

PROPEPTIDUL AMINO-TERMINAL AL PROCOLAGENULUI TIP I LA PACIENȚII CU DEFICIT DE HORMON DE CREȘTERE ÎN PERIOADA DE TRANZIȚIE

Mariana Costache-Outas^{1,2}, Andra Caragheorgheopol³, Camelia Procopiuc³,
Cristina Dumitrescu³, Cosmina Raluca Costache⁴, Simona Fica^{1,5}

¹Universitatea de Medicină și Farmacie „Carol Davila”, București

²Spitalul Clinic „Colțea”, București

³Institutul Național de Endocrinologie „C.I. Parhon”, București

⁴Spitalul Clinic „Dr. Ioan Cantacuzino”, București

⁵Spitalul Universitar de Urgență „Elias”, București

REZUMAT

Introducere. Achiziția de masă osoasă continuă și după atingerea taliei finale în perioada de tranziție. Deficitul de hormon de creștere (GHD) pare să aibă un efect semnificativ asupra turnover-ului colagenului în timpul copilăriei și mai puțin în timpul maturității. Propeptidul amino terminal al colagenului tip I (P1NP) este un marker de formare osoasă cu variabilitate intraindividuală scăzută față de IGF1.

Subiecți și metodă. 17 pacienți de sex masculin diagnosticați în timpul copilăriei cu GHD, retestați în perioada de tranziție, au fost evaluați la minimum 3 luni de la întreruperea tratamentului cu GH. Am evaluat corelația P1NP cu IGF1. Am determinat puterea predictivă a P1NP în identificarea pacienților cu deficit de GH persistent.

Rezultate. Am găsit o corelație pozitivă puternică între P1NP și IGF-1 în grupul de pacienți care au menținut deficitul de GH în perioada de adult tânăr ($r = 0,72$, CI [0,02 la 0,94], $p = 0,046$). O valoare prag pentru P1NP de - 0,66 SDS prezice persistența deficitului de GH cu o sensibilitate de 62,5% CI [24,5 la 91,5], specificitate de 75% CI [47,6 la 92,7] și AUC = 0,719 CI [0,5 la 0,881], $p < 0,05$. Nu am găsit o diferență semnificativă atunci când am comparat AUC pentru cei 2 parametri ($p = 0,29$).

Concluzii. În perioada de tranziție, atunci când viteza de creștere nu mai este disponibilă, dinamica P1NP în timpul terapiei substitutive cu GH ar putea fi utilă în cuantificarea eficienței tratamentului.

Cuvinte cheie: Markerii de colagen, P1NP, IGF1, hormon de creștere, deficit de GH, perioada de tranziție

Mulțumiri

Această lucrare a beneficiat parțial de suport financiar prin proiectul „CERO-PROFIL DE CARIERĂ: CERCETĂTOR ROMÂN” contract nr. POSDRU/159/1.5/S/135760, cofinanțat din Fondul Social European prin Programul Operațional Sectorial Dezvoltarea Resurselor Umane 2007-2013.

INTRODUCERE

Achiziția de masă osoasă continuă și după atingerea înălțimii finale, în cursul perioadei de tranziție, care este definită ca intervalul de timp parcurs de la atingerea înălțimii finale și până la finalizarea dezvoltării somatice. Axa hormon de creștere (GH, *growth hormone*) – factor de creștere, similar insulinei I (IGF1, *insulin growth factor I*), are un efect determinant asupra vârfului de densitate osoasă atins la mijlocul anilor douăzeci, în perioada de adult tânăr (1). Ritmul ultradian al eliberării GH-

ului face dificilă identificarea cu precizie și exactitate a deficitului somatotrop (2). Concentrațiile serice ale IGF1 și markerilor de colagen cresc ca răspuns la GH (3,4).

