

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA**

Studijní program: Biomedicína

Studijní obor: Fyziologie a patofyziologie člověka



**MUDr. Věra Toušková**  
**3. interní klinika 1. LF UK a VFN**

**ÚLOHA KOMPONENT OSY GH/IGF-1 V ETIOPATOGENEZE  
METABOLICKÝCH ODCHYLEK U DIABETES MELLITUS  
2. TYPU A AKROME GALIE**

**The role of GH/IGF-1 axis components in the etiopathogenesis of  
metabolic disturbances in type 2 diabetes mellitus and acromegaly**

**Dizertační práce**

**Školitel:** prof. MUDr. Martin HALUZÍK, DrSc.  
ÚLBD, 1. LF UK a VFN a Endokrinologický ústav

Praha 2016

## **OBSAH**

<b>PODĚKOVÁNÍ</b> .....	6
<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK</b> .....	7
<b>ABSTRAKT (CZ)</b> .....	12
<b>ABSTRAKT (EN)</b> .....	13
<b>1. ÚVOD</b> .....	14
<b>2. KOMPONENTY OSY GH/IGF</b> .....	16
2.1 Komponenty osy GH/IGF.....	16
2.1.1 GH, GH-R, GHBP.....	16
2.1.2 IGF-1 a IGF-1R/INS-R.....	18
2.1.2.1 Faktory ovlivňující sérové koncentrace IGF-1.....	20
2.1.3 IGF-2.....	21
2.1.4 IGF-vazebné proteiny, IGFBPs.....	21
2.2 Vzájemné regulace GH/IGF-1 komponent.....	22
2.2.1 Inzulin a GH/IGF-1 komponenty.....	22
2.2.2 GH regulace IGF-1 v séru.....	23
2.2.3 GH/IGF-1 regulace IGF-1 mRNA exprese.....	24
2.2.4 GH/IGF-1 regulace IGF-1R.....	25
2.2.5 GH/IGF-1 regulace GH-R/GHBP.....	26
2.2.6 GH/IGF-1 regulace IGFBPs.....	27
2.2.7 IGFBP regulace GH/IGF-1 komponent.....	29
2.3 Signalizace GH-GHR a IGF-1-IGF-1R.....	29
2.3.1 Signalizace IGF-1/inzulinu a její význam.....	29
2.3.2 Signalizace GH a její význam.....	30
<b>3. AKROME GALIE</b> .....	33
<b>4. ÚLOHA KOMPONENT OSY GH/IGF-1 V METABOLISMU GLUKÓZY A PŘI VZNIKU INZULINOVÉ REZISTENCE</b> .....	35
4.1 GH, GH-R/GHBP a inzulínová rezistence.....	35
4.1.1 Tuková tkáň.....	36
4.1.2 Játra.....	37
4.1.3 Kosterní sval.....	37
4.1.4 GH a příznivý účinek na metabolismus glukózy a inzulínovou rezistenci.....	39
4.1.5 GHBP a inzulínová rezistence.....	39

4.2	IGF-1 a jeho metabolické účinky.....	39
4.2.1	Význam lokální exprese IGF-1 ve vztahu k diabetu.....	40
4.2.2	Diabetes a hladiny IGF-1.....	41
4.3	IGF-2 a glukózový metabolismus.....	42
4.4	IGF-1R a glukózový metabolismus.....	43
4.5	IGFBP-1 a glukózový metabolismus.....	44
4.5.1	Asociace mezi snížením IGFBP-1 a poruchou glukózové homeostázy.....	45
4.5.2	Asociace vysokých hladin IGFBP-1 a inzulínové rezistence.....	45
4.6	IGFBP-2 a glukózový metabolismus.....	46
4.7	IGFBP-3 a glukózový metabolismus.....	48
4.8	Regulace IGF komponent hladinou glukózy.....	49
<b>5. VÝZNAM P85ALPHA PODJEDNOTKY PI3K V METABOLISMU GLUKÓZY</b>		
<b>A PŘI VZNIKU INZULINOVÉ REZISTENCE.....</b>		
5.1	Podjednotky PI3K.....	50
5.2	Interakce p85alpha s ostatními molekulami inzulínové signální kaskády.....	51
5.3	Mechanismy přímého negativního účinku p85alpha na signální dráhu PI3K/Akt.....	51
5.4	Mechanismy nepřímého negativního účinku p85alpha na signální dráhu PI3K/Akt.....	52
5.5	Vliv změn exprese p85alpha na inzulínovou/IGF-1 signalizaci-experimentální studie.....	53
5.6	Vliv inzulínové rezistence na expresi p85alpha-experimentální i klinické studie.....	55
5.6.1	Zvýšená bazální hladina exprese p85alpha u inzulínové rezistence.....	55
5.6.2	Snížená bazální hladina exprese p85alpha u inzulínové rezistence.....	55
5.6.3	Vliv akutní stimulace inzulínem na expresi p85alpha.....	56
5.7	GH regulace p85alpha exprese a vztah k inzulínové rezistenci.....	56
<b>6. VÝZNAM KOMPONENT OSY GH/IGF-1 PRO TUKOVOU TKÁŇ.....</b>		
6.1	GH/GH-R/GHBP a tuková tkáň.....	57
6.1.1	GH a jeho úloha v adipogenezi.....	57
6.1.2	Vliv účinku GH na množství tukové tkáně.....	58
6.1.3	Paradoxní „insulin-like“ účinek GH.....	59
6.1.4	Stimulace lipolýzy.....	60
6.1.5	Další mechanismy účinku GH na tukovou tkáň.....	62

6.1.6	Lokální diverzita účinků GH na tukovou tkáň.....	63
6.1.7	GHBP a tuková tkáň.....	63
6.2	IGF-1 a tuková tkáň.....	64
6.2.1	IGF-1 a diferenciacie adipocytů-experimentální studie.....	64
6.2.2	IGF-1 a tuková tkáň-klinické studie.....	65
6.3	IGF-2 a tuková tkáň.....	65
6.4	IGF-1R a INS-R a adipogeneze.....	66
6.5	IGFBP-1 a tuková tkáň.....	67
6.6	IGFBP-2 a tuková tkáň.....	67
6.7	IGFBP-3 a tuková tkáň.....	69
<b>7.</b>	<b>KOMPONENTY OSY GH/IGF-1 A ZÁNĚT.....</b>	<b>70</b>
7.1	Patofyziologie subklinického zánětu u obezity a diabetes mellitus 2. typu.....	70
7.2	Úloha GH/IGF-1 v imunitním systému.....	72
7.2.1	GH/IGF-1 a imunitní buňky-stimulace proliferace a diferenciacie.....	73
7.2.2	Stimulační (nepříznivé) účinky GH na zánět.....	74
7.2.3	Inhibiční (příznivé) účinky GH na zánět.....	75
7.2.4	Stimulační (nepříznivé) účinky IGF-1 na zánět.....	76
7.2.5	Inhibiční (příznivé) účinky IGF-1 na zánět.....	76
7.2.6	IGFBP-3 a protizánětlivý a antiproliferační vliv na imunitní buňky.....	77
7.3	Inhibiční vliv zánětu na osu GH/IGF-1.....	79
7.3.1	Obezita a komponenty osy GH/IGF-1.....	80
7.3.2	Vliv zánětu na IGFBPs.....	81
<b>8.</b>	<b>VLIV KALORICKÉ RESTRIKCE NA KOMPONENTY OSY GH/IGF-1.....</b>	<b>82</b>
8.1	Vliv kalorické restriktce/lačnění na GH/IGF-1 komponenty.....	82
8.1.1	Experimentální studie-sérové hladiny i exprese.....	82
8.1.2	Klinické studie-sérové hladiny.....	83
8.1.3	Snížení IGF-1 po kalorické restrikci jako protinádorový mechanismus....	84
8.2	Vliv zvýšeného kalorického příjmu na GH/IGF-1 komponenty.....	84
<b>9.</b>	<b>HYPOTÉZA A CÍLE PRÁCE.....</b>	<b>86</b>
<b>10.</b>	<b>METODIKA STUDIE.....</b>	<b>88</b>
10.1	Vyšetření antropometrických, biochemických a hormonálních parametrů.....	88
10.2	Biopsie podkožní tukové tkáně.....	88
10.3	Izolace krevních monocytů.....	89
10.4	Stanovení exprese mRNA.....	89

10.5 Nízkokalorická dieta (VLCD-very-low-calorie diet).....	90
10.6 Statistická analýza dat.....	90
<b>11. VLASTNÍ VÝSLEDKY</b> .....	<b>92</b>
11.1 Sérové koncentrace a tkáňová mRNA exprese komponent osy IGF-1 u žen s diabetem 2. typu a obezitou: vliv nízkokalorické diety.....	92
11.2 Možná úloha změn lokální mRNA exprese komponent osy GH/IGF-1/inzulin v podkožní tukové tkáni v metabolických odchylkách u pacientů s akromegalií.....	93
<b>12. DISKUZE</b> .....	<b>95</b>
<b>13. ZÁVĚR A SHRNU TÍ VÝSLEDKŮ PRÁCE</b> .....	<b>103</b>
<b>14. LITERATURA</b> .....	<b>107</b>
<b>15. PŘÍLOHY</b> .....	<b>146</b>
15.1 Prohlášení autora.....	146
15.2 Identifikační záznam.....	146
15.3 Plné texty vlastních publikací tvořících poklady dizertační práce.....	147

## **PODĚKOVÁNÍ**

Tato práce vznikla v rámci doktorského studijního programu v biomedicině na 3. interní klinice 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze. Úvodem bych chtěla vyjádřit velké poděkování především mému školiteli prof. MUDr. Martinu Haluzíkovi, DrSc. za vedení a pomoc během celého studia a za podněty při vypracování doktorské dizertační práce. Zároveň bych chtěla poděkovat prof. MUDr. Štěpánu Svačinovi, DrSc., MBA, který mi jako přednosta 3. interní kliniky 1. LF UK a VFN vytvořil vynikající podmínky k postgraduálnímu studiu a k mé práci. Děkuji také našim laborantkám paní Jitce Jahodové a Renatě Pavlovičové za laboratorní zpracování vzorků, RNDr. Zdeně Lacinové za statistickou analýzu a v neposlední řadě Mgr. Janě Kloučkové a MUDr. Miloši Mrázovi, PhD. za pomocné konzultace. Všem výše uvedeným děkuji za velice přátelský přístup během mého postgraduálního studia.

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK:

AC	akromegalici
ADD1	adipocyte determination and differentiation-dependent factor 1
AdipoR	receptor pro adiponektin
AIDS	získaný imunodeficitní syndrom (acquired immunodeficiency syndrome)
Akt	proteinkináza Akt (proteinkináza B)
ALS	kyselá labilní podjednotka (acid labile subunit)
AMP	adenosin monofosfát
AMPK	AMP-aktivovaná proteinkináza
ANOVA	analýza rozptylu (analysis of variance)
Anti-IGF-1	protilátka proti IGF-1
aP2	adipocytární lipidový vazebný protein
APC (Min) myši	myši s mutací Apc genu (Min-multiple intestinal neoplasia)
AS160	Akt 160kDa substrát (Akt substrate of 160 kDa)
ATGL	lipáza triglyceridů tukové tkáně (adipose tissue triglyceride lipase)
BFMI	berlínské obézní inbrední myši (Berlin Fat Mouse Inbred)
bGH	bovinní GH
BH doména	Bcl-2 homologní doména
BMI	index tělesné hmotnosti (body mass index)
C	kontrolní skupina
CBP	vazebný protein CREB (CREB-binding protein)
C/EBP $\alpha$	vazebný protein $\alpha$ CCAAT enhanceru (CCAAT/enhancer-binding protein $\alpha$ )
<i>c-fos</i>	Finkel-Biskis-Jenkins osteosarcoma
CIDEA	cell death-inducing DFFA (DNA-fragmentation-factor)-like effector a
Cis	protein obsahující SH2 doménu indukibilní cytokiny (cytokine-inducible SH2-domain-containing protein)
CHS	Cardiovascular Health Study
CMIA	chemiluminescentní mikročásticová imunnoassay technologie
CREB	vazebný protein cAMP responsivního elementu (cAMP response element binding protein)
CRH	corticotropin releasing hormone
DAG	diacylglycerol
<i>db/db</i>	diabetické (myši)
DEXA	duální dvouenergieová absorpciometrie (dual-energy X-Ray absorptiometry)
DFFA	DNA-fragmentation-factor
DM2	diabetes mellitus 2. typu
<i>dw/dw</i>	dwarf (zakrslý)
4EBP1	vazebný protein-1 eukaryotického translačního iniciačního faktoru 4E (eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1)
EDTA	ethylendiamin tetraoctová kyselina
EGF	epidermální růstový faktor (epidermal growth factor)
eIF2B	iniciační faktor 2B syntézy eukaryotického proteinu (eukaryotic protein synthesis initiation factor 2B)
eIF4P	eukaryotický iniciační faktor 4P
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay

ERK1/2	extracelulárním signálem regulované kinázy 1/2 (extracellular signal regulated kinases 1/2 )
FaGHRKO	vyřazení GH-R v tukové tkáni (Fat GH-R knockout)
FAS	syntáza mastných kyselin (fatty acid synthase)
FasL	Fas ligand
FoxO	forkhead box O
GDM	gestační diabetes mellitus
GH	růstový hormon (growth hormone)
GHA	GH antagonistické myši (GH antagonist)
GHBP	GH vazebný protein (GH binding protein)
GH-R	receptor růstového hormonu (growth hormone receptor)
GHRE/GAS	GH-respovivní elementy/ gamma-aktivovaná místa (GH response elements/gamma-activated sites)
GH-R-KO	vyřazení genu GH-R (GH-R knockout)
GH-R (-/-)	vyřazení genu GH-R
GHRH	GH-releasing hormone
GH-Rtr	zkrácená forma receptoru růstového hormonu (truncated GH-R)
GK	Goto Kakizaki
Glc	glukóza
GLP-1	glukagonu podobný peptid-1 (glucagon-like peptide-1)
GLUT	glukózový transportér
GPDH	glycerol-3-fosfát dehydrogenáza
Grb-2	vazebný protein receptoru pro růstový faktor-2 (growth factor receptor binding protein-2)
GSK-3 $\beta$	kináza-3 $\beta$ glykogen syntázy
GTP	guanosin trifosfát
HAEC	lidské aortální endotelové buňky (human aortic endothelial cells)
HDL	lipoprotein s vysokou denzitou (high-density lipoprotein)
HepG2 buňky	jaterní G2 buňky
HFD	vysokotuková dieta (high fat diet)
hGH	lidský GH (human GH)
HIF-1 $\alpha$	hypoxií inducibilní faktor 1 $\alpha$ (hypoxia-inducible-factor-1 $\alpha$ )
hIGFBP	lidský IGFBP (human IGFBP)
HIV	human immunodeficiency virus
HL	jaterní lipáza (hepatic lipase)
HOMA-index	homeostasis model assessment-index
HPLC	vysokovýkonná kapalinová chromatografie (high performance liquid chromatography)
hsCRP	vysoce senzitivní C-reaktivní protein (high-sensitivity C-reactive protein)
HSD1	hydroxysteroid-dehydrogenáza-1
HSL	hormon senzitivní lipáza
Hx	hypofyzektomie
ICAM-1	intercelulární adhezní molekula-1 (intercellular adhesion molecule-1)
IDL	lipoprotein se střední denzitou (intermediate-density lipoprotein)
IFN $\gamma$	interferon $\gamma$
IGF	inzulinu podobný růstový faktor (insulin-like growth factor)
IGF-1R	receptor inzulínu podobného růstového faktoru-1
IGF-2R	receptor inzulínu podobného růstového faktoru-2



IGF-1R-KO	vyřazení genu pro receptor inzulinu podobného růstového faktoru-1 (IGF-1R knockout)
IGFBP, IGFBPs	IGF-vazebný protein (IGF-binding protein)
IGFBP-3 PA	IGFBP-3 proteolytická aktivita
IGFBP-3R	receptor pro IGFBP-3
IGFBP-rPs	příbuzné peptidy IGF-vazebných proteinů (IGF-binding protein related peptides)
IGF-1R <sup>ap2Cre</sup> myši	myši s vyřazením IGF-1R v tukové tkáni
IKK-β	kinázy I-KappaB
IL	interleukin
IL-1Ra	antagonista receptoru pro interleukin-1 (interleukin-1 receptor antagonist)
INS-R	inzulinový receptor
INS-R-KO	vyřazení genu pro inzulinový receptor (INS-R knockout)
IRMA	Immunoradiometric Assay
IRS	inzulinový receptorový substrát (insulin receptor substrate)
IUGR	intrauterinní růstová retardace (intrauterine growth retardation)
JAK	Janus kináza
JNK	c-Jun N-terminální kináza
LBM	lean body mass (beztuková tělesná hmota)
LDL	lipoprotein s nízkou denzitou (low-density lipoprotein)
LiGHRKO	vyřazení GH-R v játrech (Liver GH-R knockout)
<i>Lit/lit</i>	malý (little)
LPL	lipoproteinová lipáza
LPS	lipopolysacharid
MacGH-R-KO	vyřazení genu pro GH-R na makrofázích (Macrophage GH-R knockout)
MAPK	mitogenem aktivovaná proteinkináza (mitogen-activated protein kinase)
MCP1	monocytární chemoatrakční protein-1 (monocyte chemoattractant protein-1)
MEK	MAPK/ERK kináza
mGH	myší GH (murine GH)
mGHRKO	vyřazení GH-R ve svalu (muscle GH-R knockout)
MK	mastné kyseliny
MGLL	lipáza monoglyceridů (monoglyceride lipase)
mTOR	mammalian target of rapamycin
NAMPT	nikotinamid fosforibosyltransferáza (nicotinamide phosphoribosyltransferase) (visfatin)
NFκB	nukleární faktor kappa B (nuclear factor kappa B)
NK buňky	přirození zabíječi (natural killer cells)
Nrf2 (NFE2L2)	Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2
NSILA	nesupresibilní inzulinu podobná aktivita (nonsuppressible insulin-like activity)
OB	obézní skupina
<i>ob/ob</i>	obézní (myši)
P	fosfát
p85alpha	p85alpha regulační podjednotka fosfatidylinositol-3-kinázy
p70S6K	kináza ribozomálního proteinu 70S6
p90rsk	90kDa ribozomální S6 kináza (90 kDa ribosomal S6 kinase)
PKD-1	fosfatidylinositol-dependentní kináza-1 (phosphoinositide dependent kinase-1)

