



UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "CAROL DAVILA"
BUCUREȘTI

*VALOAREA MARKERILOR DE FORMARE AI COLAGENULUI LA POPULAȚIA
PEDIATRICĂ CU CREȘTERE PATOLOGICĂ*

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Coordonator științific

PROF. UNIV. Dr. SIMONA FICA

Doctorand

Dr. MARIANA-CRISTINA COSTACHE OUTAS

BUCUREȘTI

2016

CUPRINS

1. INTRODUCERE	2
2. OBIECTIVELE LUCRĂRII	5
3. MATERIALE ȘI METODE	6
3.1. Răspunsul maximal al GH în testul diagnostic inițial. Evaluare ca predictor al persistenței deficitului de GH în perioada de tranziție.	6
3.2. Valoarea diagnostică a P1NP în identificarea pacienților cu GHD persistent în tranziție.....	7
3.3. Definirea intervalului de referință pentru P3NP, P1NP la populația pediatrică..	8
3.4. Valoarea markerilor de colagen P3NP și P1NP în algoritmul de evaluare a staturii joase la vârstă prepubertară.....	9
4. REZULTATE	11
4.1. Răspunsul maximal al GH în testul diagnostic. Evaluare ca predictor al persistenței deficitului de GH în perioada de tranziție.	11
4.2. Valoarea diagnostică a P1NP în identificarea pacienților cu GHD persistent în tranziție.....	14
4.3. Definirea intervalului de referință pentru P3NP, P1NP și IGF1 la vârstă prepubertară.....	15
4.4. Valoarea markerilor de colagen P3NP și P1NP în algoritmul de evaluare a staturii joase la vârstă prepubertară.....	17
5. DISCUȚII	27
5.1. Răspunsul maximal al GH în testul diagnostic. Evaluare ca predictor al persistenței deficitului de GH în perioada de tranziție.	27
5.2. Valoarea diagnostică a P1NP în identificarea pacienților cu GHD persistent în tranziție.....	29
5.3. Definirea intervalului de referință pentru P3NP, P1NP și IGF1 la vârstă prepubertară.....	31
5.4. Valoarea markerilor de colagen P3NP și P1NP în algoritmul de evaluare a staturii joase la vârstă prepubertară.....	32
6. CONCLUZII.....	37
7. FINANȚARE.....	38
8. Bibliografie.....	39

1. INTRODUCERE

Subiectul tezei îl constituie investigarea relației dintre valorile markerilor de formare ai colagenului și statusul axei somatotrope, așa cum rezultă din evaluarea acesteia prin determinarea factorului de creștere similar insulinei I (*insulin-growth factor I*, IGF1) sau testare dinamică la pacienți cu statură joasă.

Motivația alegerii acestei teme de cercetare pornește din dificultatea de armonizare și reproductibilitatea scăzută a rezultatelor obținute în testele de stimulare farmacologică a secreției de hormonului de creștere (GH), care continuă să joace un rol important în stabilirea deficitului hipofizar de GH.

Dezvoltarea somatică în populația pediatrică presupune deopotrivă un ritm predictibil de avans al taliei concomitent cu dezvoltarea masei musculare și a țesuturilor conjunctive. Creșterea reprezintă o derulare succesivă a mai multor procese anabolice și începe cu etapă de sinteză a țesutului conjunctiv, urmată de creșterea liniară a oaselor și ulterior procesul de modelare osoasă.

Talia absolută și viteza de creștere sunt cele mai importante coordonate și trebuie să reprezinte fundația judecății clinice în cazul pacientului cu statură joasă. Statură joasă, este o cauză comună de inițiere a investigațiilor de documentare a deficitului de hormon de creștere după ce au fost excluse alte cauze patologice care ar putea duce la decelerarea ritmului de înălțare¹.

Convențional deficitul de GH utilizează ca metodă pentru diagnostic efectuarea a două teste farmacologice de stimulare a secreției de GH. Confirmarea diagnosticului de deficit de GH prezintă o imprecizie considerabilă așa cum reiese din variabilitatea mare a prevalenței².

Testele de stimulare farmacologică a secreției de GH au reproductibilitate scăzută. Astfel până la 85% dintre pacienții diagnosticați inițial ca fiind GH deficienți pe baza a 2 teste de stimulare în care GH-ul maximal nu a depășit pragul țintă de 10 mcg/L, prezintă rezervă hipofizară normală de GH când sunt reevaluați la un interval de 1-6 luni³. În plus o proporție importantă a pacienților cu deficit izolat de GH diagnosticați și tratați în cursul copilăriei au răspuns normal în testele de stimulare atunci când sunt retestați la încheierea creșterii liniare, în perioada lor de tranziție⁴.

Nu există un consens unanim acceptat în ceea ce privește valoarea pragului maximal de stimulare al GH în test farmacologic sau variația lui în funcție de agentul farmacologic utilizat în stimularea axei somatotrope. Rezultatele obținute în testele de

stimulare ale GH la agenții farmacologici sunt influențate de vârstă, sex, tipul de imunotest utilizat, adipozitate, masa slabă corporeală, indicele de masă corporeală, stadiul pubertar și folosirea primingului cu hormoni sexuali⁵.

Definirea răspunsului normal este arbitrară și valoarea prag frecvent folosită în prezent de 10 mcg/L a fost stabilită în urma determinării GH cu teste imunologice care foloseau anticorpi policlonali ce cuantificau toate izoformele GH. Actual, standardul internațional IS 98/574 pentru măsurarea GH este un produs recombinat cu puritate de peste 96% a izoformei de 22 kDa. Chiar și folosind același standard de calibrare la imunotestare pot rezulta valori diferite ale GH datorită afinității și specificității diferite a anticorpilor utilizați în test^{6,7}.

Efactorii GH în periferie, au fost folosiți pentru screening-ul pacienților care indicație de testare a axei somatotrope, IGF1 fiind extensiv utilizat, cu o sensibilitate și specificitate de aproximativ 80% pentru definirea secreției insuficiente de GH⁸.

Sensibilitatea IGF-1 este limitată datorită unei suprapunerii considerabile între valorile obținute în cazul subiecților cu deficit de GH (GHD) față de cele ale subiecților normali⁹. Nivelul IGF1 este afectat cel mai frecvent de factori nutriționali, independent de GH¹⁰, de secreția spontană inadecvată de GH¹¹ sau de statusul psihosocial¹². În plus, nivelul IGF1 prezintă variabilitate interindividuală crescută influențată de vârstă și stadiul pubertar, aportul nutrițional, receptivitatea și capacitatea de sinteză a țesutului hepatic la acțiunea stimulantă a GH, hormoni tiroidieni și hormoni sexuali. Suplimentar, se adăugă și variabilitatea intraindividuală crescută până la 36% ce îi afectează precizia¹³.

Axa GH-IGF1 are un efect determinant asupra vârfului de densitate osoasă care este atins la mijlocul anilor douăzeci, în perioada de adult tânăr. În perioada de tranziție tratamentul cu GH este indicat în deficitul sever de GH pentru a completa creșterea de masă osoasă. Retestarea în perioada de tranziție la un interval de 1-3 luni de la întreruperea tratamentului de substituție este indicată pentru identificarea pacienților cu GHD persistent - care vor avea beneficiu de tratament cu GH în perioada de adult tânăr¹⁴. Studiile au arătat o proporție între 35 și 80% a reversibilității GHD izolat în perioada de tranziție în funcție de pragul maximal de GH folosit¹⁵. Parte din această proporție crescută a reversibilității deficitului somatotrop poate fi explicabilă prin diagnosticul inițial imprecis al deficitului de GH.

Markerii de colagen surogat pentru ritmul de formare osoasă sau de sinteză a țesutului conjunctiv din țesuturile de susținere, precum peptidul amino-terminal al procolagenului tip I (P1NP) și peptidul amino-terminal al procolagenului tip III (P3NP), au fost dovediți ca fiind proteine GH responsive¹⁶⁻¹⁸. Dinamica markerilor de formare ai colagenului a fost corelată cu viteza de creștere în populația pediatrică¹⁹⁻²².

P1NP 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 și permite evaluarea formării osoase^{23,24}. Markerii osoși nu sunt în prezent discriminatori pentru diagnosticul deficitului de GH¹⁴.

Nivelul seric de peptide derivate din sinteza colagenului prin poziția intermediară între hormonii de promovare a creșterii și creșterea în sine au utilitate clinică ca un biomarker nespecific de răspuns la stimulii de creștere¹⁸.

Cuantificarea P1NP în cursul copilăriei este rezultatul sintezei de colagen tip I la nivel osos în urma a trei procese metabolice distincte, osteoformare endocondrală, modelare și remodelare desfășurate sincron la nivelul osului pediatric²⁵.

P3NP, o proteină responsabilă la GH, este sintetizată de țesutul conjunctiv din surse multiple. Fenomene ca fibroză hepatică sau afectarea renală și remodelarea cardiacă, asociate cu nivel crescut al P3NP -ului sunt evenimente decelate anterior decelerării creșterii în cazul copiilor.

Concentrația plasmatică a P3NP a fost asociată cu viteza de înălțare la copiii sănătoși^{26,27}. Nivelul acestui peptid prezintă valori crescute în cursul saltului de creștere pubertar în comparație cu valorile subiecților mai tineri, cu scădere progresivă după această vârstă pe măsură ce subiectul avansează în etapa de adult.²⁸ Markerii de colagen s-au dovedit a avea valoare mai mică în cazul copiilor cu deficit de hormon de creștere (GH) în comparație cu cei sănătoși.

În cazul adulților tineri, P3NP împreună cu IGF1 sunt utilizate pentru detectarea abuzului de GH în domeniul sportului²⁹⁻³¹. Un scor compus al celor 2 peptide GH-responsive, utilizat la documentarea utilizării ilicite a GH, se bazează pe sursa lor parțial diferită, în țesuturi cu sensibilitate individuală la acțiunea GH și timpului alungit de epurare al P3NP față de IGF1^{152,134}. În plus, comparativ cu IGF1, P3NP are variabilitate intraindividuală mai mică cu valorile maxime raportate de 13%¹³⁹.

2. OBIECTIVELE LUCRĂRII

Obiectivele urmărite în această cercetare au fost:

- 1) Evaluarea răspunsului maximal al GH în testul de stimulare de la momentul diagnosticului în copilărie, ca un posibil predictor al deficitului permanent de GH după retestare în tranziție, prin compararea a trei grupe de pacienți care au beneficiat de tratament cu GH până la momentul încetării creșterii liniare: deficit de GH în cadrul unui deficit hipofizar multiplu, deficit de GH izolat care este menținut după retestare și deficit de GH reversibil.
- 2) Compararea performanței markerului de formare osoasă P1NP în documentarea persistenței deficitului de GH în etapa de adult tânăr și corelația acestuia cu IGF1 la pacienți care au încheiat creșterea liniară.
- 3) Raportarea intervalelor de referință pe vârstă și sex pentru P3NP și P1NP la copii de talie normală de vârstă prepubertară în vederea investigării metabolismul colagenului în tulburările de creștere din cursul copilărie.
- 4) Corelația markerilor de formare ai colagenului reprezentați de P3NP și P1NP cu parametri auxologici, biochimici și cu statusul axei somatotrope într-o populație pediatrică de vârstă prepubertară, folosind un kit ce are la bază o metodă non radiometrică de cuantificare.
- 5) Obiectivul final este reprezentat de cuantificarea impactului determinării markerilor de colagen P3NP și P1NP în creșterea probabilității pretestare așa cum rezultă ea din determinarea IGF1, test screening clasic de identificare al deficitului de GH.

3. MATERIALE ȘI METODE

Subiecții incluși în studiu au fost recrutați în conformitate cu Declarația de la Helsinki. Consimțământul informat a fost obținut de la toți subiecții sau aparținătorii legali. Toate procedurile au fost efectuate după semnarea consimțământului informat de către subiect sau aparținătorul legal. Studiul a fost aprobat de către Consiliul Etic al Institutului „CI Parhon”.

Pacienții incluși în studiu au fost urmăriți pentru statură joasă în cadrul Departamentului de Pediatrie al Institutului Național de Endocrinologie.

3.1. Răspunsul maximal al GH în testul diagnostic inițial. Evaluare ca predictor al persistenței deficitului de GH în perioada de tranziție.

Au fost incluși în acest lot de studiu 19 pacienți de sex masculin diagnosticați și tratați în cursul copilăriei pentru deficit de GH, izolat sau parte a unui deficit multiplu hipofizar, care au întrunit concomitent următoarele criterii de includere: [1] vârstă cronologică, la momentul studiului între 15 și 21 ani [2] perioadă de cel puțin 3 luni de la întreruperea tratamentului cu GH [3] deficit de înălțime la momentul diagnosticului mai mult de 2,5 scor deviație standard (SD) sub semenii de aceeași vârstă și sex și cu mai mult de 1,5 SD sub înălțimea de țintă genetică [4] test cu insulină sau clonidină utilizat ca stimul farmacologic al GH în testul de stabilire a diagnosticului în cursul copilăriei [5] terapia anterioară cu GH timp de cel puțin 3 ani [6] pubertate spontană în stadiul Tanner V sau substituție adecvată cu steroizi sexual timp de minimum 2 ani [7] terapia de substituție corespunzătoare cu glucocorticoizi, tiroxină și desmopresină, în cazul asocierii acestor deficite.

Evaluarea statusului axei somatotrope în perioada de tranziție pentru pacienții cu deficit izolat de GH, s-a efectuat prin testarea secreției maximal stimulate a GH de către hipoglicemie insulin- indusă (testul de toleranță la insulină- ITT) . Un prag de sub 6,1 ng/ml pentru GH maximal stimulat la retestare a fost considerat diagnostic pentru GHD persistent și în perioada de tranziție. În urma testului de stimulare am reclasificat subiecții cu debut în copilărie al deficitului de GH izolat ca având persistența deficitului somatotrop dacă nu au atins valoarea prag. Am clasificat GHD reversibil dacă testul de stimulare la încheierea creșterii liniare a arătat secreție hipofizară adecvată de GH și alături de subiecții martor acești pacienți au format

grupul de pacienți GH suficienți (SGH). Pacienții cu deficit hipofizar multiplu (MPHD) - două sau trei deficite hormonale hipofizare suplimentare deficitului somatotrop, au fost considerați ca având persistența deficitului de GH fără retestare.

