



Magdalena Banaszak-Ziemska

Analiza genu *PAPP-A2* w niskorosłości idiopatycznej

Rozprawa na stopień naukowy doktora nauk medycznych
w dyscyplinie medycyna

Promotor: prof. dr hab. n. med. Marek Niedziela

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

Poznań, 2021

Projekt badawczy był finansowany w ramach Grantu Młodych Naukowców
nr 502-14-11041180-41226 Wydziału Lekarskiego I Uniwersytetu Medycznego
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu oraz ze środków statutowych Kliniki
Endokrynologii i Reumatologii Dziecięcej Uniwersytetu Medycznego
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu nr 502-01-01104118-06037.

Chciałabym bardzo podziękować mojemu promotorowi i mentorowi Panu Profesorowi Markowi Niedzieli za możliwość prowadzenia badań, zaangażowanie, wsparcie oraz ogromne pokłady cierpliwości w trakcie prowadzenia badań i przygotowywania tej rozprawy.

Rozprawę doktorską chciałabym zadedykować mojej Rodzinie. Bez oddania i wsparcia mojego Męża nie byłabym w miejscu, w którym dzisiaj jestem. Dziękuję.

Spis treści

1. Wstęp.....	10
1.1. Fizjologia procesu wzrastania.....	10
1.2. Oś podwzgórze-przysadka-somatomedyny.....	11
1.3. Hormon wzrostu - budowa oraz działanie.....	14
1.4. Niskorosłość - definicja i przyczyny.....	15
1.5. PAPP-A oraz PAPP-A2.....	21
1.6. Gen <i>PAPP-A2</i>	24
2. Założenia pracy badawczej.....	27
3. Materiał i metody (pacjenci i metody).....	28
3.1. Grupa badana.....	28
3.2. Grupa kontrolna.....	29
3.3. Analiza auksologiczna.....	29
3.4. Rutynowa analiza parametrów osi GH-IGF-1	31
3.5. Analiza radiologiczna.....	32
3.6. Analiza kliniczna.....	32
3.7. Oznaczenie wolnego IGF-1, IGFBP-5 oraz ALS.....	32
3.7.1. Oznaczenie wolnego IGF-1 zestawem firmy Ansh Labs.....	33
3.7.2. Oznaczenie IGFBP-5.....	34
3.7.3. Oznaczenie ALS.....	35
3.8. Badanie molekularne.....	36
3.9. Analiza statystyczna.....	38
4. Wyniki.....	39
4.1. Analiza auksologiczna.....	39

4.2. Grupa kontrolna.....	47
4.3. Parametry biochemiczne.....	47
4.4. Analiza genetyczna.....	63
5. Dyskusja.....	64
6. Wnioski.....	83
7. Streszczenie w języku polskim.....	84
8. Summary.....	86
9. Piśmiennictwo.....	88
10. Załączniki.....	99
10.1. Zgoda Komisji Bioetycznej.....	99
11. Spis tabel.....	100
12. Spis rycin.....	101

Wykaz skrótów:

aCGH	porównawcza hybrydyzacja genomowa do mikromacierzy (ang. array comparative genomic hybridization)
ALS	kwasolabilna podjednostka (ang. acid-labile subunit)
BMI	wskaźnik masy ciała (ang. body mass index)
CDGP	konstytucjonalnie opóźnione wzrastanie i dojrzewanie (ang. constitutional delay of growth and puberty)
corrHSDS	skorygowany wskaźnik odchylenia standardowego wzrostu (ang. corrected height standard deviation score)
corrFH SDS	skorygowany wskaźnik odchylenia standardowego wzrostu ostatecznego (ang. corrected final height standard deviation score)
corrTH	skorygowana prognoza rodzicielska (ang. corrected target height)
CV	współczynnik zmienności (ang. coefficient of variation)
CNVs	polimorfizm liczby kopii (ang. copy number variations)
EGF	naskórkowy czynnik wzrostu (ang. epidermal growth factor)
ELISA	test immunoenzymatyczny (ang. enzyme-linked immunosorbent assay):
ER	receptor dla estrogenów (ang. estrogen receptor)
ESPE	Europejskie Towarzystwo Endokrynologii Dziecięcej (ang. European Society for Paediatric Endocrinology)
FH	wzrost ostateczny (ang. final height)
FH SDS	wskaźnik odchylenia standardowego dla wzrostu ostatecznego (ang. final height standard deviation score)
FSH	hormon folikulotropowy (ang. follicle-stimulating hormone)
FSS	rodzinny niski wzrost (ang. familial short stature)
fIGF-1	wolny IGF1 (ang. free IGF-1)
GH	hormon wzrostu (ang. growth hormone)

GHBP	białko wiążące hormon wzrostu (ang. growth hormone binding protein)
GHR	receptor dla hormonu wzrostu (ang. growth hormone receptor)
GHRH	hormon uwalniający hormon wzrostu (ang. growth hormone releasing hormone)
GHRP	peptyd uwalniający hormon wzrostu, grelina (ang. growth hormone releasing peptide)
GRB-2	białko wiążące receptor czynnika wzrostu 2 (ang. growth factor receptor-bound protein-2)
GWAS	badanie asocjacyjne całego genomu (ang. genome-wide association studies)
HDL	lipoproteina o wysokiej gęstości (ang. high density lipoprotein)
HRP	peroksydaza chrzanowa (ang. horseradish peroxidase)
HSDS	wskaźnik odchylenia standardowego wzrostu (ang. height standard deviation score)
IGF-1	insulinopodobny czynnik wzrostu 1 (ang. insulin-like growth factor-1)
IGF-2	insulinopodobny czynnik wzrostu 2 (ang. insulin-like growth factor-2)
IGF-1R	receptor dla IGF-1 (ang. IGF-1 receptor)
IGFBPs	białka wiążące insulinopodobne czynniki wzrostu (ang. insulin-like growth factor-binding proteins)
IGFBP-3	trzecie białko wiążące insulinopodobne czynniki wzrostu (ang. insulin-like growth factor-binding protein-3)
IGFBP-4	czwarte białko wiążące insulinopodobne czynniki wzrostu (ang. insulin-like growth factor-binding protein-4)
IGFBP-5	piąte białko wiążące insulinopodobne czynniki wzrostu (ang. insulin-like growth factor-binding protein-5)
ISS	idiopatyczny niski wzrost (ang. idiopathic short stature)
JAK-2	kinaza tyrozynowa Janus 2 (ang. Janus kinase 2)

JIA	młodzieńcze idiopatyczne zapalenie stawów (ang. juvenile idiopathic arthritis)
LOF	mutacja z utratą funkcji (ang. loss-of-function)
NF	nerwiakowłóknikowatość (ang. neurofibromatosis)
NGS	sekwencjonowanie następnej generacji (ang. next-generation sequencing)
non-FSS	nie-rodzinny niski wzrost (ang. non-familial short stature)
NREM	faza snu z wolnymi ruchami gałek ocznych (ang. non-rapid-eye movement)
OUN	ośrodkowy układ nerwowy
PAH	prognozowany wzrost ostateczny (ang. predicted adult height)
PAPP-A	ciążowe białko osoczowe A (ang. pregnancy-associated plasma protein-A)
PAPP-A2	ciążowe białko osoczowe A2 (ang. pregnancy-associated plasma protein-A2)
RAF	kinaza serynowo-treoninowa RAF (ang. murine sarcoma viral oncogene)
RAS	kinaza serynowo-treoninowa RAS (ang. rat sarcoma viral oncogene)
rhIGF-1	ludzki rekombinowany IGF-1 (ang. recombinant human insulin-like growth factor-1)
rhGH	ludzki rekombinowany hormon wzrostu (ang. recombinant human growth hormone)
SADDAN	ciężka achondroplazja z opóźnieniem rozwoju i rogowaceniem ciemnym (ang. severe achondroplasia with developmental delay and acanthosis nigricans)
SDS wzrostu	wskaźnik odchylenia standardowego dla wzrostu (ang. growth standard deviation score)
SGA	zbyt mała masa/długość urodzeniowa w stosunku do wieku ciążowego (ang. small for gestational age)

SNPs	polimorfizm pojedynczego nukleotydu (ang. single nucleotide polymorphisms)
SOD	dysplazja przegrodowo-oczna (ang. septo-optic dysplasia)
SOS	białko SOS (ang. son of sevenless)
SRIF/SS	somatostatyna (ang. somatostatin)
STC1	staniokalcyna 1 (ang. stanniocalcin-1)
STC2	staniokalcyna 2 (ang. stanniocalcin-2)
STAT	białko przekazujące sygnał i aktywujące transkrypcję (ang. signal transducer and activator of transcription)
TGF α	transformujący czynnik wzrostu α (ang. transforming growth factor α)
TH	prognoza rodzicielska (ang. target height)
TH SDS	wskaźnik odchylenia standardowego prognozy rodzicielskiej (ang. target height standard deviation score)
T1D	cukrzyca typu 1 (ang. type 1 diabetes)
TSH	hormon tyreotropowy (ang. thyroid-stimulating hormone)
WES	sekwencjonowanie całego egzomu (ang. whole-exome sequencing)
WHO	Światowa Organizacja Zdrowia (ang. World Health Organization)
VEGF	naczyniowo-nabłonkowy czynnik wzrostu (ang. vascular endothelial growth factor)
VLDL	lipoproteina o bardzo niskiej gęstości (ang. very low density lipoprotein)
WK	wiek kostny
WM	wiek metrykalny

1. Wstęp

1.1. Fizjologia procesu wzrastania

Ocena wzrostu, masy ciała, proporcji masy ciała do wzrostu czy obwodu głowy lub klatki piersiowej na siatkach centylowych jest elementarnym narzędziem pracy każdego pediatry, które pozwala analizować dobrostan dziecka w odniesieniu do norm populacyjnych. Choroba dziecka, szczególnie przewlekła, jest naruszeniem owego dobrostanu i może odzwierciedlać się w zmianie tempa wzrastania, a następnie zmianie krzywej wzrastania. Wiele chorób hamuje proces wzrastania przez tak krótki okres czasu, iż może być to niezauważone, jednak powtarzający się proces chorobowy przynosi ewidentne zmiany w krzywej wzrastania. Z kolei prawidłowe, efektywne leczenie choroby przewlekłej, będzie skutkowało poprawą tempa wzrastania.

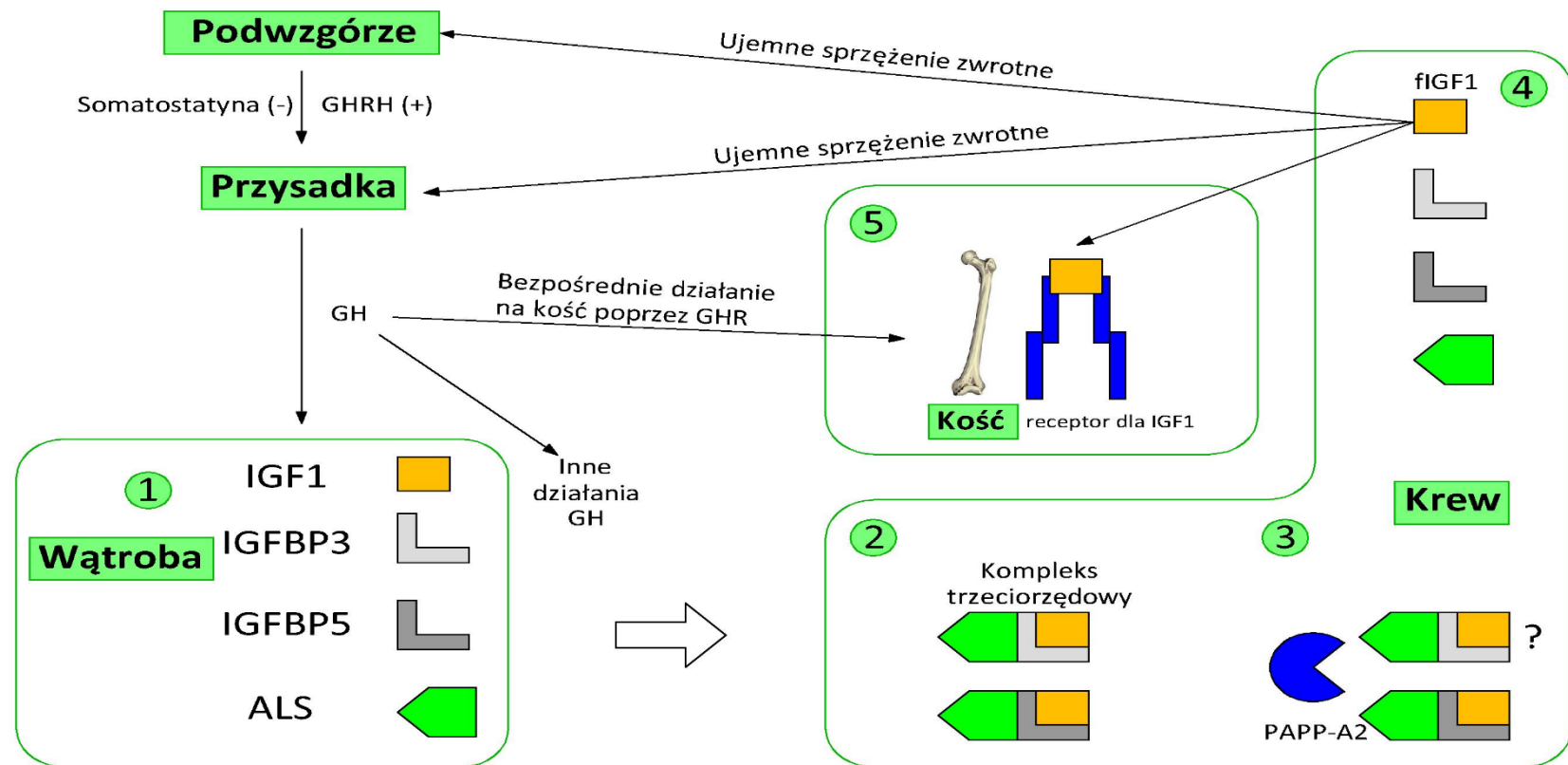
Proces wzrastania, zarówno w okresie prenatalnym jak i postnatalnym, reguluje wiele czynników wewnętrznych, takich jak genetyka, aktywność układu dokrewnego czy istniejące choroby przewlekłe oraz zewnętrznych, w tym środowisko oraz odżywienie. Kluczowe czynniki wpływające na proces wzrastania są zmienne w zależności od wieku dziecka. W okresie niemowlęcym wzrastanie zależy prawie całkowicie od stanu odżywienia dziecka. W okresie dziecięcym, poza odżywieniem, znaczącą rolę zaczynają odgrywać hormony tarczycy oraz hormon wzrostu (GH). W okresie pokwitania prawidłowo funkcjonujące gonady oraz nadnercza produkujące hormony płciowe odpowiedzialne są za pokwitaniowy skok wzrostowy. Wartości prawidłowego tempa wzrastania również ulegają zmianie w zależności od wieku dziecka. Najszybszy proces wzrastania obserwuje się w życiu wewnątrzmacicznym ze średnim przyrostem długości ciała ok. 50 cm w czasie 9 miesięcy. W okresie niemowlęcym tempo wzrastania wynosi do 30 cm/rok w ciągu pierwszych dwóch miesięcy życia a następnie obserwowany jest spadek tempa wzrastania do 10 cm/rok pod koniec 1 r.ż. Od 2-3 r.ż. tempo wzrastania wynosi 7-8 cm/rok, zaś bezpośrednio przed skokiem pokwitaniowym obserwuje się zwolnienie tempa wzrastania, które fizjologicznie wynosi wówczas do 5-6 cm/rok. W trakcie dojrzewania płciowego tempo wzrastania wynosi dla dziewcząt ok 9,5 cm/rok, zaś dla chłopców ok 10,5 cm/rok. Minimalny okres obserwacji na podstawie, którego możemy ocenić tempo wzrastania wynosi u niemowląt 3 miesiące, zaś u dzieci powyżej 1 r.ż. 6 miesięcy.

1.2. Oś podwzgórze-przysadka-somatomedyny

Jednym z kluczowych regulatorów procesu wzrastania jest hormon wzrostu (GH) wydzielany przez płat przedni przysadki. Podwzgórze jest nadrzędnym gruczołem kontrolującym pracę przysadki (**Rycina 1**). W obrębie jądra łukowatego i jądra brzusznoprzyśrodkowego podwzgórza wydzielany jest hormon uwalniający hormon wzrostu (GH-releasing hormone; GHRH), zaś w obrębie jądra przykomorowego wydzielana jest somatostatyna (somatostatin; SRIF/SS), hamująca sekrecję hormonu wzrostu. Równie istotnym hormonem regulującym wydzielanie GH jest peptyd uwalniający hormon wzrostu, czyli grelina (GH-releasing peptide; GHRP), która pełni funkcję wzmacniacza zarówno pobudzającego wydzielanie hormonu wzrostu, GHRH jak i somatostatyny. Wyśilek fizyczny, stres, takie substancje jak arginina, L-dopa, klonidyna czy estrogeny również stymulują sekrecję GH, co z powodzeniem jest wykorzystywane w ocenie wydzielania hormonu wzrostu w trakcie diagnostyki niskorosłości.

GH magazynowany jest w komórkach somatotropowych znajdujących się w obrębie przedniego płata przysadki, głównie w bocznych jej częściach. Wydzielanie hormonu wzrostu zachodzi w sposób pulsacyjny, zarówno w dzień jak i w nocy. Jednak większa część, bo aż do 80%, wydzielana jest w nocy, a szczyt wydzielania GH obserwuje się ok. 1-2 godzin po zaśnięciu, w trakcie fazy snu z wolnymi ruchami gałek ocznych (non-rapid-eye movement; NREM). Uwolniony do krwioobiegu hormon wzrostu działa w dwojaki sposób na proces wzrastania: bezpośrednio w obrębie chrząstki wzrostowej oraz pośrednio poprzez somatomedyny (**Rycina 1**). Główne działanie GH polega na stymulacji sekrecji insulinopodobnych czynników wzrostu, szczególnie w wątrobie, które są głównymi czynnikami kontrolującymi wzrastanie. Wyróżniamy insulinopodobny czynnik wzrostu 1 (insulin-like growth factor-1; IGF-1) oraz insulinopodobny czynnik wzrostu 2 (insulin-like growth factor-2; IGF-2). Somatomedyny mogą być produkowane przez większość komórek ludzkiego ciała, wykazując działanie parakryne oraz autokryne, jednak większość wytwarzana jest w wątrobie. IGF-2 jest głównym czynnikiem wzrostowym we wczesnym okresie prenatalnym, zaś IGF-1 odgrywa ważną rolę w późnym okresie prenatalnym i pozostaje głównym czynnikiem wzrostowym w okresie postnatalnym. Oddziaływanie somatomedyn na proces wzrastania płodu jest w dużym stopniu niezależne od hormonu wzrostu, zaś zależne od wydolności łożyska, stopnia odżywienia oraz insuliny (1). W diagnostyce niskorosłości, jak i dla oceny leczenia rekombinowanym ludzkim

hormonem wzrostu (recombinant human growth hormone; rhGH) wykorzystujemy oznaczenia stężeń IGF-1, oznaczając somatomedyny obecne w surowicy, które jednak nie do końca odzwierciedlają ich aktywność w komórkach docelowych. Wytworzone w wątrobie i uwolnione do krwioobiegu somatomedyny w 95% transportowane są w połączeniu z białkami wiążącymi insulinopodobne czynniki wzrostu (insulin-like growth factor binding proteins; IGFBPs) (2). W tej konfiguracji somatomedyny, będąc związane z białkami wiążącymi insulinopodobne czynniki wzrostu, nie wykazują aktywności, a dopiero jako wolne mogą połączyć się z należnym dla nich receptorem i indukować szlak metaboliczny. Dotąd opisano sześć białek wiążących insulinopodobne czynniki wzrostu odpowiednio opisane od IGFBP-1 do IGFBP-6. IGFBPs to wielofunkcyjne białka transportujące w surowicy somatomedyny, kontrolujące ich biodostępność dla tkanek docelowych oraz kontrolujące możliwość ich związania z odpowiednim receptorem i wywołania odpowiednich reakcji. Kluczową rolę odgrywa trzecie białko wiążące insulinopodobne czynniki wzrostu (insulin-like growth factor binding protein-3; IGFBP-3) oraz mniejszą rolę piąte białko wiążące insulinopodobne czynniki wzrostu (insulin-like growth factor binding protein-5; IGFBP-5). IGF-1 połączony z IGFBP-3 lub IGFBP-5 ma możliwość utworzenia wraz z kwasolabilną podjednostką (acid-labile subunit; ALS) kompleksu trzeciorzędowego. Blisko 90% krążącego IGFBP-3 związane jest w trzeciorzędowym kompleksie, w przypadku IGFBP-5 zaś 55% (3). IGFBP-3 jest głównym białkiem wiążącym insulinopodobne czynniki wzrostu, stanowi aż 60% IGFBPs (4). Właśnie w ten sposób transportowana jest większość IGF-1, aż do 80%, pozostałe 20% transportowane jest w połączeniu z jednym z pozostałych białek wiążących (5-7). Według różnych autorów od 0,95-2,02% IGF-1 krąży w surowicy w postaci wolnej (8-10). Znajdujący się w trzeciorzędowym kompleksie IGF-1 nie wykazuje aktywności, dopiero jego odłączenie to umożliwia. Do odłączenia IGF-1 z kompleksu wymagane jest prawidłowe działanie proteolityczne enzymu PAPP-A2. Opisane zostały potencjalne inhibitory działania proteazy PAPP-A i PAPP-A2, odpowiednio staniokalcyna 1 (stanniocalcin-1; STC1) oraz staniokalcyna 2 (stanniocalcin-2; STC2) (11-12).



Rycina 1. Schemat działania osi podwzgórze-przysadka-hormon wzrostu z uwzględnieniem aktywności pro wzrastowej hormonu wzrostu oraz działaniem proteolizy PAPP-A2. [Modyfikacja ryciny pochodzącej z artykułu: Banaszak-Ziemska M, Niedziela M. PAPP-A2 a new key regulator of growth. Endokrynol Pol. 2017;68(6):682–91. (13)]

1.3. Hormon wzrostu - budowa oraz działanie

Hormon wzrostu jest pojedynczym polipeptydem zbudowanym z 191 aminokwasów, o masie 22,129 kDa, a jego struktura przestrzenna utrzymana jest dzięki obecności dwóch mostków dwusiarczkowych. Gen kodujący GH znajduje się na długim ramieniu 17 chromosomu (17q24.2), zbudowany jest z 5 egzonów oddzielonych czterema intronami. 40-50% hormonu wzrostu transportowane jest w połączeniu z białkiem wiążącym hormon wzrostu (growth hormone binding protein; GHBP). Białko to jest tożsame z częścią zewnętrzną receptora dla hormonu wzrostu (growth hormone receptor; GHR). Receptor dla hormonu wzrostu składa się z trzech domen: zewnątrz błonowej, śródbłonowej oraz cytoplazmatycznej. Domena zewnątrz błonowa odpowiedzialna jest za wiązanie z kompleksem GH-GHBP. Po przyłączeniu liganda dochodzi do przyłączenia drugiej cząsteczki GHR i to właśnie zjawisko dimeryzacji receptora umożliwia przekazanie sygnału do cytoplazmy (14). Transdukcja sygnału zachodzi poprzez aktywację kinazy tyrozynowej Janus 2 (Janus kinase 2; JAK-2), a odpowiedzialny za to pozostaje rejon BOX1, znajdujący się w cytoplazmie tuż pod błoną komórkową (3). Przebiegająca kaskadowo fosforylacja w białkach przekazujących sygnał i aktywujących transkrypcję (signal transducers and activators of transcription; STAT) pozwala im wnikać do jądra komórkowego oraz stać się czynnikami transkrypcyjnymi wiążącymi się z promotorem genu dla IGF-1 (15). Po dimeryzacji receptora dla hormonu wzrostu dochodzi do autofosforylacji jego reszt tyrozynowych. Z ufosforylowaną tyrozyną łączy się białko wiążące receptor czynnika wzrostu 2 (growth factor receptor-bound protein-2; GRB-2) i to połączenie umożliwia z kolei połączenie GRB-2 z białkiem SOS (son of sevenless; SOS), które dalej łączy się z czynnikiem regulującym wzrost komórki za pośrednictwem serynowo-treoninowych kinaz białkowych (rat sarcoma viral oncogene; RAS). Aktywny RAS stymuluje kinazę serynowo-treoninową RAF (murine sarcoma viral oncogene; RAF), która również uruchamia kaskadę fosforylacji (15). Analizując fizjologię czynności osi podwzgórze–przysadka-somatomedyny oraz wieloetapowy proces oddziaływania hormonu wzrostu i somatomedyn na poziomie komórki trzeba zauważyć jak bardzo skomplikowanym procesem jest wzrastanie, na jak wielu etapach może dojść do zaburzenia tego procesu. Oprócz aktywności osi podwzgórze-przysadka-somatomedyny, także inne czynniki mają wpływ na wzrastanie. Najważniejsze z nich to: odżywienie, czynność tarczycy, nadnerczy, gonad, obecność oraz wyrównanie chorób przewlekłych, leki przyjmowane przez pacjenta, ale także dobrostan psychiczny czy

sytuacja socjoekonomiczna. Pomimo tego, iż naprawdę posiadamy szeroką znajomość procesu wzrastania, to nadal jest to ważny temat badań naukowych wynikający także ze społecznych oczekiwań w tym zakresie.

Poza kluczowym działaniem prowzrostowym GH pełni też ważną funkcję metaboliczną, wpływa na gospodarkę lipidową, węglowodanową oraz białkową (**Tabela 1**).

Tabela 1. Funkcje metaboliczne hormonu wzrostu.

<i>Wpływ na gospodarkę lipidową:</i> - nasilenie procesów lipolitycznych w tkance tłuszczowej - hamowanie lipogenezy - zwiększenie stężenia wolnych kwasów tłuszczowych w surowicy - obniżenie stężenia cholesterolu całkowitego oraz lipoprotein o bardzo niskiej gęstości (very low density lipoprotein; VLDL) - zwiększenie stężenia lipoprotein o wysokiej gęstości (high density lipoprotein; HDL)
<i>Wpływ na gospodarkę węglowodanową:</i> - nasilenie procesu glikogenolizy - zwiększenie stężenie glukozy we krwi* - stymulacja glukoneogenezy w wątrobie - zwiększenie insulinooporności tkanek
<i>Wpływ na gospodarkę białkową:</i> - zwiększenie syntezy białek poprzez pobudzenie transkrypcji oraz translacji (bezpośrednie działanie GH) oraz poprzez zwiększenie pobierania aminokwasów (pośrednie działanie GH poprzez IGF-1).

* Przez pierwsze 20 min. hormon wzrostu działa hipoglikemizująco (poprzez IGF-1), a dalej (wtórnie) wykazuje efekt hiperglikemizujący.

1.4. Niskorosłość – definicja i przyczyny

Niskorosłość stwierdzamy wówczas, gdy wzrost lub długość ciała dziecka jest poniżej 3 centyla (<-2 SD) dla płci i wieku metrykalnego i/lub jest mniejsza o co najmniej 1,5 SD od średniego wzrostu rodziców lub jak wg niektórych źródeł więcej niż 2 SD. Najczęstszą przyczyną niskorosłości na świecie pozostaje niedożywienie. W krajach rozwiniętych, których nie dotyczy problem głodu, przyczyny są bardziej zróżnicowane.

Możemy wyróżnić następujące ogólne postaci i przyczyny niskorosłości:

- łagodne warianty niskiego wzrostu:
 - rodzinny niski wzrost (familial short stature; FSS) - do 40% pacjentów; dziecko niskie w porównaniu z populacją, rośnie zgodnie z prognozą rodzicielską;
 - nie-rodzinny niski wzrost (non-familial short stature; non-FSS) - w tym konstytucjonalnie opóźnione wzrastanie i dojrzewanie (constitutional delay of growth and puberty; CDGP) - dziecko niskie w porównaniu do populacji oraz do prognozy rodzicielskiej, do 30% dzieci niskorosłych.
- wrodzone lub nabyte przewlekłe choroby - 10-20%:
 - pierwotny niski wzrost charakteryzujący się wrodzonym nieodwracalnym zmniejszeniem potencjału wzrostowego;
 - wtórny niski wzrost - wrodzone lub nabyte potencjalnie odwracalne zmniejszenie potencjału wzrostowego.
- idiopatyczny niski wzrost (idiopathic short stature; ISS).

Bardziej szczegółowa klasyfikacja niskorosłości została zaproponowana przez European Society for Paediatric Endocrinology (ESPE) – **Tabela 2** (26). O niskorosłości idiopatycznej mówimy wtedy, gdy wzrost dziecka na siatce centylowej znajduje się poniżej 2 SD od średniej wzrostu dla danej płci, wieku oraz populacji dla dzieci z prawidłową masą urodzeniową, oraz gdy nie możemy ustalić jej przyczyny (16) (17).

Ze względu na proporcje ciała dziecka, niskorosłość można również podzielić na: niskorosłość proporcjonalną oraz niskorosłość dysproporcjonalną.

Popularnym narzędziem służącym do szacowania prognozy rodzicielskiej (target height; TH) jest wzór opracowany przez Tannera:

$$TH = (\text{wzrost ojca} + \text{wzrost matki}):2 \pm 6,5 \text{ cm.}$$

W przypadku chłopców dodajemy 6,5 cm, zaś w przypadku dziewcząt odejmujemy 6,5 cm. Według Lou i wsp. wzór ten choć najbardziej popularny, nie do końca przewiduje wzrost pacjentów z niskorosłością idiopatyczną (18). Wzór ten również nie uwzględnia trendu sekularnego, który obserwowany jest w większości krajów europejskich, poza Skandynawią (16, 19). Cohen i wsp. podają, iż właściwsze byłoby obliczanie skorygowanej prognozy rodzicielskiej (corrected target height; corrTH),

wg następującego wzoru:

$$\text{corrTH} = 0,72 \times \text{średni SDS wzrostu rodziców}$$

lub obliczając dolną granicę prognozy rodzicielskiej:

$$\text{corrTH} - 1,6 \text{ SDS (20).}$$

Niskorosłość dotyczy 3% populacji, pozostaje jedną z głównych przyczyn konsultacji endokrynologicznych w poradniach specjalistycznych dla dzieci oraz jedną z głównych przyczyn hospitalizacji w oddziałach endokrynologii dziecięcej. Według Linsday i wsp. nawet 80% dzieci kierowanych do poradni endokrynologicznych i oddziałów endokrynologicznych jako niskorosłe ostatecznie uzyskuje rozpoznanie idiopatycznej niskorosłości (21).

Postępowanie z pacjentem niskorosłym obejmuje dokładne zebranie wywiadu, uwzględniając wywiad okołoporodowy, czas zakończenia ciąży, masę ciała i długość urodzeniową, przebieg ciąży, choroby matki, leki przyjmowane przez matkę. Trzeba także uzyskać informacje, czy w czasie ciąży nie były stosowane używki, jak np. alkohol, nikotyna i inne. Istotne są także informacje o tym, kiedy pojawił się problem niskorosłości i kto ten problem stwierdził. Konieczne jest pozyskanie wszystkich wcześniejszych pomiarów dziecka, aby prawidłowo wykreślić krzywą wzrastania. Na podstawie pomiaru wzrostu rodziców dokonanego przez lekarza (jeśli jest taka możliwość) należy obliczyć prognozę rodzicielską (TH). W wywiadzie należy pamiętać o chorobach przewlekłych, zażywanych lekach, operacjach. Należy zapytać o objawy charakterystyczne dla chorób przewodu pokarmowego, nerek oraz endokrynopatii. W badaniach dodatkowych należy ocenić podstawowe parametry takie jak: morfologia z rozmazem, badanie ogólne moczu, stężenie glukozy, aminotransferaz, przeciwciał p/w transglutaminazie tkankowej w klasie IgA łącznie z oceną całkowitego stężenia immunoglobuliny A, tyreotropiny (TSH) oraz wolnych hormonów tarczycy; parametry gospodarki wapniowo-fosforanowej, IGF-1, IGFBP3 oraz stężenia GH po zaśnięciu oraz w testach stymulacyjnych. W przypadku dziewcząt należy oznaczyć również stężenie gonadotropin. W sytuacji podejrzenia określonej jednostki chorobowej należy wykonać badania potwierdzające lub wykluczające podejrzanę chorobę zgodnie z obowiązującymi wytycznymi. Ponadto należy ocenić wiek kostny na podstawie zdjęcia nadgarstka ręki niedominującej (należy preferować radiogram dystalnej części przedramienia oraz ręki dla pełnej oceny wieku szkieletowego). W przypadku

wystąpienia cech dysmorficznych, jak i u dziewcząt z ISS należy skierować dziecko na konsultację genetyczną. Taka standardowa procedura pozwala zidentyfikować przyczynę niskorosłości wg różnych doniesień od 1 do 40% pacjentów (22-25).