PEPCK	fosfoenolpyruvát karboxykináza (phosphoenolpyruvate carboxykinase)
PH doména	Pleckstrin Homology domain
PHP-HL	postheparinová plazmatická (aktivita) HL (postheparin-plasma HL)
PI3K	fosfatidylinositol-3-kináza
Pik3r1	izoforma p85alpha genu
PM	periferní monocyty
PIP2	fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát
PIP3	fosfatidylinositol-3,4,5-trifosfát
PKB	proteinkináza B
PKC	proteinkináza C
PNPLA3	patatin-like phospholipase domain containing protein-3 (adiponutrin)
PPAR	receptor aktivovaný peroxisomovými proliferátory (peroxisome proliferator-activated receptor)
PRL	prolaktin
PTEN	Phosphatase and Tensin Homolog (fosfatáza)
Rab	G-protein z rodiny Ras monomerních G-proteinů (Ras superfamily of monomeric G-proteins)
Raf	serin/threonin proteinkináza (Rapidly accelerated fibrosarcoma)
Ras	Ras protein (Rat sarcoma)
Reg genu	skupina regeneračních genů (regenerating family member)
rhGH	rekombinantní lidský GH (recombinant human GH)
rhIGF-1	rekombinantní lidský IGF-1 (recombinant human IGF-1)
RIA	radioimmunoassay
rIGF-1	rekombinantní IGF-1
rIGFBP-2	rekombinantní IGFBP-2
ROP	experimentální model myši náchylných ke glomeruloskleróze (glomerulosclerosis-prone ragged, oligosyndactylism, pintail)
RT PCR	real time polymerase chain reaction
RXR $\alpha$	retinoidní X receptor $\alpha$ (retinoid X receptor $\alpha$ )
SCAT	podkožní tuková tkáň (subcutaneous adipose tissue)
SEM	střední chyba průměru (standard error of the mean)
SGA	small for gestational age
SH	Src homologní doména (Src homology domain)
SHC	protein obsahující Src homologní doménu-2 (Src homology 2 domain-containing)
SHIP	Study of Health in Pomerania
SHP	Src homologní protein-tyrosin-fosfatáza (Src homology phosphatase)
SIGFRKO	vyřazení IGF-1R na somatotropních buňkách hypofýzy (somatotroph IGF-1R knockout)
Smad	kombinace MAD (mothers against decapentaplegic) a proteinu SMA (gen <i>sma</i> pro small body size)
SOCS	supresory cytokinové signalizace (suppressors of cytokine signalling)
SOS	son of sevenless protein
Src	proteinkináza (odvozeno od „sarcoma“)
SREBP	sterol regulatory element-binding protein
STATs	signální transducery a aktivátory transkripce (signal transducers and activators of transcription)
STZ	streptozotocin
T2DM	diabetes mellitus 2. typu (type 2 diabetes mellitus)
Tg	triacylglyceroly

TGF $\beta$	transformující růstový faktor $\beta$ (transforming growth factor $\beta$ )
Thr308	threonin 308
TLR	toll-like receptor
TNF $\alpha$	tumor nekrotizující faktor $\alpha$ (tumor necrosis factor $\alpha$ )
UCP1	uncoupling protein-1
VCAM-1	adhezní molekula cévních buněk-1 (vascular cell adhesion molecule-1)
VEGF	vaskulární endotelový růstový faktor (vascular endothelial growth factor)
VHL	von Hippel-Lindau
VLCD	nízkokalorická dieta (very-low-calorie diet)
VLDL	lipoprotein s velmi nízkou denzitou (very-low-density lipoprotein)
XBP-1	X-box-vazebný protein-1
YKL-40	reaktant akutní fáze (také Chitinase-3-like protein 1 (CHI3L1))

## **ABSTRAKT (CZ)**

Komponenty osy GH/IGF-1 (růstový hormon (GH), receptor růstového hormonu (GH-R), inzulinu podobný růstový faktor-1 (IGF-1), IGF-1 receptor (IGF-1R), IGF-vazebné proteiny (IGFBPs)) hrají úlohu v regulaci glukózového metabolismu, zánětlivých pochodů stejně jako v proliferaci a diferenciaci buněk včetně adipocytů i monocytů. Cílem předkládané práce bylo prozkoumat úlohu lokálních změn mRNA exprese komponent osy GH/IGF-1 v podkožní tukové tkáni a periferních monocytech (PM) při rozvoji inzulinové rezistence a v regulaci obsahu tukové tkáně v organizmu u těchto skupin pacientů: u obézních subjektů s a bez přítomnosti diabetes mellitus 2. typu a u neléčených akromegaliků.

V našich studiích jsme zkoumali celkem 66 subjektů, a to pacientky obézní bez diabetu 2. typu (OB), obézní diabetičky 2. typu (DM2), neléčené akromegaliky (AC) a zdravé kontrolní subjekty s normální hmotností (C). U obézních diabetiček byla provedena intervence zahrnující 2 týdny nízkokalorické diety (VLCD (very-low-calorie diet)-energetický obsah 2500 kJ/den).

Dle našich výsledků se domníváme, že snížená mRNA exprese IGF-1, IGF-1R, IGFBP-2 a IGFBP-3 v tukové tkáni u obézních diabetiček 2. typu by mohla přispívat ke změnám diferenciační kapacity tukové tkáně a že zvýšená mRNA exprese IGF-1R v periferních monocytech těchto pacientek by mohla hrát úlohu v regulaci subklinického zánětu periferními monocyty. Zvýšení IGFBP-2 v séru i v tukové tkáni a zvýšení IGFBP-3 v periferních monocytech po VLCD u těchto subjektů by mohlo přispívat k metabolickému zlepšení po této intervenci.

U pacientů s neléčenou akromegalií jsme v podkožní tukové tkáni zjistili GH stimulované zvýšení IGF-1 a IGFBP-3 mRNA exprese, u které jsme neprokázali nezávislý vztah k množství celkového nebo trunkálního tuku ani k HOMA-indexu (homeostasis model assessment). IGFBP-3 by však mohl mít lokální regulační úlohu při ovlivnění inzulinové senzitivity v podkožní tukové tkáni.

**Klíčová slova:** diabetes mellitus 2. typu – subklinický zánět - tuková tkáň - inzulinová rezistence – akromegalie – komponenty osy GH/IGF-1 — nízkokalorická dieta

## **ABSTRACT (EN)**

GH/IGF-1 axis components (GH, growth hormone receptor (GH-R), IGF-1, IGF-1 receptor (IGF-1R), IGF-binding proteins (IGFBPs)) participate in the control of glucose metabolism, inflammatory processes as well as cell proliferation and differentiation, including adipocytes and monocytes. The aim of the present study was to evaluate the role of local mRNA expression of GH/IGF-1 axis components in subcutaneous adipose tissue (SCAT) and peripheral monocytes (PM) in the development of insulin resistance and differences of adipose tissue mass in following groups of patients: obese females with and without type 2 diabetes mellitus and subjects with active untreated acromegaly.

A total number of 66 subjects were included in the study: obese females without type 2 diabetes mellitus (OB), obese females with type 2 diabetes mellitus (T2DM), acromegalic patients (AC) and healthy lean control subjects (C). T2DM underwent 2 weeks of very-low-calorie diet (VLCD – energy content 2500 kJ/day).

According to our results we suggest that decreased mRNA expression of IGF-1, IGF-1R, IGFBP-2 and IGFBP-3 in adipose tissue of T2DM subjects may contribute to changes of fat differentiation capacity and the increased IGF-1R mRNA expression in peripheral monocytes in these patients may play a role in the regulation of subclinical inflammation by peripheral monocytes. The increase of SCAT and circulating IGFBP-2 and of IGFBP-3 in PM after VLCD in these subjects may participate in metabolic improvements after this intervention. In SCAT of acromegalic patients we found GH-stimulated increase of IGF-1 and IGFBP-3 mRNA expression, that was not independently associated with percentage of whole body or truncal fat or with HOMA-index (homeostasis model assessment). However, IGFBP-3 may still have a local effect in the regulation of insulin sensitivity in adipose tissue in acromegaly.

**Keywords:** type 2 diabetes mellitus – subclinical inflammation – adipose tissue – insulin resistance – acromegaly – GH/IGF-1 axis components – very-low-calorie diet

## 1. ÚVOD

Neustále narůstající prevalence diabetu 2. typu spojeného s obezitou znepokojuje lékařské řady a podněcuje výzkumníky k hlubšímu studiu etiopatogeneze tohoto onemocnění a jeho dalšího možného ovlivnění jak na úrovni léčby, tak prevence. Z širokého výzkumného pole diabetu a jeho patofyziologie je známo, že jeden z hlavních patofyziologických mechanismů vedoucích k onemocnění diabetem představuje **inzulinová rezistence** a že zásadní roli v jejím rozvoji hraje tzv. **subklinický zánět** vznikající v tukové tkáni obézního jedince, potažmo diabetika. Dochází při něm k interakci mezi tukovou tkání a monocyty původem z periferní krve a následné produkci prozánětlivých cytokinů vedoucí k **poruchám inzulinové signální kaskády** (Bourlier et Bouloumie, 2009; Xu et al., 2003). Dysfunkce tukové tkáně spojená s **poruchou diferenciací adipocytů** a následné **ektopické ukládání lipidů** je dalším možným patofyziologickým mechanismem vzniku inzulinové rezistence (Goossens, 2008).

Problematika inzulinové rezistence a jejího možného ovlivnění je relativně široce zkoumána v souvislosti s celou řadou faktorů, jako jsou adipokiny, prozánětlivé cytokiny, cytoadhezivní molekuly, myokiny, hepatokiny, inkretiny, růstové faktory a další. Nás zaujala molekula inzulinu podobného růstového faktoru-1 (IGF-1), která sdílí některé vlastnosti jak růstového hormonu (GH), tak inzulinu, tedy dvou metabolicky protichůdných hormonů. **IGF-1** je mediátorem růstových účinků GH, ale má zároveň účinky podobné inzulinu a oproti GH **zlepšuje glukózovou toleranci a inzulinovou senzitivitu** (Moses et al., 1996; Mauras et Haymond, 2005) a snižuje lipolýzu/stimuluje lipogenezi (Rajpathak et al., 2009). IGF-1 a další komponenty této osy (GH, IGF-1R, IGFBPs) mají vliv na celou řadu pochodů včetně regulace růstu, apoptózy, proliferace a diferenciací buněk (Torres Aleman, 2005), a to včetně adipocytů a monocytů, mají tedy svou roli při **adipogenezi a regulaci imunitních a zánětlivých pochodů** (Blüher et al., 2005; Wabitsch et al., 1995; Saito et al., 1996). **Komponenty osy GH/IGF-1** jsou široce zkoumány v souvislosti s **léčbou různých patologických stavů spojených s diabetem**, ať už je to příznivý vliv rekombinantního lidského IGF-1 (rhIGF-1) na složení těla a inzulinovou senzitivitu (Mauras et Haymond, 2005; Moses et al., 1996), inhibiční vliv IGFBP-1-3 (Rajkumar et al., 1999; Claudio et al., 2010; Xi et al., 2013; Nguyen et al., 2015) na nárůst tukové tkáně u obezity, vazoprotektivní a protizánětlivé vlivy IGFBP-3 u diabetické retinopatie a inzulinové rezistence (Thakran et al., 2015; Zhang et al., 2013 -B; Mohanraj et al., 2013) či protektivní vliv GH antagonistů u diabetické nefropatie (Chen et al., 1997). Blokátory IGF-1R jsou široce zkoumány v souvislosti s onkologickou léčbou (Liang et al., 2011).

Je dobře známo, že u poruch glukózového metabolismu byly zjištěny změny v sérových koncentracích komponent osy GH/IGF-1 (Rajpathak et al., 2009). **Změny tkáňové exprese v souvislosti s poruchou glukózové homeostázy** však byly na klinické úrovni zkoumány zatím spíše ojediněle.

Zájem dále prozkoumat souvislost mezi úlohou komponent osy GH/IGF-1 a inzulinovou rezistencí nás vedl k myšlence sledovat tyto vztahy u další klinické jednotky- **akromegalie**, jež je podobně jako diabetes 2. typu také doprovázená změnami hladin GH/IGF-1 komponent (Arosio et al., 2001), změnami množství tukové tkáně (Katznelson, 2009) a inzulinovou rezistencí (Rodrigues et al., 2011). V řadě různých mechanismů GH navozené **poruchy inzulinové senzitivity** (Castro et al., 2004; Smith et al., 1997) bylo zkoumáno také **GH stimulované zvýšení p85alpha** regulační podjednotky fosfatidylinositol-3-kinázy (PI3K) (p85alpha) (del Rincon et al., 2007). Naopak její snížení bylo navrženo za možnou terapeutickou strategii vedoucí ke zvýšení inzulinové signalizace (Barbour et al., 2005).

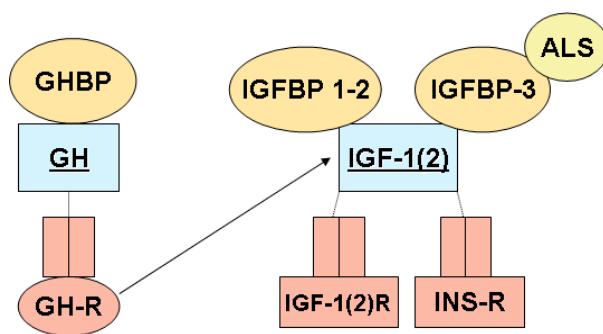
Lepší porozumění vztahů mezi lokální expesí GH/IGF-1 komponent v tukové tkáni, resp. periferních monocytech, a inzulinovou rezistencí by mohlo otevřít nové možnosti terapeutického či preventivního ovlivnění této metabolické poruchy.

## 2. KOMPONENTY OSY GH/IGF

### 2.1 Komponenty osy GH/IGF

Komponenty osy IGF představují evolučně konzervovaný systém účastníci se v regulaci buněčného růstu, diferenciace, proliferace, přežívání či apoptózy buněk, který zasahuje téměř každý orgánový systém v těle a má úlohu v patofyziologii mnoha nemocí (Rajpathak et al., 2009). Osa GH/IGF zahrnuje **GH**, **GH-R**, GH vazebný protein (**GHBP**), dva růstové faktory **IGF-1** a **IGF-2** a jejich receptory (**IGF-1R**, **IGF-2R**), 6 vazebných proteinů (**IGFBP-1-6**), IGFBP proteázy (Lelbach et al., 2005) a 9 IGFBP příbuzných peptidů (IGFBP-rPs), u nichž se však spekuluje, zda by do rodiny komponent IGF měly vůbec patřit díky absenci jasného fylogenetického vztahu mezi nimi a IGFBP-1-6 (Rodgers et al., 2008). IGFBP proteázy mohou degradovat IGFBP-1-6 na fragmenty s velice sníženou afinitou k IGF-1(2), čímž zvyšují koncentraci volného IGF (Bunn et Fowlkes, 2003). Za biologické účinky IGF-1 a vazbu s IGF-1R je zodpovědná alpha-doména IGF-1, za vazbu s INS-R beta-doména, za vazbu s IGF-2R gamma-doména a za vazbu se všemi vazebnými proteiny delta-doména (Kolychev, 2010).

*Obrázek 1: Komponenty osy GH/IGF* (ALS, kyselá labilní podjednotka; GH, růstový hormon; GHBP, GH vazebný protein; GH-R, receptor růstového hormonu; IGF-1(2), inzulínu podobný růstový faktor-1(2); IGF-1(2)R, IGF-1(2) receptor; IGFBP, IGF-vazebné proteiny; INS-R, inzulínový receptor).



#### 2.1.1 GH, GH-R, GHBP

##### GH

GH, růstový hormon, známý také jako somatotropin, je peptidový hormon sestávající ze 191 aminokyselin a dvou disulfidových můstků, který je syntetizován, skladován a secernován somatotropními buňkami v laterálních částech předního laloku hypofýzy (Lunde Jørgensen et



al., 2010). Transkripce a sekrece GH z hypofýzy je regulována a určována rovnováhou mezi GH-releasing hormonem (GHRH) a somatostatinem produkovanými neurosekrečními jádry hypothalamu. Tato rovnováha je zároveň ovlivňována řadou fyziologických stimulátorů (např. cvičením, výživou, spánkem, pohlavními hormony, stresem, hypoglykemií, lačněním, ale i příjmem proteinů vedoucím ke zvýšené hladině aminokyselin) a inhibitorů (např. hyperglykemií, GH, IGF-1, volnými mastnými kyselinami, glukokortikoidy) GH sekrece (Bartholomew et al., 2009; Lunde Jørgensen et al., 2010). Sekrece GH je stimulována také ghrelinem prostřednictvím stimulace GHRH a inhibice somatostatinu (Lunde Jørgensen et al., 2010). Somatotropní buňky syntetizují a secernují GH pulzatilním způsobem a v cirkadiánním rytmu s nejvyšším podílem sekrece během spánku (Takahashi et al., 1968).

GH má anabolické účinky, **stimuluje produkci IGF-1 v játrech**, růst, reprodukci a regeneraci buněk, má stimulační účinky také na **imunitní systém**. Je jedním ze stresových **kontraregulačních hormonů inzulínu**, zvyšuje koncentraci glukózy a volných mastných kyselin, stimuluje glukoneogenezi v játrech, lipolýzu, proteosyntézu, inhibuje syntézu glykogenu ve svalu (Ranabir et Reetu, 2011; King, 2006; Lunde Jørgensen et al., 2010).

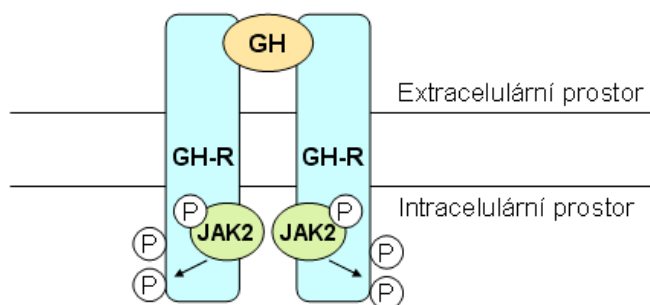
Mezi GH a inzulínem existuje zkřížená signalizace (přes inzulínový receptorový substrát (IRS)), jelikož oba mohou aktivovat dráhy PI3K/Akt (proteinkináza Akt) a ERK1/2 (extracelulárním signálem regulované kinázy 1/2) (Xu et Messina, 2009) (Obrázek 5).

### **GH-R**

GH-R je jednoduchý transmembránový glykoprotein, který patří do rodiny cytokinových receptorů, aktivující Janus kinázu-2 (JAK2) po vazbě GH (Hackett et al., 1995). GH-R je exprimován **ubikviterně**, zvláště pak v játrech, tuku a svalu (Melmed et al., 2009) v souladu s mnoha **pleiotropními účinky**, které po vazbě GH zprostředkovává (Waters, 2015). U lidí jsou ve významném množství exprimovány nejméně dvě formy GH-R. Jednak existuje receptor plné délky, tzv. full-length (GH-R), druhá je zkrácená forma, tzv. truncated (GH-Rtr), která postrádá většinu intracelulární domény. Tento receptor může inhibovat účinek receptoru plné délky.