Determinarea GH în momentul retestării în perioada de tranziție a fost efectuată utilizând o platformă de chemiluminiscență (Liaison, Diasorin) cu limită de detecție de 0,01 ng/ml, CV 8,2% care se bazează pe anticorpi monoclonali și este calibrat cu standardul de referință ÎS 98/574.

Nivelul seric al IGF1 a fost determinat din proba colectată între 8 și 9 dimineața, în condiții de post alimentar de minim 8 ore. IGF-1 a fost măsurat pe o platformă automată de chemiluminiscență (Liaison, Diasorin) (sensibilitate 0,01 ng/l, coeficient de variabilitate (CV) între teste 6,2%). Valoarea IGF1 a fost exprimată ca scor al deviației standard (SD) folosind media și respectiv SD așa cum au fost calculat din înregistrările subiecților GH suficienți (GHD reversibil și subiecți din lotul control).

3.2. Valoarea diagnostică a P1NP în identificarea pacienților cu GHD persistent în tranziție

Am evaluat P1NP într-un studiu de tip transversal în care au fost selectați 17 pacienți de sex masculin diagnosticați în timpul copilăriei cu GHD izolat - 13 pacienți, sau ca parte a MPHD (4 pacienți). 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 GHD izolat au fost retestați pentru persistența GHD în perioada lor de tranziție folosind ITT, cu nivel prag al GH-ului maxim stimulat de 6.1 ng/dl. În urma ITT, 4 dintre cei 13 pacienți cu GHD izolat au fost considerați ca având persistența deficitului de GH și împreună cu pacienții MPHD au fost incluși în grupul GHD persistent.

Grupul control a fost alcătuit din 8 subiecți sănătoși, potriviți pentru vârstă și etapă pubertară. Grupul de subiecți GH suficienți (SGH) a inclus subiecți cu GHD reversibil în urma retestării și subiecții control.

Determinarea intervalelor de referință P1NP în lotul de studiu

IGF-1 a fost măsurat prin metoda chemiluminiscență utilizând anticorpi monoclonali (Liaison, Diasorin) (limită de detecție de 0,01 ng/ml, coeficient de variație (CV) interdozare 8.2%).

P1NP total din ser prelevat între 8 și 9 am după 8 ore de post alimentar a fost analizat folosind anticorpi monoclonali de șoarece împotriva P1NP prin metodă electrochemiluminiscentă cu un analizor Cobas (Elecsys 2010 total P1NP, Roche Diagnostics- limita de detecție 5 ng/ml, CV interdozare 4.1%).

3.3. Definirea intervalului de referință pentru P3NP, P1NP la populația pediatrică

Subiecți recrutați pentru studiu prospectiv de validare a valorilor normale ale IGF1 în cadrul laboratorului de Cercetare al Institutului CI Parhon. Au fost selecția aleator din pacienți cu prezentări consecutive în perioada Iulie 2013- Octombrie 2014 la camera de gardă a Spitalului “Grigore Alexandrescu” pentru afecțiuni acute, netraumatice, în afebrilitate, ce nu au necesitat spitalizare și fără afecțiuni cronice cunoscute. Grupul selectat are talie normală, cu număr comparabil de subiecți pentru fiecare sex, cu vârsta cronologică între 3.5 și 10 ani. Au fost disponibile informații colectate cu privire la data nașterii, greutatea la naștere, parametri antropometrici - cu înregistrarea greutății și taliei la momentul recoltării. Copiii cu boli sistemice, infecții concomitente sau antecedente traumatice pozitive pentru ultimele 3 luni au fost excluși.

Probele de sânge au fost recoltate în mod aleatoriu față de momentul de momentul zilei, momentul aportul alimentar și exercițiu fizic.

Am măsurat P3NP seric utilizând un kit ELISA disponibil comercial (pentru cercetare, cod catalog: DL-P3NP-Hu, limita de detecție 62.5-4,000 pg/ml, sensibilitate 25.3 pg/ml), pe baza unui principiu imunoenzimatic sandwich. Toate probele au fost măsurate folosind același lot al kitului. CV-urile intra - și inter-analiză au fost <10% și respectiv <12%.

Interval de referință

Am aplicat succesiv metode stabilite de excludere a valorilor extreme și formarea intervalului de referință. Am reprezentat grafic datele folosind boxplot - urf pentru inspecția vizuală și am exclus valorile aberante din fiecare grupă de vârstă. Am folosit testul Tukey pentru identificarea valorilor extreme prin această metodă.

Am analizat datele separat pentru fiecare sex. Am împărțit subiecții în 3 grupe de vârstă pentru fiecare sex.

În cadrul fiecărui sex, variațiile P3NP cu vârsta au fost evaluate cu ajutorul unui model de regresie polinomială (MedCalc v.14.8.1.0 software statistic). Un al

doilea model de regresie aplicat a exprimat SD pentru P3NP în funcție de vârstă. Am analizat între 5 și 12 probe în fiecare grup de vârstă pentru ambele sexe.

3.4. Valoarea markerilor de colagen P3NP și P1NP în algoritmul de evaluare a staturii joase la vârstă prepubertară

Studiul include pacienți cu indicație de testare a axei somatotrope pentru statură joasă care au primit indicație de tratament de promovare a creșterii pentru deficit de talie atât GH deficient cât și non GHD (grup compus de statură joasă idiopatică și SGA).

Descrierea lotului de pacienți investigați pentru statură joasă

60 pacienți (42 băieți) ce au reprezentat prezentări consecutive în perioada martie 2014- iunie 2015 în Departamentul de Pediatrie al Institutului Național de Endocrinologie CI Parhon ce s-au adresat clinicii pentru statură joasă (definită sub -2 SD) sau decelerarea vitezei de creștere documentată în ultimele 6 luni, au fost incluși în prezentul studiu. Un grup de pacienți control recrutați pentru studiul prospectiv de definire și validare a valorilor normale ale IGF1 și P3NP în cadrul laboratorului de Cercetare al Institutului Național de Endocrinologie CI Parhon a fost descris în Subcapitolul 3.3 și a fost utilizat la determinarea intervalelor de referință.

Subiecți evaluați pentru statură joasă

Recoltarea de sânge, s-a efectuat prin venopuncție, între 7 a.m. și 9 a.m., în cea de-a 2 a zi de la admiterea în clinică, pentru pacienții internați în vederea evaluării staturii joase, după minim 8 ore de post. Au fost efectuate determinări uzuale și determinările hormonale incluzând TSH, tiroxină liberă (fT4), prolactină, cortizol plasmatic, GH și IGF1.

Teste de stimulare ale secreției de GH au fost fie ITT, fie test de stimulare la Clonidină. O parte dintre pacienți au avut două teste pentru aprecierea rezervei hipofizare de GH.

Valorile de referință pentru P3NP, IGF1 și P1NP au fost determinate în cadrul aceluiași lot de subiecți control. Vârsta osoasă a fost determinată prin radiografie de carp a mâinii non-dominante și apreciată prin metoda comparativă Greulich and Pyle. Imagistica centrală a regiunii hipotalamo-hipofizare s-a efectuat în cursul internării prin examinare tomografică cu secțiuni dedicate ale regiunii hipotalamo-hipofizare sau examinare cu rezonanța magnetică în afara institutului.

Am clasificat pacienții care au efectuat testare dinamică pe axa somatotropă conform criteriilor de diagnostic germane elaborate în studiul lui Binder și cel al lui Wagner utilizând parametri de conversie pentru determinarea GH publicați în aceste studii³². În cazul pacienților care aveau disponibil un singur test de stimulare al axei somatotrope o valoare a IGF1 sub -1.5 SD a fost considerată suficientă pentru clasificarea pacientului ca fiind GH deficient în absența a 2 teste de stimulare farmacologică a GH³³.

Criterii auxologic și de laborator pentru definirea GHD (condiții simultane):

[1] au fost încadrați ca pacienți cu deficit de GH acei pacienți cu greutate la naștere adecvată vârstei gestațională, cu statură joasă non familială care s-au prezentat un deficit de talie de peste $-2,5$ SD sau întârziere de creștere față de talia țintă genetică de peste $-1,5$ SD sau documentarea vitezei de creștere sub -1 SD pentru media pentru vârstă și sex.

[2] 2 teste de farmacologice cu valoare maximală a GH sub 6.25 mcg/dL sau 1 test de stimulare sugestiv de deficit de GH și IGF1 sub $-1,5$ SD

Analiză statistică

Datele au fost analizate cu ajutorul software-lor statistice MedCalc v.14.8.1.0 și SPSS v.16.0. Am calculat mediile specifice vârstei, deviația standard (SD) și intervalele de încredere 95% (95% CI) printr-un model de regresie polinomială. Un al doilea model de regresie am folosit pentru a obține deviația standard în funcție de vârstă. Semnificația statistică a diferențelor între valorile medii între diferitele categorii a fost determinată folosind testul t (atunci când se compară două grupuri). Am aplicat metode suplimentare de păstrare cu comparația mediilor partițiilor prin *One Way Anova* (pentru mai mult de 2 partiții). Pentru a verifica valorile aberante în fiecare grupă de vârstă am folosit testul Tukey.

Pentru aprecierea puterii diagnostice a diferiților parametri analizați am efectuat curbele ROC (Receiver Operating Characteristic) pentru fiecare din parametrul evaluat. Am comparat performanța ariei de sub curba ROC (AUC) în capacitatea de identificare a GHD. Compararea valorilor medii între diferitele categorii a fost realizată folosind testul Mann-Whitney U (atunci când se compară două grupuri) și testul Kruskal-Wallis atunci când se compară mai mult de două grupuri. Corelația dintre diferiți parametri a fost realizată folosind coeficientul Spearman.

4. REZULTATE

4.1. Răspunsul maximal al GH în testul diagnostic. Evaluare ca predictor al persistenței deficitului de GH în perioada de tranziție.

Nouăsprezece pacienți de sex masculin care au fost au efectuat tratament cu GH în timpul copilăriei pentru promovarea creșterii au fost identificați și introduși în studiu. Treisprezece pacienți (68,42%) au fost diagnosticați în copilărie că având GHD izolat și deficit de GH în cadrul unui deficit hipofizar multiplu. Diagnosticul de GHD la inițierea rhGH a fost efectuat cu stimularea GH în ITT sau testul de stimulare la Clonidină în perioada 1999- 2008. 30,77% (n=4) dintre pacienți cu GHD izolat diagnosticat în copilărie au menținut deficitul și după retestarea axei GH în perioada de tranziție. Toți cu excepția unuia dintre pacienții GHD izolat care au recuperat deficitul la retestarea în perioada de tranziție, au avut un vârf al GH în testul diagnostic de peste 4,8 ng/ml. Un singur pacient din grupul GHD reversibil cu un vârf de GH la momentul diagnosticului de 4,1 ng/ml a avut o vârstă cronologică de 12.2 ani la momentul diagnosticului. Tabelul 1 prezintă caracteristicile clinice și biochimice ale pacienților separați în funcție de statusul axei somatotrope la reevaluarea în perioada de tranziție. Malformație hipofizară semnificativă la evaluarea imagistică (neurohipofiză ectopică sau întreruperea tijei hipofizare) a fost detectată în 3 cazuri, toți fiind pacienți cu MPHD.

Tabel 1. Caracteristicile grupului cu persistența deficitului GH (GHD confirmat după retestare și deficit hipofizar multiplu) și grupul GH suficient (GHD reversibil și martori)

	pGHD ^a (n=10)		SGH ^b (n=16)		p *
	MPHD ^c (n=6)	p ^d IGHD (n= 4)	rev ^e IGHD (n=9)	controls (n=7)	
CA ^f Re ^g (ani)	18.55[16.6,21.5]	17.2[15.2,18.9]	17.3[14.9,18.1]	17[16,18.1]	NS
CA Diag ^g (ani)	8.4[3.4,12.7]	7.2[5,13]	11.5[4.1,13.7]	NA	NS
Ht ^h SD ⁱ Re	-1.27 [-3.70,0.09]	-1.5[-3.2,-0.22]	-1.3[-2.89,0.3]	0.24[-1.92,0.91]	NS
Ht SD Diag	-4.21[-7.34,-2.50]	-3.87[-4.65,-3.03]	-2.78[-4.01,-2.5]	NA	NS
BMI SD Re	-0.85[-2.9,2.3]	0.4[-2.3,1.98]	-0.85[-1.7,0.5]	NA	NS
BMI SD Diag	-0.95[-2,1.5]	-0.45[-1.1,1]	-1.01[-1.5,0.4]	NA	NS
GHmaxR ^k Re	NA	1.69 [0.05,4.9]	18[7.7,46.1]	NA	.003
GHmaxR Diag	0.44[0.08,0.87]	2.4[0.8,4.8]	5.7[4.1,9.1]	NA	.001
IGF1 -I SD Re	-3.86[-4.29,-2.46]	-0.92[-2.83,1.12]	0.16[-1.46,0.89]	-0.15[-1.06,2.04]	.003
MPH ^j SD	-0.1[-1,0.42]	-0.55[-1.58,0.23]	-0.95[-1.64,0.09]	NA	NS
GH Tx ^l (years)	9.65[4.2,12.4]	7.75[4.1,9.6]	5.1[2.9,10]	NA	NS
TTx ^m (years)	1.6[0.8,3.5]	0.8[0.3,4.2]	0.5[0.3,1.9]	NA	NS

Mediană și interval
^aGHD, (deficit GH); IGHD, deficit GH izolat; ^bSGH, GH suficient; ^cMPHD, deficit hipofizar multiplu; ^dp, persistent; ^e rev, reversibil; ^fCA, vârsta cronologică; ^gRe, retestare; ^hDiag, moment diagnostic; ⁱHt^h, înălțime; ^jSDⁱ, scor deviație standard; MPH^j, talie medie parentală; GHmaxR^k, GH maximal stimulat; Tx^l, durata tratament; TTx^m, timp de la întreruperea tratamentului;
*Comparație între grupul pGHD și SGH prin testul Mann-Whitney U

Am găsit o diferență semnificativă ale valorii IGF1 când am comparat grupul MPHD atât față de GHD reversibil cât și față de subiecții control (p <0,05). Valoarea IGF1 la subiecții MPHD nu a diferit semnificativ când l-am comparat cu grupul GHD izolat persistent (p = 0,31).

IGF1 în grupul GHD reversibil a fost similar cu valorile acestuia la subiecții control (p = 0,711).