Tabela 2. Przyczyny niskorosłości wg klasyfikacji European Society for Paediatric Endocrinology (ESPE) (26)

Pierwotny niski wzrost	<i>Niedobór hormonu wzrostu</i>
Zdefiniowane zespoły: Zespół Turnera Zespół Aarskog-Scott Zespół Blooma Zespół Kabuki makeup Zespół Rubinstein-Taybi Zespół Williams-Beuren Zespół Cornelia de Lange Zespół DiGeorge’a Zespół Downa Zespół Noonan Zespół Prader-Willi Zespół von Recklinghausena (NF typu 1) Zespół Silver-Russel Inne zdefiniowane zespoły: Zespół 3-M Zespół Seckela Zespół Mulibrey SGA bez efektu „nadganiania” wzrostu Niedobór IGF-1, oporność na IGF-1 Spowodowane uchwytną przyczyną np. leki stosowane w ciąży, infekcje, palenie papierosów, alkohol Idiopatyczne Dysplazje kostne Achondroplazja Hipochondroplazja Inne specyficzne zaburzenia – tanatoforyczna dysplazja, SADDAN Typ II kolagenopatii Dysplazja mezomieliczna	Idiopatyczny Genetyczne (mutacje genu <i>HESX1</i>, <i>PROP1</i>, <i>POU1F1</i>, <i>LHX3</i>, <i>LHX4</i>, <i>GHRHR</i>, <i>GH</i>) Zespół neurosekrecyjny Związane z zespołami z obecnymi malformacjami mózgowymi lub twarzowymi np. dysplazja przegrodowo-oczna (septo-optic dysplasia; SOD), zespół pustego siodła, torbiele pajęczynówki, wrodzone wodogłowie Związane z wewnątrzmacicznymi infekcjami np. różyczka Nabyte np. czaszko gardlak, inne guzy przysadki np. germinoma, hamartoma, inne guzy OUN Przerzuty nowotworów np. białaczki, chłoniaka Urazy mózgozczaszki Infekcje OUN Choroby ziarniniakowate np. histiocytoza Inne zaburzenia osi hormon wzrostu-IGF-1 Nieaktywna cząsteczka hormonu wzrostu (zespół Kowarskiego) Zaburzenia funkcjonowania receptora dla hormonu wzrostu np. zespół Larona Zaburzenia transdukcji sygnału GH np. defekty STAT5B Niedobór ALS Niedobór IGF-1 Oporność na IGF-1 np. defekt IGF1R, defekty postreceptorowe Inne zaburzenia endokrynologiczne Zespół Cushinga Niedoczynność tarczycy Leprechaunizm Zespół Morrisona – niekontrolowana T1D

Dyschondrostenozy (Leri-Weill oraz pozostałe defekty genu <i>SHOX</i>) Langer typ (homozygotyczna dyschondrostenozą) Osteogenesis imperfecta I-VI Hipofosfatazja Krzywice hipofosfatemiczne Mukopolisacharydozy (typ IH, IS, II-VII) Mukolipidozy (typ II oraz III) Dysplazje z defektem mineralizacji	Niski wzrost ostateczny spowodowany przyspieszonym wiekiem kostnym np. przedwczesne dojrzewanie, nadczynność tarczycy, wrodzony przerost nadnerczy, ekspozycja na egzogenne estrogeny/androgeny Zaburzenia metaboliczne Zaburzenia gospodarki wapniowo-fosforanowej Zaburzenia gospodarki węglowodanowej Zaburzenia gospodarki lipidowej Zaburzenia gospodarki białkowej Psychospołeczne Emocjonalna deprywacja Jadłowstręt psychiczny Depresja Jatrogenne Systemowe leczenie glikokortykosteroidami Miejscowa terapia glikokortykosteroidami np. zewnętrznie, inhalacje Inne leki Chemioterapia Radioterapia Inne przyczyny jatrogenne
Wtórny niski wzrost	
Niedożywienie Choroby systemowe Choroby układu krążenia Choroby pulmonologiczne np. mukowiscydoza Choroby wątroby Choroby przewodu pokarmowego np. zapalne choroby jelit, zaburzenia wchłaniania Zespół krótkiego jelita Choroby nerek Przewlekła niedokrwistość Choroby mięśniowe oraz neurologiczne np. dystrofia mięśniowa Duchenne’a Choroby tkanki łącznej – młodzieńcze idiopatyczne zapalenie stawów (JIA)	Idiopatyczna niskorosłość Rodzinna idiopatyczna niskorosłość Nie-rodzinna idiopatyczna niskorosłość

Skróty: NF - neurofibromatosis, nerwiakowłókniakowatość, SGA - small for gestational age, zbyt mała masa/długość urodzeniowa w stosunku do wieku ciążowego, SADDAN - severe achondroplasia with developmental delay and acanthosis nigricans, ciężka achondroplazja z opóźnieniem rozwoju i rogowaceniem ciemnym, JIA - juvenile idiopathic arthritis, młodzieńcze idiopatyczne zapalenie stawów, SOD - septo-optic dysplasia, dysplazja przegrodowo-oczna, OUN - ośrodkowy układ nerwowy, T1D - type 1 diabetes, cukrzyca typu 1.

1.5. PAPP-A oraz PAPP-A2

PAPP-A oraz PAPP-A2 to dwie proteazy, należące do nadrodziny metzincyn oraz klasy Zn^{2+} -zależnych metaloproteaz (27).

Ciążowe białko osoczowe A (PAPP-A) specyficznie rozszczepia czwarte białko wiążące insulinopodobny czynnik wzrostu (IGFBP-4) (28) i uwalnia IGF-1 z trzeciorzędowego kompleksu oraz pozwala IGF-1 połączyć się z odpowiednim receptorem (13). Proces ten wymaga obecności IGF-1 (28). IGF-1 przyłącza się do IGFBP-4 i poprzez strukturalną reorganizację C-końcowej domeny IGFBP-4, umożliwia lub zaburza dostęp PAPP-A do miejsca rozszczepienia (29). Udowodniono, że PAPP-A wydzielane jest przez fibroblasty (30), osteoblasty (17,31), komórki zrębu szpiku (30) oraz komórki mięśni gładkich naczyń (32). Wykazano również obecność PAPP-A w surowicy ciężarnych (33) oraz w płynie pęcherzykowym jajnika (34).

Ciążowe białko osoczowe A2 (PAPP-A2) jest białkiem homologicznym do PAPP-A. Dojrzałe PAPP-A2 wykazuje aż 45% wspólnych elementów budowy z PAPP-A (35). PAPP-A2 rozszczepia IGFBP-5 pomiędzy Ser-143 i Lys-144. Prawdopodobnie rozszczepia również IGFBP-3, dzięki temu możliwe jest uwolnienie IGF-1 z kompleksu wiążącego. Proces ten nie wymaga obecności IGF-1 (35). Proteolityczna aktywność PAPP-A2 została opisana w surowicy ciężarnych szczególnie w trakcie pierwszego trymestru ciąży oraz w okresie okołoporodowym (36-37), nasieniu (38), kulturach komórek mięśni gładkich (39), komórkach ziarnistych (40), komórkach osteosarcoma (41), osteoblastach (41) i fibroblastach (42).

Kjaer-Sorensen i wsp., opierając się na wcześniejszych doniesieniach na temat wykorzystania płodów ryby *Danio pręgowanego*, jako odpowiedniego modelu *in vivo* do analizy funkcji PAPP-A2, wykazali iż białko PAPP-A2 przyczynia się do prawidłowego rozwoju chrząstek czaszki oraz angiogenezy (43). Prowadzone były również badania na myszach pozbawionych genu *PAPP-A2*, w których zaobserwowano zahamowanie wzrostu, poczynając od 3 tygodnia życia, ale nie zaobserwowano istotnej różnicy w masie ciała w okresie płodowym i perinatalnym. Odnotowano dysproporcjonalne zmniejszenie wymiarów kości takich jak: kości czaszki, żuchwy, kości ramiennej, kości udowej, kości piszczelowej, kości obręczy miednicy i kości ogonowej u myszy pozbawionych genu *PAPP-A2*. Zmniejszenie wymiaru ww. kości było bardziej znaczne niż wskazywałoby na to zmniejszenie masy ciała i długości ciała osobników (44-45). U myszy pozbawionych

genu *PAPP-A2* żuchwy są płytsze, zaś kształt kości obręczy miedniczej zbliżony jest bardziej do żeńskiego modelu (44). Obserwując myszy pozbawione genu *PAPP-A2* udowodniono, że *PAPP-A2* odgrywa ważną rolę, zależną od płci i wieku, w zakresie regulacji masy kostnej (46). Delecja genu *PAPP-A2* w obrębie osteoblastów nie zmienia stężenia krążącego IGFBP-5, jednak zwiększa miejscowe stężenie IGFBP-5 skutkując zmniejszeniem biodostępności somatomedyn, a mechanizm tego procesu jest złożony (47). Prowadzone są również badania nad powiązaniem białka *PAPP-A2* z rozwojem dysplazji stawu biodrowego. Chen i wsp. sugerują, na podstawie badań u myszy pozbawionych genu *PAPP-A2*, iż zaburzenie funkcji białka *PAPP-A2* pośrednio poprzez wpływ na funkcjonowanie osi GH-IGF-1 może być powiązane z rozwojową dysplazją stawu biodrowego. Jak dotąd nie udało się jednak ustalić związku zaburzeń funkcji białka *PAPP-A2* z rozwojową dysplazją stawu biodrowego i konieczne są dalsze badania (48-49).

PAPP-A2, jako nowy regulator procesu wzrastania, wpływa na funkcjonowanie osi podwzgórze-przysadka-somatomedyny poprzez swoją rolę czynnika zmieniającego biodostępność IGF-1. Pod wpływem tej osi pozostaje również metabolizm węglowodanów i lipidów. Wykazano, że delecja *PAPP-A2* nie ma istotnego wpływu na metabolizm glukozy i lipidów, zarówno u osobników pozostających na diecie standardowej, jak i wysokotłuszczowej. Nie wykazano także wpływu na przyrost masy ciała w trakcie diety wysokotłuszczowej oraz na całkowitą masę tkanki tłuszczowej w trakcie zmiany masy ciała (50). Nieprawidłowo działające białko *PAPP-A2*, poprzez zaburzenie funkcjonowania osi GH-IGF-1, może odgrywać ważną rolę, poza znaczącym wpływem na proces wzrastania, również w innych procesach podlegających regulacji przez insulinopodobne czynniki wzrostu. Udowodniono, iż somatomedyny pełnią kluczową rolę w uwrażliwianiu komórek ziarnistych jajnika na działanie folikulotropiny (FSH) w końcowej fazie wzrostu pęcherzykowego. W czasie wzrostu pęcherzyków w fazie pęcherzykowej cyklu miesięczkowego w płynie pęcherzykowym obserwuje się spadek stężenia IGFBP-2 oraz IGFBP-4, co skutkuje zwiększeniem biodostępności somatomedyn. Dotąd nie odnotowano żadnych istotnych zmian stężenia IGFBP-3 w jajniku w trakcie fazy pęcherzykowej, zaś ekspresja IGFBP-5 różni się w zależności od badanego gatunku, ale obserwowane są różnice w stężeniu w zależności od fazy cyklu (51-55). W przypadku myszy *Pappa2* KO, jajnikowa ekspresja IGFBP-5 wzrasta, pomimo to nie udowodniono wpływu tego zjawiska na płodność osobników płci żeńskiej,

odnotowano zaś wpływ na płodność osobników płci męskiej (56). Wpływ PAPP-A2 na proces folikulogenezy nadal pozostaje niejasny, jednak z uwagi na wpływ proteazy na biodostępność IGF-1 wymaga dalszych badań.

PAPP-A jest dobrze znanym i wykorzystywanym markerem aberracji chromosomalnych płodu. Naukowcy dowiedli zwiększonej ekspresji PAPP-A2 w obrębie łożyska w stanie przedrzucawkowym oraz w zaburzeniach wzrastania płodu (57-59). Wysunięto hipotezę, iż zwiększona ekspresja jest efektem kompensacyjnym niedomogi łożyska. Christians i wsp. nie potwierdzają jednak tej teorii sugerując, iż PAPP-A2 może być markerem dobrostanu łożyska (60).

W 2016 roku Andrew Dauber i wsp. po raz pierwszy opisali dwie, niespokrewnione rodziny z potwierdzoną, dziedziczną w sposób autosomalny recesywny mutacją w genie dla proteazy PAPP-A2 (61). U członków ww. rodzin obserwowano progresywną utratę tempa wzrastania, bez znaczącego skoku pokwitaniowego, wzrost poniżej prognozowanego na podstawie wzrostu rodziców, małowłowie, długie i cienkie kości. Wykazano również łagodnie zmniejszoną gęstość mineralną kości. Opisane wśród pacjentów obu rodzin cechy dysmorficzne były podobne do tych obserwowanych we wcześniejszych doniesieniach u myszy pozbawionych genu *PAPP-A2* (62-63). W badaniach laboratoryjnych oceniających funkcję osi podwzgórze-przysadka-somatomedyny udokumentowano charakterystycznie podwyższone stężenie hormonu wzrostu (w pierwszej rodzinie oceniono stężenie GH po zaśnięciu, w drugiej zaś rodzinie w testach stymulacyjnych) oraz podwyższone stężenie czynników zależnych od działania hormonu wzrostu takich jak: całkowity IGF1, IGFBP3, IGFBP5, ALS i IGF2 oraz zmniejszone stężenie wolnego IGF1 (free IGF-1; fIGF-1) (61). Ocena parametrów funkcjonowania osi podwzgórze-przysadka-somatomedyny a szczególnie zaobserwowana dysproporcja pomiędzy stężeniem całkowitego i wolnego IGF-1 wskazują na kluczowe znaczenie PAPP-A2 dla biodostępności IGF-1. Oceniono również stężenie PAPP-A2 i stwierdzono, że wśród dotkniętych mutacją pacjentów z rodziny pierwszej było nieoznaczalne, a w rodzinie drugiej mieściło się w dolnej granicy normy (61). Z uwagi na charakterystyczny układ parametrów biochemicznych oceniających funkcjonowanie osi GH-IGF-1 wykluczono mutacje w genie dla receptora IGF-1. W przypadku obu rodzin odnotowano prawidłowe stężenie glukozy na czczo, obserwowano łagodną hiperinsulinemię na czczo, a przyczyną tego stanu wydaje się być podwyższone stężenie hormonu wzrostu i jego diabetogenne działanie (61). Wiek kostny

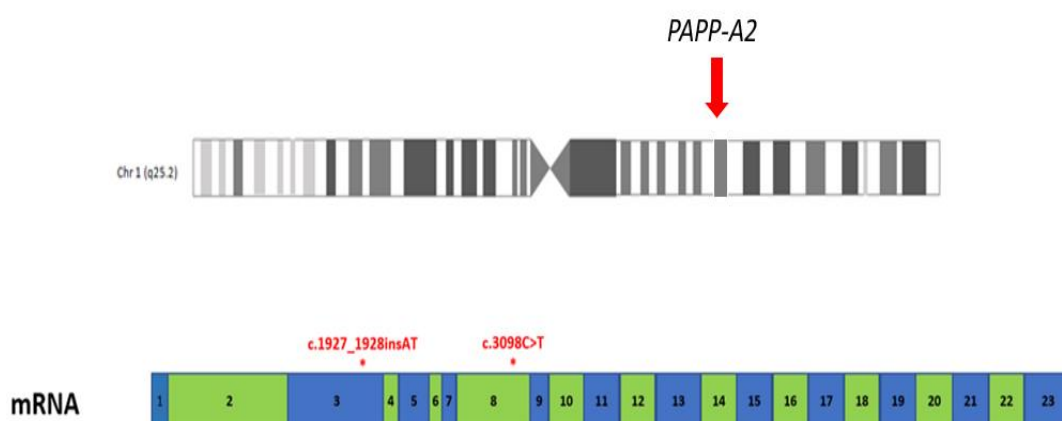
opisywano jako zgodny z wiekiem metrykalnym (61). Na podstawie zmian w proporcjach stężenia całkowitego i wolnego IGF-1 naukowcy wysunęli teorię, iż leczenie ludzkim rekombinowanym IGF-1 (recombinant human insulin-like growth factor-1; rhIGF-1) powinno spowodować zmianę równowagi w zakresie parametrów osi GH-IGF-1, ostatecznie skutkować zwiększeniem stężenia aktywnego IGF-1 i poprawiając tempo wzrastania u pacjentów z potwierdzoną mutacją w genie *PAPP-A2*. Munoz-Calvo i wsp. podjęli próbę leczenia ludzkim rekombinowanym IGF-1 dwójki rodzeństwa hiszpańskiego pochodzenia: 10,5-letniej dziewczynki (P1) oraz 6-letniego chłopca (P2), z potwierdzoną homozygotyczną mutacją w genie *PAPP-A2* (*p.D643fs25**), niskorosłością, podwyższonym stężeniem GH i całkowitego IGF1 oraz obniżonym stężeniem wolnego IGF1 i *PAPP-A2* (64). Dzieci były leczone przez 12 miesięcy. Zastosowane leczenie poprawiło tempo wzrastania, poprawie uległo również SDS wzrostu (64). Cabrera-Salcedo i wsp. podjęli próbę leczenia dwójki z trojga dotkniętych mutacją dzieci pochodzenia palestyńskiego, z drugiej jak dotąd opisanej rodziny z mutacją w genie *PAPP-A2* (66). Najstarsza pacjentka zakończyła już proces wzrastania. W przeszłości podjęto w jej przypadku próbę leczenia rhIGF-1, ale zakończono po wystąpieniu objawów sugerujących rzekomy guz mózgu. Podjęto próbę leczenia rhIGF-1 u 14-letniego chłopca (P2) oraz 10-letniego chłopca (P3). Po 51 dniach u P2 wystąpiły nawracające bóle głowy z wymiotami i po rozpoznaniu rzekomego guza mózgu przerwano leczenie. Dolegliwości ustąpiły wraz z zakończeniem leczenia. U pacjenta P3, po roku terapii rhIGF-1, odnotowano poprawę w zakresie SDS wzrostu oraz tempa wzrastania. Powyższe dane jednoznacznie wskazują, że niezbędne są długoterminowe badania z zastosowaniem rhIGF-1 w grupie pacjentów z zaburzeniem funkcjonowania *PAPP-A2* nad bezpieczeństwem i skutecznością tego leczenia.

1.6. Gen *PAPP-A2*

Gen *PAPP-A2* (pregnancy-associated plasma protein-A2) (Gene ID: 60676, 1q25.2), zlokalizowany jest w obrębie ramienia długiego chromosomu 1 (1q25.2) (**Rycina 2**). Składa się z 29 egzonów i podlega on alternatywnemu splicingowi. Dwa transkrypty są kodujące tj. kodują białko *PAPP-A2*. Transkrypt, który koduje pełną formę białka *PAPP-A2* ma 23 egzony. Niektóre egzony występują w pierwotnym transkrypcie, ale nie są obecne w jego dojrzałej formie. Gen koduje białko proteolityczne, należące do

grupy metaloproteinaz cynkowych (**Rycina 2**). Wielkość białka kodowanego przez gen *PAPP-A2* wynosi 1791 aminokwasów, zaś jego masa molekularna 198539 Da.

Do tej pory, u dwóch niespokrewnionych rodzin, opisano dwie mutacje homozygotyczne w genie *PAPP-A2*: p.D643fs25* w egzonie 3 oraz p.Ala1033Val w egzonie 8, skutkujące niskorosłością idiopatyczną z charakterystycznym obniżeniem wolnego IGF-1z jednocześnie prawidłowym stężeniem hormonu wzrostu, całkowitego IGF-1, IGF-2, IGFBP-3, IGFBP-5 oraz ALS (61).



Rycina 2. Schemat lokalizacji genu *PAPP-A2* w obrębie chromosomu 1 oraz lokalizacja mutacji w obrębie kodowanego mRNA, opracowany na podstawie artykułu: Dauber A, et al. Mutations in pregnancy-associated plasma protein A2 cause short stature due to low IGF-I availability. EMBO Mol Med. 2016 01;8(4):363–74 (61).

Temat niskorosłości może wydawać się tematem szeroko już poznanym jednak kolejne doniesienia podkreślają, że dalsze prace są niezbędne dla szerszego zrozumienia tego społecznego problemu. Do tej pory opisano dwie rodziny z potwierdzoną mutacją w genie *PAPP-A2*. Nie ukazały się żadne prace analizujące występowanie mutacji w genie *PAPP-A2* w populacji pacjentów z niskorosłością idiopatyczną zarówno w Polsce jak i na świecie. Ważność tego problemu wiąże się dodatkowo z dostępnością na rynku farmaceutycznym leku, ludzkiego rekombinowanego IGF-1 (rhIGF-1).

W związku z istotnym znaczeniem klinicznym problemu niskorosłości, szczególnie niskorosłości idiopatycznej jako tej stawiającej klinicyście największe wyzwanie, podjęto próbę analizy tego zagadnienia na grupie pacjentów ze znaczącym niedoborem wzrostu, u których dostępne rutynowo możliwości diagnostyczne i terapeutyczne zostały wyczerpane, mając nadzieję na identyfikację pacjentów z mutacją w genie *PAPP-A2* wśród zrekrutowanych pacjentów. Identyfikacja pacjentów z mutacją w genie *PAPP-A2* pozwoliłaby zaoferować im dostępne i w części skuteczne leczenie rhIGF-1. Analiza genu *PAPP-A2* w grupie pacjentów z niskorosłością idiopatyczną jest szansą na poszerzenie istniejącej wiedzy i możliwości leczniczej tychże pacjentów.

2. Założenia pracy badawczej

Założeniem pracy badawczej było potwierdzenie hipotezy badawczej, iż mutacje w genie *PAPP-A2* są przyczyną niskorosłości idiopatycznej z prawidłowym wydzielaniem hormonu wzrostu, prawidłowym stężeniem IGF-1 charakteryzującej się progresywną utratą tempa wzrastania.

Cele pracy badawczej były następujące:

1. Analiza kliniczna grupy pacjentów z niskorosłością idiopatyczną.
2. Analiza biochemiczna parametrów osi GH–IGF-1 nie ocenianych w rutynowej diagnostyce niskorosłości, takich jak wolny IGF-1, IGFBP-5 oraz kwasolabilna podjednostka (ALS).
3. Analiza genu *PAPP-A2* (Gene ID: 60676, 1q25.2) w miejscach dotąd opisanych mutacji tj. c.3098C>T, p.Ala1033Val w egzonie 8 oraz p.D643fs25* w egzonie 3.
4. W przypadku braku potwierdzenia mutacji w miejscach c.3098C>T, p.Ala1033Val w egzonie 8 i p.D643fs25* w egzonie 3, analiza egzonu 3, 4 oraz 5 kodujących miejsce aktywne białka PAPP-A2.
5. Próba oszacowania częstości występowania mutacji w genie *PAPP-A2* w populacji wielkopolskiej.
6. Poszerzenie wiedzy na temat niskorosłości idiopatycznej.

3. Materiał i metody (pacjenci i metody)

3.1. Grupa badana

Grupa badana składała się z 22 osób, 6 chłopców oraz 16 dziewczynek. Pacjenci byli rekrutowani wśród pacjentów diagnozowanych w Klinice Endokrynologii i Reumatologii Dziecięcej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, zgodnie z kryteriami włączenia:

- a) wzrost poniżej 3c lub wrastanie odbiegające od prognozy rodzicielskiej (TH) o -1 SD;
- b) wykluczenie chorób przewlekłych, mogących wpłynąć negatywnie na proces wzrastania;
- c) stężenie GH w surowicy krwi powyżej 10 ng/ml w co najmniej jednym teście stymulacyjnym spośród testu z klonidyną, insuliną, glukagonem lub arginina lub w teście po zaśnięciu;
- d) wykluczony zespół Turnera i brak charakterystycznych cech fenotypowych sugerujących inne zaburzenia chromosomalne.

Pacjentka nr 10 nie spełniała kryterium stężenia hormonu wzrostu powyżej 10 ng/ml, jednak z uwagi na progresywną utratę tempa wzrastania pomimo leczenia rhGH i wysokiego stężenia IGF-1, zdecydowano o włączeniu jej do badania. Pacjent nr 21, pomimo stężenia hormonu wzrostu poniżej 10 ng/ml, także został zakwalifikowany do grupy badanej z uwagi na kwalifikację do badania dwójki jego rodzeństwa oraz niski wzrost rodziców na poziomie wskaźnika odchylenia standardowego wzrostu (height standard deviation score; hSDS) -3 w przypadku matki i -3,36 w przypadku ojca, sugerujący obecność tła genetycznego.

W momencie włączenia do badania, grupę badaną ze względu na stadium dojrzewania płciowego można było podzielić na dzieci przedpowitaniowe (Tanner 1) oraz dzieci, które zakończyły już pokwitanie (Tanner 5). W grupie Tanner 1 znajdowało się 11 pacjentów, zaś w grupie Tanner 5, 10 pacjentów. U jednej dziewczynki dojrzewanie płciowe oceniono na stadium 3 wg Tannera.

3.2. Grupa kontrolna

Grupa kontrolna składała się z 9 pacjentów: dwóch dziewczynek w stadium dojrzewania płciowego Tanner 1, dwóch dziewczynek w stadium dojrzewania płciowego Tanner 5, trzech chłopców w stadium dojrzewania płciowego Tanner 1 i dwóch chłopców w stadium dojrzewania płciowego Tanner 5. Grupa kontrolna była rekrutowana wśród pacjentów diagnozowanych w Klinice Endokrynologii i Reumatologii Dziecięcej. Byli to pacjenci bez chorób przewlekłych, z prawidłowym wzrostem.

3.3. Analiza auksologiczna

Wzrost i masa ciała pacjentów były oceniane przez lekarza prowadzącego, w przypadku pomiaru wzrostu zawsze w tym samym pomieszczeniu przy użyciu wzrostomierza typu Harpenden, z dokładnością do 1 mm, wykonując trzy pomiary i obliczając średnią pomiaru. Analizy auksologicznej wzrostu, masy ciała, BMI oraz proporcji masy ciała do wzrostu dokonano w oparciu o siatki centylowe dla populacji polskiej opracowane przez I. Palczewską i Z. Niedźwiecką, 1999r (66).

SDS masy urodzeniowej oraz długości urodzeniowej odniesiono do siatek centylowych opracowanych przez Fentona (67). Zbyt małą masę urodzeniową dla wieku ciążowego (SGA) rozpoznano na podstawie definicji opierającej się na masie ciała/długości urodzeniowej <-2 SD na siatkach centylowych Fentona.

Wskaźnik odchylenia standardowego wzrostu (height standard deviation score; HSDS) obliczono na podstawie wzoru:

$$\text{HSDS} = \text{wzrost dziecka} - \text{wzrost 50c} / \frac{1}{2} \times (\text{wzrost 50c} - \text{wzrost 3c})$$

gdzie wzrost 50c oraz wzrost 3 c odpowiadają pozycji odpowiednio 50 centyla i 3 centyla dla danego wieku i płci.

Wskaźnik odchylenia standardowego dla wzrostu (SDS wzrostu) obliczono na podstawie wzoru:

$$\text{SDS wzrostu} = \frac{\text{wartość obserwowana} - \text{wartość średnia w populacji polskiej}}{\text{wartość SD w populacji polskiej}}$$

Prognozę rodzicielską (target height; TH) wyliczono na podstawie wzoru opracowanego przez Tannera (68):

$$TH = (\text{wzrost ojca} + \text{wzrost matki}) : 2 \pm 6,5 \text{ cm.}$$

W przypadku chłopców dodano 6,5 cm, zaś w przypadku dziewcząt odejmowano 6,5 cm.

Wskaźnik odchylenia standardowego prognozy rodzicielskiej (target height standard deviation score; TH SDS) obliczono na podstawie wzoru:

$$TH \text{ SDS} = TH - \text{wzrost } 50c / \frac{1}{2} \times (\text{wzrost } 50c - \text{wzrost } 3c)$$

gdzie TH odpowiada prognozie rodzicielskiej obliczonej na podstawie wzoru Tannera, zaś wzrost 50c oraz wzrost 3c odpowiadają odpowiednio pozycji 50 centyla i 3 centyla dla 18 r.ż. dla danej płci.

Wartość skorygowanego wskaźnika odchylenia standardowego wzrostu (corrected height standard deviation score; corrHSDS) obliczono na podstawie wzoru:

$$\text{corrHSDS} = \text{HSDS} - \text{TH SDS}$$

Wskaźnik odchylenia standardowego dla wzrostu ostatecznego (final height standard deviation score; FH SDS) obliczono na podstawie wzoru:

$$\text{FH SDS} = \text{wzrost dziecka} - \text{wzrost } 50c / \frac{1}{2} \times (\text{wzrost } 50c - \text{wzrost } 3c)$$

gdzie wzrost 50c oraz wzrost 3c odpowiadają odpowiednio pozycji 50 centyla i 3 centyla dla 18 r.ż. dla danej płci.

Wartość skorygowanego wskaźnika odchylenia standardowego wzrostu ostatecznego (corrected final height standard deviation score; corrFH SDS) obliczono na podstawie wzoru:

$$\text{corrFH SDS} = \text{FH SDS} - \text{TH SDS}$$

3.4. Rutynowa analiza parametrów osi GH-IGF-1

Do oceny stężenia hormonu wzrostu stosowano DAsource HGH-IRMA kit firmy DAsource Immuno Assays wykorzystujący metodę immunoradiometryczną do ilościowego pomiaru stężenia hormonu wzrostu. Granica wykrywania wynosi 0,004 μ IU/ml (1 μ IU kalibratora hGH-IRMA=0,33 ng), współczynnik zmienności (CV) precyzji w serii oraz między seriami wynosił odpowiednio 4,4-1% oraz 8,1-6,7%. Do oceny stężenia IGF-1 stosowano IGF1-RIACT kit firmy Cisbio Bioassays wykorzystujący metodę immunoradiometryczną do ilościowego pomiaru stężenia IGF-1. Granica wykrywania wynosi 1 ng/ml, współczynnik zmienności (CV) precyzji w serii oraz między seriami wynosił odpowiednio 3,8-3,4-3,2% oraz 3,8-8,2-5,9%. Do oceny stężenia IGFBP-3 stosowano DAsource IGFBP-3-IRMA kit firmy DAsource, wykorzystujący metodę immunoradiometryczną do ilościowego pomiaru stężenia IGFBP-3. Granica wykrywania kształtowała się na poziomie 17,3 ng/ml, współczynnik zmienności (CV) precyzji w serii oraz między seriami wynosił odpowiednio 4,0-2,7% oraz 3,2-5,6%. Wszystkie oznaczenia były prowadzone zgodnie z instrukcją zalecaną przez producenta. Oznaczeń dokonano w trakcie rutynowej diagnostyki niskorosłości w Centralnym Laboratorium Szpitala Klinicznego im. Karola Jonschera Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

Wartości stężenia IGF-1 oraz IGFBP-3 odniesiono do wartości dla danej płci i wieku zaproponowane przez Bluma i wsp. (69).

Oceny wydzielania hormonu wzrostu dokonano po zaśnięciu oraz w testach stymulacyjnych, zgodnie z obowiązującymi zaleceniami. W teście z klonidyną stosowano Iporel w dawce 125-150 mcg/m² doustnie, w teście z glukagonem stosowano GlucaGen HypoKit w dawce 0,03 mg/kg.m.c., maksymalnie 1 mg domięśniowo; w teście z insuliną stosowano insulinę Actrapid w dawce 0,1 j/kg.m.c. dożylnie, zaś w teście z arginina stosowano argininę 20% w postaci wlewu dożylnego 10% argininy w dawce 0,5 g/kg.m.c. maksymalnie 30g.

3.5. Analiza radiologiczna

W trakcie rutynowej diagnostyki niskorosłości każdy pacjent miał wykonane zdjęcie RTG ręki niedominującej, w celu oceny wieku kostnego, której dokonano na podstawie atlasu Greulich-Pyle'a (70). Prognozowany/przewidywany wzrost ostateczny (Predicted Adult Height; PAH) wyliczono zgodnie z metodą opracowaną przez Bayley-Pinneau (71).