Sérový GHP je produkt proteolytického štěpení z obou těchto receptorů. Klinický význam těchto různých typů receptorů zatím není plně znám (Fisker et al., 2001).

Obrázek 2: **GH-R** (GH, růstový hormon; GH-R, receptor růstového hormonu; JAK2, Janus kináza-2; P, fosfát).  
Upraveno podle *Herrington et Carter-Su, 2001*.



### **GHBP**

GHBP reguluje biologickou aktivitu GH omezením vazby volného GH v cílových tkáních *in vivo*. Lim usuzuje, že snížením volného GH vazbou na GHBP během sekrečních pulzů GH spolu s prodloužením poločasu cirkulujícího GH by mohl mít **vliv na oploštění sekrečního profilu GH** na úrovni cílové tkáně (Lim et al., 1990). U hlodavců vzniká GHBP alternativním splicingem transkriptu GH-R a má shodnou extracelulární ligand-vázající doménu (Doehner et al., 2001), ale liší se v terminální C-sequenci (Zou et al., 1997).

### **2.1.2 IGF-1 a IGF-1R/INS-R**

#### **IGF-1**

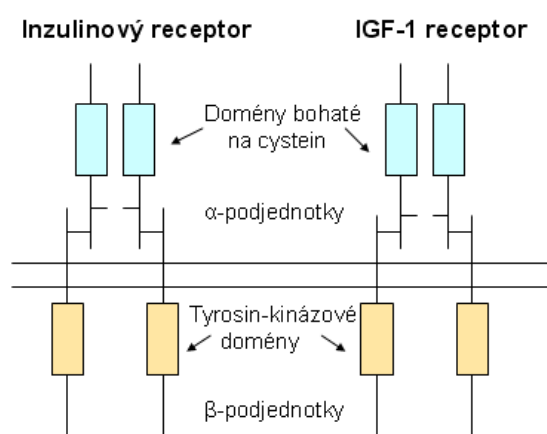
IGF-1, dříve nazývaný somatomedin-C, (NSILA-nesupresibilní inzulínu podobná aktivita či sulfatační faktor), je hormon podobné molekulární struktury jako inzulín, sestává ze 70 aminokyselin, má A a B řetězce, které jsou spojeny třemi intramolekulárními disulfidovými můstky, C-peptidová oblast je tvořena 12 aminokyselinami (Keating, 2008; Rinderknecht et Humbel, 1978; Laron, 2001). Téměř 80% cirkulujícího IGF-1 pochází z jater, ale je syntetizován i v extrahepatálních tkáních (kostech, svalech, ledvinách, tukové tkáni, hypofýze a dalších) (Laron, 2011; Melmed et al., 2009). Nedávné experimenty s geneticky upravenými myši ukazují, že každý zdroj IGF-1 může kompenzovat absenci jiného, byť nenahradí jejich relativní úlohu v postnatálním růstu (Ueki et al., 2009; Klötting et al., 2008; List et al., 2014). IGF-1 účinkuje jak parakrinně přímo v místě své tvorby, tak endokrinně (Binoux et al., 1995). IGF-1 je známý především jako **mediátor růstového hormonu** a stimulator somatického růstu (Laron, 2001). Na rozdíl od GH **zlepšuje glukózovou toleranci a inzulínovou senzitivitu** (Moses et al., 1996; Mauras et Haymond, 2005) a snižuje lipolýzu/stimuluje

lipogenezi (Rajpathak et al., 2009). Podobnosti mezi účinky inzulínu a IGF-1 *in vitro* jsou dané především zkříženými reakcemi díky strukturální homologii jejich molekul a jejich receptorů (Binoux et al., 1995) (Obrázek 5).

### IGF-1R/INS-R

IGF-1R patří do rodiny inzulínového receptoru (60% homologie) a stejně jako INS-R je IGF-1R transmembránová ligandem-aktivovaná glykoproteinová tyrosin-proteinkináza, která je složena ze dvou membránových alfa-podjednotek, vzájemně spojených disulfidovými můstky, a dvou intracelulárních beta-podjednotek (Ullrich et Schlessinger, 1990).

Obrázek 3: **Podobnosti mezi INS-R a IGF-1R.** Upraveno podle Laron, 2011.



INS-R a IGF-1R sdílejí několik intracelulárních signálních ligandů (IRS1, SHC (protein obsahující Src homologní doménu-2) a další) a několik signálních drah (MAP-kinázovou dráhu (mitogenem aktivovaná proteinkináza), PI3K/PKB (proteinkináza B) dráhu a další) (Entingh-Pearsall et Kahn, 2004) (Obrázek 5). IGF-1R jsou přítomny ubikviterně (Melmed et al., 2009). Laron sice popsal, že překvapivě chybí na hepatocytech, které jsou důležitým zdrojem IGF-1, což dle něj pravděpodobně souvisí se zpětnou vazbou IGF-1 na IGF-1R v játrech (Laron, 2011), ale existují studie popisující expresi IGF-1R i na jaterních buňkách (Nevado et al., 2006; Kurabayashi et al., 2013).

K IGF-1R mají vysokou afinitu jak IGF-1, tak IGF-2 a právě většina jejich účinků je zprostředkována skrze IGF-1R (Ullrich et Schlessinger, 1990). **Inzulín i IGF-1 se mohou vzájemně vázat na IGF-1R, resp. INS-R,** i když s nízkou afinitou a pouze ve vysokých (nefyziologických) koncentracích (Rajpathak et al., 2009). Za normálních fyziologických

podmínek se inzulin po vazbě na INS-R v játrech, tuku a svalech podílí na regulaci intermediárního metabolismu a energetické homeostázy (Le Roith et al., 1994) a nemá za fyziologických koncentrací mitogenní účinky (Binoux et al., 1995). IGF-1R je zase obecně považován za receptor spojený s regulací růstu, proliferace, diferenciaci, migrace (Torres Aleman, 2005), přežívání a apoptózy buněk během vývoje organismu (Vincent et Feldman, 2002). Biologické účinky zprostředkované těmito receptory však nejsou přesně rozlišené: **IGF-1R má také důležité metabolické účinky** (stimuluje proteosyntézu, vychytávání glukózy, syntézu glykogenu a akumulaci lipidů) (Senthil et al., 2002), zatímco INS-R má také dobře známé účinky na buněčný růst, proliferaci a diferenciaci (Combettes-Souverain et Issad, 1998), které jsou stimulovány zvláště při vyřazení funkce IGF-1R, jak ukázaly experimentální studie (Entingh-Pearsall et Kahn, 2004), a může hrát významnou roli v procesu kancerogeneze (Frasca et al., 1999; Sciacca et al., 1999). V 3T3-L1 adipocytech, které exprimovaly vysoké hladiny INS-R a IGF-1R se ukázalo, že alpha-podjednotky obou receptorů mají stejný potenciál stimulovat metabolickou i mitogenní odpověď (indukce mRNA proto-onkogenu-c-fos, zvýšení DNA syntézy, transportu glukózy a mRNA exprese GLUT4 (glukózového transportéru-4)) měrou odpovídající obsazenosti jejich příslušných receptorů (Weiland et al., 1991).

I přes tuto zjevnou podobnost a překrývající se funkci obou receptorů **nejdou funkčně vzájemně zcela zastupitelné** a vzájemně nemohou kompenzovat úlohu druhého při jeho absenci, jak se ukázalo u rozdílných fenotypů myši s chyběním INS-R nebo IGF-1R (Accili et al., 1996; Joshi et al., 1996; Liu et al., 1993). **Chybění INS-R** při diferenciaci buněčné linie preadipocytů z hnědé tukové tkáně, který je zde normálně exprimován v nízkých hladinách, **blokovalo adipogenezi**, zatímco **chybění IGF-1R**, který je paradoxně exprimován v relativním nadbytku k INS-R, **k inhibici adipogeneze nevedlo**. Autoři se také domnívají, že spíše než celkový (absolutní) počet receptorů je důležitý poměr hladin expresí INS-R a IGF-1R u dané buňky (Entingh-Pearsall et Kahn, 2004).

Jednotlivé alpha/beta heterodimery INS-R a IGF-1R se také mohou kombinovat a tvořit sulfidovými můstky spojené hybridní receptory, které také mohou vázat jak inzulin, tak IGF-1 s biologickými účinky blízkými IGF-1R a jejichž exprese byla zjištěna v celé řadě tkání (Soos et al., 1990; Pandini et al., 2002).

#### **2.1.2.1 Faktory ovlivňující sérové koncentrace IGF-1**

V sérových hladinách celkového IGF-1 a jeho vazebných proteinů existuje značná interindividuální variabilita (Harella et al., 1996). Hladiny IGF-1 jsou relativně nízké ve

fetálním období, vrchol nastává v období pubertálního růstového spurtu a poté následuje pozvolný pokles jeho hladin (Hall et al., 1999). Snížené hladiny jsou spojené se stárnutím (O'Connor et al., 1998). Jaterní exprese a **sérové koncentrace IGF-1 jsou ovlivněny také výživou** (kalorický příjem, příjem proteinů) (Thissen et al., 1994) či užíváním hormonální antikoncepce (snížení IGF-1) (Jernström et al., 2001). V jiné studii korelovaly hladiny IGF-1 inverzně také s celkovým cholesterolem, body mass indexem (BMI), konzumací alkoholu a glomerulární filtrací (Lam et al., 2010). Bylo také zjištěno, že metformin může snižovat koncentrace IGF-1 v séru (Fruehwald-Schultes et al., 2002).

### **2.1.3 IGF-2**

IGF-2 je podobně jako IGF-1 strukturálně podobný inzulinu, je produkován především játry, ale i mnoha dalšími tkáněmi a jeho účinky se překrývají s účinky IGF-1. Podílí se na regulaci růstu, diferenciaci, má „insulin-like“ účinky a mitogenní aktivitu. Jeho regulace je částečně závislá na GH. Je vysoce exprimován během embryogeneze, předpokládá se, že **hlavní úlohou IGF-2 je stimulace růstu během fetálního života** na rozdíl od **IGF-1, který je hlavním stimulatorem růstu po narození** (Livingstone, 2013). U prasátek s intrauterinní růstovou retardací (IUGR) byla vývojově jaterní mRNA exprese IGF-2 vyšší intrauterinně a při narození než později ve 21. a 49. dnu života (Kampman et al., 1993). IGF-2 se váže na IGF-1R, INS-R i **IGF-2R**, posledně jmenovaný však účinkuje jako **signální antagonist IGF-2 účinků**. Sérové koncentrace IGF-2 jsou 3 krát vyšší než IGF-1 a bylo zjištěno, že vysoké hladiny IGF-2 v séru jsou spojeny se zvýšeným rizikem rozvoje rakoviny (Livingstone, 2013). IGF-2 má vztah také k reprodukci a paměti (Chen et al., 2011).

### **2.1.4 IGF-vazebné proteiny, IGFBPs**

V krvi jsou koncentrace IGF 100-1000 krát vyšší než koncentrace inzulinu (Binoux et al., 1995). Na rozdíl od inzulinu, který není vázán na žádnou transportní molekulu, je však téměř **99% IGF-1 v cirkulaci navázáno na jeden ze šesti IGFBPs** (Juul et al., 2003; Rajpathak et al., 2009). Tyto rezervy mohou být v případě metabolických potřeb mobilizovány skrze regulaci proteolýzy IGFBPs serinovými proteázami (Binoux et al., 1995). IGFBPs vážou IGF s afinitou vyšší než IGF-R, chrání ho před degradací, brání jeho účinku a transportují ho k IGF-R v cílových tkáních, kde ovlivňují účinek IGF. Nemají žádnou afinitu k inzulinu, který tak zůstává volný pro vazbu s vlastním receptorem (Le Roith et al., 1994).

Většina IGF-1 (kolem 80%) je ve formě tzv. **ternárního komplexu**, který je tvořen IGF-1, IGFBP-3 a glykoproteinem ALS (kyselá labilní podjednotka) (Rajpathak et al., 2009). Studie

na myších prokázala, že snížení/chybění ALS vede k urychlené degradaci IGF-1 a významnému poklesu plazmatické hladiny IGF-1 (Kim et al., 2006) a k blokování schopnosti GH zvýšit plazmatickou hladinu IGF-1 i přes intaktní na GH závislou stimulaci IGF-1 exprese v játrech, tukové tkáni a kosterním svalu (Ueki et al., 2009). Malé množství IGF-1 je vázáno v cirkulaci na ostatní IGFBPs jako binární komplex a pouze asi 1% IGF-1 v cirkulaci je nevázané. Nicméně právě tato volná (free) IGF-1 frakce je považována za hlavní bioaktivní komponentu IGF-1.

Změny v hladinách vazebných proteinů tedy souvisejí s množstvím volného IGF-1 a **regulují tak jeho biologickou dostupnost** (Rajpathak et al., 2009). Uvažuje se také, že právě volné, a nikoliv celkové IGF-1 zpětnovazebně ovlivňuje hladiny GH (Chen et al., 2005). Lokálně produkované **IGFBPs slouží jako autokrinní/parakrinní regulátory účinku IGF** (Chan et Spencer, 1997), jsou exprimovány v přesně stanoveném čase a tkáňově specifickým způsobem (Schneider et al., 2000) a kromě jejich tradiční úlohy prodlužování poločasu IGF mohou mít **i funkce nezávislé na IGF** (Chan et Spencer, 1997).

## **2.2 Vzájemné regulace GH/IGF-1 komponent**

### **2.2.1 Inzulin a GH/IGF-1 komponenty**

Dřívější práce ukázaly, že **inzulin** dodávaný do jater portální žilou zvyšuje citlivost jater na GH **zvýšením exprese GH-R**, a tím nepřímo **stimuluje produkci IGF-1 játry** (Droste et al., 2014; Leung et al., 2000), (s čímž souvisí nutnost vyšších dávek pegvisomantu pro normalizaci hladin IGF-1 u akromegaliků s diabetem (Droste et al., 2014)). Inzulin zvýšil expresi GH-R asi o 100% a odpověď na GH také v adipocytech potkanů po hypofyzektomii, u kterých byl počet GH-R snížen (Gause et Edén, 1985). Zjistilo se také, že přechodná expozice inzulinu zvyšuje aktivaci dráhy GH-GH-R-MEK (MAPK/ERK kinázy), zatímco dlouhodobá expozice inzulinu inhibuje GH signalizaci, a to jak na receptorové, tak postreceptorové úrovni (Xu et Messina, 2009).

Zvýšená sekrece inzulinu *in vivo* stimuluje IGF-1 syntézu v játrech a secernovaný **IGF-1 zpětnovazebně inhibuje inzulinovou sekreci z beta-buněk** skrze dráhu IGF-1R. Tato dráha je pravděpodobně zvláště důležitá v případech zvýšených hladin glukózy a sekretagog jako je glukagonu podobný peptid-1 (**GLP-1**) (Zhao et al., 1997).

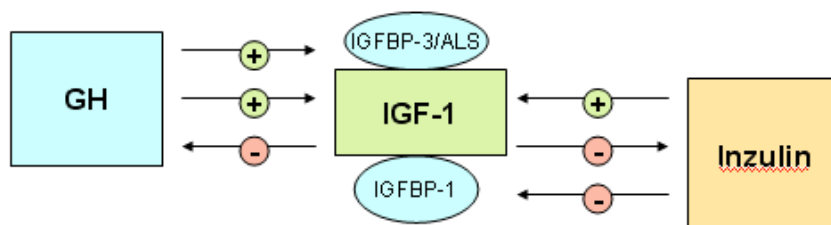
V jiné studii u nediatetických potkanů s GH deficitem se jaterní IGF-1 mRNA nelišila mezi skupinou léčenou inzulinem a kontrolní skupinou, ve skupině léčené inzulinem byla však vyšší oproti skupině léčené IGF-1, a to bez změny jaterních GH-R. Léčba inzulinem zde vedla

k poklesu IGF-1 v séru, ale ke zvýšení IGFBP-3 v séru, což autoři vysvětlují vlivem inzulínu na clearance IGF-1 z cirkulace (Butler et al., 1996 -A). V pozdější studii byly u krav v laktaci, (tedy ve stavu negativní energetické bilance, kdy dochází k rezistenci jater vůči účinku GH), nízké hladiny jaterní exprese GH-R a IGF-1, ale zvýšily se spolu se sérovým IGF-1 při hyperinzulinemickém-euglykemickém clampu. V tukové tkáni však byly změny opačné- snížená GH-R a IGF-1 mRNA exprese (Butler et al., 2003).

U plodů ovcí, u nichž byly zajištěny stabilní hladiny glukózy a aminokyselin, inhibovala infúze inzulínu jaterní IGFBP-1 expresi, ale neměla vliv na plazmatické hladiny IGFBP-1, naproti tomu signifikantně zvýšila IGFBP-3 v plazmě, ale neměla vliv na jaterní IGFBP-3 expresi (Shen et al., 2001).

Inzulín zvýšil sekreci IGF-1 v izolovaných potkaních hepatocytech, ale změny koncentrace glukózy neměly na IGF-1 vliv (Arany et al., 1993). Naopak infúze IGF-1 v jiné studii snížila inzulinémii u modelu potkanů po intestinální ischémii/reperfúzi (Haglund et al., 1998).

