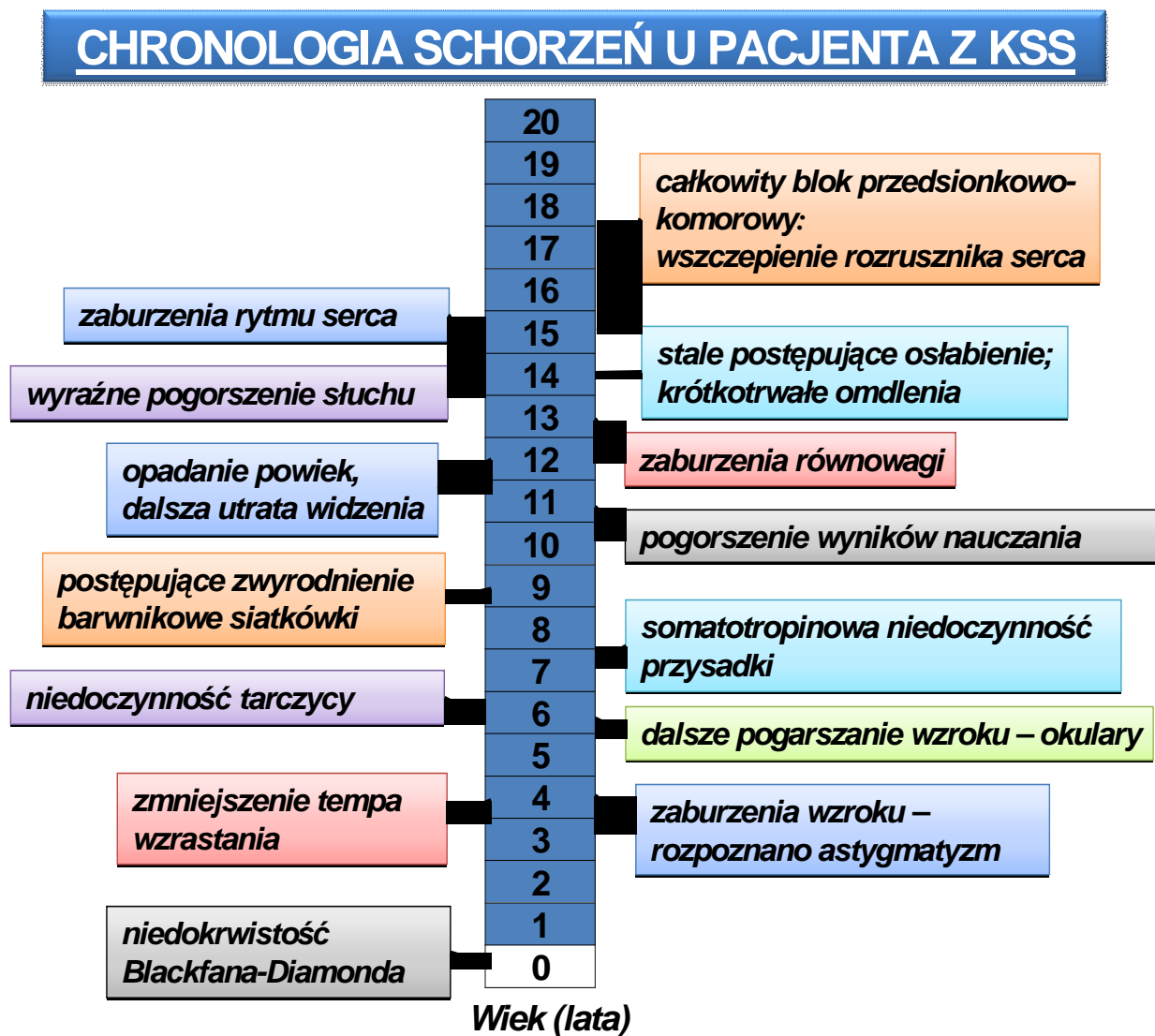
Analizę przeprowadzono w oparciu o wyniki ilościowej reakcji Real-Time PCR. W tabeli porównano poziom mtDNA z delecją (reakcja 4) oraz bez delecji (reakcja 3) obliczone względem poziomu ekspresji mRNA genu referencyjnego GAPDH (reakcja 1) przy użyciu metody ΔC_T .

3. Opis pacjenta nr 24 ze zdiagnozowanym zespołem Kearns-Sayre'a.

- c.IV; poród siłami natury w 39 t.c.; 9 pkt. Apgar
- masa ur. 3500 g / długość 54 cm / obwód głowy 34 cm
- matka I.31 / 156,5 cm / zdrowa ojciec I.33 / 180,3 cm / zdrowy
- okres noworodkowy - bez powikłań

3.1. Chronologia poszczególnych schorzeń u pacjenta nr 24 (Rycina 14).

Rycina 14. Wiek wystąpienia poszczególnych chorób i objawów klinicznych u pacjenta nr 24 z rozpoznaniem zespołu Kearns-Sayre'a.



3.2. Zaburzenia hematologiczne

W 6 miesiącu życia rozpoznano ciężką postać niedokrwistości, a w 7 m.ż., po badaniu szpiku kostnego, ustalono rozpoznanie niedokrwistości Blackfana-Diamonda (CZD Warszawa). W leczeniu stosowano następujące leki: prednizon, interleukina 3 oraz transfuzje uzupełniające masy erytrocytarnej (15x); ostatnią transfuzję wykonano w 31 miesiącu życia. Od tego czasu pacjent jest w remisji.

3.3. Zaburzenia endokrynologiczne

Wzrastanie

W 4 r.ż. podczas badania bilansowego po raz pierwszy stwierdzono obniżone tempo wzrastania. Z ww. powodu, po 2-letnim okresie obserwacji, pacjent został skierowany do Poradni Endokrynologicznej dla Dzieci Szpitala Wojewódzkiego nr 2 w Rzeszowie.

Wizyta 1 (wiek metrykalny 6 lat i 5 miesięcy)

- wzrost 106,7 cm (htSDS: -3,3) (**Rycina 15**, pkt O)
- masa ciała 16,3 kg
- tempo wzrastania między 4 a 6,5 r.ż.: 3,2 cm/rok
- budowa ciała prawidłowa, proporcje ciała zachowane
- stan przedpokwitaniowy: jądra w mosznie; objętość jąder ok. 2 ml; *pubarche* (*owłosienie łonowe*) 1; *axilarche* (*owłosienie pachowe*) 1
- zachowanie: usposobienie spokojne; uwagę zwraca bardzo mała ruchliwość
- w badaniach hormonalnych stwierdzono: obniżone stężenie fT4 przy prawidłowym stężeniu TSH – wyniki mogą wskazywać na wtórną niedoczynność tarczycy; włączono L-tyroksynę w dawce 25 µg dziennie p.o.

Wizyta 2 (wiek metrykalny 6 lat i 11 miesięcy)

- wzrost 108,0 cm (htSDS: -3,3)
- masa ciała 16,6 kg
- nadal słabe tempo wzrastania ok. 3,2 cm/rok
- Pacjenta skierowano do Oddziału Dziecięcego celem wykonania badań diagnostycznych z powodu niskorosłości

Tabela 20. Charakterystyka hormonalna i biochemiczna pacjenta z zespołem Kearns-Sayre'a (*nieprawidłowe wartości są oznaczone pogrubionym drukiem*)

Wiek	6lat	7lat	8lat	9lat	10lat	11lat	12lat	13lat	14lat	15lat	16lat	Norma
Parametry biochemiczne												
TSH (μIU/ml)	1,87	0,05	0,22	0,05	2,11	1,3	1,39	1,09	0,81	1,14	1,84	0,51-4,3
ft4 (pg/ml)	6,83	10,28	10,24	11,26	6,27							6,99-15,4
ft4 (ng/dl)						1,04	0,99	1,29	1,49	1,55	1,02	0,9-1,67
ACTH (pg/ml)									62,5			7,2-63,3
Kortyzol (μg/l)	97,1							120,3	104,6	100,8	179,7	62-194
LH (mIU/ml)		<0,1					<0,1	0,2	0,61	4,63	0,19	*
FSH (mIU/ml)		0,2					1,39	1,26	1,22	1,72	0,58	**
Testosteron (ng/ml)								0,2	0,16	0,836	0,245	***
Prolaktyna (ng/ml)		4,5								3,38	2,92	4,7-16,7
Parathormon (pg/ml)									42,8			15-65
GH (ng/ml) po klonidynie												
0'		0,8										>10
30'		1,0										
60'		1,5										
90'		4,5										
120'		3,2										
GH (ng/ml) po glukagonie												
0'	0,9	1,6										>10
30'	-	1,8										
60'	1,9	2,1										
90'	6,1	3,4										
120'	4,0	1,3										
150'	1,0	0,9										
180'	0,5	0,6										
HbA1c (%)			5,37	5,52			5,4	5,6	5,2	5,7	5,6	4,8-6,0
Glukoza (mg/dl)		84	88		81		96				80	65-100
OGTT: glukoza (mg/dl)												
0'								84	100	87		0': <100
30'								141	180	156		
60'								149	168	164		
90'								159	166	167		
120'								141	145	151		120': <140
150'								117	128	138		
Insulina (μU/ml)												
0'								5,53		8,69		2,4 – 24,9
30'										43,57		
60'										36,06		
90'								25,48		32,85		
120'										33,53		
150'								15,47				

normy dla wieku

* 0-5 lat: 0 -1,3; 5-10lat: 0-1,4; 10-13 lat: 0,1-7,8; 13-17 lat: 1,3-9,8;

** 0-5 lat: 0,2-2,8; 5-10 lat: 0,2-3,8; 10-13 lat: 0,4-4,6; 13-17 lat: 1,5-12,9;

*** 0-1r.ż.: 0,12-0,21; 1-6 lat: 0,03-0,32; 6-12 lat: 0,03-0,68; 12-17 lat: 0,28-11,1;

Tabela 20 (cd). Charakterystyka hormonalna i biochemiczna pacjenta z zespołem Kearns-Sayre'a (*nieprawidłowe wartości są oznaczone pogrubionym drukiem*)

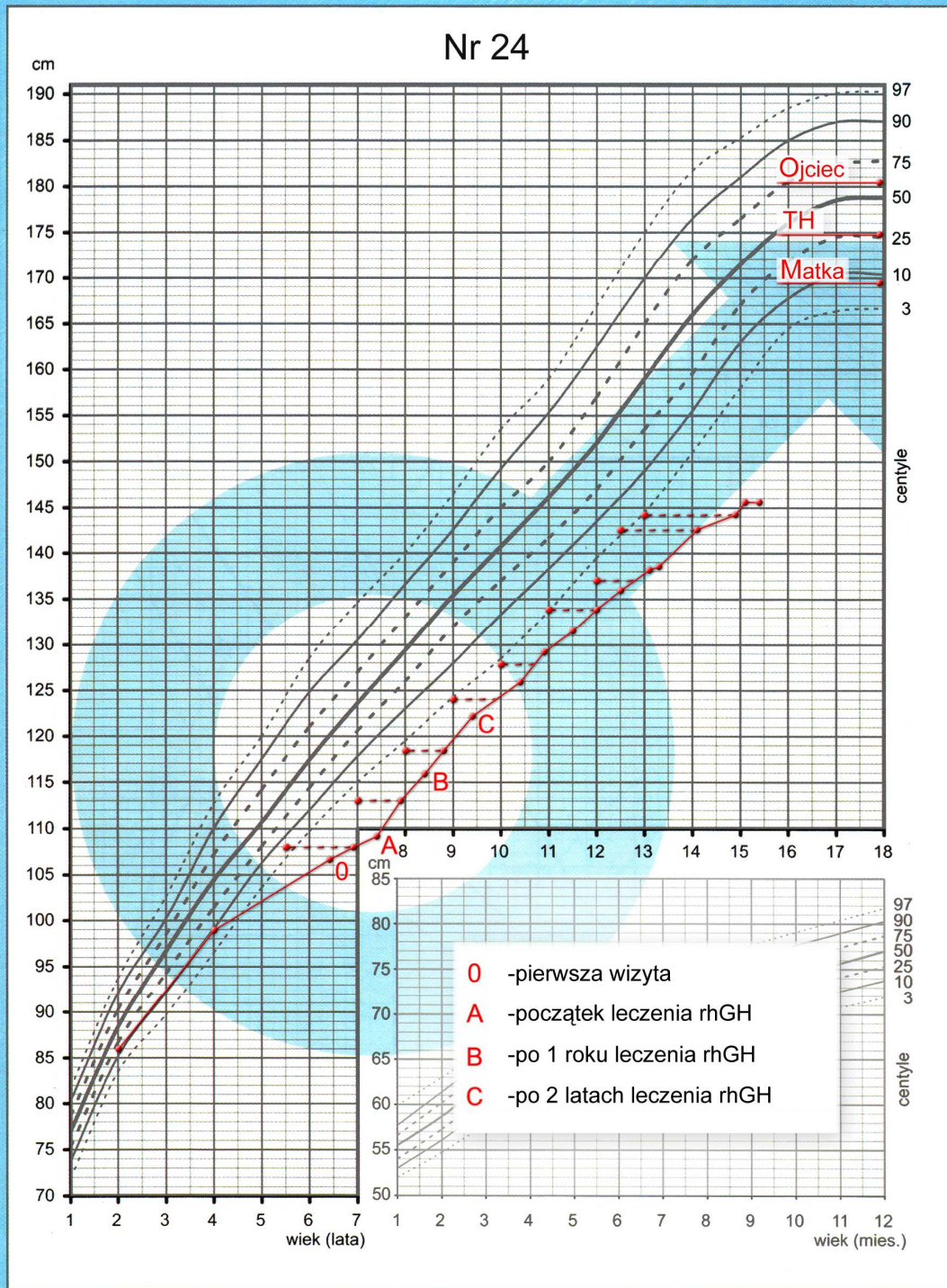
Wiek	6lat	7lat	8lat	9lat	10lat	11lat	12lat	13lat	14lat	15lat	16lat	Norma
Parametry biochemiczne												
anty-GAD (U/ml)										0,2		<1
IAA (%)										4,2		<5,5
IA-2 (U/ml)										0,4		<1
Na ⁺ (mmol/l)	141	136	142		140	141	142	143	142	141	141	135-148
K ⁺ (mmol/l)	4,6	4,5	4,4		4,9	4,6	4,6	4,3	4,2	4,6	4,1	3,5-5,3
Ca (mg/dl)	8,8			9,2	8,8	9,1	9,7	9,5	9,7	9,1	9,7	8,6-10,3
Mg (mg/dl)									1,9		2,1	1,8-2,3
P (mg/dl)									4,8		3,9	2,5-4,8
AspAł (U/l)							52	41	26	36	39	1-40
AlAł (U/l)							33	32	23	46	38	1-45
Mocznik ((mg/dl)		33			35		41	41	46	40	30	13-43
Kreatynina (mg/dl)		0,3			0,6		0,8	0,6	0,6	0,7	0,6	0,6-1,3
Białko (g/dl)											7,6	6,0-8,0
IgA ARA		ujemne										

Badania dodatkowe:

- Badania biochemiczne wykazały m.in. (**Tabela 20**):
 - obniżone wydzielanie GH w testach z klonidyną i glukagonem; w czasie diagnozowania pacjenta nie obowiązywało wykonanie testu wydzielania GH po zaśnięciu
 - niski poziom prolaktyny
- Wiek kostny: 5 lat i 6 miesięcy (opóźniony o 1 rok i 5 miesięcy w stosunku do wieku metrykalnego)
- USG jamy brzusznej: obraz prawidłowy
- EKG: rytm zatokowy, normogram; zapis prawidłowy
- Echokardiografia: serce bez wady anatomicznej, czynność skurczowa w normie
- MR OUN: prawidłowy obraz mózgowia i przestrzeni płynowych wewnątrzczaszkowych. Struktura przysadki i lejka bez zmian.