Nu am găsit o diferență semnificativă atunci când am comparat IGF1 determinat la pacienții GHD izolat persistent cu nici unul dintre celelalte 3 grupuri.

Figura 1 prezintă comparativ în 4 grupe de subiecți stratificați în funcție de diagnosticul din copilărie și rezultatul retestării din perioada de tranziție, vârful de GH în testul de la momentul diagnosticului și IGF1 SD în perioada de tranziție pentru fiecare grup de pacienți.

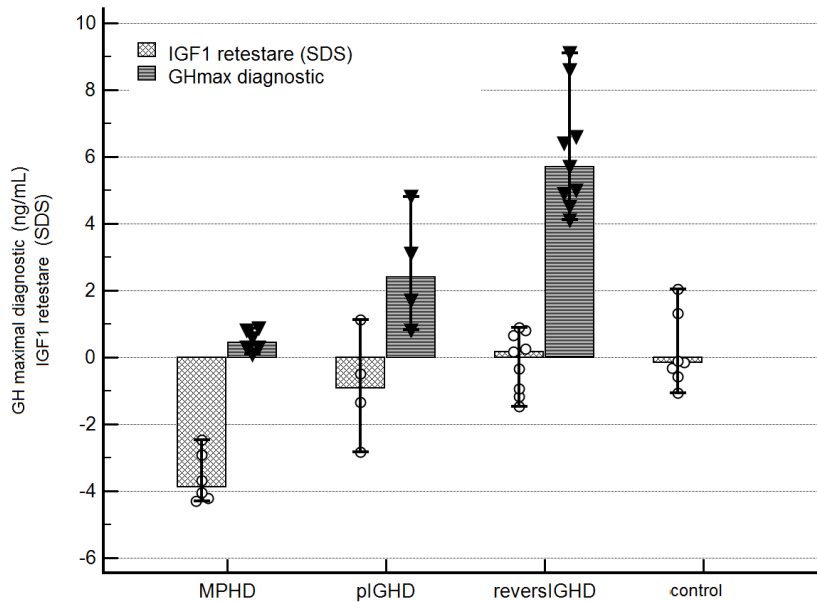


Figura 1. Valorile GH maximal în testul diagnostic și a IGF1 (SD) la momentul retestării în 4 clase de subiecți: deficit hipofizar multiplu (MPHD), deficit GH izolat persistent după retestare (pIGHD), deficit GH reversibil după testarea în tranziție (reversIGHD) și control

Analiza curbei ROC pentru vârful de GH în testul de la momentul diagnosticului a arătat că cea mai bună valoare prag ce discriminează între GHD persistent și SGH a fost de 4,1 ng / ml, cu o sensibilitate (Se) de 90% [55.5-99.9], o specificitate (Sp) de 88,89% [51.8-99.7], AUC = 0,978 (p <0,0001); 95% CI [0.786-1.000] și eficiența de diagnosticare (DeF) de 89,47%.

Analiza curbei ROC pentru IGF1 SD a arătat că cea mai bună valoare prag a fost de -1.34 SD și discriminează între GHD persistent și SGH cu o sensibilitate (Se) de 80% [44.4-97.5], o specificitate (Sp) de 93,75% [69,8 la 99,8], AUC = 0,875 (p <0,0001); 95% CI [.686-.971] și eficiența de diagnosticare (DEF) de 88.46%. Pentru un nivel al IGF1 de -2.3 SD specificitatea și sensibilitatea testului au fost de 99% și, respectiv, 70%. Nu a existat nici o diferență semnificativă atunci când am comparat cele două curbe ROC (p = 0.1577). 50% dintre pacienții cu GHD izolat care mențin deficitul la retestarea în tranziție au o valoare a IGF1 sub valoarea prag -1.34 SD. Pacienți cu GHD care mențin deficitul la retestarea în tranziție și au prezentat niveluri ale IGF1 peste acest prag au fost evaluați după o perioadă de 3 până la 6 luni de la retragerea rhGH. O serie de valori prag pentru secreția maximală stimulată a GH în testul diagnostic și IGF1 SD la retestare, ca și efectul acestora pe sensibilitatea și specificitatea corespunzătoare sunt prezentate în Tabelul 2.

Tabel 2 Valori prag ale GH maximal la momentul diagnostic al deficitului GH și IGF1 în perioada de tranziție cu coordonatele din curba ROC

	Se ^c	95%CI	Sp ^d	95%CI ^e	+LR ^f	95%CI	-LR	95%CI
GHmaxR								
≤3.1	90	55.5-99.7	100	66.4-100			0.1	0.02-0.6
≤3.6	90		95					
≤4.1	90	63.6-98.5	88.89	51.8-99.7	8.1	1.3-52	0.11	0.02-0.7
≤4.8	100	69.2-100.0	77.78	40-97.2	4.5	1.3-15.3		
IGF1 SD^b								
≤-2.46	70	34.8-93.3	100	79.4-100			0.3.	0.1-0.8
≤-1.66	70		95					
≤-1.34	80	44.4-97.5	93.75	69.8-99.8	12.8	1.9-87.6	0.21	0.06-0.7
≤-0.95	80	56.6-96.2	75	47.6-92.7	3.2	1.3-7.9	0.27	0.07-1

^aGHmaxR, GH maxim în testul diagnostic; ^bSD, scor deviație standard; ^cSe, sensibilitate; ^dSp, specificitate; ^eCI, interval de confidență; ^fLR, proporție de probabilitate.

4.2. Valoarea diagnostică a P1NP în identificarea pacienților cu GHD persistent în tranziție

Șaptesprezece pacienți de sex masculin cu GHD (4 MPHD), cu o vârstă medie de 17.3 ani, tratați în timpul copilăriei cu GH recombinant (rhGH) pentru o perioadă medie de 6.88 ani (interval 2.9-12.4 ani) au fost incluși în studiu. Patru dintre pacienții GHD izolat au menținut deficitul după retestarea în perioadă de tranziție. Un grup de 8 subiecți control, potriviți de vârstă, alături de pacienții cu GHD reversibil, au reprezentat grupul de subiecți cu axă GH competentă.

Tabel 3 Caracteristicile pacienților separați în funcție de statusul GH

	pGHD (n=8)		SGH (17)	
BMI(SD)	0.40±1.82	[-2.9,1.4]	-0.74±0.82	[-1.7,0.75]
Ht (SD)	-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(SD)	-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(SD)	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 masa corporala; SD, scor deviație standard; Ht, înălțime; CA, vârsta cronologică; P1NP, capătul amino-terminal al procolagenului de tip I; IGF1, factor de creștere similar insulinei I; timeTX, timp de la întreruperea tratamentului cu GH; * cu excepția subiecților control

Tabelul 3 prezintă caracteristicile clinice și biochimice ale subiecților separați în funcție de statusul axei GH. Toți subiecții au prezentat pubertate spontană în stadiul de sexualizare Tanner V 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). Am folosit grupul SGH ca referință pentru valorile normale IGF1 și P1NP. Am obținut pentru fiecare an de vârstă, media și deviația standard (SD) pentru P1NP și IGF-1 ca o funcție a vârstei.

Vârsta a fost un predictor semnificativ doar pentru SD 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 SD (medie = 0, SE = 0.23) superior comparativ cu pacienții GHD (medie = -0.71, SE = 0.58). Această diferență a fost semnificativă $t(21) = 2.24$, $p < .05$ și reprezintă un efect mediu $r = 0.44$. În grupul GH deficient nu a existat nici o valoare a P1NP sub - 2SD.

4.3. Definirea intervalului de referință pentru P3NP, P1NP și IGF1 la vârstă prepubertară

Patruzeci și nouă copii (19 fete) cu vârste cuprinse între 3-10 ani, au fost incluși în acest studiu transversal.

Tabel 4 Caracteristicile biochimice și antropometrice ale subiecților după excluderea valorilor extreme, exprimate în funcție de sex

	Fete (n = 17)		Băieți (n=23)	
Z-BMI(SD)	-0.79±1.4	[-2.9,1.4]	-0.52±1.37	[-3.4,2.3]
HtSD	-0.16±1.37	[-2.48,2.22]	-0.97±1.37	[-2.5,1.4]
CA, ani	6.35±1.97	[3.48,9.41]	6.24±1.64	[3.39,8.9]
P3NP(pg/mL)	371.87±142.56	[186.83,644.97]	286.08±110.5	[146.01,572.01]
IGF1(ng/mL)	123.68±51.11	[46.96-200.3]	114.43±37.64	[64.69,202.1]

medii±SD [min, max]
 BMI, indice de masă corporeală, SD, scorul deviației standard; Ht, talie; CA, vârstă cronologică; P3NP, propeptidul amino terminal al colagenului tip III; IGF1, factor de creștere similar insulinei-1

Caracteristicile subiecților ce au participat au format lotul de referință sunt prezentate în Tabelul 4 după excluderea valorilor extreme.

Vârsta a fost un predictor semnificativ pentru media și scor standard deviație ale P3NP doar în cazul sexului masculin. Mediile, deviațiile standard și intervalele de confidență 95% pentru P3NP sunt rezumate în Tabelul 5.

Tabel 5 Valorile P3NP -ului în grupuri stabilite în funcție de vârstă și sex			
Intervalul de vârstă	mean (SD), pg/mL	range, pg/mL	95% ^a RI, pg/mL
Fete			
3- 5 ani	321.46 (148.3)	187-537	30-612
5-7 ani	392.24 (184.64)	199-645	30-754
7-10 ani	393.33 (117.48)	204-581	163-624
Băieți			
3- 5 ani	271.32 (92.61)	155-398	90-453
5-7 ani	326.1 (121.97)	146-572	125-526
7-10 ani	218.34 (68.03)	151-317	85-352

^a95% interval de referință (RI), calculat pe baza metodei aplicate la distribuția normală;
P3NP, propeptidul amino - terminal al colagenului tip III

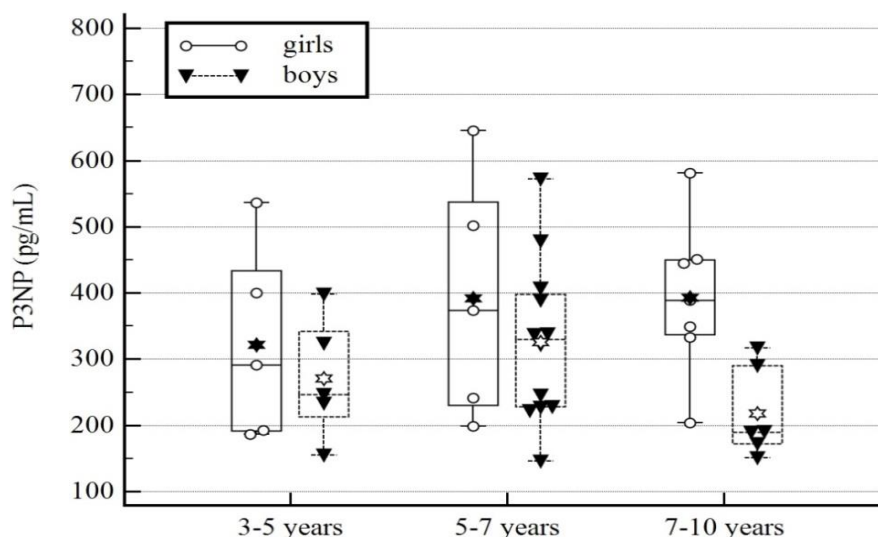


Figura 2. Valorile P3NP in fiecare grup de vârstă și sex

Figura 2 prezintă comparativ între cele 2 sexe valorile P3NP pentru fiecare grup de vârstă. Mediile valorilor P3NP pentru fiecare grupă de vârstă au fost similare atunci când am analizat diferențele între sexe, cu excepția celor intervalului de vârstă între 7 și 10 ani unde am găsit o diferență semnificativă între fete și băieți. Astfel, în cazul fetelor în acest interval de vârstă am găsit niveluri mai ridicate ale P3NP-ului ($M = 393.33$, $SE = 44.4$), comparativ cu băieții ($M = 218.34$, $SE = 27.77$). Diferența a avut semnificație statistică, $t(10) = -3.21$, $p < .05$ și reprezintă un efect major $r = .89$. În grupul de studiu cu copii sănătoși menținuți pentru determinarea intervalului de referință, P3NP nu s-a corelat cu IGF1, greutate sau înălțime exprimate fie ca valori absolute fie ca SD. Am analizat grupul subiecților cu determinări aberante și l-am comparat cu grupul de referință. Nivelurile P3NP au fost mai mari în grupul de aberante (mediană, 998.46 pg / ml, interval [565.67 , 1935.91]) și această diferență a fost semnificativă atunci când am comparat cu grupul de referință, $U = 3$, $z = -4.57$, $p < 0.001$, $r = -.65$. Comparativ cu subiecții din grupul de referință, am observat o grupare a valorilor mici ale IGF1-ului în grupul subiecților cu determinări aberante ($n=9$), chiar dacă această observație nu a atins semnificație statistică ($U = 232$, $z = 1.47$, $p = 0.141$).

4.4. Valoarea markerilor de colagen P3NP și P1NP în algoritmul de evaluare a staturii joase la vârstă prepubertară

În lotul de 60 pacienți investigați pentru decelerarea creșterii sau talie sub -2 SD, care au reprezentat prezentări consecutive în cadrul Departamentului de Endocrinologie Pediatrică al Institutului CI Parhon, s-au efectuat 56 teste farmacologice pentru aprecierea rezervei hipofizare de GH (31 pacienți au avut câte 2 teste de stimulare ale secreției cu GH iar restul de subiecților au efectuat câte un singur test farmacologic de stimulare GH (clonidină sau insulină).

În urma efectuării testelor farmacologice și a determinării valorii IGF1, 18 pacienți care au întrunit simultan criteriul auxologic și criteriul de laborator au fost clasificați ca fiind GH deficienți (GHD) iar 25 subiecți au fost încadrați ca fiind statură joasă non-GHD.