*Obrázek 4: Vzájemné regulace GH, IGF-1, inzulínu (ALS, kyselá labilní podjednotka; GH, růstový hormon; IGF-1, inzulínu podobný růstový faktor-1; IGFBP, IGF-vazebný protein) Zdroj:(upraveno) [https://www.google.cz/search?q=IGF+komponenty&biw=1440&bih=809&source=lnms&ibm=isch&sa=X&ved=0CAYQ\\_AUoAWoVChMI2ILYqN2KyAIVyrcUCh0W4ggr#tbm=isch&q=GH+insulin+resistance&imgc=7-19vTLW608KxM%3A](https://www.google.cz/search?q=IGF+komponenty&biw=1440&bih=809&source=lnms&ibm=isch&sa=X&ved=0CAYQ_AUoAWoVChMI2ILYqN2KyAIVyrcUCh0W4ggr#tbm=isch&q=GH+insulin+resistance&imgc=7-19vTLW608KxM%3A)*



### 2.2.2 GH regulace IGF-1 v séru

**GH je hlavním regulátorem sérového IGF-1** (Cingel-Ristic et al., 2004). Hladiny IGF-1 významně klesají (mRNA a peptid) po hypofyzektomii a normalizují se při léčbě GH (Peter et al., 1993). **IGF-1 naopak zpětně negativně reguluje sekreci GH z hypofýzy** (Cingel-Ristic et al., 2004). Inhibiční vliv IGF-1 na GH expresi se děje na úrovni promotoru a cílová struktura pro IGF-1R signalizaci je zde vazebný protein CBP (vazebný protein CREB (vazebný protein cAMP responsivního elementu)) (Romero et al., 2012). Myši s vyřazením genu pro IGF-1 v játrech měly o 80% nižší hladiny IGF-1 v séru a zvýšené hladiny GH v séru (Sjögren et al., 2002). Myši s **vyřazením GH-R v játrech** měly 90% pokles IGF-1 hladin v séru a **300% zvýšení sérového GH**. Lokální IGF-1 mRNA hladiny ve vybraných tukových

depech a kosterním svalu zde byly signifikantně zvýšené, ale nestačily k vyrovnání poklesu IGF-1 v séru a k zajištění normálního vzrůstu a množství tuku (List et al., 2014). V jiné studii u modelu **SIGFRKO** myši (s vyřazením IGF-1R na somatotropních buňkách hypofýzy) byla zjištěna zvýšená exprese GH v hypofýze a jeho zvýšená sekrece, zvýšené sérové IGF-1, snížená mRNA exprese GHRH a zvýšená mRNA exprese somatostatinu. **Hypothalamická negativní zpětná vazba IGF-1** tak rovněž limituje rozsah uvolňování GH (Romero et al., 2010).

### 2.2.3 GH/IGF-1 regulace IGF-1 mRNA exprese

#### **GH regulace IGF-1 mRNA exprese**

U hypofyzektomovaných potkanů, kteří byli léčeni rekombinantním lidským GH (rhGH), byla závislost IGF-1 mRNA exprese na GH vyjádřena nejvíce v játrech, kosterním svalu a bílé tukové tkáni (Gosteli-Peter MA et al., 1994). GH byl označen za hlavní regulátor IGF-1 mRNA exprese v tukové tkáni (Louveau et Gondret, 2004). Řada studií ukázala **zvýšení IGF-1 mRNA v tukové tkáni po léčbě GH** u zvířat (Doglio et al., 1987; Vikman et al., 1991 -A; Brameld et al., 1996; Coleman et al., 1994; Houseknecht et al., 2000; Wabitsch et al., 1996 -A, -B) či u osob s GH deficitem (Zhao et al., 2011; Paulsen et al., 2006). Myši GH stimuloval vzestup IGF-1 mRNA v diferencujících se buňkách, ale nikoli v nediferencovaných (Fleener et al., 2006). Po hypofyzektomii potkanů došlo k dramatickému poklesu hladin IGF-1 mRNA a IGF-1 peptidu v tukové tkáni a po léčbě GH se téměř opět normalizovaly jak *in vivo*, tak *in vitro* (Peter et al., 1993; Vikman et al., 1991 -A; Boni-Schnetzler et al., 1996).

Podobně jako v tukové tkáni byla také **v játrech** zjištěna **paralelní regulace IGF-1 mRNA exprese s GH účinkem** jak u GH transgenních, u GH antagonistických (GHA) „little“ (lit/lit), tak i kontrolních myši (Iida et al., 2004). V řadě studií byla hypofyzektomie či léčba antagonistou GH-R (van Neck et al., 2000) u hlodavců spojena s poklesem IGF-1 mRNA v játrech (Domené et al., 1993) a naopak léčba GH vedla ke zvýšení IGF-1 exprese v játrech (de Castro Barbosa et al., 2009; Haglind et al., 1998; Domené et al., 1993; Bates et al., 1993). **Podobné změny** byly zjištěny také **v kosterním svalu** u potkanů (Butler et al., 1994) či prasat (Brameld et al., 1996).

Absence efektu GH na změny IGF-1 mRNA exprese je tedy spíše výjimkou a v experimentálních studiích byla zjištěna v několika studiích v kosterním svalu (Coleman et



al., 1994; Haglind et al., 1998). Lu et al. také popsal absenci vlivu GH na zvýšení exprese IGF-1 na makrofázích (Lu et al., 2010).

### **IGF-1 regulace IGF-1 mRNA exprese**

V situacích zvýšených sérových hladin GH se při vlivu na exprese dalších komponent kombinuje vliv samotného GH a jím stimulovaného zvýšení IGF-1 v séru. U hypofyzektomovaných potkanů vedla infúze rhIGF-1 k malému **zvýšení IGF-1 mRNA** v kosterním svalu a bílé **tukové tkáni** (Gosteli-Peter MA et al., 1994). V jiné studii přidání IGF-1 do kultury adipocytů epididymální tukové tkáně potkanů **nemělo vliv na jejich IGF-1 mRNA** expresi (Vikman et al., 1991 -A). U kontrolních myší ve studii Klöttinga et al. vedla stimulace adipocytů pomocí IGF-1 dokonce ke **snížení IGF-1 mRNA** exprese. Naproti tomu u myší s vyřazením IGF-1R na adipocytech IGF-1 zvýšil IGF-1 mRNA expresi (Klötting et al., 2008).

U potkanů s GH deficitem byla léčba IGF-1 (oproti GH) spojena se snížením (Butler et al., 1994; Gosteli-Peter MA et al., 1994) nebo s tendencí k poklesu IGF-1 mRNA exprese **v játrech** (Lemmey et al., 1997), **ve svalu** se však po IGF-1 léčbě IGF-1 mRNA exprese zvýšila (Lemmey et al., 1997). V jiné studii u potkanů (model střevní ischémie/reperfúze) bez GH deficitu však **v játrech** exogenní IGF-1 zvýšil obsah i mRNA IGF-1 (Haglind et al., 1998).

### **2.2.4 GH/IGF-1 regulace IGF-1R**

#### **GH regulace IGF-1R**

Studie na zvířatech opakovaně potvrdily **absenci vlivu** změn sérových hladin GH (hypofyzektomie, léčba GH) na tkáňovou (slezina, játra, sval) expresi IGF-1R (Domené et al., 1994; Combes et al., 1997; Butler et al., 1996 -B; Butler et al., 1994). Starší studie na adipocytech hypofyzektomovaných potkanů zjistila vyšší „vazbu“ IGF-2R ve srovnání s adipocyty kontrolních zvířat a po přidání GH do inkubačního média s adipocyty hypofyzektomovaných potkanů se počet vazebných míst ještě zvýšil (Lönnroth et al., 1987).

#### **IGF-1 regulace IGF-1R**

Butler et al. popsal, že změny sérového IGF-1 a lokální IGF-1 mRNA exprese **neměly vliv** na mRNA expresi IGF-1R v extrahepatálních tkáních u zakrslých (*dw/dw*) potkanů s deficitem

GH (Butler et al., 1994; Butler et al., 1996 -B). Léčba rhIGF-1 ani hypofyzektomie neměly vliv na IGF-1R expresi ve slezině potkanů (Domené et al., 1994). V bovinní blastocystě však fyziologické koncentrace IGF-1 zvýšily expresi IGF-1R proteinu a IGFBP-3 transkripci (Velazquez et al., 2011).

**Inaktivace IGF-1R v tukové tkáni** u myši ve studii Klöttinga et al. byla spojena se **zvýšenou expresí IGF-1 v játrech a tukové tkáni**, zvýšenou sérovou hladinou IGF-1 a normální hladinou GH v séru, což naznačuje existenci **negativní zpětné vazby IGF-1 skrze IGF-1R** na jeho vlastní expresi v **adipocytech** (Klötting et al., 2008).

### 2.2.5 GH/IGF-1 regulace GH-R/GHBP

#### GH regulace GH-R

Vikman et al. popsal, že v epididymální **tukové tkáni** u Sprague-Dawley potkanů je rychlá a **na GH závislá regulace GH-R mRNA exprese**. **Hypofyzektomie** zde vedla ke **snížení GH-R** (4 a 1,2 kb transkriptu) a již jedna injekce GH vedla ke zvýšení mRNA hladin GH-R. Toto zvýšení bylo závislé na dávce GH a bylo pozorováno i po prodloužené léčbě po dobu 6 dnů (Vikman et al., 1991 -B). Další experimentální studie potvrdily **pozitivní vliv GH na GH-R** expresi v izolovaných adipocytech jak diabetických, tak kontrolních zvířat (Solomon et al., 1990). Zajímavé je, že tukové buňky diabetických zvířat měly po léčbě GH větší vzestup GH-R i bez preinkubace s GH, což naznačuje **vyšší senzitivitu ke GH v tukové tkáni diabetických potkanů**, která by mohla být zčásti zprostředkována zvýšením GH-R (Solomon et al., 1990). U dětí s Prader-Williho syndromem a u pacientů s deficitem GH vedla 2-4 měsíční léčba GH ke zvýšení GH-R mRNA v tukové tkáni a v izolovaných adipocytech (Kamel et al., 1995).

Avšak v některých studiích **nedošlo** ke zvýšení GH-R v tukové tkáni po stimulaci GH, např. u prasat (Brameld et al., 1996) či u hypofyzektomovaných potkanů po léčbě GH (Gause et Edén, 1985). Stejně tak nedošlo ke zvýšení GH-R plné délky po 4 měsíční substituční léčbě GH u dospělých s deficitem GH (Fisker et al., 2001).

**V játrech** byla také zjištěna **paralelní regulace GH-R s GH účinkem** (Iida et al., 2004) a zvýšení GH-R mRNA při léčbě GH, a to u prasat (Combes et al., 1997) nebo u GH transgenních myši (Bartke et al., 1994 -A; Oberbauer et al., 2004). V některých studiích však tento efekt nebyl přítomný (Domené et al., 1993; Maiter et al., 1992). V jiných studiích u krmených, resp. lačnicích potkanů měl GH stimulační vliv na expresi GH-R v játrech pouze

přechodné trvání (1 den) a po určité době (5 dnů) se GH-R exprese opět normalizovala, resp. snížila (Ohashi et al., 1995; Kaji et al., 1994).

V **kosterním svalu** ve studii Combese et al. byly zvýšené hladiny GH spojeny dokonce se snížením GH-R mRNA (Combes et al., 1997), ale např. ve studii Bramelda et al. došlo ve svalu prasat také ke zvýšení GH-R mRNA exprese (Brameld et al., 1996).

### GH regulace GHBP

Nálezy u potkanů naznačují, že GH-R a GHBP mRNA v játrech je exprimována jiným způsobem (Kaji et al., 1994) a že GHBP mRNA exprese je regulována v různých tkáních odlišně (Butler et al., 1996 -B; Kaji et al., 1994). **Deficit GH** po hypofyzektomii např. u *dw/dw* myši je spojen se **sníženou expresí GHBP** a GH-R v játrech. Po kontinuální infúzi GH došlo k nárůstu GHBP mRNA v játrech, ale nedošlo ke změnám v GH-R mRNA (Maiter et al., 1992). Transgenní myši se zvýšenou expresí humánního nebo bovinního GH měly signifikantně zvýšené plazmatické hladiny GHBP (Bartke et al., 1994 -A). GHBP se zvýšil také po GH léčbě u dospělých s GH deficitem (Florkowski et al., 1999).

### IGF-1 regulace GH-R

V játrech u potkanů, kteří dostávali GH, nebyla prokázána korelace vazebných míst pro GH se sérovými hladinami IGF-1 (Maiter et al., 1988) a u potkanů s GH deficitem nebyly zjištěny změny v jaterní GH-R mRNA expresi v reakci na podání IGF-1 (Butler et al., 1996 -A, -B). Avšak jak u GH transgenních, GHA (lit/lit) i kontrolních myši (Iida et al., 2004), tak u krav v laktaci (Butler et al., 2003) byla **v játrech zjištěna silná korelace mezi GH-R a IGF-1 mRNA hladinami**. Podobně prokázal Shoba et al. **koordinovanou expresi IGF-1 a GH-R genu** během vývoje potkana a naznačil, že GH-R exprese přispívá k tkáňově specifické expresi IGF-1 genu během vývoje (Shoba et al., 1999).

### 2.2.6 GH/IGF-1 regulace IGFBPs

#### GH regulace IGFBPs

Peter et al. zjistil, že bílá **tuková tkáň** u potkanů exprimuje **IGFBP-2-6 mRNA** a že tato exprese je **regulována GH** (Peter et al., 1993). Na primárních kulturách stromovaskulárních buněk odvozených od prasečí tukové tkáně stimulovala léčba GH sekreci všech IGFBP-1-4

(Chen et al., 1996). **Hypofyzektomie** prasečích fětů vedla k **poklesu hladin IGFBP3** v podkožní tukové tkáni během času a na IGFBP3 závislém způsobu. V jiné studii v tukové tkáni u plodů prasat však léčba GH neměla žádný vliv ani na sérové hladiny, ani na hladiny IGFBP3 (Hausman et al., 2000).

Několik studií ukázalo **stimulační vliv GH na IGFBP-3** sérové hladiny (Wester et al., 1998; McCann et al., 1997) či na genovou expresi v játrech (Lemmey et al., 1997; Rico-Bautista et al., 2005; Gosteli-Peter MA et al., 1994) a naopak pokles IGFBP-3 po hypofyzektomii (Albiston et al., 1992; Gosteli-Peter et al., 1994). GH stimuloval sekreci IGFBP-3 v lidských preadipocytech, ale nikoli v adipocytech (Wabitsch et al., 2000).

### **IGF-1 regulace IGFBP3**

**Stimulační vliv IGF-1 na IGFBP-3 mRNA expresi** byl zjištěn experimentálně např. v endotelových buňkách, kde bylo potvrzeno, že jde o IGF-1R zprostředkovaný proces (Erondu et al., 1996), nebo v kůži (Lemmey et al., 1997), v játrech u hlodavců (Gosteli-Peter MA et al., 1994; Rico-Bautista et al., 2005) či v séru u potkanů/myší (Butler et al., 1996 -A; Rico-Bautista et al., 2005). Wass popsal **korelace mezi IGF-1 a IGFBP-3 v séru u akromegaliků** (Wass, 1997). Liao et al. uvedl, že **IGF-1** produkovaný v játrech stimuluje expresi IGFBP-3 mRNA a **stabilizuje IGFBP-3 při GH deficitu**, což vede k lepší stabilitě IGF-1 hladin v oběhu (Liao et al., 2006).

Podobně jako inzulin má také **IGF-1** a **IGF-2 inhibiční vliv na expresi IGFBP-1** (Lee et al., 1997). IGF-1 analog se sníženou vazebnou schopností k IGFBP-1 snížil IGFBP-1 koncentrace v médiu HepG2 buněk (Lindgren et al., 1993). Infúze IGF-1 v jiné studii u plodů ovcí však **zvýšila IGFBP-1** (i jeho jaterní expresi) a **IGFBP-3** hladiny v séru, což by dle autorů mohlo sloužit k ochraně plodu před vystupňovanými anabolickými účinky a **k blokaci hypoglykemizujících vlivů IGF-1 a inzulinu** (Shen et al., 2001).

U IGF-2 transgenních myší se zvýšenou expresí a sérovou hladinou IGF-2 koreloval IGF-2 v séru negativně s IGF-1 hladinou a pozitivně s IGFBP-2 hladinou, což naznačuje, že IGF-1 je vlivem IGF-2 vyřazen z vazby na IGFBP3 a že IGF-2 je hlavním regulátorem IGFBP-2 (Wolf et al., 1994). I v jiné studii bylo u IGF-2 transgenních myší nižší IGF-1 a vyšší IGFBP-2 v séru než u kontrolních myší (Blackburn et al., 1997 -A).

### 2.2.7 IGFBP regulace GH/IGF-1 komponent

Ve studii Cingel-Ristica et al. na myších se po podání lidského IGFBP-1 (hIGFBP-1) hladiny GH zvýšily i při normálních IGF-1 hladinách, což naznačuje přímý vliv IGFBP-1 na sekreci GH (Cingel-Ristic et al., 2004). Akutní *in vivo* zvýšení IGFBP-1 u potkanů (v míře pozorované u různých katabolických stavů) je schopno selektivně snížit proteosyntézu (snížením volného IGF-1) u rychle pracujících kosterních svalů a zvýšit svou vlastní jaterní a renální syntézu (Lang et al., 2003).

## 2.3 Signalizace GH-GH-R a IGF-1-IGF-1R

### 2.3.1 Signalizace IGF-1/inzulinu a její význam

Ligandy IGF-1R se vážou k doméně jeho alpha-podjednotky bohaté na cystein, odkud je signál převeden skrze transmembránovou doménu na beta-podjednotku IGF-1R (Obrázek 3). Ta podstupuje konformační změnu, která stimulací tyrosin-kinázové aktivity vede k autofosforylaci skupiny tyrosinových zbytků IGF-1R, čímž se zvýší jeho vnitřní tyrosin-kinázová aktivita, což vede k fosforylaci dalších míst na receptoru a s ním spojených substrátových proteinů, např. rodiny **IRSs (IRS-1-4)** a **SHC** (Mur et al., 2002; Torres Aleman, 2005; Shelton et al., 2004; Kuemmerle et al., 2003).

Tyrosin-fosforylované IRS proteiny poté vážou proteiny obsahující Src homologní domény-2 (SH2), jako je např. **p85alpha** regulační podjednotka PI3K, vazebný protein receptoru růstového faktoru-2 (**Grb-2**) a Src homologní fosfatáza-2 (**SHP-2**) (Mur et al., 2002) (Obrázek 5).

Aktivovaná **PI3K** katalyzuje konverzi fosfatidylinositol-4,5-bisfosfátu (**PIP2**) na fosfatidylinositol-3,4,5-trifosfát (**PIP3**) a reverzní reakce je katalyzována fosfatázou **PTEN** (Phosphatase and Tensin Homolog). PIP3 ve zvýšené koncentraci váže PH (Pleckstrin Homology) doménu nejméně dvou proteinů, **Akt** a fosfatidylinositol-dependentní kinázy-1 (PDK-1). **PDK-1** poté fosforyluje zbytky threoninu (Thr308) na Akt nebo proteiny proteinkinázy C (PKC) (Kuemmerle et al., 2003). Tyto PKCs spolu s Akt zvyšují rychlost **vychytávání glukózy** buňkou pomocí translokace GLUT4 z vezikulu do plazmatické membrány (Mora et al., 2005). Akt zprostředkovaná fosforylace Rab GTPáza-aktivujícího proteinu **AS160** (160kDa substrát Akt) také vede ke stimulaci vychytávání glukózy v adipocytech a svalu právě umožněním translokace GLUT4 do plazmatické membrány (May, 2008).