Po przeprowadzeniu ww. badań rozpoznano somatotropinową niedoczynność przysadki i przygotowano wniosek do Zespołu Koordynacyjnego ds. Stosowania Hormonu Wzrostu celem przydziału rhGH. Na posiedzeniu ww. Zespołu w dniu 14.01.2002 r. wniosek został zaopiniowany pozytywnie. Po kilku dniach przeprowadzono szkolenie rodziców w zakresie obsługi Pena i rozpoczęto leczenie hormonem wzrostu (Genotropin 5,3 mg; Pfizer).

Rycina 15. Wzrastanie pacjenta nr 24 z zespołem Kearns-Sayre'a



Początek leczenia rhGH (wiek metrykalny 7 lat i 5 miesięcy)

- Wzrost 109,2 cm (htSDS – 3.5) (**Rycina 15**, pkt A)
- Masa ciała 17,6 kg
- Dawka Genotropin: 0,030 mg/kg/dzień s.c.
- Leczenie dodatkowe: L-tyroksyna 37,5 µg/d p.o.

Tabela 21. Ocena auksologiczna, hormonalna, wiek kostny oraz przebieg leczenia pacjenta z zespołem Kearns-Sayre'a.

WM (lata)	Czas leczenia (miesiące)	Wzrost (cm)	htSDS	Masa (kg)	TW (cm/rok)	WK (lata)	IGF-1 (ng/ml)	Dawka leku mg/kg/d
7,4	początek leczenia	109,2	-3,5	17,6	3,0	-	39	0,030
7,7	3	110,5	-3,5	17,9	5,2	-	-	0,030
7,9	6	113,1	-3,2	19,0	10,4	7	-	0,028
8,2	9	115,2	-3,2	19,6	7,4	-	-	0,027
8,4	12	116,0	-3,0	19,2	4,8	-	-	0,028
8,6	15	117,3	-3,1	20,7	4,2	-	183	0,032
8,8	18	118,5	-2,9	21,3	7,2	8	-	0,031
9,1	21	120,0	-	21,3	5,1	-	-	0,031
9,4	24	122,2	-2,7	21,1	7,5	-	-	0,031
9,7	28	123,9	-	23,3	6,8	-	-	1 przerwa
9,9	31	124,3	-2,7	23,1	1,6	9	-	0,029
10,1	33	124,6	-	23,3	1,4	-	-	0,028
10,4	36	125,9	-2,8	22,9	3,9	-	-	0,029
10,7	40	127,7	-	23,5	8,2	10	-	0,028
10,9	43	129,2	-2,8	23,7	4,5	-	-	0,028
11,2	46	130,0	-	24,2	3,2	-	-	0,031
11,5	50	131,5	-2,8	25,1	4,9	-	-	0,030
11,8	53	133,0	-	25,6	7,2	-	-	0,029
12,0	55	133,9	-2,8	26,0	3,6	11	171	0,029
12,3	59	135,4	-	26,8	6,0	-	-	0,033
12,5	62	136,0	-2,9	26,8	6,4	-	-	0,040
12,8	65	137,5	-	27,5	4,8	12	-	0,027
13,1	69	138,2	-3,0	27,5	2,4	-	314	2 przerwa
13,3	71	138,6	-	27,5	2,1	-	122	0,024
13,9	79	142,1	-3,1	28,8	5,8	-	401	0,023
14,1	81	142,6	-3,2	29,0	3,5	12,5	392	0,023
14,9	90	144,2	-3,9	29,2	3,6	13	294	0,03
15,1	93	145,6	-3,9	30,5	6,1	-	294	3 przerwa
15,4	96	145,6	-4,5	29,7	0	-	186	0,025

Przerwy w leczeniu:

1. 92 dni (9,7 – 9,9 r.ż.) rozpoznano zwyrodnienie barwnikowe siatkówki
2. 71 dni (13,1 - 13,3 r.ż.) pogorszenie wzroku, nasilone osłabienie mięśniowe
3. 105 dni (15,1 – 15,4 r.ż.) zaburzenia rytmu serca, wszczepienie rozrusznika serca

Dojrzewanie

Dojrzewanie pacjenta z KSS było opóźnione – jego początek (powiększenie jąder oraz pubarche) miało miejsce po 14 r.ż.

Stan tyreometaboliczny

W wieku 6 lat i 5 miesięcy rozpoznano niedoczynność tarczycy i od tamtej chwili stale otrzymuje L-tyroksynę w dawce zależnej od poziomu hormonów tarczycy oraz TSH; aktualna dawka 37,5 µg/d. W czasie kiedy był kwalifikowany do badań diagnostycznych hormonalnych oraz molekularnych był w eutyreozie klinicznej i hormonalnej.

3.4. Zaburzenia okulistyczne

Po raz pierwszy zaburzenia ze strony narządu wzroku pojawiły się w wieku 4 lat podczas badania bilansowego. W badaniu okulistycznym rozpoznano astygmatyzm, który od 6 r.ż. został skorygowany okularami. W badaniu okulistycznym, w tym okresie życia, nie obserwowano żadnych innych nieprawidłowości.

W 9 r.ż. podczas kolejnego badania z powodu stale pogarszającego się wzroku, rozpoznano postępujące zwyrodnienie barwnikowe siatkówki (CZD Warszawa).

W 12 r.ż. zaobserwowano obustronne opadanie powiek (**Rycina 16**). Przez kolejne lata następowała dalsza utrata wzroku, z utrudnionym widzeniem bocznym. W 14 r.ż., z ww. powodu, rekomendowano rodzicom kontynuację edukacji chłopca w szkole dla dzieci niedowidzących. Opadanie powiek ulega stałej progresji (**Rycina 17**).

3.5. Zaburzenia kardiologiczne

Od 1-szej wizyty endokrynologicznej a następnie w trakcie leczenia rhGH monitorowano układ sercowo-naczyniowy pacjenta z KSS. Początkowo jego parametry nie odbiegały od normy. Wstępnie wykonane badanie EKG wykazało prawidłowy zapis, a obrazowanie echokardiograficzne wykluczyło wadę anatomiczną serca. Nawet już po postawieniu diagnozy KSS, podczas kontrolnych, szczegółowych badań kardiologicznych w 13 r.ż. wykonane EKG, ECHO serca oraz badanie holterowskie nie wykazały nieprawidłowości. Nigdy też wcześniej nie odnotowano w historii choroby jakichkolwiek nieprawidłowości kardiologicznych. Z uwagi na postępujące osłabienie po raz kolejny wykonano 24-godzinny profil EKG:

- Elektrokardiografia holterowska (14,5 r.ż.). W czasie badania stwierdzono nieznaczna liczbę pobudzeń dodatkowych nadkomorowych, przedwczesnych, bez częstoskurczu. Brak zaburzeń przewodnictwa. Zmienność rytmu serca 58 – 151/min, śr. 88/min. Tendencja do tachykardii. Zwraca uwagę brak naturalnej zmienności dobowej akcji serca (neuropatia trzewna? zmniejszona wydolność?), labilność rytmu. QTc 0,33-0,34 s.

Na kontrolnym badaniu (15 r.ż.) zaobserwowano znacznego stopnia bradykardię (ok.30-36/min); EKG: blok A-V 2/3 st.; do leczenia włączono Salbutamol oraz wystawiono wniosek do CZD na założenie stymulatora. Do Kliniki Kardiologii IP CZD w Warszawie został przyjęty 1 miesiąc później.

W wykonanych w dniu przyjęcia badaniach m.in.

- EKG: czynność serca miarowa ok. 38/min.; zaburzenia przewodzenia przedsionkowo-komorowego 3 stopnia (całkowity blok A-V).
- Elektrokardiografia holterowska (rejestracja 3 godzinna): rytm zatokowy 35 – 107/min., śr.39/min., zarejestrowano 365 pojedynczych, przedwczesnych pobudzeń komorowych, krótki epizod rytmu zatokowego.

Podjęto decyzję o wszczepieniu rozrusznika serca. Wykonano wszczepienie układu jednojamowego endokawitarnego stymulującego serce. Przebieg po zabiegu był niepowikłany. Kontrolne badanie EKG wykazało prawidłową stymulację (rytm 57 – 75/min., śr. 60/min.)

3.6. Zaburzenia neurologiczne

Po urodzeniu rozwój psychoruchowy pacjenta był prawidłowy. Jednakże uwagę zwracała stosunkowo niska aktywność fizyczna pacjenta w okresie niemowlęcym i wczesnodziecięcym. W wieku przedszkolnym odnotowano zmniejszoną sprawność fizyczną oraz szybkie męczenie się. Stopniowo wraz z wiekiem występowały coraz większe trudności w zakresie narządu ruchu w postaci ogólnego spowolnienia, obniżonego napięcia mięśniowego, niechęci do aktywności fizycznej oraz zaburzeń chodu. Od 13 r.ż. występują zaburzenia równowagi i w tym samym roku życia obserwowano 2-krotnie omdlenie. Pacjent pozostaje w stałej opiece neurologicznej CZD w Warszawie.

Wykonane badania:

(7 r.ż. i 3/12) MR OUN: prawidłowy obraz mózgowia i przestrzeni płynowych wewnątrzczaszkowych. Struktura przysadki i lejka bez zmian.

(11 r.ż i 9/12) MR OUN: badanie MR mózgu wykazało nieprawidłową intensywność sygnału (podwyższoną w obrazach T2-zależnych i obniżoną w obrazach T1-zależnych) pnia mózgu: zmiany najbardziej nasilone w obrębie mostu i śródmózgowia. Ogniskowe zmiany o podobnej intensywności sygnału stwierdza się w obrębie gałek białych obustronnie, ale z wyraźną przewagą strony prawej. Układ komorowy w granicach normy. Nie uwidoczniło zmian w półkulach mózgu. Nie można wykluczyć niewielkich zmian w półkulach mózdzku – ocena badania utrudniona ze względu na artefakty ruchowe, dziecko niespokojne.

(14 r.ż. i 8/12) Badanie elektroencefalograficzne: badanie wykonano w czuwaniu; zapis niezróżnicowany przestrzennie, podczas całego zapisu, we wszystkich okolicach dominuje czynność theta 5-7 Hz o amplitudzie 20-90 μ V. Rz niewyraźna, Fs bez wpływu na zapis, Hv chłopiec nie wykonuje. Orzeczenie: zapis nieprawidłowy z nieodpowiednią do wieku czynnością podstawową.

3.7. Zaburzenia laryngologiczne

Ze względu na uogólnione spowolnienie w czynnościach wykonywanych przez chłopca bardzo trudno jest ustalić czas kiedy nastąpiło pogorszenie słuchu. Dodatkową trudnością był słaby kontakt chłopca z osobami spoza rodziny.

Badanie laryngologiczne (15 r.ż.): Obustronny niedosłuch typu czuciowo-nerwowego. Złe rokowanie co do poprawy słuchu. Wskazane protezowanie słuchu.

Pomimo zaleceń chłopiec nie zgodził się na noszenie aparatu słuchowego.

3.8. Zaburzenia metaboliczne

Od 10 r.ż. pacjent pozostawał w opiece Poradni Chorób Metabolicznych IP CZD w Warszawie. Wstępne badania poszerzonego przesiewu metabolicznego (GC-MS, CDGS, MS/MS) nie wykazały specyficznych zaburzeń. Z uwagi na wielonarządowość zaburzeń i nietypowy ich przebieg chłopca hospitalizowano w Klinice Chorób Metabolicznych IP CZD (10 r.ż. i 7/12) celem poszerzenia diagnostyki w kierunku występowania ewentualnych chorób z grupy zaburzeń mitochondrialnych. W trakcie tego pobytu w znieczuleniu ogólnym wykonano biopsję chirurgiczną mięśnia szkieletowego oraz zabezpieczono materiał biologiczny na ewentualne przyszłe badania molekularne.

Pracownia Cytochemiczna CZD: Wynik badania mikroskopowego mięśnia szkieletowego (nr bad. 13714):

W badaniu histochemicznym i histologicznym stwierdzono wzrost ilości lipidów we włóknach mięśniowych o małym-średnim nasileniu oraz przewagę liczbową włókien typu pierwszego. Zmiany nie mają charakteru swoistego. Nie stwierdza się innych zmian miopatycznych, ani cech neurogenego uszkodzenia mięśnia (dr hab.med. M. Pronicki).

Wynik molekularnego badania genetycznego (30.10.2008r):

Wynik diagnostyki: analiza mtDNA przy pomocy techniki PCR wykazała obecność skróconego fragmentu (300pz) w regionie obejmującym nukleotydy w pozycji 8224-13501. Interpretacja wyniku: uzyskany wynik wskazuje na obecność powszechnej delecji m.8470_13447del4977 odpowiedzialnej za występowanie cytopatii mitochondrialnej u pacjenta.

3.9. Zaburzenia psychofizyczne

Chłopiec w zachowaniu zawsze był nad wyraz spokojny, wg rodziców najspokojniejszy wśród licznej rodziny (2 siostry i 4 braci – wszyscy zdrowi). W gabinecie lekarskim prawidłowo, choć nieśmiało spełniał wszystkie polecenia, bardzo mało mówił, sprawiał wrażenie dziecka ze spowolnionym myśleniem. Zwykle był bardzo zmęczony po wysiłku fizycznym. W związku z tym sam ograniczał swoją aktywność ruchową do minimum. W relacji matki apetyt chłopca zawsze był bardzo słaby. W szkole początkowo w klasach 1-3 radził sobie w sposób wystarczający, jednak stopniowo uczył się coraz słabiej (otrzymywał oceny w granicach 2-3) i po

ocenie psychologa w 10 r.ż., na podstawie ww. orzeczenia, rozpoczął indywidualne nauczanie w domu. Jego tempo pracy było coraz wolniejsze i miał trudności z zapamiętywaniem i rozumieniem treści. Występowały też bardzo duże problemy z pisaniem: pisał niezgrabnie, niestarannie i bardzo szybko męczył się w trakcie pisania, miał ogromne trudności w prowadzeniu zeszytów.

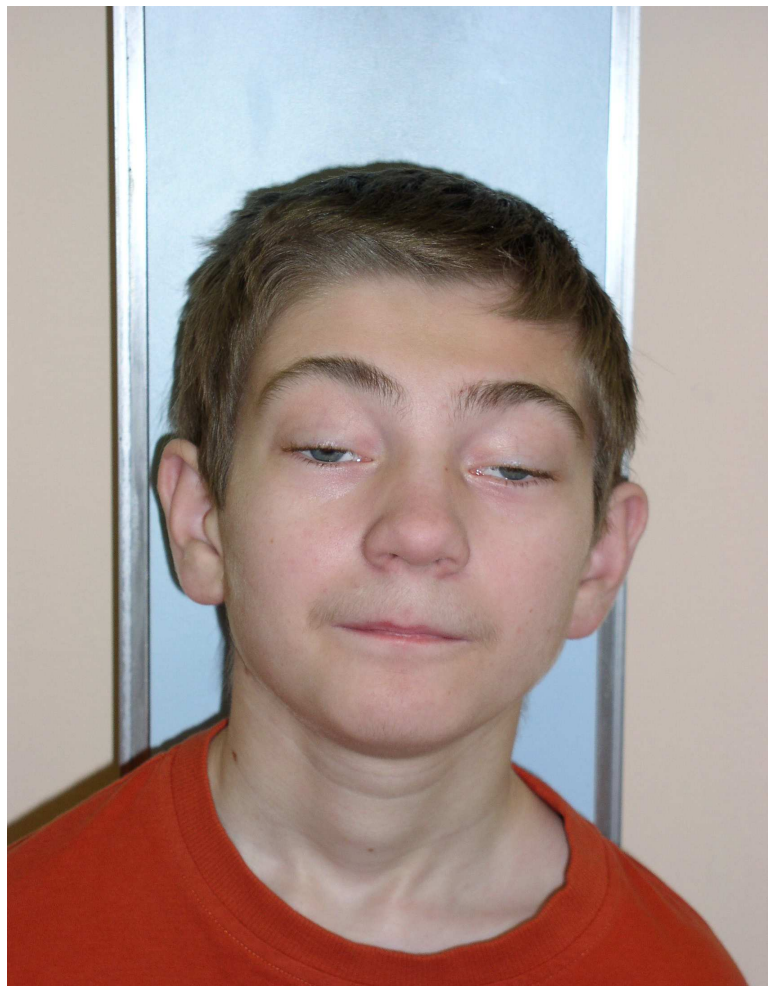
Uzyskano zgodę rodziców pacjenta z zespołem Kearns-Sayre'a na prezentację zdjęć fotograficznych ich syna.