Analiza globală a datelor

Tabelul 6 prezintă caracteristicile antropometrice și determinările paraclinice, la

	GHD (n=18)**		non GHD talie <-2.5 SD (n=25)		crestere normala (n= 50)	
	M	interval	M	interval	M	interval
VC (ani)	5.63	3.73,9.95	7.09	4.17,9.9	6.03*	3.39,9.55
Talie (SD)	-3.27*	-7,-2.34	-3.3	-3.93,-2.57	-0.56*	-2.5, 1.3
BMI (SD)	-0.5	-2.6,1.8	-0.8	-4.3,1.7	-0.6	-1.4,2.3
TTG (SD)	-0.76	-2.7,0.42	-1.15	-2.62,0.15	NA	NA
IGF1 (SD)	-1.71	-3.28,-0.36	-0.78	-2.57,0.99	-0.14	-1.86,1.84
P3NP (SD)	0.51	-0.9,2.69	2.63*	-0.82,6.49	0.03*	-1.61,17.97
P3NP (pg/mL)	348	188,654	634	245, 933	335 *	146, 1936
P1NP (ng/mL)	392.9	241,698	482	167,773	452*	187,903
GHmax (ng/mL)	1.9	0.13,6	10.2	6.45;11.53	9.7***	1.63,28.3
Δtalie (SD)	1.36	0.16, 2.67	1.02	-0.24,1.86	NA	NA

exprimat ca mediana (M) și interval de valori ;
 *distribuție non normală a datelor;
 **exclusiv 2 pacienți cu panhipopituitarism
 ***efectuate la 13 subiecți cu talie în intervalul [-2.5 SD , -2] sau documentarea decelerării creșterii din care 1 subiect ce are GHmax în test de 1.63 are viteza de creștere normala;
 GHD, deficit de GHD; SD, deviație standard; TTG, talie țintă genetică; BMI, index de masa corporeală; VC, vârstă cronologică; GHmax, vârf GH în test de stimulare; IGF1, factorul de creștere similar insulinei; P3NP, propeptidul amino-terminal al colagenului de tip 3; P1NP, propeptidul amino-terminal al colagenului de tip 1; Δ talie, corectare talie sub tratament

momentul includerii în studiu al celor 93 participanți, subiecți cu statură joasă (43) și control.

În întregul lot de pacienți, P3NP (SD) corelează negativ cu valoarea IGF1 (SD) și deficitul de talie (SD). Coeficientul Spearman r indică o corelație negativă semnificativă cu efect mediu, $rs=-.248$, ($p=.026$, $n=81$) și respective $rs=-.231$ ($p=.038$, $n=81$). Prin efectuarea unei corelații parțiale în care introducem ca variabilă de corecție valoarea IGF1, obținem un coeficient de corelație negativă moderată semnificativă de ($rs= -.397$, $p<.001$, $n=69$) între P3NP și deficitul de talie, dar nu talia în valoare absolută.

Valoarea P1NP nu se corelează cu deficitul de talie ($r_s=0.074$, $p=0.524$, $n=69$). P1NP nu a variat în funcție de vârstă, sex sau greutate. Nu a existat o corelație a acestuia cu IGF1 sau P3NP.

Un model de regresie polinomială pentru variația valorilor P3NP în funcție de nivelul IGF1 în cohorta de subiecți fără deficit de GH arată o variație semnificativă a nivelului de P3NP pentru un anumit nivel al IGF1. Reprezentarea grafică a acestei

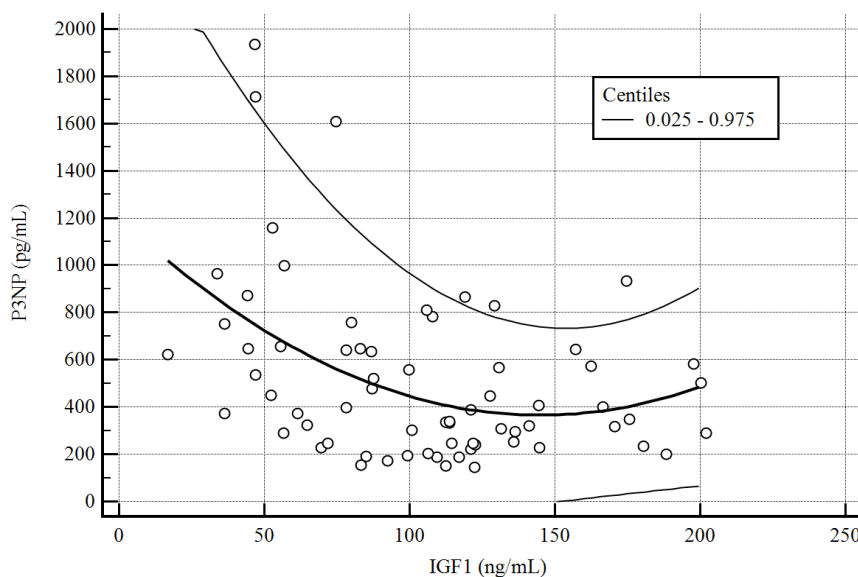


Figura 3 Variația P3NP (valori absolute) în funcție de IGF1 (valori absolute) în întregul lot de subiecți.

dependențe ia forma unei curbe în U cu nadir la nivelul mediu al IGF1 (+0 SD) așa cum arată Figura 3.

Valorile absolute ale P3NP exprimate în funcție de nivelul IGF1 arată o inversare a relației între P3NP și IGF1 când nivelul IGF1 trece de medie. Astfel la valori ale IGF1 sub 0 SD avem un model de corelație negativă în timp pe valori ale IGF1 peste pragul de 0 SD ale IGF1 avem un raport de corelație pozitivă între IGF1 și P3NP.

Înregistram o diferență statistică semnificativă când comparăm P3NP și IGF1 prin test non parametri Kruskal Wallis în 3 grupe de pacienți definite ca subiecți GHD, statură joasă non GHD și subiecți din lotul cu creștere fiziologică (Figura 4)

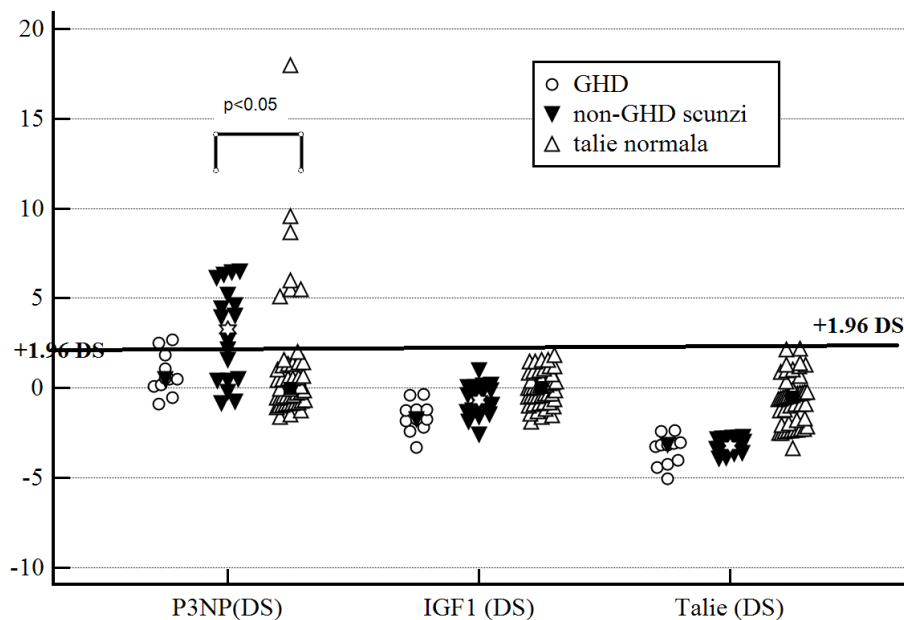


Figura 4. Reprezentarea comparativă în 3 grupe de pacienți, cu deficit de GH (GHD), statură joasă non-GHD și subiecți normali pentru peptidul amino-terminal al colagenului tip III (P3NP), factorul de creștere similar insulinei (IGF1) și deficitul de talie inițial

Analiza post hoc arată semnificație statistică când se compară P3NP în lotul martor cu subiecții de statură joasă și axa somatotropă competentă (<-2.5 SD, non GHD). Astfel valorile P3NP sunt semnificativ crescute în grupul pacienților cu talie joasă și axa somatotropă competentă față de pacienții normali ($U=14.87$, $Z=2.47$, $p=0.041$). Subiecții de talie joasă non-GHD au prezentat valori crescute și față de grupul pacienților diagnosticați cu GHD, dar această creștere nu a avut semnificație statistică ($U=10.73$, $Z=1.28$, $p=0.59$); când pacienții cu deficit de GH au fost comparați cu pacienții de talie normală aceștia au avut valori similare $U=609$, $z=1.167$, $p=.243$. În grupul pacienților cu talie joasă (sub -2 SD) GHD și non GHD, care au efectuat test de stimulare a secreției de GH, am găsit o corelație negativă semnificativă a deficitului de talie, exprimat ca SD a înălțimii, cu valoarea absolută P3NP (coeficient Spearman $r=-.356$, $p=0.016$, $n=45$).

Pentru descrierea corelațiilor valorilor P3NP cu factori clinici și biochimici s-a analizat lotul de subiecți cu talie normală și valori ale P3NP în intervalul -1.96 , $+1.96$ SD.

Astfel dintre cei 47 subiecți de talie normală, 10 subiecți aveau o valoare a P3NP -ului care depășea $+1.96$ SD și au fost excluși din corelații, fiind etichetați ca valori aberante.

Am găsit o corelație semnificativă a P3NP cu sexul. Băieții au prezentat valori mai mici ale P3NP (M=239.08 pg/mL, n=20) față de fete (M=373.93 pg/mL, n=17) și această diferență a fost semnificativă statistic U=92, z=2.38, p=0.017.

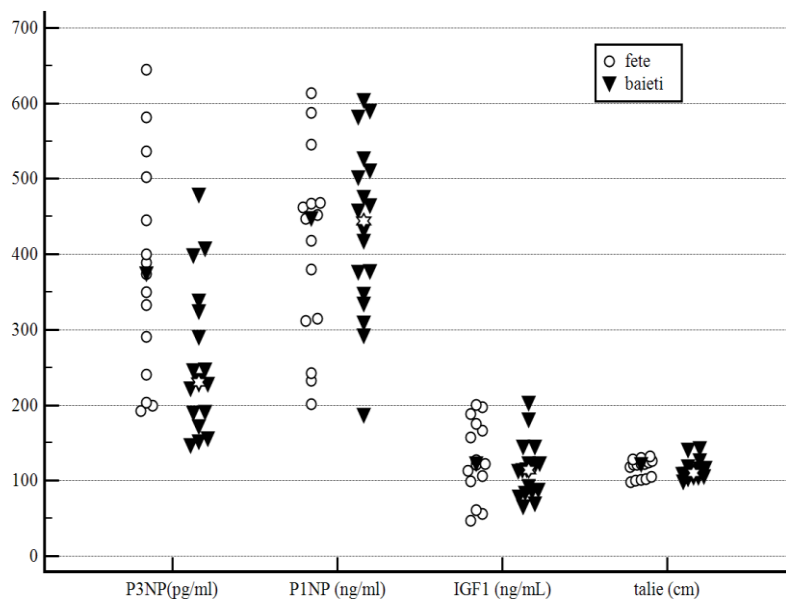


Figura 5. Valorile P3NP, P1NP, IGF1 și taliei stratificate în funcție de sex

Figura 5 arată valorile absolute pentru P3NP, P1NP, IGF1 și talie comparativ în lotul de subiecții de talie normală după excluderea valorilor extreme.

Aplicând un model de regresie polinomială în acest lotul de subiecți, am găsit o corelație non liniară a valorilor P3NP în funcție de nivelul IGF1 sub forma de U, similară cu cea obținută în lotul integral de pacienți indiferent de statusul axei somatotrope care conține și valorile extreme ale P3NP.

Tabelul 7. reprezintă corelații ale unor parametri clinici și biochimici la pacienți GH suficienți cu P3NP în intervalul -1.96, +1.96 SD.

Tabel 7. Coeficienti de corelație în lotul de subiecți GH suficienți, atat cu statură normală cât și cu statură joasă

		IGF1 (SD)	GHmaxR	BMI (SD)	P1NP (abs)	P3NP (abs)	Talie (SD)	TTG (SD)
IGF1 (SD)	<i>r*</i>		-0,54	0,25	0,27	0,024	0,24	0,08
	<i>p</i>		0,03	0,10	0,07	ns	0,1	ns
	<i>n</i>		16	44	43	45	45	17
GHmaxR	<i>r*</i>	-0,54		-0,57	0,16	0,01	-0,17	-0,04
	<i>p</i>	0,03		0,02	ns	ns	ns	ns
	<i>n</i>	16		16	15	16	16	16
BMI SD	<i>r*</i>	0,25	-0,57		0,04	-0,04	0,07	-0,19
	<i>p</i>	0,11	0,02		ns	ns	ns	ns
	<i>n</i>	44	16		42	44	44	17
P1NP abs	<i>r*</i>	0,28	0,161	0,037		0,290	-0,15	0,28
	<i>p</i>	0,07	ns	ns		0,06	ns	ns
	<i>n</i>	43	15	42		43	43	16
P3NP abs	<i>r*</i>	0,02	0,01	-0,04	0,29		-0,05	-0,43
	<i>p</i>	ns	ns	ns	0,06		ns	0,08
	<i>n</i>	45	16	44	43		45	17
Talie (SD)	<i>r*</i>	0,24	-0,17	0,07	-0,15	-0,05		-0,07
	<i>p</i>	0,11	ns	ns	ns	ns		ns
	<i>n</i>	45	16	44	43	45		17
TTG (SD)	<i>r*</i>	-0,08	-0,04	0,19	-0,28	-0,43	-0,07	
	<i>p</i>	ns	ns	ns	ns	0,08	ns	
	<i>n</i>	17	16	17	16	17	17	

*Spearman rank correlation coefficient

SD, deviație standard; IGF1, factorul de creștere similar insulinei; GHmaxR, vârf GH în test de stimulare; BMI, index de masa corporeală; P1NP, propeptidul amino-terminal al colagenului de tip 1; P3NP, propeptidul amino-terminal al colagenului de tip 3; TTG, talie țintă genetică;

Figura 6 schițează în cadrul subiecților care au valori în intervalul normal ale P3NP o variație inversă a P3NP și IGF1 în 3 grupuri de subiecți: GHD, statura joasă non GHD și subiecți normali.

