

Importanța evaluării homocisteinei serice totale la pacienții cu hipotiroidism “indus”

The importance of total seric homocysteine assesment at pacients with „induced” hypothyroidism

Mariana Purice, Florin Alexiu, Valeria Lungu*, Mihaela Giurcaneanu, Petrica Museteanu, Leonard Dumitriu

Institutul de Endocrinologie “C.I. Parhon “, București

** Institutul de Fizică și Inginerie Nucleară ” Horia Hulubei “, București*

Rezumat

Homocisteina este un aminoacid cu grupare tiolică care ajunge în circulație ca rezultat al proceselor metabolice de metilare. Dezechilibrele de potențial de membrană celulară pot determina hipo sau hiper acumularea homocisteinei circulante. Valori ridicate de homocisteină s-au evidențiat la pacienți cu patologie genetică a enzimelor implicate în metabolismul acestei molecule, la pacienți cu retard mental, în arteroscleroza timpurie și în tromboembolism arterial și venos. Studiile epidemiologice au evidențiat că nivelul crescut de homocisteină este un factor de risc în bolile cardiovasculare și cerebrale și totodată este implicat în accelerarea proceselor de îmbătrânire.

Studiul de față a avut ca scop evaluarea nivelului de homocisteină la un lot de pacienți cu neoplasm tiroidian (Ak tiroidian), operați și tratați cu ^{131}I . În timpul radioterapiei, pacienții întrerup substituția cu hormoni tiroidieni devenind astfel hipotirodieni “induși” (TSH seric $>50\mu\text{UI/ml}$).

Homocisteina serică totală a fost determinată prin metoda ELISA (DRG International, Inc USA). Studiul a fost completat efectuând determinări de colesterol seric (metoda colorimetrică).

La 67% dintre pacienți s-au gasit valori semnificativ mai mari decât la lotului martor ($p<0.01$). Dintre aceștia, 5 pacienți (39%) au avut concentrația de tHcy cuprinsă între 15-20 $\mu\text{mol/l}$ și 8 pacienți (32%) au avut concentrația de tHcy $>20\mu\text{mol/l}$ (domeniul de normalitate al metodei fiind 5-15 $\mu\text{mol/l}$).

Concentrația crescută a homocisteinei serice totale în hipotiroidism poate fi considerată ca un nou factor de risc cardiovascular. Față de colesterol și fracțiile de colesterol seric, homocisteina este un parametru mult mai sensibil de evaluare a acestui risc la pacienții cu hipotiroidism sever. De asemenea, evaluarea nivlului seric de homocistină ar ajuta la monitorizarea terapiei hipotirodismului și, în același timp, la prevenirea apariției timpurii a aterosclerozei.

În vederea studiilor viitoare privind implicarea acestui metabolit ca marker în procesele de îmbătrânire, metoda de dozare a homocisteinei serice totale a fost testată și pe un model animal, un lot de șobolani tineri ($n=10$). S-au obținut rezultate reproductibile.

Abstract

Homocysteine is a thiol-containing amino acid, exported to the circulation as a result of the methylation in the metabolical processes. Impaired reactions at the level of cellular membrane can induce a hypo or hyper accumulation of circulating homocysteine. Several elevated concentrations of the homocysteine (tHcy) are found in subjects with homocystinuria. Patients with homocystinuria exhibit mental retardation, early arterioscleroses and arterial and venous thromboembolism. Other less severe genetic defects, leading to moderate elevated levels of tHcy, are also found. Epidemiological research has shown that elevated levels of tHcy is an independent risk factor of cardiovascular and cerebral diseases, as well as in the aging processes.

The purpose of our study was to evaluate the level of the total serum homocysteine for 18 patients with thyroid neoplasm during the treatment with radio iodine (^{131}I). These patients are considered as being with "induced hypothyroidism" due to the fact that four weeks before, and during the radio therapy, they stop the substitution with thyroid hormones and serum TSH levels are $>50 \mu\text{UI/ml}$.