Rycina 16. Zdjęcie twarzy pacjenta nr 24 wykonane w wieku 12 lat (rozpoznanie KSS).



Widoczne obustronne opadanie powiek

Rycina 17. Zdjęcie twarzy pacjenta nr 24 wykonane w wieku 16 lat (stan po założeniu rozrusznika serca)



Nasilone obustronne opadanie powiek w stosunku do obrazu w 12 r.ż.

VI. DYSKUSJA

Wiedza na temat możliwości leczenia niskorosłości za pomocą rekombinowanego, ludzkiego hormonu wzrostu (rhGH) jest bardzo powszechna w świadomości społecznej, a przede wszystkim wśród dzieci niskorosłych i ich rodziców. Według oczekiwań tych ostatnich zastosowanie leku ma być prostym środkiem, swoistym *panaceum*, na zniwelowanie znaczących kompleksów związanych z niedostateczną wysokością ciała. Wieloprofilowa diagnostyka, szczególnie nastawiona na zaburzenia endokrynne, wskazuje w jakich sytuacjach klinicznych może znaleźć zastosowanie rhGH. Jak wykazały badania, już samo rozpoczęcie leczenia rhGH wywiera korzystny efekt emocjonalny u dzieci niskich [124,125]. Od czasu, w którym pojawiła się możliwość leczenia rhGH, dyskomfort psychiczny wynikający z niskorosłości był proponowany jako jedno ze wskazań do rozpoczęcia terapii hormonem wzrostu [126], ale należy pamiętać, że skuteczność leczenia musi być zawsze związana z bezpieczeństwem leczenia. Często zastosowana terapia rhGH weryfikuje zasadność takiego postępowania wówczas, gdy po początkowo dobrej odpowiedzi wzrostowej, tempo wzrastania wyraźnie słabnie i nie widzimy oczekiwanego efektu terapeutycznego. Taki stan skłania do poszukiwania innych przyczyn niskorosłości aniżeli niedobór hormonu wzrostu. Dotyczy to głównie samego leku, sposobu jego podawania czy nieprawidłowego odżywiania pacjenta i wskazuje na potrzebę weryfikacji rozpoznania wstępnego, w tym także do poszukiwań dodatkowych, nie rozpoznanych dotąd schorzeń ogólnych, ograniczających efekt terapeutyczny. Jedną z przyczyn prowadzących do nieskuteczności leczenia są zaburzenia mitochondrialne, których występowanie można było do niedawna podejrzewać, a od kilku lat także rozpoznawać. Właśnie możliwość badań molekularnych w kierunku rozpoznania zespołu Kearns-Sayre'a (KSS), rzadkiego zespołu chorobowego, była inspiracją do podjętych badań z przekonaniem, że schorzenie to może nie być dostatecznie rozpoznawane w okresie dzieciństwa kiedy rozpoznawana jest niskorosłość i inicjowane jest leczenie hormonem wzrostu, a pozostałe objawy kliniczne tego zespołu nie są jeszcze odpowiednio silnie wyrażone.

Zespół Kearns-Sayre'a z powodu nadal jeszcze ograniczonej możliwości diagnostyki pozostaje problemem stosunkowo mało znanym i to nie tylko w Polsce. Wielonarządowe objawy wchodzące w jego skład powodują, że pacjenci z KSS są

wielokrotnie konsultowani przez lekarzy różnych specjalności, z reguły uzyskując tylko częściową pomoc. To także dotyczyło opisywanego w pracy pacjenta z KSS, oczekującego na konsultację hematologiczną, okulistyczną, endokrynologiczną, neurologiczną, genetyczną, kardiologiczną, laryngologiczną i psychologiczną. Z drugiej strony nie można się dziwić, że wiedza lekarzy rodzinnych, pediatrów, a nawet specjalistów na temat KSS pozostaje nadal niewystarczająca z uwagi na brak opisów w polskim piśmiennictwie, a diagnoza oparta była do niedawna wyłącznie o wynik biopsji mięśnia. Można domniemywać, że populacja pacjentów dotkniętych tym uszkodzeniem genetycznym może być większa niż w oficjalnych raportach. Prawidłowe postawienie diagnozy jest ważne nie tylko w wymiarze przyczynowym, ale także wskazówką do dalszych, ukierunkowanych poszukiwań zaburzeń klinicznych.

Podstawą wyboru pacjentów do badań (kryteria włączenia) było stwierdzenie SNP u dziecka niskorosłego oraz udokumentowana słabsza od spodziewanej odpowiedź na leczenie rhGH.

DeSanctis opisał pacjenta z KSS i towarzyszącym SNP, u którego podanie rhGH nie zmieniło tempa wzrastania [127].

Również obserwacje pacjentów Kliniki Endokrynologii i Diabetologii Wieku Rozwojowego UM w Poznaniu (obecnie Klinika Endokrynologii i Reumatologii Dziecięcej) wykazały, że wśród pacjentów ze znacznie słabszym efektem leczniczym po zastosowaniu rhGH, znajduje się pacjent z zespołem Kearns-Sayre'a. W tymże ośrodku zdiagnozowano i leczono (bądź są nadal leczeni) kolejnych 4 pacjentów z regionu wielkopolskiego.

W niniejszej pracy poddano początkowej analizie dane 202 pacjentów, będących w opiece Poradni Endokrynologicznej dla Dzieci i Oddziału Dziecięcego Szpitala Wojewódzkiego nr 2 w Rzeszowie, którzy w latach 2005 – 2007 byli leczeni rhGH z powodu rozpoznanej niedoczynności przysadki. W tej grupie pacjentów przeważały dziewczynki (104) vs chłopcy (98). Spośród nich wyselekcjonowano grupę 32 dzieci, które pomimo standardowego leczenia rhGH nie wykazywały charakterystycznego „*nadganiania wzrostu*” (z ang. *catch-up growth*) i pozostawały nadal niskie.

Wśród wybranych pacjentów dominowali chłopcy (24/32; 75%). 8 dziewczynek (8/32; 25%) uzupełniało grupę badaną. Ta proporcja (3:1) zdecydowanie więc odbiegała od początkowej (~1:1). Wszyscy pacjenci poddani byli standardowej

procedurze diagnostycznej wymaganej przed ewentualnym włączeniem leczenia rhGH. Cechą najbardziej różniącą grupę badanych dziewczynek od chłopców, z którą można wiązać tę nierównowagę, był stan dojrzewania płciowego w chwili rozpoczęcia terapii rhGH. Na początku leczenia 10 (1 dziewczynka i 9 chłopców) spośród 32 dzieci (31,2%) włączonych do badania, prezentowało cechy dojrzewania płciowego. W grupie chłopców znajdowało się 8 pacjentów (33,3%), którzy ukończyli 14 rok życia. Wśród dziewczynek nie było ani jednej w tej grupie wiekowej. Można zatem przyjąć, że grupa starszych, dojrzewających chłopców, pomimo zastosowanego leczenia rhGH, nie była w stanie zmienić dotychczasowego tempa wzrastania. Karavanaki i wsp. w swojej pracy wykazali, że wiek i wzrost w chwili rozpoczęcia dojrzewania, są czynnikami determinującymi wzrost ostateczny [128]. Stąd można było wnioskować pierwotnie, że tempo wzrastania i wzrost ostateczny będą lepsze u dzieci jeszcze prepubertalnych. Stosunkowo późny wiek w chwili rozpoznania SNP może być wynikiem nie tylko mniejszej świadomości społecznej, ale również wynikiem niedostatecznej czujności lekarza pierwszego kontaktu.

Pomimo zwiększonego tempa wzrastania bezpośrednio po rozpoczęciu leczenia nie obserwowano wyraźnego „*nadganiania wzrostu*”, tak po 1 jak i po 2 roku terapii pacjentów grupy badanej (dziewczynki: htSDS +0,26 i +0,30; chłopcy odpowiednio htSDS +0,21 i +0,20; Tabela 12). Dotyczyło to zarówno tych pacjentów z zapoczątkowanym dojrzewaniem jak i pacjentów bez cech dojrzewania. Odpowiedź na leczenie rhGH w postaci znamiennego zwiększonego wydzielania IGF1 odnotowano w obu grupach (Tabela 10, Rycina 7) tak więc zarówno lek (rhGH) jak i receptor dla GH (GHR) nie były przyczyną słabszego efektu terapeutycznego. Analiza porównawcza wzrostu aktualnego do wzrostu docelowego przedstawionego jako średni wzrost rodziców wykazała, że na każdym z dwóch etapów leczenia (1 i 2 rok odpowiednio) był on na zdecydowanie niższym poziomie, z tym że w przypadku chłopców (htSDS -2,53; -2,33) dystans do „*nadganiania*” pozostawał stale większy niż u dziewczynek (htSDS -1,93; -1,63) (Tabela 10). Niekorzystna prognoza wzrostu ostatecznego (PAH) nie ulegała znamiennej poprawie w trakcie leczenia rhGH w obydwu grupach pacjentów i parametr ten pozostawał nadal poniżej wzrostu docelowego (th) (Tabela 15, Tabela 16). Należy zaznaczyć, że u 5 chłopców (w tym u pacjenta z KSS) nie można było oznaczyć PAH w momencie rozpoczynania leczenia, ponieważ ich wiek kostny znajdował się poniżej 6 lat, uniemożliwiając skorzystanie z tablic Bayley-Pinneau. W niektórych przypadkach, przyczyna

pozostawiania wzrostu pacjentów na względnie niskim poziomie mogła być uwarunkowana konstytucjonalnie opóźnionym dojrzewaniem i wzrastaniem, dla potwierdzenia czego potrzebny byłby dłuższy okres obserwacji pacjentów aniżeli 2 lata. Innym problemem, który należało wyjaśnić było wykrycie ewentualnych schorzeń ogólnych, mogących wielopoziomowo zaburzać proces wzrastania.

Najbardziej istotną przyczyną endokrynologiczną związaną ze wzrastaniem, oprócz SNP, obniżającą znamienne tempo wzrastania jest niedoczynność tarczycy [129]. Dysfunkcja tarczycy w odniesieniu do wzrostu manifestuje się niekorzystnie na każdym etapie życia, ale szczególnie jest to znamienne w okresie intensywnego wzrastania ze względu na rolę hormonów tarczycy w syntezie i działaniu GH [130]. W przypadku grupy badanej przed rozpoczęciem diagnostyki niedoboru wzrostu u trójki pacjentów (chłopcy) stwierdzono niedobór hormonów tarczycy. U tych pacjentów włączono L-tyroksynę celem wyrównania stanu hormonalnego i po powtórnej ocenie wzrastania, po 6 miesiącach kwalifikowano ich do testów stymulacyjnych na wydzielanie GH. U całej trójki kontynuowano leczenie L-tyroksyną także po włączeniu terapii rhGH. U kolejnych 3 pacjentów (2 chłopców i 1 dziewczynka) rozpoznano pierwotną niedoczynność tarczycy już po rozpoczęciu leczenia rhGH. Zależności między leczeniem rhGH, a funkcją tarczycy były podnoszone wielokrotnie w piśmiennictwie [131,132] z sugestią, że wyrównanie tych zaburzeń (subkliniczna hipotyreoza) następuje zwykle samoistnie, a leczenie farmakologiczne niekoniecznie musi być podejmowane [133]. Decyzję o włączeniu lub zaprzestaniu leczenia L-tyroksyną można rozważyć tylko w sytuacji dobrej odpowiedzi wzrostowej na podjęte leczenie rhGH. Wątpliwości wynikające ze słabego tempa wzrastania powinny skłaniać do pilnego wyrównywania zaburzeń osi przysadkowo-tarczycowej [134]. We wszystkich 3 wymienionych wcześniej przypadkach prowadzono leczenie L-T4 i przy prawidłowych poziomach hormonów tarczycy obserwowano odpowiedź na leczenie rhGH.

Inną nieprawidłowością mogącą być źródłem zaburzeń sekrecji innych hormonów tropowych przysadki były zmiany wykryte w obrębie przysadki w trakcie obrazowania OUN w badaniu MR. U trzech chłopców i jednej dziewczynki (n=4) uwidoczono zmiany o typie zespołu pustego siodła (*empty sella syndrome*; ESS) z hipoplastyczną przysadką, natomiast u kolejnych dwóch pacjentów płci męskiej rozpoznano inne nieprawidłowości w obrębie siodła tureckiego (hipoplazja szypuły i zmiana pokrwotoczna; Tabela 17). Te zmiany wymagały sprawdzenia nie tylko

sekrecji hormonu tyreotropowego, jak wyżej opisano, lecz funkcjonowania także pozostałych osi. U żadnego z pacjentów nie potwierdzono nieprawidłowości w zakresie sekrecji prolaktyny ani zaburzeń w obrębie osi przysadkowo-nadnerczowej. Z kolei u dwóch chłopców do leczenia włączono preparaty testosteronu, w dawce 50 mg/4tyg. im, ze względu na fakt, że nieprawidłowościom morfologicznym (ESS w pierwszym przypadku i hipoplazja szypuły w drugim) towarzyszył brak cech dojrzewania, pomimo ukończonego już 14 r.ż., i niedostateczne wydzielanie gonadotropin w teście z LH-RH. U jednego z nich (z ESS) odstąpiono od leczenia po półrocznym okresie terapii z powodu powiększających się jąder i podjęciu endogennego LHRH-zależnego dojrzewania. Obie te sytuacje, w których włączono testosteron, miały miejsce już po okresie 2 letniej obserwacji od rozpoczęcia leczenia rhGH. Bardzo ciekawa okazała się analiza wzrastania jedynej dziewczynki z ESS, która rozpoczęła leczenie rhGH mając lat 11,5. Początkowy poziom wzrostu (htSDS -3,8) nie uległ zmianie po 1 roku leczenia (htSDS -3,8), a po następnym roku awansował tylko bardzo niewiele do poziomu htSDS -3,5. Z powodu braku zewnętrznych cech dojrzewania (w wykonywanym USG miednicy małej macica i jajniki pozostawały w rozwoju na poziomie wczesno dziecięcym) wykonano oznaczenie poziomu gonadotropin (nie wykonywanych dotychczas), których podwyższone poziomy sugerowały hipogonadyzm hipergonadotropowy, a badanie genetyczne (45,X) potwierdziło podejrzewany zespół Turnera (ZT). Cała ta sytuacja miała miejsce już po rekrutacji do grupy badanej i wykonaniu badań molekularnych. Po zmianie kwalifikacji do leczenia i po zwiększeniu dawki na obowiązującą w tym schorzeniu, nastąpiła poprawa tempa wzrastania. Można w tym przypadku dyskutować o potrzebie wykonywania diagnostyki genetycznej za każdym razem rozpoczynając leczenie rhGH. U ww. pacjentki, poza niskorosłością, nie było fenotypowych stygmatów ZT, a wykonane badanie na poziom chromatyny płciowej, przez niektórych stosowane jako badanie przesiewowe, wykazało poziom prawidłowy (22%). Badanie to nie powinno więc być stosowane w diagnostyce genetycznej ze względu na ryzyko wyniku fałszywie ujemnego i błędne zakwalifikowanie pacjenta do niewłaściwej grupy terapeutycznej. U dziewczynki z niskorosłością i powyżej 11 roku życia, nawet przy braku stygmatów zespołu Turnera, należy obligatoryjnie oznaczyć poziom gonadotropin gdyż pierwotna niedoczynność jajników, manifestująca się hipogonadyzmem hipergonadotropowym, to obok niskorosłości druga podstawowa cecha zespołu Turnera. Pozostałe badania kontrolne w tej grupie pacjentów, a także

u dwóch kolejnych z torbielami szyszynki pozostawały w normie i nie dawały przesłanek do podejrzeń w kierunku przyczyny słabej odpowiedzi na leczenie rhGH.