Akt zprostředkovaná inhibice kinázy-3 $\beta$  glykogen syntázy (**GSK-3 $\beta$** ) vede zas k defosforylaci a aktivaci glykogen syntázy a **stimulaci syntézy glykogenu**. Inhibice GSK-3 $\beta$  je spojena prostřednictvím aktivace iniciačního faktoru 2B syntézy eukaryotického proteinu (eIF2B) také se **stimulací proteosyntézy** (Senthil et al., 2002) a hraje roli v protizánětlivém účinku inzulinu skrze regulaci nukleárního faktoru kappa B (NFkB) (Dugo et al., 2007; Dugo et al., 2006). GSK-3 $\beta$  je sama o sobě negativním regulátorem inzulinové signalizace prostřednictvím fosforylace IRS-1 na serinu 332, což inhibuje INS-R zprostředkovanou fosforylaci tyrosinu IRS-1 (Martyn et al., 2008).

**mTOR** (mammalian target of rapamycin) je dalším fosforylačním substrátem Akt, který se prostřednictvím inhibice vazebného proteinu-1 eukaryotického translačního iniciačního faktoru 4E (4EBP1) a aktivace kinázy ribozomálního proteinu 70S6 (p70S6K) podílí na **zvýšení proteosyntézy** (Senthil et al., 2002).

Aktivovaná Akt také fosforyluje a inaktivuje některé proteiny, které se účastní apoptózy. Snížením exprese Fas ligandu (**FasL**) snižuje Fas-indukovanou apoptózu, vede k expresi **antiapoptického** transkripčního faktoru **NFkB** skrze degradaci kináz I-KappaB (IKK- $\beta$ ) (Mora et al., 2005) či brání aktivaci c-Jun N-terminální kinázy (**JNK**), která stimuluje apoptózu (Mora et al., 2005; Zheng et al., 2002).

Jak IRS, tak také SHC proteiny mohou po fosforylaci tyrosinových zbytků vlivem aktivace IGF-1R/INS-R vázat adaptační protein **Grb-2**, čímž se naváže protein **SOS** (son of sevenless) nezávisle na IRS. Tento komplex pak aktivuje **Ras** (Rat sarcoma) a iniciuje sekvenční fosforylační kaskády zahrnující serin/threonin kinázu **Raf** (Rapidly accelerated fibrosarcoma), která dále aktivuje threonin/tyrosin kinázu **MEK1/2**, která posléze aktivuje **MAPK a ERK1/2**. Tato dráha IGF-1R je nejvíce spojována s **regulací buněčného růstu, diferenciací, migrací a proliferací buněk** a v některých případech může také regulovat mechanismy **apoptózy** (Mora et al., 2005; Zheng et al., 2002).

### **2.3.2 Signalizace GH a její význam**

GH účinkuje vazbou na extracelulární doménu transmembránového glykoproteinu GH-R, kdy jedna molekula GH váže dvě molekuly GH-R (Obrázek 2). Dimerizace GH-R umožní aktivaci a asociaci cytoplazmatických tyrosin-kináz, které fosforylují tyrosinové zbytky intracelulární domény GH-R. Hlavní skupinou těchto tyrosin-kináz je proteinová rodina JAK, zvláště pak **JAK2** (Herrington et Carter-Su, 2001). Uvažuje se, že všechny další signály z GH-R jsou závislé na počáteční aktivaci JAK2 (Campbell, 1997). Aktivovaná JAK2 posléze fosforyluje další tyrosinové zbytky ve své struktuře a na cytoplazmatické doméně GH-R,

kteřé jsou pak vazebnými místy s vysokou afinitou pro řadu signálních proteinů (signální transducery a aktivátory transkripce (**STATs**), **SHC**, **IRS**), které obsahují vazebné molekuly (motivy) pro fosfo-tyrosin (jako např. SH2 domény) (Herrington et Carter-Su, 2001).

Mezi substráty (proteiny s SH2 doménami) GH-R-JAK2 aktivace patří **STAT** proteiny jsou fosforylovány na tyrosinech převážně prostřednictvím JAK2, vytváří homo- nebo heterodimery a přesouvají se do jádra, kde se váží ke specifické DNA sekvenci v oblasti promotoru různých genů a regulují jejich **transkripce** (Carter-Su et al., 1996). Aktivace STAT5b je klíčová pro transkripce genů včetně IGF-1 (Yang et al., 2004).

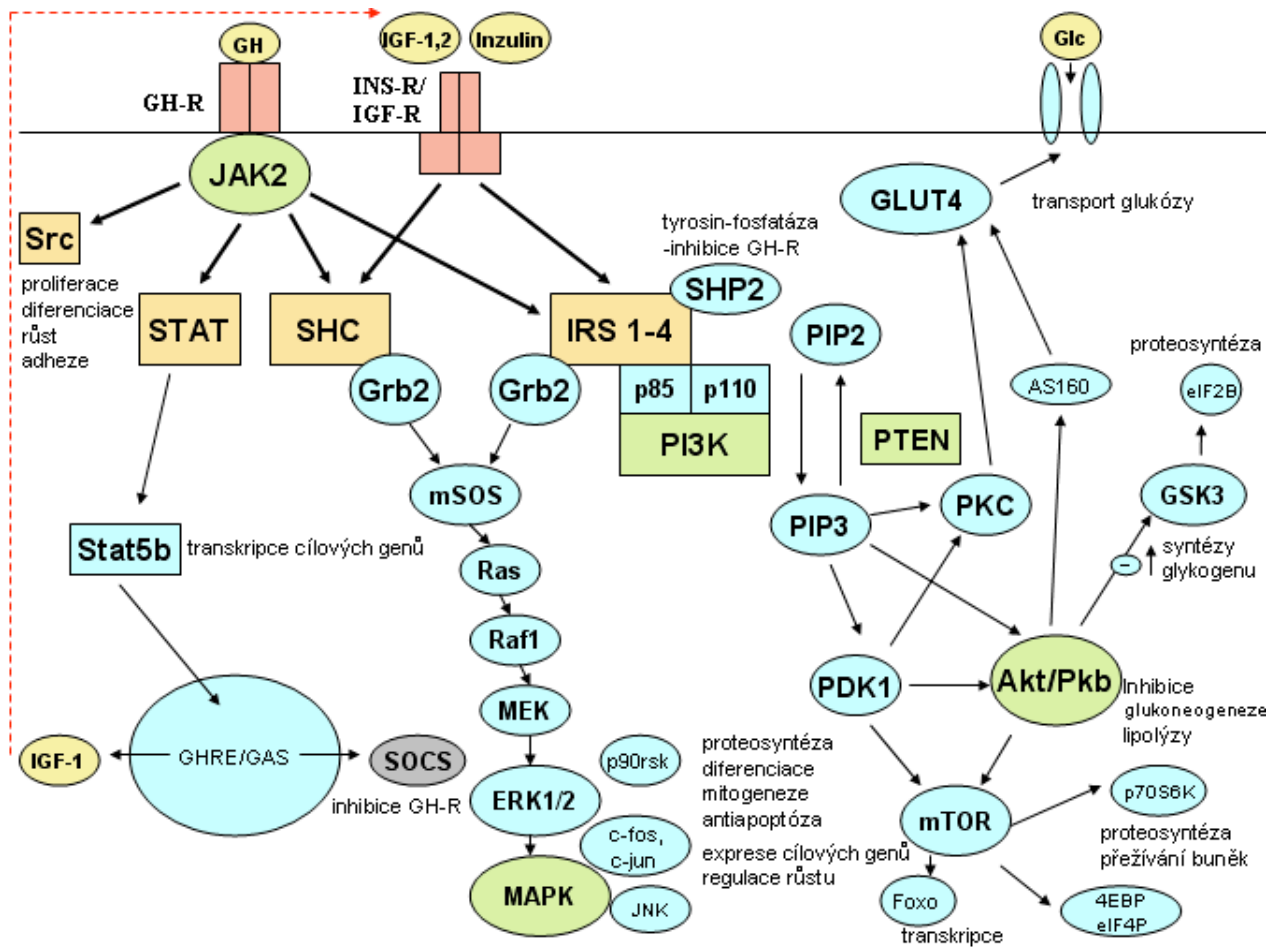
Další skupinou kináz je **Src** rodina, která také může fosforylovat GH-R (Herrington et Carter-Su, 2001) a je zapojena např. do **regulace adheze, proliferace, růstu a diferenciace buněk** (Frame, 2002).

Dalším substrátem GH-R-JAK2 aktivace jsou adaptérové proteiny **SHCs**, které vedou k aktivaci **Ras-Raf-MEK-MAPK** dráhy a **transkripce** (Carter-Su et al., 2000). GH skrze dráhu SHC-Grb2 aktivuje také **ERK1/2**, která je spojována s genovou expresí c-fos, **buněčnou proliferací** a interakcemi mezi signálním systémem GH a epidermálního růstového faktoru (EGF) (Yang et al., 2004).

Za jistých podmínek může **GH** vykazovat „**insulin-like**“ **stimulační účinky** na metabolismus sacharidů a lipidů. GH stejně jako inzulin/IGF-1,2 může po vazbě GH-R-JAK2 také fosforylovat IRSs, což má za následek **aktivaci PI3K** a dalších molekul řídících metabolismus. **GH také stimuluje vazbu p85alpha regulační podjednotky PI3K s IRS-1**. Bylo také naznačeno, že JAK2 je nutná nejen pro fosforylaci IRS, ale spíše než GH-R slouží také jako vazebné místo pro IRS. IRS-1 a PI3K se podílí na akutní stimulaci glukózového transportu inzulinem v adipocytech a předpokládá se, že **rychlý přechodný stimulační efekt GH na glukózový transport v adipocytech** využívá právě této IRS-1-PI3K dráhy (Carter-Su et al., 1996).

Účinky vyvolané GH mohou být **inhibovány** různými proteiny, které kontrolují aktivitu GH a zabraňují neregulovanému růstu. GH-R může být inhibován supresory cytokinové signalizace (**SOCS**), které se vážou na JAK proteiny, čímž potlačují jejich kinázovou aktivitu. Anebo může být GH-R inhibován různými tyrosin-fosfatázami, jako např. **SHP**, které defosforylují jak GH-R, tak JAK2, čímž potlačují jejich signální aktivitu (Herrington et Carter-Su, 2001).

**Obrázek 5: Signalizace GH, IGF-1, inzulinu** (Akt, proteinkináza Akt; AS160, Akt substrát 160kDa; 4EBP, vazebný protein eukaryotického translačního iniciačního faktoru 4E; eIF4P, eukaryotický iniciační faktor 4P; eIF2B, iniciační faktor 2B syntézy eukaryotického proteinu; ERK, extracelulárním signálem regulované kinázy; Foxo, forkhead box O; GAS, gamma-aktivovaná místa; GH, růstový hormon; GH-R, receptor růstového hormonu; GHRE, GH responsivní elementy; Glc, glukóza; GLUT, glukózový transportér; Grb2, vazebný protein receptoru pro růstový faktor-2; GSK3, kináza-3 $\beta$  glykogen syntázy; IGF, inzulinu podobný růstový faktor; IGF-R, receptor inzulinu podobného růstového faktoru; IRS, inzulinový receptorový substrát; JAK, Janus kináza; JNK, c-jun N-terminální kináza; MAPK, mitogenem aktivovaná proteinkináza; MEK, MAPK/ERK kinázy; mSOS, protein „son of sevenless“; mTOR, mammalian target of rapamycin; p90rsk, 90kDa ribozomální S6 kináza; p70S6K, kináza ribozomálního proteinu 70S6; p85, p85alpha podjednotka PI3K; p110, p110 podjednotka PI3K; PI3K, fosfatidylinositol-3-kináza; PIP2, fosfatidylinositol-difosfát; PIP3, fosfatidylinositol-trifosfát; PTEN, phosphatase and tensin homolog; PDK1, fosfatidylinositol-dependentní kináza-1; Pkb, proteinkináza B; PKC, proteinkináza C; Raf, serin/threonin kináza (Rapidly accelerated fibrosarcoma); Ras, protein (Rat sarcoma); SHC, protein obsahující Src homologní doménu-2; SHP2, Src homologní protein-tyrosin-fosfatáza-2; Src, proteinkináza (od „sarcoma“); STAT, signální transducery a aktivátory transkripce; SOCS, supresory cytokinové signalizace). Upraveno podle: *Alberini et Chen, 2012; Herrington et Carter-Su, 2001 a dalších\**





### **3. AKROMEALIE**

Akromegalie se vyskytuje vzácně, její **incidence** se odhaduje na 3-4 nové případy na 1 000 000 obyvatel za 1 rok a **prevalence** na 40-60 na 1 000 000 obyvatel. Tato čísla jsou však považována spíše za mírně podhodnocená. Diagnóza akromegalie bývá obvykle stanovena až po řadě let trvání onemocnění, (odhadem až za 7-10 let), vzhledem k tomu, že klinické příznaky akromegalie se vyvíjejí velmi pomalu. Za tuto dobu se však rozvine řada změn, z nichž jsou některé již částečně nebo zcela ireverzibilní a které se podílejí na významně **zvýšené morbiditě a mortalitě**, a to převážně z důvodu kardiovaskulárního onemocnění nebo nádorů (Holdaway et al., 2004; Krsek, 2015; Rajasoorya et al., 1994).

K akromegalii vede nadměrná konstantní tvorba růstového hormonu (GH) po uzavření růstových štěrbin dlouhých kostí (Krsek, 2011), doprovázená zvýšenou sekrecí mediátoru růstového hormonu IGF-1 a často i IGFBP-3 (Wass, 1997). Etiopatogenetickým podkladem akromegalie je zpravidla **adenom hypofýzy** (Zakovicova et Zamrazil, 2009). Ve 30% případů jsou zároveň zvýšeny i sérové hladiny prolaktinu (PRL), buď vlivem smíšeného tumoru secernujícího jak GH, tak PRL, nebo útlakem stopky hypofýzy a inhibicí sekrece dopaminu (Melmed et al., 2009). K **projevům akromegalie** patří nejen zvětšování akrálních částí těla spojené se změnou vzhledu obličeje, včetně růstu dolní čelisti, nadočnicových oblouků atd., ale také vnitřních orgánů, včetně jater a srdce (Zakovicova et Zamrazil, 2009). Důsledkem koncentrické hypertrofie myokardu je relativní insuficience srdečních chlopní, diastolická i systolická dysfunkce a srdeční insuficience (Wang et al., 2014; Colao et al., 2004). Často se vyskytuje také arteriální hypertenze, poruchy lipidového metabolismu, hyperkalciurie, hyperhidróza, struma, osteoartropatie, chronické bolesti hlavy a páteře, psychické změny, zejména deprese, poruchy periferního vidění, někdy i bitemporální hemianopsie (Zakovicova et Zamrazil, 2009), spánková apnoe obstrukčního typu (Davi et al., 2008) a další změny včetně **poruchy glukózové homeostázy** (viz dále).

Pro **diagnózu** akromegalie svědčí zejména absence poklesu GH v průběhu dne pod stanovenou hodnotu (za hranici se obvykle považuje hodnota 0,4 ug/l) (Soucek, 2011). V praxi se osvědčilo vyšetřování IGF-1, jehož vylučování na rozdíl od GH (Sala et Ho, 2007) nepodléhá změnám v průběhu dne, a to jak pro screening, tak pro sledování účinnosti léčby (Brooke et Drake, 2007). Hladina IGF-1 je u akromegalie zvýšená nad horní mez podle příslušné věkové kategorie. Za rozhodující kritérium pro stanovení diagnózy akromegalie je považován orální glukózový toleranční test, při kterém nedochází po zatížení glukózou k jinak zjišťovanému poklesu hladiny GH <0,4 ng/ml (Tzanela, 2006). Za remisi je označován stav,

kdy je náhodná sérová hladina GH  $<2,5$  ug/l (RIA, nebo  $<0,1$ ug/l (ultrasenzitivní kity)) a je normální hladina IGF-1 (Giustina et al., 2014). Snížení hladin GH  $<2,5$ ug/l snižuje riziko mortality na úroveň obecné populace (Holdaway et al., 2008).

Při **léčbě** akromegalie je zpravidla třeba kombinovat více terapeutických postupů (Marek, 2014). Základem léčby je **neurochirurgický zákrok** (Guinto et al., 2012; Sala et al., 2014), který při přítomnosti hormonálně aktivního rezidua bývá doplňován radioterapií (Rim et al., 2011). V případě mikroadenomů hypofýzy (s největším rozměrem  $\leq 1$  cm) je šance na kurativní výkon 80-90%. Pokud se však jedná o makroadenomy ( $>1$  cm), je to již pouze asi 50% (Fahlbusch et al., 1997; Krsek, 2015). Preferovaná radiační léčba je **stereotaktické ozáření Leksellovým gamanožem**, resp. konformní frakcionovaná stereotaktická radioterapie a nově i protonová léčba. Doba do plného uplatnění účinku záření je několik let a po tuto dobu je nutné tlumit aktivitu onemocnění medikamentózní léčbou (Jezkova et al., 2006; Wattson et al., 2014), která v terapii akromegalie zaujímá stále významnější místo (Gustina et al., 2014). Celkově okolo 50% pacientů dosáhne biochemické remise po 10 letech od ozáření (Melmed et al., 2009). Nejdostupnějším a pro pacienta i zdravotní pojišťovnu nejméně zatěžujícím medikamentózním přípravkem je dopaminergní agonista **kabergolin**. Při podávání kabergolinu nemocným s hladinou IGF-1  $>750$  ng/l však lze očekávat jen minimální úspěch (Marek, 2014), kabergolin se ovšem osvědčil v kombinační léčbě se somatostatinovými analogy. U hormonálně aktivnějších tumorů jsou indikována depotní **somatostatinová analoga oktreotid** (Sandostatin LAR) a **lanreotid** (Somatulín Autogel), podávaná v přibližně 4 týdenních intervalech, hluboko subkutánně (Espinosa de los Monteros et al., 2014; Caron et al., 2014). Jejich použití vede k poklesu koncentrací GH do oblasti tzv. safe limits a k normalizaci IGF-1 u 70% pacientů selektovaných na základě odpovědi na léčbu a až u 44% neselektovaných (Lamberts et al., 1986). Nejúčinnějším lékem hormonálně aktivní akromegalie je **blokátor receptorů pro růstový hormon-pegvisomant** (Somavert), podávaný podkožně (Trainer et al., 2000), kterým lze v závislosti na dávce teoreticky zcela zablockovat účinky růstového hormonu. Jde ovšem o léčbu finančně náročnou. V poslední době je navíc možnost léčby pacientů multiligandovým somatostatinovým analogem **pasireotidem**, která však bude určena zřejmě jen pro menší část pacientů s akromegalií rezistentních na oktreotidovou léčbu (Petersenn et al., 2010).