3.6. Analiza kliniczna

Stadia dojrzewania płciowego oceniono wg Tannera (72-73).

Na podstawie wywiadu lekarskiego oraz badań dodatkowych w uzasadnionych przypadkach wykluczono choroby systemowe oddziałujące negatywnie na proces wzrastania zgodnie z obowiązującymi aktualnie wytycznymi (26).

Nadwagę rozpoznano przy pomocy wskaźnika masy ciała (Body Mass Index; BMI) ≥ 85 centyla, ale ≤ 95 centyla, zaś otyłość rozpoznano przy BMI ≥ 95 centyla dla wieku i płci.

3.7. Oznaczenie wolnego IGF-1, IGFBP-5 oraz ALS

Stężenie wolnego IGF-1, IGFBP-5 oraz ALS w grupie badanej oraz w grupie kontrolnej oznaczono bezpośrednio po zdiagnozowaniu klinicznym pacjentów, po uzyskaniu pisemnej, świadomej zgody na udział w badaniu. Badanie wykonano w Pracowni Endokrynologii Molekularnej Kliniki Endokrynologii i Reumatologii Dziecięcej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, za pomocą testów laboratoryjnych ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay):

- free IGF-1 firmy Ansh Labs;
- IGFBP-5 firmy SunRed;
- ALS firmy Mediagnost, Germany.

Analizę wykonała dr n. med. Hanna Mikoś. Krew po rannym pobraniu na czczo, wirowano w ciągu 30 minut od momentu jej pobrania w wirówce z chłodzeniem przez

20 minut, przy 3000 obrotów/min, a następnie surowice rozdzielono na mniejsze porcje, mrożono i przechowywano w temp. -80°C do czasu wykonania oznaczeń.

Przed wykonaniem oznaczeń badane surowice rozmrożono, a odczynniki do wykonania oznaczenia pozostawiono w temp. pokojowej przez 30 min.

3.7.1. Oznaczenie wolnego IGF-1 zestawem firmy Ansh Labs

Oznaczenie stężenia wolnego IGF-1 w surowicy krwi wykonano w oparciu o metodę kanapkową ELISA przy użyciu komercyjnych zestawów do ilościowego oznaczenia wolnego IGF-1 firmy Ansh Labs wg zaleceń producenta. Zestaw przygotowany jest do oznaczania wolnego IGF-1 w ludzkiej surowicy oraz w innych płynach ustrojowych. Czas inkubacji wynosi odpowiednio 1 godzina w temperaturze pokojowej ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$).

Ludzki wolny IGF-1 zawarty w badanym materiale wiąże się specyficznie ze swoistym monoklonalnym przeciwciałem opłaszczonym na powierzchni mikrostudzienek reakcyjnych. W kolejnym etapie w trakcie inkubacji z enzymem peroksydazą chrzanową sprzężoną z przeciwciałem otrzymano kompleks immunologiczny o strukturze kanapkowej: opłaszczone na płytce przeciwciało monoklonalne-badany wolny IGF-1 i drugie przeciwciało monoklonalne-enzym HRP. Po usunięciu niezwiązanych z kompleksem immunologicznym substancji w trakcie płukania, do układu reakcyjnego dodano roztwór Chromogenu. W wyniku reakcji enzym-substrat, powstała ilość kolorowego (niebieskiego) produktu, wprost proporcjonalna do ilości wolnego IGF-1 oznaczanej w badanej próbce, oraz dodanych standardów, tworzących krzywą kalibracyjną. Zatrzymanie reakcji nastąpiło przez dodanie roztworu kwasu siarkowego ze zmianą koloru reakcji na żółty. Do płukania mikropłetek zastosowano płuczkę automatyczną ETI-System Washer firmy DiaSorin. Absorbancję odczytano za pomocą czytnika mikropłetek ELx 800 firmy BioTek Instruments (USA) przy długości fali 450 nm i 630 nm. Test poddano ewaluacji za pomocą programu komputerowego Gen 5 przy użyciu krzywej 4 PL. Wartości absorbancji przeliczano na jednostki stężenia badanego parametru w oparciu o wielopunktową krzywą kalibracyjną.

Czułość zestawu wynosi 0,025 ng/ml. Zakres analizy od 0 ng/ml do 50 ng/ml.

3.7.2. Oznaczenie IGFBP-5

Oznaczenie stężenia IGFBP-5 w surowicy krwi wykonano w oparciu o metodę kanapkową ELISA z podwójnym przeciwciałem monoklonalnym, przy użyciu komercyjnych zestawów do ilościowego oznaczenia IGFBP-5 firmy SunRed, numer katalogowy: 201-12-2142, wg zaleceń producenta. Zestaw przygotowany jest do oznaczania IGFBP-5 w ludzkiej surowicy, osoczu EDTA, osoczu z heparyną oraz w innych płynach ustrojowych. Czas inkubacji wynosi odpowiednio 1 godzina, 10 min w temperaturze 37°C. Objętość surowicy potrzebna do wykonania oznaczenia wynosi 50 µl.

Ludzki IGFBP-5 zawarty w badanym materiale wiąże się specyficznie ze swoistym monoklonalnym przeciwciałem opłaszczonym na powierzchni mikrostudzienek reakcyjnych. Po dodaniu konjugatu biotyna–anty-ludzkie przeciwciało, następowało wiązanie utworzonego kompleksu z drugim monoklonalnym przeciwciałem. W kolejnym etapie w trakcie inkubacji z enzymem HRP sprzężoną ze streptawidyną, otrzymano kompleks immunologiczny o strukturze kanapkowej: opłaszczone na płycie przeciwciało monoklonalne-badany IGFBP-5 i drugie przeciwciało monoklonalne-enzym HRP. Po usunięciu niezwiązanych z kompleksem immunologicznym substancji w trakcie pięciokrotnego płukania, do układu reakcyjnego dodano roztwór Chromogenu A i Chromogenu B. W wyniku reakcji enzym-substrat, powstała ilość kolorowego (niebieskiego) produktu, wprost proporcjonalna do ilości IGFBP-5 oznaczanej w badanej próbce, oraz dodanych standardów, tworzących krzywą kalibracyjną. Zatrzymanie reakcji nastąpiło przez dodanie 1M roztworu kwasu ze zmianą koloru reakcji na żółty.

Do płukania mikropłytek zastosowano płuczkę automatyczną ETI-System Washer firmy DiaSorin. Absorbancję odczytano za pomocą czytnika mikropłytek ELx 800 firmy BioTek Instruments (USA) przy długości fali 450 nm. Test poddano ewaluacji za pomocą programu komputerowego Gen 5 przy użyciu krzywej 4 PL. Wartości absorbancji przeliczano na jednostki stężenia badanego parametru w oparciu o wielopunktową krzywą kalibracyjną.

Czułość zestawu wynosi 2,352 ng/ml. Zakres analizy od 3 ng/ml do 720 ng/ml.

3.7.3. Oznaczenie ALS

Oznaczenie stężenia ALS w surowicy krwi wykonano w oparciu o metodę kanapkową ELISA, z zastosowaniem zestawu do ilościowego oznaczenia ALS firmy Mediagnost (Germany), numer katalogowy: E35, wg zaleceń producenta w ludzkiej surowicy, osoczu EDTA lub osoczu z heparyną. Objętość potrzebna do wykonania oznaczenia stanowi 10 µl surowicy, rozcieńczonej w fazie wstępnej 1:150 razy buforem reakcyjnym. Czas inkubacji wynosi odpowiednio 2 godziny oraz 2 razy po 30 min podczas wytrząsania w temperaturze 20-25°C. Do zestawu dołączono dwie surowice kontrolne niską i wysoką rozcieńczone w fazie wstępnej oznaczenia 1:150 razy.

W pierwszym etapie do dołków płytek opłaszczonych pierwszym króliczym przeciwciałem anti-ALS dodaje się 50µl kalibratorów, kontroli i próbek badanych. Następnie dodaje się 50µl drugiego przeciwciała anti-ALS znakowanego biotyną. W wyniku reakcji powstaje kompleks immunologiczny przeciwciało anti-ALS-ALS-anti-ALS przeciwciało znakowane biotyną. Płytkę inkubuje się przez 2 godziny w temperaturze 20-25°C wytrząsając. Po zakończeniu inkubacji płytkę należy dokładnie przepłukać 5 razy buforem w celu usunięcia nadmiaru niezwiązanych kompleksów. W kolejnym etapie po dodaniu 100 µl konjugatu enzym HRP sprzężona ze streptawidyną przeprowadza się inkubację przez 30 min w temp. 20-25°C wytrząsając. Po powtórnym 5-krotnym przemyciu płytki i dokładnym usunięciu resztek buforu płuczącego, do każdego dołka dodaje się 100 µl roztworu substratu. Po 30 minutach inkubacji w ciemności w temp. 20-25°C, reakcję należy zatrzymać, przez dodanie 100 µl roztworu hamującego reakcję enzymatyczną. W wyniku reakcji enzym–substrat powstała ilość kolorowego produktu jest wprost proporcjonalna do ilości ALS w badanej próbce i w surowicy kontrolnej oraz do stężenia ALS w dodanych standardach tworzących krzywą kalibracyjną. Stężenia próbek i kontroli odczytano z krzywej kalibracyjnej mnożąc uzyskaną wartość przez rozcieńczenie wstępne (x150).

Do płukania mikropłytek zastosowano płuczkę automatyczną ETI-System Washer firmy DiaSorin. Absorbancję odczytano za pomocą czytnika mikropłytek ELX 800 firmy BioTek przy długości fali 490 nm z filtrem referencyjnym 620 nm. Test poddano ewaluacji za pomocą programu komputerowego Gen 5 przy użyciu krzywej 4PL. Precyzja metody wyniosła: wewnątrztestowa CV 6,7% a międzytestowa CV 8,96%. Według podanych przez producenta informacji, czułość testu wynosi 0,53 ng/ml

Zakres wartości referencyjnych podanych przez producenta wynosi dla kobiet średnio 8413 ng/ml i dla mężczyzn średnio 7095 ng/ml.

3.8. Badanie molekularne

Badania molekularne przeprowadzono w Pracowni Endokrynologii Molekularnej Kliniki Endokrynologii i Reumatologii Dziecięcej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, na co otrzymano stosowną zgodę Komisji Bioetycznej (zgoda Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego nr uchwały 134/4 z dnia 01.02.2018r.). Analizę wykonała dr n. biol. Aleksandra Rojek.

Po uzyskaniu pisemnej, świadomej zgody na udział w badaniu krew żyłą do izolacji DNA pobrano do próbek zawierających EDTA, którą przechowywano w temperaturze -20°C do momentu izolacji. DNA genomowy został wyizolowany z leukocytów krwi obwodowej przy użyciu zestawu QIAamp DNA Blood Mini Kit firmy Qiagen. Reakcje PCR przeprowadzono z wykorzystaniem polimerazy HotStarTaq® DNA Polymerase (QIAGEN).

Badania molekularne obejmowały egzon 3 i 8, w których znajdują się opisane do tej pory mutacje (c.3098C>T, p.Ala1033Val w egzonie 8 oraz p.D643fs25* w egzonie 3) oraz region kodujący domenę katalityczną białka (fragment egzonu 3, egzon 4 oraz fragment egzonu 5). Oligonukleotydy (Sigma Aldrich) wykorzystane w reakcjach PCR, zostały zaprojektowane przy użyciu programu Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>, data dostępu: 10.04.2020) a ich sekwencje oraz warunki reakcji PCR podano w **Tabeli 3**.

Tabela 3. Sekwencje oligonukleotydów oraz warunki reakcji PCR stosowane w celu amplifikacji wybranych fragmentów genu *PAPP-A2*.

Nazwa oligonukleotydu	Sekwencja 5'→3'	Wielkość produktu (bp)	Ta (°C)	Elongacja (s)
PAPP-A2-E3F	CACCAGGTCCACAATTCCAC	391	60	30
PAPP-A2-E3R	TGTCTTATTCAGGGAGTGTGTGA			
PAPP-A2-E8F	GCTGCTAAGGGCTACTCATTTT	698	60	60
PAPP-A2-E8R	TACGGTAAAATCCCCTCTGAAA			
PAPP-A2-E3D1F	AGCTCTGAGGATGGGCACTAT	588	60	40
PAPP-A2-E3D1R	ATAGCCTGTGAGTGGGTGCT			
PAPP-A2-E4D2F	CTGGGAGTGCCATTAGAATCTG	391	60	40
PAPP-A2-E4D2R	ACTAAGTGCCATTCTCAGCACA			
PAPP-A2-E5D3F	GGCAAGAAAGAAAAGCAATGAC	569	60	40
PAPP-A2-E5D3R	CTCCGACACAAATGACCACTTA			

Otrzymane produkty PCR rozdzielono w 1% żelu agarozowym w obecności bromku etydyny (AppliChem), następnie oczyszczono z wykorzystaniem zestawu QIAquick® Gel Extraction Kit (QIAGEN) oraz poddano bezpośredniemu sekwencjonowaniu na aparacie ABI Prism 3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems) z wykorzystaniem zestawu BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems). Reakcje sekwencjonowania przeprowadzono w Wydziałowej Pracowni Technik Molekularnych na Wydziale Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Otrzymane sekwencje (chromatogramy) zostały przeanalizowane z wykorzystaniem oprogramowania Vector NIT 9.0 Software (Invitrogen) i porównane z sekwencją referencyjną dzikiego typu (NCBI Reference Sequence: NC_000001.11). Zidentyfikowane warianty DNA zostały przeanalizowane z wykorzystaniem programu Mutation Taster (<http://www.mutationtaster.org/>, data dostępu: 10.04.2020).

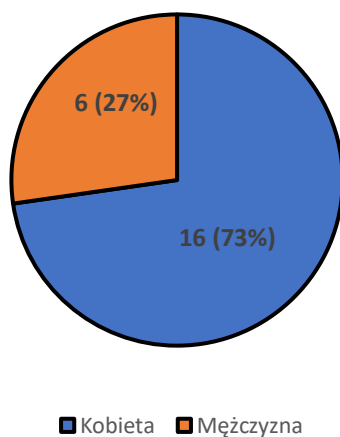
3.9. Analiza statystyczna

Zmienne ilościowe przedstawiono za pomocą średniej i odchylenia standardowego (SD), a zmienne jakościowe jako proporcje. Ze względu na liczebność grup porównania zmiennych ilościowych dokonano przy użyciu testu U-Manna Whitneya. Do porównania zmiennych jakościowych wykorzystano test chi kwadrat oraz dokładny test Fishera. Korelacje dwóch zmiennych ilościowych wykonano metodą Spearmana. Wartość $p < 0,05$ przyjęto za statystycznie istotną. Obliczenia statystyczne zostały wykonane przy pomocy programu SPSS (wersja 21, IBM, SPSS Statistics).

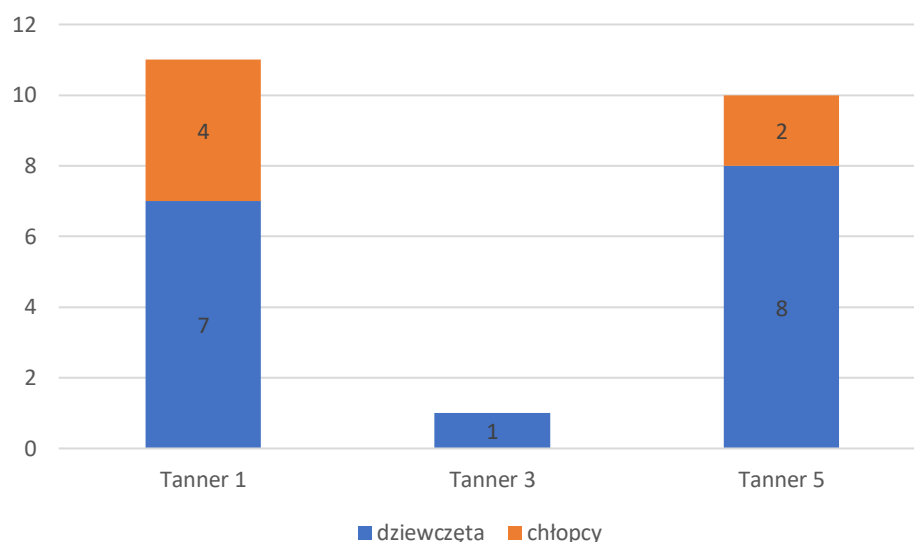
4. Wyniki

4.1. Analiza auksologiczna

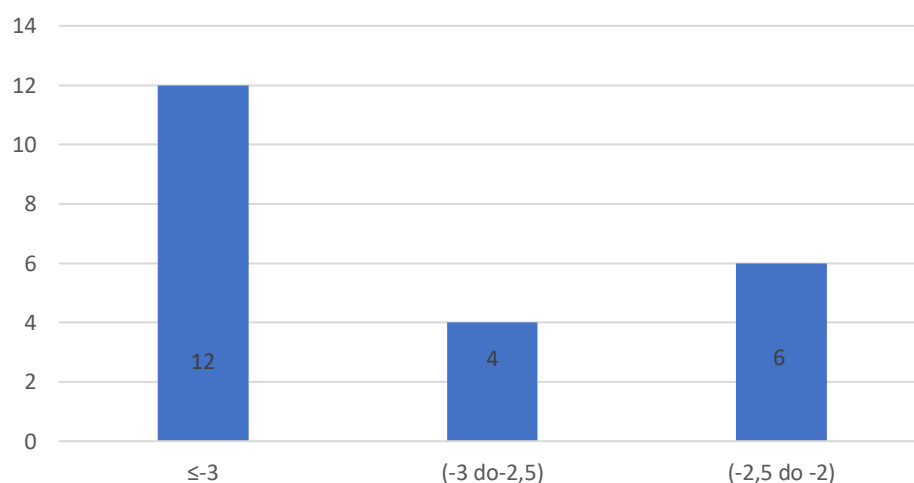
Grupa badana składała się 22 pacjentów: 6 chłopców oraz 16 dziewczynek (**Rycina 3**). Do grupy badanej 11 pacjentów zrekrutowano w stadium dojrzewania płciowego Tanner 1, 10 pacjentów w stadium dojrzewania płciowego Tanner 5, u jednej dziewczynki stadium dojrzewania płciowego oceniono jako Tanner 3 (ww. pacjentka w trakcie analiz była uwzględniona w grupie Tanner 5) (**Rycina 4**). Średni HSDS grupy badanej wynosił -2,95, zaś SDS wzrostu -2,84, większość pacjentów charakteryzował jednak znaczny niedobór wzrostu (**Tabela 4, Rycina 5**).



Rycina 3. Rozkład płci w grupie badanej.



Rycina 4. Rozkład stadium dojrzewania płciowego wśród pacjentów w zależności od płci.



Rycina 5. Rozkład HSDS w grupie badanej.

Dziewięcioro dzieci (9/22) pochodziło z rodzin, w których potencjał wzrostowy na podstawie wzrostu rodziców został obliczony na przynajmniej -1,8 SDS co odpowiada mniej więcej 3 centylowi w obrębie siatki centylowej opracowanej przez I. Palczewską i Z. Niedźwiecką. Trójka z dziewięciorga (3/9) dzieci to rodzeństwo (**Tabela 4**). Średni wzrost matki w grupie dziewczynek wynosił 157,4 cm (-1,4 SD), co odpowiada 10 centylowi. Średni wzrost matki w grupie chłopców wynosił 159,3 cm (-1,11 SD), co

odpowiada 10-25 centylowi (**Tabela 8**). Średni wzrost ojca w grupie dziewczynek wynosił 169,1 cm (-1,56 SD), co odpowiada 3-10 centylowi. Średni wzrost ojca w grupie chłopców wynosił 168,8 cm (-1,62 SD), co odpowiada 3-10 centylowi (**Tabela 8**). Średni wiek metrykalny dla grupy badanej wynosił 12,1 lat, zaś średni wiek kostny 12,0 lat, nie obserwowano różnic w obrębie płci (**Tabela 8**). U trójki pacjentów, będących rodzeństwem, HSDS rodziców był mniejszy niż -3 SD. U dwójki dzieci HSDS jednego z rodziców był mniejszy niż -3SD. U kolejnej trójki pacjentów HSDS był bliski 0 SD, czyli plasował się w okolicy 50 centyla. HSDS rodziców kolejnej trójki pacjentów był <-2 SD, ale >-3 SD, w tej grupie różnica pomiędzy TH a HSDS pacjentów była >2 SD. U trójki pacjentów HSDS rodziców był <-2 SD, ale >-3 SD, różnica pomiędzy TH a HSDS dzieci była <2 SD, zaś HSDS dzieci był <-3 SD. U siódemki pacjentów HSDS rodziców był <-2 SD, ale >-3 SD, różnica pomiędzy TH a HSDS dzieci była <2 SD, zaś HSDS dzieci był <-2 SD, ale >-3 SD.

Masę ciała 16 z 22 pacjentów w momencie kwalifikacji oceniono na równą lub mniejszą od 3 centyla. W związku z znacznym niedoborem wzrostu oceniono również proporcje masy ciała do wzrostu. U dwójki dzieci proporcję masy ciała do wzrostu oceniono na 3-10 centyl. U jednej dziewczynki proporcja masy ciała do wzrostu była poniżej 3 centyla. Pacjentka ta jest wcześniakiem urodzonym w 30 t.c., u którego nie obserwuje się zjawiska „nadgania” wzrostu i masy ciała. BMI poniżej 3 centyla opisano u 2 pacjentów. BMI powyżej 97 centyla opisano u 1 pacjentki (**Tabela 4**).

Dwójka pacjentów urodziła się przedwcześnie. Masa ciała urodzeniowa dwójki innych pacjentów spełniała kryteria zbyt niskiej masy ciała urodzeniowej (SGA). Długość ciała urodzeniowa wszystkich pacjentów znajdowała się w normie dla wieku ciążowego (**Tabela 5**). Średnia wartość wskaźnika odchylenia standardowego (SDS) dla masy urodzeniowej wynosiła -0,82, zaś dla długości urodzeniowej 0,9 (**Tabela 8**). Żaden z pacjentów nie był leczony hormonem wzrostu zgodnie z programem lekowym dla dzieci z niskorosłością i zbyt niską masą urodzeniową.

U sześciu pacjentek w momencie kwalifikacji wystąpiła już pierwsza miesiączka, mediana wieku menarche w tej grupie wyniosła 12 lat 7/12, mediana wieku menarche dla populacji polskich wynosi 12 lat 8/12.

Dziesięcioro pacjentów zakończyło już proces wzrastania. Żaden z nich nie osiągnął prognozy rodzicielskiej obliczonej na podstawie wzrostu rodziców, niezależnie

od wzrostu ostatecznego rodziców (**Tabela 6**). Prognoza rodzicielska trójki pacjentów była równa -1,8 SD, co odpowiada 3 centylowi na siatce centylowej opracowanej przez I. Palczewską i Z. Niedźwiecką, również ta grupa nie osiągnęła prognozy rodzicielskiej wzrostu. Średni FH SDS wynosił -3,03, średni corrFH SDS wynosił -2,07. Średnia różnica pomiędzy FH pacjentów a TH wynosiła 12,4 cm, dla chłopców 20,5 cm zaś dla dziewcząt 10,4 cm. U wszystkich pacjentów wzrost ostateczny był zbliżony do wzrostu ostatecznego oszacowanego na podstawie wieku kostnego (**Tabela 6**). Analiza statystyczna wykazała obecność pozytywnej korelacji pomiędzy wzrostem ostatecznym (FH) a prognozą rodzicielską (TH) ($r=0,933$, $p<0,001$) oraz pomiędzy wskaźnikiem odchylenia standardowego wzrostu ostatecznego (FH SDS) i wskaźnikiem odchylenia standardowego prognozy rodzicielskiej (TH SDS) ($r=0,901$, $p<0,001$). Wykazano również dodatnią korelację pomiędzy wzrostem ostatecznym (FH) a wzrostem oszacowanym na podstawie pierwszej oceny wieku kostnego (PAH I) ($r=0,945$, $p<0,001$). Ponadto wykazano dodatnią korelację pomiędzy wskaźnikiem odchylenia standardowego wzrostu ostatecznego a odchyleniem standardowym dla wzrostu w 4 r.ż. ($r=0,747$, $p=0,033$) i 6 r.ż. ($r=0,912$, $p=0,011$).

Tabela 4. Szczegółowa analiza parametrów auksologicznych grupy badanej.

Nr	Płeć	WM (lata)	WK (lata)	Wzrost (cm)	HSDS	SDS Wzrostu	TH (cm)	TH SDS	Corr HSDS	Masa ciała (kg) [centyl]	Proporcja masy ciała do wzrostu (centyl)	BMI (centyl)	Skala Tannera
1	M	10 8/12	8	117,0	-4,23	-4,13	160,0	-3,1	-0,58	25,0 [<3]	75	18,3 (50-75)	G1
2	K	9 3/12	8	116,0	-3,5	-3,28	147,0	-3,7	1,2	23,0 [3]	75	17,1 (50-75)	Th1
3	K	16 10/12	16	152,0	-2,24	-2,39	172,0	1,6	-3,84	47,0 [10-25]	50-75	20,3 (25-50)	Th5
4	K	16 10/12	15	141,0	-4,17	-4,4	152,0	-2,0	-2,12	32,0 [<3]	25	16,1 (<3)	Th5
5	K	11	11	130,9	-2,47	-2,30	154,0	-1,8	-0,5	35,0 [50]	90-97	19,2 (75)	Th5
6	K	17	15	146,0	-3,3	-3,56	157,0	-1,6	-1,47	36,0 [<3]	25	16,9 (3)	Th5
7	M	16 9/12	17 1/12	159,0	-3,16	-2,92	181,0	0,5	-3,66	51,5 [<3]	50-75	20,2 (25)	G5
8	M	17 7/12	17	164,0	-2,40	-2,25	184,0	0,7	-2,84	60,0 [10]	75	22,3 (50-75)	G5
9	K	17 8/12	17	146,0	-3,39	-3,30	155,0	-1,8	-1,37	36,6 [<3]	25-50	16,9 (<3)	Th5
10	K	13 3/12	14	139,0	-3,31	-3,39	156,5	-1,6	-1,74	57,0 [75-90]	>>97	29,5 (>97)	Th4

11	K	12 6/12	11	139,4	-2,63	-2,59	158,0	-1,2	-1,4	29,5 [<3]	3-10	15 (3-10)	Th1
12	K	12 5/12	11	142,5	-2,00	-2,01	162,0	-0,8	-2,14	29,0 [<3]	10	14,4 (3)	Th2
13	M	6 11/12	7	107,2	-3,7	-3,07	171,0	-1	-3,2	16,1 [<3]	10	14,0 (10)	G1
14	M	9 11/12	7	121,1	-2,9	-2,94	167,0	-1,8	-1,35	24,0 [3]	75	16,4 (25-50)	G1
15	K	11 6/12	11 6/12	136,8	-2,02	-1,92	162,0	-0,9	-1,14	27,8 [<3]	25	14,6 (3-10)	Th1
16	K	12 7/12	11 6/12	140,5	-2,48	-2,51	160,0	-1,1	-1,06	40,5 [10-25]	75-90	20,4 (75)	Th3
17	K	12	12	136,1	-2,60	-2,51	155,0	-1,7	-0,92	30,0 [<3]	50	16,2 (25)	Th1
18	K	11 8/12	13	128,4	-3,47	-3,31	155,0	-1,8	-1,7	24,0 [<3]	50	14,6 (3-10)	Th2
19	K	15 9/12	16	151,9	-2,13	-2,09	156,0	-1,45	-0,68	42,5 [3]	3-10	18,2 (10-25)	Th5
20	K	12 10/12	12 6/12	140,7	-2,74	-2,79	151,0	-2,5	-0,24	42,0 [25]	>90	21,5 (75-90)	Th5
21	M	6	3 3/12	102,5	-3,75	-2,87	160,0	-3,1	-0,77	18,0 [<3]	75-90	17 (75-90)	G1
22	K	9	7	114,5	-3,72	-3,4	159,0	-1,2	-2,8	17,5 [<3]	< 3	13,2 (3)	Th1

Skróty: Nr - numer pacjenta, M - chłopiec, K - dziewczynka, WM - wiek metrykalny, WK - wiek kostny, HSDS - wskaźnik odchylenia standardowego wzrostu, SDS wzrostu - wskaźnik odchylenia standardowego dla wzrostu, TH - prognoza rodzicielska, TH SDS - wskaźnik odchylenia standardowego prognozy rodzicielskiej, corr HSDS - skorygowany wskaźnik odchylenia standardowego wzrostu, BMI - body mass index, Th1 - stadium Tanner 1 dla dziewczynek, Th5 - stadium Tanner 5 dla dziewczynek, G1 - stadium Tanner 1 dla chłopców, G5 - stadium Tanner 5 dla chłopców

Tabela 5. Dane auksologiczne okresu noworodkowego pacjentów grupy badanej.

Nr	Czas trwania ciąży (tygodnie)	Masa urodzeniowa (g)	SDS masy urodzeniowej	Długość urodzeniowa (cm)	SDS długości urodzeniowej
1	40	3100	-1,1	54	1,1
2	40	3100	-0,75	54	1,5
3	36	1980	-1,6	48	0,6
4	38	2750	-0,75	50	0,6
5	40	3600	0,5	54	1,5
6	39	3100	-0,6	54	2,0
7	40	2160	-3,1	48	-1,5
8	41	4320	1,1	57	2,5
9	40	3140	-1,0	54	1,5
10	39	2000	-2,7	47	-1,1
11	38	2940	-0,2	52	1,5
12	41	3650	0,1	57	2,4
13	32	1660	-0,4	44	0,8
14	38	2500	-1,5	46	-1,5
15	41	3360	-0,5	55	1,5
16	40	3800	1,0	57	2,8
17	40	3460	-0,15	54	1,5
18	40	2800	-1,5	50	-0,2
19	40	3070	-0,8	53	1,1
20	38	2480	-1,4	50	0,6
21	41	3100	-1,5	51	0,4
22	30	870	-1,4	brak wpisu	brak wpisu

Skróty: Nr – numer, SDS – wskaźnik odchylenia standardowego

Tabela 6. Wzrost ostateczny (FH), prognozowany wzrost ostateczny (PAH), SDS dla wzrostu, Δ FH – TH w grupie pacjentów, którzy zakończyli proces wzrastania.

Nr	Płeć	FH (cm)	FH SDS	TH (cm)	TH SDS	Corr FH SDS	PAH I (cm)	PAH II (cm)	PAH III (cm)	SDS 4 r.ż	SDS 6 r.ż	SDS 9 r.ż.	Δ FH - TH (cm)
3	K	152,0	-2,3	172,0	1,6	-3,9	152,3	-	-	-1,5	-1,5	-	20,0
4	K	143,0	-3,8	152,0	-2,0	-1,8	141,8	-	-	-5,4	-3,4	-	9,0
5	K	143,9	-3,7	154,0	-1,8	-1,9	144,0	145,4	144,1	-	-	-2	10,1
6	K	147,0	-3,2	157,0	-1,6	-1,6	146,0	146,0	-	-1,2	-	-1,92	10,0
7	M	160,0	-3	181,0	0,5	-3,5	159,0	-	-	-1,46	-	-	21,0
8	M	164,0	-2,4	184,0	0,7	-3,1	165,5	-	-	-	-2,6	-2,36	20,0
9	K	146,0	-3,3	155,0	-1,8	-1,5	146,0	-	-	-2,85	-	-3,5	9,0
16	K	152,0	-2,3	160,0	-1,1	-1,2	152,0	155,0	156,0	-1,07	-1,44	-2	8,0
18	K	142,9	-3,8	155,0	-1,8	-2,0	142,0	138,0	-	-4,0	-3,5	-	12,1
19	K	150,8	-2,5	156,0	-1,45	-1,05	152,5	-	-	-2,71	-2,33	-2,76	5,2
Śr.		150,16	-3,03	162,6		-2,15	150,5			-2,5	-2,46	-2,42	12,4

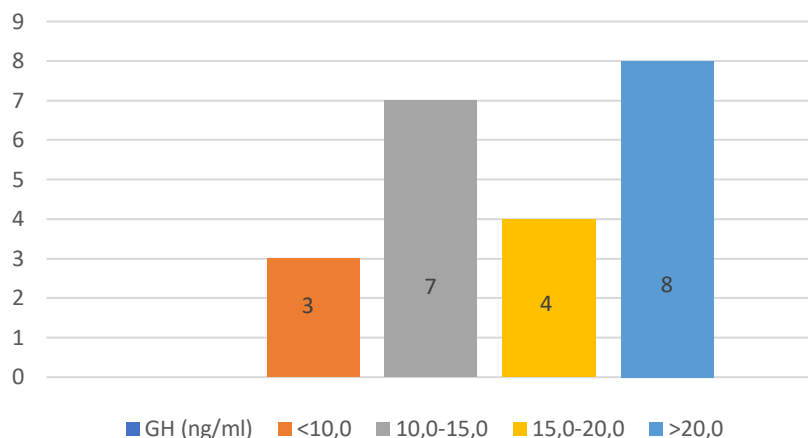
Skróty: Nr - numer pacjenta z grupy badanej, K - dziewczynka, M - chłopiec, FH - wzrost ostateczny, FH SDS - wskaźnik odchylenia standardowego wzrostu ostatecznego, TH - prognoza rodzicielska, TH SDS - wskaźnik odchylenia standardowego prognozy rodzicielskiej, PAH I, II, III - odpowiednio kolejne wartości szacowanego wzrostu na podstawie wieku kostnego, Śr.- średnia

4.2. Grupa kontrolna

Średni HSDS w grupie kontrolnej wynosił -0,32. Średnie wartości pomiarów biochemicznych w grupie kontrolnej zostały przedstawione w **Tabeli 10**.