Jeszcze innymi chorobami współistniejącymi, które wystąpiły u jednego z pacjentów płci męskiej już w trakcie leczenia było postępujące zwyrodnienie barwnikowe siatkówki, do którego dołączyło się wkrótce opadanie powiek. Sytuacja ta miała miejsce w 3 roku stosowania preparatu rhGH. Początkowe efekty leczenia tego pacjenta były bardzo obiecujące, ponieważ już po 6-miesięcznym okresie terapii wystąpił bardzo zadowalający efekt w postaci zwiększenia tempa wzrastania z 3.0 do 10.4 cm/rok, co odpowiadało wstępnym przewidywaniom i było zgodne z danymi z piśmiennictwa [135,136]. Niestety już w drugiej połowie 1-go roku stosowania rhGH tempo wzrastania uległo wyraźnemu obniżeniu do 4,8 cm/rok. „*Nadganianie wzrostu*” po 1 roku leczenia wyniosło ostatecznie tylko +0,5 htSDS. Ponieważ zmiany barwnikowe siatkówki pojawiły się już w trakcie stosowania terapii rhGH i był to nowy objaw, dotychczas nie spotykany w naszym ośrodku, podjęta została decyzja o czasowym zaprzestaniu terapii rhGH z obawy przed nasileniem postępu choroby siatkówki, biorąc także pod uwagę ewentualny efekt jatrogenny. Czas ten (3 miesiące) wykorzystano na wykonanie konsultacji okulistycznych i endokrynologicznych oraz na poszukiwanie związku przyczynowego pomiędzy leczeniem rhGH, a wystąpieniem zmian ocznych. W literaturze nie znaleziono związku pomiędzy wyżej wymienionymi zdarzeniami, ani też opisywane kliniczne zmiany nie były wymieniane jako sytuacje, które zmuszały by do przerwania podawania rhGH jak np. wystąpienie objawów zwiększonego ciśnienia czaszkowego (*pseudotumor cerebri*), cukrzycy czy też złuszczenia głowy kości udowej [137]. Z ww. powodów, po 3-miesięcznej przerwie ponownie włączono leczenie rhGH. W późniejszym okresie wykorzystano możliwość wykonania badań molekularnych w Pracowni Endokrynologii Molekularnej UM w Poznaniu i na ich podstawie rozpoznano u pacjenta **zespół Kearns-Sayre’a**. Postawienie takiego rozpoznania implikuje zarówno konieczność poszukiwania innych nieprawidłowości u pacjenta z takim rozpoznaniem jak i poddaje pod dyskusję dalsze leczenie rhGH. Wątpliwości co do terapii rhGH dotyczyły:

1. zasadności kontynuacji leczenia
2. dawki leku
3. częstotliwości podawania leku.
4. bezpieczeństwa leczenia

Zaburzenia wzrastania są jedną z cech encefalomiopatii mitochondrialnej [138,139]. W większości tych przypadków sekrecja GH w testach stymulacyjnych jest prawidłowa, a prawidłowe stężenia IGF-1 sugerują sprawność działania szlaku GHRH/GH/IGF1/IGFBP3 [119]. Bardzo niewiele można znaleźć informacji o skuteczności leczenia rhGH w tych przypadkach. Leczenie za pomocą rhGH powoduje zwykle wzrost tempa wzrastania u tych pacjentów tylko w pierwszych latach leczenia, tak jak obserwuje się to u dzieci z idiopatycznym niskim wzrostem (bez niedoboru GH) [119]. Z doświadczeń innych ośrodków na uwagę zasługuje obserwacja zespołu poznańskiego [140], który we współpracy z Kliniką Neurologii Wieku Rozwojowego UM w Poznaniu, Okulistyczną Poradnią Konsultacyjną SK im. H. Świącickiego UM w Poznaniu oraz Kliniką Neurologii UM w Warszawie, zdiagnozował kolejnych pięć przypadków zespołu Kearns-Sayre'a (z czego 4 z Wielkopolski i 1 z Krakowa). We wszystkich przypadkach obserwowano też bardzo znaczną niskorosłość (htSDS <-3) spowodowaną niedoborem GH. W jednym z tych przypadków zastosowano leczenie rhGH, w trakcie którego obserwowano pojawienie się opadania obu powiek [141]. Z ww. powodu oraz braku spodziewanych efektów w zakresie wzrastania zaprzestano leczenia rhGH tego pacjenta, w dwóch kolejnych przypadkach leczenie jest kontynuowane. U jednego chłopca, przerwano leczenie ze względu na ciężki blok przedsionkowo-komorowy oraz współistniejącą kardiomiopatią rozstrzeniową o podłożu genetycznym. Paradoksalnie tempo wzrastania u tego pacjenta było dobre, a w porównaniu do innych dzieci z KSS wręcz bardzo dobre [142]. Leczenie tych pacjentów jest zatem dyskusyjne i to nie tylko z uwagi na koszty, ale zwłaszcza ze względu na brak dostatecznych danych o optymalnych dawkach rhGH, a także ostatecznej wiedzy na temat skuteczności i bezpieczeństwa terapii. Nie można także wykluczyć wręcz szkodliwości tej terapii u pacjentów z KSS. Pomimo wielu znaków zapytania podjęto jednak decyzję o kontynuacji leczenia rhGH u mojego pacjenta z rozpoznaniem KSS przynajmniej z dwóch powodów:

1. występowała niedoczynność przysadki w zakresie wydzielania GH i ten fakt skłaniał do wyrównywania jego niedoboru w odniesieniu do procesu wzrastania oraz ze względu na rolę jaką odgrywa hormon wzrostu w metabolizmie.
2. analizując tabele wyników można zaobserwować, że po pierwszym 3-miesięcznym odstawieniu rhGH tempo wzrastania uległo zdecydowanemu obniżeniu (z 6,8 do 1,6 cm/rok). Takich samych obserwacji dostarczyły dwie

kolejne przerwy w leczeniu, ze spadkiem TW do zera w ostatnim z tych okresów

Pierwsza przerwa, wynikająca m.in. z braku preparatu rhGH, została dokonana przy stosunkowo dobrym tempie wzrastania (ok. 6,8 cm/rok). Po opisywanym już spadku TW i po wznowieniu terapii zaobserwowano zwiększenie tempa wzrastania (do 8,2 cm/rok). Tego samego spostrzeżenia można dokonać oceniając TW w czasie drugiego odstawienia rhGH z tym, że do tej ostatniej sytuacji doszło w momencie zaobserwowanego dużego osłabienia naszego pacjenta, ze spadkiem tempa wzrastania do 2,4 cm/rok. Przerwa zmniejszyła TW do 2,1 cm/rok. Po ponownym zastosowaniu leczenia zanotowano jego wzrost TW do 5,8 cm/rok. Obie te sytuacje mogą świadczyć o tym, że być może jednym z właściwych elementów terapii rhGH w KSS i w innych tego typu cytopatiach jest właśnie okresowe przerywanie leczenia (terapia przerywana). Jak wiadomo podanie rhGH stymuluje organizm do zwiększenia aktywności metabolicznej, a co za tym idzie wzrostu produkcji energii. Defekt genetyczny występujący w KSS powoduje wyraźne ograniczenie produkcji energii mitochondrialnej tak potrzebnej w omawianym aspekcie. W mitochondriach pacjentów z KSS współwystępuje zmutowany i prawidłowy mtDNA (heteroplazmia), dlatego funkcje łańcucha oddechowego mogą nie być upośledzone tak długo, jak długo prawidłowy mtDNA w sposób wystarczający dostarcza energii, niwelując braki energetyczne zmutowanego mtDNA. Można domniemywać, że krótkotrwale zwiększenie wymagań energetycznych może być zabezpieczone przez część prawidłowego mtDNA, a przerwa potrzebna jest na jego regenerację. Jeśli przyjmiemy to za wskazówkę postępowania to należy jeszcze odpowiedzieć na pytanie kiedy przerwać leczenie? Czy robić to z pewną systematycznością np. co 6 czy 9 czy 12 miesięcy albo dopiero w momencie gdy objawy kliniczne i tempo wzrastania (wyraźne pogorszenie) będą sygnalizowały „osłabienie organizmu”? Czy przerwa w leczeniu powinna być taka sama jak czas terapii (np. 3 miesiące podawania rhGH i 3 miesiące przerwy) czy może być krótsza? Z praktycznego punktu widzenia wydaje się, że w schemacie leczenia powinien być to dość regularny okres, a z obserwacji dokonanych u mojego pacjenta z KSS, gdzie najlepsze rezultaty wzrastania osiągnął on odpowiednio po 7,5 i 8 miesiącach terapii można założyć 9-miesięczny okres leczenia z następową 3-miesięczną przerwą. Ze względu na trudności występujące w wykonywaniu oznaczeń stężenia IGF-1 w naszym ośrodku niemożliwa była dokładna analiza jego poziomu po wdrożeniu

leczenia rhGH i w okresie pierwszego zaprzestania leczenia, ale już oznaczony spadek tego czynnika wzrostowego po drugiej i trzeciej przerwie był znaczny, co raczej potwierdza zasadność kontynuacji leczenia po każdej z wymuszonych przerw w leczeniu.

Inną kwestią, także trudną do jednoznacznego ustalenia, pozostaje wielkość dawki rhGH. W programie leczenia SNP rekomendowane są dawki 0,1 - 0,33mg (0,3 -1,0 IU)/kg/tydz., (0,015– 0,045 mg/kg/d) [76], w których to zakresach prowadzono terapię wszystkich pacjentów. Jeśli chodzi o pacjenta z KSS to rozpiętość ta wahała się między 0,023 a 0,040 mg/kg/d. Pytanie o wielkość dawki związane jest z teoretycznym rozważaniem, a mianowicie która z dawek, w sytuacji przewidywalnego „wyczerpania mitochondrialnego”, mogłaby stać się tą najbardziej optymalną, efektywną? Z obserwacji własnych leczenia jednego pacjenta z KSS dość trudno w sposób jednoznaczny wskazać najskuteczniejszą ilość podawanego rhGH. Przez pierwszy, ok. 2-letni okres terapii rhGH wielkość dawki wahała się w granicach 0,027–0,032 mg/kg/d. W połowie tego okresu leczenia, z powodu wyraźnego spadku tempa wzrastania, zwiększono dawkę rhGH z 0,028 do 0,032 mg/kg/d i nastąpiło odwrócenie tego trendu (z 4,2 na 7,2 cm/rok), co może świadczyć o skuteczności takiego postępowania. Ten niewielki wzrost dawki leku (o 12,5%), w sytuacji spadku oczekiwanego efektu wzrostowego, który w tej wyjątkowej sytuacji może korelować z przewidywanym „wyczerpaniem mitochondrialnym”, mógł wygenerować istniejącą rezerwę auksologiczną. Niestety nie można tego potwierdzić stosownymi oznaczeniami stężeń IGF-1. Dość podobną sytuację można zaobserwować w drugim i trzecim „przedziale czasowym” leczenia (po pierwszej i drugiej przerwie w terapii), gdy również po pierwotnym zwiększonym przyroście długości ciała następowało spowolnienie tempa wzrastania (1,6–8,2–3,6 cm/rok; 2,1–5,8–3,5 cm/rok). Ponowne, jak za pierwszym razem zwiększenie dawki leku (10,7%; 30,4%) powodowało wzrost tempa wzrastania (3,2–7,2 cm/rok; 3,6–6,1 cm/rok). Wydaje się więc, że w sytuacji powolnego zmniejszania skuteczności rhGH podanie zwiększonej jego dawki może spowodować ponowny i skuteczniejszy efekt wzrostowy. Uzupełniając rozważania o czasie podawania i ewentualnej dawce rhGH można zastanowić się nad podaniem tego hormonu tylko w dawce metabolicznej, w takiej jaką praktykuje się u dorosłych pacjentów z niedoborem hormonu wzrostu. Te niższe dawki rhGH nie powinny generować znaczącego „mitochondrialnego wyczerpania” organizmu, a zapewniałyby podtrzymywanie prawidłowych lub zbliżonych do prawidłowych funkcji

metabolicznych. Taki rodzaj postępowania miałby swoje uzasadnienie u analizowanego w mojej pracy pacjenta, w czasie planowanych przerw w terapii rhGH. Jednakże poza hipotetyczną „regeneracją” ekspresji mtDNA mającą miejsce podczas terapii przerywanej następuje także niejako „regeneracja psychiczna” pacjenta zmęczonego i czasem zniecierpliwionego codziennym wykonywaniem iniekcji, zwłaszcza w okresie dojrzewania i w związku ze słabszym niż oczekiwano efektem stosowanej terapii. Wybór pomiędzy „leczeniem metabolicznym” a zupełnym odstawieniem powinien być dokonywany indywidualnie i być opartym o dane dotyczące stopnia niedoboru hormonu wzrostu w testach stymulacyjnych oceniających maksymalne szczytowe wydzielanie hormonu wzrostu. W przypadku ciężkiego niedoboru GH należałoby rozważyć utrzymanie dawki „metabolicznej” w przerwie terapii „wzrostowej”. U opisywanego pacjenta występował częściowy niedobór GH, więc całkowite odstawienie rhGH w trakcie terapii przerywanej wydaje się bardziej uzasadnione.

Dyskusyjnym wydaje się poszukiwanie KSS wśród pacjentów, u których występują tylko pojedyncze objawy z licznych nieprawidłowości związanych z tym schorzeniem. W mojej pracy, oprócz niskorosłości związanej z deficytem wydzielania GH, dodatkowym kryterium w doborze grupy badanej była słaba reakcja na leczenie rhGH. Dodatni wynik w badaniach genetycznych w kierunku KSS uzyskano tylko u jednego pacjenta ($1/32=3.1\%$) i to u tego, u którego można było zaobserwować inne dodatkowe nieprawidłowości jak choćby zwyrodnienie barwnikowe siatkówki, opadanie powiek czy niezborność ruchów. Oczywiście retrospektywnie można dość jednoznacznie odnaleźć poszukiwanego pacjenta z badanej grupy, ale w momencie zapoczątkowania terapii u chłopca nie występowały w sposób jawny inne, oprócz niskiego wzrostu, objawy i tylko słaba odpowiedź na leczenie mogła wpisać pacjenta w grupę badaną. Dodatkowe nieprawidłowości pojawiały się w trakcie kolejnych lat terapii rhGH (Rycina 14) m.in.:

- po 2 latach: zwyrodnienie barwnikowe siatkówki
- po 5 latach: opadanie powiek
- po 6 latach: zaburzenie chodu i równowagi.

