

## Streszczenie pracy doktorskiej lek. Anny Ruszały

**Promotor: dr hab. Małgorzata Wójcik**

**Temat pracy doktorskiej: „Selected hormonal and metabolic disorders in girls with Turner syndrome” – cykl publikacji**

**(„Wybrane aspekty zaburzeń hormonalnych i metabolicznych u dziewcząt z zespołem Turnera”)**

### **Wstęp**

Względnie nowym problemem analizowanym w pojedynczych doniesieniach z ostatnich lat, jest deficyt estrogenów i jego konsekwencje u dziewcząt z ZT przed okresem dojrzewania płciowego. Na to zagadnienie zwrócono uwagę, gdy jednoznacznie wykazano że u zdrowych dziewcząt, estrogeny są wydzielane przez jajniki także w okresie przedpokwitaniowym. Zjawisko to wydaje się mieć istotne, choć jeszcze nie całkowicie poznane znaczenie, dla rozwoju somatycznego i psychicznego. Z tego powodu w literaturze światowej w ostatnich latach pojawiają się sugestie, wskazujące na konieczność rozważenia wprowadzenia wcześniejszego niż rekomendowane dla indukcji dojrzewania, ultra niskich dawek estradiolu. Takie postępowanie miałyby zoptymalizować odpowiedź wzrostową na ludzki rekombinowany hormon wzrostu [38,39], korzystnie wpływać na rozwój i zdolności poznawcze dziecka, a także skutecznie zapobiegać osteoporozie [40-45]. Dotychczas brakuje jednak jednoznacznych dowodów na skuteczność i bezpieczeństwo takiego postępowania. Z pewnością decyzję o wcześniejszym wprowadzeniu substytucji hormonami płciowymi ułatwiłaby możliwość jednoznacznego określenia, które z pacjentek będą jej wymagały, jeszcze zanim wystąpią u nich jawne objawy hipogonadyzmu. Dotychczas nie udało się jednak określić dostatecznie czułych i swoistych wskaźników, które mogłyby być wykorzystane do tego celu u dziewcząt młodszych niż wiek fizjologicznego dojrzewania płciowego. Wiadomo, że u dziewcząt młodszych, diagnostyka hipogonadyzmu w oparciu o klasyczną metodę oceny stężeń gonadotropin nie jest wystarczająca [5]. Pewne nadzieje wiąże się z wykorzystaniem stosowanych od lat w ginekologii oznaczeń substancji będących wskaźnikami rezerwy jajnikowej – w tym najbardziej obiecujących i dostępnych AMH i inhibiny B. Na obecnym etapie rozwoju medycyny, postęp w zakresie metod hormonalnej terapii zastępczej oraz technik wspomaganego rozrodu powoduje, że pilną potrzebą wydaje się opracowanie nowego schematu diagnostycznego i terapeutycznego hipogonadyzmu i bezpłodności u chorych na ZT. Dodatkowe kontrowersje dotyczące stosowania hormonalnej terapii zastępczej u dziewcząt i dorosłych kobiet chorujących na ZT, budził przez lata możliwy negatywny wpływ tego leczenia na czynność wątroby [46,47]. Problem jest o tyle istotny i trudny, że według piśmiennictwa nieprawidłową aktywność aminotransferaz wątrobowych stwierdza się okresowo nawet u 20-80% dorosłych chorych na ZT, niezależnie od ich masy ciała [46,48-50]. Częstość jawnych, objawowych chorób wątroby, jest u nich również większa niż w populacji ogólnej. Co więcej, u dorosłych kobiet z niskim wzrostem i zwiększoną aktywnością aminotransferaz wątrobowych o nieustalonej przyczynie, często, w trakcie