K závažným komplikacím neléčené nebo nedostatečně léčené akromegalie patří **diabetes mellitus** způsobený **zvýšenou inzulínovou rezistencí** (Zakovicova et Zamrazil, 2009). Za možné příčinné faktory inzulínové rezistence se u akromegalie uvažuje **zvýšená lipolýza a**

**hladina volných mastných kyselin, porucha inzulinové signalizace, změny exprese adipokinů a snad také zánět v tukové tkáni** (Møller et al., 2009; Olarescu et al., 2012). Prevalence diabetes mellitus a porušené glukózové tolerance se u akromegalie udává v rozmezí **16-56 %** (Resmini et al., 2009). Pacienti s akromegalií a diabetem mají horší prognózu onemocnění (Droste et al., 2014). Zdá se, že stupeň glukózové tolerance koreluje s hladinou GH v séru, věkem a trváním choroby a rodinnou anamnézou diabetu (Resmini et al., 2009). Nabarro zjistil, že GH hladiny byly u akromegaliků s diabetem 19 krát vyšší než horní normální hranice ve srovnání s 10 násobným zvýšením u pacientů bez diabetu (Nabarro, 1987). Důležité je, že pacienti s akromegalií spojenou s diabetem 2. typu mají exponenciálně zvýšenou mortalitu, jelikož jak neléčená akromegalie, tak zvýšené plazmatické hladiny inzulinu u diabetu jsou spojeny se zvýšenou kardiovaskulární mortalitou a zvýšenou incidencí karcinomů (Droste et al., 2014).

Niculescu et al. popsal, že těsněji s inzulinovou rezistencí a glukózovou intolerancí u pacientů s akromegalií koreluje IGF-1 v porovnání s GH (Niculescu et al., 2013). Úspěšná léčba akromegalie s redukcí cirkulujícího růstového hormonu a hladin IGF-1 vede ke zlepšení kompenzace, snížení denních dávek inzulinu a perorálních antidiabetik (Zakovicova et Zamrazil, 2009).

#### **4. ÚLOHA KOMPONENT OSY GH/IGF-1 V METABOLISMU GLUKÓZY A PŘÍVZNIKU INZULINOVÉ REZISTENCE**

##### **4.1 GH, GH-R/GHBP a inzulinová rezistence**

Inhibiční vliv GH na účinek inzulinu potvrdila celá řada studií (Foster et al., 1988), včetně studií u akromegaliků (Hansen et al., 1986; Bolinder et al., 1986). Antagonistický účinek GH k inzulinu je dle předchozích studií zřejmě dán jednak nepřímým vlivem, tj. sekundárně skrze GH indukovanou hyperinzulinémií (reakce na relativní inzulinovou rezistenci) a **downregulaci INS-R** (Lerario et al., 1989; Muggeo et al., 1983; Pav et al., 1986) a jednak přímým vlivem **snížením** tyrosin-kinázové **aktivity INS-R** (Dominici et Turyn, 2002; Dominici et al., 2005) a aktivity **postreceptorových signálních molekul (IRS/PI3K)** (Hansen et al., 1986), případně je přítomná kombinace těchto mechanismů. Inzulin a GH spolu sdílejí některé postreceptorové signální pochody, kde důležitým místem konvergence mezi signály je dráha vedoucí k aktivaci PI3K (Dominici et Turyn, 2002).

#### **4.1.1 Tuková tkáň**

Při analýze metabolických účinků GH na tukovou tkáň je třeba zmínit mj. výsledky studie Lista et al., který popsal, že myši s cíleným **chyběním GH-R pouze v tukové tkáni** (FaGHRKO) byly obezní se zvýšeným množstvím celkového tuku, ale **nevykazovaly zlepšení v glukózové homeostáze** v porovnání s kontrolní skupinou (List et al., 2013). V jiné studii Johansen et al. uvádí, že extenzivní **redukce tukové tkáně** u obezních potkanů vyššího věku léčených GH **nezlepšila parametry inzulínové rezistence** (Johansen et al., 2005). Na základě těchto výsledků bychom se mohli domnívat, že omezení vlivu GH na tukovou tkáň, ať už redukcí množství tukové tkáně po léčbě GH nebo odstraněním účinku GH na tuk vyřazením GH-R, nemá vliv na celkovou glukózovou homeostázu. Inzulínová rezistence daná zvýšeným účinkem GH v tukové tkáni tedy zřejmě **nemá tak zásadní podíl na celkové inzulínové rezistenci**. Překvapivý byl také výsledek studie, kde odstranění viscerální tukové tkáně u myši s cíleným vyřazením genu pro GH-R nejen že nebylo spojeno s očekávaným zlepšením inzulínové senzitivity, jak bylo patrné u normálních myši, ale mělo dokonce opačný účinek (Masternak et al., 2012). Masternak tak naznačil, že při chybění signalizace GH je sekreční aktivita viscerálního tuku zřejmě významně změněna a překvapivě se podílí na zvyšování inzulínové senzitivity (Masternak et al., 2012). Nicméně přes výše uvedené výsledky (List et al., 2013; Johansen et al., 2005), které možná význam tukové tkáně v patogenezi inzulínové rezistence navozené GH mohou zpochybňovat, existuje celá řada studií, které popisují **přímé mechanismy, kterými GH narušuje účinek inzulínu v tukové tkáni** (viz dále).

Působení GH v tukové tkáni potkanů vedlo k poklesu koncentrace IRS-1, IRS-3, PI3K, ke snížené asociaci PI3K s IRS-1 a IRS-3 po krátké stimulaci inzulínem a snížené fosforylaci IRS-3 (Castro et al., 2004). U potkanů se streptozotocinovým (STZ) diabetem snižoval GH množství glukózových transportérů GLUT1 a GLUT4 v epididymálních adipocytech (Smith et al., 1997). GH pravděpodobně snižoval inzulínovou senzitivitu v lidské podkožní tukové tkáni také zvýšením fosforylace Stat5 (Nielsen et al., 2008). V 3T3-L1 adipocytech myši stimuloval GH také expresi SOCS-2 a SOCS-3 (Fleener et al., 2006), které přispívají k inzulínové rezistenci např. zprostředkováním proteasomální degradace proteinů IRS (Howard et Flier, 2006). GH snižoval sekreci adiponektinu v lidské tukové tkáni *in vitro* a u myši *in vivo*. GH také snížil expresi receptoru pro adiponektin (AdipoR2) v kultuře lidské tukové tkáně. Naopak myši s GH deficitem měly zvýšené hladiny adiponektinu (Nilsson et al., 2005). Také stimulace lipolýzy (hormon senzitivní lipázy-HSL), inhibice lipogeneze a zvýšená produkce volných mastných kyselin (VMK) a jejich snížená reesterifikace (Le Roith

et Yakar, 2007) vlivem GH může mít v adipocytech negativní vliv na inzulínovou senzitivitu stimulací akumulace monocyto-makrofágů (Yeop Han et al., 2010) nebo kompeticí s glukózou jakožto substrátem pro oxidaci, narušením inzulínové signalizace či poruchou funkce beta-buněk (Olarescu et al., 2014).

#### **4.1.2 Játra**

Játra byla v některých studiích, (mj. výše uvedená studie Johansena et al.), navržena za **primární místo inzulínové rezistence navozené GH** (Johansen et al., 2005; Dominici et al., 2005).

Vyřazení GH-R pouze v játrech (LiGHRKO) vedlo u myši k poklesu sérových hladin IGF-1, ale ke zvýšené produkci IGF-1 ve svalu a tuku a k nárůstu sérového GH a hladin leptinu, rezistinu a adiponektinu (List et al., 2014). V jiné studii u myši byla **absence GH-R v játrech** spojena se **zvýšeným množstvím INS-R** a zvýšenou inzulínem navozenou fosforylací tyrosinu na INS-R, což by mohly být adaptační změny zodpovědné za **zvýšenou inzulínovou senzitivitu** (Dominici et al., 2000). Naopak v játrech u myši se **zvýšenou expresí GH** byly nadbytek GH a s ním spojená sekundární hyperinzulinémie spojeny se **sníženou koncentrací INS-R**, přičemž fosforylace INS-R a IRS-1, asociace IRS-1/PI3K a aktivita PI3K byly maximálně aktivovány za bazálních podmínek, a tedy necitlivé k další stimulaci exogenním inzulínem *in vivo* (Dominici et al., 1999). V játrech vede GH ke zvýšení sekrece lipoproteinů s velmi nízkou denzitou (VLDL), zvyšuje aktivitu jaterní lipázy (HL), snižuje expresi receptorů PPAR $\alpha$  (receptor  $\alpha$  aktivovaný peroxisomovými proliferátory), zvyšuje tvorbu a vychytávání lipoproteinů se střední (IDL), nízkou (LDL) a vysokou (HDL) denzitou, což vše také může přispívat k inzulínové rezistenci (Le Roith et Yakar, 2007).

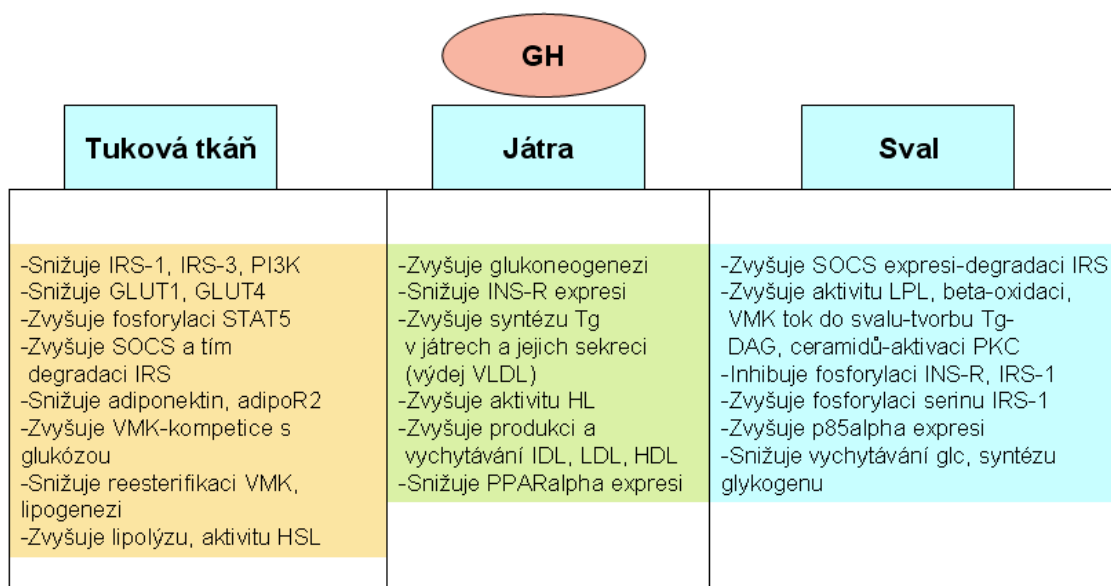
Ukázalo se, že v podmínkách inzulínové rezistence v tukové tkáni a svalech navozené GH mají játra důležitou kompenzační roli ve smyslu zvýšeného vychytávání glukózy a syntézy a akumulace glykogenu a lipidů skrze zvýšenou signalizaci IRS-2 v játrech (Cho et al., 2006). V řadě studií u inzulín-dependentního diabetu se nedostatek portálního přívodu inzulínu považuje za příčinu GH rezistence spojené se sníženým množstvím GH-R v játrech (Bereket et al., 1999; Mercado et al., 1992), potažmo se sníženou produkcí IGF-1 játry a sníženým lineárním růstem (Menon et al., 1994).

#### **4.1.3 Kosterní sval**

Na rozdíl od žádné změny v celkové glukózové homeostáze v případě GH-R-KO v tukové tkáni bylo cílené **vyřazení genu GH-R v kosterním svalu** (mGHRKO) spojeno s **lepší**

**inzulinovou senzitivitou** u obezity myši vyvolané dietou. mGHRKO myši měly na vysokotukové dietě významně menší množství tuku, nižší stupeň systémového zánětu, pokles triglyceridů ve svalu a játrech a nižší inzulinovou rezistenci v porovnání s obézními kontrolami (Vijayakumar et al., 2012). Mezi mechanismy, kterými GH působí inzulinovou rezistenci ve svalu, byly popsány GH stimulace SOCS proteinů, které zprostředkovávají proteasomální degradaci IRS proteinů, zvýšený přívod volných mastných kyselin do svalu a jejich následná reesterifikace na triglyceridy s tvorbou intermediátů jako jsou diacylglyceroly (DAG) a ceramidy, které inhibují inzulinovou signalizaci aktivací PKC (Vijayakumar et al., 2012), dále fosforylace serinu na IRS-1, která zabraňuje jeho vazbě k INS-R (Dominici et al., 2005), inhibice fosforylace INS-R a IRS-1 (Smith et al., 1997), zvýšená asociace IRS-1 s JAK2 (Johansen et al., 2005) či zvýšení exprese p85alpha podjednotky PI3K (Barbour et al., 2005).

*Obrázek 6: Principy GH indukované inzulinové rezistence* (adipoR2, receptor pro adiponektin 2; DAG, diacylglycerol; GH, růstový hormon; glc, glukóza; GLUT, glukózový transportér; HDL, lipoproteiny s vysokou denzitou; HL, jaterní lipáza; HSL, hormon senzitivní lipáza; IDL, lipoproteiny se střední denzitou; INS-R, inzulinový receptor; IRS, inzulinový receptorový substrát; LDL, lipoproteiny s nízkou denzitou; LPL, lipoproteinová lipáza; PI3K, fosfatidylinositol-3-kináza; PKC, proteinkináza C; PPAR $\alpha$ , receptor  $\alpha$  aktivovaný peroxisomovými proliferátory; p85alpha, p85alpha podjednotka PI3K; SOCS, supresory cytokinové signalizace; STAT5, signální transducer a aktivátor transkripce 5; Tg, triglyceridy; VLDL, lipoproteiny s velmi nízkou denzitou; VMK, volné mastné kyseliny).



#### **4.1.4 GH a příznivý vliv na metabolismus glukózy a inzulinovou rezistenci**

Ve většině studií tak platí, že GH je spojován s redukcí tukové tkáně a zhoršením inzulinové senzitivity. Nicméně za určitých podmínek může být vliv GH i opačný. 4 hodinová inkubace s lidským GH (hGH) **přechodně stimulovala vychytávání a oxidaci glukózy a akumulaci lipidů v diferencovaných adipocytech**. Při prodloužení inkubace na 48 hodin hGH již tyto procesy glukózového metabolismu inhiboval (Schwartz et Carter-Su, 1988). Existují i další studie, ve kterých byla léčba GH spojena s příznivým vlivem na glukózový metabolismus a inzulinovou rezistenci, např. u obézních KK-Ay myši (Hioki et al., 2004) nebo u potomků potkaních samic s podvýživou během gestace (Reynolds et al., 2013). Příznivý efekt GH na chronický zánět a inzulinovou rezistenci spojenou s dietou indukovanou obezitou ukázal Kubota et al. ve studii na myších, kde nízká dávka GH snižovala zvýšenou populaci adipocytů koexprimujících toll-like receptor/tumor nekrotizující faktor  $\alpha$  (TLR/TNF $\alpha$ ) (Kubota et al., 2008).

#### **4.1.5 GHBP a inzulinová rezistence**

U potkanů se STZ indukovaným **diabetem** byly signifikantně **snížené exprese GH-R a GHBP** v játrech ve srovnání s kontrolní skupinou (Menon et al., 1994). Studie u inzulin-dependentního diabetu popisují GH rezistenci vlivem sníženého množství GH-R (spolu s GHBP expresí) v játrech reflektovaného sníženou hladinou GHBP v séru (Bereket et al., 1999; Mercado et al., 1992; Landau et al., 2000). Ve studii u obézních pacientů však byly sérové hladiny GHBP vyšší u obézních pacientů s nealkoholickou steatózou jater (NAFLD) s vyšším stupněm inzulinové rezistence než u obézních kontrol bez NAFLD (Fusco et al., 2012). Frystyk také zjistil **zvýšené sérové hladiny GHBP u obézních pacientů s diabetem 2. typu** (Frystyk et al., 1999).

#### **4.2 IGF-1 a jeho metabolické účinky**

Peptidová struktura hormonu IGF-1 má aminokyselinovou sekvenční homologii s inzulinem (Rinderknecht et Humbel, 1978) a má tedy i inzulinu podobné účinky. Za normálních fyziologických podmínek je hlavním regulátorem glukózového a lipidového metabolismu inzulin, nicméně, jak se ukázalo, IGF-1 a komponenty jeho osy sehrávají důležitou přídatnou úlohu v glukózové a lipidové homeostáze, inzulinové senzitivitě a patogenezi diabetes mellitus (Le Roith, 1994; Rajpathak et al., 2009).

Po podání IGF-1 je typicky pozorováno **snížení glykémie, zlepšení inzulinové senzitivity a značné snížení inzulinu v séru**. Stejně jako inzulin také **IGF-1 snižuje glukózu**

**stimulovanou sekreci inzulínu z beta-buněk pankreatu**, na kterých jsou exprimovány především IGF-1R (Zhao et al., 1997). Mezi „insulin-like“ metabolické účinky IGF-1 patří především **zvýšení vychytávání glukózy** (zvýšením exprese GLUT4) (Valverde et al., 1999) **a mastných kyselin** v periferních tkáních (Russell-Jones et al., 1995; Rajpathak et al., 2009). Ačkoli význam tohoto efektu činí pouze asi 4-7 % účinku inzulínu, molární koncentrace IGF-1 v plazmě je 100-1000 násobně vyšší než koncentrace inzulínu (Rajpathak et al., 2009). Předchozí studie také ukázaly, že IGF-1 **potlačuje jaterní produkci glukózy** (Pratinapanawatr et al., 2002; Rajpathak et al., 2009) skrze **snížení exprese enzymu glukoneogeneze** fosfoenolpyruvát karboxykinázy (PEPCK) v játrech (Di Cola et al., 1997). Stejně jako GH **stimuluje IGF-1 proteosyntézu** a příznivě ovlivňuje složení těla u pacientů s deficitem GH či při katabolických stavech, např. i při léčbě glukokortikoidy. Na rozdíl od GH zvyšuje IGF-1 oxidaci lipidů, pouze když je podáván chronicky pravděpodobně jako výsledek chronické inzulínopenie (Mauras et Haymond, 2005). Melmed et al. popsali, že GH a IGF-1 mají vzájemně aditivní účinky umožňující růst s tím, že IGF-1 může zmírňovat metabolické účinky GH (Melmed et al., 2009; Fan et al., 2009).