În ciuda utilizării răspândite în anumite circumstanțe clinice a IGF1 ca un test de screening pentru deficitul de GH (GHD), coeficientul său de reproductibilitate este mai mic decât cel al markerilor de colagen la determinări spațiate în cazul aceluiași individ (5) (IGF binding protein 3 – IGFBP-3). Markerii de colagen nu sunt considerați instrumente de diagnostic pentru GHD (6). Markerii surogat ai

Adresa de corespondență:

Mariana Costache-Outas, Spitalul Clinic „Colțea”, Bulevardul Ion C. Brătianu nr. 1, București

E-mail: costache.mariana@gmail.com

sintezei de colagen permit evaluarea formării osoase (7,8).

Propeptidul amino-terminal al procologenului tip I este derivat din colagenul de tip I – într-o manieră stoechiometrică și este considerat o metodă de cuantificare a colagenului tip I nou format, colagenul principal al osului.

În timpul creșterii din copilărie, markerii surrogat de formare osoasă circulă la concentrații mai mari decât în viața adultă și se corelează cu viteza de înălțare (9,10). Nivelurile lor variază în timpul pubertății și sunt mai mari în perioadele de viteză maximă de creștere. GH-ul, precum și hormonii sexuali influențează nivelurile markerilor de formare osoasă (11). GHD pare să aibă un efect semnificativ asupra ratei de reînnoire a colagenului în timpul copilăriei și mai puțin în timpul maturității, atunci când hormonii sexuali și factorii locali contracarează parțial consecințele negative ale deficitului cronic de GH-IGF-I în sinteza colagenului (12). Nu există date disponibile despre markerii surrogat ai turnover-ului osos și asocierea acestora cu statutul de GH în perioada de tranziție.

Pentru a obține o aprofundare a rolului P1NP în screening-ul persistenței GHD în perioada de tranziție, am evaluat concentrațiile acestuia la adolescenți GHD și voluntari sănătoși și le-am comparat cu nivelurile IGF1. Am emis ipoteza că P1NP este mai scăzut la pacienții cu persistența GHD în perioada de tranziție.

METODA

Subiecți

Am evaluat P1NP într-un studiu de tip transversal. 17 pacienți de sex masculin diagnosticați în timpul copilăriei cu GHD, izolat (CO-IGHD), sau ca parte a deficitului multiplu hipofizar (MPHD) (4 pacienți), urmăriti în cadrul Departamentului de Pediatrie al Institutului Național de Endocrinologie, au fost selectați pentru acest studiu. O parte din prezentul grup a fost utilizat într-un studiu anterior în care am determinat persistența GHD în perioada lor de tranziție.

Toți pacienții au avut indicația de întrerupere a tratamentului cu GH pentru atingerea înălțimii finale în perioada cuprinsă între septembrie 2008 și decembrie 2013.

Pacienții cu CO-IGHD au fost retestați pentru persistența GHD în perioada lor de tranziție folosind testul de hipoglicemie insulin-indusă (ITT), cu nivel prag al GH-ului maxim stimulat de 6.1 ng/dl. În urma ITT, 4 dintre cei 13 pacienți cu CO-IGHD

au fost considerați ca GHD persistenți și împreună cu pacienții MPHD au fost incluși în grupul pGHD (date nepublicate). Un grup de control de 8 subiecți sănătoși, potriviți pentru vârstă și etapă pubertară, au fost recrutați dintre copiii personalului medical al institutului nostru. Grupul de subiecți GH suficienți (sGH) a inclus subiecți cu GHD reversibil și subiecții control.

Studiul a fost aprobat de comisia științifică a Departamentului de Pediatrie. Consimțământul informat scris a fost obținut de la toți părinții și pacienții.

Analizele biochimice

Probele pentru determinarea IGF1 și P1NP au fost colectate între orele 8 și 9 dimineața, pe nemâncate. În următoarele 2 ore, probele au fost centrifugate la 4°C, plasma separată și utilizată pentru măsurători sau stocată la -20°C până la analiza ulterioară.