diagnostyki, stwierdza się nierozpoznane wcześniej zaburzenia strukturalne chromosomu X, czy nawet ZT. Chociaż początkowo próbowano tłumaczyć to zjawisko częstszym występowaniem otyłości i niealkoholowego stłuszczenia wątroby, obecnie wiadomo, że te czynniki są odpowiedzialne jedynie za część spośród przypadków dysfunkcji wątroby u chorych na ZT. Pozostałe przyczyny w dalszym ciągu pozostają niejasne, a potencjalne hipotezy dotyczą autoimmunizacji, zaburzeń rozwoju naczyń krwionośnych, wpływu braku lub stosowania hormonalnej terapii zastępczej [46,50,52-65]. Ten ostatni czynnik był w ostatnich latach przedmiotem wnikliwych badań. Na podstawie ich wyników ustalono, że obserwowane u dorosłych chorych na ZT zaburzenia czynności wątroby, nie są spowodowane prawidłowo stosowaną hormonalną terapią zastępczą [66]. Dotychczas problem ten nie był szeroko badany u młodszych chorych z ZT.

### **Cele pracy**

Wspólnym celem cyklu trzech prac była analiza wybranych parametrów metabolicznych i hormonalnych oraz ich relacji ze stosowanym leczeniem, w szczególności z hormonalną terapią zastępczą u dziewcząt z ZT w okresie przed i w trakcie dojrzewania płciowego.

Celem szczegółowym *pracy 1* była ocena wpływu substytucji małymi dawkami estrogenów w okresie okołopokwitaniowym (8-12 lat), na wybrane parametry metaboliczne i auksologiczne u chorych na ZT.

Celem szczegółowym *pracy 2* była analiza wpływu hormonalnej terapii zastępczej i otyłości na funkcję wątroby, u pacjentek z ZT podczas kilkuletniej obserwacji.

Celem szczegółowym *pracy 3*, była próba określenia przydatności oznaczenia stężeń AMH i inhibiny B do oceny funkcji jajników, jako uzupełnienie konwencjonalnej diagnostyki hipogonadyzmu u dziewcząt z ZT.

### **Materiał (dotyczy wszystkich prac)**

Badaniami objęto pacjentki Kliniki Endokrynologii Dzieci i Młodzieży, Katedry Pediatrii, Instytutu Pediatrii, UJCM z potwierdzonym badaniem genetycznym ZT (kariotyp oznaczony w limfocytach krwi obwodowej, preparaty barwione metodą GTG 500 prążków, liczba liczonych mitoz 25, liczba kariotypowanych mitoz 5).

#### **Praca 1**

Do badania włączono 28 pacjentek z ZT leczonych rhGH przed okresem dojrzewania płciowego. W pierwszej grupie (średni wiek 13,8 lat), niskodawkową substytucję doustnym preparatem 17beta estradiolu wprowadzono w średnim wieku 10,5 lat, a następnie kontynuowano w dawkach standardowych po ukończeniu 12 r.ż. W drugiej grupie (średni wiek 16,4 lat), leczenie substytucyjne wprowadzono celem indukcji dojrzewania płciowego, w dawkach standardowych w średnim wieku 14 lat.

## Praca 2

Do badania włączono 100 pacjentek z zespołem Turnera w wieku 4-16 lat. Wszystkie pacjentki były leczone rhGH, a 44 z nich pozostawały również na substytucji estrogenowej (17beta estradiolem) lub estrogenowo/progesteronowej. Do części obserwacyjnej badania włączono 81 pacjentek, z odpowiednio długim (> 1 rok) okresem obserwacji. Średnia wartość BMI-SDS wynosiła 0,63, u 17 pacjentek stwierdzono otyłość (9 bez substytucji estrogenowej, 8 stosujących hormonalną terapię zastępczą).

## Praca 3

Do badania włączono 35 pacjentek z zespołem Turnera leczonych rhGH w wieku 10-12 lat bez cech dojrzewania płciowego.