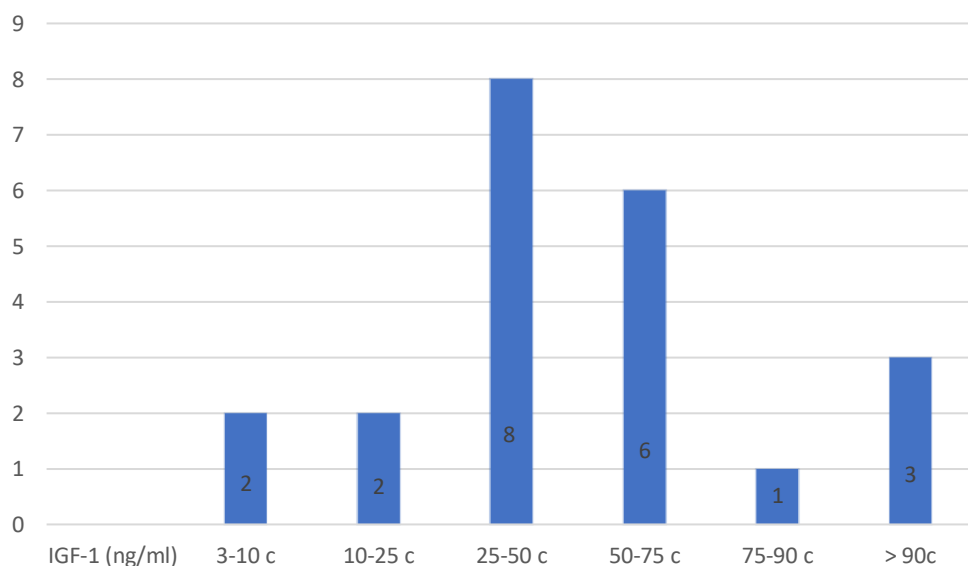
4.3. Parametry biochemiczne

Średnie stężenie hormonu wzrostu ocenione po zaśnięciu w grupie badanej wynosiło 15,4 (9,4) ng/ml, zaś w testach stymulacyjnych 13,0 (6,0) ng/ml (**Tabela 8**). Pięcioro pacjentów w ocenie po zaśnięciu uzyskało wynik powyżej 20 ng/ml (**Tabela 7**). W ocenie z wykorzystaniem testów stymulacyjnych dwoje pacjentów uzyskało wynik powyżej 20 ng/ml (**Tabela 7**). Nie u każdego pacjenta dokonano oceny wydzielania hormonu wzrostu zarówno po zaśnięciu jak i w testach stymulacyjnych. Pacjent numer 21 pomimo uzyskania w obu testach stężenia hormonu wzrostu poniżej 10 ng/ml został zakwalifikowany do grupy badanej z uwagi na zakwalifikowanie dwójki jego rodzeństwa oraz niski wzrost rodziców na poziomie HSDS -3 w przypadku matki i -3,36 w przypadku ojca. Pacjentka nr 10 z uwagi na progresywną utratę tempa wzrastania, pomimo stosowanego leczenia rhGH oraz obserwowane wysokie stężenia IGF-1, również została zakwalifikowana do badania, choć w ocenie wydzielania hormonu wzrostu uzyskała wartości stężenia poniżej 10 ng/ml. U pacjentki nr 3 stężenie hormonu wzrostu również plasowało się poniżej 10 ng/ml, ze względu na wiek pacjentki oraz zakończony proces dojrzewania płciowego przy kwalifikacji odniesiono się do norm wydzielania hormonu wzrostu Europejskiego Towarzystwa Endokrynologicznego dla pacjentów dorosłych (74). Rozkład maksymalnego stężenia hormonu wzrostu w grupie badanej przedstawiono na **Rycinie 6**.



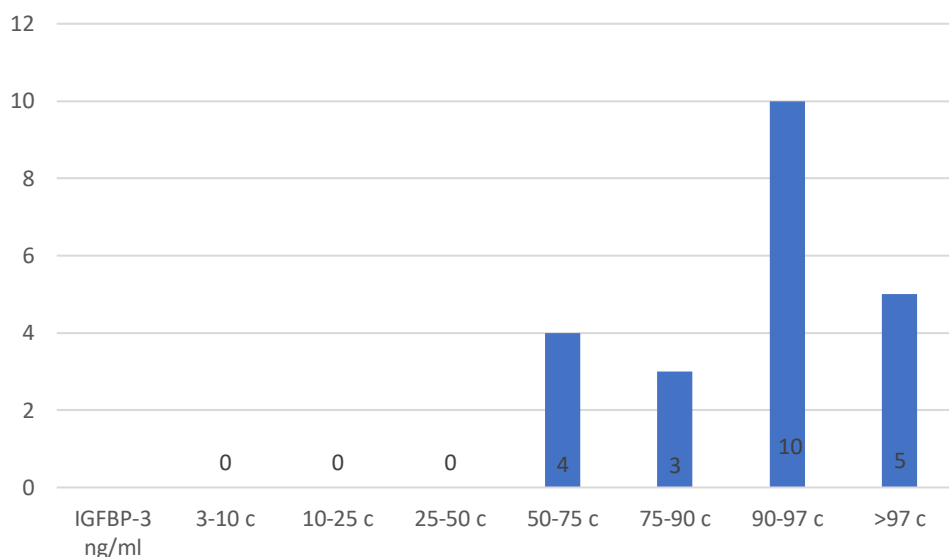
Rycina 6. Rozkład maksymalnego stężenia hormonu wzrostu (GH) w grupie badanej.

Średnie stężenie IGF-1 w grupie badanej wynosiło 330,5 (178) ng/ml. Średnie stężenie IGF-1 w grupie dziewczynek wynosiło 373,0 ng/ml i było większe w porównaniu do grupy chłopców (217,1 ng/ml). Różnica ta nie była istotna statystycznie ($p=0,09$) (**Tabela 11**). Stadium dojrzewania płciowego wpłynęło istotnie statystycznie na stężenie IGF-1 w grupie chłopców ($p=0,049$), podobnego wpływu nie wykazano w grupie dziewczynek ($p=0,345$). W grupie pacjentów w stadium dojrzewania Tanner 1 odnotowano pozytywną korelację pomiędzy stężeniem IGF-1 a wzrostem ($r=0,682$, $p=0,021$) (**Tabela 13**). Rozkład centylowy stężenia IGF-1 dla wieku i płci w grupie badanej przedstawiono na **Rycinie 7**.



Rycina 7. Rozkład wartości centylowej stężenia IGF-1 w grupie badanej.

Średnie stężenie IGFBP-3 w grupie badanej wynosiło 4849,6 (1046,3) ng/ml. Średnie stężenie IGFBP-3 w grupie dziewczynek wynosiło 5112,4 ng/ml i było większe w porównaniu do grupy chłopców (4148,6 ng/ml). Różnica ta nie była istotna statystycznie ($p=0,077$) (**Tabela 11**). Stadium dojrzewania płciowego nie wpłynęło istotnie statystycznie na stężenie IGFBP-3 zarówno w grupie dziewczynek jak i w grupie chłopców (**Tabela 11**). W grupie pacjentów w stadium dojrzewania płciowego Tanner 1 odnotowano pozytywną korelację pomiędzy stężeniem IGFBP-3 a wzrostem ($r=0,638$, $p=0,035$) (**Tabela 13**). W grupie pacjentów w stadium dojrzewania płciowego Tanner 5 odnotowano negatywną korelację pomiędzy stężeniem IGFBP-3 a wzrostem ($r=-0,618$, $p=0,043$) (**Tabela 13**). Rozkład centylowy stężenia IGFBP-3 dla wieku i płci w grupie badanej przedstawiono na **Rycinie 8**.



Rycina 8. Rozkład wartości centylowej stężenia IGFBP-3 w grupie badanej.

Średnie stężenie wolnego IGF-1 w grupie badanej wynosiło 25,09 (18,07) ng/ml. Średnie stężenie wolnego IGF-1 w grupie dziewczynek wynosiło 27,42 ng/ml i było większe w porównaniu do grupy chłopców (18,86 ng/ml). Różnica ta nie była istotna statystycznie ($p=0,203$) (**Tabela 11**). Stadium dojrzewania płciowego nie wpłynęło istotnie statystycznie na stężenie wolnego IGF-1 zarówno w grupie dziewczynek jak i w grupie chłopców (**Tabela 11**). Średnie stężenie wolnego IGF-1 w grupie kontrolnej wynosiło 14,5 ng/ml. Nie odnotowano istotnej statystycznie różnicy pomiędzy grupą badaną a kontrolną w zakresie stężenia wolnego IGF-1 ($p=0,160$) (**Tabela 12**). Płeć

wpłynęła istotnie statystycznie na stężenie wolnego IGF-1 w grupie pacjentów w stadium dojrzewania płciowego Tanner 1 ($p=0,024$) (**Tabela 11**). Podobnego wpływu nie odnotowano w przypadku pacjentów w stadium dojrzewania płciowego Tanner 5 ($p=0,436$) (**Tabela 11**). Porównując grupę badaną i kontrolną, w poszczególnych stadiach dojrzewania płciowego, nie wykazano istotnej statystycznie różnicy w zakresie stężenia wolnego IGF-1 (**Tabela 12**). W grupie pacjentów w stadium dojrzewania płciowego Tanner 5 wykazano wystąpienie pozytywnej korelacji pomiędzy stężeniem wolnego IGF-1 a BMI ($p=0,011$) oraz SDS masy ciała ($p=0,036$) (**Tabela 13**). Nie wykazano wystąpienia korelacji pomiędzy stężeniem wolnego IGF-1 a stężeniem GH (**Tabela 13**). Wykazano obecność pozytywnej korelacji pomiędzy stężeniem wolnego IGF-1 a wzrostem, SDS wzrostu oraz HSDS (**Tabela 13**).

Średnia wartość stosunku wolny IGF-1/IGF-1 w grupie badanej wynosiła 0,08 (0,04). Podobne średnie wartości odnotowano w grupie chłopców (0,071) jak i w grupie dziewczynek (0,068). Nie odnotowano istotnej statystycznie różnicy ($p=0,858$) (**Tabela 11**). Stadium dojrzewania płciowego nie wpłynęło istotnie statystycznie na wartość stosunku wolny IGF-1/IGF-1 zarówno w grupie dziewczynek jak i w grupie chłopców (**Tabela 11**). Płeć nie wpłynęła istotnie statystycznie na wartość stosunku wolny IGF-1/IGF-1 zarówno w grupie pacjentów w stadium dojrzewania płciowego Tanner 1 jak i Tanner 5 (**Tabela 11**). Średnia wartość stosunku wolny IGF-1/IGF-1 w grupie kontrolnej wynosiła 0,07 (0,01). Nie odnotowano istotnej statystycznie różnicy pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną w zakresie wartości stosunku wolny IGF-1/IGF1 ($p=0,667$) (**Tabela 12**). Porównując grupę badaną i kontrolną, w poszczególnych stadiach dojrzewania płciowego nie wykazano istotnej statystycznie różnicy w zakresie wartości stosunku wolny IGF-1/IGF-1 (**Tabela 12**).

Dwójka pacjentów płci żeńskiej (nr 4, nr 9) z grupy Tanner 5 oraz jedna pacjentka (nr 21) z grupy Tanner 1 uzyskały wartości wolnego IGF-1 oraz stosunku wolny IGF-1/IGF-1 w zakresie wartości referencyjnych. Pozostali pacjenci z grupy badanej uzyskali wartości powyżej zakresu referencji dla opisanego stadium dojrzewania. Pomimo wartości wolnego IGF-1 przewyższających zakres referencji dla danego stadium dojrzewania pacjent nr 14 uzyskał wartość stosunku wolny IGF-1/IGF-1 w zakresie opisywanej wartości referencyjnej. Trójka pacjentów: pacjentka nr 15 z grupy Tanner 1 oraz pacjentka nr 5 i 19 z grupy Tanner 5, przy większych wartościach stężenia wolnego IGF-1 niż zakres referencyjny dla danego stadium dojrzewania płciowego, uzyskała

wartości stosunku wolny IGF-1/IGF-1 nieco powyżej zakresu referencji (0,03) (**Tabela 7**). W grupie pacjentów w stadium dojrzewania Tanner 5 wykazano wystąpienie pozytywnej korelacji pomiędzy wartością stosunku wolny IGF-1/IGF-1 a wzrostem ostatecznym ($p=0,035$) (**Tabela 13**).

Średnie stężenie IGFBP-5 w grupie badanej wynosiło 125,4 (55,6) ng/ml. Średnie stężenie w grupie chłopców wynosiło 165,0 ng/ml i było większe w porównaniu z grupą dziewczynek (110,6 ng/ml). Różnica ta nie była istotna statystycznie ($p=0,09$) (**Tabela 11**). Stadium dojrzewania płciowego nie wpłynęło istotnie statystycznie na stężenie IGFBP-5 tak w grupie dziewczynek jak i w grupie chłopców (**Tabela 11**). Płeć nie wpłynęła istotnie statystycznie na stężenie IGFBP-5 zarówno w grupie pacjentów w stadium dojrzewania płciowego Tanner 1 jak i Tanner 5 (**Tabela 11**). W odniesieniu do norm stężenia IGFBP-5, w zależności od stadium dojrzewania płciowego, wszyscy pacjenci z grupy badanej uzyskali wartości IGFBP-5 poniżej normy (**Tabela 7**) (2). Średnie stężenie IGFBP-5 w grupie kontrolnej wynosiło 209,7 (120,6) ng/ml. Odnotowano istotną statystycznie różnicę pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną w zakresie stężenia IGFBP-5 ($p=0,037$) (**Tabela 12**). Porównując grupę badaną i grupę kontrolną, w poszczególnych stadiach dojrzewania płciowego nie wykazano istotnej statystycznie różnicy, w zakresie stężenia IGFBP-5 (**Tabela 12**). W przypadku grupy pacjentów w stadium dojrzewania Tanner 5 odnotowano pozytywną korelację pomiędzy stężeniem IGFBP-5 a wzrostem ($r=0,627$, $p=0,039$) (**Tabela 13**). W grupie pacjentów w stadium dojrzewania Tanner 1 odnotowano negatywną korelację pomiędzy stężeniem IGFBP-5 a stężeniem IGF-1 (**Tabela 13**). Nie wykazano wystąpienia korelacji pomiędzy stężeniem IGFBP-5 a stężeniem wolnego IGF-1, IGFBP-3, GH, SDS masy ciała i BMI (**Tabela 13**).

Średnia wartość stosunku wolny IGF-1/IGFBP-3 w grupie badanej wynosiła 0,005 (0,003). Średnia wartość stosunku wolny IGF-1/IGFBP-3 w grupie dziewczynek wynosiła 0,005 i była większa w porównaniu z grupą chłopców (0,004). Różnica ta nie była istotna statystycznie ($p=0,541$). Stadium dojrzewania płciowego nie wpłynęło istotnie statystycznie na wartość stosunku wolny IGF-1/IGFBP-3 zarówno w grupie dziewczynek jak i w grupie chłopców (**Tabela 11**). Płeć wpłynęła istotnie statystycznie na wartość stosunku wolny IGF-1/IGF-1 w grupie pacjentów w stadium dojrzewania płciowego Tanner 1 ($p=0,042$) (**Tabela 11**). Podobnego wpływu nie wykazano w grupie pacjentów w stadium dojrzewania płciowego Tanner 5 ($p=0,073$) (**Tabela 11**). Średnia

wartość stosunku wolny IGF-1/IGFBP-3 w grupie kontrolnej wynosiła 0,003 (0,002). Nie odnotowano istotnej statystycznie różnicy pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną w zakresie wartości stosunku wolny IGF-1/IGFBP-3 ($p=0,188$). Porównując grupę badaną i grupę kontrolną, w poszczególnych stadiach dojrzewania płciowego nie wykazano istotnej statystycznie różnicy w zakresie wartości stosunku wolny IGF-1/IGFBP-3 (**Tabela 12**).

Średnia wartość stosunku wolny IGF-1/IGFBP-5 w grupie badanej wynosiła 0,22 (0,18). Średnia wartość stosunku wolny IGF-1/IGFBP-5 w grupie dziewczynek wynosiła 0,26 i była większa w porównaniu z grupą chłopców (0,12) (**Tabela 11**). Różnica ta nie była istotna statystycznie ($p=0,098$). Stadium dojrzewania płciowego nie wpłynęło istotnie statystycznie na wartość stosunku wolny IGF-1/IGFBP-5 zarówno w grupie dziewczynek jak i w grupie chłopców (**Tabela 11**). Płeć wpłynęła istotnie statystycznie na wartość stosunku wolny IGF-1/IGFBP-5 w grupie pacjentów w stadium dojrzewania płciowego Tanner 1 ($p=0,012$) (**Tabela 11**). Podobnego wpływu nie wykazano w grupie pacjentów w stadium dojrzewania płciowego Tanner 5 ($p=0,436$) (**Tabela 11**). Średnie wartości stosunku wolny IGF-1/IGFBP-5 w grupie kontrolnej wynosiły 0,09 (0,06). Odnotowano istotną statystycznie różnicę pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną w zakresie wartości stosunku wolny IGF-1/IGFBP-5 ($p=0,02$) (**Tabela 12**). Porównując grupę badaną i grupę kontrolną w poszczególnych stadiach dojrzewania płciowego nie wykazano istotnej statystycznie różnicy w zakresie wartości stosunku wolny IGF-1/IGFBP-5 (**Tabela 12**).

Średnie stężenie ALS w grupie badanej wynosiło 1895,8 (669,2) U/ml. Średnie stężenie ALS w grupie dziewczynek wynosiło 2017,7 U/ml i było większe w porównaniu do grupy chłopców (1570,6 U/ml). Różnica ta nie była istotna statystycznie ($p=0,083$). Stadium dojrzewania płciowego nie wpłynęło istotnie statystycznie na stężenie ALS tak w grupie dziewczynek jak i w grupie chłopców (**Tabela 11**). Płeć nie wpłynęła istotnie statystycznie na stężenie ALS zarówno w grupie pacjentów w stadium dojrzewania płciowego Tanner 1 jak i Tanner 5 (**Tabela 11**). Średnie stężenie ALS w grupie kontrolnej wynosiło 1453,6 (773,5) U/ml. Nie odnotowano istotnej statystycznie różnicy pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną w zakresie stężenia ALS ($p=0,151$) (**Tabela 12**). Porównując grupę badaną i grupę kontrolną w poszczególnych stadiach dojrzewania płciowego nie wykazano istotnej statystycznie różnicy w zakresie stężenia ALS (**Tabela 11**). W oparciu o dostępne w literaturze wartości referencyjne stężenia ALS, u jednej

pacjentki w stadium dojrzewania płciowego Tanner 1 uzyskano wartości poniżej zaproponowanych norm (**Tabela 7**). U dwójki pacjentów w stadium dojrzewania płciowego Tanner 5 również uzyskano wartości poniżej wartości referencyjnych (**Tabela 7**) (3).

Pacjenci, u których odnotowano wartości ALS poniżej normy, podobnie jak reszta grupy badanej, uzyskali obniżone wartości stężenia IGFBP-5. Stężenie IGFBP-5 u pacjentki nr 6 wynosiło 116 ng/ml, zaś średnia wartość dla podgrupy dziewczynek w stadium dojrzewania płciowego Tanner 5 wynosiła 123,1 ng/ml. W przypadku pacjentki nr 12 stężenie IGFBP-5 wynosiło 95,3 ng/ml a średnia wartość dla podgrupy dziewczynek w stadium dojrzewania Tanner 1 wynosiła 94,5 ng/ml. U kolejnego pacjenta (nr 21) stężenie IGFBP-5 wynosiło 146,5 ng/ml a średnia dla podgrupy chłopców w stadium dojrzewania płciowego Tanner 1 wynosiła 156,9 ng/ml. Nie wykazano wystąpienie korelacji pomiędzy stężeniem ALS a stężeniem IGFBP-5 (**Tabela 13**). Wartości stężenia IGFBP-3 we wszystkich przypadkach były w granicach normy dla wieku i płci. W przypadku pacjentki nr 6 stężenie odpowiadało 50 c, co daje jedną z mniejszych wartości w grupie badanej. Stężenie IGFBP-3 u pacjentki nr 12 odpowiadało 90 c, zaś pacjent nr 21 uzyskał wartości IGFBP-3 >90c (**Tabela 7**). Nie wykazano wystąpienie korelacji pomiędzy stężeniem ALS a stężeniem IGFBP-3 (**Tabela 13**). Również maksymalne stężenie GH w przypadku pacjentów, którzy uzyskali obniżony wynik ALS, nie było jednorodne. U pacjentki nr 6 wartość ta wynosiła 13,6 ng/ml, w przypadku pacjentki nr 12 wynosiła 28,3 ng/ml, zaś u pacjenta nr 21 jedynie 5 ng/ml (**Tabela 7**). Nie wykazano wystąpienie korelacji pomiędzy stężeniem ALS a GH (**Tabela 13**). Również w przypadku stężenia IGF-1, nie można wskazać tendencji co do uzyskanych wartości. U pacjentki nr 6 wartość odpowiadały 3c, u pacjentki nr 12 plasowały się na 30c, zaś pacjent nr 21 uzyskał wartości na poziomie 50c (**Tabela 7**). Nie wykazano wystąpienie korelacji pomiędzy stężeniem ALS a stężeniem IGF-1 i stężeniem wolnego IGF-1 (**Tabela 13**). BMI dwójki z trojga pacjentów z obniżoną wartością ALS oceniono na 3c, zaś ich proporcje masy ciała do wzrostu oceniono na 10-25c, BMI jak i proporcje masy ciała do wzrostu pacjenta nr 21 oceniono na 75-90c (**Tabela 4**). Nie wykazano wystąpienie korelacji pomiędzy stężeniem ALS a SDS masy ciała i BMI (**Tabela 13**).

Szczegółowe dane opisujące parametry oceniające funkcjonowanie osi GH-IGF-1 w grupie badanej przedstawiono w **Tabeli 7**. Dane opisujące parametry oceniające

funkcjonowanie osi GH-IGF-1 w postaci średniej i odchylenia standardowego w zależności od płci przedstawiono w **Tabeli 8**, zaś w zależności od płci oraz stadium dojrzewania płciowego przedstawiono w **Tabeli 9**. Dane porównujące uzyskane średnie wartości stężenia wolnego IGF-1, IGFBP-5 oraz ALS oraz odchylenie standardowe w grupie badanej i grupie kontrolnej przedstawiono w **Tabeli 10**. Różnice statystyczne w stężeniu parametrów biochemicznych w obrębie grupy badanej w zależności od płci, stadium dojrzewania przedstawiono w **Tabeli 11**, zaś pomiędzy grupą badaną i grupą kontrolną przedstawiono w **Tabeli 12**. Korelacje wybranych parametrów biochemicznych i aksamologicznych w grupie badanej przedstawiono w **Tabeli 13**.

Tabela 7. Parametry biochemiczne oceniające funkcjonowanie osi GH–IGF-1

Nr	Maks. GH po zaśnięciu (ng/ml)	Maks. GH w stymulacji (ng/ml)	IGF-1 (ng/ml) [centyl]	IGFBP-3 (ng/ml) [centyl]	Wolny IGF-1 (ng/ml) *	Wskaźnik wolny IGF-1/IGF-1	IGFBP-5 (ng/ml) #	ALS (ng/ml)	ALS (U/ml) **	Wolny IGF- 1/IGFBP-3	Wolny IGF- 1/IGFBP-5
1	18,6	11,6	157,0 [35]	4487,0 [95]	11,1	0,07	73,6	6203,0	1240,0	0,002	0,15
2	19,0	8,8	194,0 [50]	5379,0 [>95]	12,9	0,06	46,1	11781,0	2356,2	0,002	0,27
3	1,9	8,6	363,0 [30]	4012,0 [80]	52,5	0,14	91,1	11023,0	2204,6	0,01	0,57
4	29,0	7,0	295,0 [10]	4375,0 [90]	6,5	0,02	58,1	10421,0	2084,2	0,001	0,11
5	26,8	-	941,0 [>>95]	6036,0 [>95]	35,3	0,03	86,5	13944,0	2788,8	0,005	0,4
6	-	13,6	196,0 [3]	3057,0 [50]	15,4	0,07	116,0	4941,0	988,2	0,005	0,13
7	11,5	10,5	231,0 [5]	3097,0 [70]	37,7	0,13	113,2	9101,0	1820,2	0,01	0,28
8	30,7	16,3	456,0 [60]	4946,0 [95]	52,5	0,11	249,5	7940,0	1588,0	0,01	0,21
9	28,3	-	341,0 [25]	3977,0 [75]	5,5	0,01	138,7	12107,0	2421,4	0,001	0,04
10	2,3	3,4	398,0 [40]	5560,0 [70]	16,4	0,04	91,8	12849,0	2569,8	0,003	0,17

11	5,1	12,6	397,0 [75]	6309,0 [95]	43,6	0,11	79,6	11412,0	2282,4	0,007	0,54
12	4,7	28,3	270,0 [30]	5591,0 [90]	26,5	0,09	95,3	2653,0	530,6	0,005	0,27
13	7,6	19,8	162,0 [75]	5347,0 [>95]	10,5	0,06	206,4	9531,0	1906,2	0,002	0,05
14	14,0	6,4	171,0 [40]	3311,0 [50]	4,3	0,02	201,3	8290,0	1658,0	0,001	0,02
15	24,5	15,6	495,0 [90]	4620,0 [80]	16,6	0,03	103,9	4284,0	856,8	0,003	0,16
16	11,4	10,6	312,0 [>50]	4940,0 [>95]	38,1	0,12	209,9	14084,0	2816,8	0,007	0,18
17	16,2	21,7	325,0 [60]	5073,0 [90]	52,5	0,16	157,8	14614,0	2922,8	0,01	0,33
18	14,0	13,0	526,0 [90]	5843,0 [>90]	52,5	0,09	76,6	10029,0	2005,8	0,008	0,62
19	-	15,3	364,0 [25]	6309,0 [>95]	14,2	0,03	122,7	9099,0	1819,8	0,002	0,11
20	13,2	14,4	454,0 [85]	6439,0 [>95]	48,0	0,1	193,5	11897,0	2379,4	0,007	0,24
21	4,6	5,0	126,0 [50]	3704,0 [>90]	3,1	0,02	146,5	6053,0	1210,6	0,0008	0,02
22	24,3	16,9	157,0 [30]	4279,0 [>95]	6,8	0,04	103,3	6285,0	1257,0	0,001	0,06

Skróty: Maks. - maksymalny, GH - hormon wzrostu, ALS - kwasolabilna podjednostka, * - normy dla wolnego IGF-1; stadium Tanner 1: 1,58 - 3,15, Tanner 5 : 4,89 - 9,37; # - normy dla IGFBP-5: stadium Tanner 1 : 211 - 700, Tanner 5 : 293 - 1023; ** - normy dla ALS: stadium Tanner 1 : 753 - 2634, Tanner 5 : 1260 - 4030.

Tabela 8. Dane auksologiczne, kliniczne oraz hormonalne grupy badanej wg płci, podane jako wartość średnia wraz z odchyleniem standardowym.

Parametr	Dziewczynki (średnia $\pm$ SD)	Chłopcy (średnia $\pm$ SD)	Grupa badana ogółem (średnia $\pm$ SD)
Liczebność grupy	16	6	22
Tydzień ciąży	38,8 (2,7)	38,6 (3,4)	38,7 (2,8)
Masa urodzeniowa (g)	2881 (754)	2806 (926)	2860 (782)
SDS masy urodzeniowej	-0,7 (0,9)	-1,1 (1,4)	-0,82 (1,0)
Długość urodzeniowa (cm)	52,6 (3,0)	50,0 (4,9)	51,8 (3,7)
SDS długości urodzeniowej	1,2 (1,0)	0,3 (1,6)	0,9 (1,2)
Wiek metrykalny (WM) (lata)	12,5 (3,2)	11,3 (5,4)	12,1(3,9)
Wiek kostny (WK) (lata)	11,9 (3,1)	9,9 (5,8)	12,0 (4,0)
WM/WK (lata)	1,05 (0,09)	1,25 (0,34)	1,09 (0,2)
Wzrost (cm)	137,6 (10,7)	127,4 (28,9)	135,9 (16,2)
HSDS	-2,88 (0,65)	-3,35 (0,66)	-2,95 (0,64)
SDS dla wzrostu	-2,86 (0,68)	-3,06 (0,61)	-2,84 (0,61)
Masa ciała (kg)	33,4 (9,9)	32,4 (18,5)	34,4 (12,5)
SDS masy ciała	-2,05 (1,5)	-2,0 (0,62)	-2,0 (1,3)
Średni wzrost matki (cm)	157,4 (5,83)	159,3 (10,9)	157,9 (7,4)
SD średniego wzrostu matki	-1,4 (0,99)	-1,11 (1,83)	-1,34 (1,23)
Średni wzrost ojca (cm)	169,1 (7,77)	168,8 (11,39)	169,0 (8,60)
SD średniego wzrostu ojca	-1,56 (1,25)	-1,62 (1,82)	-1,58 (1,38)
TH (cm)	156,9 (5,6)	170,5 (10,2)	160,6 (9,2)
TH SDS	-1,4 (1,1)	-1,3 (1,6)	-1,4 (1,2)
CorrHSDS	-1,37 (1,12)	-2,06 (1,32)	-1,56 (1,19)
BMI	17,6 (4)	18,0 (2,9)	17,6 (3,7)
Maks. stężenie GH po zaśnięciu	15,7 (9,8)	14,5 (9,3)	15,4 (9,4)
Maks. stężenie GH w testach stymulacyjnych	13,5 (6,2)	11,6 (5,7)	13,0 (6,0)
Stężenie IGF-1 (ng/ml)	373,0 (181,0)	217,1 (121,0)	330,5 (178,0)
SDS IGF-1	0,4 (2,3)	-0,07 (0,8)	0,27 (2,0)
IGFBP-3 (ng/ml)	5112,4 (991,1)	4148,6 (915,6)	4849,6 (1046,3)
SDS IGFBP-3	2,0 (1,0)	1,7 (1,6)	1,9 (1,2)
Wolny IGF-1 (ng/ml)	27,4 (17,6)	18,8 (19,4)	25,0 (18,0)
Wskaźnik wolny IGF-1/IGF-1	0,07 (0,04)	0,06 (0,04)	0,07 (0,04)
IGFBP-5 (ng/ml)	110,6 (45,0)	165,0 (65,5)	125,4 (55,6)
ALS (ng/ml)	10088,9 (3676,9)	7853,0 (1451),4	9479 (3346,2)
Wskaźnik wolny IGF-1/IGFBP-3	0,004 (0,003)	0,004 (0,004)	0,004 (0,003)
Wskaźnik wolny IGF-1/IGFBP-5	0,26 (0,18)	0,12 (0,10)	0,22 (0,17)
ALS (U/ml)	2017,7 (735,3)	1570,6 (290,3)	1895,8 (669,2)

Tabela 9. Parametry auksologiczne oraz biochemiczne oraz ich odchylenie standardowe wg płci oraz stadium dojrzewania.