IGF-1 a fost măsurat prin metoda chemiluminescentă utilizând anticorpi monoclonali (Liaison, DIASORIN) (limita de detecție de 0,01 ng/ml, coeficient de variație (CV) interdozare 8,2%). P1NP total a fost analizat folosind anticorpi monoclonali de șoarece împotriva P1NP prin metodă electrochemiluminescentă cu un analizor Cobas (Elecsys 2010 total P1NP, Roche Diagnostics- limita de detecție 5 ng/ml, CV interdozare 4,1%).

În cazul P1NP, toate probele din studiu au fost măsurate folosind același lot de analiză.

Valorile de referință

Pentru IGF-1 și P1NP, am calculat mediile specifice vârstei, deviația standard (DS) și intervalele de încredere 95% (95% CI), folosindu-se valorile lor în grupul sGH. Pentru fiecare dintre cei doi parametri, am evaluat modificări cu vârsta, folosind un model de regresie polinomială (software statistic MedCalc v.14.8.1.0). Un al doilea model de regresie a fost folosit pentru a obține deviația standard în funcție de vârstă. Am stratificat grupul sGH în 2 intervale de vârstă (15-16,9 și respectiv 17-19 ani), în conformitate cu specificațiile din literatură pentru variația valorilor P1NP în funcție de vârstă. Pentru a verifica valorile aberante în fiecare grupă de vârstă, am folosit testul Tukey. Am evaluat normalitatea distribuției folosind testul Shapiro-Wilk pentru fiecare grupă de vârstă. Am evaluat omogenitatea varianțelor folosind testul Levene. Am calculat indicii de asimetrie și aplatizare pentru fiecare grupă de vârstă. Am transformat în scor de deviație standard (SDS), folosind formula: $x - \text{media } x / DS$,

unde x este valoarea absolută IGF-1 sau P1NP a pacientului, media x este media IGF1 sau P1NP pentru subgrupul de pacienți sGH din care face parte cazul index.

Metoda prelucrare date statistice

Analiza statistică a fost realizată cu ajutorul SPSS v 16.0. Corelația dintre diferiți parametri a fost realizată folosind coeficientul Pearson (pentru date parametrice). Semnificația statistică a diferențelor între valorile medii între diferitele categorii a fost determinată folosind testul t (atunci când se compară două grupuri). O valoare $p < 0.05$ a fost considerată semnificativă din punct de vedere statistic. Pentru a evalua performanța de diagnostic a IGF1 și P1NP în caracterizarea GHD în perioada de tranziție, am ales nivelul prag al acestor parametri cu cea mai bună specificitate și sensibilitate așa cum a rezultat din analiza curbei ROC. Am folosit software-ul de statistică MedCalc v.14.8.1.0 pentru a compara performanța ariei de sub curba ROC (AUC) pentru cei doi parametri și a identifica în mod corect starea de deficit de GH.

Rezultate obținute

Am evaluat șaptesprezece pacienți de sex masculin cu GHD (4 MPH), cu o vârstă medie de 17,3 ani, tratați în timpul copilăriei cu GH recombinant pentru o perioadă medie de 6,88 ani (interval 2,9-12,4 ani), după o perioadă minimă de 3 luni de la întreruperea tratamentului cu GH. Patru pacienți IGHD au menținut GHD după retestarea în perioada de tranziție. Un grup de 8 subiecți control, potriviți de vârstă, alături de pacienții cu GHD reversibil, au reprezentat grupul de subiecți cu axa GH competentă (sGH).

Tabelul 1 prezintă caracteristicile clinice și biochimice ale subiecților separați în funcție de statu-

sul axei GH. Toți subiecții au prezentat pubertate spontană în stadiul Tanner V de sexualizare sau au avut substituție adecvată cu steroizi sexuali.