For the determination of total homocysteine, we used an enzyme immunoassay (DRG International, Inc USA). In addition, serum cholesterol level was also determined for all the patients (Cobas Mira automated analyzer).

We found that 67% of these patients had significantly high serum tHcy values if compared with the control ($p<0.01$). Between them, 5 patients (39 %) had the concentration between $15\text{--}20 \mu\text{mol/l}$ and 8 patients (32%) had $\text{tHcy} > 20 \mu\text{mol/l}$ (normal range is $5\text{--}15 \mu\text{mol/l}$).

Elevated concentrations of the total serum homocysteine (tHcy) in hypothyroidism could be considered as an independent risk factor of cardiovascular disease for these patients. Compared with cholesterol and its fractions determination, the total homocysteine is a more sensible parameter for the evaluation of this risk for patients with severe hypothyroidism. It could also help in the follow up of the level of therapy for severe hypothyroidism and in the prevention of the early arterioscleroses.

For our future study regarding the aging processes, the method of tHcy measuring was also applied for the determination of this molecule in the rat serum ($n=10$). We obtained reproducible results on an animal model.

Introducere

Homocisteina este un aminoacid cu grupare tiolică și care ajunge în circulație ca rezultat al proceselor metabolice de metilare. Dezechilibrele de potențial de membrană celulară pot determina hipo sau hiper acumularea homocisteinei circulante.

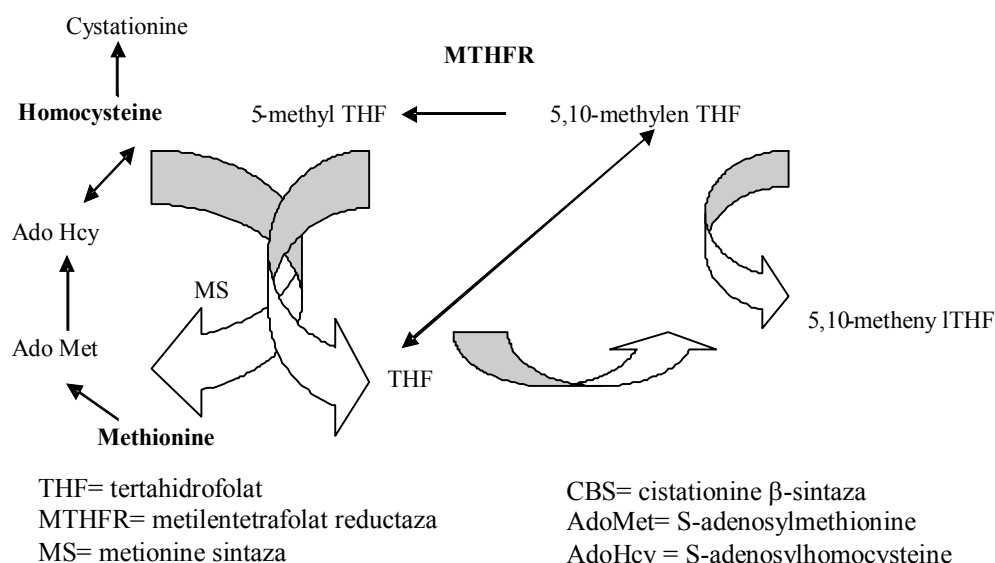
Hiperhomocisteinemia are atât cauze genetice, la nivelul enzimelor implicate în metabolismul ei (MTHFR), cât și cauze dobândite (deficiența de vitamine, interferența cu unele medicamente, cum ar fi antiepilepticele și altele). Valori ridicate s-au evidențiat și la pacienți cu retard mental, în arteroscleroza timpurie și în tromboembolism arterial și venos.

Studiile epidemiologice au evidențiat că nivelul crescut de homocisteină este un factor de

risc în bolile cardiovasculare și cerebrale și totodată este implicat în accelerarea proceselor de îmbătrânire.