Parametr	Dziewczynki		Chłopcy		Ogółem	
	Tanner 1	Tanner 5	Tanner 1	Tanner 5	Tanner 1	Tanner 5
Wiek metrykalny (WM) (lata)	10,4 (1,5)	14,6 (3,2)	7,6 (2,0)	16,9 (0,2)	9,2 (2,2)	15,4 (2,7)
Wiek kostny (WK) (lata)	10,3 (2,3)	14,2 (2,1)	6,3 (2,0)	17,2 (0,3)	8,7 (2,9)	14,7 (2,2)
WM/WK	1,06 (0,12)	1,04 (0,06)	1,3 (0,3)	1,0 (0,03)	1,18 (0,26)	1,03 (0,06)
Wzrost (cm)	130,5 (11,2)	143,1 (6,6)	110,4 (7,9)	161,5 (3,5)	123,2 (14,0)	146,4 (9,6)
HSDS	-2,84 (0,71)	-2,91 (0,67)	-3,64 (0,55)	-2,78 (0,53)	-3,13 (0,74)	-2,89 (0,62)
SDS dla wzrostu	-2,71 (0,62)	-2,97 (0,74)	-3,25 (0,59)	-2,58 (0,48)	-2,91 (0,64)	-2,9 (0,7)
CorrHSDS	-1,27 (1,26)	-1,44 (1,08)	-1,45 (1,1)	-3,25 (0,5)	-1,34 (1,18)	-1,77 (1,47)
Masa ciała (kg)	25,8 (4,5)	40,9 (7,5)	20,7 (4,3)	55,7 (0,2)	24,0 (4,9)	43,6 (9,2)
SDS masy ciała	-2,47 (0,5)	-1,73 (2,0)	-2,1(0,5)	-1,65 (0,7)	-2,3 (0,5)	-1,72 (1,8)
BMI	15,0 (1,2)	19,8 (4,0)	16,1 (2,2)	21,2 (1,4)	15,4 (1,6)	20,1 (3,6)
Maks. stężenie GH po zaśnięciu	15,4 (8,1)	16,1 (11,9)	11,2 (6,3)	21,1 (13,5)	13,8 (7,4)	17,2 (11,5)
Maks. stężenie GH w testach stymulacyjnych	16,7 (6,5)	10,4 (4,3)	10,7 (6,6)	13,4 (4,1)	14,5 (6,9)	11,0 (4,2)
Stężenie IGF-1 (ng/ml)	329,1 (132,9)	407,1 (212,6)	154,0 (19,5)	343,5 (159,9)	265,4 (136,0)	395,5 (198,0)
SD stężenia IGF-1	0,4 (1,3)	0,39 (2,9)	-0,01 (0,3)	-0,2 (1,8)	0,26 (1,0)	0,28 (2,6)
Stężenie IGFBP-3 (ng/ml)	5299,1 (702,4)	4967,2 (1191,3)	4212,2 (900,6)	4021,5 (1307,4)	4903,9 (916,5)	4795,2 (1205,2)
SD stężenia IGFBP-3	2,4 (0,7)	1,7 (1,2)	2,2 (1,5)	0,65 (1,4)	2,3 (1,01)	1,5 (1,2)
Wolny IGF-1 (ng/ml)	29,5 (18,4)	25,7 (17,8)	7,24 (4,1)	42,1 (14,7)	21,4 (18,3)	28,7 (17,9)
Wskaźnik wolny IGF-1/IGF-1	0,08 (0,04)	0,06 (0,04)	0,04 (0,02)	0,12 (0,01)	0,06 (0,04)	0,07 (0,04)
IGFBP-5 (ng/ml)	94,5 (95,3)	123,1 (50,4)	156,9 (61,8)	181,3 (96,3)	117,2 (53,2)	133,7 (59,3)
ALS (ng/ml)	8722,5 (4387,1)	11151,0 (2830,2)	7519,2 (1685,5)	8520,5 (820,9)	8285,0 (3573,4)	10673,2 (2758,3)
Wolny IGF-1/IGFBP-3	0,005 (0,003)	0,004 (0,003)	0,001 (0,0006)	0,01 (0)	0,003 (0,003)	0,005 (0,003)
Wolny IGF-1/IGFBP-5	0,32 (0,19)	0,21 (0,16)	0,06 (0,06)	0,24 (0,04)	0,22 (0,20)	0,22 (0,15)
ALS (U/ml)	1744,5 (877,4)	2230,2 (566,0)	1503,8 (337,1)	1704,1 (164,1)	1657,0 (714,6)	2134,6 (551,6)

Tabela 10. Porównanie grupy badanej i kontrolnej w zakresie uzyskanego średniego stężenia wolnego IGF-1, IGFBP-5, ALS oraz odchylenia standardowego w zależności od płci i stadium dojrzewania płciowego.

	Grupa badana		Grupa kontrolna	
	Tanner 1	Tanner 5	Tanner 1	Tanner 5
	Wolny IGF-1 (ng/ml)		Wolny IGF-1 (ng/ml)	
Dziewczynki	29,5 (18,4)	25,7 (17,8)	16,4 (8,2)	19,0 (14,5)
Chłopcy	7,25 (4,1)	42,1 (14)	9,8 (4,6)	15,1 (14,1)
	Wolny IGF-1/IGF-1		Wolny IGF-1/IGF-1	
Dziewczynki	0,08 (0,04)	0,06 (0,04)	0,06 (0,002)	0,05 (0,02)
Chłopcy	0,04 (0,02)	0,12 (0,01)	0,04 (0,02)	0,03 (0,02)
	IGFBP-5 (ng/ml)		IGFBP-5 (ng/ml)	
Dziewczynki	94,5 (95,3)	123,1 (50,4)	108,1 (2,1)	142,2 (59,3)
Chłopcy	156,9 (61,8)	181,3 (96,3)	279,1 (159,1)	274,7 (97)
	ALS (ng/ml)		ALS (ng/ml)	
Dziewczynki	8722,5 (4387,1)	11151,0 (2830,2)	12488,0 (2439,5)	4280,5 (4646)
Chłopcy	7519,2 (1685,5)	8520,5 (820,9)	7583,6 (1445)	4563,0 (874)
	ALS (U/ml)		ALS (U/ml)	
Dziewczynki	1744,5 (877,4)	2230,2 (566,0)	2497,6 (487,9)	856,0 (929,2)
Chłopcy	1503,8 (337,1)	1704,1 (164,1)	1516,6 (289)	912,6 (174,8)
	Wolny IGF-1/IGFBP-3		Wolny IGF-1/IGFBP-3	
Dziewczynki	0,005 (0,003)	0,004 (0,003)	0,003 (0,002)	0,004 (0,003)
Chłopcy	0,001 (0,0006)	0,01 (0)	0,001 (0,001)	0,001 (0,001)
	Wolny IGF-1/IGFBP-5		Wolny IGF-1/IGFBP-5	
Dziewczynki	0,32 (0,19)	0,21 (0,16)	0,14 (0,07)	0,12 (0,05)
Chłopcy	0,06 (0,06)	0,24 (0,04)	0,04 (0,04)	0,04 (0,03)

Tabela 11. Różnica statystyczna parametrów biochemicznych w obrębie grupy badanej w zależności od stadium dojrzewania i płci.

	Dziewczynki (n=16)	Chłopcy (n=6)	P
ALS (U/ml)	2017,7 ± 735,3	1570,6 ± 290,3	0,083
ALS (ng/ml)	10088,9 ± 3676,9	7853,0 ± 1451,5	0,083
IGFBP-5 (ng/ml)	110,6 ± 45,0	165,0 ± 65,5	0,098
wolny IGF-1 (ng/ml)	27,4 ± 17,6	18,9 ± 19,4	0,203
wolny IGF-1/IGF-1	0,069 ± 0,05	0,071 ± 0,05	0,858
wolny IGF-1/IGFBP-3	0,005 ± 0,003	0,004 ± 0,004	0,541
wolny IGF-1/IGFBP-5	0,26 ± 0,18	0,12 ± 0,11	0,098
	Th1 (n=7)	G1 (n=4)	P
ALS (U/ml)	1744,5 ± 877,4	1503,8 ± 337,1	0,527
ALS (ng/ml)	8722,5 ± 4387,1	7519,2 ± 1685,5	0,527
IGFBP-5 (ng/ml)	94,5 ± 33,9	156,9 ± 61,8	0,230
wolny IGF-1 (ng/ml)	29,6 ± 18,4	7,3 ± 4,1	0,024
wolny IGF-1/IGF-1	0,08 ± 0,04	0,04 ± 0,03	0,109
wolny IGF-1/IGFBP-3	0,005 ± 0,003	0,001 ± 0,001	0,042
wolny IGF-1/IGFBP-5	0,32 ± 0,20	0,06 ± 0,06	0,012
	Th5 (n=9)	G5 (n=2)	P
ALS (U/ml)	2230,2 ± 566,0	1704,0 ± 164,1	0,218
ALS (ng/ml)	11151,0 ± 2830,2	8520,5 ± 820,9	0,218
IGFBP-5 (ng/ml)	123,1 ± 50,4	181,3 ± 96,3	0,436
wolny IGF-1 (ng/ml)	25,8 ± 17,9	42,1 ± 14,7	0,327
wolny IGF-1/IGF-1	0,06 ± 0,05	0,12 ± 0,01	0,218
wolny IGF-1/IGFBP-3	0,004 ± 0,003	0,01 ± 0,00	0,073
wolny IGF-1/IGFBP-5	0,22 ± 0,17	0,25 ± 0,05	0,436
	Th1 + G1 (n=11)	Th5 + G5 (n=11)	P
ALS (U/ml)	1624,1 ± 714,7	2134,7 ± 551,7	0,116
ALS (ng/ml)	8285,0 ± 3573,4	10673,3 ± 2758,3	0,116
IGFBP-5 (ng/ml)	117,2 ± 53,2	133,7 ± 59,3	0,847
wolny IGF-1 (ng/ml)	21,4 ± 18,3	28,7 ± 17,9	0,300
wolny IGF-1/IGF-1	0,07 ± 0,04	0,07 ± 0,05	0,797
wolny IGF-1/IGFBP-3	0,004 ± 0,003	0,006 ± 0,004	0,243
wolny IGF-1/IGFBP-5	0,23 ± 0,21	0,22 ± 0,15	0,797
	Grupa badana Th1 (n=7)	Grupa badana Th5 (n=9)	P
ALS (U/ml)	1744,5 ± 877,4	2230,3 ± 566,0	0,252
ALS (ng/ml)	8722,6 ± 4387,2	11151,7 ± 2830,2	0,252
IGFBP-5 (ng/ml)	94,5 ± 34,0	123,1 ± 50,4	0,299
wolny IGF-1	29,6 ± 18,4	25,8 ± 17,9	0,606
wolny IGF-1/IGF-1	0,08 ± 0,04	0,06 ± 0,05	0,351
wolny IGF-1/IGFBP-3	0,005 ± 0,003	0,005 ± 0,003	0,681
wolny IGF-1/IGFBP-5	0,32 ± 0,20	0,22 ± 0,17	0,252
	Grupa badana G1 (n=4)	Grupa badana G5 (n=2)	P
ALS (U/ml)	1503,7 ± 337,3	1704,1 ± 164,2	0,800
ALS (ng/ml)	7519,3 ± 1685,6	8520,5 ± 821,0	0,800
IGFBP-5 (ng/ml)	157,0 ± 61,8	181,4 ± 96,4	0,800
wolny IGF-1	7,3 ± 4,1	42,1 ± 14,7	0,133
wolny IGF-1/IGF-1	0,04 ± 0,03	0,12 ± 0,01	0,133
wolny IGF-1/IGFBP-3	0,001 ± 0,001	0,01 ± 0,00	0,133
wolny IGF-1/IGFBP-5	0,06 ± 0,06	0,25 ± 0,05	0,133

Skróty: Th1 - stadium Tanner 1 dla dziewczynek, Th5 – stadium Tanner 5 dla dziewczynek, G1 – stadium Tanner 1 dla chłopców, G5 – stadium Tanner 5 dla chłopców. *Istotność statystyczną zaznaczono kursywą i pogrubieniem.

Tabela 12. Różnica statystyczna wartości parametrów biochemicznymi pomiędzy grupą badaną i kontrolną w zależności od stadium pokwitania i płci.

	Grupa badana (n=22)	Grupa kontrolna (n=9)	P
ALS (U/ml)	1895,8 ± 669,3	1453,6 ± 773,5	0,151
ALS (ng/ml)	94791,0 ± 3346,2	7268,3 ± 3867,6	0,151
IGFBP-5 (ng/ml)	125,5 ± 55,7	209,7 ± 120,6	0,037
wolny IGF-1 (ng/ml)	25,1 ± 18,1	14,5 ± 8,9	0,160
wolny IGF-1/IGF-1	0,07 ± 0,04	0,05 ± 0,02	0,203
wolny IGF-1/IGFBP-3	0,005 ± 0,003	0,003 ± 0,002	0,188
wolny IGF-1/IGFBP-5	0,22 ± 0,18	0,09 ± 0,06	0,020
	Grupa badana Th1 (n=7)	Grupa kontrolna Th1 (n=2)	P
ALS (U/ml)	1744,5 ± 877,4	2497,6 ± 487,9	0,500
ALS (ng/ml)	8722,6 ± 4387,2	12488,0 ± 2439,5	0,500
IGFBP-5 (ng/ml)	94,5 ± 34,0	108,1 ± 2,2	0,222
wolny IGF-1	29,6 ± 18,4	16,4 ± 8,2	0,500
wolny IGF-1/IGF-1	0,08 ± 0,04	0,07 ± 0,01	0,667
wolny IGF-1/IGFBP-3	0,005 ± 0,003	0,004 ± 0,002	0,667
wolny IGF-1/IGFBP-5	0,32 ± 0,20	0,15 ± 0,08	0,333
	Grupa badana Th5 (n=9)	Grupa kontrolna Th5 (n=2)	P
ALS (U/ml)	2230,3 ± 566,0	856,1 ± 927,3	0,073
ALS (ng/ml)	11151,7 ± 2830,2	4280,5 ± 4636,5	0,073
IGFBP-5 (ng/ml)	123,1 ± 50,4	142,2 ± 59,3	0,727
wolny IGF-1	25,8 ± 17,9	19,0 ± 14,6	0,727
wolny IGF-1/IGF-1	0,06 ± 0,05	0,05 ± 0,03	0,909
wolny IGF-1/IGFBP-3	0,005 ± 0,003	0,004 ± 0,004	1,000
wolny IGF-1/IGFBP-5	0,22 ± 0,17	0,12 ± 0,06	0,436
	Grupa badana G1 (n=4)	Grupa kontrolna G1 (n=3)	P
ALS (U/ml)	1503,7 ± 337,3	1518,5 ± 292,1	0,857
ALS (ng/ml)	7519,3 ± 1685,6	7583,7 ± 1445,2	0,857
IGFBP-5 (ng/ml)	157,0 ± 61,8	279,1 ± 159,1	0,400
wolny IGF-1	7,3 ± 4,1	9,8 ± 4,7	0,629
wolny IGF-1/IGF-1	0,04 ± 0,03	0,04 ± 0,03	0,857
wolny IGF-1/IGFBP-3	0,001 ± 0,001	0,002 ± 0,001	0,629
wolny IGF-1/IGFBP-5	0,06 ± 0,06	0,05 ± 0,04	0,857
	Grupa badana G5 (n=2)	Grupa kontrolna G5 (n=2)	P
ALS (U/ml)	1704,1 ± 164,2	912,7 ± 174,9	0,333
ALS (ng/ml)	8520,5 ± 821,0	4563,5 ± 874,7	0,333
IGFBP-5 (ng/ml)	181,4 ± 96,4	274,7 ± 97,3	0,667
wolny IGF-1	42,1 ± 14,7	15,1 ± 14,1	0,333
wolny IGF-1/IGF-1	0,12 ± 0,01	0,03 ± 0,03	0,333
wolny IGF-1/IGFBP-3	0,01 ± 0,00	0,002 ± 0,002	0,333
wolny IGF-1/IGFBP-5	0,25 ± 0,05	0,05 ± 0,03	0,333

Skróty: Th1 – stadium Tanner 1 dla dziewczynek, Th5 – stadium Tanner 5 dla dziewczynek, G1 – stadium Tanner 1 dla chłopców, G5 – stadium Tanner 5 dla chłopców. *Istotność statystyczną zaznaczono kursywą i pogrubieniem.

Tabela 13. Korelacje wybranych parametrów biochemicznych i auksologicznych w grupie badanej.

	Th1 + G1 (n=11)		Th5 + G5 (n=11)		Grupa badana (n=22)	
	R	P	R	P	R	P
IGF-1 a wzrost	0,682	0,021	-0,555	0,077	0,269	0,226
IGF-1 a HSDS	0,419	0,199	0,364	0,272	0,339	0,122
IGF-1 a SD wzrostu	0,391	0,235	0,456	0,159	0,293	0,186
FH a IGF-1	-	-	-0,371	0,291	-	-
IGF-1 a GH	0,232	0,492	0,247	0,465	0,292	0,187
Wolny IGF-1 a wzrost	0,736	0,010	0,160	0,639	0,441	0,040
Wolny IGF-1 a HSDS	0,627	0,039	0,615	0,044	0,607	0,003
Wolny IGF-1 a SD wzrostu	0,327	0,326	0,528	0,095	0,506	0,016
Wolny IGF-1 a BMI	-0,132	0,699	0,731	0,011	0,334	0,129
Wolny IGF-1 a SDS masy ciała	-0,119	0,728	0,635	0,036	0,418	0,053
Wolny IGF-1 a GH	0,073	0,831	-0,140	0,682	-0,105	0,642
FH a wolny IGF-1	-	-	0,657	0,077	-	-
Wolny IGF-1/IGF-1 a BMI	-0,099	0,773	0,566	0,069	0,247	0,267
Wolny IGF-1/IGF-1 a SDS masy ciała	-0,221	0,514	0,354	0,286	0,262	0,238
FH a wolny IGF-1/IGF-1	-	-	0,743	0,035	-	-
Wolny IGF-1/IGF-1 a GH	-0,138	0,687	-0,318	0,340	-0,228	0,307
IGFBP-3 a wzrost	0,638	0,035	-0,618	0,043	0,101	0,655
IGFBP-3 a HSDS	0,263	0,435	0,273	0,417	0,298	0,179
IGFBP-3 a SD wzrostu	0,169	0,620	0,323	0,332	0,284	0,200
FH a IGFBP-3	-	-	-0,280	0,434	-	-
GH a wzrost	0,073	0,831	-0,050	-0,898	0,002	0,995
GH a HSDS	0,000	1,000	-0,050	0,898	-0,044	0,855
GH a SD wzrostu	-0,087	0,800	0,233	0,546	-0,16	0,947
FH a GH	-	-	-0,084	0,844	-	-
IGFBP-5 a IGF-1	-0,645	0,032	0,118	0,729	-0,356	0,104
IGFBP-5 a wolny IGF-1	-0,327	0,326	0,282	0,400	0,047	0,836
IGFBP-5 a IGFBP-3	-0,464	0,151	0,155	0,650	-0,167	0,457
IGFBP-5 a GH	-0,232	0,492	0,142	0,678	-0,051	0,822
IGFBP-5 a SDS masy ciała	-0,023	0,947	0,141	0,679	0,209	0,350
IGFBP-5 a BMI	-0,383	0,245	0,401	0,222	0,157	0,485
IGFBP-5 a wzrost	-0,455	0,160	0,627	0,039	-0,143	0,0526
IGFBP-5 a HSDS	-0,128	0,709	0,409	0,212	0,103	0,647
IGFBP-5 a SD wzrostu	0,082	0,811	0,424	0,194	0,201	0,370
FH a IGFBP-5	-	-	0,693	0,026	-	-
ALS a IGF-1	0,318	0,340	0,091	0,790	0,302	0,172
ALS a wolny IGF-1	0,418	0,201	0,082	0,811	0,343	0,118
ALS a IGFBP-3	0,364	0,272	0,318	0,340	0,358	0,102
ALS a IGFBP-5	-0,082	0,811	-0,100	0,770	-0,003	0,990
ALS a GH	0,109	0,749	-0,333	0,316	-0,070	0,757
ALS a SDS masy ciała	0,169	0,619	0,533	0,091	0,391	0,072
ALS a BMI	0,173	0,611	0,269	0,424	0,375	0,085
ALS a wzrost	0,045	0,894	-0,518	0,102	-0,129	0,566
ALS a HSDS	-0,068	0,842	0,073	0,832	0,015	0,948
ALS a SD wzrostu	-0,009	0,979	0,018	0,958	-0,018	0,936
FH a ALS	-	-	-0,243	0,498	-	-

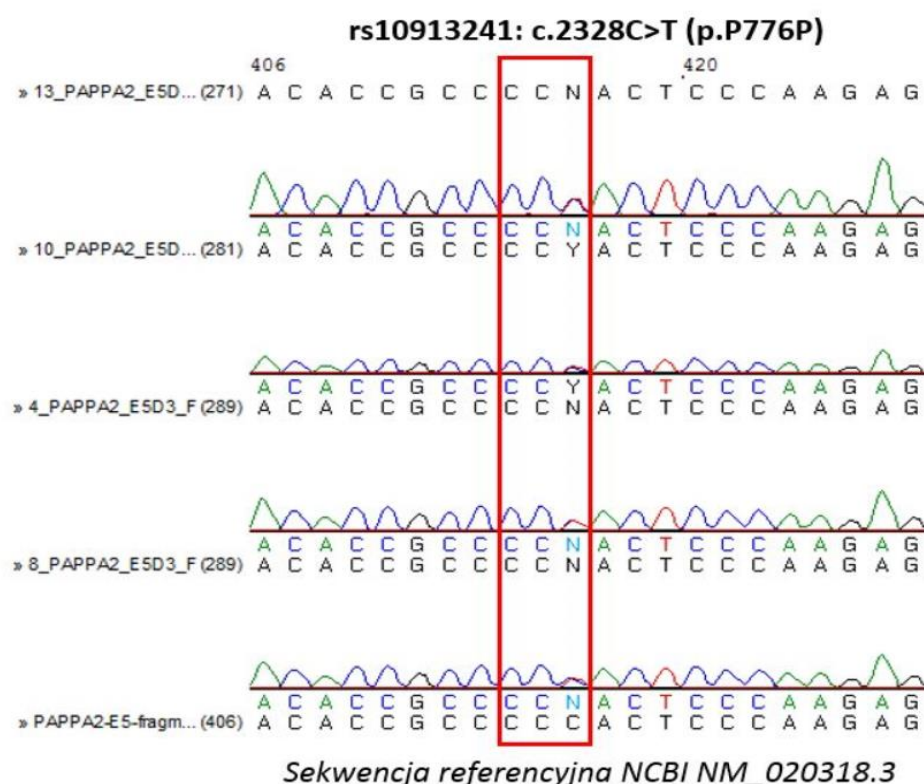
Skróty: Th1 - stadium Tanner 1 dla dziewczynek, Th5 - stadium Tanner 5 dla dziewczynek, G1 - stadium Tanner 1 dla chłopców, G5 - stadium Tanner 5 dla chłopców, FH - wzrost ostateczny (ang. final height).

*Istotność statystyczną zaznaczono kursywą i pogrubieniem.

4.4. Analiza genetyczna

Grupa badana obejmowała 22 pacjentów. U żadnego z pacjentów nie wykazano obecności opisanych wcześniej mutacji w egzonie 3 i 8 (c.3098C>T, p.Ala1033Val w egzonie 8 oraz p.D643fs25* w egzonie 3) ani mutacji w regionach kodujących domenę katalityczną białka PAPP-A2.

U pacjentów nr 4, 8, 10 oraz 13 stwierdzono obecność znanego polimorfizmu c.2328C>T (rs10913241) w układzie heterozygotycznym w egzonie 5, poza miejscem kodującym domenę katalityczną (**Rycina 9**). Polimorfizm ten jest zdeponowany w bazie ExAC (<https://gnomad.broadinstitute.org/>, data dostępu: 10.04.2020) oraz 1000G (<http://www.internationalgenome.org/1000-genomes-browsers/>, data dostępu 10.04.2020) i nie ma znaczenia klinicznego.



Rycina 9. Chromatogram prezentujący obecny u pacjenta nr 4, 8, 10 i 13 polimorfizm genu *PAPP-A2* (rs10913241: c.2328C>T).

5. Dyskusja

Fizjologiczny proces wzrastania podlega wieloczynnikowej kontroli zarówno w aspekcie czynników zewnętrznych, jak i w zakresie udziału wielu czynników genetycznych. Według dostępnych danych 80-90% wzrostu ostatecznego jest dziedziczne (76). Wykazano, iż pojedyncze występowanie częstych wariantów genowych ma minimalny wpływ na wzrost, jednakże w przypadku współwystępowania tychże wariantów obserwuje się ich znaczący wpływ na proces wzrastania (77-78). Rozpoznanie niskorosłości idiopatycznej (ISS) jest rozpoznaniem z wykluczenia innych przyczyn. Na podstawie wywiadu, badania przedmiotowego, diagnostyki laboratoryjnej oraz obrazowej należy wykluczyć: zespoły genetyczne w tym dysplazję kostną, SGA, choroby przewlekłe w tym celiakię, niedokrwistość, niedoczynność tarczycy, choroby zapalne jelit oraz choroby nerek. Ponadto wykluczyć należy choroby endokrynologiczne jak chorobę Cushinga, niedoczynność tarczycy, rzekomą niedoczynność przysadki oraz ostatecznie niedobór hormonu wzrostu. Endokrynolodzy zgodni są co do tego, aby u każdej dziewczynki z ISS, nawet bez charakterystycznych cech fenotypowych, wykonać badanie kariotypu celem wykluczenia zespołu Turnera. Podobne stanowisko dotyczy chłopców z nieprawidłowo rozwiniętymi narządami płciowymi, u których wykluczyć należy aberrację chromosomalną (20). Podobnego konsensusu nie ma w stosunku do mutacji w genie *SHOX*, choć mutacje ww. genu są przyczyną ISS w ok 2,5-5,0% przypadków. Zaleca się aby wykonać analizę genetyczną tylko u pacjentów z cechami fenotypowymi sugerującymi mutację w genie *SHOX* (79), aczkolwiek część pacjentów może nie prezentować charakterystycznych cech fenotypowych i być klasyfikowana jako ISS. W grupie pacjentów z niskorosłością idiopatyczną i potwierdzoną mutacją *SHOX* częściej obserwowano BMI powyżej 50^o, hipertrofię mięśni, skrócenie kończyn oraz pogrubienie nasad kości przedramienia i piszczeli (79). W przypadku rozpoznania rodzinnego niskiego wzrostu, prawdopodobieństwo znalezienia przyczyny genetycznej jest niewielkie (16). W przypadku, gdy wzrost jednego z rodziców dziecka niskorosłego wynosi więcej niż -2 SD, należy pamiętać o możliwości wystąpienia w rodzinie mutacji dziedziczonych w sposób autosomalnie dominujący jak np. hipochondroplazja, mutacje w genie *SHOX* czy mutacje w genie *PAPP-A2*. Ostatnie badania, przeprowadzone na grupie pacjentów spełniających kryteria SGA lub niedoboru hormonu wzrostu, z jednocześnie występującą ciężką rodzinną niskorosłością, ujawniły monogenowe zaburzenie w 52% (17/33 pacjentów) (80). Do

badania w ramach rozprawy doktorskiej zakwalifikowani zostali pacjenci, których wzrost wynosił $-2,0$ SD lub mniej, w przypadku 13 pacjentów wzrost jednego z rodziców wynosił $-2,0$ SD lub mniej.

Powstaje pytanie o to, których pacjentów należy kierować do diagnostyki niskorosłości? Witt i wsp. sugerują, aby w przypadku dzieci między 3 a 10 r.ż. kierować do diagnostyki niskorosłości gdy SDS wzrostu wynosi $<-2,5$ lub gdy SDS wzrostu wynosi <-2 oraz różnica pomiędzy SDS wzrostu dziecka i prognozą rodzicielską wynosi 2 SD a także, gdy obserwuje się utratę tempa wzrastania dziecka o 1 SD (16). Taki klucz diagnostyczny pozwala rozpoznać 85,7% pacjentek z zespołem Turnera oraz 76,5% niskorosłości spowodowanych różnymi chorobami (81). W przypadku dzieci poniżej 3 r.ż. znaczenie kliniczne ma SDS wzrostu $<-3,0$ lub powtarzalny w pomiarach SDS wzrostu $<-2,5$ (81). W przypadku dzieci powyżej 10 r.ż. znaczenie ma SDS wzrostu $<-2,5$ (81).

Historia naturalna pacjentów z niskorosłością idiopatyczną wskazuje na różnego stopnia trudności z osiągnięciem potencjału wzrostowego wynikającego ze wzrostu rodziców. Na przestrzeni lat ukazały się liczne prace podsumowujące wzrost ostateczny dzieci z niskorosłością idiopatyczną (82-85). W grupie pacjentów z FSS średni wzrost ostateczny był mniejszy od tego prognozowanego na podstawie wzrostu rodziców o 2,1 cm w przypadku chłopców oraz o 0,6 cm w przypadku dziewcząt. W grupie tej SDS wzrostu ostatecznego był podobny do SDS wzrostu z okresu przedpokwitaniowego. W grupie pacjentów z nie-FSS średni wzrost ostateczny był mniejszy od wzrostu prognozowanego na podstawie wzrostu rodziców o 8,3 cm w przypadku chłopców oraz o 6,8 cm w przypadku dziewcząt, ale średnie odchylenie standardowe wzrostu ostatecznego było większe niż początkowy HSDS. Zaobserwowano, że średni wzrost ostateczny w grupie chłopców był o kilka centymetrów (2-5 cm) mniejszy niż ten obliczony na podstawie wieku kostnego pacjentów, zaś w grupie dziewcząt średni wzrost ostateczny był zbliżony do tego obliczonego na podstawie wieku kostnego i aktualnego wzrostu w oparciu o metodę Bayley & Pinneau. Wg autora, znaczne opóźnienie wieku kostnego powyżej dwóch lat skutkuje znacznym nadszacowaniem wzrostu ostatecznego, a mniejsze opóźnienie wieku kostnego prowadzi z kolei do niedoszacowania wzrostu ostatecznego i stąd wynikać mogą różnice pomiędzy średnim wzrostem ostatecznym a szacowanym na podstawie aktualnego wzrostu i wieku kostnego (16, 86). W naszej grupie badanej wśród pacjentów, którzy zakończyli proces wzrastania średni wzrost ostateczny był mniejszy od tego obliczonego na podstawie prognozy rodzicielskiej

o średnio 12,4 cm, co jest znacznie większą wartością niż te podane we wcześniejszych doniesieniach na temat wzrostu ostatecznego w grupie pacjentów z nie-FSS. W grupie chłopców różnica ta wynosiła aż 20,5 cm, zaś w grupie dziewcząt 10,4 cm. Średnie odchylenie standardowe wzrostu ostatecznego w grupie badanej było mniejsze niż średnie początkowe odchylenie standardowe wzrostu. Podobnie jak we wcześniejszych doniesieniach, w naszej grupie badanej wzrost ostateczny nie różnił się znacząco od wzrostu prognozowanego na podstawie pierwszej oceny wieku kostnego w grupie dziewcząt. Wśród chłopców z zakończonym procesem wzrastania, w naszej grupie badanej odmiennie niż we wcześniejszych doniesieniach, wzrost ostateczny nie różnił się znacząco od wzrostu prognozowanego na podstawie pierwszej oceny wieku kostnego. Fakt ten może być powiązany z małą liczebnością grupy badanej oraz faktem kwalifikacji do grupy badanej pacjentów ze znacznym niedoborem wzrostu. Bez wątpienia konieczna jest dalsza obserwacja pacjentów z idiopatyczną niskorosłością na większej grupie.