### Metody (dotyczy pracy 1)

U połowy pacjentek substytucję estrogenową rozpoczęto podając doustnie ultra niskie dawki 17beta estradiolu (62,5  $\mu\text{g}/\text{dobę}$ ) przed ukończeniem 12 r.ż. (w średnim wieku 10,5 lat), a następnie po ukończeniu 12 r.ż. kontynuowano substytucję w standardowych dawkach. W drugiej grupie pacjentek substytucję wprowadzono w standardowych dawkach po ukończeniu 12 r.ż. (w średnim wieku 14 lat). U wszystkich pacjentek przed wprowadzeniem substytucji estrogenowej, oraz 3 lata od jej rozpoczęcia, oceniono wybrane parametry metaboliczne (lipidogram, test doustnego obciążenia glukozą z oznaczeniem glikemii i insulinemii na czczo i po 120 minutach). Dodatkowo u wszystkich pacjentek monitorowano przebieg wzrastania, zmiany BMI, awans wieku kostnego.

### Metody (dotyczy pracy 2)

U wszystkich pacjentek monitorowano funkcję wątroby na podstawie oznaczeń aktywności aminotransferaz wątrobowych: aminotransferaza alaninowa (ALT) i aminotransferaza asparaginowa (AST) w próbkach krwi żyłnej pobranej rano na czczo. W analizie uwzględniono zarówno wyniki badań uzyskane retrospektywnie, jak i podczas prospektywnej obserwacji (średni czas obserwacji 4,31 lat). Pomiaru masy ciała dokonano za pomocą wagi lekarskiej z dokładności do 0,1 kg, a pomiaru wzrostu na pomocą stadiometru z dokładnością do 0,1 cm.

### Metody (dotyczy pracy 3)

Ocenę osi gonadalnej i rezerwy jajnikowej (LH-hormon luteinizujący, FSH-hormon folikulotropowy, estradiol, AMH, inhibina B) przeprowadzono u pacjentek w wieku fizjologicznego dojrzewania płciowego (10-12 lat) przed wprowadzeniem estrogenowej terapii zastępczej. Podczas okresu obserwacji (do czasu wystąpienia samoistnego dojrzewania płciowego lub rozpoczęcia indukcji dojrzewania, zgodnie z aktualnymi standardami po ukończeniu 12 r.ż.) pacjentki podzielono na dwie

grupy w zależności od tego czy rozpoczęły samoistne dojrzewanie (SP), czy też nie (WP).

#### Statystyczne opracowanie wyników

Analizę danych rozpoczęto od opisu statystycznego grupy, podając liczebność i odsetki w przypadku danych jakościowych oraz średnią i odchylenie standardowe dla danych ciągłych. W celu dokonania analizy otrzymanych danych, grupa badana została podzielona na podgrupy z uwagi m.in. na takie czynniki, jak wiek chronologiczny, BMI, wystąpienie lub nie samoistnego dojrzewania płciowego, dawka otrzymywanych estrogenów. Istotność statystyczną różnic między dwiema niezależnymi grupami oceniano za pomocą testu Manna-Whitneya lub testu t-Studenta. Iloraz szans (OR) obliczono za pomocą analizy regresji logistycznej. Dla wszystkich obliczeń istotność statystyczną przyjęto na poziomie  $p < 0,05$ . Analizę statystyczną wykonano w programie Statistica v 12.0.

#### Podsumowanie wyników

W niniejszym rozdziale podsumowano wyniki zaprezentowane w artykułach 1–3.

#### **Artykuł nr 1**

**Prepubertal ultra-low-dose estrogen therapy is associated with healthier lipid profile than conventional estrogen replacement for pubertal induction in adolescent girls with Turner syndrome: preliminary results.**