Studiul de față a avut ca scop:

- Evaluarea nivelului de homocisteină serică totală (tHcy) la un lot de pacienți cu neoplasm tiroidian, operați și tratați cu ^{131}I . Înainte de tratament și pe durata radioterapiei, pacienții întrerup substituția cu hormoni tiroidieni, deci pot fi considerați ca un lot de pacienți cu hipotiroidism "indus".
- Corelarea concentrației de homocisteină cu alți factori biochimici de risc cardio-vascular (colesterolul).
- Testarea metodei de dozare a homocisteinei serice totale pe un lot de șobolani tineri ($n=10$) în vederea studiilor viitoare privind implicarea acestui metabolit ca marker în procesele de îmbătrânire.



I. Metabolismul homocisteinei (tHcy)

MTHFR este enzima modificată genetic și anume, în nucleotidul 677 are loc substituția Ala cu Val

La nivelul celulelor endoteliale, creșterea concentrației de tHcy are următoarele efecte:

- Induce o activare a endotelială a factorului V;
- Reduce producția endotelială de activator al proteinei C;
- Produce dezechilibre oxidative (*in vitro*);
- Toate acestea determină disfuncția endotelului, care este prima etapă în apariția leziunilor aterosclerotice.

Un studiu efectuat în Țările de Jos a arătat că frecvența în populația generală a hiperhomocistenemiei este la:

HOMOZYGOTI	TT	între	12-21 %
HETEROZYGOTI	CT	de	35 %.

În România, astfel de studii populaționale nu există.

II. Loturile

LOTUL de pacienți cu hipotiroidism “indus” (n=18): a inclus 18 pacienți cu neoplasm ti-

roidian (Ak tiroidian), operați și tratați cu ^{131}I , 4 femei și 14 bărbați, cu vârsta cuprinsă între 27 și 62 de ani. Ei au fost internați în secția de Medicină Nucleară a Institutului de Endocrinologie “C.I. Parhon” din București în vederea administrării dozei terapeutice de radioiod. Pentru a primi acest tratament, pacienții întrerup, cu 4 săptămâni înainte de internare, substituția cu Euthyrox (tyroxina), devenind astfel hipotiroidieni “indus”.

LOTUL MARTOR (n=6): a inclus 6 pacienți cu sindrom de ovar polichistic (SOPC) cu vârsta cuprinsă între 25-42 ani. În literatură nu s-a semnalat o modificare a nivelului homocisteinei serice în SOPC.

MODELUL ANIMAL (n=10): în vederea studiilor viitoare privind implicarea acestui metabolit ca marker în procesele de îmbătrânire, s-a efectuat dozarea de homocisteina pe ser provenit de la 10 de șobolani tineri (în vârstă de 3 luni).

III. Materiale și metode

Metoda de dozare a homocisteinei

Pentru dozarea homocisteinei serice totale s-a folosit metoda ELISA (prin competiție) în fază solidă, cu dublu anticorp monoclonal (DRG

N	Vârsta (ani)	Media (tHcy)	SD	Domeniu
6	20-35	7,9	2,46	5,44-10,36

Tabelul 1. Valoarea t Hcys serice ($\mu\text{mol/l}$)

International, Inc USA). Înainte de efectuarea dozării imunometrice, homocisteina totală (legată proteic) este redusă la homocisteină liberă (Hcy) și, apoi prin conversie enzimatică, este transformată în S-adenosyl-L-homocysteina (SAH).

Reacția de reducere:

Prot-SS-Hcy ---- DTT-----> Hcy.

Reacția de conversie enzimatică:

Hcy + Ad -----SAH-Hydrolase-----> SAH + H₂O.

Sensibilitatea metodei este de 1 $\mu\text{mol/l}$.

Domeniul de măsurare este între 2-50 $\mu\text{mol/l}$ mol/l.

Valorile normale: 5-15 $\mu\text{mol/l}$.