Różnice we wzroście ostatecznym w obrębie populacji przynajmniej w 80% mogą być wyjaśnione przez analizę wielu czynników genetycznych/genów (87). Badania genomowe pozwoliły wykazać, że przynajmniej połowa różnorodności wzrostu ostatecznego w populacji jest spowodowana złożonym efektem polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (single nucleotide polymorphisms; SNPs) (88). Pomimo tego, iż wydaje się, że wiemy już wiele na temat procesu wzrastania, wciąż bardzo dużo kwestii pozostaje niewyjaśnionych, między innymi rola różnych wariantów genowych. Badania wskazują, że SNPs mogą być przyczyną niskorosłości o miernym stopniu nasilenia, zaś w przypadku dzieci z ciężką niskorosłością mają one mniejsze znaczenie (89-90). W dwóch badaniach na grupie dzieci niskorosłych wykazano obecność polimorfizmu liczby kopii (copy number variations: CNVs) u 4-10% badanych, z większym odsetkiem u pacjentów z dodatkowymi malformacjami (76, 91). Inne doniesienia wskazują na mniejszą częstość występowania CNVs w powiązaniu z niskorosłością. Między innymi w badaniach chińskich, w grupie pacjentów z ISS wykazano obecność wariantów patologicznych u 3/119 pacjentów, tj. 2,5 % badanej populacji (92). Inne badania wykazały występowanie CNVs w powiązaniu z niskorosłością u 4% pacjentów z grupy badanej (76). Należy rozważyć tę metodę analizy genetycznej jako pomocną we wskazaniu nowych genów zaangażowanych w regulację procesu wzrastania w grupie pacjentów niskorosłych. Poszerzająca się wiedza na temat przyczyn genetycznych niskorosłości, w tym idiopatycznej, oraz coraz szerszy dostęp do nowych technologii, zarówno badań pojedynczych genów, jak i wybranych paneli genów oraz

sekwencjonowanie całego egzomu przyczyniają się i nadal będą wpływać na lepsze poznanie zagadnienia ISS i minimalizowanie tego rozpoznania. Dzięki badaniom molekularnym, opartym na analizie polimorfizmu liczby kopii, analizie pojedynczego genu czy sekwencjonowaniu całego egzomu możliwe jest obecnie rozpoznanie podłoża molekularnego u 25-40% pacjentów z ISS (93). Badania asocjacyjne całego genomu (genome-wide association studies; GWAS) zidentyfikowały ponad 600 powiązanych wariantów, wpływających na ludzki wzrost (94-96). Sekwencjonowanie następnej generacji (next-generation sequencing; NGS), sekwencjonowanie całego egzomu (whole-exome sequencing; WES) oraz coraz większa dostępność wyżej wymienionych metod, stały się ważnym narzędziem diagnostycznym nie tylko w diagnostyce niskorosłości. Wydaje się, że w przypadku ISS wykorzystanie metody NGS pozostaje nadal wyzwaniem, głównie ze względu na wymóg dużej grupy badawczej w celu wykrycia nowych, rzadkich przyczyn niskorosłości (90). Wyzwaniem i pewnego rodzaju ograniczeniem analizy wielogenowej jest możliwość wykrycia wariantów o nieznanym dotąd wpływie czy patogeniczności i wynikające z tego trudności w interpretacji, wymagające dużego doświadczenia zespołu badawczego. Jednakże w celu postawienia diagnozy taka analiza jest narzędziem bardzo pomocnym. Guo i wsp. wykorzystali sekwencjonowanie egzomu do analizy 14-osobowej grupy pacjentów z niskorosłością (wzrost <-3 SDS), udało im się rozpoznać chorobę monogenową u 5 z 14 pacjentów tj. u 35,7% (97).

Wydaje się, że w przypadku ISS przyczyny monogenowe tego schorzenia, z racji na brak rutynowej diagnostyki genetycznej, są niedoszacowane. Ważne jest podjęcie trudu, aby w jak największej grupie pacjentów z ISS przeprowadzić badania genetyczne dlatego, że postawienie diagnozy może kończyć proces diagnostyczny, oszczędzając czas i pieniądze związane z kolejnymi hospitalizacjami, mającymi na celu ustalenie etiologii. Z drugiej strony, poznanie diagnozy może wiązać się, w przypadku rozpoznania pewnych zespołów, z poszerzeniem diagnostyki o inne zaburzenia charakterystyczne dla danej jednostki chorobowej, przez co można zapobiec lub wyprzedzić rozwinięcie się swoistych powikłań. Rodzinom z udokumentowanym podłożem genetycznym niskorosłości idiopatycznej można udzielić odpowiedniej porady genetycznej. Pewne rozpoznania, jak chociażby mutacja w genie *PAPP-A2*, pozwalają wdrożyć dostępną i skuteczną terapię, gdyż dostępny jest lek w postaci rhIGF1, który może poprawić wzrost ostateczny pacjentów z tym zespołem. Udowodniono bowiem wpływ rhIGF-1 na zmianę

parametrów osi GH-somatomedyny. Po podaniu leku obserwowano bowiem wzrost stężenia całkowitego oraz wolnego IGF-1 średnio na ok. 12 godzin, a u niektórych pacjentów nawet do 24 godzin (65). Przeprowadzone badania sugerują również, że podany rhIGF-1 nie łączy się w kompleks trzeciorzędowy, z którego uwolnienie wolnego IGF-1 jest zaburzone poprzez niedobór białka PAPP-A2, co potwierdza pośrednio poprawa SDS wzrostu i tempa wzrastania leczonych pacjentów (65).

Dauber i wsp. sugerują, aby rozważyć wykonanie badań genetycznych u pacjentów ze wzrostem poniżej -3 SD lub u pacjentów, u których przewidywany wzrost jest poniżej -2 SD od prognozy rodzicielskiej (90). W przypadku, gdy jeden z rodziców jest znacząco niski badania genetyczne mogą ujawnić chorobę dziedziczną w sposób autosomalnie dominujący. Dauber i wsp. proponują również badania genetyczne u dzieci, których oboje rodziców są znacząco niski (wzrost poniżej -3 SD). W przypadku, gdy oboje rodziców prezentują umiarkowaną niskorosłość, a wzrost dziecka plasuje się w zakresie -2 SD w stosunku do prognozy rodzicielskiej bardzo prawdopodobne jest wystąpienie poligenowej przyczyny niskorosłości (90). Podobne wskazania do poszerzenia diagnostyki niskorosłości i analizy genetycznej podkreśla Argente i wsp., sugerując analizę genetyczną u pacjentów ze wzrostem ≤ -3 SD, wzrostem ≤ -2 SD w stosunku do prognozy rodzicielskiej, PAH poniżej 5 cm od prognozy rodzicielskiej, zahamowaniem procesu wzrastania, wiekiem kostnym opóźnionym powyżej dwóch lat, cechami dysmorficznymi, dysproporcjonalną niskorosłością i niskim stężeniem IGF-1 lub IGFBP-3 (98). W przypadku wystąpienia cech fenotypowych, sugerujących określone zaburzenie oraz w przypadku wystąpienia układu parametrów funkcjonowania osi GH-IGF-1, sugerujących prawdopodobny mechanizm genetyczny, wskazana jest analiza określonych genów poprzez ocenę opisanych dotąd mutacji lub analiza panelu genów za pomocą sekwencjonowania następnej generacji (NGS) (98). W przypadku braku potencjalnego rozpoznania analizę genetyczną należy rozpocząć od badania kariotypu oraz badania porównawczej hybrydyzacji genomowej do mikromacierzy (array comparative genomic hybridization; aCGH) (98). W przypadkach ciężkiej niskorosłości, w której nie potrafimy wskazać przyczyny, należy pamiętać o możliwych korzyściach wynikających z analizy całego egzomu (97).

Mogłoby się wydawać, że analiza genów odpowiedzialnych za dobrze opisane zespoły genetyczne z charakterystycznymi cechami fenotypowymi i niskorosłością u pacjentów nieprezentujących danych objawów jest bezpodstawna. Nic bardziej

mylnego. Badania genetyczne pozwoliły w grupie pacjentów z ISS rozpoznać heterozygotyczny wariant bez charakterystycznych cech fenotypowych w genie *NPR2*, który w postaci homozygotycznej jest odpowiedzialny za ciężką, recesywną akromezomeliczną dysplazję typu Maroteaux. Podobnie w przypadku mutacji w genie *FGFR3* odpowiedzialnym m.in. za achondroplazję, hipochondroplazję oraz inne dysplazje kostne (99-100). Tym bardziej ważne jest poszukiwanie nowych przyczyn niskorosłości, dotąd klasyfikowanej jako idiopatyczna, szczególnie gdy zdiagnozuje się jednostkę chorobową, dla której znane jest lub możliwe jest zastosowanie skutecznej i dostępnej terapii. Identyfikacja pacjentów, wymagających poszerzenia diagnostyki genetycznej, bez wątpienia pozostaje jednym z największych wyzwań w opiece nad pacjentem z niskorosłością idiopatyczną. Zadania z pewnością nie ułatwia fakt braku lub miernej ekspresji objawów mogących sugerować zaburzenie w określonych genach.

Pomocnym kryterium oceny pacjentów niskorosłych pozostaje szacowany wzrost ostateczny na bazie wieku kostnego. W długoterminowych badaniach pacjentów z ISS zaobserwowano, iż wzrost ostateczny szacowany na podstawie wieku kostnego opóźnionego o ok. 2 lata był zbliżony do średniego rzeczywistego wzrostu ostatecznego. W przypadkach gdy nie obserwowano opóźnienia wieku kostnego ostateczny wzrost pacjentów przekraczał ten szacowany, zaś gdy wiek kostny był opóźniony o więcej niż 2 lata, ostateczny wzrost był niższy niż ten szacowany na jego podstawie (101). W naszej grupie badanej wśród pacjentów, którzy zakończyli proces wzrastania u żadnego z pacjentów nie obserwowano wieku kostnego opóźnionego o więcej niż dwa lata. W grupie pacjentów z opóźnieniem wieku kostnego pomiędzy 1,5 roku a 2 lata (2/10), dwoje z nich uzyskało wzrost ostateczny wyższy od prognozowanego na podstawie wieku kostnego (PAH), odpowiednio o 1,0 i 1,2 cm (**Tabela 4** i **Tabela 6**). Moim zdaniem nie należy zakładać błędu pomiaru w przypadku pacjentów, którzy uzyskali wyższy wzrost ostateczny niż prognozowany, ze względu m.in. na standaryzację pomiaru. Niemniej jednak grupa pacjentów jest niewielka, co bez wątpienia wymaga dalszej obserwacji na większej grupie pacjentów z niskorosłością idiopatyczną, by móc potwierdzić pewne różnice z obecnymi w literaturze danymi. U pięciorga pacjentów (5/10) opisano wiek kostny zgodny z wiekiem metrykalnym lub opóźniony o mniej niż jeden rok. U czwórki pacjentów wzrost ostateczny był zbliżony lub taki jak był prognozowany na podstawie wieku kostnego (PAH). W przypadku jednego pacjenta różnica wynosiła 0,3 cm, u kolejnego zaś wzrost ostateczny był niższy o 1,5 cm (**Tabela**

4 i Tabela 6). Dane te również nie są spójne z dostępnymi w literaturze, ponieważ pacjenci z ISS bez wyraźnego opóźnienia wieku kostnego wg wcześniejszych obserwacji osiągnęli wyższy wzrost ostateczny niż ten prognozowany na podstawie wieku kostnego. U trójki pacjentów (3/10) wiek kostny oceniono na zaawansowany w stosunku do wieku metrykalnego. Dwoje z nich osiągnęło wzrost ostateczny wyższy niż prognozowano, odpowiednio o 0,9 i 1,0 cm, zaś jeden z nich osiągnął wzrost ostateczny niższy o 1,7 cm w porównaniu do prognozowanego. Obserwowane różnice, pomiędzy grupą badaną a doniesieniami literaturowymi, związane są z niewielką liczebnością grupy badanej oraz z faktem, iż maksymalne przyśpieszenie wieku kostnego wynosiło 1,5 roku. Wymagane są więc dalsze obserwacje na większej grupie pacjentów z niskorosłością idiopatyczną.

Proces dojrzewania chrząstki wzrostowej jest procesem wieloetapowym, bardzo złożonym, zależnym od wielu czynników, począwszy od ekspresji odpowiednich genów pozwalających na przejście z jednego etapu do następnego, poprzez działanie czynników transkrypcyjnych oraz udział czynników hormonalnych wpływających na jego przebieg. Dodatkowo istnieje wiele poznanych i prawdopodobnie o wiele więcej niepoznanych czynników modulujących ten proces. Możemy tutaj wyróżnić czynniki, które promują dojrzewanie chrząstki wzrostowej, jak i takie, które wykazują działanie hamujące. Zarówno zaburzenia powodujące zwiększoną ekspresję, jak i te powodujące zmniejszoną ekspresję danych czynników będą miały wpływ na proces dojrzewania chrząstki wzrostowej. Pomimo prowadzonych przez dekady prac badawczych jest to proces nadal nie do końca poznany i rozumiany. Somatomedyny odgrywają istotną rolę w przedostatnim etapie dojrzewania chrząstki wzrostowej. Brak przekąźnictwa sygnału indukowanego pierwotnie przez IGF-1 wiąże się z istotnym zmniejszeniem długości kości. W obrębie chrząstki wzrostowej ilość chondrocytów i ich proliferacja pozostają na podobnym poziomie jak w grupie z prawidłową transdukcją sygnału IGF-1, zmienia się zaś poziom hipertrofii chondrocytów nawet o 30% (102-104). Ostateczny etap dojrzewania chrząstki wzrostowej związany jest z procesem waskularyzacji, pozwalającym zakończyć proces fuzji przynasad. Istotnym czynnikiem modelującym ten etap jest naczyniowo-nabłonkowy czynnik wzrostu (vascular endothelial growth factor; VEGF) (105-106). Kluczowymi czynnikami pozwalającymi przejść do etapu waskularyzacji chrząstki wzrostowej są naskórkowy czynnik wzrostu (epidermal growth factor; EGF) oraz transformujący czynnik wzrostu alfa (transforming growth factor; TGF α). Oba działające przez receptor dla naskórkowego czynnika wzrostu (107).

Z uwagi na złożoność procesu dojrzewania kośćca trudno jest wybrać jego najważniejsze regulatory. Znany jest wpływ hormonu wzrostu, który działa zarówno bezpośrednio jak i pośrednio poprzez aktywność somatomedyn. Znany jest wpływ hormonów tarczycy, które modulują dojrzewanie chrząstki wzrostowej poprzez wpływ na szlak transdukcijny Wnt/beta-katenina (108). Dobrze poznany jest również wpływ estrogenów na dojrzewanie chrząstki wzrostowej, które poprzez wzrost ekspresji VEGF przyczyniają się do awansu wieku kostnego (109). Obecność estrogenów wydaje się być jednym z kluczowych elementów dla prawidłowego przebiegu skoku pokwitaniowego i awansu wieku kostnego. W początkowym etapie dojrzewania płciowego mniejsze stężenia estrogenów wpływają na rozwój skoku pokwitaniowego, głównie poprzez pozytywny wpływ na działanie osi GH-IGF1, nie zaś poprzez bezpośrednie oddziaływanie na receptor dla estrogenów (estrogen receptor; ER) w obrębie chrząstki wzrostowej (110). Działanie poprzez ER ma kluczowe znaczenie dla fuzji przynasad w okresie późnego dojrzewania płciowego i wiąże się z większymi stężeniami estrogenów (110). Fakt ten potwierdza brak fuzji przynasad u pacjentów z mutacją nieaktywną (loss-of-function; LOF) w genie dla ER. Istotność działania estrogenów dla dojrzewania chrząstki przynasadowej zaobserwować można również na przykładzie pacjentek z zespołem Turnera, gdzie na pewnym etapie, stosując jedynie terapię rhGH nie jesteśmy w stanie uzyskać większego przyrostu wzrostu. Dopiero dodanie substytucji estrogenowej pozwala poprawić tempo wzrastania, ale jednocześnie przyspiesza się wiek kostny. Działanie androgenów poprzez zjawisko aromatyzacji do estrogenów, zwiększenie stężenia i nasilenie wydzielania pulsacyjnego GH a w konsekwencji IGF-1, jak i poprzez wpływ na miejscową ekspresję IGF-1 czy IGFR oraz bezpośrednie działanie za pomocą receptora dla androgenów, odgrywa kluczową rolę dla procesu dojrzewania kośćca (109). Istotność kliniczną obecności androgenów i estrogenów na wiek kostny można zaobserwować na grupie pacjentów z przedwczesnym dojrzewaniem płciowym, gdzie ocena wieku kostnego ma istotne znaczenie dla klinicysty. Pacjentka nr 10 jako jedyna była dzieckiem, u którego zdiagnozowano przedwczesne dojrzewanie płciowe GnRH-zależne. Oceniono również sekrecję hormonu wzrostu, która była obniżona, a jednocześnie obserwowano prawidłowe stężenie IGF-1. Pomimo to jej skok wzrostowy polegał na zmianie w obrębie siatki centylowej z pozycji poniżej 3 centyla na pozycję pomiędzy 3 a 10 centylem. Jej obecny wzrost wynosi 139,5 cm, co dla danego wieku wynosi -4 HSDS, jeśli będzie to wzrost ostateczny to HSDS wyniesie w przybliżeniu -4,5. Wy tłumaczeniem takiego stanu może być występowanie częściowej oporności na

IGF-1, a być może również częściowe zaburzenie w obrębie chrząstki wzrostowej w zakresie działania estrogenów, gdyż pomimo objawów przedwczesnego dojrzewania płciowego, pokwitaniowego stężenia estrogenów, prawidłowego stężenia IGF-1 oraz wdrożenia leczenia analogiem GnRH oraz rhGH u tej pacjentki obserwuje się znaczny niedobór wzrostu.

Ocena stężenia takich czynników jak IGF-1, wolny IGF-1, GH czy białek wiążących IGF w surowicy nie mówi nam o ich aktywności w obrębie chrząstki wzrostowej. Pewną wskazówką odnośnie ewentualnej oporności w obrębie chrząstki wzrostowej może być wyraźnie podwyższone stężenie danych czynników, lecz bez badania samej chrząstki wzrostowej nie jesteśmy w stanie ocenić miejscowej funkcji ww. czynników.

Zastanawiający jest brak wpływu prowzrostowego IGF-1 w grupie badanej z jednocześnie zbliżonym do wieku metrykalnego, adekwatnym lub nawet przyspieszonym wiekiem kostnym. Czy istnieje możliwość częściowej oporności na IGF-1? Oporności tylko w zakresie promocji wzrostu kości, jednocześnie utrzymując zdolność do awansu wieku kostnego? A być może znaczenie odgrywają inne czynniki, które wpływają dodatkowo na progresję wieku kostnego. Być może na poziomie chrząstki wzrostowej działają czynniki, które hamują lub uniemożliwiają właściwe działanie IGF-1 lub działają czynniki, które promują wcześniejszą waskularyzację chrząstki wzrostowej? Te i inne pytania nadal pozostają bez odpowiedzi i wymagają dalszych badań.

Ważnym aspektem oceny pacjenta z niskorosłością pozostają normy, do których odnosimy wzrost pacjenta. Najlepsze dla analizy wzrostu pozostają siatki centylowe z kraju pochodzenia pacjenta. Jeśli niedostępne są siatki lokalne, wtedy należy wykorzystać siatki centylowe stworzone przez Światową Organizację Zdrowia (World Health Organization; WHO). W przypadku imigrantów w pierwszym pokoleniu należy używać siatek centylowych z kraju pochodzenia dziecka, w drugim pokoleniu siatek centylowych stworzonych dla populacji, w której pacjenta wychowywano.

W wielu krajach europejskich oraz w Stanach Zjednoczonych rekomendowane jest leczenie ludzkim rekombinowanym hormonem wzrostu (rhGH) pacjentów z ISS. W części tych państw rozważa się leczenie, gdy wzrost mieści się poniżej -2,25 SDS, tempo wzrastania jest niedostateczne oraz wykluczono inne schorzenia mogące być

przyczyną niskorosłości. Wytyczne Pediatric Endocrine Society wskazują, aby leczenie rhGH u każdego pacjenta z niskorosłością idiopatyczną rozpatrywać indywidualnie, z uwzględnieniem korzyści i zagrożeń wynikających z zastosowanej terapii. Podkreślone jest aby nie decydować o leczeniu tylko na podstawie HSDS spełniającego kryteria rozpoczęcia terapii oraz by po 12 miesiącach terapii ocenić uzysk wzrostu poprzez ocenę HSDS oraz ocenić wpływ leczenia na aspekt psychologiczny i by w przypadkach braku poprawy HSDS zakończyć terapię (111). Niskorosłość idiopatyczna jest grupą bardzo heterogenną, w związku z tym odpowiedź na leczenie rhGH również jest zróżnicowana i bardzo zindywidualizowana. Na podstawie dostępnych danych, w tej grupie można wyróżnić pacjentów, u których poprzez zastosowanie terapii poprawiono wzrost ostateczny o średnio 4-5 cm (2,3-8,7) po pięciu latach leczenia rhGH. Mimo to u wielu pacjentów wzrost ostateczny znajdował się poniżej -2 SDS. W niektórych przypadkach nie odnotowano żadnej zmiany w zakresie wzrostu ostatecznego (112). W badaniach Zadik i Zung u 2/16 pacjentów FH SDS było mniejsze niż PAH SDS, -2,6 vs -2,3 oraz -3,1 vs -1,7 (113). Bernasconi i wsp. w swojej analizie udowodnili, że w przypadku pacjentów z ISS leczonych rhGH w okresie pokwitania FH SDS jest mniejsze niż PAH SDS, $-1,7 \pm 0,13$ vs $-1,29 \pm 0,2$ (114). Pediatric Endocrine Society zaleca aby u pacjentów z niskorosłością idiopatyczną rozpoczynać leczenie rhGH w dawce 0,24 mg/kg/tydzień (0,034 mg/kg/dobę), przy czym zaznaczono, iż niektórzy pacjenci mogą wymagać zwiększenia dawki do 0,47 mg/kg/tydzień (0,067 mg/kg/dobę), co jest bardzo wysoką dawką (111). Z uwagi jednak na podkreślaną heterogenność grupy pacjentów z ISS nie odnotowano wyraźnego związku pomiędzy dawką rhGH a zmianą HSDS (115). Z pewnością konieczne są długookresowe badania oceniające wpływ terapii rhGH na występowanie chorób nowotworowych czy śmiertelności w tej specyficznej grupie pacjentów. Obecnie dostępne są dane z badania francuskiego, w którym przebadano 6500 młodych dorosłych leczonych z powodu niedoboru hormonu wzrostu, zbyt małej masy urodzeniowej lub ISS hormonem wzrostu w trakcie dzieciństwa. W grupie tej odnotowano zwiększone ryzyko śmiertelności z powodu nowotworu kości, chrząstki oraz incydentów sercowo-naczyniowych (116). W badaniu na podobnej grupie pacjentów z Belgii, Szwecji i Holandii nie wykazano żadnego przypadku zgonu z powodu choroby nowotworowej czy incydentów sercowo-naczyniowych (117). Analizy prowadzone były na grupie, która składała się z pacjentów zarówno z rzeczywistym niedoborem hormonu wzrostu jak i pacjentów bez niedoboru hormonu wzrostu. Niezbędne są dane na grupie pacjentów z ISS leczonych rhGH. Konieczne są również badania długofalowe, oceniające

odległe następstwa leczenia rhGH szczególnie w grupie pacjentów, u których nie występuje rzeczywisty niedobór hormonu wzrostu tylko próbuje się przełamać swoistą oporność tkankową na działanie hormonu wzrostu. Należy pamiętać, że poprzez stosowanie rhGH przyspieszamy również wiek kostny, przez co efekt w postaci okresowej poprawy tempa wzrastania może być ostatecznie nie zauważalny w poprawie wzrostu ostatecznego i zniwelowany przez awans wieku kostnego.

Jednym z kryteriów rozpoznania niskorosłości idiopatycznej jest wykluczenie znanych przyczyn niskorosłości, w tym wykluczenie SGA/IUGR. Badania jednak pokazują, iż nie zawsze należy wykluczać pacjentów z niską masą urodzeniową z grupy badanej. W przypadku opisu dwóch pierwszych rodzin z mutacją w genie *PAPP-A2*, masę urodzeniową dwojga z pięciu dotkniętych mutacją dzieci można było określić jako łagodny niedobór masy urodzeniowej. Podobnie u myszy pozbawionych genu *PAPP-A2* w obu allelach (*PAPP-A2* KO) obserwowano zmniejszenie masy urodzeniowej o ok. 30-40% w stosunku do typu dzikiego (WT) (118).

Pół wieku temu po raz pierwszy opisano czynniki stymulujące wzrost, które wykazywały aktywność podobną do insuliny, a dziś nazywane są somatomedynami czy insulinopodobnymi czynnikami wzrostu. W latach 70-tych stworzono pierwsze zestawy oceniające stężenie IGF-1 metodą radioimmunologiczną. Dzisiaj endokrynolodzy dziecięcy nie wyobrażają sobie oceny wzrastania, jak i skuteczności i bezpieczeństwa terapii rhGH właśnie bez oceny stężenia IGF-1. Oceniając stężenie IGF-1 oceniamy jego całkowite stężenie, czyli tak naprawdę stężenie somatomedyny niewykazującej aktywności klinicznej. W związku z tym, jak i z faktem, iż oceniamy stężenie IGF-1 w surowicy a nie oceniamy stężenia czy aktywności IGF-1 na poziomie chrząstki wzrostowej, czyli miejsca faktycznego działania somatomedyn, naukowcy stworzyli zestawy do oceny stężenia wolnego IGF-1, wiążąc z nim ogromne nadzieje. Chapman i wsp. wykazali, iż wolny IGF-1 a nie całkowity IGF-1 kontroluje wydzielanie hormonu wzrostu indukowane głodem (119). Im większy jest spadek stężenia wolnego IGF-1 tym większy wzrost stężenia GH (120). Badania pokazały, iż w grupie pacjentów z całkowitym jak i częściowym niedoborem hormonu wzrostu oznaczenie wolnego IGF-1 charakteryzuje się mniejszą czułością niż oznaczenie całkowitego IGF-1 (9). Nie wykazano przewagi oznaczenia wolnego IGF-1 nad całkowitym, w związku z tym nie ma przesłanek do wprowadzenia w rutynowej diagnostyce niskorosłości oznaczenia wolnego IGF-1 (121). Prowadzone były również badania oceniające stężenia wolnego

IGF-1 w trakcie leczenia rhGH pacjentów z niedoborem hormonu wzrostu oraz w trakcie leczenia pacjentów z akromegalią. W trakcie terapii rhGH obserwowano mniejszą fluktuację wzrostu stężenia wolnego IGF-1 niż w przypadku całkowitego IGF-1 (122). W trakcie leczenia hormonem wzrostu pacjentów z jego niedoborem obserwowano znaczący wzrost stężenia wolnego IGF-1 po 6 miesiącach terapii, następnie stężenie wolnego IGF-1 utrzymywało się na podobnym, stałym poziomie, prawdopodobnie jako mechanizm kompensacyjny (123). Kawai i wsp. sugerowali, iż na podstawie zmiany stężenia wolnego IGF-1 (przyrostu) po 1 miesiącu terapii rhGH można próbować przewidzieć odpowiedź na leczenie rhGH w postaci tempa wzrastania po 1 roku terapii (stosunek tempa wzrastania w pierwszym roku terapii/tempo wzrastania przed leczeniem rhGH), ze względu na istotną statystycznie korelację pomiędzy tymi parametrami (8). W trakcie leczenia pacjentów z akromegalią obserwowano spadek stężenia wolnego IGF-1 zbliżony do spadku stężenia całkowitego IGF-1 (124). W przypadku pacjentów z otyłością należy pamiętać o tym, iż stężenie wolnego IGF-1 może być większe, co wiąże się z supresyjnym działaniem insuliny na stężenie IGFBP-1, zaś stężenie IGF-1 wg doniesień może być zarówno obniżone, podwyższone jak i w granicach normy. Dane literaturowe są w tej kwestii sprzeczne, część badań potwierdza tę hipotezę, a część ją zaprzecza (125-126). W przypadku naszej grupy badanej u jednej pacjentki rozpoznano otyłość, w jej przypadku stężenie wolnego IGF-1 było podwyższone (**Tabela 6**), przy czym stosunek wolnego IGF-1 do całkowitego IGF-1 był tylko nieco podwyższony (0,04) w porównaniu do wartości referencyjnych (0,02). Kamoda i wsp. w swoich badaniach oceniających stężenie wolnego IGF-1, całkowitego IGF-1 oraz IGFBP-1 w grupie 19 pacjentów z niskorosłością idiopatyczną w porównaniu z grupą kontrolną uzyskali stężenia wolnego IGF-1 istotnie statystycznie mniejsze ($p < 0,05$), zaś stężenie całkowitego IGF-1 mniejsze, lecz bez istotności statystycznej. Grupa badana i kontrolna składały się jedynie z pacjentów w okresie przedpowitaniowym, biorąc pod uwagę płeć również obserwowano istotną statystycznie różnicę stężeń wolnego IGF-1 pomiędzy grupą badaną i kontrolną (127). Jull i wsp. przeprowadzili badanie stężenia wolnego IGF-1 na grupie 1430 zdrowych dzieci i dorosłych i wykazali, iż stężenie wolnego IGF-1 pozostaje niskie w okresie niemowlęcym oraz w okresie wczesnego dzieciństwa, następnie wzrasta z największym średnim stężeniem w okresie pokwitania i wraca do poziomu podobnego jak w okresie przedpokwitaniowym, nie zmieniając się dalej z wiekiem (10). W grupie przedpowitaniowej u 3,3% pacjentów stężenie wolnego IGF-1 było poniżej progu wykrywania, pomimo iż nie rozpoznano u nich niedoboru hormonu

wzrostu (10). W grupie pediatrycznej odnotowano różnice w zależności od płci, u dziewcząt wzrost stężenia wolnego IGF-1 obserwowano 1-2 lata wcześniej niż u chłopców co pokrywa się z fizjologicznym przebiegiem dojrzewania płciowego. Poza tym u dziewcząt obserwowano stężenie wolnego IGF-1 znacząco większe niż u chłopców. Takich różnic ze względu na płeć nie obserwowano w populacji dorosłych (10). Podobne wyniki uzyskali badacze japońscy na grupie 354 zdrowych dzieci (8). Kawai i wsp. zaobserwowali, iż w okresie niemowlęcym stosunek wolnego IGF-1/IGF-1 jest znamienne większy i związane jest to z szybkim wzrostem jaki obserwowany jest w tym okresie życia i zwiększoną konwersją somatomedyn do formy aktywnej (8).

W naszej grupie badanej podobnie jak w dostępnych w literaturze doniesieniach, większe wartości stężenia wolnego IGF-1 uzyskano w grupie dziewczynek zarówno w grupie badanej jak i kontrolnej, poza podgrupą w stadium dojrzewania płciowego Tanner 5, gdzie większe wartości odnotowano wśród chłopców. Jednak grupa chłopców w tym stadium dojrzewania płciowego składała się tylko z dwóch pacjentów, a więc konieczne są dalsze badania na większej grupie, aby wyciągać właściwe wnioski. Płeć wykazała istotny statystycznie wpływ na stężenie wolnego IGF-1 w grupie pacjentów w stadium dojrzewania płciowego Tanner 1. Wykazano pozytywną korelację pomiędzy stężeniem wolnego IGF-1 a wzrostem, HSDS oraz SD wzrostu oraz stosunkiem wolny IGF-1/IGF1 a wzrostem ostatecznym w grupie pacjentów, którzy zakończyli proces wzrastania (**Tabela 13**). W grupie badanej stężenie wolnego IGF-1 lepiej korelowało ze wzrostem, HSDS oraz SD dla wzrostu niż stężenie IGF-1 co może być wykorzystane przy analizie krzywej wzrastania oraz próbie oszacowania wzrostu ostatecznego pacjentów z ISS.

Jull i wsp. w swoich badaniach oceniali stężenie wolnego IGF-1 przy użyciu metody radioimmunometrycznej (Diagnostic System Laboratories, Webster TX). Nie może być to jednak przyczyna różnic w uzyskanych wynikach, szczególnie w zakresie różnic pomiędzy płcią. Jull i wsp. oceniali stężenie wolnego IGF-1 w grupie ok. 800 zdrowych dzieci, a nasze grupy: kontrolna i badana były niewielkie. Z pewnością należy poszerzyć badania na grupach większych, bardziej reprezentatywnych. Dauber i wsp. w swojej pracy do oceny stężenia wolnego IGF-1, IGF-1, IGF-2, IGFBP-3 oraz IGFBP-5 użyli metody ELISA, stosując do oceny wolnego IGF-1 zestaw (Ansh Labs, Webster, TX, USA), przy pomocy którego oceniane było również stężenie wolnego IGF-1 w grupie badanej i kontrolnej (61).