Należy w tym miejscu nadmienić, że u probanda, po stwierdzeniu zmian zwyrodnieniowych siatkówki, została podjęta diagnostyka w kierunku wrodzonych wad metabolicznych. Już wtedy, wobec niejasnego obrazu chorobowego wynikającego z wielonarządowości zaburzeń i nietypowego ich przebiegu, przy

prawidłowych wynikach poszerzonego przesiewu metabolicznego, wskazano na konieczność przeprowadzenia diagnostyki uzupełniającej celem ewentualnego rozpoznania lub wykluczenia zaburzeń z grupy chorób mitochondrialnych. Wykonana w znieczuleniu ogólnym biopsja chirurgiczna mięśnia szkieletowego nie wykazała w badaniu mikroskopowym zmian miopatycznych ani cech neurogenego uszkodzenia mięśnia. Badań molekularnych nie wykonywano. Można więc jednoznacznie zauważyć, że poszczególne dolegliwości nie musiały, a nawet nie mogły być początkowym kryterium włączenia. Każda z ww. nieprawidłowości mogła wystąpić jako pierwsza, jak choćby postępująca oftalmoplegia zewnętrzna w opisach innych pacjentów [143,144] i pokazywać „wierzchołek góry lodowej” KSS, której to objawy ukazywały by się stopniowo w czasie. Ujawnienie się typowej triady objawów może być znacząco rozciągnięte w czasie, a niektóre charakterystyczne zaburzenia mogą się nigdy nie pojawić [145]. To potwierdza konieczność poszukiwania pacjentów z KSS wśród chorych o niewielkiej liczbie objawów (w badanej grupie niski wzrost, niedoczynność przysadki i słaba odpowiedź na leczenie rhGH), szczególnie gdyby występowały nieprawidłowości z różnych dziedzin medycyny jak np. okulistyki (zwyrodnienie barwnikowe siatkówki, opadanie powiek) i neurologii (hipotonia, ataksja) lub wielu innych jeszcze możliwych asocjacji. Najtrudniej rozpoznać nietypowy przebieg KSS jak choćby opisywany „Bartter-like” KSS [146], z dominującymi objawami nerkowymi. Nie należy także zapominać o mitochondriopatiach w przypadku np. cukrzycy, która także może być pierwszą oznaką KSS [147]. Brak potwierdzenia autoimmunologicznego podłoża cukrzycy powinno nasuwać podejrzenie nieautoimmunologicznych przyczyn cukrzycy, w tym cytopatii mitochondrialnej, jak w przypadku KSS. Wymienione sytuacje kliniczne potwierdzają większą niż przypuszcza się częstość występowania zaburzeń mitochondrialnych. Dość powszechna nieznajomość KSS wśród lekarzy, także specjalistów, utrudnia rozpoznawanie tego schorzenia. Pomimo, że w chwili obecnej nie ma możliwości wyleczenia pacjentów z KSS, to jednak istnieją sposoby łagodzenia ich dolegliwości, choćby w ograniczonym zakresie. Poznanie i zrozumienie mechanizmów zachodzących na poziomie komórkowym, w przypadku takich cytopatii jak KSS, może pomóc w prowadzeniu terapii jak choćby rhGH (dawka, częstotliwość podawania leku, czas prowadzenia leczenia), czy też we wcześniejszym rozpoznawaniu innych towarzyszących temu zespołowi objawów chorobowych. Objawy kliniczne w KSS mogą dotyczyć każdego narządu. W

zależności od tego który narząd ulega największej dysfunkcji nasze postępowanie medyczne może być bardziej zachowawcze lub zdecydowanie bardziej aktywne. W przypadku stopniowo pogarszającego się słuchu związanego z dysfunkcją układu neurosensorycznego zaleca się, podobnie jak we wszystkich zaburzeniach mitochondrialnych, regularne badanie audiometryczne [148]. Tak właśnie postępowaliśmy z naszym pacjentem. Pogarszanie się słuchu stopniowo doprowadziło do sytuacji, w której wskazane było zaopatrzenie w aparat słuchowy. Niestety, chłopiec nie wyraził zgody na to leczenie. Innego postępowania wymagają zaburzenia, w których brak wyrównania może zagrazić życiu pacjenta. Dotyczy to np. cukrzycy, niedoczynności nadnerczy czy zaburzeń rytmu serca, gdzie spóźniona interwencja lekarska może doprowadzić do przedwczesnej śmierci pacjenta [149]. Wiedza o naturalnym przebiegu tego schorzenia pozwoliła stosunkowo wcześnie wykryć ciężkie zaburzenia układu bodźco-przewodzącego serca z bradykardią i blokiem przedsionkowo-komorowym, doprowadzającym do omdleń. Omdlenia były początkowo związane z uogólnionym zmęczeniem. Krótco przed wystąpieniem ciężkich objawów wykonano 24-godzinne badanie holterowskie monitorujące pracę serca, które wykazało zapis w granicach normy. W okresie 6 miesięcy powstał blok P-K III stopnia, z towarzyszącą bradykardią, nasilającą się pomimo zastosowanego leczenia. Pilna interwencja w postaci założenia rozrusznika serca spowodowała ustąpienie zagrażających życiu objawów i poprawę stanu ogólnego chłopca. Podobne sytuacje opisywane są coraz częściej w piśmiennictwie, nakazując czujność kardiologiczną w przypadkach pojawiania się zaburzeń przewodnictwa w mięśniu sercowym, szczególnie tych występujących u małych dzieci [150].

Mając definitywne, molekularne potwierdzenie KSS u pacjenta, można też poddać analizie retrospektywnej pierwsze poważne schorzenie chłopca jakim była wykryta w 1 roku życia niedokrwistość Blackfana-Diamonda (BDA), wymagająca m.in. sterydoterapii i wielokrotnych transfuzji uzupełniających. Ostatecznie, po około 2-letniej terapii nastąpiła trwała remisja choroby. W KSS nie opisuje się wczesnych zaburzeń hematologicznych, lecz to samo podłoże molekularne występujących zaburzeń chorobowych (delecja mtDNA) ma także zespół Pearsona (ZP), w obrazie którego występuje niedokrwistość sideroblastyczna lub pancytopenia [151,152]. Niedokrwistość Blackfana–Diamonda, ujawniająca się w większości przypadków w okresie noworodkowym lub niemowlęcym, to normochromiczna niedokrwistość ze znacznego stopnia retikulocytopenią oraz wybiórczym brakiem komórek

prekursorowych dla erytrocytów. Podłożem tej choroby są zaburzenia w funkcji rybosomów [153-155]. Ten typ niedokrwistości nie wpisuje się więc w standardowy ZP, w którym poza niedokrwistością sideropeniczną występuje zewnątrzwydzielnicza niedomoga trzustki oraz zaburzenia funkcji wątroby i nerek, nie występujące u opisywanego pacjenta. ZP najczęściej kończy się śmiercią we wczesnym dzieciństwie [156]. Ci nieliczni pacjenci, którzy przeżyli okres niemowlęctwa, rozwijają w późniejszym okresie objawy KSS [113]. Wydaje się więc, że niedokrwistość występująca we wczesnym dzieciństwie u pacjenta nie powinna być związana z wrodzonymi zmianami w mtDNA, chociaż nie można tego ostatecznie wykluczyć, biorąc pod uwagę możliwość upośledzonej białkowej produkcji rybosomalnej na skutek zaburzeń w mitochondriach komórek szpiku. U ponad połowy pacjentów z BDA nie udaje się znaleźć charakterystycznych mutacji w genach kodujących produkcję białek rybosomalnych, sugerując istnienie innych zaburzeń molekularnych w patogenezie tej choroby [157]. Tak więc istnieje prawdopodobieństwo, że zaburzenia w mtDNA mogły wywołać ten rodzaj niedokrwistości, będąc pierwszym sygnałem ujawniających się z biegiem lat nieprawidłowości charakterystycznych dla zespołu Kearns-Sayre'a. Być może ten typ anemii jest kolejnym objawem klinicznym zespołu Kearns-Sayre'a. Jest to nowatorskie spostrzeżenie w przebiegu KSS.

Problemy związane z KSS wynikające z pogarszających się funkcji wielu narządów jak niedosłuch, niedowidzenie, spowolnienie ruchowe i myślowe prowadzą do stopniowego obniżania się jakości życia. Z tego powodu chłopca zakwalifikowano do indywidualnego nauczania w domu, ale ze stałą możliwością uczęszczania na zajęcia w szkole, aby zachować kontakt z rówieśnikami w tym tak ważnym dla niego okresie życia. Bardzo ważne jest aby oprócz nadzoru medycznego pacjent wraz z rodziną został objęty opieką środowiskową i psychologiczną. Tak też dzieje się w przypadku opisywanego pacjenta.

Odnosząc się do analizy mtDNA wykonanej w 2006 r. w Pracowni Endokrynologii Molekularnej UM w Poznaniu (potwierdzającej u pacjenta zespół Kearns-Sayre'a) i wyniku takiego samego badania z Pracowni Cytochemicznej CZD w Warszawie (2008r), w obu ośrodkach uzyskano wynik tej samej „common deletion” 4977 pz. Rozbieżności w szczegółowym opisie delecji z obydwu pracowni wynikają z różnic w technicznym przeprowadzeniu badania, a konkretnie w umiejscowieniu starterów użytych do reakcji PCR. W analizie wykonanej w CZD użyto starterów amplifikujących jedynie region 8224-13 501 pz cząsteczki mtDNA, a więc

ukierunkowanych wyłącznie na wykrycie „common deletion”. Stąd otrzymano jedynie produkt o długości 300 pz ponieważ reszta amplifikowanego regionu została usunięta przez delecję. W pracowni poznańskiej wykorzystano inne zestawy starterów do reakcji PCR, które pozwalały na przeanalizowanie całej cząsteczki mtDNA w poszukiwaniu każdej możliwej delecji – stąd inna wielkość produktu reakcji. W obydwu przypadkach uzyskano jednak ten sam wynik badania – obecność „common deletion”. Trudności w jednoznacznym określeniu dokładnej lokalizacji początku i końca delecji wynikają z faktu występowania identycznych powtórzeń 12-to nukleotydowej sekwencji ACCTCCCTCACCA w rejonie bezpośrednio otaczającym delecję pomiędzy nukleotydami 8470-8482 oraz 13 447-13 459. Podczas sekwencjonowania produktów reakcji nie można jednoznacznie stwierdzić, który z nukleotydów tego powtórzenia należy do regionu z początku, a który z końca delecji. Nawet w bazie danych MITOMAP „common deletion” jest kilka razy lokalizowana w tym regionie z przesunięciem kilku nukleotydów w jedną lub drugą stronę. Stała jest jednak zawsze wielkość delecji (4977 pz) oraz lokalizacja początku w regionie nt 8470-8482 i końca w regionie nt 13 447-13 459. Te warunki zostały spełnione w wynikach obydwu badań.

Jak wcześniej wspomniano w jednej komórce, a nawet w obrębie jednego mitochondrium, występują prawidłowe oraz zmutowane cząsteczki mtDNA. Nie do końca jednak wiadomo jak dystrybucja zmutowanego mtDNA w macierzy mitochondrialnej wpływa na rozwój choroby [158]. W opublikowanych badaniach nie stwierdzono korelacji pomiędzy wielkością i lokalizacją delecji mtDNA, a fenotypem pacjenta i jego objawami chorobowymi. Dla wszystkich mutacji mtDNA, w tym też dla KSS, kliniczna ekspresja zależy od kilku czynników:

- odsetka zmutowanego mtDNA (heteroplazmia)
- dystrybucji tkankowej zmutowanego mtDNA
- wrażliwości poszczególnych tkanek na zaburzenia metabolizmu tlenowego (efekt progowy) [93].

Delecje w mitochondrialnym DNA występują zazwyczaj w stanie heteroplazmii. Oznacza to współwystępowanie w jednej komórce, a nawet w obrębie jednego mitochondrium, zarówno prawidłowych cząsteczek mtDNA jak i cząsteczek z delecją. Stosunek ilościowy zmutowanych cząsteczek mtDNA do prawidłowych ma krytyczny wpływ na fakt wystąpienia choroby i stopień nasilenia jej objawów klinicznych [83,

159]. Z ww. powodu przeprowadzono analizę ilościową poziomu mtDNA we krwi pacjenta za pomocą techniki Real-Time PCR.

Próg podatności poszczególnych tkanek prawdopodobnie nie różni się znacząco u poszczególnych osób, zatem to dystrybucja tkankowa i wielkość heteroplazmii mogą decydować o spektrum objawów klinicznych. Występowanie delecji mtDNA we wszystkich tkankach pacjentów z KSS, ich dominacja w komórkach krwiotwórczych w zespole Pearsona oraz ograniczenie do występowania w mięśniach szkieletowych pacjentów z postępującą, zewnętrzną oftalmoplegią tłumaczy różne kliniczne postacie tego samego defektu molekularnego [160]. Ekspresja objawów jest więc wywoływana przez poziom zmutowanego mtDNA. U opisywanego pacjenta z KSS, heteroplazmia była zdominowana przez nieprawidłowy mtDNA (75,7%). W piśmiennictwie sugeruje się, że w przypadku KSS 20% niezmiennego mtDNA może wystarczać dla prawidłowego funkcjonowania mitochondriów, a dopiero poziom mutacji przekraczający 80% jest przyczyną dysfunkcji mitochondriów i objawów klinicznych [81]. Nie można jednak wykluczyć występowania objawów chorobowych przy niższych poziomach nieprawidłowego mtDNA w szczególnych okresach o zwiększonych wymaganiach energetycznych jak np. noworodkowym czy dojrzewania. U pacjenta z KSS poziom heteroplazmii jest zbliżony do wartości progowych dostępnych z literatury. Ten poziom nieprawidłowości spowodował stopniowe pojawianie się objawów klinicznych, ale i szybkie ich narastanie, szczególnie w okresie związanym z intensywnym wzrostem, a więc w okresie wyraźnie zwiększonego zapotrzebowania energetycznego. Należy mieć nadzieję, że po okresie intensywnego wzrastania i dojrzewania nastąpi stabilizacja choroby. Ilościowe oznaczenie poziomu nieprawidłowego mtDNA może więc być bardzo cenną wskazówką w każdym przypadku rozpoznania cytopatii mitochondrialnej (w tym KSS) dla prognozowania postępu choroby.

Trudnością związaną z takimi chorobami jak KSS jest też dostępność wykonania określonych badań. Ograniczone możliwości diagnostyczne w znacznym stopniu zmniejszają naszą czujność na występowanie schorzeń będących rzadkością w codziennej praktyce lekarskiej. Dlatego tak ważne jest aby promować ośrodki medyczne w Polsce z największym doświadczeniem i możliwościami diagnostycznymi w określonej dziedzinie medycyny, w których można zawsze otrzymać 2-gą opinię oraz wykonać uzupełniające badania diagnostyczne.

Równocześnie należy pamiętać o schorzeniach z grupy zaburzeń mitochondrialnych u pacjentów, którzy przechodzą do opieki endokrynologów-internistów. Wiele przypadków KSS może bowiem ujawniać się dopiero po okresie dzieciństwa i dotyczyć dorosłych [143], u których przez wiele lat diagnoza może być postawiona niewłaściwie [144,161].

Podsumowując można stwierdzić, że w wyselekcjonowanej grupie badanej 32 pacjentów z trudnościami w „*nadganianiu wzrostu*” wykryto 1 przypadek dziecka z zespołem Kearns-Sayre'a, co potwierdza zasadność uwzględniania przyczyn mitochondrialnych w diagnostyce różnicowej słabej odpowiedzi na leczenie rhGH pacjentów z SNP. Negatywny wynik badania w kierunku KSS nie wyklucza obecności cytopatii mitochondrialnej innego typu, ale o podobnych objawach klinicznych. Szczególną uwagę powinno zwracać się na pacjentów wykazujących interdyscyplinarne dolegliwości, szczególnie o nietypowym przebiegu choroby, sprawiającym trudności terapeutyczne [162]. Holistyczne spojrzenie na pacjenta i jego problem zdrowotny, właściwe i szybkie rozpoznanie KSS lub podobnej choroby u dziecka ma istotne znaczenie dla sposobu dalszego postępowania profilaktycznego i leczniczego, którego celem jest zmniejszenie ryzyka zaburzenia harmonijnego rozwoju dziecka.

Leczenie niskorosłych pacjentów z KSS za pomocą rhGH może być nieskuteczne, co sugeruje że niski wzrost u tych pacjentów nie jest związany wyłącznie z niedoborem GH, ale może być także związany ze zbyt małą ilością substratu białkowego. Deficyt efektywności fosforylacji oksydacyjnej z powodu mutacji w mtDNA powoduje niedostateczną produkcję energii w mitochondriach i - co jest z tym związane - obniżoną syntezę białek. W rezultacie nie obserwuje się znaczącego krótko- czy długotrwałego efektu w postaci przyspieszonego tempa wzrastania po podaniu rhGH. W niektórych przypadkach terapia hormonem wzrostu może prowadzić do nasilenia się innych objawów klinicznych i progresji stanu chorobowego, co jest związane ze zwiększonym zapotrzebowaniem energetycznym. Zwiększona stymulacja mitochondrialna przy obecności nieprawidłowego mtDNA może prowadzić do takiego deficytu energetycznego, że po przekroczeniu pewnego progu wydolności pojawią się objawy chorobowe w tkankach i narządach.

Trzeba żywić nadzieję, że może w niedalekiej przyszłości dostępna będzie skuteczna terapia genowa w tej ciężkiej, genetycznie uwarunkowanej chorobie.