#### **4.2.1 Význam lokální exprese IGF-1 ve vztahu k diabetu**

Ve studii se specifickým **vyřazením genu IGF-1 v játrech** u myšního modelu popsala Yakar et al. snížení sérových hladin IGF-1 o 75% a **inzulinovou rezistenci vlivem sekundárně zvýšených hladin GH** (Yakar et al., 2005 -A, -B). Rezistence k inzulínu však byla přítomna specificky pouze ve svalu. Léčba rhIGF-1 stejně jako antagonistou GHRH nebo zkřížení těchto myší s GHA (antagonistickými) transgenními myšmi (Yakar et al., 2004) vedoucí ke snížení hladin GH bylo spojeno se snížením hladin inzulínu a se zlepšením inzulínové senzitivity (Yakar et al., 2001). Tyto nálezy potvrzují, že chronické zvýšení GH se podílí na inzulínové rezistenci a také, že IGF-1 hraje roli v udržení jemné rovnováhy mezi GH a inzulínem k zajištění normálního sacharidového a lipidového metabolismu (Yakar et al., 2004). Normalizace IGF-1 v séru u myší s úplným vyřazením GH-R také vedla ke zlepšení množství tělesného tuku a normalizaci glukózové tolerance (Wu et al., 2013).

Transgenní myši se **zvýšenou expresí IGF-1 v játrech** měly o 50-60 % zvýšené sérové hladiny IGF-1 a snížené sérové hladiny GH, **zlepšenou glukózovou toleranci** a více svalové a kostní hmoty (Liao et al., 2006).

IGF-1 byl dlouho považován za růstový faktor **beta-buněk pankreatu**. Zvýšená exprese IGF-1 specificky v ostrůvkách stimulovala regeneraci beta-buněk u diabetických myší, vedla k oddálení diabetu (Liu, 2007) či k rezistenci ke STZ vyvolanému diabetu (Robertson et al.,



2008) u myši nebo částečným obnovením množství beta-buněk skrze jejich hypertrofii zlepšila glukózovou toleranci a sekreci inzulínu u myši s vyřazením genu GH-R (GH-R (-/-)) s téměř nepřítomnou expresí IGF-1 genu (Guo et al., 2005). Velmi zajímavá studie Casellas et al. ukázala, že lokální exprese **IGF-1 v pankreatu může chránit beta-buňky před diabetem 1. typu** (blokáci exprese Fas, lymfocytární infiltrace a apoptózy beta-buněk) (Casellas et al., 2006). Liu et al. se však domnívá, že za patologických podmínek nebo při vývoji organismu lokálně produkované a systémové IGF-1 pravděpodobně **nemá pozitivní vliv na růst beta-buněk**, ale je spíše negativním regulátorem uvolňování GH a inzulínu, hyperglykémie nebo exprese rodiny regeneračních genů (Reg) (Liu, 2007). Existuje i studie, ve které byl oddálený vznik diabetu 2. typu na podkladě vysokotukové diety a větší množství beta-buněk, produkce inzulínu a zachovaná citlivost na inzulín u myši se specifickou delecí IGF-1 v pankreatu (Lu et al., 2004).

**IGF-1** je také **pravděpodobným mediátorem remise diabetu 1. typu** po transplantaci embryonální hnědé **tukové tkáně** neobézním diabetickým myším. Tuková tkáň příjemců transplantátů konzistentně exprimovala IGF-1 ve srovnání s žádným nebo pouze s malým množstvím exprese u kontrolní skupiny a zvýšené sérové hladiny IGF-1 negativně korelovaly s glykemií, glukagonem a zánětlivými cytokiny. Autoři tohoto experimentu se domnívají, že **adipogenní a protizánětlivé vlastnosti IGF-1** mohou stimulovat regeneraci nové zdravé tukové tkáně, která může následně secernovat hypoglykemizující adipokiny, které částečně nahradí inzulín. IGF-1 také může přímo snížit glykémii aktivací INS-R (Gunawardana et Piston, 2015).

Zatímco inzulín a IGF-1 jsou metabolicky stejně účinné **ve svalu** nediabetiků, **u diabetiků jsou svalové buňky značně více rezistentní k inzulínu než k IGF-1**. V buňkách kosterního svalu u diabetiků byla maximální stimulace vychytávání glukózy a syntézy glykogenu inzulínem poloviční než u stimulace IGF-1 (Ciaraldi et al., 2002).

#### **4.2.2 Diabetes a hladiny IGF-1**

Několik studií u potkanů s **experimentálním** diabetem a obezitou ukázalo **snížené hladiny IGF-1 v séru i sníženou mRNA expresi IGF-1 v játrech** (Pao et al., 1992; Menon et al., 1994; Luo et Murphy et al., 1994), srdci (Menon et al., 1994; Luo et Murphy et al., 1994), **tukové tkáni** (včetně IGF-2 mRNA) (de Sevilla et al., 1994; Luo et Murphy et al., 1994), **svalu** a ledvině (Luo et Murphy, 1991). **Léčba inzulínem** byla spojena s **normalizací IGF-1** v séru (Menon et al., 1994) a nesignifikantním **vzestupem** exprese v játrech a ledvině (Luo et Murphy, 1991). U vysoce obézních Berlin Fat Mouse Inbred (BFMI) myši byly zjištěny

zvýšené sérové hladiny IGF-1, které korespondovaly s jeho expresí v játrech, ale nikoli ve svalu. Autoři se domnívají, že tyto **vysoké hladiny IGF-1 (a inzulínu) pravděpodobně chrání BFMI myši před diabetem** (Schafer et al., 2011). Podobný předpoklad, že zvýšené IGF-1 v séru vede ke zlepšení glukózové tolerance, byl i v jiné studii u obezných myši (Wan et al., 2003).

**V klinických studiích zlepšovalo podání rhIGF-1 inzulínovou senzitivitu** jak u zdravých jedinců (Russell-Jones et al., 1995), tak u pacientů s inzulínovou rezistencí a diabetem 2. typu (Moses et al., 1996), zvýšilo sekreci inzulínu u jedinců s porušenou glukózovou tolerancí (Dunger et al., 2004) a v komplexu s IGFBP-3 zlepšilo glukózovou toleranci u HIV (human immunodeficiency virus) nakažených jedinců (Rao et al., 2010). **Nízké bazální hladiny IGF-1 predikovaly rozvoj porušené glukózové tolerance**, diabetu 2. typu a kardiovaskulárních onemocnění u dospělých osob (Dunger et al., 2004). To, že má IGF-1 účinky zesilující inzulínovou senzitivitu, které jsou nezávislé na jeho schopnosti potlačovat sekreci GH, ukázala studie O'Connell et al., kde byli akromegalici s inzulínovou rezistencí léčeni GH-R antagonistou spolu s IGF-1/IGFBP-3, při kterém se inzulínová senzitivita zlepšila signifikantně více než pouze při léčbě s GH-R antagonistou (O'Connell et Clemmons, 2002).

#### **4.3 IGF-2 a glukózový metabolismus**

Během embryonálního vývoje má IGF-2 klíčovou roli v diferenciaci a organogenezi včetně adipogeneze a vývoje pankreatu (Chistiakov et al., 2012) a podílí se na regulaci růstu pankreatických ostrůvků a jejich diferenciaci (Devedjian et al., 2000). Zvýšená exprese IGF-2 ve fetálním období u myši vedla k hyperplázii beta-buněk a snížení jejich apoptózy bez změn hladin inzulínu a glukózy v séru (Petrik et al., 1999). U PEPCK-IGF-2 transgenních myši se zvýšenou expresí a sérovou hladinou IGF-2 byla signifikantně snižená inzulinémie nalačno, ale glykémie se nelišila od kontrol (Wolf et al., 1994). V jiné studii vedla zvýšená exprese IGF-2 v beta-buňkách u myši k hyperinzulinémii, inzulínové rezistenci a poruše glukózové tolerance a asi ve 30% případech k diabetu po vyskotukové dietě (Devedjian et al., 2000).

**Diabetes** byl u mladých Goto Kakizaki (GK) potkanů spojen se **zvýšenou mRNA expresí IGF-2 mRNA v ostrůvkách**, což by mohl být důsledek diabetu a zároveň možná příčina **strukturálních změn ostrůvků** včetně fibrózy a nepravidelné konfigurace (Hoog et al., 1996). U potkanů se STZ diabetem byly snižené hladiny IGF-1 v séru, ale zvýšené IGF-2 ve srovnání s kontrolní skupinou a tyto změny se normalizovaly po léčbě inzulínem (Han et al., 2006). Léčba IGF-1 snížila sekreci inzulínu a C-peptidu z buněk diferencovaných v buňky

secernující inzulín, kdežto **IGF-2 výrazně zvýšila obě sekrece**. Diferenciace stimulovaná IGF-2 byla zprostředkována INS-R (Kang et al., 2011).

Z klinického hlediska jsou důležité IGF-2 produkující tumory, které jsou většinou mezenchymového nebo epiteliálního původu a u kterých se klinicky může projevovat hypoglykémie, a to zejména u nádorů metastazujících do jater. U těchto nádorů bývá zvýšená sérová hladina IGF-2 a snížené hladiny inzulínu, C-peptidu, IGF-1 a IGFBP-3, nebo může být přítomen „velký IGF-2“ („big-IGF-2“), který působí negativní zpětnou vazbou na sekreci inzulínu a GH (Škrha, Hypoglykemický syndrom v klinické praxi-ZDN, 2002).

#### **4.4 IGF-1R a glukózový metabolismus**

U myši s vyřazením INS-R (-/-) sice rekombinantní IGF-1 (rIGF-1) snížil glykémii, avšak tyto myši po 2-3 dnech zemřely, což naznačuje, že **IGF-1R nemohou efektivně zprostředkovávat všechny metabolické účinky INS-R** (Di Cola et al., 1997). Úloha signalizace prostřednictvím IGF-1R je nejlépe patrná na experimentálních modelech s vyřazenou nebo zvýšenou expresí tohoto receptoru specificky v daném orgánu.

Asociaci mezi **vyřazením genu IGF-1R v kosterním svalu a zhoršením inzulínové senzitivity** popsalo shodně několik studií (Kim et al., 2006; Yakar et al., 2005 -B; Yakar et al., 2005 -A). Myši s vyřazením IGF-1R v kosterním svalu (neobézní diabetické myši) jsou štíhlé, ale mají hyperlipidémii, hyperinzulinémii, hyperglykémii a těžkou inzulínovou rezistenci a zvýšené hladiny triglyceridů v játrech a kosterním svalu (Li et al., 2011). Za příčinu inzulínové rezistence u tohoto modelu popisují autoři vliv lipotoxicity a zvýšení hladin triglyceridů v séru a tkáních (Yakar et al., 2005 -B; Yakar et al., 2005 -A), formaci hybridních receptorů mezi mutantními a endogenními IGF-1R a INS-R (Fernández et al., 2001), event. dysfunkci beta-buněk ve smyslu spíše poruchy sekrece inzulínu než jeho syntézy (Asghar et al., 2006).

**Vyřazení genu IGF-1R v tukové tkáni** u myšího modelu (IGF-1R<sup>ap2Cre</sup>) nevedlo ke zlepšení glukózové tolerance a inzulínové senzitivity i přes 20% zvýšení sérových hladin IGF-1 (Klötting et al., 2008). **Adipocyty těchto myši však byly citlivější k inzulínem stimulovanému vychytávání glukózy**. U těchto myši byl také zjištěn snížený počet hybridních IGF-1R/INS-R vedoucí ke **zvýšené formaci holo-INS-R** v tukové tkáni (Klötting et al., 2008). Podobně chybění IGF-1R v adipocytech hnědé tukové tkáně plodů myši bylo spojeno s vyšší inzulínovou senzitivitou skrze dráhu INS-R/IRS-1/Grb-2/MAPK vedoucí ke zvýšené mitogenní odpovědi (Mur et al., 2002).

**Zvýšení IGF-1R** proteinové exprese **v játrech** spolu s GLUT1 byla příčinou **těžkých hypoglykemií** spojených s úmrtím u myši s vyřazením von Hippel-Lindau (VHL) genu (Kurabayashi et al., 2013). Zvýšená exprese IGF-1R v neonatálních lidských hepatocytech **zvýšila bazální vychytávání glukózy** prostřednictvím GLUT1 nebo GLUT2 jak u hepatocytů s INS-R, tak bez nich (Nevado et al., 2006).

**Inhibice** aktivace **inzulinu/IGF-1R** spolu s **aktivací AMP-aktivované proteinkinázy** (AMPK) jsou mechanismy **antiproliferativních účinků metforminu** na rakovinné buňky **pankreatu**. Expozice těchto buněk hyperglykémii však vedla ke snížení antiproliferativních a apoptotických účinků metforminu vlivem silnější odpovědi IGF-1 a aktivace Akt korelující s fosforylací AMPK na serinu (Karnevi et al., 2013). Cornu et al. dále zjistil, že **zvýšení exprese IGF-1R** a jeho signalizace, závislé na autokrinní sekreci IGF-2, je mechanismus, kterým **GLP-1** zprostředkovává **ochranný antiapoptotický účinek na beta-buňky** pankreatu (Cornu et al., 2010). Specifické **vyřazení genu pro IGF-1R v beta-buňkách** nevedlo ke změněnému množství beta-buněk, ale bylo spojeno s hyperinzulinémií a **glukózovou intolerancí** (Kulkarni et al., 2002 -A, -B).

Haploinsuficience IGF-1R (heterozygotní mutace) **u člověka** vedoucí ke snížené expresi IGF-1R nebyla spojena s porušenou glukózovou tolerancí nebo hypoglykémii, což mohlo být dáno vlivem sníženého množství IGF-1R/INS-R hybridních receptorů, a tedy zvýšené hladiny INS-R/INS-R homodimerů pravděpodobně spojené se zvýšenou odpovědí na inzulín (Raile et al., 2006). Naopak **vyšší exprese hybridních receptorů** skládajících se z heterodimerů INS-R/IGF-1R, jejichž množství **negativně korelovalo s *in vivo* inzulínovou senzitivitou** v tukové tkáni a kosterním svalu diabetiků 2. typu, mohla částečně přispívat k inzulínové rezistenci, jelikož tyto receptory váží IGF-1 s vyšší afinitou než inzulín (Federici et al., 1997; Sesti et al., 2001).

#### **4.5 IGFBP-1 a glukózový metabolismus**

IGFBP-1 je jedním ze 6 homologních vazebných proteinů, produkovaných játry, které specificky vážou a modulují mitogenní a metabolické účinky IGF-1 a -2 (Lee et al., 1993). IGFBP-1 je zřejmě primárním determinantem volného IGF-1 v séru a jeho **inhibiční vliv na IGF** byl potvrzen řadou *in vitro* studií a některými *in vivo* studiemi na zvířatech (Lee et al., 1997). Skrze ovlivnění hladin volného IGF-1 může IGFBP-1 akutně **regulovat hladiny glukózy v krvi**, a to ve smyslu kontraregulačního účinku vůči inzulínu (Rajpathak et al., 2009). Ze 6 IGFBPs je IGFBP-1 jediným, který je tak dynamicky regulován a v závislosti na příjmu potravy se jeho sérové hladiny mohou měnit až 10 násobně. Jaterní produkce IGFBP-1

je snižována dodávkou inzulínu portální žílou. **Inzulín je primárním regulátorem exprese IGFBP-1** a jeho primárním účinkem je rychlá **inhibice transkripce IGFBP-1** (Lee et al., 1993). Inkubace buněk odvozených z dobře diferencovaného H35 hepatomu s inzulínem vedla ke snížení mRNA exprese IGFBP-1 o 50% skrze INS-R (Orlowski et al., 1991). Vedle inzulínu má na expresi IGFBP-1 inhibiční vliv také IGF-1 a IGF-2 (Lee et al., 1997). Transkripce IGFBP-1 je naopak stimulována např. glukagonem (Lee et al., 1993), akutním lačněním (Ooi et al., 1992) či akutní fyzickou námahou (Hoene et al., 2010; Koistinen et al., 1996), kdy snad brání hypoglykemizujícímu vlivu IGF-1.

#### **4.5.1 Asociace mezi snížením IGFBP-1 a poruchou glukózové homeostázy**

V mnoha studiích byla potvrzena silná inverzní asociace mezi IGFBP-1 a koncentracemi inzulínu (Rajpathak et al., 2009). V **experimentálních studiích** u myši byla obezita a hyperinzulinémie spojena se sníženou **jaterní** expresí IGFBP-1 (i GLUT4) (Hoffler et al., 2009). Naopak zvýšená IGFBP-1 exprese **v játrech** byla zjištěna u myších modelů zvýšené inzulínové senzitivity a glukózové tolerance (Younis et al., 2011) a u Nrf2-null (nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2) myši byla možná jedním z mechanismů, které sice nezabránilo obezitě vyvolané dietou, ale vedly ke zlepšení glukózové homeostázy (Zhang et al., 2012).

V **klinických studiích** např. u diabetiků 1. typu s deficitem inzulínu byly zjištěny vysoké hladiny IGFBP-1 a snížené hladiny volného IGF-1 (Frystyk et al., 1999; Krsek et al., 2003). V jiných studiích **nízké hladiny IGFBP-1 predikovaly dlouhodobě rozvoj diabetu 2. typu** a porušené glukózové tolerance u populace středního věku (Petersson et al., 2009) a také mortalitu na ischemickou chorobu srdeční (Laughlin et al., 2004) a byly spojeny s metabolickým syndromem (Kalme et al., 2005), porušenou glukózovou tolerancí a diabetem (Rajpathak et al., 2008; Heald et al., 2001). Byla také popsána inverzní asociace mezi IGFBP-1 v séru a kardiovaskulárními rizikovými faktory (Heald et al., 2001) a makrovaskulárními komplikacemi (Wheatcroft et al., 2003).

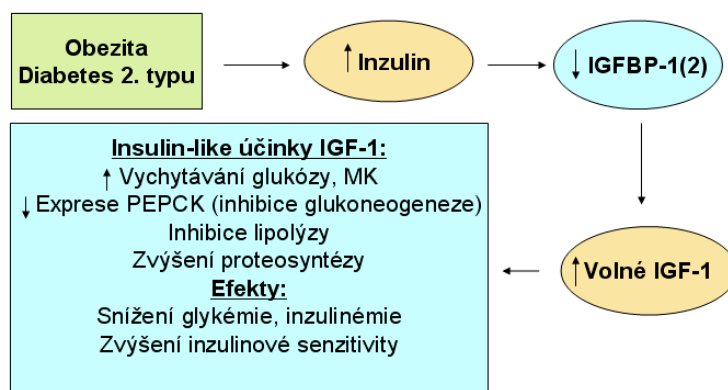
#### **4.5.2 Asociace vysokých hladin IGFBP-1 a inzulínové rezistence**

Existují však také studie, kde jsou vysoké hladiny IGFBP-1 spojeny se stavy inzulínové rezistence. U potkanů s **experimentálním** diabetem byl **diabetes** spojen většinou se **vzestupem IGFBP-1** v séru a jeho expresí v játrech a tyto změny byly **normalizovány léčbou inzulínem** (Han et al., 2006; Pao et al., 1992, Luo et al., 1992). U IGFBP-1 transgenních myši v jiné studii byla zjištěna růstová retardace, porušená tolerance glukózy a mírná inzulínová rezistence v kosterním svalu a játrech (Murphy, 2000). Chirurgické

odstranění viscerálního tuku u mírně obézních potkanů bylo spojeno s asi 70% poklesem IGFBP-1 v séru a se zlepšením jaterní inzulínové senzitivity (Barzilai et al., 1999).