Dwie pacjentki (nr 4 i nr 9) z grupy w stadium dojrzewania płciowego Tanner 5 oraz jedna (nr 21) w stadium dojrzewania płciowego z grupy Tanner 1 uzyskały wartości wolnego IGF-1 oraz stosunku wolny IGF-1/IGF-1 w zakresie wartości referencyjnych. Pozostali pacjenci z grupy badanej uzyskali wartości powyżej zakresu referencyjnego dla opisanego stadium dojrzewania płciowego. Pomimo wartości większych od zakresu referencyjnego dla danego stadium dojrzewania płciowego pacjent nr 14 uzyskał wartość stosunku wolny IGF-1/IGF-1 w zakresie opisywanej wartości referencyjnej i jest to związane z bardzo wysokim stężeniem IGF-1. Trójka pacjentów, pacjentka nr 15 z grupy w stadium dojrzewania płciowego Tanner 1 oraz pacjentka nr 5 i nr 19 z grupy w stadium dojrzewania płciowego Tanner 5, przy większych wartościach stężenia wolnego IGF-1 niż zakres referencyjny dla danego stadium dojrzewania płciowego, uzyskały wartości stosunku wolny IGF-1/IGF-1 nieco powyżej zakresu referencyjnego (0,03). Wartości stężenia wolnego IGF-1 u dziewiętnastu (19/22) pacjentów przekraczały wartości referencyjne dla stadium dojrzewania płciowego. U czwórki (4/22) pacjentów wartości te były przekroczone o mniej lub jednokrotnie. U ośmiorga pacjentów (8/22) przekroczone je mniej niż pięciokrotnie. W przypadku kolejnej czwórki pacjentów (4/22) wartości zostały przekroczone od pięcio- do dziesięciokrotnie. Trójka pacjentów (3/22) uzyskała wartości przekroczone aż dziesięciokrotnie, a grupę tę tworzyły pacjentki z stadium dojrzewania płciowego Tanner 1. W grupie, w której znacznie przekroczone została wartość stężenia wolnego IGF-1 (powyżej dziesięciokrotnie) stężenie IGF-1 znajdowało się powyżej 50c a maksymalne wartości stężenia hormonu wzrostu wynosiły odpowiednio 12,6 ng/ml, 21,7 ng/ml i 14 ng/ml (**Tabela 7**). Z uwagi na charakter grupy badanej, progresywną utratę tempa wzrastania i ciężką niskorosłość idiopatyczną wydaje się, iż uzyskane wartości stężenia wolnego IGF-1 mogą świadczyć o oporności tkanek obwodowych na działanie IGF-1, co może potwierdzać wysokie stężenie IGF-1, wolnego IGF-1 oraz brak adekwatnego do ich stężenia tempa wzrastania. Mutacje w genie dla receptora dla IGF-1 (*IGF-1R*) są bardzo rzadkie i charakteryzują się znacznym niedoborem masy i długości urodzeniowej, małą głową oraz ciężką niskorosłością z HSDS na poziomie -7 (128). Żaden z naszych pacjentów nie prezentuje aż tak skrajnie nasilonej niskorosłości. Nie wyklucza to jednak stanu nosicielstwa mutacji w genie dla *IGF1R* czy występowania łagodniejszego wariantu. Możliwe jest również wystąpienie zaburzenia procesu transdukcji sygnału postreceptorowego, co może mieć miejsce u pacjentów z grupy badanej.

Odnotowano również, iż stężenie wolnego IGF-1 koreluje znacząco statystycznie z maksymalną wartością wyrzutu hormonu wzrostu. Dodatkowo jego stężenie znacząco przewiduje odpowiedź w zakresie sekrecji hormonu wzrostu w testach stymulacyjnych w populacji dorosłych leczonych hormonem wzrostu w dzieciństwie z powodu niedoboru hormonu wzrostu. Oznaczenie wolnego IGF-1 w porównaniu z oznaczeniem standardowym stężenia IGF-1 oraz IGFBP-3 w tej grupie nie niesie jednak za sobą żadnych dodatkowych korzyści (10). W grupie badanej nie wykazano wystąpienia korelacji pomiędzy stężeniem IGF-1 a stężeniem hormonu wzrostu, stężeniem wolnego IGF-1 a stężeniem hormonu wzrostu oraz wartością stosunku wolny IGF-1/IGF-1 a stężeniem hormonu wzrostu (**Tabela 13**).

Zgodnie z doniesieniami literaturowymi wraz z wiekiem obserwuje się spadek stężenia IGFBP-5. W grupie dziewcząt pomiędzy 9 a 15 rokiem życia badacze obserwowali istotnie statystycznie większe stężenia w porównaniu z grupą kobiet w wieku 23-85 lat, podobną zależność spadku stężenia od wieku obserwowano w przypadku IGFBP-3 (129). W grupie pacjentów powyżej 16 r.ż. nie odnotowano różnicy w stężeniu IGFBP-5 pomiędzy mężczyznami a kobietami, a średnia wartość wynosiła 200 ng/ml. Obserwowano spadek stężenia tego białka o ok 50% w trakcie trwania ciąży (3, 130). W literaturze opisano pozytywną korelację pomiędzy stężeniem IGFBP-5 a IGF-1, IGF-2 oraz ALS. W przypadku kwasolabilnej podjednostki korelacja ta była jednak mniejsza niż w przypadku stężenia IGFBP-3 (3). Nie odnotowano korelacji pomiędzy stężeniem IGFBP-3 a IGFBP-5 (3). W grupie badanej wykazano negatywną korelację pomiędzy stężeniem IGFBP-5 a stężeniem IGF-1, nie wykazano korelacji pomiędzy stężeniem IGFBP-5 a wolnym IGF-1, IGFBP-3 oraz ALS. U wszystkich pacjentów z grupy badanej obserwowano obniżone wartości IGFBP-5 w porównaniu z dostępnymi normami. W grupie kontrolnej tylko wśród chłopców odnotowano stężenia w granicach wartości referencyjnych. Porównując chłopców z grupy badanej z grupą kontrolną nie odnotowano większych stężeń wolnego IGF-1 w grupie badanej. Przy mniejszych wartościach IGFBP-5 obserwowano odwrotną zależność, stężenie wolnego IGF-1 wśród chłopców z grupy kontrolnej było również większe niż w odpowiedniej grupie badanej (**Tabela 10**). W zakresie stężenia IGFBP-5 odnotowano istotną statystycznie różnicę pomiędzy grupą badaną a kontrolną. Być może wartości IGFBP-3 równe lub większe od 90c, w przypadku 15 z 22 pacjentów grupy badanej, są wynikiem kompensacyjnego wzrostu stężenia IGFBP-3 w stosunku do obniżonych wartości

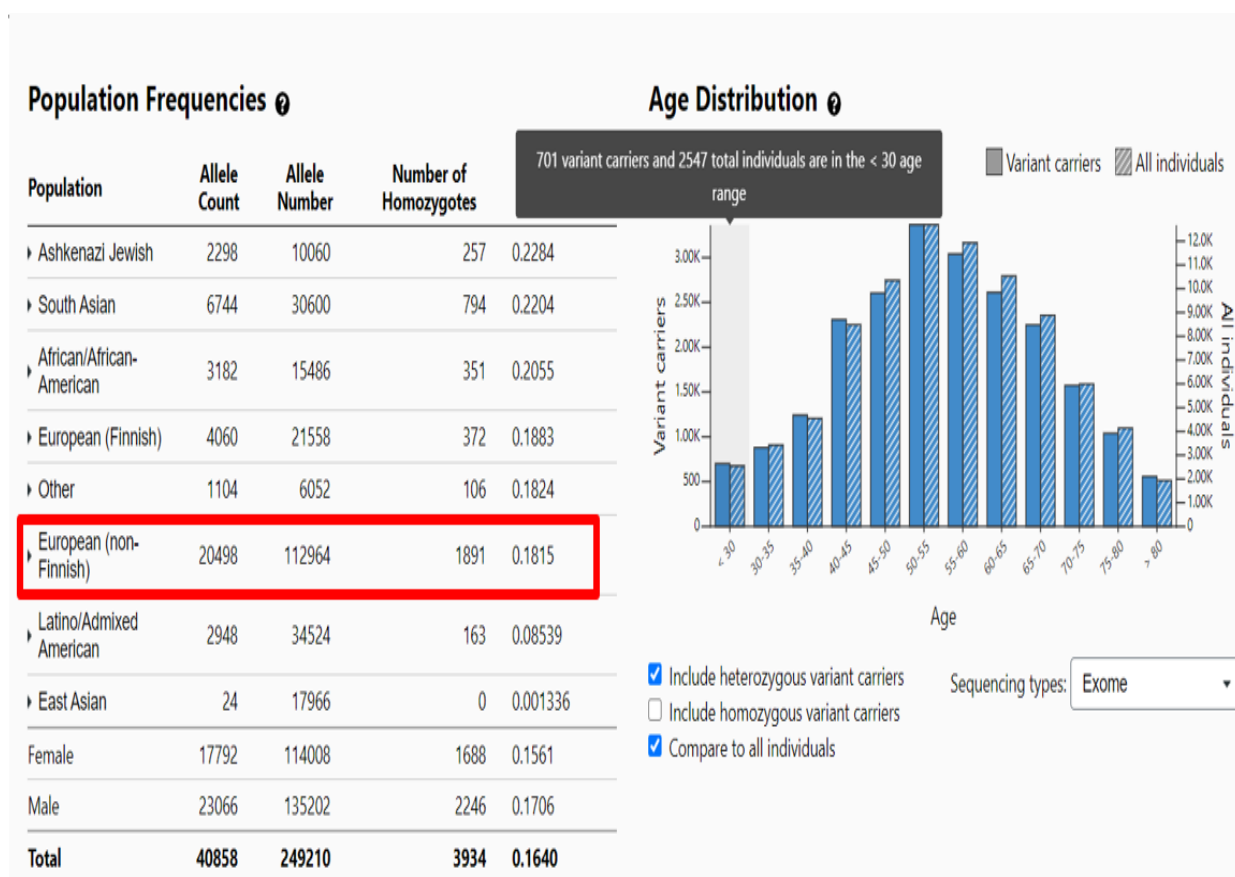
IGFBP-5. Do tej pory w literaturze nie opisano przypadku niskorosłości z udowodnioną mutacją w genie kodującym którekolwiek z białek wiążących insulinopodobne czynniki wzrostu.

W dokonanej analizie statystycznej płeć wykazała istotny statystycznie wpływ na stężenia wolnego IGF-1, wartość stosunku wolny IGF-1/IGFBP-3 oraz wartość stosunku wolny IGF-1/IGFBP-5 w grupie pacjentów w stadium dojrzewania płciowego Tanner 1 (**Tabela 11**). W literaturze brak jest doniesień na temat wykorzystania wartości tych poszczególnych relacji w analizie pacjentów z niskorosłością idiopatyczną. Wykazano również istotną statystycznie różnicę pomiędzy grupą badaną i grupą kontrolną, podobnie jak w zakresie stężenia IGFBP-5 (**Tabela 12**). Wydaje się, iż wykazana istotność statystyczna ściśle związana jest z wykazaniem istotności statystycznej jednej z składowych wyliczonych stosunków.

Stężenie kwasolabilnej podjednostki (ALS) stopniowo wzrasta w dzieciństwie, osiągając największe wartości w trakcie pokwitania. Największy poziom w przypadku dziewcząt obserwowany jest 2 lata wcześniej niż u chłopców. Zależność tę zaobserwowano zarówno w grupie pacjentów z prawidłowym wzrastaniem jak i analizowanej przez Renes i wsp. grupie dzieci niskorosłych spełniających kryteria SGA (131-132). Opisano istotną statystycznie różnicę w stężeniu kwasolabilnej podjednostki w zależności od płci, ze znacznie większymi stężeniami ALS w grupie dziewcząt (132). W grupie badanej odnotowano różnice w stężeniu ALS w zależności od płci, obserwowano większe wartości wśród dziewcząt zgodnie z poprzednimi doniesieniami, nie odnotowano jednak istotności statystycznej w zakresie tej analizy (**Tabela 11**). W literaturze opisano pozytywną korelację pomiędzy SDS wzrostu, SDS masy ciała, SDS BMI a SDS stężenia ALS oraz pomiędzy stężeniem insuliny na czczo a SDS stężenia ALS (131). Wykazano również silną pozytywną korelację pomiędzy SDS stężenia ALS a SDS stężenia IGF-1, IGF-1 oraz SDS stężenia IGFBP-3 i IGFBP-3 (131-132). Zależność ta wynika z połączenia ALS, IGF-1 oraz IGFBP-3 w kompleksie trzeciorzędowym, przy czym bardziej dotyczy to IGFBP-3 gdyż białko to w przypadku niezwiązania z kompleksem w krótkim czasie zostaje eliminowane z krwioobiegu. Renes i wsp. wykazali, iż pacjenci z mniejszą masą ciała i mniejszym BMI mają mniejsze wartości ALS. Podobną zależność zaobserwowano w przypadku mniejszego stężenia insuliny na czczo (131), co wskazuje na wpływ stanu odżywienia na poziom ALS. Wśród pacjentów

z grupy badanej nie wykazano obecności korelacji pomiędzy stężeniem ALS a BMI i SDS masy ciała (**Tabela 13**).

Jedną z niedoskonałości planu badawczego z całą pewnością był zakres analizy genetycznej. Jak pokazują wyżej wymienione badania w przypadku pacjentów z niskorosłością idiopatyczną zastosowanie sekwencjonowania następnej generacji (NGS) z wyborem panelu genów kandydackich a szczególnie wykorzystanie metody sekwencjonowania całego egzomu daje najlepsze wyniki. Metody te z uwagi na powstawanie coraz większej ilości pracowni, również komercyjnych, stają się coraz bardziej popularne i dostępne. Przeprowadzona analiza genetyczna oparta na poszukiwaniu dotąd opisanych mutacji w genie *PAPP-A2* oraz analizy fragmentu genu *PAPP-A2* kodującego aktywną domenę *PAPP-A2* wykazała u pacjentów nr 4, nr 8, nr 10 oraz nr 13 obecność znanego polimorfizmu c.2328C>T(rs10913241) w układzie heterozygotycznym w egzonie 5, poza miejscem kodującym domenę katalityczną. W oparciu o dane z bazy ExAC (<https://gnomad.broadinstitute.org/>, data dostępu: 20.02.2021), w populacji poniżej 30 r.ż., 701 z 2547 badanych było nosicielami wariantu w układzie heterozygotycznym, co daje częstość 0,27 (**Rycina 10**). W populacji europejskiej bez udziału populacji fińskiej w 20498 przypadkach z 112964 analizowanych wykryto obecność polimorfizmu rs10913241 w genie *PAPP-A2*, z czego 1891 w układzie homozygotycznym, co daje częstość występowania 0,18 (**Rycina 10**). Częstość występowania tego polimorfizmu jest różna w zależności od populacji badanej. Najniższa została wykazana w populacji wschodnio-azjatyckiej (0,001336) oraz latyno-amerykańskiej (0,08539), najwyższa zaś w populacji południowo-azjatyckiej (0,2204) oraz wśród Żydów aszkenazyjskich (0,2287) (**Rycina 10**). W grupie badanej u 4 z 22 pacjentów wykazano obecność polimorfizmu, co daje częstość 0,18 zgodną z opisaną dla populacji europejskiej bez udziału populacji fińskiej (**Rycina 10**).



Rycina 10. Częstość występowania polimorfizmu c.2328C>T(rs10913241) w grupie pacjentów poniżej 30 r.ż. oraz w poszczególnych populacjach. Dane pochodzą z bazy ExAC (<https://gnomad.broadinstitute.org/>, data dostępu: 28.02.2021).

Niedoskonałością badania bez wątpienia pozostaje liczebność grupy badanej jak i grupy kontrolnej. Wspomniane wcześniej badania sugerują, że aby rozpoznać nowe, rzadkie przyczyny niskorosłości idiopatycznej przy użyciu sekwencjonowania następnej generacji potrzebna jest analiza na dużej grupie badanej. Nasza grupa jest niewielka, poza tym przeprowadzono analizę genetyczną tylko jednego genu (*PAPP-A2*), tylko w zakresie wcześniej opisanych w literaturze mutacji oraz analizując fragment genu kodujący aktywną domenę białka PAPP-A2. Badania Guo i wsp. na grupie 14 pacjentów z ISS, przy pomocy sekwencjonowania całego egzomu, pozwoliły zidentyfikować podłoże genetyczne u aż pięciu pacjentów (97). Z całą pewnością kontynuację badań należy prowadzić na większej grupie badanej z wykorzystać sekwencjonowanie całego egzomu. Badacze sugerują, aby analizy genów kandydackich dokonywać, gdy cechy

fenotypowe lub układ analizowanych wcześniej parametrów osi GH-IGF-1 sugeruje zaburzenie na danym poziomie. W grupie badanej kryterium była niskorosłość idiopatyczna. Kluczowym wydaje się dodanie do kryteriów rekrutacji obniżonego stężenia wolnego IGF-1 i na tej podstawie kwalifikacja do analizy genetycznej genu *PAPP-A2*. Rekrutując w ten sposób można skupić się tylko na analizie genu *PAPP-A2*.

Niedostępne są normy dla wolnego IGF-1, IGFBP-5 oraz ALS dla populacji polskiej, dlatego wymagana jest analiza w grupie kontrolnej jednak znacznie większej niż ta rekrutowana na potrzeby tego badania. Innym rozwiązaniem tej sytuacji jest wykorzystanie zestawów diagnostycznych z dostępnymi w literaturze, opracowanymi już przez innych badaczy normami dla właściwego stadium dojrzewania, tak jak wykonaliśmy to w naszym projekcie.

Walorem przeprowadzonego badania jest próba analizy zjawiska nowego, nie do końca poznanego, mogącego poszerzyć wiedzę z tego zakresu. Do tej pory nie pojawiły się poza pierwotnym doniesieniem Daubera i wsp. badania analizujące częstość opisanych mutacji w grupie pacjentów z ISS (61). Kontynuacja analizy genetycznej wybranej grupy badanej wymaga zaplanowania badania w oparciu o sekwencjonowanie następnej generacji z użyciem panelu genów kandydackich lub preferencyjnie z sekwencjonowaniem całego egzomu. Z uwagi na dobór pacjentów z znacznym niedoborem wzrostu dalsze badania wydają się kluczowe w celu ustalenia etiologii problemu z jakim borykają się zrekrutowani pacjenci. Kontynuacja analizy częstości mutacji w genie *PAPP-A2* wymaga włączenia do kryteriów badania wcześniejszej analizy wolnego IGF-1 i wyboru pacjentów na podstawie stężenia tego białka.

6. Wnioski

1. Wolny IGF-1 lepiej koreluje ze wzrostem, HSDS oraz SDS wzrostu aniżeli całkowity IGF-1. Stosunek wolny IGF-1/IGF-1 oraz stężenie IGFBP-5 mogą być pomocnymi parametrami do predykcji wzrostu ostatecznego w grupie pacjentów z niskorosłością idiopatyczną.
2. Ocena stężenia wolnego IGF-1, IGFBP-5, ALS na dużej grupie kontrolnej jest niezbędna dla wypracowania norm dla populacji polskiej.
3. Prognozowany wzrost ostateczny (PAH) wyliczony w okresie przedpokwitaniowym, w oparciu o aktualny wzrost dziecka i jego wiek kostny, jest dobrym predyktorem wzrostu ostatecznego. Odchylenia standardowe wzrostu w 4 r.ż. i 6 r.ż. są z kolei dobrym predyktorem odchylenia standardowego wzrostu ostatecznego. Parametry te powinny być wykorzystywane w codziennej praktyce klinicznej.
4. Nie wykryto wcześniej opisanych mutacji genu *PAPP-A2* oraz mutacji w egzonie 3, 4 oraz 5 tego genu kodującym miejsce aktywne białka PAPP-A2 a jedynie znany i niepatogeny polimorfizm c.2328C>T (rs10913241) w układzie heterozygotycznym w egzonie 5 genu *PAPP-A2* i stąd niemożliwe jest oszacowanie częstości występowania mutacji genu *PAPP-A2* w populacji polskiej/wielkopolskiej.
5. Wstępne oznaczenie wolnego IGF1 na wyselekcjonowanej tym sposobem i większej liczbowo grupie badanej jest konieczne dla oszacowania potencjalnego ryzyka występowania mutacji genu *PAPP-A2* w grupie pacjentów z niskorosłością idiopatyczną.

7. Streszczenie w języku polskim

Wprowadzenie: Niskorosłość jest jednym z głównych powodów konsultacji w poradniach i oddziałach endokrynologii dziecięcej i definiowana jest jako wzrost poniżej 3 centyla lub wzrost mniejszy niż -2 odchylenia standardowe (SD). W 2016 r. Dauber i wsp. poszerzyli grupę przyczyn niskorosłości o nowy zespół charakteryzujący się progresywną utratą tempa wzrastania, prawidłowym stężeniem hormonu wzrostu i IGF-1 i obniżonym stężeniem wolnego IGF-1. Badacze udowodnili w opisanych rodzinach obecność mutacji w genie *PAPP-A2*, kodującym białko odpowiedzialne za uwolnienie IGF-1 z kompleksu trzeciorzędowego.

Cele: Nadrzędnym celem pracy była analiza genu *PAPP-A2* w miejscach dotąd opisanych mutacji oraz analiza egzonu 3, 4 oraz 5 kodujących miejsce aktywne białka *PAPP-A2*. Innymi celami pracy była analiza kliniczna i auksologiczna grupy pacjentów z niskorosłością idiopatyczną oraz analiza biochemiczna parametrów osi GH-IGF-1 nie ocenianych w rutynowej diagnostyce niskorosłości, takich jak: wolny IGF-1, IGFBP-5 oraz kwasolabilna podjednostka (ALS).

Metodologia: Analiza molekularna genu *PAPP-A2* została przeprowadzona przy użyciu metody PCR oraz bezpośredniego sekwencjonowania wybranych egzonów, w których znajdują się opisane do tej pory mutacje (c.3098C>T, p.Ala1033Val w egzonie 8 oraz p.D643fs25* w egzonie 3) oraz egzonu 3, 4 oraz 5 kodujących miejsce aktywne białka *PAPP-A2*. Analiza biochemiczna wolnego IGF-1, IGFBP-5 oraz ALS została przeprowadzona przy użyciu metody ELISA.

Wyniki: Średni współczynnik odchylenia standardowego wzrostu (HSDS) w grupie badanej wynosił -2,95. Wśród pacjentów, którzy zakończyli proces wzrastania (10/22), żaden z nich nie osiągnął prognozy wzrostu ostatecznego oszacowanej na podstawie prognozy rodzicielskiej. Średnia różnica pomiędzy wzrostem ostatecznym pacjentów a prognozą rodzicielską wynosiła 12,4 cm, dla chłopców 20,5 cm zaś dla dziewcząt 10,4 cm. U żadnego z pacjentów nie wykazano obecności dotąd opisanych mutacji w genie *PAPP-A2* oraz mutacji w egzonie 3, 4 oraz 5 kodujących miejsce aktywne białka *PAPP-A2*. U czwórki pacjentów wykazano obecność znanego, niepatogenego polimorfizmu c.2328C>T(rs10913241) w egzonie 5, w układzie heterozygotycznym. W grupie badanej uzyskano stężenia wolnego IGF-1 w zakresie referencyjnym, nieco powyżej i znacznie powyżej zakresu referencyjnego zaproponowanego dla stadium dojrzewania.

U wszystkich pacjentów grupy badanej stężenie IGFBP-5 znajdowało się poniżej normy dla stadium dojrzewania płciowego. Większość pacjentów z grupy badanej uzyskała stężenie ALS w normie dla stadium dojrzewania płciowego.

Wnioski: Wolny IGF-1 lepiej koreluje ze wzrostem, HSDS oraz SDS wzrostu aniżeli całkowity IGF-1. Stosunek wolny IGF-1/IGF-1 oraz stężenie IGFBP-5 mogą być pomocnymi parametrami do predykcji wzrostu ostatecznego w grupie pacjentów z niskorosłością idiopatyczną. Ocena stężenia wolnego IGF-1, IGFBP-5, ALS na dużej grupie kontrolnej jest niezbędna dla wypracowania norm dla populacji polskiej. Prognozowany wzrost ostateczny (PAH) wyliczony w okresie przedpokwitaniowym, w oparciu o aktualny wzrost dziecka i jego wiek kostny, jest dobrym predyktorem wzrostu ostatecznego. Odchylenia standardowe wzrostu w 4 r.ż. i 6 r.ż. są z kolei dobrym predyktorem odchylenia standardowego wzrostu ostatecznego. Parametry te powinny być wykorzystywane w codziennej praktyce klinicznej. Nie wykryto wcześniej opisanych mutacji genu *PAPP-A2* oraz mutacji w egzonie 3, 4 oraz 5 tego genu kodującym miejsce aktywne białka PAPP-A2 a jedynie znany i niepatogeny polimorfizm c.2328C>T (rs10913241) w układzie heterozygotycznym w egzonie 5 genu *PAPP-A2* i stąd niemożliwe jest oszacowanie częstości występowania mutacji genu *PAPP-A2* w populacji polskiej/wielkopolskiej. Wstępne oznaczenie wolnego IGF1 na wyselekcjonowanej tym sposobem i większej liczbowo grupie badanej jest konieczne dla oszacowania potencjalnego ryzyka występowania mutacji genu *PAPP-A2* w grupie pacjentów z niskorosłością idiopatyczną.

8. Summary

Introduction: Short stature is one of the main reasons for consultation in outpatient clinics and paediatric endocrinology departments and is defined as height below the 3rd centile or height less than -2 standard deviations (SD). In 2016, Dauber et al. expanded the group of causes of short stature to include a new syndrome characterised by progressive loss of growth velocity, normal growth hormone and IGF-1 levels and reduced free IGF-1 levels. The researchers demonstrated in the families described the presence of mutations in the *PAPP-A2* gene, which encodes the protein responsible for the release of IGF-1 from the tertiary complex.

Objectives: The overarching aim of the study was to analyse the *PAPP-A2* gene at sites of mutations described so far and to analyse exon 3, 4 and 5 encoding the active site of the PAPP-A2 protein. Other aims of the study were clinical and auxological analysis of a group of patients with idiopathic short stature and biochemical analysis of GH-IGF-1 axis parameters not assessed in the routine diagnosis of short stature, such as free IGF-1, IGFBP-5 and acid-labile subunit (ALS).

Methodology: Molecular analysis of the *PAPP-A2* gene was performed using PCR and direct sequencing of selected exons harbouring the mutations described so far (c.3098C>T, p.Ala1033Val in exon 8 and p.D643fs25* in exon 3) and exons 3, 4 and 5 encoding the active site of the PAPP-A2 protein. Biochemical analysis of free IGF-1, IGFBP-5 and ALS was performed by ELISA.

Results: The mean height standard deviation score (HSDS) in the study group was -2.95. Among the patients who completed the growth process (10/22), none of them reached the final height prediction estimated from the parental target height. The mean difference between the final height of the patients and the parental prognosis was 12.4 cm, for boys 20.5 cm and for girls 10.4 cm. None of the patients showed the presence of previously described mutations in the *PAPP-A2* gene and mutations in exons 3, 4 and 5 encoding the active site of the PAPP-A2 protein. In four patients the presence of known, non-pathogenic, heterozygotic polymorphism c.2328C>T(rs10913241) in exon 5 was demonstrated. In the study group, free IGF-1 concentrations were obtained in the reference range, slightly above and significantly above the reference range proposed for the pubertal stage. In all patients of the study group, IGFBP-5 concentrations were below

normal for the pubertal stage. Most patients in the study group achieved ALS concentrations within the normal range for the pubertal stage.

Conclusions: Free IGF-1 correlates better with height, height standard deviation score (HSDS) and standard deviation score of height (SDS) than total IGF-1. Free IGF-1/IGF-1 ratio and IGFBP-5 concentration may be helpful parameters for prediction of final height in a group of patients with idiopathic short stature. Evaluation of free IGF-1, IGFBP-5, ALS concentrations on a large control group is necessary to develop norms for the Polish population. Predicted adult height (PAH) calculated in the prepubertal period, based on the child's current height and bone age, is a good predictor of final height. The standard deviation scores of heights at 4 y of age and at 6 y of age are in turn a good predictor of the standard deviation score of final height. These parameters should be used in daily clinical practice. The previously described mutations in the *PAPP-A2* gene and mutations in exons 3, 4 and 5 of this gene encoding the active site of the PAPP-A2 protein were not detected, but only the known and non-pathogenic, heterozygotic polymorphism c.2328C>T(rs10913241) in exon 5 of the *PAPP-A2* gene and therefore it is impossible to estimate the frequency of *PAPP-A2* gene mutations in the Polish population. Preliminary determination of free IGF1 on the selected and numerically larger study group is necessary to estimate a potential risk of the *PAPP-A2* gene mutation occurrence in the group of patients with idiopathic short stature.

9. Piśmiennictwo

1. Rosenfeld RG. Insulin-like Growth Factors and the Basis of Growth. *N Engl J Med*. 2003;349(23):2184–6.
2. Beattie J, Allan GJ, Lochrie JD, Flint DJ. Insulin-like growth factor-binding protein-5 (IGFBP-5): a critical member of the IGF axis. *Biochem J*. 2006;395(Pt 1):1–19.
3. Baxter RC, Meka S, Firth SM. Molecular distribution of IGF binding protein-5 in human serum. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(1):271–6.
4. Rajaram S, Baylink DJ, Mohan S. Insulin-like growth factor-binding proteins in serum and other biological fluids: regulation and functions. *Endocr Rev*. 1997;18(6):801–31.
5. Guler HP, Zapf J, Schmid C, Froesch ER. Insulin-like growth factors I and II in healthy man. Estimations of half-lives and production rates. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1989;121(6):753–8.
6. Hardouin S, Gourmelen M, Noguez P i wsp. Molecular forms of serum insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins in man: relationships with growth hormone and IGFs and physiological significance. *J Clin Endocrinol Metab*. 1989;69(6):1291–301.
7. Baxter RC, Martin JL. Structure of the Mr 140,000 growth hormone-dependent insulin-like growth factor binding protein complex: determination by reconstitution and affinity-labeling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86(18):6898–902.
8. Kawai N, Kanzaki S, Takano-Watou S i wsp. Serum Free Insulin-Like Growth Factor I (IGF-I), Total IGF-I, and IGF-Binding Protein-3 Concentrations in Normal Children and Children with Growth Hormone Deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84(1):82–9.
9. Hasegawa Y, Hasegawa T, Takada M, Tsuchiya Y. Plasma free insulin-like growth factor I concentrations in growth hormone deficiency in children and adolescents. *Eur J Endocrinol*. 1996;134(2):184–9.
10. Juul A, Holm K, Kastrup KW i wsp. Free insulin-like growth factor I serum levels in 1430 healthy children and adults, and its diagnostic value in patients suspected of growth hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82(8):2497–502.
11. Jepsen MR, Kløverpris S, Mikkelsen JH i wsp. Stanniocalcin-2 inhibits mammalian growth by proteolytic inhibition of the insulin-like growth factor axis. *J Biol Chem*. 2015;290(6):3430–9.
12. Kløverpris S, Mikkelsen JH, Pedersen JH i wsp. Stanniocalcin-1 Potently Inhibits the Proteolytic Activity of the Metalloproteinase Pregnancy-associated Plasma Protein-A. *J Biol Chem*. 2015;290(36):21915–24.