**Opublikowany w "Journal of Endocrinological Investigation"**

Podstawowym celem pracy była ocena wpływu niskodawkowej substytucji estrogenowej wprowadzonej u pacjentek z ZT, w okresie fizjologicznego pokwitania (wiek poniżej 8 lat), ale przed wprowadzeniem pełnej dawki indukującej rozwój cech płciowych (wiek 12 lat), na wybrane parametry metaboliczne. Chociaż w chwili włączenia do badania wartości ocenianych parametrów metabolicznych i aksamologicznych nie różniły się pomiędzy grupami, to po trzech latach obserwacji u dziewcząt stosujących niskie dawki 17beta estradiolu w wieku 8-12 lat, stwierdzono znamienne niższe średnie stężenie cholesterolu całkowitego i cholesterolu LDL (odpowiednio: 3,8 vs 4,4 mmol/l,  $p = 0,004$ ; 1,9 vs 2,4 mmol/l,  $p = 0,03$ ). Podobnie, chociaż już bez znamienności statystycznej, korzystniejsze z punktu widzenia ryzyka metabolicznego wartości stężeń, miały także inne oceniane w surowicy wskaźniki metaboliczne (trójglicerydy 1,2 vs 1,3 mmol/l; glukoza na czczo 4,6 vs 4,8 mmol/l; glukoza 120 minut po obciążeniu doustnym (OGTT, test doustnego obciążenia glukozą) 5,2 vs 6,0 mmol/l; insulina na czczo 12,3 vs 15,6  $\mu\text{IU/ml}$ ; insulina 120 minut po obciążeniu doustnym (OGTT) 62,7 vs 83,7  $\mu\text{IU/ml}$ ). Również wartość wskaźnika HOMA-IR była niższa w grupie w której stosowano niskie dawki 17beta estradiolu (2,5 vs 3,6). Porównując wpływ wczesnego wprowadzenia

niskodawkowej substytucji estrogenowej na rozwój somatyczny, nie stwierdzono niekorzystnego wpływu na przebieg wzrastania, awans wieku kostnego ani zmiany BMI. Ultra niskie dawki 17beta estradiolu nie spowodowały rozwoju gruczołów piersiowych u żadnej z pacjentek.

Uzyskane wyniki pozwoliły na sformułowanie wniosku, że wprowadzenie niskodawkowej substytucji estrogenami u chorych na ZT w okresie okołopokwitaniowym, może korzystnie wpłynąć na profil lipidowy i inne parametry ryzyka metabolicznego, bez negatywnego wpływu na rozwój somatyczny i skuteczność leczenia rhGH.

### **Artykuł nr 2**

#### **Liver Biochemical Abnormalities in Adolescent Patients with Turner Syndrome.**

**Opublikowany w Journal of Clinical Research in Pediatric Endocrinology**

W chwili włączenia do badania, nieprawidłowa, zwiększona aktywność aminotransferaz wątrobowych została udokumentowana u aż 34% pacjentek, u żadnej z badanych nie stwierdzono jawnej choroby wątroby. U 18 (32%) spośród wyżej wymienionych, nie stosowano suplementacji hormonami płciowymi, 16 (36%) takie leczenie otrzymywało. Średnia wartość aktywności AST wynosiła 42,7 IU/l u nieleczonych hormonami płciowymi i 44,2 IU/ml u stosujących to leczenie. Wartości ALT w obu grupach wynosiły odpowiednio: 27,5 IU/l i 29,9 IU/l. Różnice nie były znamienne statystycznie. Zwiększoną aktywność AST i ALT stwierdzono odpowiednio u 10 i 9 chorych niestosujących oraz u 5 i 11 stosujących hormonalną terapię zastępczą. Średnie wartości aktywności AST u badanych z otyłością nie różniły się znamienne w porównaniu do chorych z prawidłową masą ciała i wynosiły odpowiednio: 47,5 IU/l i 42,5 IU/l. U pacjentek z ZT i otyłością stwierdzono natomiast znamienne statystycznie większą aktywność ALT 35,6 IU/l vs 27 IU/l,  $p=0,037$ . Pogłębiona analiza statystyczna nie wykazała jednak zwiększonego ryzyka zaburzeń czynności wątroby u otyłych chorych na ZT w porównaniu do chorych z prawidłową masą ciała. Podobnie, nie stwierdzono aby takie ryzyko było zwiększone w trakcie stosowania terapii hormonami płciowymi. W trakcie okresu obserwacyjnego analiza wyników powtarzanych co rok oznaczeń aktywności aminotransferaz wątrobowych, nie wykazała znamiennej zmiany częstości występowania dysfunkcji wątroby.