Am stratificat grupul sGH în 2 intervale de vârstă (15-16.9 și respectiv 17-19 ani). Valorile IGF1 și P1NP au avut o distribuție normală în grupul sGH așa cum rezultă din testul Shapiro-Wilk ($p > 0,05$), cu un indice de asimetrie de 0,835 (eroare standard (SE) 0,550) și un indice de aplatizare de 0,557 (SE = 1,063) pentru IGF1 și respectiv indice de asimetrie de 0,003 (SE = 0,550) și un indice de aplatizare de -0,459 (SE = 1,063) pentru P1NP. Valorile IGF1 și P1NP mențin distribuția normală în grupurile stratificate în funcție de vârstă (datele nu sunt prezentate). Am folosit grupul sGH ca referință pentru valorile normale IGF1 și P1NP. Am obținut pentru fiecare an de vârstă, media și deviația standard (DS) pentru P1NP și IGF-1 ca o funcție de vârstă. Vârsta a fost un predictor semnificativ doar pentru DS a P1NP. Am găsit o distribuție normală pentru P1NP și IGF1 în grupul GHD stratificat în funcție de vârstă. Am găsit o suprapunere a valorilor absolute ale P1NP între pacienți GHD și grupul de referință. A existat o tendință către o diferență semnificativă a concentrațiilor absolute ale P1NP când comparăm cele două grupuri ($p = 0,07$), cu valori mai mici în grupul GH deficient. Pacienții GH suficienți au P1NP exprimat ca SDS (medie = 0, SE = 0,23) superior comparativ cu pacienții GHD (medie = -0,71, SE = 0,58). Această diferență a fost semnificativă [$t(21) = 2,24, p < 0,05$] și reprezintă un efect mediu $r = 0,44$. În grupul GH deficient nu a existat nici o valoare a P1NP sub $-2SDS$.

Deși nu am găsit o diferență semnificativă între mediile pentru cei doi parametri, P1NP și IGF1, când am comparat grupul sub 17 ani cu grupul de vârstă mai mare, am păstrat intervalele de referință

TABELUL 1. Caracteristicile pacienților separați în funcție de statusul GH

	pGHD (n=8)		sGH (17)	
	medie ± SD	[min, max]	medie ± SD	[min, max]
BMI (SDS)	0,40±1,82	[-2.9, 1.4]	-0,74±0,82	[-1.7, 0.75]
Ht (SDS)	-1,1±1,12	[-3.2, 0.09]	-0,63±1,20	[-2.89, 1.46]
CA (ani)	17,53±1,26	[15.2, 18.9]	16,94±1,01	[14.9, 18.5]
P1NP (SDS)	-0,71±0,58	[-1.49, 0.27]	0±0,97	[-1.56, 1.37]
P1NP (ng/mL)	214,36±74,57	[106.7, 321.1]	308,41±130,95	[120.2, 537.8]
IGF1 (SDS)	2,1±1,48	[-3.69, 0.49]	0±0,97	[-1.46, 2.04]
IGF1 (ng/mL)	209,68±151,88	[60.94, 493.7]	398,12±102,45	[250.8, 638.8]
timeTx (ani)	1,38±1,27	[0.3, 4.2]	0,81±0,53	[0.3, 1.9]*

medie ± SD [min, max]

pGHD, deficit persistent al GH; sGH, GH suficient; IMC, indice de masă corporală; SDS, scor deviație standard; Ht, înălțime; CA, vârsta cronologică; P1NP, capătul amino-terminal al procologenului de tip I; IGF1, factor de creștere similar insulinei I; timeTX, timp de la întreruperea tratamentului cu GH;

* cu excepția subiecților control

stratificate pe vârstă datorită diferenței semnificative dintre DS.

Figura 1 prezintă relația grafică dintre valoarea absolută a P1NP și IGF-1, folosind o diagramă de dispersie. Am găsit o corelație pozitivă puternică între P1NP și IGF-1, atât în grupul GHD, cât și în grupul sGH ($r = 0,72$, CI [0,02 la 0,94], $p = 0,046$ și respectiv $r = 0,48$ CI [-0,01 la 0,79], $p = 0,058$).