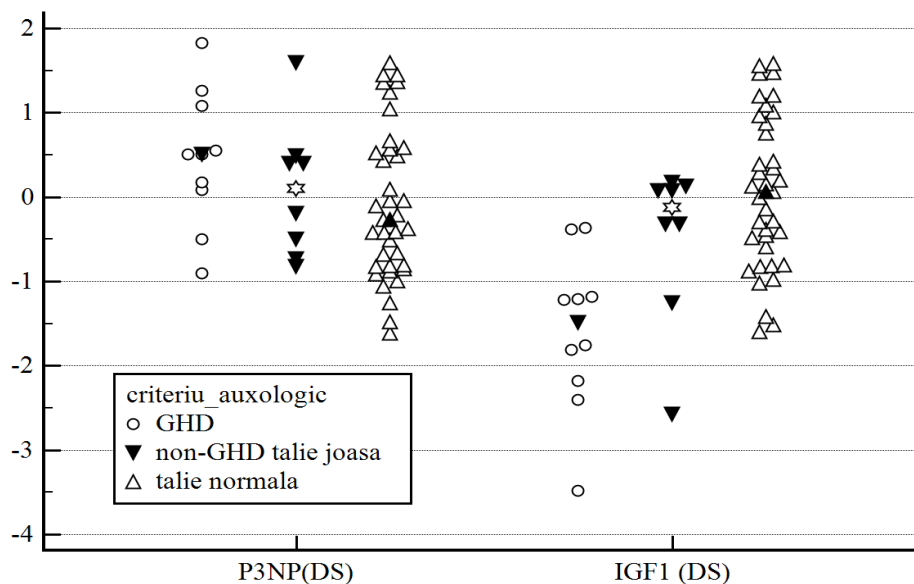


Figura 6. Reprezentare comparativa a IGF1 si P3NP in grupuri stratificate in functie de statura si axa GH

Bazându-ne pe această corelație negativă între IGF1 și P3NP dar și între P3NP și deficitul statural, analiza curbei ROC pentru a decela putere diagnostică comparativă între P3NP și IGF1 a fost efectuată presupunând că valori pozitive ale P3NP -ului sunt asociate cu probabilitatea crescută de GHD și valori negative ale IGF1 sunt asociate cu probabilitate crescută de GHD. Pentru IGF1 curba ROC a luat în considerație asocierea deficitului de GH cu valori mici ale acestui parametru. Analiza curbei ROC pentru puterea discriminatorie maximă a IGF1 în a identifica deficitul de GH arată o valoare prag < -1.184 SD ca având cea mai bună eficiență diagnostică cu o sensibilitate și specificitate 86.67 % și respectiv 87.72 % (AUC=0.892 CI 95% [0.806, 0.979], SE=0.044, $p<0.001$). Analiza curbei ROC pentru puterea discriminatorie maximă a P3NP în a identifica deficitul de GH arată o valoare prag > -0.04 SD ca având cea mai bună eficiență diagnostică cu o sensibilitate și specificitate de 81.82 % și respectiv 56.25 % (AUC=0.674 CI95% [0.497, 0.851], SE=0.09, $p=0.0536$).

Analiza puterii de selecție a P3NP așa cum este rezultă din analiza curbei ROC pentru acest parametru a fost comparată cu cea a lui IGF1. Graficul lor comparativ este prezentat în Figură 7.

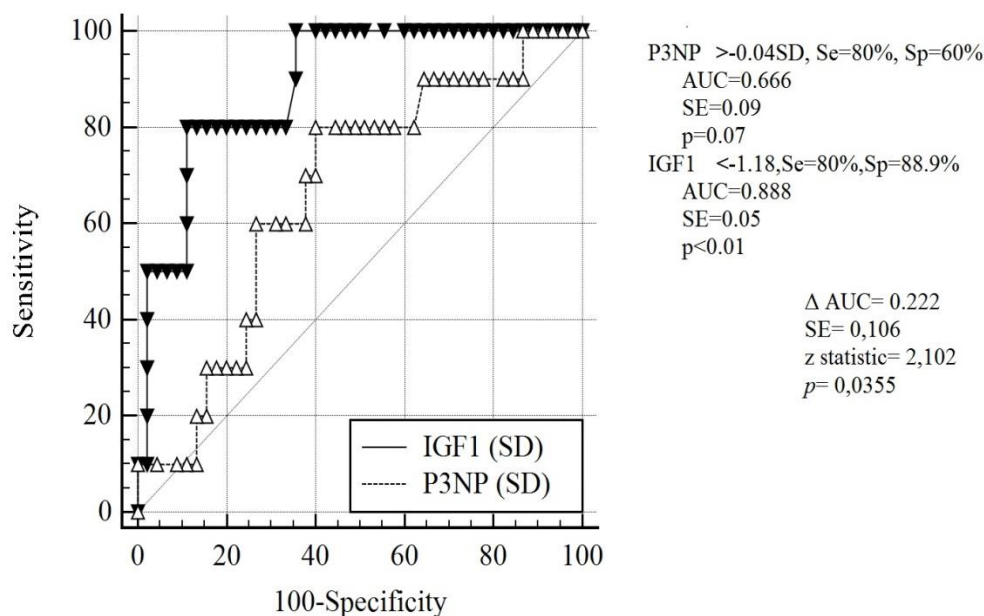


Figura 7. Grafic comparativ al performanței IGF1 și P3NP în documentarea deficitului de GH

Analiza valorilor extreme ale P3NP definite ca valori peste +1.96 DS

Au fost analizate valorile P3NP în afara intervalului normal definit ca -1.96 SD,+1.96 SD reprezentate de 26 determinări.

În lotul de pacienți clasificați GH suficienți 7 din cei 50 pacienți ai lotului martor cu creștere normală au avut valori peste +1.96 SD iar aceste valori au fost mult crescute (de la +5.51 SD la +17.97 SD). Dintre pacienții cu statură joasă care nu au confirmat deficitul de GH în urma testelor dinamice pe axa somatotropă 14 dintre acești pacienți au avut P3NP determinat cu valoare peste +1.96 SD (de la +2.64 SD la +6.48 SD).

Datele analizate pentru pacienți cu valori mai mari de +1.96 SD ale P3NP, am găsit o corelație importantă semnificativă a P3NP cu SD a taliei : $n=26$, $r=.517$, $p=0.0068$; când a fost corectată pentru IGF1 prin corelație parțială indicele de corelație a crescut $n=26$, $r=.532$, $p=0.0062$. Figura 8 arată condensarea valorilor pozitive extreme ale P3NP la pacienții cu deficit de statură.

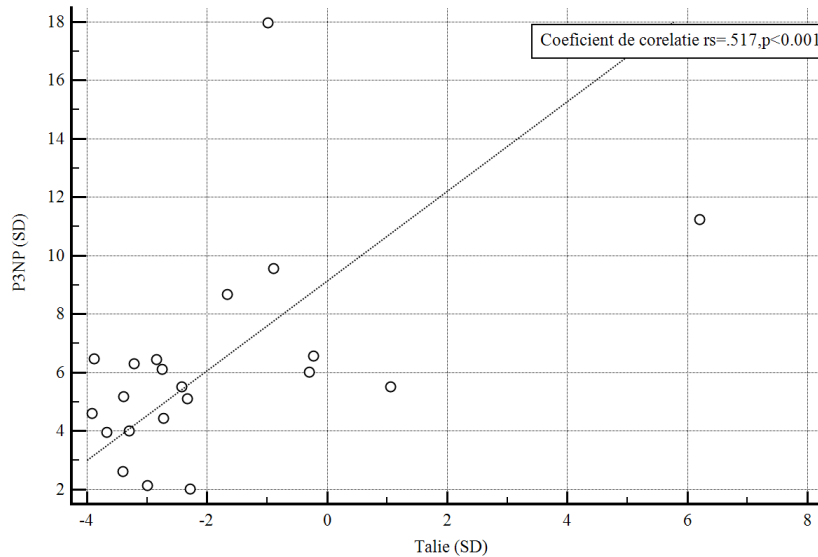


Diagrama de dispersie a valorilor P3NP in functie de talie in lotul de pacienti cu valori ale P3NP peste +1.96 DS

Figura 8. Corelația cu talia a valorilor extreme ale P3NP

Tabel 8 Caracteristici antropometrice in grupul de statura joasa stratificati in functie de axa somatotropa

	GHD izolat (n=13)	non - GHD (n=33)
sex	M:8 F:5	M: 20 F: 13
VC (ani)	6.07±1.98 [4.05,7.60]	6.82± [5.52,7.87]
BA (ani)	3.03±1.51[1.87,3.83]	4.13±2.11[2.55,5.6]
BMI (SD)	-0.07±1.1 [-1.33,0.72]	-0.91±1.26[-1.6,0]
Talie preT (SD)	-4.34±1.16[-4.99,-3.16]	-2.98± 0.54[-3.32,- 2.55]
TTG (SD)	-0.67±0.89 [-0.93,-0.13]	-1.01± 0.6[-1.3, 0.56]
talie postT (SD)	-3.54±1.09[-3.94,-2.77]	-2.58±0.58[-2.91,-2.23]
dozaGH (mcg/kgc)	28.19±3.49[25,31.58]	32.59±3.93[30,35]
Δ Talie SD	2.01±0.65[1.55,2.60]	0.89±0.53[0.45,1.33]
GHmaxR (ng/dL)	1.68±1.84[0.48,1.8]	8.79±3.70[5.71,11.2]
IGF1 (SD)	-1.98±0.9 [-2.4,-1.74]	-0.69± 0.86[-1.22,0.05]
P3NP(SD)	1.7±1.63 [0.52,2.65]	2.04±2.67 [-0.19,4.6]
P3NPabs(pg/mL)	494.67±198.17[344.43,593.62]	447.55±228.13 [296.69,647.26]
P1NPabs(ng/mL)	443.11±165.16[287.9,604.4]	479.79±112.85[388.8,542.6]

GHD, deficit de GHD; M, masculin; F, feminin; VC, vârstă cronologică; BA, varsta osoasa; BMI, index de masa corporeală; SD, deviație standard; preT, pretratament; TTG, talie țintă genetică; postT, după 6 luni de tratament cu GH; Δ Talie, corectare talie sub tratament; GHmax, vârf GH în test de stimulare; IGF1, factorul de creștere similar insulinei; P3NP, propeptidul amino-terminal al colagenului de tip 3; P1NP, propeptidul amino-terminal al colagenului de tip 1.

Pacienții cu talie joasă GH suficienți au avut valori mai scăzute ale IGF1 față de lotul de subiecți cu talie normală, iar această diferență a fost la limita semnificației statistice ($p=0.063$). A existat un trend către valori mai mici ale TTG (SD) în lotul de pacienți cu deficit de talie non GHD față de cei cu GHD. În lotul de pacienți cu talie joasă care ar putea fi îndrumați către evaluarea rezervei hipofizare de GH am găsit o corelație negativă semnificativă statistic între deficitul de talie și valoarea P3NP ($r_s=-.476$, $p<0.01$, $n=30$). Lotul de pacienți cu statură joasă prin deficit de GH nu a menținut această corelație (coeficient Spearman $=-0.069$, $p=0.82$, $n=12$).

Caracteristicile antropometrice și paraclinice în grupul de pacienți cu statură sub -2 SD se regăsesc în Tabelul 8.

Tabelul 9 prezintă, utilizând un test parametric corelații ale markerilor de colagen P3NP și P1NP dar și ale IGF1 cu parametri auxologici în lotul de pacienți GH suficienți ale căror P3NP s-au situat în intervalul -1.96, +1.96 SD, indiferent de statusul axei somatotrope.

Tabel 9 Corelații în grupul GH suficient ale P3NP, P1NP și IGF1 pentru subiecți cu nivel al P3NP în intervalul -1.96,+1.96

		P3NP (SD)	P1NP (SD)	Talie (SD)	BMI-scor Z
IGF1	r	0.058	0.26	0.4	0.39
	p	0.70	0.08	<0.01	<0.001
P3NP	r	-	0.25	0.05	0.096
	p	-	0.1	0.73	0.53
P1NP	r	0.254	-	-0.11	0.06
	p	0.1	-	0.5	0.69

P3NP, peptid amino terminal al colagenului tip III, P1NP, peptid amino-terminal al colagenului tip 1; IGF1, insulin growth factor; SD, deviația standard, BMI, indice de masa corporala; r, coeficient de corelație; p, semnificația statistică

5. DISCUȚII

5.1. Răspunsul maximal al GH în testul diagnostic. Evaluare ca predictor al persistenței deficitului de GH în perioada de tranziție.

Confirmarea GHD persistent în perioada de tranziție cu ajutorul testelor de stimulare GH este indicată după întreruperea administrării GH pentru o perioadă de 1 până la 3 luni pentru toți pacienții tratați în timpul copilăriei pentru GHD izolat și care nu au identificată o mutație genetică responsabilă pentru deficit. O proporție mare a pacienților cu GHD izolat diagnosticat în copilărie, nu vor mai confirma un deficit de GH atunci când sunt retestați la adolescență^{34,35,36}.

Un diagnostic de GHD la adulții tineri se bazează pe un test de stimulare al secreției GH și pe probabilitatea prezenței bolii. Pacienții diagnosticați în copilărie cu deficit multiplu de hormoni hipofizari, care asociază două deficite pituitare suplimentare deficitului de GH sunt considerați ca având persistența GHD în tranziție, fără a necesita retestare¹⁴. O anomalie morfologică severă a glandei hipofizare la evaluarea imagistică prin rezonanța magnetică s-a dovedit utilă ca fiind factor de predicție pozitivă pentru GHD permanent^{37,38,39}.

În cadrul acestui studiu am evaluat axa somatotropă într-un grup de pacienți tratați în copilărie cu rhGH pentru GHD fie izolat sau ca parte a deficitului hipofizar multiplu. Am studiat răspunsul maxim al GH-ului în timpul testului de stimulare al axei somatotrope de la momentul diagnosticului în copilărie ca un posibil predictor al GHD permanent în perioada de adult tânăr. Am analizat un grup de 19 subiecți cu GHD, izolat (68.43%) sau deficit somatotrop ca parte a MPH. Am retestat pacienți GHD izolat diagnosticat în copilărie în perioada lor de tranziție și am găsit persistența deficitului după atingerea înălțimii finale la 30,77% dintre pacienții noștri, similar rezultatelor altor studii^{14,40}.

Nici unul din pacienții grupului GHD izolat nu are anomalii imagistice hipofizare și sunt încadrați ca fiind adulți cu probabilitate scăzută de persistență a GHD care necesită retestarea așa cum este indicat prin consensul GHD la adulți¹⁴.