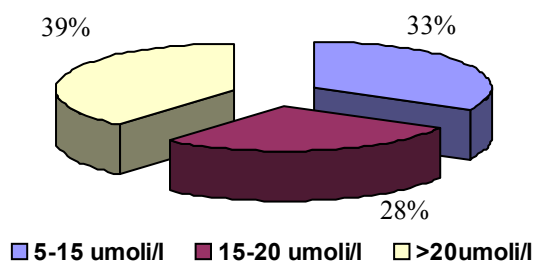
Probele de sânge: recoltarea s-a făcut pe gheață, probele de sânge au fost imediat centrifugate, iar serul a fost porționat și păstrat la - 20° C, până la efectuarea dozării.

Metoda de dozare a colesterolului seric

S-a utilizat metoda colorimetrică pe autoanalizorul de chimie clinică Cobas MIRA (Roche Diagnostic, cu truse Hoffman la Roche).

Metoda de dozarea TSH-ului seric

TSH-ul seric s-a determinat prin tehnica de chemiluminiscență, utilizând analizorul automat ACS (Bayer).

Figura 1. Variația concentrației tHcy la pacienții cu Ak Thyroid în tratament cu ¹³¹I (n=18)**IV. Rezultate****LOTUL MARTOR (SOPC)**

Se observă că pentru lotul martor s-a obținut cu această metodă o valoare medie a homocisteinei serice totale de 7.9 ± 2.46 ($\mu\text{mol/l}$).

LOTUL Hipotiroidism "indus"

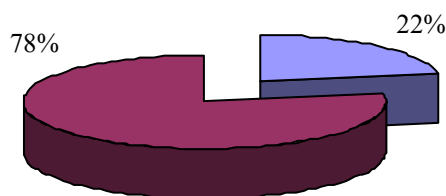
La toți pacienții din lotul cu adenocarcinom tiroidian operat (Ak tiroidian) s-a determinat prin chemiluminiscență concentrația de TSH și la tot lotul s-au găsit valori TSH > 50 $\mu\text{U/ml}$, astfel încât s-a confirmat diagnosticul de hipotiroidism "indus".

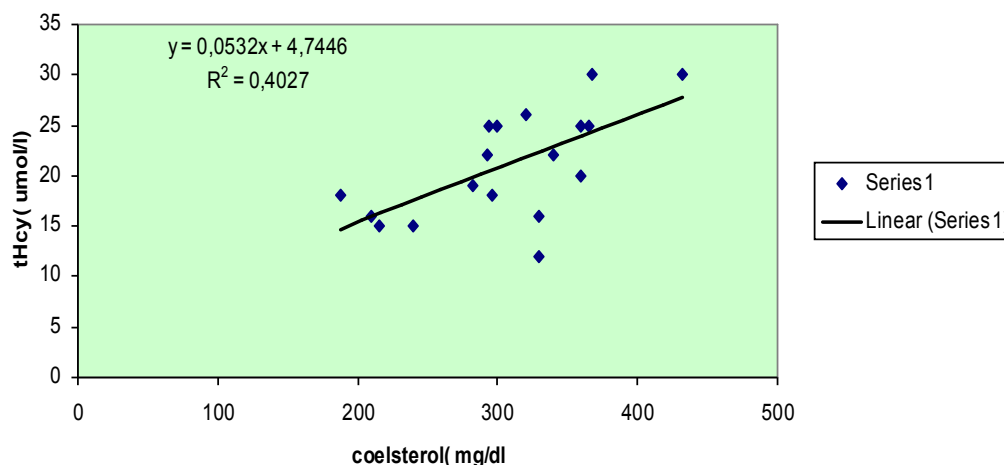
La 67% dintre pacienți, s-au găsit valori semnificativ mai mari decât ale lotului martor ($p < 0.01$). Dintre aceștia, 5 pacienți (39%) au avut concentrația de tHcy cuprinsă între 15-20 $\mu\text{mol/l}$ și 8 pacienți (32%) au avut concentrația de tHcy > 20 $\mu\text{mol/l}$ (domeniul de normalitate al metodei fiind 5-15 $\mu\text{mol/l}$). Valoarea medie a homocisteinei la lotul studiat a fost 17.69 ± 5.93 ($\mu\text{mol/l}$).