VII. WNIOSKI

1. Około 15% pacjentów z somatotropinową niedoczynnością przysadki prezentuje brak charakterystycznego „nadgania wzrostu” po zastosowaniu leczenia rhGH.
2. Dzieci z somatotropinową niedoczynnością przysadki (SNP) i brakiem „nadgania wzrostu” w trakcie terapii rhGH są potencjalnymi kandydatami do badania genetycznego w kierunku delecji mtDNA. Grupą ryzyka zespołu Kearns-Sayre’a są szczególnie te dzieci z SNP, u których występują dodatkowe zaburzenia jak opadanie powiek, zwyrodnienie barwnikowe siatkówki i zaburzenia układu bódźco-przewodzącego serca.
3. Diagnostyka molekularna (badanie mtDNA w kierunku delecji) jest podstawową metodą diagnostyczną w rozpoznaniu zespołu Kearns-Sayre’a.
4. Wynik badania molekularnego mtDNA (jakościowy i ilościowy) może prognozować wystąpienie określonego zespołu chorobowego.
5. Leczenie SNP u pacjenta z zespołem Kearns-Sayre’a za pomocą rhGH należy prawdopodobnie indywidualizować, modyfikując dawkę oraz okres podawania leku.

VIII. STRESZCZENIE

Niski wzrost jest przyczyną niepokoju zarówno samych pacjentów jak i wśród ich rodziców. Duże nadzieje na poprawę wzrostu ostatecznego wiązane są z możliwością zastosowania rekombinowanego ludzkiego hormonu wzrostu (rhGH), zwłaszcza w przypadku niskorosłych dzieci z rozpoznaniem somatotropinowej niedoczynności przysadki (SNP), dzięki której to terapii pacjenci mogą osiągnąć zadowalający wzrost ostateczny. Niestety, nie wszystkie dzieci objęte tą terapią wykazują dobrą odpowiedź na zastosowany lek. Wśród przyczyn nieskuteczności leczenia wyróżnić trzeba cytopatie mitochondrialne, które są grupą wieloukładowych zaburzeń metabolicznych o podłożu genetycznym. Stopniowe obniżenie procesów energetycznych na poziomie mitochondriów prowadzi do upośledzenia funkcji poszczególnych tkanek i narządów z preferencyjnym osłabieniem mięśni oraz układu nerwowego. Jedną z cech ww. chorób jest też niskorosłość związana z zaburzeniem funkcji układu wewnątrzwydzielniczego. Zespół Kearns-Sayre'a (KSS) to przykład mitochondriopatii, z klasyczną triadą zaburzeń: zwyrodnienia barwnikowego siatkówki, przewlekłej, postępującej zewnętrznej oftalmoplegii z opadaniem powiek oraz bloku przedsionkowo-komorowego układu bodźco-przewodzącego serca. Słaba odpowiedź na leczenie rhGH to kolejna cecha KSS.

Cele pracy obejmowały: (1) wyselekcjonowanie z grupy dzieci z SNP leczonych rhGH w Poradni Endokrynologicznej dla Dzieci Szpitala Wojewódzkiego nr 2 w Rzeszowie, w woj. podkarpackim chorych ze słabszą odpowiedzią na zastosowane leczenie oraz ich szczegółową charakterystykę; (2) ocenę grupy badanej pod kątem współistnienia innych nieprawidłowości (endokrynologicznych i nieendokrynologicznych); (3) analizę molekularną mtDNA u ww., wyselekcjonowanych pacjentów w poszukiwaniu delecji mtDNA jako przyczyny SNP oraz (4) szczegółową analizę pacjentów z delecją mtDNA i ich odpowiedź na leczenie rhGH. Z grupy 202 dzieci leczonych rhGH w latach 2005 – 2007 wyselekcjonowano grupę 32 dzieci, które pomimo standardowego leczenia rhGH nie wykazywały charakterystycznego „nadgania wzrostu” ($\Delta h_{SDS} \leq 0,5$ po roku leczenia) i po dwóch latach leczenia pozostawały nadal niskie. Analizie poddano wybrane parametry auksologiczne i biochemiczne [m.in. wzrost i masę ciała, wskaźnik BMI, wiek kostny, tempo wzrastania, „nadganie wzrostu”, wzrost rodziców, prognozę wzrostu ostatecznego (PAH), stężenie IGF1] zarówno przed i w

trakcie leczenia rhGH. U wszystkich wyselekcjonowanych pacjentów wykonano badania molekularne (izolację DNA z limfocytów krwi obwodowej oraz analizę mitochondrialnego DNA) w poszukiwaniu delecji mitochondrialnego DNA (mtDNA). W badanej grupie zdecydowaną większość stanowili chłopcy (n=24) vs dziewczynki (n=8). Stosunek płci męskiej do żeńskiej w badanym materiale wynosił 3:1. Porównano m.in. skuteczność leczenia w poszczególnych grupach z uwzględnieniem wzrostu docelowego wynikającego ze wzrostu rodziców, a także w oparciu o prognozę wzrostu ostatecznego (PAH) wynikającej z oceny wieku kostnego i aktualnego wzrostu. Oceniono stężenie IGF1 jako wskaźnika odpowiedzi biochemicznej na stosowany rhGH. Przeanalizowano schorzenia towarzyszące, mogące mieć wpływ na słabszą odpowiedź wzrostową w trakcie leczenia hormonem wzrostu.

Wykazano porównywalną skuteczność leczenia w grupie dziewczynek i chłopców w poszczególnych latach terapii rhGH. Znamienna poprawa tempa wzrastania (TW), związana była z wyraźnym wzrostem poziomów IGF-1, jednak nie spowodowała oczekiwanego „nadgania wzrostu” w obu grupach po 1 roku i 2 latach leczenia (dziewczynki 0,26 i 0,30 htSDS; chłopcy 0,21 i 0,20 htSDS). Prognoza wzrostu ostatecznego uległa tylko nieznacznej poprawie w okresie 2-letniej obserwacji (dziewczynki 0,59 htSDS; chłopcy 0,43 htSDS).

Przeprowadzona analiza molekularna mtDNA pozwoliła rozpoznać KSS u jednego pacjenta. U ww. chłopca z KSS poddano retrospektywnej analizie wszystkie wcześniej występujące zdarzenia chorobowe oraz zweryfikowano aktualne zaburzenia zdrowotne w poszukiwaniu związku z istniejącą mutacją mtDNA (genotyp/fenotyp). Poddano wnikliwej ocenie dotychczasowy sposób leczenia hormonem wzrostu opisywanego pacjenta, sugerując nieco inny sposób podawania rhGH aniżeli w pozostałych przypadkach somatotropinowej niedoczynności przysadki, modyfikując dawkę oraz okres podawania leku.

Na podstawie przeprowadzonej rozprawy doktorskiej wysunięto następujące wnioski:

1. Około 15% pacjentów z somatotropinową niedoczynnością przysadki prezentuje brak charakterystycznego „nadgania wzrostu” po zastosowaniu leczenia rhGH.
2. Dzieci z somatotropinową niedoczynnością przysadki (SNP) i brakiem „nadgania wzrostu” w trakcie terapii rhGH są potencjalnymi kandydatami do badania genetycznego w kierunku delecji mtDNA. Grupą ryzyka zespołu

Kearns-Sayre'a są szczególnie te dzieci z SNP, u których występują dodatkowe zaburzenia jak opadanie powiek, zwyrodnienie barwnikowe siatkówki i zaburzenia układu bódźco-przewodzącego serca.

3. Diagnostyka molekularna (badanie mtDNA w kierunku delecji) jest podstawową metodą diagnostyczną w rozpoznaniu zespołu Kearns-Sayre'a.
4. Wynik badania molekularnego mtDNA (jakościowy i ilościowy) może prognozować wystąpienie określonego zespołu chorobowego.
5. Leczenie SNP u pacjenta z zespołem Kearns-Sayre'a za pomocą rhGH należy prawdopodobnie indywidualizować, modyfikując dawkę oraz okres podawania leku.

IX. SUMMARY

Short stature is a cause for concern for both patients and their parents. High hopes for improvement in final height are associated with the use of recombinant human growth hormone (rhGH), especially in case of short-statured children diagnosed with growth hormone deficiency (GHD), which means that with this therapy patients can achieve a satisfactory final height. Unfortunately, not all children submitted to this treatment have shown good response to the drug used. The causes of ineffective treatment include mitochondrial cytopathies - a complex group of metabolic multiple system disorders of genetic origin. The gradual reduction of energy processes at the level of mitochondria leads to impaired function of individual tissues and organs with preferential weakness of muscles and nervous system. One of the features of the above mentioned diseases is also short stature associated with endocrine dysfunction. Kearns-Sayre Syndrome (KSS) is an example of mitochondrial cytopathy with the classic triad of disorders: retinal pigment degeneration, chronic progressive external ophtalmoplegy with drooping eyelids and atrioventricular block. Poor response to treatment with rhGH is another feature of KSS.

The objectives of the study included: (1) selection and detailed characteristics of a group of children with suboptimal response to treatment from the cohort of GHD children treated with rhGH in Pediatric Endocrinology Outpatient Clinic in District Hospital No. 2 in Rzeszów, Podkarpackie region (2) evaluation of the test group for the coexistence of other disorders (endocrine and nonendocrine), (3) molecular analysis of mtDNA from the selected patients mentioned above in the search for mtDNA deletion as a cause of GHD and (4) a detailed analysis of patients with a possible diagnosis of mtDNA deletion and their response to treatment with rhGH.

Out of the 202 children treated with rhGH in the years 2005 - 2007 the group of 32 children was selected who, despite standard rhGH treatment, did not show the characteristic "catch-up growth" ($\Delta h\text{SDS} \leq 0,5$ after one year of treatment) and after two years of treatment were still short-statured. Selected auxological and biochemical parameters were analyzed (including height and weight, BMI index, bone age, growth velocity, "catch up growth", parental height, prediction of adult height (PAH), IGF1 levels) both before and during the treatment with rhGH. Molecular testing was performed in all selected patients (isolation of DNA from peripheral blood lymphocytes and analysis of mitochondrial DNA) in the search for deletions of mitochondrial DNA (mtDNA). The study group comprised 24 boys and 8 girls. The ratio of male to female in the test material was 3:1. Effectiveness of treatment in each group was compared with regard to

growth resulting from the target parental growth and based on the prediction of final height (PAH) resulting from the assessment of bone age and current height. IGF1 concentration was evaluated as an indicator of biochemical response to rhGH used. Accompanying diseases, which might have affected the weaker growth response during growth hormone therapy were analyzed.

Comparable efficacy has been shown in a group of girls and boys in each year of rhGH treatment. Significant improvement of growth velocity (GV) was associated with a significant increase in IGF-1 levels, but did not cause the expected “catch-up growth” in either group after 1 year and 2 years of treatment (0,26 and 0,30 girls htSDS; boys 0,21 and 0,20 htSDS). The prediction of final growth (PAH) was also only slightly improved during the 2 years of observation (0,59 htSDS girls vs. htSDS 0,43 boys).

Molecular mtDNA analysis performed in all children from the study group helped to identify KSS in one patient. In this one case a retrospective analysis of all events and health disorders occurring before the disease was verified in the search for correlations with existing mtDNA mutation (genotype/phenotype). The current growth hormone treatment for the patient described was submitted to a thorough assessment, suggesting a slightly different method of administration of rhGH from other cases with hormone deficiency, modifying the dose and duration of drug administration.

Based on the presented doctoral dissertation the following conclusions are proposed:

1. About 15% of GHD patients demonstrate lack of characteristic “catch-up growth” pattern after rhGH treatment.
2. Children with GHD and lack of “catch-up growth” during rhGH therapy, are potential candidates for genetic evaluation in the search for mtDNA deletion. Risk group with suspicion of KSS is particularly the children with GHD who have additional problems such as ptosis, retinal pigment degeneration or atrioventricular conduction disturbances.
3. Molecular diagnostics (mtDNA analysis in the search for deletion) is the basic diagnostic modality in the diagnosis of KSS.
4. The mtDNA result (both qualitative and quantitative) may allow prediction of the particular pathological syndrome.
5. Treatment of GHD in a KSS patient with rhGH should probably be individualized by modification of the dose and the duration of treatment.

X. Piśmiennictwo

- [1] **Feldman S.** "The presentation of shortness in everyday life—height and heightism in American society: Toward a sociology of stature Paper". Presented at the meeting of the American Sociological Association. Chicago, Il. 1971.
- [2] **Romer TE.** Zaburzenia wzrostu i rozwoju. W: Endokrynologia Kliniczna dla Ginekologa, Internisty i Pediatri, pod red. Romer TE., Springer PWN, Warszawa 1998: 43-79.
- [3] **Molinari E,** Sartori A, Ceccarelli A, Marchi S. Psychological and emotional development, intellectual capabilities, and body image in short normal children. *J Endocrinol Invest* 2002; 25(4):321-328.
- [4] **Visser-van Balen H,** Geenen R, Kamp GA, Huisman J, Wit JM, Sinnema G. Motives for choosing growth-enhancing hormone treatment in adolescents with idiopathic short stature: a questionnaire and structured interview study. *BMC Pediatr* 2005; 8;5(1):15.
- [5] **Hulse JA.** Referral criteria for growth screening. *J Med Screen* 1995; 2(3):168-170.
- [6] **Krawczyński M.** Niedobór wzrostu. W: Diagnostyka najczęstszych objawów w praktyce pediatrycznej pod red. Kawalec W, Milanowski A. PZWL Warszawa 2003, 121-124.
- [7] **Rymkiewicz-Kluczyńska B.** Wzrastanie i rozwój. W: Zaburzenia hormonalne u dzieci i młodzieży pod red. Romer T.E. Omnitech Press, Warszawa 1993; 5:63-85
- [8] **Karlberg J,** Luo ZC. Foetal size to final height. *Acta Paediatr* 2000; 89(6):632-636.
- [9] **Karlberg J.** On the modelling of human growth. *Stat Med* 1987; 6(2):185-192.
- [10] **Tanner JM,** Whitehouse RH, Takaishi M. Standards from birth to maturity for height, weight, height velocity, and weight velocity: British children, 1965. I. *Arch Dis Child* 1966;41(219):454-471.
- [11] **Krawczyński M.** Rozwój fizyczny. W: Norma Kliniczna w Pediatrii, pod red. Krawczyński M, PZWL Warszawa 2005; 50.
- [12] **Voss LD,** Wilkin TJ, Bailey BJ, Betts PR. The reliability of height and height velocity in the assessment of growth (the Wessex Growth Study). *Arch Dis Child.* 1991;66(7):833-837.

- [13] **Watt V**, Pickering M, Wales J. A comparison of ultrasonic and mechanical stadiometry. Arch Dis Child. 1998;78(3):269-270.
- [14] **Palczewska I**, Niedźwiecka Z. Wskaźniki rozwoju somatycznego dzieci i młodzieży warszawskiej. Med Wieku Rozw 2001;5,Suppl.I do nr 2,17-118.
- [15] **Krawczyński M**. Dziecko poznańskie 2000. Poznań, Oddz. Poznański Polskiego Towarzystwa Pediatrycznego 2001
- [16] **Marshall WA**, Tanner JM. Variations in pattern of pubertal changes in girls. Arch Dis Child 1969; 44(235):291-303.
- [17] **Marshall WA**, Tanner JM. Variations in the pattern of pubertal changes in boys. Arch Dis Child 1970; 45(239):13-23.
- [18] **Greulich WW**, Pyle SI. Radiographic atlas of skeletal development of the hand and wrist. California: Stanford University Press; 1950.
- [19] **Lifshitz F**. Nutrition and growth. J Clin Res Pediatr Endocrinol 2009; 1(4):157–163.
- [20] **Doeker B**, Simić-Schleicher, Hauffa BP, Andler W. Psychosocially stunted growth masked as growth hormone deficiency. Klin Padiatr 1999; 211(5):394-398.
- [21] **Lee PA**, Chernausek 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.
- [22] **Niedziela M**, Korman E. Endokrynologia/Wzrastanie. W: Norma Kliniczna w Pediatrui, pod red. Krawczyński M, PZWL Warszawa 2005; 221-222.
- [23] **Rosenbloom AL**. Idiopathic short stature: conundrums of definition and treatment. Int J Pediatr Endocrinol 2009; 2009:470378.
- [24] **Simm PJ**, Werther GA. Child and adolescent growth disorders-an overview. Aust Fam Physician 2005; 34(9):731-737.
- [25] **Mullis PE**. Genetic control of growth. Eur J Endocrinol 2005; 152(1):11-31.
- [26] **Aarskog D**, Eiken HG, Bjerknes R, Myking OL.: Pituitary dwarfism in the R271W Pit-1 gene mutation. Eur J Pediatr 1997; 156(11):829-34.
- [27] **Bhangoo AP**, Hunter CS, Savage JJ, Anhalt H, Pavlakis S, Walvoord EC, Ten S, Rhodes SJ. Clinical case seminar: a novel *LHX3* mutation presenting as combined pituitary hormonal deficiency. J Clin Endocrinol Metab 2006; 91(3):747-753.