Nici unul dintre parametri clinici sau biochimici din momentul diagnosticului, cu excepția vârfului de GH în testul diagnostic, nu a prezis în acest studiu persistența GHD. Toți, mai puțin unul dintre pacienții cu GHD persistent după retestarea în perioada de tranziție, au avut un GH maximal în testul de diagnostic sub 4,1 ng/ml.

Și alte studii au constatat că nivelul GH în testul de stimulare diagnostic este un predictor al deficitului de GH persistent la vârsta adultă. Secco a găsit și a propus un nivel predictiv pentru persistența GHD al GH maximal în testul de diagnosticare de sub 3,6 mcg/l în ITT (Se 83,9%, Sp70.8%) și sub 3,1 mcg/l când se efectuează stimularea cu arginină (Se 87,1%, Sp 75%)³⁶.

Am găsit pentru o valoare prag de 3,6 ng/ml în testul de diagnostic pentru GH maximal o sensibilitate și specificitate superioare celor publicate de către Secco pentru persistența GHD (90% și respectiv 95%). Această diferență poate fi explicată printr-un procent mai mare în lotul nostru de pacienți clasificați ca având probabilitate mare a persistenței GHD deoarece grupul de studiu a cuprins 60% MPH, comparativ cu o incidență mai mică în grupul de studiu publicat de Secco (40% MPH). În plus stimularea GH în testul diagnostic cu clonidină ca alternativă la testul cu insulină poate juca un rol esențial în explicația acestei diferențe și a nivelului mai mare al GH ului obținut în studiu, datorită efectului clonidinei mai agresiv asupra stimulării pituitare a GH⁴¹.

Toți cu excepția unuia dintre pacienții care normalizează secreția GH în test de provocare în tranziție au avut un GH maximal în testul de stimulare la momentul diagnostic de peste 4,8 ng/ml, considerat ca fiind GHD parțial. GH maximal în testul de stimulare la momentul diagnostic sub 4,1 ng/ml, este un bun predictor pentru persistența GHD la retestare, după cum reiese din analiza curbei ROC.

Această valoare prag pentru GH maximal stimulat în testul diagnostic realizează o predicție mai bună a persistenței deficitului de GH decât nivelul IGF1 în tranziție după cum reiese din diferența eficienței diagnostice calculate.

Rezultatele sugerează că retestarea în timpul tranziției ar putea fi necesară numai pentru pacienții cu GH maximal în testul diagnostic între 4,1 și 4,8 ng/ml. Astfel, pacienții cu morfologie hipofizară normală și un răspuns parțial pentru nivelul GH în testul de stimulare diagnostic ar putea să nu mai necesite reevaluarea axei somatotrope în timpul tranziției și să fie considerați GH suficienți.

Pacienții cu GHD reversibil au niveluri comparabile ale IGF1 subiecții sănătoși. Toți, mai puțin unul dintre subiecții cu GHD reversibil, au IGF1 peste valoarea prag de -1.34 SD.

În mod surprinzător, 50% dintre pacienții noștri cu persistența GHD după retestare au avut un nivel de IGF1 peste acest prag. Un studiu anterior care evaluează valoarea predictivă a măsurării IGF1 pentru GHD a găsit o valoare predictivă mai

bună a acestui parametru³⁷. Explicația acestui rezultat poate fi perioada de la întreruperea tratamentului cu rhGH la care s-a efectuat reevaluarea în studiul nostru. Unii dintre pacienții noștri cu GHD persistent au fost retestați în tranziție la un interval de 3 până la 6 luni de la întreruperea tratamentului cu rhGH, așa cum este indicat prin consens. Această perioadă de mai puțin de șase luni de la retragerea GH ar putea fi prea scurt pentru că nivelul de IGF1 să scadă și să fie un indicator corect al statusului axei somatotrope.

Ar putea să se ia în considerare doar retestarea pacienților cu GHD tratați în timpul copilăriei care au avut un GH maximal în testul diagnostic între 4,1 și 4,8 ng/ml indiferent de nivelul IGF1.

5.2. Valoarea diagnostică a P1NP în identificarea pacienților cu GHD persistent în tranziție

Perioada de tranziție este definită ca fiind intervalul de la momentul atingerii înălțimii finale, după parcurgerea pubertății și încheierea dezvoltării fizice cu atingerea vârfului de masă osoasă. Deficitul de GH (GHD) netratat duce la creșterea proporției de țesut adipos în detrimentul masei musculare a corpului, osteopenie, tulburări ale metabolismului glucozei și lipidelor, prevalența crescută a bolilor cardiovasculare și reducerea calității vieții. Aceste modificări biologice adverse pot fi reversibile sub tratament cu GH (GH)^{15,42-44}.

P1NP este un marker al formării osoase. Aceasta provine din conversia procologenui în colagen în cursul sintezei de colagen tip I. Eliminarea capătului amino-terminal este realizată de proteaze specifice atunci când colagenul de tip I este încorporat în matricea osoasă. Concentrația P1NP se corelează cu cantitatea de os nou format⁴⁵.

În 2011 Fundația Internațională de Osteoporoză și Federația Internațională de Chimie Clinică și Grupul de lucru privind standardele de Laborator ale markerilor osoși au recomandat utilizarea P1NP ca marker de referință pentru formarea osoasă⁴⁶.

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-1 asupra turnover-ului osos, așa cum apare în deficitul de hormon de creștere, este asociată cu formarea osoasă și sinteză scăzută de colagen doar în timpul copilărie, dar nu și în viață de adult⁴⁷.

Nivelurile serice scăzute ale propeptidelor de procologen în cazul copiilor cu GHD au fost legate de viteză de creștere redusă^{18,48}.

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 analiză 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 intact⁴⁵. Folosirea unui imunotest care detectează forme trimerice ale P1NP poate să detecteze modificările subtile ale acestuia în cursul procesului de formare osoasă.

Concentrațiile plasmatice ale P1NP-ului la pacienții GHD au fost în intervalul de referință pentru indivizi normali. Acest lucru poate fi explicat prin intervale de referință extinse ale acestui marker, cu variație interindividuală considerabilă reflectând mari variații interindividuale ale ratei de înnoire osoasă la adulți⁴⁹.

Valorile P1NP variază în funcție de vârstă. În cazul subiecților noștri, corelația negativă a P1NP-ului cu vârsta este de așteptat dat fiind declinul fiziologic al markerilor de colagen după parcurgerea pubertății⁵⁰. 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 cazul celor dintâi.

Am găsit o diferență semnificativă între P1NP (SD) 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 steroizi sexuali au efectul principal⁴⁷.

Am calculat AUC pentru P1NP și am găsit putere de predicție pentru GHD similară cu cea a IGF1-ului. Markerii de colagen au variabilitate intraindividuală mai mică în comparație cu IGF1¹³. Ei nu sunt acceptați în ghidurile de diagnostic al deficitului de GH dar pot fi luați în considerare mai ales în etapa de tranziție când s-a încheiat creșterea liniară iar efectul lipsei acțiunii GH-IGF1 la nivel osos poate afecta acreția osoasă¹⁴.

5.3. Definirea intervalului de referință pentru P3NP, P1NP și IGF1 la vârstă prepubertară

Elongarea osoasă are loc la nivelul țesutului cartilajinos la nivelul cartilajului de creștere. Ea necesită sinteză crescută a colagenului tip I colagenul fibrilar ce se găsește la nivelul osului. Sincron cu înălțarea există o sinteză continuă de țesut de susținere, cu colagenul de tip III, fiind principalul colagen interstițial prezent la nivelul țesutului conjunctiv.

Prin urmare, determinarea markerilor surogat de formare ai colagenului pot da informații asupra activității osului și țesutului conjunctiv în timpul creșterii⁵¹.

Aprecierea valorii unui marker necesită existența unor intervale de referință care să permită compararea nivelului acestui marker cu determinările la persoane de sex și vârstă similare cu individul testat.

Actual, lipsa unor valori de referință pentru markeri de colagen în populația pediatrică, în special P3NP, este datorată studiilor restrânse, pe un număr redus de pacienți, rezultate în urma dozării cu ajutorul unor metode radioimunometrice. Folosirea kiturilor ce au antigene radiomarcate are o disponibilitate limitată prin restricțiile legislative în diverse regiuni.

Raportăm intervale stratificate pe grupe de vârstă și pentru fiecare sex pentru P3NP la copii folosind o metodă imunoenzimatică non-radiometrică de determinare. Un test non-radiometric care utilizează platformele de laborator obișnuite este mai ușor de realizat în laboratoare care nu dispun de facilitatea de a folosi radioactivitate.

Am obținut intervale de referință pentru P3NP similare cu cele obținute de alți cercetători, folosind aceeași metodă de testare⁵².

Intervalele noastre de referință pentru P3NP sunt diferite de cele obținute prin radioimunoanaliză și au valori de aproximativ 100 de ori mai mici față de acestea^{53,54}.

Diferențele mari între SD la grupe de vârstă adiacente necesită păstrarea stratificării pe intervale de vârstă în populație prepubertară.

Spre deosebire de IGF1, P3NP nu s-a corelat cu greutate, BMI și înălțime, factori auxologici influențabili de starea de nutriție.

Diferențele inter sex pentru determinările P3NP apar semnificative în intervalul de vârstă apropiat de vârsta cronologică a debutului pubertar. S-au găsit valori mai mari ale P3NP-ului în cazul fetelor, în comparație cu grupul de băieții de vârstă 7 - 10 ani. Acest lucru poate fi explicat printr-un debut pubertar mai timpuriu în

cazul fetelor, ce este însoțit de creșterea markerilor de colagen așa cum a fost raportat în studiile anterioare .

Am observat o grupare a valorilor crescute ale P3NP la pacienți cu un nivel scăzut de IGF1 din grupul determinărilor aberante. Când a fost comparat cu grupul de referință, grupul determinărilor aberante are niveluri mai ridicate ale P3NP-ului corelate cu niveluri serice scăzute ale IGF1. Atât subiecții ce au constituit grupul cu valori P3NP aberante cât și subiecții din grupul de referință, au statură normală. P3NP nu a fost corelată cu IGF1, înălțime, greutate sau IMC. Presupunem că aceiași factorii GH-independenți, determinanți ai unui nivel scăzut de IGF-1, cum ar fi factori nutriționali pot determina de asemenea nivelurile ridicate ale P3NP-ului. În această perspectivă, putem folosi un nivel ridicat P3NP ca un instrument sugestiv pentru a indica deficit primar de IGF1, independent de axa GH.

Limitarea majoră a acestui studiu este numărul relativ mic de pacienți. Studiul actual a eșuat în a controla pentru alte variabile cunoscute de a afecta P3NP, cum ar fi patologia renală sau hepatică, pentru care nu putem descrie complet grupul cu determinări aberante ale P3NP.

5.4. Valoarea markerilor de colagen P3NP și P1NP în algoritmul de evaluare a staturii joase la vârstă prepubertară

Determinarea etiologică a staturii joase este importantă pentru monitorizarea tratamentului și minimalizarea riscului asociat terapiei cu hormon de creștere. Factori care sunt incluși în modele de predicție ajung să explice maximum 60 % din variabilitatea la răspunsului la tratamentul cu GH ⁵⁵. Această valoare a predicției avansului de talie pentru patologia pentru care s-a efectuat indicația de inițiere a terapiei, împreună cu proporția de până la 80 % a reversibilității GHD în testarea din momentul tranziției a unui pacient care a încheiat creșterea liniară pot fi explicate de diagnosticul etiologic imprecis al deficitului statural ^{36,37}.

Controversele legate de reproductibilitatea testelor de stimulare ale secreției de GH au direcționat strategia diagnostică spre identificarea unor markeri biochimici ai acțiunii sale - a căror concentrație plasmatică să se coreleze cu secreția endogenă de GH, să nu aibă o variabilitate diurnă sau o fluctuație acută.

Testul de screening recomandat în ghidurile clinice pentru identificarea unui deficit de GH este determinarea IGF1. Utilitatea lui se datorează disponibilității

extensive și lipsei de variație circadiană. Există studii care indică inițierea testării axei somatotrope la pacienții cu statură joasă și valori determinate ale IGF1 sub -1SD față de referința pentru vârstă și sex ⁵⁶. Acest biomarker clasic al disponibilității GH în periferie are o eficiență diagnostică de 80 % în populația de vârstă pediatrică ⁵⁷.

Metabolismul colagenului este profund influențat de concentrația GH-ului seric ⁵⁸.

Efectele GH duc la promovarea sintezei țesutului de colagen atât la nivelul osului cât și la nivelul țesutului conjunctiv. Markerii surogat ce cuantifică sinteza colagenului prin poziția intermediară între hormonii de promovare a creșterii și creșterea în sine au utilitate clinică ca un biomarker nespecific de răspuns la stimulii de creștere.

Am testat pe axa somatotropă 56 de subiecți cu care au întrunit criteriul auxologic pentru indicația de testare dinamică a axei somatotrope.

Criteriile stricte aplicate în prezentul studiu, recent revizuite de societăți europene, au dus la o prevalență de 33.9 % a deficitului de GH izolat similară cu frecvența indicației de tratament pentru GHD în studii actuale publicate în literatura de specialitate ^{59,60}.

Pacienții din studiu încadrați ca GHD au la prezentare vârstă mai mică și o talie scăzută semnificativ față de cohorta de pacienți cu statură joasă care au depășit pragul de stimulare al GH folosit în studiu. Încadrarea lor în clasa corectă etiologică reiese și din viteza recuperatorie semnificativ accelerată a subiecților GHD față de non GHD așa cum rezultă din comparația vitezei de creștere anualizată sub tratament. Aceste rezultate sunt similare cu cele amintite în literatură și stau la baza validării pragului de stimulare al GH pentru determinarea secreției hipofizare insuficiente ^{8,61,62}.

Dacă o valoare a determinării IGF1 în jumătatea superioară a intervalului normal exclude teoretic existența unui deficit idiopatic de GH la un pacient fără patologie hipofizară cunoscută, nivelul acestui biomarker în jumătatea inferioară sau sub limita inferioară a intervalului de referință nu este echivalentă de deficit hipofizar de GH existând factori nutriționali și socio-economici ce pot influența acest nivel scăzut pentru IGF1 ^{55,56}.

Creșterea somatică presupune dezvoltarea scheletală însoțită de o sinteză de țesut de susținere care este o condiție preexistentă a avansului de talie ⁶³. P3NP este o proteină rezultată în procesul de sinteză al colagenului de tip III, constituentul principal al țesutului conjunctiv de susținere. Colagenul este sintetizat sub forma unui

precursor care prezintă la fiecare capăt câte un propeptid. În procesul sintezei și formării triplu helixului, capetele amino și carboxi terminale ale lanțurilor α sunt îndepărtate și eliberate în circulație.