La 15 dintre pacienții internați (78 %) s-au găsit valori ale colesterolului seric mai mare ca 220 mg/ml. Valoarea medie a colesterolului la lotul studiat a fost 306.7 ± 63.2 mg/ml. Aceste rezultate au fost în corelație pozitivă cu valorile crescute de homocisteină ($R^2 = 0.40$).

LOTUL de șobolani (n=10):

S-au obținut valori reproductibile ale concentrației de homocisteină la un lot de 10 șobolani tineri (vârsta de 3 luni), cu o valoare medie de 5.6 ± 0.23 $\mu\text{mol/l}$ și un CV de 5,5 %.

Figura 2. Colesterolul seric la pacienții cu Ak Thyroid în tratament cu ¹³¹I (n=18)



Figură 3. Corelația între tHcy serică și colesterol la pacienții cu Ak Thy în tratament cu ^{131}I (n=18)

V. Discuții

La pacienții cu neoplasm tiroidian operat (Ak tyr), în timpul tratamentului cu radioiod (^{131}I), s-a găsit că 67 % din pacienți au avut concentrația de tHcy $>15\mu\text{mol/l}$, dintre care 39% au avut concentrația de tHcy $>20\mu\text{mol/l}$.

La aceștia, deși 78 % au avut valori mari de colesterol seric, corelația cu homocisteina este slabă ($r = 0.40$).

Concentrația crescută a homocisteinei serice totale în hipotiroidism, poate fi considerată ca un nou factor de risc cardiovascular. Homocisteina este un parametru mult mai sensibil de evaluare a riscului față de colesterol și fracțiile de colesterol seric.

Câteva studii au demonstrat valori crescute de homocisteină în hipotiroidie, cu ameliorarea acestora după administrare de tiroxina, dar fără valori modificate de colesterol seric. Mecanismele care ar putea a fi implicate sunt fie modificarea clearance-ului renal al homocisteinei, fie implicarea hormonilor tiroidieni în metabolismul folatului.

Scăderea drastică a homocisteinei (până la $2-5\mu\text{mol/l}$) după tratamentul cu tiroxină, până la supresarea nivelului de TSH ($< 0.01\text{ uUI/ml}$), este suficientă pentru a scădea riscul cardiovascular.

Față de colesterol și fracțiile de colesterol seric, homocisteina este un parametru mult mai sensibil de evaluare a riscului cardiovascular la pacienții cu hipotiroidism. Determinarea concentrației de acid folic ca stabilizator al activității metilen tetra hidrofolat reductazei, în paralel cu cea de homocisteină, ar putea aduce noi informații privind mecanismele de metilare în procesele de îmbătrânire. De asemenea, ar ajuta la monitorizarea terapiei hipotiroidismului și, în același timp, la prevenirea apariției timpurii a aterosclerozei.

N	Vârsta	X (tHcy)	SD	CV
10	3 luni	5,66	0,23	5,5

Tabelul 2. Valoarea tHcy serice ($\mu\text{mol/l}$) (ELISA) la lotul de șobolani

Bibliografie

1. Boushey CJ, Beresford S A, Omenn gS, Motulsky A G : Quantitativ assessment of plasma momocystein as a risk factor for vascular disease, JAMA, 1995;2
2. Perry I J, Refsum H, Morris RW Ebrahim SB, Ueland PM, Shaper AG. Prospectiv study of serum total homocysteine concentration and risk of stroke in middle- aged British men. The Lacet 1995;346:1395-98
3. Ubbkin JB, Vermaak WJ hayward, van der merwe A, becker PJ. The effect of bloodsample aging and food consupction on plasma total homocysteine levels. Clinica chmica Acta, 1992;207:119-128
4. Mudd SH, levy HL, Skovby F. The metabolic basis of inherited disease, New York; McGraw-Hill, 1995:1297-1327
5. Clarke R , Daly L, Robinson K, Naughten E, Cahalane S, Fowler B, Graham I Hyperhomocysteinemia: an Independent Risk Factor for Vascular Disease. N Engl J Med, 1991;324:1149-5