13. Banaszak-Ziemska M, Niedziela M. PAPP-A2 a new key regulator of growth. *Endokrynol Pol.* 2017;68(6):682–91.
14. Gent J, van Kerkhof P, Roza M, Bu G, Strous GJ. Ligand-independent growth hormone receptor dimerization occurs in the endoplasmic reticulum and is required for ubiquitin system-dependent endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(15):9858–63.
15. Brooks AJ, Wooh JW, Tunny KA, Waters MJ. Growth hormone receptor; mechanism of action. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008;40(10):1984–9.
16. Wit JM, Clayton PE, Rogol AD, Savage MO, Saenger PH, Cohen P. Idiopathic short stature: definition, epidemiology, and diagnostic evaluation. *Growth Horm IGF Res Off J Growth Horm Res Soc Int IGF Res Soc.* 2008;18(2):89–110.
17. Ranke MB. Towards a Consensus on the Definition of Idiopathic Short Stature. *Horm Res Paediatr.* 1996;45(Suppl. 2):64–6.
18. Luo ZC, Albertsson-Wikland K, Karlberg J. Target height as predicted by parental heights in a population-based study. *Pediatr Res.* 1998;44(4):563–71.
19. Hermanussen M, Cole J. The calculation of target height reconsidered. *Horm Res.* 2003;59(4):180–3.
20. Cohen P, Rogol AD, Deal CL i wsp. Consensus Statement on the Diagnosis and Treatment of Children with Idiopathic Short Stature: A Summary of the Growth Hormone Research Society, the Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society, and the European Society for Paediatric Endocrinology Workshop. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(11):4210–7.
21. Lindsay R, Feldkamp M, Harris D, Robertson J, Rallison M. Utah Growth Study: growth standards and the prevalence of growth hormone deficiency. *J Pediatr.* 1994;125(1):29–35.
22. Ahmed ML, Allen AD, Sharma A, Macfarlane JA, Dunger DB. Evaluation of a district growth screening programme: the Oxford Growth Study. *Arch Dis Child.* 1993;69(3):361–5.
23. Grote FK, Oostdijk W, De Muinck Keizer-Schrama SM i wsp. The diagnostic work up of growth failure in secondary health care; an evaluation of consensus guidelines. *BMC Pediatr.* 2008;8:21.
24. Grimberg A, Kutikov JK, Cucchiara AJ. Sex differences in patients referred for evaluation of poor growth. *J Pediatr.* 2005;146(2):212–6.
25. Sisley S, Trujillo MV, Khoury J, Backeljauw P. Low incidence of pathology detection and high cost of screening in the evaluation of asymptomatic short children. *J Pediatr.* 2013;163(4):1045–51.
26. Wit JM, Ranke MB, Kelnar CJH. SHORT STATURE. *Horm Res Paediatr.* 2007;68(Suppl. 2):1–9.

27. Boldt HB, Overgaard MT, Laursen LS, Weyer K, Sottrup-Jensen L, Oxvig C. Mutational analysis of the proteolytic domain of pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A): classification as a metzincin. *Biochem J.* 2001;358(Pt 2):359–67.
28. Lawrence JB, Oxvig C, Overgaard MT i wsp. The insulin-like growth factor (IGF)-dependent IGF binding protein-4 protease secreted by human fibroblasts is pregnancy-associated plasma protein-A. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(6):3149–53.
29. Gaidamauskas E, Gyrup C, Boldt HB i wsp. IGF dependent modulation of IGF binding protein (IGFBP) proteolysis by pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A): Multiple PAPP-A–IGFBP interaction sites. 2013 [cytowane 13 sierpień 2019]; Dostępne na: <https://pubag.nal.usda.gov/catalog/1119849>
30. Fowlkes JL. Insulin-like Growth Factor-Binding Protein Proteolysis: An Emerging Paradigm in Insulinlike Growth Factor Physiology. *Trends Endocrinol Metab.* 1997;8(8):299–306.
31. Qin X, Byun D, Lau K-HW, Baylink DJ, Mohan S. Evidence That the Interaction between Insulin-like Growth Factor (IGF)-II and IGF Binding Protein (IGFBP)-4 Is Essential for the Action of the IGF-II-Dependent IGFBP-4 Protease. *Arch Biochem Biophys.* 2000;379(2):209–16.
32. Bayes-Genis A, Schwartz RS, Lewis DA i wsp. Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-4 Protease Produced by Smooth Muscle Cells Increases in the Coronary Artery After Angioplasty. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21(3):335–41.
33. Overgaard MT, Haaning J, Boldt HB i wsp. Expression of Recombinant Human Pregnancy-associated Plasma Protein-A and Identification of the Proform of Eosinophil Major Basic Protein as Its Physiological Inhibitor. *J Biol Chem.* 2000;275(40):31128–33.
34. Conover CA, Oxvig C, Overgaard MT, Christiansen M, Giudice LC. Evidence That the Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-4 Protease in Human Ovarian Follicular Fluid Is Pregnancy Associated Plasma Protein-A. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84(12):4742–5.
35. Overgaard MT, Boldt HB, Laursen LS, Sottrup-Jensen L, Conover CA, Oxvig C. Pregnancy-associated Plasma Protein-A2 (PAPP-A2), a Novel Insulin-like Growth Factor-binding Protein-5 Proteinase. *J Biol Chem.* 2001;276(24):21849–53.
36. Claussen M, Zapf J, Braulke T. Proteolysis of insulin-like growth factor binding protein-5 by pregnancy serum and amniotic fluid. *Endocrinology.* 1994;134(4):1964–6.
37. Yan X, Baxter RC, Firth SM. Involvement of Pregnancy-Associated Plasma Protein-A2 in Insulin-Like Growth Factor (IGF) Binding Protein-5 Proteolysis during Pregnancy: A Potential Mechanism for Increasing IGF Bioavailability. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(3):1412–20.

38. Lee KO, Oh Y, Giudice LC, Cohen P, Peehl DM, Rosenfeld RG. Identification of insulin-like growth factor-binding protein-3 (IGFBP-3) fragments and IGFBP-5 proteolytic activity in human seminal plasma: a comparison of normal and vasectomized patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994;79(5):1367–72.
39. Imai Y, Busby WH, Smith CE i wsp. Protease-resistant form of insulin-like growth factor-binding protein 5 is an inhibitor of insulin-like growth factor-I actions on porcine smooth muscle cells in culture. *J Clin Invest.* 1997;100(10):2596–605.
40. Resnick CE, Fielder PJ, Rosenfeld RG, Adashi EY. Characterization and Hormonal Regulation of a Rat Ovarian Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-5 Endopeptidase: An FSH-Inducible Granulosa Cell-Derived Metalloprotease*. *Endocrinology.* 1998;139(3):1249–57.
41. Conover CA, Kiefer MC. Regulation and biological effect of endogenous insulin-like growth factor binding protein-5 in human osteoblastic cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 1993;76(5):1153–9.
42. Thrailkill KM, Quarles LD, Nagase H, Suzuki K, Serra DM, Fowlkes JL. Characterization of insulin-like growth factor-binding protein 5-degrading proteases produced throughout murine osteoblast differentiation. *Endocrinology.* 1995;136(8):3527–33.
43. De Meyts P, Palsgaard J, Sajid W, Theede A-M, Aladdin H. Structural biology of insulin and IGF-1 receptors. *Novartis Found Symp.* 2004;262:160–71; discussion 171-176, 265–8.
44. Jones JJ, Clemmons DR. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev.* 1995;16(1):3–34.
45. Kjaer-Sorensen K, Engholm DH, Jepsen MR i wsp. Papp-a2 modulates development of cranial cartilage and angiogenesis in zebrafish embryos. *J Cell Sci.* 2014;127(Pt 23):5027–37.
46. Christians JK, Amiri N, Schipilow JD, Zhang SW, May-Rashke KI. Pappa2 deletion has sex- and age-specific effects on bone in mice. *Growth Horm IGF Res Off J Growth Horm Res Soc Int IGF Res Soc.* 2019;44:6–10.
47. Farr M, Strübe J, Geppert HG, Kocourek A, Mahne M, Tschesche H. Pregnancy-associated plasma protein-E (PAPP-E). *Biochim Biophys Acta.* 2000;1493(3):356–62.
48. Chen Y, Li L, Wang E, Zhang L, Zhao Q. Abnormal expression of Pappa2 gene may indirectly affect mouse hip development through the IGF signaling pathway. *Endocrine.* 2019;65(2):440–50.
49. Chen Y, Lv H, Li L, Wang E, Zhang L, Zhao Q. Expression of PAPP-A2 and IGF Pathway-Related Proteins in the Hip Joint of Normal Rat and Those with Developmental Dysplasia of the Hip. *Int J Endocrinol.* 2019;2019:7691531.
50. Christians JK, Bath AK, Amiri N. Pappa2 deletion alters IGFBPs but has little effect on glucose disposal or adiposity. *Growth Horm IGF Res.* 2015;25(5):232–9.

51. Kwon H, Choi D-H, Bae J-H, Kim J-H, Kim Y-S. mRNA expression pattern of insulin-like growth factor components of granulosa cells and cumulus cells in women with and without polycystic ovary syndrome according to oocyte maturity. *Fertil Steril*. 2010;94(6):2417–20.
52. Hastie PM, Onagbesan OM, Haresign W. Co-expression of messenger ribonucleic acids encoding IGF-I, IGF-II, type I and II IGF receptors and IGF-binding proteins (IGFBP-1 to -6) during follicular development in the ovary of seasonally anoestrous ewes. *Anim Reprod Sci*. 2004;84(1–2):93–105.
53. Besnard N, Pisselet C, Monniaux D, Monget P. Proteolytic activity degrading insulin-like growth factor-binding protein-2, -3, -4, and -5 in healthy growing and atretic follicles in the pig ovary. *Biol Reprod*. 1997;56(4):1050–8.
54. Erickson GF, Nakatani A, Ling N, Shimasaki S. Localization of insulin-like growth factor-binding protein-5 messenger ribonucleic acid in rat ovaries during the estrous cycle. *Endocrinology*. 1992;130(4):1867–78.
55. Hastie PM, Haresign W. Modulating peripheral gonadotrophin levels affects follicular expression of mRNAs encoding insulin-like growth factor binding proteins in sheep. *Anim Reprod Sci*. 2010;119(3–4):198–204.
56. Christians JK, King AY, Rogowska MD, Hessels SM. Pappa2 deletion in mice affects male but not female fertility. *Reprod Biol Endocrinol RBE*. 2015;13:109.
57. Vaiman D, Miralles F. An Integrative Analysis of Preeclampsia Based on the Construction of an Extended Composite Network Featuring Protein-Protein Physical Interactions and Transcriptional Relationships. *PloS One*. 2016;11(11):e0165849.
58. Macintire K, Tuohey L, Ye L i wsp. PAPP2 is increased in severe early onset pre-eclampsia and upregulated with hypoxia. *Reprod Fertil Dev*. 2014;26(2):351–7.
59. Whitehead CL, Walker SP, Ye L i wsp. Placental specific mRNA in the maternal circulation are globally dysregulated in pregnancies complicated by fetal growth restriction. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(3):E429–436.
60. Christians JK, Lennie KI, Huicochea Munoz MF, Binning N. PAPP-A2 deficiency does not exacerbate the phenotype of a mouse model of intrauterine growth restriction. *Reprod Biol Endocrinol RBE*. 2018;16(1):58.
61. Dauber A, Muñoz-Calvo MT, Barrios V i wsp. Mutations in pregnancy-associated plasma protein A2 cause short stature due to low IGF-I availability. *EMBO Mol Med*. 01 2016;8(4):363–74.
62. Christians JK, de Zwaan DR, Fung SHY. Pregnancy associated plasma protein A2 (PAPP-A2) affects bone size and shape and contributes to natural variation in postnatal growth in mice. *PloS One*. 2013;8(2):e56260.

63. Conover CA, Boldt HB, Bale LK i wsp. Pregnancy-associated plasma protein-A2 (PAPP-A2): tissue expression and biological consequences of gene knockout in mice. *Endocrinology*. 2011;152(7):2837–44.
64. Muñoz-Calvo MT, Barrios V, Pozo J i wsp. Treatment With Recombinant Human Insulin-Like Growth Factor-1 Improves Growth in Patients With PAPP-A2 Deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016;101(11):3879–83.
65. Cabrera-Salcedo C, Mizuno T, Tyzinski L i wsp. Pharmacokinetics of IGF-1 in PAPP-A2-Deficient Patients, Growth Response, and Effects on Glucose and Bone Density. *J Clin Endocrinol Metab*. 2017;102(12):4568–77.
66. Wskaźniki rozwoju somatycznego dzieci i młodzieży warszawskiej | Request PDF [Internet]. [cytowane 23 październik 2019]. Dostępne na: https://www.researchgate.net/publication/284773718_Wskazniki_rozwoju_somatycznego_dzieci_i_mlodziezy_warszawskiej
67. A systematic review and meta-analysis to revise the Fenton growth chart for preterm infants | BMC Pediatrics | Full Text [Internet]. [cytowane 17 październik 2019]. Dostępne na: <https://bmcpediatr.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2431-13-59>
68. Tanner JM, Goldstein H, Whitehouse RH. Standards for Children's Height at Ages 2-9 Years Allowing for Height of Parents. *Arch Dis Child*. 1970;45(244):755–62.
69. Radioimmunoassays for IGFs and IGFBPs [Internet]. ResearchGate. [cytowane 17 październik 2019]. Dostępne na: https://www.researchgate.net/publication/15682845_Radioimmunoassays_for_IGFs_and_IGFBPs
70. Bayer LM. RADIOGRAPHIC ATLAS OF SKELETAL DEVELOPMENT OF THE HAND AND WRIST. *Calif Med*. 1959;91(1):53.
71. 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):423–41.
72. Marshall WA, Tanner JM. Variations in the pattern of pubertal changes in boys. *Arch Dis Child*. 1970;45(239):13–23.
73. Marshall WA, Tanner JM. Variations in pattern of pubertal changes in girls. *Arch Dis Child*. 1969;44(235):291–303.
74. Fleseriu M, Hashim IA, Karavitaki N i wsp. Hormonal Replacement in Hypopituitarism in Adults: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016;101(11):3888–921.
75. Baxter RC, Martin JL. Structure of the Mr 140,000 growth hormone-dependent insulin-like growth factor binding protein complex: determination by reconstitution and affinity-labeling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86(18):6898–902.

76. van Duyvenvoorde HA, Lui JC, Kant SG i wsp.. Copy number variants in patients with short stature. *Eur J Hum Genet EJHG*. 2014;22(5):602–9.
77. Gudbjartsson DF, Walters GB, Thorleifsson G i wsp.. Many sequence variants affecting diversity of adult human height. *Nat Genet*. 2008;40(5):609–15.
78. Benonisdottir S, Oddsson A, Helgason A i wsp. Epigenetic and genetic components of height regulation. *Nat Commun*. 2016;7(1):13490.
79. Rappold G, Blum WF, Shavrikova EP i wsp. Genotypes and phenotypes in children with short stature: clinical indicators of SHOX haploinsufficiency. *J Med Genet*. 2007;44(5):306–13.
80. Plachy L, Strakova V, Elblova L i wsp. High Prevalence of Growth Plate Gene Variants in Children With Familial Short Stature Treated With GH. *J Clin Endocrinol Metab*. 2019;104(10):4273–81.
81. Grote FK, Dommelen P van, Oostdijk i wsp. Developing evidence-based guidelines for referral for short stature. *Arch Dis Child*. 2008;93(3):212–7.
82. Price DA. Spontaneous Adult Height in Patients with Idiopathic Short Stature. *Horm Res Paediatr*. 1996;45(Suppl. 2):59–63.
83. Ranke MB, Grauer ML, Kistner K, Blum WF, Wollmann HA. Spontaneous Adult Height in Idiopathic Short Stature. *Horm Res Paediatr*. 1995;44(4):152–7.
84. López Siguero JP, Martínez-Aedo MJ, Paz Cerezo M, Martínez Valverde A. Spontaneous development of idiopathic short stature. Analysis of a group of 42 children followed to their final body height. *An Esp Pediatr*. 1998;48(3):261–6.
85. Rekers-Mombarg LT, Wit JM, Massa GG i wsp.. Spontaneous growth in idiopathic short stature. European Study Group. *Arch Dis Child*. 1996;75(3):175–80.
86. Wit JM, Kamp GA, Rikken B. Spontaneous Growth and Response to Growth Hormone Treatment in Children with Growth Hormone Deficiency and Idiopathic Short Stature. *Pediatr Res*. 1996;39(2):295–302.
87. Hirschhorn JN, Lettre G. Progress in genome-wide association studies of human height. *Horm Res*. 2009;71 Suppl 2:5–13.
88. Yang J, Benyamin B, McEvoy BP i wsp. Common SNPs explain a large proportion of the heritability for human height. *Nat Genet*. 2010;42(7):565–9.
89. Chan Y, Holmen OL, Dauber A i wsp. Common variants show predicted polygenic effects on height in the tails of the distribution, except in extremely short individuals. *PLoS Genet*. 2011;7(12):e1002439.
90. Dauber A, Rosenfeld RG, Hirschhorn JN. Genetic evaluation of short stature. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(9):3080–92.
91. Zahnleiter D, Uebe S, Ekici AB i wsp. Rare copy number variants are a common cause of short stature. *PLoS Genet*. 2013;9(3):e1003365.

92. Hu G, Fan Y, Wang L i wsp. Copy number variations in 119 Chinese children with idiopathic short stature identified by the custom genome-wide microarray. *Mol Cytogenet* [Internet]. 16 luty 2016 [cytowane 30 maj 2020];9. Dostępne na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4755006/>
93. Murray PG, Clayton PE, Chernausek SD. A genetic approach to evaluation of short stature of undetermined cause. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2018;6(7):564–74.
94. Lango Allen H, Estrada K, Lettre G i wsp. Hundreds of variants clustered in genomic loci and biological pathways affect human height. *Nature*. 2010;467(7317):832–8.
95. Silventoinen K, Sammalisto S, Perola M i wsp. Heritability of adult body height: a comparative study of twin cohorts in eight countries. *Twin Res Off J Int Soc Twin Stud*. 2003;6(5):399–408.
96. Marouli E, Graff M, Medina-Gomez C i wsp. Rare and low-frequency coding variants alter human adult height. *Nature*. 2017;542(7640):186–90.
97. Guo MH, Shen Y, Walvoord EC i wsp. Whole exome sequencing to identify genetic causes of short stature. *Horm Res Paediatr*. 2014;82(1):44–52.
98. Argente J. Challenges in the Management of Short Stature. *Horm Res Paediatr*. 2016;85(1):2–10.
99. Amano N, Mukai T, Ito Y i wsp. Identification and functional characterization of two novel NPR2 mutations in Japanese patients with short stature. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(4):E713-718.
100. Kant SG, Cervenkova I, Balek L i wsp. A novel variant of FGFR3 causes proportionate short stature. *Eur J Endocrinol*. 2015;172(6):763–70.
101. Final Height Gain by GH Therapy in Children with Idiopathic Short Stature Is Dose Dependent | The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism | Oxford Academic [Internet]. [cytowane 6 sierpień 2019]. Dostępne na: <https://academic.oup.com/jcem/article/87/2/604/2846857>
102. Woods KA, Camacho-Hübner C, Savage MO, Clark AJ. Intrauterine growth retardation and postnatal growth failure associated with deletion of the insulin-like growth factor I gene. *N Engl J Med*. 1996;335(18):1363–7.
103. Wang J, Zhou J, Bondy CA. Igf1 promotes longitudinal bone growth by insulin-like actions augmenting chondrocyte hypertrophy. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 1999;13(14):1985–90.
104. Cooper KL, Oh S, Sung Y, Dasari RR, Kirschner MW, Tabin CJ. Multiple phases of chondrocyte enlargement underlie differences in skeletal proportions. *Nature*. 2013;495(7441):375–8.
105. Zelzer E, McLean W, Ng Y-S i wsp. Skeletal defects in VEGF(120/120) mice reveal multiple roles for VEGF in skeletogenesis. *Dev Camb Engl*. 2002;129(8):1893–904.

106. Zelzer E, Mamluk R, Ferrara N, Johnson RS, Schipani E, Olsen BR. VEGFA is necessary for chondrocyte survival during bone development. *Dev Camb Engl.* 2004;131(9):2161–71.
107. Kozhemyakina E, Lassar AB, Zelzer E. A pathway to bone: signaling molecules and transcription factors involved in chondrocyte development and maturation. *Dev Camb Engl.* 2015;142(5):817–31.
108. Wang L, Shao YY, Ballock RT. Thyroid hormone interacts with the Wnt/beta-catenin signaling pathway in the terminal differentiation of growth plate chondrocytes. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* 2007;22(12):1988–95.
109. Emons J, Chagin AS, Malmlöf T i wsp. Expression of vascular endothelial growth factor in the growth plate is stimulated by estradiol and increases during pubertal development. *J Endocrinol.* 2010;205(1):61–8.
110. Börjesson AE, Lagerquist MK, Liu C i wsp. The role of estrogen receptor α in growth plate cartilage for longitudinal bone growth. *J Bone Miner Res.* 2010;25(12):2690–700.
111. Grimberg A, DiVall SA, Polychronakos C i wsp. Guidelines for Growth Hormone and Insulin-Like Growth Factor-I Treatment in Children and Adolescents: Growth Hormone Deficiency, Idiopathic Short Stature, and Primary Insulin-Like Growth Factor-I Deficiency. *Horm Res Paediatr.* 2016;86(6):361–97.
112. Finkelstein BS, Imperiale TF, Speroff T, Marrero U, Radcliffe DJ, Cuttler L. Effect of Growth Hormone Therapy on Height in Children With Idiopathic Short Stature: A Meta-analysis. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 2002;156(3):230.
113. Zadik Z, Zung A. Final Height after Growth Hormone Therapy in Short Children: Correlation with Siblings's Height. *Horm Res.* 1997;48(6):274–7.
114. Bernasconi S, Street ME, Volta C, Mazzardo G. Final height in non-growth hormone deficient children treated with growth hormone. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1997;47(3):261–6.
115. Loche S, Cambiaso P, Setzu S i wsp. Final height after growth hormone therapy in non-growth-hormone-deficient children with short stature. *J Pediatr.* 1994;125(2):196–200.
116. Carel J-C, Ecosse E, Landier F i wsp. Long-Term Mortality after Recombinant Growth Hormone Treatment for Isolated Growth Hormone Deficiency or Childhood Short Stature: Preliminary Report of the French SAGhE Study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(2):416–25.
117. Säwendahl L, Maes M, Albertsson-Wikland K i wsp. Long-Term Mortality and Causes of Death in Isolated GHD, ISS, and SGA Patients Treated with Recombinant Growth Hormone during Childhood in Belgium, The Netherlands, and Sweden: Preliminary Report of 3 Countries Participating in the EU SAGhE Study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(2):E213–7.

118. Conover CA, Bale LK, Overgaard MT i wsp. Metalloproteinase pregnancy-associated plasma protein A is a critical growth regulatory factor during fetal development. *Dev Camb Engl*. 2004;131(5):1187–94.
119. Chapman IM, Hartman ML, Pieper KS i wsp. Recovery of growth hormone release from suppression by exogenous insulin-like growth factor I (IGF-I): evidence for a suppressive action of free rather than bound IGF-I. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998;83(8):2836–42.
120. Chen J-W, Højlund K, Beck-Nielsen H, Sandahl Christiansen J, Orskov H, Frystyk J. Free rather than total circulating insulin-like growth factor-I determines the feedback on growth hormone release in normal subjects. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(1):366–71.
121. Frystyk J. Utility of Free IGF-I Measurements. *Pituitary*. 2007;10(2):181–7.
122. Frystyk J. Free insulin-like growth factors - measurements and relationships to growth hormone secretion and glucose homeostasis. *Growth Horm IGF Res Off J Growth Horm Res Soc Int IGF Res Soc*. 2004;14(5):337–75.
123. 3MeasurementofIGF1Vol20No3September2002P155.pdf [Internet]. [cytowane 19 grudzień 2019]. Dostępne na: <http://apjai-journal.org/wp-content/uploads/2018/02/3MeasurementofIGF1Vol20No3September2002P155.pdf>
124. Sneppen SB, Lange M, Pedersen LM i wsp. Total and free insulin-like growth factor I, insulin-like growth factor binding protein 3 and acid-labile subunit reflect clinical activity in acromegaly. *Growth Horm IGF Res Off J Growth Horm Res Soc Int IGF Res Soc*. 2001;11(6):384–91.
125. Scacchi M, Pincelli AI, Cavagnini F. Growth hormone in obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord J Int Assoc Study Obes*. 1999;23(3):260–71.
126. Frystyk J, Vestbo E, Skjaerbaek C, Mogensen CE, Orskov H. Free insulin-like growth factors in human obesity. *Metabolism*. 1995;44(10 Suppl 4):37–44.
127. Kamoda T, Saitoh H, Hirano T, Matsui A. Serum levels of free insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-binding protein-1 in prepubertal children with idiopathic short stature. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2000;53(6):683–8.
128. Walenkamp MJE, Losekoot M, Wit JM. Molecular IGF-1 and IGF-1 Receptor Defects: From Genetics to Clinical Management. W: Maghnie M, Loche S, Cappa M, Ghizzoni L, Lorini R, redaktorzy. *Endocrine Development* [Internet]. Basel: S. KARGER AG; 2013 [cytowane 17 grudzień 2020]. s. 128–37. Dostępne na: <https://www.karger.com/Article/FullText/342841>
129. Mohan S, Libanati C, Dony C, Lang K, Srinivasan N, Baylink DJ. Development, validation, and application of a radioimmunoassay for insulin-like growth factor binding protein-5 in human serum and other biological fluids. *J Clin Endocrinol Metab*. 1995;80(9):2638–45.

130. Bach LA. Insulin-like growth factor binding proteins 4-6. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2015;29(5):713–22.
131. Renes J, van Doorn J, Breukhoven P, Lem AJ, Ridder M, Hokken-Koelega A. Acid-Labile Subunit Levels and the Association with Response to Growth Hormone Treatment in Short Children Born Small for Gestational Age. *Horm Res Paediatr.* 2014;81:126–32.
132. Juul A, Møller S, Mosfeldt-Laursen E, Rasmussen MH i wsp. The acid-labile subunit of human ternary insulin-like growth factor binding protein complex in serum: hepatosplanchnic release, diurnal variation, circulating concentrations in healthy subjects, and diagnostic use in patients with growth hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83(12):4408–15.

10. Załączniki

10.1. Zgoda Komisji Bioetycznej



UNIwersYTET MEDYCZNY IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU

KOMISJA BIOETYCZNA PRZY UNIwersYTECIE MEDYCZNYM
IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU

Collegium Stomatologicum
ul. Bukowska 70
60-812 Poznań

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

Uchwała nr 134/18

Na podstawie przepisów Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodach lekarzy i lekarzy dentysty (Dz. U. z 2017, poz. 125 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999r. w sprawie szczegółowych zasad prowadzenia i finansowania oraz trybu działania Komisji bioetycznych (Dz. U. Nr 47, poz. 489); Ustawy z dnia 6 września 2001r. Prawo farmaceutyczne (Dz. U. z 2016, poz. 2142 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 19 kwietnia 2004r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. z 2004 Nr 101, poz. 1014 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 18 maja 2005r. zmieniające ubezpieczenie odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. Nr 101, poz. 841); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 10 kwietnia 2006r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. z 2006 Nr 104, poz. 1100); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 10 kwietnia 2006r. w sprawie sposobu prowadzenia badań klinicznych z udziałem małoletnich (Dz. U. z 2006 Nr 104, poz. 1100); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 17 lutego 2016 r. i sprawie zgłaszania niepodzielonego ciężkiego niepodzielonego działania produktu leczniczego (Dz. U. z 2016 Nr 104, poz. 1100); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 8 października 2016 r. w sprawie wznowienia wniosków zgłoszonych z badaniami klinicznymi wyrobu medycznego lub innego wyrobu medycznego do implantacji oraz wniosków o zmianę danych w wnioskach (Dz. U. z 2016 r., poz. 208); Ustawy z dnia 20 maja 2018 r. o wyrobach medycznych (Dz. U. z 2017r. poz. 211, z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 8 października 2018 r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej sponsora i badacza klinicznego w związku z prowadzeniem badania klinicznego wyrobu (Dz. U. z 2018 Nr 194 poz. 1296); Ustawy z dnia 18 marca 2011 r. o Ogólnie Rejestrowanych Produktach Leczniczych, Wyrobach Medycznych i Produktach Biologicznych (Dz. U. z 2016 r., poz. 1719); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 2 maja 2012r. w sprawie Badanej Praktyki Klinicznej (Dz. U. z 2012, poz. 489); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 2 maja 2012r. w sprawie wznowienia wniosków zgłoszonych z badaniami klinicznymi wyrobu medycznego oraz w sprawie wniosków o zmianę danych w wnioskach o rozpoczęcie badania klinicznego (Dz. U. z 2012, Nr 8 poz. 491); w sprawie o Deklarację Helioski - Zasady Etycznego Postępowania w Ekspertyzowaniu Medycznym z Udziałem Ludzi oraz przepisy ICH GCP.

Komisja Bioetyczna, na posiedzeniu w dniu 01 lutego 2018 r.

rozpatrzyła wniosek dotyczący prowadzenia badań naukowych.

Kierownik projektu: prof. dr hab. n. med. Marek Niedziela

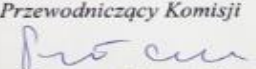
Miejsce prowadzenia badań:
Klinika Endokrynologii
i Reumatologii Dziecięcej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu

Główny badacz: lek. med. Magdalena Banaszak-Ziemska

Członkowie zespołu badawczego:
prof. dr hab. n. med. Marek Niedziela
lek. med. Magdalena Banaszak-Ziemska
dr n. biol. Aleksandra Rojek
dr n. med. Hanna Mikoś
dr n. biol. Bartłomiej Budny
dr hab. n. med. Katarzyna Ziemnicka, prof. UM

Temat badań:
„Analiza podłoża molekularnego niskorosłości idiopatycznej”.

Komisja wydała uchwałę o pozytywnym zaopiniowaniu tego wniosku

Przewodniczący Komisji

prof. zw. dr hab. med. Paweł Chęciński

11. Spis tabel

Tabela 1. Funkcje metaboliczne hormonu wzrostu.....	15
Tabela 2. Przyczyny niskorosłości wg klasyfikacji European Society for Paediatric Endocrinology (ESPE).....	19
Tabela 3. Sekwencje oligonukleotydów oraz warunki reakcji PCR stosowane w celu amplifikacji wybranych fragmentów genu <i>PAPP-A2</i>	37
Tabela 4. Szczegółowa analiza parametrów auksologicznych grupy badanej.....	43
Tabela 5. Dane auksologiczne okresu noworodkowego pacjentów grupy badanej.....	45
Tabela 6. Wzrost ostateczny (FH), prognozowany wzrost ostateczny (PAH), SDS dla wzrostu, Δ FH – TH w grupie pacjentów, którzy zakończyli proces wzrastania.....	46
Tabela 7. Parametry biochemiczne oceniające funkcjonowanie osi GH–IGF-1.....	55
Tabela 8. Dane auksologiczne, kliniczne oraz hormonalne grupy badanej wg płci, podane jako wartość średnia wraz z odchyleniem standardowym.....	57
Tabela 9. Parametry auksologiczne oraz biochemiczne oraz ich odchylenie standardowe wg płci oraz stadium dojrzewania.....	58
Tabela 10. Porównanie grupy badanej i kontrolnej w zakresie uzyskanego średniego stężenia wolnego IGF-1, IGFBP-5, ALS raz odchylenia standardowego w zależności od płci i stadium dojrzewania płciowego.....	59
Tabela 11. Różnica statystyczna parametrów biochemicznymi w obrębie grupy badanej w zależności od stadium dojrzewania i płci.....	60
Tabela 12. Różnica statystyczna wartości parametrów biochemicznymi pomiędzy grupą badaną i kontrolną w zależności od stadium pokwitania i płci.....	61
Tabela 13. Korelacje wybranych parametrów biochemicznych i auksologicznych w grupie badanej.....	62

12. Spis rycin

Rycina 1. Schemat działania osi podwzgórze-przysadka-hormon wzrostu z uwzględnieniem aktywności prowzrostowej hormonu wzrostu oraz działaniem proteolizy PAPP-A2.....	13
Rycina 2. Schemat lokalizacji genu <i>PAPP-A2</i> w obrębie chromosomu 1 oraz lokalizacja mutacji w obrębie kodowanego mRNA.....	25
Rycina 3. Rozkład płci w grupie badanej.....	39
Rycina 4. Rozkład stadium dojrzewania płciowego wśród pacjentów w zależności od płci.....	40
Rycina 5. Rozkład HSDS w grupie badanej.....	40
Rycina 6. Rozkład maksymalnego stężenia hormonu wzrostu (GH) w grupie badanej...	48
Rycina 7. Rozkład wartości centylowej stężenia IGF-1 w grupie badanej.....	48
Rycina 8. Rozkład wartości centylowej stężenia IGFBP-3 w grupie badanej.....	49
Rycina 9. Chromatogram prezentujący obecny u pacjenta nr 4, 8, 10 i 13 polimorfizm genu <i>PAPP-A2</i> (rs10913241: c.2328C>T).....	63
Rycina 10. Częstość występowania polimorfizmu c.2328C>T (rs10913241) w grupie pacjentów poniżej 30 r.ż. oraz w poszczególnych populacjach.....	81