În studiul de față, P3NP este o variabilă continuă care are un interval de distribuție foarte larg dat fiind variabilitatea interindividuală crescută, așa cum se observă la markerii de colagen⁴⁵. Datele existente în literatură asupra nivelului P3NP sunt limitate datorită existenței a doar 2 kituri cu principiu radiometric de imunotestare (Cisbio RIA-gnost P-III-P, Orion UniQ PIIIINP RIA) și un altul non radiometric ce necesită platformă dedicată (Advia Centaur Siemens)^{21,30}. Cele mai multe date recente ale P3NP sunt publicate la adulți tineri. Nu există studii care să descrie nivelul P3NP la vârstă pediatrică și relația acestuia cu creșterea folosind un principiu non-radiometric de dozare.

Am folosit în studiu un kit comercial cu principiu imunoenzimatic-sandwich non radiometric. Acest test utilizează P3NP uman și anticorpi monoclonali de șoarece dezvoltati împotriva antigenului uman. Metoda detectează sensibil peptidul uman dat fiind variabilitatea scăzută interspecie a moleculei de P3NP. Folosirea unei metode non radiometrice de cuantificare ce nu necesită echiparea cu platforme de laborator dedicate îi crește posibilitatea de cuantificare.

În lotul nostru, din 81 de înregistrări disponibile pentru P3NP, în grupul compus de pacienți GH deficienți și GH suficienți, am avut 26 valori care au fost peste +1.96 SD și au fost definite valori extreme. Am arătat în studiu ca spre deosebire de IGF1, P3NP și P1NP sunt independenți de factori nutriționali la grupul de pacienți cu axa somatotropă competentă.

Dintre valorile P3NP care depășesc +1,96 SD, 5 înregistrări aparțin celor 15 pacienți cu deficit izolat GH ce au prezentat disponibile determinarea P3NP. Chiar dacă procentual, cele două incidente ale valorilor extreme sunt similare între subiecții cu GHD sau GH suficienți, 3 dintre pacienții cu GHD au asociat condiții identificabile cunoscute a se asocia cu turnover crescut al țesutului de colagen. Astfel 2 dintre acești pacienți asociau parapareză în timp ce un al treilea asocia sindrom inflamator important la determinarea P3NP.

Proporția crescută de valori extreme ale P3NP-ului de 33% în întregul lot o explicăm prin caracteristica de biomarker nespecific cu surse tisulare multiple ale acestuia. Nu este cunoscută proporția dependentă de GH a P3NP-ului seric rezultat din sinteza colagenului dar nivelul său crește la expunerea din sursă exogenă la GH⁶⁴

Sinteza scăzută de matrice proteică osoasă în cazul deficienței de GH nu este specifică decelerării creșterii prin GHD și a fost observată în situații însoțite de viteză redusă de înălțare cum este cazul hipotiroidiei și al bolilor inflamatorii intestinale la copil. Sinteza crescută de colagen este o condiție necesară susținerii creșterii. Studiul efectuat de Carey arată valorile mari bazale ale markerilor de colagen mai frecvent întâlnite la pacienții cu viteză scăzută de înălțare în timp ce pacienții cu viteză de creștere ce depășește un prag de 6.5 cm. au avut valori bazale ale markerilor de colagen mai mici ¹⁸.

Mai mult de jumătate din valorile P3NP care au depășit pragul de +1.96 SD au fost înregistrate la subiecți cu talie joasă și axa somatotropă competentă.

P3NP nu s-a corelat cu greutatea sau talia în valoare absolută și această lipsă de corelație face ca P3NP să nu necesite ajustare față de acești 2 parametri și să fie considerat independent de statusul nutrițional.

Corelația IGF1 cu deficitul de talie analizată la subiecți cu stimulare normală a GH în testul farmacologic a fost regăsită și în alte studii în care s-a sugerat crearea unor intervale de referință pentru aceasta, corectate pentru talie (SD).

În lotul martor valorile P3NP au fost semnificativ mai mari în lotul de fete față de cel al băieților. Dimorfismul sexual amintit în literatură se referă doar la populația postpubertară, unde găsim valori mai crescute ale P3NP în lotul de sex masculin față de cel feminin și aceste valori sunt condiționate de testosteron ^{30,65}.

IGF1 se corelează negativ cu P3NP atunci când le-am comparat în întregul lot. Acest rezultat este surprinzător având în vedere că atât P3NP cât și IGF1 sunt văzute ca proteine GH responsive⁵⁸.

În timp ce IGF1 rezultă în mai mult de 75 % din sursă hepatică, producția de P3NP are sursă hepatică doar când însoțește procesul de fibroză hepatică ¹⁶. Cum în acest grup de pacienți este improbabilă boala avansată hepatică, variația divergentă a celor 2 biomarkeri poate fi explicabilă prin sursa diferită a celor 2 biomarkeri în populația pediatrică din țesuturi cu sensibilitate diferită la GH.

Corelația negativă semnificativă a valorii P3NP cu talia exprimată ca SD s-a regăsit atât în analiza întregului lot de subiecți cuprinzând martori cu talie normală cât și când a fost evaluată această relație în lotul cu statură joasă. Nivelul P3NP crește odată cu accentuarea deficitului de înălțime și această corelație negativă este mai evidentă la statura joasă.

Corelația negativă moderată în lotul de talie joasă între talie și P3NP față de corelația negativă modestă determinată în lotul ce include și subiecți de talie normală poate sugera că pacienții scunzi indiferent de etiologie dau relația negativă a taliei cu P3NP.

Determinarea valorii efectorului periferic al IGF1 este o metodă de screening sensibilă și specifică pentru identificarea pacienților cu deficit hipofizar de GH. Am obținut în studiu pentru IGF1 o valoare prag de -1,18 DS care caracterizează cel mai bine starea de deficit de GH. Valoarea prag pentru IGF1 din studiul nostru are o specificitate de peste 90 % a prezenței deficitului de GH fiind sensibil diferită de alte studii dar această valoare a fost determinată într-un lot de pacienți la care s-au exclus valorile extreme ale P3NP definite ca fiind peste 1,96 SD. În studiul său Binder pentru un prag mai mic al IGF1 avem o specificitate de doar 33.3% ⁶⁰.

În plus având în vedere corelația inversă a IGF1 și P3NP atunci când IGF1 scade sub 0 SD este posibilă excluderea valorilor mult scăzute ale IGF1 care sunt însoțite la dozarea concomitentă a P3NP de valori extreme ale celui din urmă.

Valoarea prag de -1.18 SD obținută în acest studiu este sensibil crescută față de valorile publicate anterior și se datorează în parte selecției în analiză a pacienților cu deficit izolat de GH și excluderii din lot a celor care asociază deficit hipofizar multiplu. Studiul nu a avut obiectiv primar determinarea pragului pentru IGF1 a deficitului de GH.

Creșterea coeficientului de corelație negativă între P3NP și deficitul statural atunci când corectăm pentru valoarea IGF1 semnifică un determinant comun al valorilor P3NP și deficitului statural independent de nivelul IGF1.

Printr-un mecanism similar cu efectul GH la nivelul cartilajului de creștere putem presupune că în parte sinteza GH dependentă a P3NP este independentă de IGF1 și reprezintă un efect per se al GH-ului. Această ipoteză este susținută de studiile inițiale care descriu proteinele derivate din sinteza colagenului ⁶⁴. În studiul nostru subiecții GH deficienți au valori ale P3NP în intervalul normal pentru acest biomarker.

După eliminarea subiecților cu valori aberante ale P3NP, valorile acestuia la subiecții cu GHD au fost superioare față de cele ale subiecților fără deficit hipofizar de GH, indiferent de statură. Am înregistrat un trend invers al variației P3NP față de cel al IGF1 în 3 grupuri de pacienți comparate: GHD, statură joasă non GHD, subiecți

cu statură normală. Este posibilă ipoteza că lipsa acțiunii GH împiedică încorporarea acestui peptid în țesuturi conjunctive non- osoase și mai puțin sinteza acestuia.

De remarcat că frecvența cea mai mare a valorilor extreme apare în lotul cu statură joasă non GH deficient cu agregarea lor în intervalul de talie -2SD până la -4SD. În acest interval indicele de corelație al P3NP cu talia are un nivel coeficientul de corelație negativă maximă între toate loturile analizate ($r_s = .517$, $p < 0.01$).

Astfel valorile crescute peste nivelul intervalului fiziologic pentru P3NP pot să orienteze investigarea deficitului statural din cauze GH independente. El este un marker ce crește sensibilitatea valorilor scăzute ale IGF1 în identificarea deficitului de GH.

6. CONCLUZII

1. O treime dintre pacienții diagnosticați cu deficit izolat de hormon de creștere în cursul copilăriei vor menține deficitul când sunt retestați la vârsta adultă.
2. Valoarea maximală a GH în testul de stimulare farmacologică diagnostic în copilărie poate fi folosită ca un criteriu de probabilitate înaltă a menținerii deficitului de hormon de creștere la vârsta de adult tânăr. O valoare a vârfului de GH în testul diagnostic de sub 4.1 ng/mL încadrează pacienții în grupul de subiecți cu persistența deficitului de GH, în afara retestării. O valoare a vârfului de GH de peste 4.8 ng/mL va predicta axă somatotropă competentă la retestarea din perioada de tranziție.
3. O perioadă de epurare pentru IGF1 între 3 și 6 luni de la întreruperea terapiei de promovare a creșterii este insuficientă pentru evaluarea corectă a hiposomatotropismului la pacienții cu deficit izolat de hormon de creștere.
4. Am identificat o corelație pozitivă între P1NP și IGF-1 în perioadă de tranziție. Am găsit o diferență semnificativă între P1NP (SD) între pacienții cu GHD și subiecții GH-suficienți. Acest fapt sugerează influența axei GH-IGF1 asupra markerilor turnover-ului osos în timpul etapei de tranziție.
5. Atât subiecții GH suficienți cât și cei care au deficit de GH în viața de adult tânăr au valori ale P1NP în intervalul normal, explicabil prin controlul important exercitat de hormonii sexuali asupra acestui marker de formare osoasă.

6. P3NP este un marker cu un interval larg de referință similar cu ceilalți markeri ai metabolismului colagenului. Fiind un parametru nespecific cu surse tisulare multiple nivelul său crescut poate fi datorat unor modificări independente de statusul GH. P3NP și P1NP sunt independenți de factori nutriționali la grupul de pacienți cu axa somatotropă competentă.
7. Corelația inversă între P3NP și IGF1 în grupul de subiecți de talie normală cu valori aberante ale P3NP, poate reprezenta sensibilitate diferită la acțiunea GH a țesutului din care provin. Sunt necesare studii prospective suplimentare în ceea ce privește nivelul ridicat de P3NP ca un instrument sugestiv pentru deficitul primar de IGF1, independent de axa GH.
8. Nivelul P3NP crește o dată cu accentuarea deficitului de înălțime. Chiar dacă sunt situate în intervalul normal, valorile P3NP ale subiecților cu GHD sunt superioare față de cele ale subiecților cu axă somatotropă competentă. Emitem ipoteza ca lipsa acțiunii GH împiedică încorporarea acestui peptid în țesuturi conjunctive non-osoase și mai puțin sinteza acestuia.
9. În ciuda puterii discriminative scăzute în diagnosticul deficitului de GH atunci când îl comparăm cu IGF1, o valoare extremă a P3NP poate să orienteze în direcționarea evaluării staturii joase către factori responsabili de deficitul primar de IGF1 cum este deficitul nutrițional.

7. FINANȚARE

Această cercetare a fost finanțată parțial prin următoarele fonduri:

Proiect CERO – PROFIL DE CARIERĂ: CERCETĂTOR ROMÂN. Contract de finanțare: POSDRU/159/1.5/S/135760 la care am participat ca doctorand în perioada 2014 – 2015.

8. Bibliografie

1. Wit JM, Clayton PE, Rogol AD, Savage MO, Saenger PH, Cohen P. Idiopathic short stature: definition, epidemiology, and diagnostic evaluation. *Growth Horm IGF Res.* 2008;18(2):89-110. doi:10.1016/j.ghir.2007.11.004.
2. Stanley T. Diagnosis of growth hormone deficiency in childhood. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2012;19(1):47-52. doi:10.1097/MED.0b013e32834ec952.
3. Ghigo E, Bellone J, Aimaretti G, et al. Reliability of provocative tests to assess growth hormone secretory status. Study in 472 normally growing children. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996;81(9):3323-3327. doi:10.1210/jc.81.9.3323.
4. Maghnie M, Aimaretti G, Bellone S, et al. Diagnosis of GH deficiency in the transition period: Accuracy of insulin tolerance test and insulin-like growth factor-I measurement. *Eur J Endocrinol.* 2005;152(4):589-596. doi:10.1530/eje.1.01873.
5. Stanley TL, Levitsky LL, Grinspoon SK, Misra M. Effect of body mass index on peak growth hormone response to provocative testing in children with short stature. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94(12):4875-4881. doi:10.1210/jc.2009-1369.
6. Clemmons DR. Consensus statement on the standardization and evaluation of growth hormone and insulin-like growth factor assays. *Clin Chem.* 2011;57(4):555-559. doi:10.1373/clinchem.2010.150631.
7. Wagner I V, Paetzold C, Gausche R, et al. Supplemental Data for : Clinical evidence based decision limits for growth hormone stimulation tests in children with back-up of results by reference to mass spectrometry. :1-7.
8. Richmond EJ, Rogol AD. Growth hormone deficiency in children. *Pituitary.* 2008;11(2):115-120. doi:10.1007/s11102-008-0105-7.
9. Strasburger CJ, Bidlingmaier M, Wu Z, Morrison KM. Normal values of insulin-like growth factor I and their clinical utility in adults. *Horm Res.* 2001;55 Suppl 2(suppl 2):100-105. doi:63484.
10. Ranke MB, Schweizer R, Lindberg A, et al. Insulin-like growth factors as diagnostic tools in growth hormone deficiency during childhood and adolescence: the KIGS experience. *Horm Res.* 2004;62 Suppl 1:17-25. doi:10.1159/000080754.
11. Jensen RB, Jeppesen KA, Vielwerth S, et al. Insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF-binding protein 3 as diagnostic markers of growth hormone deficiency in infancy. *Horm Res.* 2005;63(1):15-21. doi:10.1159/000082456.
12. Strasburger CJ, Bidlingmaier M. How robust are laboratory measures of growth hormone status? *Horm Res.* 2005;64 Suppl 2:1-5. doi:10.1159/000087745.
13. Nguyen T V, Nelson AE, Howe CJ, et al. Within-subject variability and analytic imprecision of insulinlike growth factor axis and collagen markers: implications for clinical diagnosis and doping tests. *Clin Chem.* 2008;54(8):1268-1276. doi:10.1373/clinchem.2008.105726.
14. Ho KKY. Consensus guidelines for the diagnosis and treatment of adults with GH deficiency II: a statement of the GH Research Society in association with the European Society for Pediatric Endocrinology, Lawson Wilkins Society, European Society of Endocrinology, J. *Eur J Endocrinol.* 2007;157(6):695-700. doi:10.1530/EJE-07-0631.
15. Alatzoglou KS, Webb EA, Le Tissier P, Dattani MT. Isolated growth hormone deficiency (GHD) in childhood and adolescence: recent advances. *Endocr Rev.* 2014;35(3):376-432. doi:10.1210/er.2013-1067.
16. Khan S, Subedi D, Chowdhury MMU. Use of amino terminal type III procollagen peptide (P3NP) assay in methotrexate therapy for psoriasis. *Postgrad Med J.*