- [28] **Netchine I**, Sobrier ML, Krude H, Schnabel D, Maghnie M, Marcos E, Duriez B, Cacheux V, Moers A, Goossens M, Grüters A, Amselem S. Mutations in LHX3 result in a new syndrome revealed by combined pituitary hormone deficiency. *Nat Genet* 2000; 25(2):182-186.
- [29] **Vieira TC**, Boldarine VT, Abucham J. Molecular analysis of PROP1, PIT1, HESX1, LHX3, and LHX4 shows high frequency of PROP1 mutations in patients with familial forms of combined pituitary hormone deficiency. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2007; 51(7): 1097-1103.
- [30] **Pfäffle R**, Klammt J. Pituitary transcription factors in the aetiology of combined pituitary hormone deficiency. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2011; 25(1):43-60.
- [31] **Davidson MB**. Effect of growth hormone on carbohydrate and lipid metabolism. *Endocr Rev* 1987;8(2):115-131.
- [32] **Hilczer M**. Test wysiłkowy i test oceny nocnego wydzielania hormonu wzrostu w diagnostyce dzieci z niedoborem wzrostu. *Endokrynol Ped* 8/2009, sup 2(9).
- [33] **Yang N**, Langenheim JF, Wang X, Jiang J, Chen WY, Frank SJ. Activation of growth hormone receptors by growth hormone and growth hormone antagonist dimers: insights into receptor triggering. *Mol Endocrinol* 2008; 22(4):978-988.
- [34] **Waters MJ**, Brooks AJ. Growth hormone receptor: structure function relationships. *Horm Res Paediatr.* 2011; 76 Suppl 1:12-16.
- [35] **Moaeen-ud-Din M**, Yang LG. Evolutionary history of the somatostatin and somatostatin receptors. *J Genet* 2009; 88(1):41-53.
- [36] **Smith RG**, Van der Ploeg LH, Howard AD, Feighner SD, Cheng K, Hickey GJ, Wyvratt MJ Jr, Fisher MH, Nargund RP, Patchett AA. Peptidomimetic regulation of growth hormone secretion. *Endocr Rev* 1997; 18(5):621-645.
- [37] **Date Y**, Kojima M, Hosoda H, Sawaguchi A, Mondal MS, Suganuma T, Matsukura S, Kangawa K, Nakazato M. Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology* 2000;141(11):4255-4261.
- [38] **Brown MJ**, Struthers AD, Burrin JM, Di Silvio L, Brown DC. The physiological and pharmacological role of presynaptic alpha- and beta-adrenoceptors in man. *Br J Clin Pharmacol* 1985; 20(6):649-58.
- [39] **Collu R**, Leboeuf G, Letarte J. Stimulation of growth hormone secretion by levodopa-propranolol in children and adolescents. *Pediatrics* 1975; 56(2):262-256.

- [40] **Shalet SM**, Toogood A, Rahim A, Brennan BM. The diagnosis of growth hormone deficiency in children and adults. *Endocr Rev* 1998; 19(2):203-223.
- [41] **D'Ercole AJ**, Stiles AD, Underwood LE. Tissue concentrations of somatomedin C: further evidence for multiple sites of synthesis and paracrine or autocrine mechanisms of action. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984; 81(3):935-939.
- [42] **Limesand KH**, Barzen KA, Quissell DO, Anderson SM. Synergistic suppression of apoptosis in salivary acinar cells by IGF1 and EGF. *Cell Death Differ* 2003; 10(3):345-355.
- [43] **Moll GW Jr**, Rosenfield RL, Fang VS. Administration of low-dose estrogen rapidly and directly stimulates growth hormone production. *Am J Dis Child* 1986; 140(2):124-127.
- [44] **Morovat A**, Dauncey MJ. Effects of thyroid status on insulin-like growth factor-I, growth hormone and insulin are modified by food intake. *Eur J Endocrinol* 1998; 138(1):95-103.
- [45] **Magiakou MA**. Growth in disorders of adrenal hyperfunction. *Pediatr Endocrinol Rev* 2004; 1 Suppl 3:484-489.
- [46] **Misra M**, Bredella MA, Tsai P, Mendes N, Miller KK, Klibanski A. Lower growth hormone and higher cortisol are associated with greater visceral adiposity, intramyocellular lipids, and insulin resistance in overweight girls. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008; 295(2):E385-392.
- [47] **Lanning NJ**, Carter-Su C. Recent advances in growth hormone signaling. *Rev Endocr Metab Disord* 2006; 7(4):225-235.
- [48] **Bex M**, Bouillon R. Growth hormone and bone health. *Horm Res* 2003; 60 (Suppl 3):80-86.
- [49] **Salomon F**, Cuneo R, Sönksen PH. Growth hormone and protein metabolism. *Horm Res* 1991; 36 (Suppl 1):41-43.
- [50] **Russell-Jones DL**, Umpleby M. Protein anabolic action of insulin, growth hormone and insulin-like growth factor I. *Eur J Endocrinol* 1996; 135(6):631-642.
- [51] **Guyda HJ**. How do we best measure growth hormone action? *Horm Res* 1997; 48 Suppl 5:1-10.
- [52] **Angelin B**, Rudling M. Growth hormone and hepatic lipoprotein metabolism. *Curr Opin Lipidol* 1994; 5(3):160-165.
- [53] **Perrini S**, Laviola L, Carreira MC, Cignarelli A, Natalicchio A, Giorgino F. The GH/IGF1 axis and signaling pathways in the muscle and bone: mechanisms

underlying age-related skeletal muscle wasting and osteoporosis. *J Endocrinol* 2010; 205(3):201-210.

[54] **Procter AM**, Phillips JA 3rd, Cooper DN. The molecular genetics of growth hormone deficiency. *Hum Genet* 1998; 103(3):255-272.

[55] **Herber SM**, Milner RD. Growth hormone deficiency presenting under age 2 years. *Arch Dis Child* 1984; 59(6):557-560.

[56] **Wit JM**, van Unen H. Growth of infants with neonatal growth hormone deficiency. *Arch Dis Child* 1992; 67(7):920-924.

[57] **Lovinger RD**, Kaplan SL, Grumbach MM. Congenital hypopituitarism associated with neonatal hypoglycemia and microphallus: four cases secondary to hypothalamic hormone deficiencies. *J Pediatr* 1975; 87(6 Pt 2):1171-1181.

[58] **Salisbury DM**, Leonard JV, Dezateux CA, Savage MO. Micropenis: an important early sign of congenital hypopituitarism. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1984; 288(6417):621-622.

[59] **Pena-Almazan S**, Buchlis J, Miller S, Shine B, MacGillivray M. Linear growth characteristics of congenitally GH-deficient infants from birth to one year of age. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86(12):5691-5694.

[60] **Walczak M**, Romer TE, Korman E, Małeczka-Tendera E, Lewiński A, Rymkiewicz-Kluczyńska B, Szewczyk L, Urban M, Roszkowska-Blaim M, Niedziela M, Noczyńska A, Starzyk J, Szalecki M, Dorant B, Ginalska-Malinowska M, Hilczer M, Kalina-Faska B, Komar-Szymborska M, Niżankowska-Błaż T, Pilecki O, Wójcik-Musiałek K, Ziara K, Szilagy-Pągowska I. Zasady postępowania w przypadku niskorosłości uwarunkowanej somatotropinową niedoczynnością przysadki. *Klinika Pediatr* 2005:13, 212-221.

[61] **Hilczer M**, Lewiński A. Wskazania do leczenia hormonem wzrostu u dzieci i dorosłych. *Prz Pediat* 2004; 34,170-175.

[62] **Richmond EJ**, Rogol AD. Growth hormone deficiency in children. *Pituitary* 2008:11, 115-120.

[63] **Zadik Z**, Chalew S, Kowarski A. Assessment of growth hormone secretion in normal stature children using 24-hour integrated concentration of GH and pharmacological stimulation. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 71(4):932-936.

[64] **Romer TE**. Test generacji IGF1 w rozpoznawaniu zespołu całkowitej niewrażliwości na hormon wzrostu. *Endokrynol Pediatr* 2009:8, supl.2(9),46-51.

- [65] **Mason AS**. Therapeutic use of human growth hormone. *J Clin Pathol Suppl* 1976;7:58-61.
- [66] **Ogilvy-Stuart AL**, Ryder WD, Gattamaneni HR, Clayton PE, Shalet SM. Growth hormone and tumor recurrence. *BMJ* 1992; 304(6842):1601-1605.
- [67] **Blethen SL**. Leukemia in children treated with growth hormone. *Trends Endocrinol Metab* 1998; 9(9):367-370.
- [68] **Sklar CA**, Mertens AC, Mitby P, Occhiogrosso G, Qin J, Heller G, Yasui Y, Robison LL. Risk of disease recurrence and second neoplasms in survivors of childhood cancer treated with growth hormone: a report from the Childhood Cancer Survivor Study. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87(7):3136-3141.
- [69] **Clayton PE**, Cowell CT. Safety issues in children and adolescents during growth hormone therapy-a review. *Growth Horm IGF Res* 2000; 10(6):306-317.
- [70] **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. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85(11):3990-3993.
- [71] **Mauras N**, Attie KM, Reiter EO, Saenger P, Baptista J. 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(10):3653-3660.
- [72] **Cole TJ**, Hindmarsh PC, Dunger DB. Growth hormone (GH) provocation tests and the response to GH treatment in GH deficiency. *Arch Dis Child* 2004; 89(11):1024-1027.
- [73] **Krström B**, Dahlgren J, Niklasson A, Nierop AF, Albertsson-Wikland K. The first-year growth response to growth hormone treatment predicts the long-term prepubertal growth response in children. *BMC Med Inform Decis Mak* 2009; 9:1.
- [74] **Romer TE**. Zaburzenia wzrastania o etiologii hormonalnej, w Zaburzenia hormonalne u dzieci i młodzieży pod red. Romer T.E. Omnitech Press, Warszawa 1993; 5:85-96.
- [75] **Boersma B**, Rikken B, Wit JM. Catch-up growth in early treated patients with growth hormone deficiency. Dutch Growth Hormone Working Group. *Arch Dis Child* 1995; 72(5):427-431.

- [76] **Terapeutyczne programy zdrowotne.** Leczenie niskorosłych dzieci z somatotropinową niedoczynnością przysadki (SNP). Załącznik nr 20 do zarządzenia Nr 8/2010/DGL Prezesa NFZ z dnia 20.01.2010 r.
- [77] **Sadikovic B**, Wang J, El-Hattab A, Landsverk M, Douglas G, Brundage EK, Craigen WJ, Schmitt ES, Wong LJ. Sequence homology at the breakpoint and clinical phenotype of mitochondrial DNA deletion syndromes. *PLoS One* 2010; 20;5(12):e15687.
- [78] **Chinnery PF.** Mitochondrial Disorders Overview. In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, Stephens K. University of Washington, Seattle; 1993; updated 2010.
- [79] **Anderson S**, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MHL, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJH, Staden R, Young IG. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 1981; 290:457-465.
- [80] **DiMauro S**, Schon EA. Mitochondrial respiratory-chain diseases. *N Engl J Med* 2003; 26;348(26):2656-2668.
- [81] **Maceluch JA**, Niedziela M. The clinical diagnosis and molecular genetics of Kearns-Sayre syndrome: a complex mitochondrial encephalomyopathy. *Pediatr Endocrinol Rev* 2006 Dec-2007 Jan;4(2):117-137.
- [82] **Sarnat HB**, Marín-García J. Pathology of mitochondrial encephalomyopathies. *Can J Neurol Sci* 2005; 32(2):152-166.
- [83] **López-Gallardo E**, López-Pérez MJ, Montoya J, Ruiz-Pesini E. CPEO and KSS differ in the percentage and location of the mtDNA deletion. *Mitochondrion* 2009; 9(5):314-317.
- [84] **Chinnery PF**, Schon EA. Mitochondria. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2003; 74(9):1188-1199.
- [85] **Wallace DC.** Mitochondrial DNA variation in human evolution, degenerative disease, and aging. *Am J Hum Genet* 1995; 57:201-223.
- [86] **Bresolin N**, Moggio M, Bet L, Gallanti A, Prella A, Nobile-Orazio E, Adobbati L, Ferrante C, Pellegrini G, Scarlato G. Progressive cytochrome c oxidase deficiency in a case of Kearns-Sayre syndrome: morphological, immunological, and biochemical studies in muscle biopsies and autopsy tissues. *Ann Neurol* 1987; 21:564-572.
- [87] **Finsterer J.** Overview on visceral manifestations of mitochondrial disorders. *Neth J Med* 2006; 64(3):61-71.

- [88] **Park SB**, Ma KT, Kook KH, Lee SY. Kearns-Sayre syndrome -3 case reports and review of clinical feature. *Yonsei Med J* 2004 Aug; 45(4):727-735.
- [89] **Matthews PM**, Ford B, Dandurand RJ, Eidelman DH, O'Connor D, Sherwin A, Karpati G, Andermann F, Arnold DL. Coenzyme Q10 with multiple vitamins is generally ineffective in treatment of mitochondrial disease. *Neurology* 1993; 43:884-890.
- [90] **Choi C**, Sunwoo IN, Kim HS, Kim DI. Transient improvement of pyruvate metabolism after coenzyme Q therapy in Kearns-Sayre syndrome: MRS study. *Yonsei Med J* 2000; 41(5):676-679.
- [91] **DiMauro S**, Bonilla E, Zeviani M, Nakagawa M, DeVivo DC. Mitochondrial myopathies. *Ann Neurol* 1985; 17(6):521-538.
- [92] **Newman NJ**. Hereditary optic neuropathies: from the mitochondria to the optic nerve. *Am J Ophthalmol* 2005; 140(3):517-523.
- [93] **Al-Enezi M**, Al-Saleh H, Nasser M. Mitochondrial disorders with significant ophthalmic manifestations. *Middle East Afr J Ophthalmol* 2008; 15(2):81-86.
- [94] **Finsterer J**. Mitochondriopathies. *Eur J Neurol* 2004; 11(3):163-186.
- [95] **Madsen PL**, Linde R, Hasselbalch SG, Paulson OB, Lassen NA. Activation-induced resetting of cerebral oxygen and glucose uptake in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 1998; 18:742-748.
- [96] **Valanne L**, Ketonen L, Majander A, Suomalainen A, Pihko H. Neuroradiologic findings in children with mitochondrial disorders. *Am J Neuroradiol* 1998; 19:369-377.
- [97] **Spector R**, Johanson CE. Choroid plexus failure in the Kearns-Sayre syndrome. *Cerebrospinal Fluid Res* 2010; 23;7:14.
- [98] **Mehndiratta MM**, Agarwal P, Tatke M, Krishnamurthy M. Neurological mitochondrial cytopathies. *Neurol India* 2002; 50(2):162-167.
- [99] **Kornblum C**, Broicher R, Walther E, Herberhold S, Klockgether T, Herberhold C, Schroder R. Sensorineural hearing loss in patients with chronic progressive ophthalmoplegia or Kearns-Sayre syndrome. *J Neurol* 2005; 252:1101-1107.
- [100] **Lerman-Sagie T**, Leshinsky-Silver E, Watemberg N, Luckman Y, Lev D. White matter involvement in mitochondrial diseases. *Mol Genet Metab* 2005; 84(2):127-136.
- [101] **Chu BC**, Terae S, Takahashi C, Kikuchi Y, Miyasaka K, Abe S, Minowa K, Sawamura T. MRI of the brain in the Kearns-Sayre syndrome: report of four cases and a review. *Neuroradiology* 1999; 41(10):759-764.