Uzyskane wyniki pozwoliły na sformułowanie wniosków, że zaburzenia czynności wątroby są częstą nieprawidłowością u chorych na ZT dziewcząt przed osiągnięciem dorosłości. Ani otyłość ani stosowanie hormonalnej terapii zastępczej nie mają wpływu na ryzyko rozwoju u nich dysfunkcji wątroby.

### **Artykuł nr 3**

**Evaluation of the usefulness of antimüllerian hormone and inhibin B as markers of ovarian activity in patients with Turner syndrome – preliminary results**

Samoistne dojrzewanie płciowe, definiowane jako rozwój piersi oceniony na stopień II lub wyższy w skali Tannera, wystąpiło u 16 spośród 35 włączonych do badania chorych na ZT dziewcząt. Średni wiek początku dojrzewania płciowego wynosił 10 lat. W przeważającej części grupy dojrzewających samoistnie stwierdzono kariotyp mozaikowy (87,5% chorych), podczas gdy u dziewcząt niedojrzewających samoistnie występował on jedynie u 47%. Grupa pokwitających samoistnie, w porównaniu do dziewcząt u których pokwitanie nie wystąpiło, charakteryzowała się mniejszymi średnimi wartościami stężeń FSH: 24,5 IU/l (zakres: 1,14-91,1) vs 66,5 IU/l (7,7-196,4) ( $p=0,002$ ), większymi średnimi stężeniami estradiolu: 28,4 pg/ml (10,5-68,8) vs 14,9 pg/ml (6,1-26,0) ( $p=0,005$ ), AMH: 0,8 ng/ml [0,0-3,11] vs 0,003 ng/ml (0,0-0,002) ( $p=0,001$ ) i inhibiny B: 29,1 pg/ml (0,0-110,0) vs 1,06 pg/ml (0,0-11,0) ( $p=0,026$ ). U trzech pacjentek z grupy pokwitających samoistnie, bez podwyższonego stężenia FSH ( $FSH < 35 \text{ mIU/ml}$ ), stwierdziliśmy jednak zerowe stężenia AMH i inhibiny B. Na podstawie wyników badania postawiono następujący wniosek: Niskie stężenia AMH i inhibiny B, wskazujące na zmniejszoną rezerwę jajnikową, mogą występować nawet u tych pacjentek, u których początkowo nie stwierdza się ewidentnych klinicznych ani biochemicznych cech hipogonadyzmu hipogonadotropowego.

#### Podsumowanie

(dotyczy trzech prac)

1. Substytucja estradiolem wprowadzona wcześniej oraz w znacznie mniejszej dawce niż rekomendowana dla indukcji dojrzewania płciowego, może u chorych ZT korzystnie wpłynąć na profil lipidowy i inne parametry ryzyka metabolicznego. Takie postępowanie wydaje się nie mieć negatywnego wpływu na rozwój somatyczny i skuteczność leczenia rhGH.
2. Biochemiczna dysfunkcji wątroby nie jest wyłącznie cechą dorosłych pacjentek z ZT, ale dotyczy także dziewcząt w wieku poniżej 18 lat. Współwystępowanie otyłości ani stosowanie preparaty estrogenowych nie zwiększają ryzyka rozwoju zaburzeń funkcji wątroby w tej grupie pacjentek.
3. Ocena stężeń AMH i inhibiny B, może być wartościowym elementem oceny funkcji jajników u młodych pacjentek z zespołem Turnera. Niskie stężenia AMH i inhibiny B mogą wskazywać na ryzyko niewydolności jajników nawet u tych pacjentek, które rozpoczęły

dojrzewanie płciowe samoistnie i u których nie stwierdzono hipogonadyzmu hipergonadotropowego.