- 2006;82(967):353-354. doi:10.1136/pgmj.2005.041533.
17. Taubman MB, Goldberg B, Sherr C. Radioimmunoassay for human procollagen. *Science* (80-). 1974;186(4169):1115-1117.
 18. Carey DE, Goldberg B, Ratzan SK, Rubin KR, Rowe DW. Radioimmunoassay for type I procollagen in growth hormone-deficient children before and during treatment with growth hormone. *Pediatr Res*. 1985;19(1):8-11.
 19. Tapanainen P, Risteli L, Knip M, Kaar MJ, Risteli J. Serum aminoterminal propeptide of type III procollagen: A potential predictor of the response to growth hormone therapy. *J Clin Endocrinol Metab*. 1988;67(6):1244-1249. doi:10.1210/jcem-67-6-1244.
 20. Crofton PM, Wade JC, Taylor MRH, Holland C V. Serum concentrations of carboxyl-terminal propeptide of type I procollagen , amino-terminal propeptide of type III procollagen , cross-linked carboxyl-terminal telopeptide of type I collagen , and their interrelationships in schoolchildren. *Clin Chem*. 1997;43(9):1577-1581.
 21. Danne T, Gruters A, Schnabel K, et al. Long-term monitoring of treatment with recombinant human growth hormone by serial determinations of type III procollagen-related antigens in serum. *Pediatr Res*. 1988;23(2):167-171. doi:10.1203/00006450-198802000-00008.
 22. Hertel NT, Stoltenberg M, Juul A, et al. Serum concentrations of type I and III procollagen propeptides in healthy children and girls with central precocious puberty during treatment with gonadotropin-releasing hormone analog and cyproterone acetate. *J Clin Endocrinol Metab*. 1993;76(4):924-927. doi:10.1210/jcem.76.4.8473407.
 23. Seibel MJ. The use of molecular markers of bone turnover in the management of patients with metastatic bone disease. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2008;68(6):839-849. doi:10.1111/j.1365-2265.2007.03112.x.
 24. Civitelli R, Armamento-Villareal R, Napoli N. Bone turnover markers: Understanding their value in clinical trials and clinical practice. *Osteoporos Int*. 2009;20(6):843-851. doi:10.1007/s00198-009-0838-9.
 25. Karsenty G, Kronenberg HM. Postnatal Bone Growth: Growth Plate Biology, Modeling, and Remodeling. In: *Pediatric Bone: Biology & Diseases*. Elsevier Inc.; 2003:119-133.
 26. Tuchman S, THAYU M, Shults J, ZEMEL BSS, BURNHAM JMM, Leonard MBB. Interpretation of Biomarkers of Bone Metabolism in Children: Impact of Growth Velocity and Body Size in Healthy Children and Chronic Disease. *J Pediatr*. 2008;(153):484-490. doi:10.1016/j.jpeds.2008.04.028.
 27. Russell M, Breggia A, Mendes N, Klibanski A, Misra M. Growth hormone is positively associated with surrogate markers of bone turnover during puberty. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2011;(75):482-488. doi:10.1111/j.1365-2265.2011.04088.x.
 28. Trivedi P, Risteli J, Risteli L, Hindmarsh PCP, Brook CGDC, Mowat AAP. Serum concentrations of the type-I and type-III procollagen propeptides as biochemical markers of growth velocity in healthy infants and children and in children with growth disorders. *Pediatr reasearch*. 1991;30(3).
 29. Abellan, Rosario, Ventura, et al. Evaluation of immunoassays for the measurement of insulin- like growth factor-I and procollagen type III peptide, indirect biomarkers of recombinant human growth hormone misuse in sport. *Clin Chem Lab Med*. 2005;43(1):75-85. doi:10.1515/CCLM.2005.012.
 30. Erotokritou-Mulligan I, Guha N, Stow M, et al. The development of decision limits for the implementation of the GH-2000 detection methodology using current commercial insulin-like growth factor-I and amino-terminal pro-peptide of type III

- collagen assays. *Growth Horm IGF Res.* 2012;22(2):53-58.
doi:10.1016/j.ghir.2011.12.005.
31. Wallace JD, Cuneo RC, Baxter R, et al. Responses of the growth hormone (GH) and insulin-like growth factor axis to exercise, GH administration, and GH withdrawal in trained adult males: A potential test for GH abuse in sport. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84(10):3591-3601. doi:10.1210/jcem.84.10.6037.
 32. Wagner I V., Paetzold C, Gausche R, et al. Clinical evidence-based cutoff limits for GH stimulation tests in children with a backup of results with reference to mass spectrometry. *Eur J Endocrinol.* 2014;171:389-397. doi:10.1530/EJE-14-0165.
 33. Maghnie M, Strigazzi C, Tinelli C, et al. Growth hormone (GH) deficiency (GHD) of childhood onset: reassessment of GH status and evaluation of the predictive criteria for permanent GHD in young adults. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84(4):1324-1328. doi:10.1210/jcem.84.4.5614.
 34. AAP. Recommendations for Preventive Pediatric Health Care Periodicity Schedule. *Pediatrics.* 2008;105(3):645-646.
 35. Wass JA, Vakili H, Cattini P a, et al. Growth hormone (GH) deficiency (GHD) of childhood onset: reassessment of GH status and evaluation of the predictive criteria for permanent GHD in young adults. *Eur J Endocrinol.* 2007;92(4):49-58. doi:10.1210/jcem.84.4.5614.
 36. Secco A, Di Iorgi N, Napoli F, et al. Reassessment of the growth hormone status in young adults with childhood-onset growth hormone deficiency: Reappraisal of insulin tolerance testing. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94(11):4195-4204. doi:10.1210/jc.2009-0602.
 37. Gelwane G, Garel C, Chevenne D, et al. Subnormal serum insulin-like growth factor-I levels in young adults with childhood-onset nonacquired growth hormone (GH) deficiency who recover normal GH secretion may indicate less severe but persistent pituitary failure. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(10):3788-3795. doi:10.1210/jc.2007-1003.
 38. di Iorgi N, Secco A, Napoli F, et al. Deterioration of growth hormone (GH) response and anterior pituitary function in young adults with childhood-onset GH deficiency and ectopic posterior pituitary: a two-year prospective follow-up study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(10):3875-3884. doi:10.1210/jc.2007-1081.
 39. Gascoïn-Lachambre G, Brauner R, Duche L, et al. Pituitary stalk interruption syndrome: diagnostic delay and sensitivity of the auxological criteria of the growth hormone research society. *PLoS One.* 2011;6(1):e16367. doi:10.1371/journal.pone.0016367.
 40. Gonc EN, Kandemir N. Long-term effects of growth hormone (GH) on bone mineral status and bone turnover markers in patients with isolated GH deficiency and multiple pituitary hormone deficiency. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2007;66:672-677. doi:10.1111/j.1365-2265.2007.02799.x.
 41. Fima Lifshitz. *Pediatric Endocrinology Volume 2.* FIFTH EDIT. (Lifshitz F, ed.). Informa Healthcare; 2007.
 42. Ter Maaten JC, De Boer H, Kamp O, Stuurman L, Van Der Veen EA. Long-term effects of growth hormone (GH) replacement in men with childhood-onset GH deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84(7):2373-2380.
 43. Amato G, Izzo G, La Montagna G, Bellastella a. Low dose recombinant human growth hormone normalizes bone metabolism and cortical bone density and improves trabecular bone density in growth hormone deficient adults without causing adverse effects. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1996;45(1):27-32.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8796135>.

44. O'Halloran DJ, Tsatsoulis A, Whitehouse RW, Holmes SJ, Adams JE, Shalet SM. Increased bone density after recombinant human growth hormone (GH) therapy in adults with isolated GH deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 1993;76(5):1344-1348. <http://press.endocrine.org/doi/pdf/10.1210/jcem.76.5.8496328>. Accessed May 3, 2016.
45. Koivula MK, Risteli L, Risteli J. Measurement of aminoterminal propeptide of type I procollagen (PINP) in serum. *Clin Biochem.* 2012;45:920-927. doi:10.1016/j.clinbiochem.2012.03.023.
46. Vasikaran S, Eastell R, Bruyère O, et al. Markers of bone turnover for the prediction of fracture risk and monitoring of osteoporosis treatment: A need for international reference standards. *Osteoporos Int.* 2011;22(2):391-420. doi:10.1007/s00198-010-1501-1.
47. Sartorio a, Conti a, Monzani M. New markers of bone and collagen turnover in children and adults with growth hormone deficiency. *Postgrad Med J.* 1993;69:846-850. doi:10.1136/pgmj.69.817.846.
48. Crofton PM, Evans N, Taylor MRH, Holland C V. Procollagen Type I Amino-Terminal Propeptide: Pediatric Reference Data and Relationship with Procollagen Type I Carboxyl-Terminal Propeptide. *Clin Chem.* 2004;50(11):2173-2176. doi:10.1373/clinchem.2004.034090.
49. Brown JP, Albert C, Nassar BA, et al. Bone turnover markers in the management of postmenopausal osteoporosis. *Clin Biochem.* 2009;42(10-11):929-942. doi:10.1016/j.clinbiochem.2009.04.001.
50. Bayer M. Reference values of osteocalcin and procollagen type I N-propeptide plasma levels in a healthy Central European population aged 0-18 years. *Osteoporos Int.* 2014;25(2):729-736. doi:10.1007/s00198-013-2485-4.
51. Li Ch PH. Preparation and properties of growth hormone from human and monkey pituitary glands. *Science.* 1956;124(3235):1293-1294.
52. Jianguo W, Zhenzhen L, Xianghua L, Zhazheng Z, Suke S, Suyun W. Serum and urinary procollagen III aminoterminal propeptide as a biomarker of obstructive nephropathy in children. *Clin Chim Acta.* 2014;434:29-33. doi:10.1016/j.cca.2014.04.005.
53. Szulc P, Seeman E, Delmas PD. Biochemical measurements of bone turnover in children and adolescents. *Osteoporos Int.* 2000;11(4):281-294. doi:10.1007/s001980070116.
54. Niemelä O, Risteli L, Parkkinen J, Risteli J. Purification and characterization of the N-terminal propeptide of human type III procollagen. *Biochem J.* 1985;232(1):145-150.
55. Ranke MB, Lindberg A. Predicting growth in response to growth hormone treatment. *Growth Horm IGF Res.* 2009;19(1):1-11. doi:10.1016/j.ghir.2008.08.001.
56. Pandian R, Nakamoto JM. Rational use of the laboratory for childhood and adult growth hormone deficiency. *Clin Lab Med.* 2004;24(1):141-174. doi:10.1016/j.cll.2004.01.009.
57. Boquete HR, Sobrado PG V, Fideleff HL, et al. Evaluation of Diagnostic Accuracy of Insulin-Like Growth Factor (IGF)-I and IGF-Binding Protein-3 in Growth Hormone-Deficient Children and Adults Using ROC Plot Analysis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(January):4702-4708. doi:10.1210/jc.2003-030412.
58. Doessing S, Heinemeier KM, Holm L, et al. Growth hormone stimulates the collagen synthesis in human tendon and skeletal muscle without affecting myofibrillar protein synthesis. *J Physiol.* 2010;588(Pt 2):341-351. doi:10.1113/jphysiol.2009.179325.
59. Amed S, Delvin E, Hamilton J. Variation in growth hormone immunoassays in

- clinical practice in Canada. *Horm Res.* 2008;69(5):290-294. doi:10.1159/000114860.
60. Binder G, Huller E, Blumenstock G, Schweizer R. Auxology-based cut-off values for biochemical testing of GH secretion in childhood. *Growth Horm IGF Res.* 2011;21(4):212-218. doi:10.1016/j.ghir.2011.05.007.
61. Mauras N, Walton P, Nicar M, Welch S, Rogol AD. Growth hormone stimulation testing in both short and normal statured children: use of an immunofunctional assay. *Pediatr Res.* 2000;48(5):614-618. doi:10.1203/00006450-200011000-00010.
62. Ranke MB, Lindberg a, Chatelain P, et al. Prediction of long-term response to recombinant human growth hormone in Turner syndrome: development and validation of mathematical models. KIGS International Board. Kabi International Growth Study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85(11):4212-4218. doi:10.1210/jc.85.11.4212.
63. Danne T, Grüters A, Schuppan D, Quantas N, Enders I, Weber B. Relationship of procollagen type III propeptide-related antigens in serum to somatic growth in healthy children and patients with growth disorders. *J Pediatr.* 1989;114(2):257-260. doi:10.1016/S0022-3476(89)80792-9.
64. Jensen LT. The aminoterminal propeptide of type III procollagen. Studies on physiology and pathophysiology. *Dan Med Bull.* 1997;44(1):70-78. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9062765>.
65. Erotokritou-Mulligan I, Bassett EE, Cowan DA, et al. Influence of ethnicity on IGF-I and procollagen III peptide (P-III-P) in elite athletes and its effect on the ability to detect GH abuse. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2009;70(1):161-168. doi:10.1111/j.1365-2265.2008.03319.x.