După ce am ajustat pentru vârsta cronologică, deficitul de înălțime și greutate, această corelație a fost menținută doar în grupul GHD. Tabelul 2 prezintă corelația între P1NP și IGF1 și anumiți parametri clinici.

Valorile P semnificative sunt cu caractere îngroșate.

Analiza curbei ROC a arătat că cea mai bună valoare prag pentru IGF-1-SDS care discriminează între GHD și sGH a fost -1,34 SDS, cu o sensibilitate de 80% CI [44,4 la 97,5], o specificitate de 93,75% CI [69,8 la 99,8] și $AUC = 0,875$ CI [0,686 la 0,971], $p < 0,05$. Probabilitatea prezisă pentru un rezultat pozitiv al testului (LR +) a fost de 12,8 CI [1,9 la 87,6]. Probabilitatea prezisă pentru un rezultat negativ (LR-) a fost de 0,21 CI [0,06 la 0,7].

Analiza curbei ROC a arătat că cea mai bună valoare prag pentru P1NP-SDS care discriminează între GHD și sGH a fost -0,66 SDS, sensibilitate de 62,5% CI [24,5 la 91,5], specificitate de 75% CI [47,6 la 92,7] și $AUC = 0,719$ CI [0,5 la 0,881], $p < 0,05$. Probabilitatea prezisă pentru un rezultat pozitiv al testului (LR +) a fost de 2,5 CI [0,9 la 6,8]. Probabilitatea prezisă pentru un rezultat negativ al testului (LR-) a fost de 0,5 CI [0,2 la 1,3]. Nu am găsit o diferență semnificativă atunci când am comparat AUC pentru cei doi parametri ($p = 0,29$).

DISCUȚII

P1NP este un marker al formării osoase. Acesta provine din conversia procolagenului în collagen în cursul sintezei de collagen tip I. Eliminarea capătului amino-terminal este realizată de proteaze specifice atunci când collagenul de tip I este încorporat în matricea osoasă. Concentrația P1NP este legată de cantitatea de os nou format (13). În 2011, Fundația Internațională de Osteoporoză, Federația Internațională de Chimie Clinică și Grupul de lucru privind standardele de Laborator ale markerilor osoși au

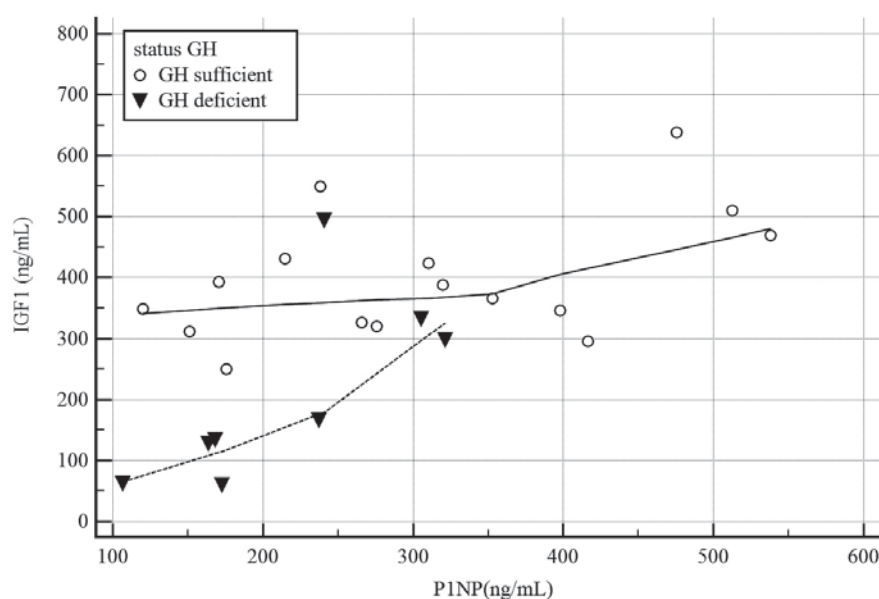


FIGURE 1. Corelația între propeptid amino-terminal collagen tip I, P1NP cu factorul de creștere similar insulinei