### **Streszczenie w języku angielskim**

Turner Syndrome (TS) affects approximately 1 per 2000-2500 live female births and is one of the most common chromosomal aberration in females. It is estimated that each year about 80-100 girls with TS are born in Poland. Great individual variability in the dysmorphic features, congenital malformations, hormonal and metabolic disturbances can be noted in patients with this syndrome. Turner Syndrome patients present also with heterogeneity of karyotype with monosomy (45, X) in more than 50% of patients, mosaic karyotype in about 1/3 of patients and structural abnormalities of the X chromosome in other cases. Although strict correlation between karyotype and phenotype has not been confirmed, some karyotypes may be related to specific clinical course. Despite knowledge about TS and availability of diagnostic methods are rising, TS is in Poland diagnosed at the mean age of 9-10 years old, which is two years later than in American population. Missed or delayed diagnoses can be caused by ignorance of the symptoms, especially that symptoms can be various depending on patient's age. Prenatal diagnosis can be carried out because of abnormalities found in ultrasonography such as increased nuchal translucency, frank cystic hygroma, cardiac defects, renal anomalies or poly/oligohydramnios. Abnormal concentration of alpha-fetoprotein, human chorionic gonadotropin, inhibin A and unconjugated estriol in mother's blood may also suggest the diagnosis of TS. In newborns and infants with TS webbed neck, edema of hands and feet and low birth weight/length together with characteristics dysmorphic features (low hairline, epicanthal folds, high-arched palate, low-set ears) can be noticed. If not found prenatally cardiac and renal anomalies can be also diagnosed in these periods. In childhood and adolescence main symptom implying karyotyping is growth failure found in 95% of TS patients. It is escalating through patient's life and without growth-promoting treatment patients with TS are about 20 cm shorter than healthy peers. Another important symptom appearing at this age is hypogonadism. It is estimated that it's symptoms will appear in about 90% of TS individuals at some point of life. Although according to literature 30% of TS patients undergo some spontaneous pubertal development and 10- 15% have spontaneous menarche, most of patients have premature ovarian failure. Because of that most patients will demand long estrogen replacement therapy for induction of puberty and for maintaining female secondary sex characteristics. According to current guidelines hormonal replacement therapy (HRT) should be initiated at 11-12 years of age with low doses and then be increased gradually over a period of 2–3 years. As it is known that healthy girl's ovaries secrete estradiol also before the puberty, there is uncertainty whether estradiol deficit in this period in TS patients may be harmful. Because of short stature and tendency to overweight and obesity TS patients should have periodic metabolic evaluation and dietary assessment.

One of the disorders often found in TS patients, regardless of their body weight, are elevated liver aminotransferases. Hormonal replacement therapy has also been considered as potential factor influencing liver's function, but current researches did not confirm this correlation in adults patients.

### **Objectives:**

The common goal of the presented dissertation is to analyse selected metabolic and hormonal factors and their correlation with conducted treatment, especially with hormonal replacement therapy in TS patients in prepubertal and pubertal period.

Detailed goal of article 1 was evaluation the influence of low dose estrogen replacement therapy in peripubertal period (8-12 years) on selected metabolic and auxological parameters in TS patients.

Detailed goal of article 2 was evaluation the influence of hormonal replacement therapy and obesity on liver function in TS patients during several years of observation.

Detailed goal of article 3 was attempt to evaluating the usefulness of antimüllerian hormone (AMH) and inhibin B assessment in predicting ovarian function as complement to the diagnosis of ovarian function in patients with TS.

### **Material (all articles)**

The study involved patients of the Department of Pediatric and Adolescent Endocrinology, Chair of Pediatrics, Pediatric Institute, Jagiellonian University Medical College, Kraków with TS confirmed in genetic evaluation (karyotyping analysis was performed using lymphocyte cultures).

#### **Article 1**

The study involved 28 prepubertal TS patients treated rhGH. All participants were divided into 2 groups. In the first group (14 TS patients, mean age 13.8) low-dose estrogen replacement therapy (17beta estradiol, 62.5 µg daily) was introduced before age 12 (mean age 10.5), and followed by a pubertal induction regimen after age 12. In the second group (14 TS patients) estrogen replacement therapy was started in accordance with present standards after the age of 12 (mean 14, SD 1.96).