- [102] **Barragan-Campos HM**, Vallee JN, Lo D, Barrera-Ramirez CF, Argote-Greene M, Sanchez-Guerrero J, Estanol B, Guillevin R, Chiras J. Brain magnetic resonance imaging findings in patients with mitochondrial cytopathies. *Arch Neurol* 2005; 62(5):737-742.
- [103] **Young TJ**, Shah AK, Lee MH, Hayes DL. Kearns-Sayre syndrome: a case report and review of cardiovascular complications. *Pacing Clin Electrophysiol*. 2005; 28(5):454-457.
- [104] **Gobu P**, Karthikeyan B, Prasath A, Santhosh S, Balachander J. Kearns Sayre Syndrome (KSS) - A Rare Cause For Cardiac Pacing. *Indian Pacing Electrophysiol J* 2011; 10(12):547-550.
- [105] **Ergül Y**, Nisli K, Saygili A, Dindar A. Kearns-Sayre syndrome presenting as somatomedin C deficiency and complete heart block. *Turk Kardiyol Dern Ars* 2010; 38(8):568-571.
- [106] **Kakura H**, Tachibana Y, Nakamura K, Tanaka Y, Sanada J, Arima T. Mitochondrial encephalomyopathy (Kearns-Sayre syndrome) with complete atrioventricular block: a case report. *Jpn Circ J* 1998; 62(8):623-625.
- [107] **Polak PE**, Zijlstra F, Roelandt JR. Indications for pacemaker implantation in the Kearns-Sayre syndrome. *Eur Heart J*. 1989; 10(3):281-282.
- [108] **Katsanos KH**, Nastos D, Noussias V, Christodoulou D, Kappas A, Tsianos EV. Manometric study in Kearns-Sayre syndrome. *Dis Esophagus*. 2001; 14(1):63-66.
- [109] **Challa S**, Kanikannan MA, Murthy JM, Bhoompally VR, Surath M. Diagnosis of mitochondrial diseases: clinical and histological study of sixty patients with ragged red fibers. *Neurol India* 2004; 52(3):353-358.
- [110] **Poulton J**, O'Rahilly S, Morten KJ, Clarck A. Mitochondrial DNA, diabetes and pancreatic pathology in Kearns-Sayre syndrom. *Diabetologia* 1995; 38:868-871
- [111] **Boles RG**, Roe T, Senadheera D, Mahnovski V, Wong LJ. Mitochondrial DNA deletion with Kearns Sayre syndrome in a child with Addison disease. *Eur J Pediatr* 1998; 157(8):643-647.
- [112] **Nicolino M**, Ferlin T, Forest M, Godinot C, Carrier H, David M, Chatelain P, Mousson B. Identification of a large-scale mitochondrial deoxyribonucleic acid deletion in endocrinopathies and deafness: report of two unrelated cases with diabetes mellitus and adrenal insufficiency, respectively. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82:3063-3067.

- [113] **Mohri I**, Taniike M, Fujimura H, Matsuoka T, Inui K, Nagai T, Okada S. A case of Kearns-Sayre syndrome showing a constant proportion of deleted mitochondrial DNA in blood cells during 6 years of follow-up. *J Neurol Sci* 1998; 11;158(1):106-109.
- [114] **Wilichowski E**, Grütters A, Kruse K, Rating D, Beetz R, Korenke GC, Ernst BP, Christen HJ, Hanefeld F. Hypoparathyroidism and deafness associated with pleioplasmic large scale rearrangements of the mitochondrial DNA: a clinical and molecular genetic study of four children with Kearns-Sayre syndrome. *Pediatr Res* 1997; 41(2):193-200.
- [115] **Artuch R**, Pavía C, Playán A, Vilaseca MA, Colomer J, Valls C, Rissech M, González MA, Pou A, Briones P, Montoya J, Pineda M. Multiple endocrine involvement in two pediatric patients with Kearns-Sayre syndrome. *Horm Res* 1998; 50(2):99-104.
- [116] **Papadimitriou A**, Hadjigeorgiou GM, Divari R, Papagalanis N, Comi G, Bresolin N. The influence of Coenzyme Q10 on total serum calcium concentration in two patients with Kearns-Sayre Syndrome and hypoparathyroidism. *Neuromuscul Disord* 1996; 6(1):49-53.
- [117] **De Block CE**, De Leeuw IH, Maassen JA, Ballaux D, Martin JJ. A novel 7301-bp deletion in mitochondrial DNA in a patient with Kearns-Sayre syndrome, diabetes mellitus, and primary amenorrhoea. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2004; 112(2):80-83.
- [118] **Harvey JN**, Barnett D. Endocrine dysfunction in Kearns-Sayre syndrome. *Clin Endocrinol* 1992; 37:97-103.
- [119] **Barberi S**, Bozzola E, Berardinelli A, Meazza C, Bozzola M. Long-term growth hormone therapy in mitochondrial cytopathy. *Horm Res* 2004; 62(2):103-106.
- [120] **Tanner JM**, Goldstein H, Whitehouse RH. Standards for children's height at ages 2-9 years allowing for heights of parents. *Arch Dis Child* 1970;45(244):755-62.
- [121] **Prader A**, Largo RH, Molinari L, Issler C. Physical growth of Swiss children from birth to 20 years of age. First Zurich longitudinal study of growth and development. *Helv Paediatr Acta Suppl*. 1989; 52:1-125.
- [122] **Bayley N**, Pinneau SR. Tables for predicting adult height from skeletal age: revised for use with the Greulich-Pyle hand standards. *J Pediatr* 1952;40(4):423-441.
- [123] **Brandon MC**, Lott MT, Nguyen KC, Spolim S, Navathe SB, Baldi P, Wallace DC. MITOMAP: a human mitochondrial genome database – 2004 update. *Nucleic Acids Res* 2005; 33 (Database Issue):D611-613, URL: <http://www.mitomap.org>.

- [124] **Boulton TJ**, Dunn SM, Quigley CA, Taylor JJ, Thompson L. Perceptions of self and short stature: effects of two years of growth hormone treatment. *Acta Paediatr Scand Suppl* 1991; 377:20-27.
- [125] **Zlotkin D**, Varma SK. Psychosocial effects of short stature. *Indian J Pediatr* 2006; 73(1):79-80.
- [126] **Sandberg DE**, Brook AE, Campos SP. Short stature: a psychosocial burden requiring growth hormone therapy? *Pediatrics* 1994; 94(6 Pt 1):832-840.
- [127] **De Sanctis V**, Calzolari F, Piazzzi A, Berio A.: Kearns-Sayre syndrome associated with growth hormone deficiency. *Pediatr Med Chir* 2003 Nov-Dec; 25(6):447-451.
- [128] **Karavanaki K**, Kontaxaki C, Maniati-Christidi M, Petrou V, Dacou-Voutetakis C. Growth response, pubertal growth and final height in Greek children with growth hormone (GH) deficiency on long-term GH therapy and factors affecting outcome. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2001; 14(4):397-405.
- [129] **Shao YY**, Wang L, Ballock RT. Thyroid hormone and the growth plate. *Rev Endocr Metab Disord* 2006; 7(4):265-271.
- [130] **Laron Z**. Interactions between the thyroid hormones and the hormones of the growth hormone axis. *Pediatr Endocrinol Rev* 2003; 1 Suppl 2:244-249-discussion 250.
- [131] **Gacs G**, Banos C. The effect of growth hormone on the plasma levels of T4, free-T4, T3, reverse T3 and TBG in hypopituitary patients. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1981; 96:475-479.
- [132] **Jorgensen JO**, Moller J, Skakkebaek NE, Weeke J, Christiansen JS. Thyroid function during growth hormone therapy. *Horm Res* 1992; 38(Suppl 1):63-67.
- [133] **Wyatt DT**, Gesundheit N, Sherman B. Changes in thyroid hormone levels during growth hormone therapy in initially euthyroid patients: lack of need for thyroxine supplementation. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83:3493-3497.
- [134] **Smyczynska J**, Hilczer M, Stawerska R, Lewinski A. Thyroid function in children with growth hormone (GH) deficiency during the initial phase of GH replacement therapy - clinical implications. *Thyroid Res* 2010; 22;3(1):2.
- [135] **Bakker B**, Frane J, Anhalt H, Lippe B, Rosenfeld RG. Height velocity targets from the national cooperative growth study for first-year growth hormone responses in short children. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93(2):352-357.

- [136] **Żak T**, Basiak A, Zubkiewicz-Kucharska A, Noczyńska A. Ocena szybkości wzrastania i gospodarki wapniowo-fosforanowej, gęstości mineralnej kości oraz zmiany składu ciała u dzieci z somatotropinową niedoczynnością przysadki w pierwszym roku leczenia rekombinowanym ludzkim hormonem wzrostu (rhGH). *Endokrynologia, diabetologia i choroby przemiany materii wieku rozwojowego* 2010; 16(1):39-43.
- [137] **Quigley CA**, Gill AM, Crowe BJ, Robling K, Chipman JJ, Rose SR, Ross JL, Cassorla FG, Wolka AM, Wit JM, Rekers-Mombarg LT, Cutler GB Jr. Safety of growth hormone treatment in pediatric patients with idiopathic short stature. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90(9):5188-5196.
- [138] **Finsterer J**. Mitochondriopathies. *Eur J Neurol* 2004; 11(3):163-186.
- [139] **Wolny S**, McFarland R, Chinnery P, Cheetham T. Abnormal growth in mitochondrial disease. *Acta Paediatr* 2009; 98(3): 553-554.
- [140] **Maceluch J**, Obara-Moszyńska M, Rabska-Pietrzak B, Dudek A, Niedziela M. Studies for mitochondrial cytopathy (Kearns-Sayre syndrome) in children with growth hormone deficiency. *Horm. Res.* 2007 Vol. 68 suppl. 1 s. 32. 46th Annual Meeting of the European Society for Paediatric Endocrinology (ESPE). Helsinki, Finland, June 27-30, 2007.
- [141] **Maceluch J**, Zgorzalewicz M, Kulinska-Niedziela I, Kostera-Pruszczyk A, Nadaj A, Rabska-Pietrzak B, Steinborn B, Niedziela M. Kearns-Sayre Syndrome: clinical and molecular diagnosis in a girl with GH deficiency and hypogonadotropic hypogonadism. *Horm. Res.* 2005 Vol. 64 suppl. 1 s. 177-178. ESPE/LWPES 7th Joint Meeting Paediatric Endocrinology in collaboration with APEG, APPES, JSPE and SLEP. Lyon, France, September 21-24, 2005.
- [142] **Obara-Moszyńska M**, Maceluch J, Niedziela M. The patient with Kearns-Sayre syndrome treated with recombinant growth hormone. *Horm Res* 2011;76(suppl 2), 200. 50th ESPE Meeting. Glasgow, UK, September 25-28, 2011.
- [143] **Wabbels B**, Ali N, Kunz WS, Roggenkamper P, Kornblum C. Chronic progressive external ophthalmoplegia and Kearns-Sayre syndrome: interdisciplinary diagnosis and therapy. *Ophthalmologie* 2008; 105(6):550-556.
- [144] **Yerdelen D**, Koc F, Koc Z. Delayed diagnosis of Kearns-Sayre syndrome in a 38-year-old male patient: a case report. *Int J Neurosci* 2008; 118(2):267-275.
- [145] **Rajakannan V**, Gayathri D, Prasad W, Ramakrishnan R, Prajna NV. Kearns Sayre syndrome: an atypical presentation. *Indian J Ophthalmol* 2000; 48(1):54-55.

- [146] **Emma F**, Pizzini C, Tessa A, Di Giandomenico S, Onetti-Muda A, Santorelli FM, Bertini E, Rizzoni G. "Bartter-like" phenotype in Kearns-Sayre syndrome. *Pediatr Nephrol* 2006; 21(3):355-360.
- [147] **Laloi-Michelin M**, Virally M, Jardel C, Meas T, Ingster-Moati I, Lombès A, Massin P, Chabriat H, Tielmans A, Mikol J, Guillausseau PJ. Kearns Sayre syndrome: an unusual form of mitochondrial diabetes. *Diabetes Metab* 2006; 32(2):182-186.
- [148] **Zwirner P**, Wilichowski E. Progressive sensorineural hearing loss in children with mitochondrial encephalomyopathies. *Laryngoscope* 2001; 111(3):515-521.
- [149] **Katsanos KH**, Pappas CJ, Patsouras D, Michalis LK, Kitsios G, Elisaf M, Tsianos EV. Alarming atrioventricular block and mitral valve prolapse in the Kearns-Sayre syndrome. *Int J Cardiol* 2002; 83(2):179-181.
- [150] **Welzing L**, von Kleist-Retzow JC, Kribs A, Eifinger F, Huenseler C, Sreeram N. Rapid development of life-threatening complete atrioventricular block in Kearns-Sayre syndrome. *Eur J Pediatr* 2009; 168(6):757-759.
- [151] **Shanske S**, Tang Y, Hirano M, Nishigaki Y, Tanji K, Bonilla E, Sue C, Krishna S, Carlo JR, Willner J, Schon EA, DiMauro S. Identical mitochondrial DNA deletion in a woman with ocular myopathy and in her son with Pearson syndrome. *Am J Hum Genet* 2002; 71(3):679-683.
- [152] **Finsterer J**. Hematological manifestations of primary mitochondrial disorders. *Acta Haematol.* 2007; 118(2):88-98.
- [153] **Dianzani I**, Loreni F. Diamond-Blackfan anemia: a ribosomal puzzle. *Haematologica* 2008; 93(11):1601-1604.
- [154] **Chiabrando D**, Tolosano E. Diamond Blackfan Anemia at the Crossroad between Ribosome Biogenesis and Heme Metabolism. *Adv Hematol* 2010; 2010:790632.
- [155] **Angelini M**, Cannata S, Mercaldo V, Gibello L, Santoro C, Dianzani I, Loreni F. Missense mutations associated with Diamond-Blackfan anemia affect the assembly of ribosomal protein S19 into the ribosome. *Hum Mol Genet* 2007; 15;16(14):1720-1727.
- [156] **Rötig A**, Cormier V, Blanche S, Bonnefont JP, Ledest F, Romero N, Schmitz J, Rustin P, Fischer A, Saudubray JM, et al. Pearson's marrow-pancreas syndrome. A multisystem mitochondrial disorder in infancy. *J Clin Invest* 1990; 86(5):1601-1608.

- [157] **Sieff CA**, Yang J, Merida-Long LB, Lodish HF. Pathogenesis of the erythroid failure in Diamond Blackfan anaemia. *Br J Haematol* 2010; 148(4):611-622.
- [158] **Reiner JE**, Kishore RB, Levin BC, Albanetti T, Boire N, Knipe A, Helmersson K, Deckman KH. Detection of heteroplasmic mitochondrial DNA in single mitochondria. *PLoS One* 2010; 16;5(12):e14359.
- [159] **Aure K**, Ogier de Baulny H, Laforet P, Jardel C, Eymard B, Lombes A. Chronic progressive ophthalmoplegia with large-scale mtDNA rearrangement: can we predict progression? *Brain* 2007; 130(Pt 6):1516-1524.
- [160] **DiMauro S**, Hirano M. Mitochondrial DNA Deletion Syndromes. In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, Stephens K. University of Washington, Seattle, 1993.
- [161] **Pfeffer G**, Sirrs S, Wade NK, Mezei MM. Multisystem disorder in late-onset chronic progressive external ophthalmoplegia. *Can J Neurol Sci* 2011; 38(1):119-123.
- [162] **Corrado A**, Cantatore FP, Serlenga L, Amati A, Petruzzella V, Lapadula G. Mitochondrial disease mimicking polymyositis: a case report. *Clin Rheumatol* 2002; 21(5):411-414.