TABELUL 2. Corelația P1NP și IGF1 cu parametri clinici

	P1NP		IGF1	
	r	p	r	p
Ht (SDS)	0,424	0,039	0,338	0,098
Greutate (kg)	-0,139	0,584	-0,560	0,016
CA (ani)	-0,383	0,065	-0,593	0,002
timeTx (ani)	-0,393	0,107	-0,476	0,046

r – coeficientul de corelație Pearson; P1NP – propeptidul amino-terminal al procolagenului de tip I; IGF1 – factorul de creștere similar insulinei I; SDS – scor deviație standard; Ht, înălțime; CA – vârsta cronologică; timeTx – timpul de la întreruperea tratamentului cu hormon de creștere

recomandat utilizarea P1NP ca marker de referință pentru formarea osoasă (14).

Datele obținute în studiul nostru arată că în timpul perioadei de tranziție, P1NP se corelează pozitiv cu IGF-1. Studiile anterioare au arătat că lipsa efectului GH/IGF-I asupra turnover-ului osos, așa cum apare în deficitul de hormon de creștere, este asociată cu formarea osoasă și sinteza scăzută de colagen doar în timpul copilăriei, dar nu și în viața de adult (12).

Nivelurile serice scăzute ale propeptidelor de procologen în cazul copiilor cu GHD au fost legate de viteza de creștere redusă (15,16).

Subiecții incluși în studiul nostru sunt evaluați după atingerea înălțimii finale, în etapa de tineri adulți, într-o perioadă când acreția de masă mineral-osoasă continuă.

Am folosit pentru analiza biochimică un test pentru P1NP total care detectează două forme antigenice diferite ale P1NP, cea trimerică, intactă și cea monomerică. Această caracteristică este relevantă în special atunci când modificările ce urmează să fie măsurate sunt relativ mici și ar fi de așteptat un comportament mai dinamic pentru un test care detectează P1NP intact (13). Concentrațiile plasmatică ale P1NP la pacienții GHD au fost în intervalul de referință pentru indivizi normali. Acest lucru poate fi explicat prin intervale de referință prea extinse ale acestui marker, cu variație inter-individuală considerabilă, reflectând mari variații inter-individuale ale ratei de înnoire osoasă la adulți (17).

Valorile P1NP variază în funcție de vârstă. În cazul subiecților noștri, corelația negativă a P1NP cu vârsta este de așteptat, dat fiind declinul fiziologic al markerilor de colagen după parcurgerea pubertății (18). Spre deosebire de impactul negativ asupra valorilor IGF1, P1NP nu este influențat de greutate.

Valori similare pentru P1NP între pacienții cu GHD reversibil și martori sugerează o rată a formării de masă osoasă normală în primul caz.

Am găsit o diferență semnificativă între P1NP, exprimat ca SDS între pacienții cu GHD și subiecții GH-suficienți.

Acest fapt sugerează un rol determinant asupra markerilor turnover-ului osos al axei GH-IGF1 în timpul etapei de tranziție, spre deosebire de viața de adult când steroizii sexuali au efectul principal (12). Am calculat AUC pentru P1NP și am găsit putere de predicție pentru GHD similară cu cea a IGF1. Markerii de colagen au variabilitate intra-individuală mai mică în comparație cu IGF1 (5).

CONCLUZII

Un marker seric cu coeficient de reproductibilitate crescut este preferabil de utilizat atunci când se cuantifică beneficiul în timpul tratamentului.

În perioada de tranziție, atunci când viteza de creștere nu mai este disponibilă, dinamica P1NP, un marker de formare osoasă responsabil la GH, ar putea fi utilă în cuantificarea eficienței tratamentului substitutiv cu GH.