#### **Article 2**

The study involved 100 TS patients aged 4-16 years. All patients were treated with rhGH and 44 of them additionally were on estrogen/estrogen-progestin patches. Longitudinal study included 81 patients with follow-up longer than 1 year. Mean BMI-SDS was 0.63, 17 patients were obese (9 without HRT and 8 with HRT).

#### **Article 3**



The study involved 35 TS patients aged 10-12 years without pubertal development treated with rhGH.

### **Methods (Article 1)**

Before, and 3 years after starting 17beta estradiol growth velocity, bone age, BMI, and selected parameters of glucose and lipids metabolism were assessed in all patients.

### **Methods (Article 2)**

The activity of aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) was measured in fresh serum samples, blood was collected in the fasting state, in the morning (7.00-9.00), during routine examinations performed in patients with TS. It was a retrospective analysis plus prospective follow-up period (mean follow-up 4.31 years). Body height and weight were measured to the nearest 0.1 cm and 0.1 kg, respectively, using a stadiometer and a balanced scale.

### **Methods (Article 3)**

Evaluation of gonadal axis function (LH-luteinizing hormone, FSH-follicle-stimulating hormone, estradiol, AMH, inhibin B) was performed at the age of physiological puberty (10-12 y, mean 10.5 y), before introduction of hormonal replacement therapy (HRT). In follow up (up to beginning of the spontaneous puberty or starting hormonal replacement therapy at the age of 12 which is in accordance with present standards) patients were divided into 2 groups: with spontaneous puberty (SP) and without (WP).

### **Statistical analysis**

Characteristics of the presented patient population were described using statistical tests for single variables. For continuous variables, mean and standard deviation were given, the observed distributions were then compared using a t-Student test or Mann-Whitney test. In order to analyse our accumulated data, the study population was divided into groups based on such factors as age, BMI, presence of spontaneous puberty, dosage of received estrogens. For continuous variables, mean and standard deviation were given, the observed distributions were then compared using a two-sided t-test, Mann-Whitney non-parametric test. The studied groups were compared directly, and after standardization (using logistic regression model). The significance level for a study was set at  $p < 0.05$ . Statistical analyses were performed using Statistica v 12.0.

### **Article 1**

**Prepubertal ultra-low-dose estrogen therapy is associated with healthier lipid profile than conventional estrogen replacement for pubertal induction in adolescent girls with Turner syndrome: preliminary results.**

**Published in "Journal of Endocrinological Investigation"**

Main goal of the study was evaluation the influence of ultra low-dose estrogen replacement therapy introduced in patients with ZT at the age of physiological puberty (age>8 years), but before the recommended age for starting standard dose estrogen replacement therapy (age<12 years) on selected metabolic factors. Although before introduction of 17beta estradiol there were no significant differences between two groups of patients in any assessed parameters, after three years of observation total cholesterol and LDL-cholesterol levels were significantly lower in the first group treated with ultra low-dose estrogens (3.8 vs. 4.4 mmol/L,  $p = 0.004$ ; 1.9 vs. 2.4 mmol/L,  $p = 0.03$  respectively). The other parameters did not differ significantly, but results were also more beneficial in ultra low-dose estrogen group (TG 1.2 vs. 1.3 mmol/L, fasting glucose 4.6 vs. 4.8 mmol/L, glucose 120 minutes after oral glucose tolerance test 5.2 vs. 6.0 mmol/L; fasting insulin 12.3 vs. 15.6  $\mu\text{IU/mL}$ , insulin 120 minutes after oral glucose tolerance test 62.7 vs. 83.7  $\mu\text{IU/mL}$ ; HOMA-IR 2.5 vs. 3.6). We observed no negative impact on growth course and bone age advancement nor on BMI in patients treated with ultra low-dose of estrogens. There was also no case of premature breast development in this group of patients. Prepubertal low-dose estrogen LE with TS. LE should be considered for girls with TS not only due to positive effects on growth and puberty course but also because of its positive metabolic effects.

In this study we demonstrated that in TS patients ultra low-dose estrogen replacement therapy in prepubertal age is associated with healthier lipid profile than conventional estrogen replacement therapy and has no negative impact on growth and effects of rhGH treatment.

## **Article 2**

### **Liver Biochemical Abnormalities in Adolescent Patients with Turner Syndrome.**

#### **Published in Journal of Clinical Research in Pediatric Endocrinology**

At the beginning of the study elevated liver function tests (LFTs) were found in 34 patients 34% [in 18 (32%) without HRT vs. in 16 (36%) on HRT], no patients was diagnosed with overt liver disease. Increased AST activity was present in 10 (18%) without HRT; in 5 (11%) on HRT, and elevation of ALT [in 9 (16%) without HRT and in 11 (25%) on HRT]. The mean values of AST in both groups (without HRT and with HRT) were 42.7 IU/L and 44.2 IU/L  $p=0.8$ , and the mean value of ALT were 27.5 IU/L and 29.9 IU/L,  $p=0.14$  respectively. Differences were not statistically significant.

The mean values of AST in patients with obesity and non-obese were 47.5 IU/L and 42.5 IU/L,  $p=0.8$ , difference was not statistically significant. The mean values of ALT in patients with obesity and non-obese were 35.6 IU/L and 27 IU/L, and difference was statistically significant  $p=0.037$ . Nevertheless, the relative risk of increased LFTs activity was not higher in obese vs normal weight. Similarly, HRT did not increase the risk of abnormal LFTs activity. During the follow-up period, no patient developed overt

liver disease. There was no significant increase nor decrease of the abnormal LFTs frequency in the subsequent years of follow up ( $p>0.05$ ).

As a conclusion we found that constantly elevated LFTs are common in children and adolescents with TS. This study suggests that obesity and HRT do not increase the risk of elevated LFTs

### **Article 3**

#### **Evaluation of the usefulness of antimüllerian hormone and inhibin B as markers of ovarian activity in patients with Turner syndrome – preliminary results**

##### **Published in Pediatric Endocrinology, Diabetes and Metabolism**

Spontaneous puberty was defined as Tanner stage 2 or higher breast development and occurred in 16 out of 35 ZT patients at the mean age of 10 years. Most of patients with spontaneous puberty (SP) had mosaic karyotype (87.5 %), while in patients without spontaneous puberty (WP) it was found only in 47 %. SP patients presented with significantly lower mean FSH level (1.14-91.1 mean value 24.5 vs. 7.7-196.4, mean value 66.5 mIU/mL,  $p=0.002$ ), significantly higher mean estradiol (10.5-68.8, mean value 28.4 vs. 6.1-26.0, mean value 14.9 pg/mL,  $p=0.005$ ), AMH (0.0-3.11, mean value 0.8 vs. 0.0-0.002, mean value 0.003 ng/mL,  $p=0.001$ ) and inhibin B (0.0-110.0, mean value 29.1 vs. 0.0-11.0, mean value 1.06 pg/mL,  $p=0.026$ ) levels. Interestingly, in three SP patients with not elevated FSH level ( $FSH<35$ mIU/mL) we found zero concentration levels of AMH and inhibin B.

Based on obtained results we found that low levels of AMH and inhibin B may indicate a risk of ovarian failure even in patients with spontaneous puberty and without hypergonadotropic hypogonadism.

##### **Summary:**

1. In TS patients ultra low-dose estrogen replacement therapy in prepubertal age is associated with healthier lipid profile than conventional estrogen replacement therapy and has no negative impact on growth and effects of rhGH treatment.
2. Elevated LFTs are common not only in adults, but also in children and adolescents with TS. Obesity and HRT do not increase the risk of elevated LFTs
3. AMH and inhibin B levels may be useful parameters in ovaries function evaluation. Low levels of AMH and inhibin B may indicate a risk of ovarian failure even in patients with spontaneous puberty and without hypergonadotropic hypogonadism.