Z uvedených studií vyplývá, že vztah mezi hladinami IGFBP-1 a stavem glukózové homeostázy není jednoznačný. Rajpathak et al. se domnívá, že s nárůstem inzulínové rezistence u obezity a diabetu vedou **rostoucí hladiny inzulínu** ke zvýšení produkce jaterního IGF-1 a zároveň ke **snížení produkce IGFBP-1** a jeho sérových hladin, a tím ke **zvýšení hladin volného bioaktivního IGF-1**, což by mohl potenciálně být **kompensační mechanismus při inzulínové rezistenci**. Popisovány byly však také **zvýšující se hladiny IGFBP-1** během trvání diabetu 2. typu zřejmě v důsledku narůstající **inzulínové rezistence** (Rajpathak et al., 2009). Vysoká jaterní inzulínová rezistence byla zřejmě také důvod, proč intenzivní inzulínová léčba u pacientů na intenzivní péči neměla vliv na jaterní ani sérové hladiny IGFBP-1 (Mesotten et al., 2002).

*Obrázek 7: Kompensační zvýšení volného IGF-1 při inzulínové rezistenci a jeho „insulin-like“ účinky (IGF-1, inzulínu podobný růstový faktor-1; IGFBP, IGF-vazebný protein; MK, mastné kyseliny; PEPCK, fosfoenolpyruvát karboxykináza).*



#### **4.6 IGFBP-2 a glukózový metabolismus**

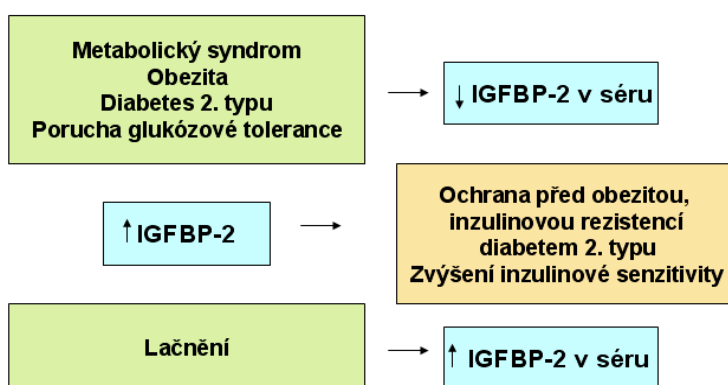
Fyziologická úloha IGFBP-2 a jeho metabolická regulace u lidí zůstává stále objasněna jen částečně. Z některých předchozích studií se zdá, že **hladiny IGFBP-2** jsou spíše než akutními změnami inzulínu, (jako je tomu u IGFBP-1) (Arafat et al., 2009), **ovlivňovány chronicky zvýšenými hladinami inzulínu**, např. u inzulín-rezistentních jedinců. Sérové hladiny IGFBP-2 se u zdravých subjektů nezměnily po zvýšení inzulínémie postprandiálně, po infúzi glukózy, po akutní stimulaci inzulínem (Clemmons et al., 1991) ani po orálním glukózovém

tolerančním testu (Chen et al., 2006), zatímco **lačnění** bylo v jiné studii spojeno s přechodným **vzestupem IGFBP-2** v séru (Chen et al., 2005; Clemmons et al., 1991).

Ve studii Arafata et al. byl **IGFBP-2 nezávislý prediktor bioaktivity IGF-1 a inzulínové senzitivity**. Subjekty s **porušenou glukózovou tolerancí** zde měly **snížené hladiny IGFBP-2** v séru (spolu s IGFBP-1) (Arafat et al., 2009). Nízké hladiny IGFBP-2 byly zjištěny dále např. u metabolického syndromu (Heald et al., 2006), u dětí narozených jako SGA (small for gestational age) negativně korelovaly s kardiovaskulárními rizikovými faktory včetně HOMA-indexu (de Kort et al., 2010). Yau a Wheatcroft popisují, že IGFBP-2 bývá snížen u obezity a diabetu 2. typu a že **zvýšená exprese IGFBP-2 u myší chrání před obezitou a inzulínovou rezistencí/diabetem 2. typu** (Yau et al., 2014; Wheatcroft et al., 2007).

U obézních prepubertálních dětí koreloval sérový IGFBP-2 pozitivně s inzulínovou senzitivitou (Claudio et al., 2010). Tyto nálezy se mohou zdát překvapivé v tom smyslu, že IGFBP-2 by měl snižovat biologickou dostupnost IGF-1 (Wheatcroft et al., 2007), který má metabolicky příznivé účinky. IGFBP-2 mRNA exprese v podkožní tukové tkáni břicha obézních prepubertálních dětí v této studii pozitivně korelovala s procentem tukové tkáně nezávisle na inzulínové senzitivitě, s kterou však korelovala negativně (Claudio et al., 2010). Několik studií také ukázalo, že hladina IGFBP-2 je pozitivně ovlivňována leptinem. **Leptin zvýšil IGFBP-2** mRNA i protein v lidských svalových buňkách i u ovcí v kosterním svalu paralelně se **zvýšením inzulínové signalizace** a zlepšením glukózové tolerance (Yau et al., 2014).

Obrázek 8: IGFBP-2 a glukózový metabolismus (IGFBP-2, IGF-vazebný protein-2).



#### **4.7 IGFBP-3 a glukózový metabolismus**

IGFBP-3 je nejvíce zastoupeným vazebným proteinem IGF-1 v séru, váže asi 80-90% cirkulujícího IGF-1 v tzv. ternárním komplexu (Rajpathak et al., 2009; Hall et al., 1999), čímž **snižuje jeho biologickou dostupnost**, a tak potenciálně **zvyšuje riziko diabetu** (Rajpathak et al., 2009). Biodostupnost IGF-1 může být u subjektů s inzulínovou rezistencí zvýšena stimulací IGFBP-3 proteolytické aktivity (IGFBP-3 PA), která je také regulována inzulínem (Bang et al., 1998).

Jak studie experimentální, tak klinické však přinášejí z hlediska vzájemného vlivu poruch glukózového metabolismu a hladin IGFBP-3 **nesourodé výsledky**.

Podle některých experimentálních studií je transgenně **zvýšená exprese IGFBP-3** u myši spojena s **porušenou glukózovou tolerancí, inzulínovou rezistencí**, sníženým vychytáváním glukózy ve svalu a tukové tkáni (Chan et al., 2005; Silha et al., 2002; Kim et al., 2007) a snížením syntézy glykogenu (Kim et al., 2007). IGFBP-3 v tukové tkáni také snižoval translokaci GLUT4 na plazmatickou membránu, snižoval fosforylaci Akt (Chan et al., 2005), fosforylaci INS-R a expresi adiponektinu v adipocytech (Kim et al., 2007). Zvýšená exprese hIGFBP-3 v beta-buňkách pankreatu u myši zpomalila clearance inzulínu a snížila sekreci inzulínu stimulovanou glukózou v ostrůvkách (Nguyen et al., 2011). Myši se zvýšenou expresí mutovaného IGFBP-3, bez schopnosti vazby IGF-1, měly inzulínovou rezistenci v souvislosti s hyperplázií beta-buněk, ale myši se zvýšenou expresí normálního IGFBP-3 měly menší množství beta-buněk a sníženou sekreci inzulínu (Nguyen et al., 2015). Zajímavé je, že zvýšené hladiny inzulínu a glukózy nalačno měly také myši s vyřazeným genem pro IGFBP-3. Vyřazení tohoto genu zde však pravděpodobně souviselo s relativně normální glukózovou tolerancí po stimulaci inzulínem (zachovanou citlivostí na inzulín) i přes snížený bazální metabolismus, vyšší hmotnost, zvýšenou bazální jaterní produkci glukózy a jaterní steatózu těchto myši (Yamada et al., 2010).

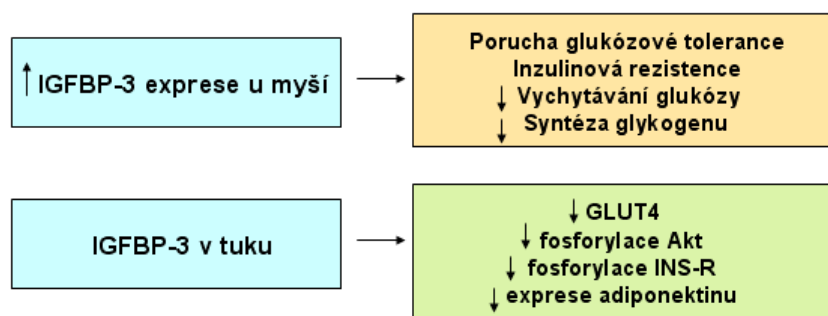
Jednou z funkcí IGFBP-3 nezávislých na IGF je jeho úloha protizánětlivé molekuly. Ukázalo se, že může mít **úlohu v rozvoji inzulínové rezistence vyvolané cytokiny**. Ve studii Kima et al. zabránil blokátor IGFBP-3 částečně inhibičnímu vlivu TNF $\alpha$  na glukózový transport (Kim et al., 2007). V jiné studii na lidských adipocytech však IGFBP-3 naopak blokoval TNF $\alpha$  indukovanou inhibici vychytávání glukózy na IGF nezávislým způsobem (Mohanraj et al., 2013).

Na rozdíl od IGFBP-1 **koreluje IGFBP-3 pozitivně s hladinami inzulínu** a C-peptidu nalačno a uvádí se, že **vysoké hladiny IGFBP-3** mohou být **rizikovým faktorem inzulínové rezistence a diabetu 2. typu** (Rajpathak et al., 2009). U potkanů se STZ indukovaným



diabetem byly však zjištěny snížené hladiny IGFBP-3 v séru i v játrech a tyto změny byly léčbou inzulínem normalizovány (Han et al., 2006). Cordain et al. ale popsal, že hyperinzulinémie snižuje IGFBP-3 (Cordain et al., 2003). Existují klinické studie, kde byly u **pacientů s diabetem 2. typu** (Yamada et al., 2010) či obezitou (Krsek et al., 2003) zjištěny **snížené sérové hladiny IGFBP-3, ale také zvýšené sérové hladiny IGFBP-3** (Frystyk et al., 1999). U obézních adolescentů byla pozitivní korelace mezi IGFBP-3 protelozou a ukazately obezity a inzulínové rezistence (Mohanraj et al., 2013). Pacienti s diabetem 1. typu měli buď normální (Frystyk et al., 1999) nebo snížené hladiny IGFBP-3 (Thraikill, 2000; Krsek et al., 2003).

Obrázek 9: **IGFBP-3 a glukózový metabolismus** (GLUT, glukózový transportér; IGFBP-3, IGF-vazebný protein-3; INS-R, inzulínový receptor).



Pokud shrneme závěry z dosud provedených prací, ukazuje se, že u **pacientů s obezitou a diabetem 2. typu jsou nejčastěji zjišťovány normální** (Frystyk et al., 1999) **nebo snížené** (Rasmussen et al., 2006) **hladiny celkového IGF-1, zvýšené hladiny volného IGF-1, snížené hladiny IGFBP-1 a -2, normální nebo zvýšené hladiny IGFBP-3, snížené hladiny GH a zvýšené hladiny GHBP** (Scacchi et al., 1999; Frystyk et al., 1999).

#### **4.8 Regulace IGF komponent hladinou glukózy**

V kultuře hepatocytů potkaních fětů vedla glukóza (5-20 mmol/l) ke **zvýšení IGF-1 a IGF-2 mRNA exprese** a paralelně i sekrece jejich peptidů (Goya et al., 1999). V ostrůvkách pankreatu u potkanů vedla 24 h expozice hyperglykémii (25 mmol/l) ke **zvýšení genové exprese IGF-1R a INS-R** (Raile et al., 2005).

Expozice přechodné vysoké koncentraci glukózy snížila uvolňování IGF-1 a IGFBP-2 v kultuře fetálních neuroepiteliálních buněk a potlačila růst indukci apoptózy, čímž by hyperglykémie mohla přispívat k rozvoji **diabetické neuropatie** (Giannini et al., 2008).

V jiné studii bylo zjištěno, že hyperglykémie způsobuje signální „switch“ u endoteliálních vaskulárních buněk a buněk hladkého svalstva, který naopak vede ke zvýšené citlivosti k růstovým účinkům IGF-1, což se může uplatňovat **v patogenezi retinopatie a aterosklerózy** (Clemmons et al., 2011).

Hladiny glukózy samy o sobě nezávisle na hladinách inzulínu hrají také roli v regulaci IGF-1R v ledvině potkanů s chronickým trváním diabetu (Weiss et al., 1995). Vysoká hladina glukózy (25 mmol/l) zvýšila exprese proteinů IGF-1, IGF-1R a IRS-1 v mezangiálních buňkách jak u experimentálního modelu ROP (glomerulosclerosis-prone ragged, oligosyndactylism, pintail) myši náchylných ke glomeruloskleróze, tak u kontrolních myši rezistentních ke glomeruloskleróze (Fornoni et al., 2006). V jiné studii pak vysoká koncentrace glukózy (25 mmol/l) v myších mezangiálních buňkách snížila mRNA expresi i sekreci IGFBP-2, což by mohlo souviset se zvýšením citlivosti mezangiálních buněk k IGF-1 a proliferační odpovědi vedoucí k rozvoji **diabetické glomerulosklerózy** (Horney et al., 1998). Studie na prasečích epiteliálních buňkách proximálních tubulů zas naznačila, že zvýšený oxidační stres daný vysokou glykemií zvyšuje IGFBP-3 expresi vedoucí k apoptóze těchto buněk (Yoo et al., 2011).

Zajímavé je, že **inhibiční vliv inzulínu na mRNA expresi a sekreci IGFBP-1** z izolovaných potkaních hepatocytů **vymizel s rostoucí koncentrací glukózy** (Arany et al., 1993).

Sekrece IGFBPs z fetálních potkaních ostrůvků pankreatu byla pozitivně spojena s koncentracemi glukózy nad fyziologické rozmezí (Hill et al., 1992).

## **5. VÝZNAM P85ALPHA PODJEDNOTKY PI3K (FOSFATIDYLINOSITOL-3-KINÁZY) V METABOLISMU GLUKÓZY A PŘI VZNIKU INZULINOVÉ REZISTENCE**

**PI3K** patří do třídy 1A 3-kináz (Sheperd et al., 1998), je ústřední komponentou evolučně konzervované signální dráhy GH/IGF-1 a inzulínu a přenosem signálů z odpovídajícího receptoru na další signální molekuly (Wang et al., 2013) zprostředkovává a reguluje jak **metabolické účinky inzulínu**, tak **účinky GH/IGF-1 stimulující růst** (Luo et al., 2006).

### **5.1 Podjednotky PI3K**

PI3K je heterodimerický enzym složený z **regulační podjednotky p85** (p85alpha, p55alpha, p50alpha nebo p85beta), která je pevně spojena skrze C-terminální strukturu, sestávající ze dvou SH2 domén, s **katalytickou podjednotkou p110** (p110alpha nebo p110beta) (Ueki et

al., 2000), přičemž každá z nich existuje v několika izoformách. Dvě hlavní regulační izoformy jsou p85alpha (Pik3r1) a p85beta (produkty dvou genů) a třetí genový produkt je p55gamma. Navíc jsou známy tři varianty splicingu p85alpha, a to p85alpha, p55alpha a p50alpha, které tvoří 70-80% celkové regulační podjednotky PI3K. **P85alpha** se z nich však jeví jako **nejzastoupenější izoforma** (Draznin, 2006). Varianty splicingu **p50alpha a p55alpha** jsou podobně jako p85alpha také exprimovány ve tkáních citlivých na inzulín jako je tuk, svaly a játra a mají **důležitou úlohu při inzulínové signalizaci** (Chen et al., 2004). P50alpha také tvoří heterodimer s p110 a má značně vyšší kapacitu aktivovat asociovanou PI3K po stimulaci inzulínem a má vyšší afinitu k IRS-1 fosforylovanému na tyrosinu než jiné varianty (Inukai et al., 1997).

### **5.2 Interakce p85alpha s ostatními molekulami inzulínové signální kaskády**

PI3K je stimulována asociací s receptory pro tyrosin-kinázu a intracelulárními substráty fosforylace tyrosinu (Inukai et al., 1997). **Interakce mezi IRS proteiny a PI3K** je součástí všech tří signálních drah **inzulinu, IGF-1 a GH** (Trobec et al., 2011) (Obrázek 5). V adipocytech hnědé tukové tkáně potkaních plodů inzulín/IGF-1 stimuloval fosforylaci tyrosinu na IRS-1 a IRS-2, jejich asociaci s p85alpha a aktivaci PI3K (Valverde et al., 1998). V jiné studii inzulín/IGF-1 stimuloval **vazbu INS-R/IGF-1R k IRS-1/IRS-2 a vazbu IRS-1/IRS-2 k p85alpha** (Talbot et al., 2012). V několika studiích se pokles hladin p85alpha vyskytoval simultánně s poklesem dalších intermediárních molekul a s PI3K spojených proteinů zapojených v inzulínové signální dráze **včetně INS-R** (Colomiere et al., 2009; Fernandez-Twin et al., 2014; Ishizuka et al., 1999). Při inhibici PI3K v izolovaných adipocytech došlo ke zvýšení inzulínem stimulované fosforylace IRS-1 na tyrosin-vazebných místech pro p85alpha, což bylo spojeno se zvýšenou asociací s p85alpha. To naznačuje zpětnovazebnou regulaci mezi p85alpha a INS-R-IRS-1 (Hers et al., 2002).

### **5.3 Mechanismy přímého negativního účinku p85alpha na signální dráhu PI3K/Akt**

Inhibiční vliv zvýšené exprese p85alpha na signalizaci inzulínem/IGF-1 byl v dřívějších pracech zdůvodňován několika mechanismy, a to jak na PI3K závislými (Draznin, 2006), tak na PI3K nezávislými (Chagpar et al., 2010).

Luo et al. popsal, že p85alpha regulační podjednotka je nutná k zajištění na inzulínu závislém přesunu PI3K do plazmatické membrány (Luo et al., 2005). Yu et al. popsal dva vlivy p85alpha na p110alpha: konformační stabilizaci katalytické podjednotky a inhibici její kinázové aktivity (Yu et al., 1998). Ueki i Brachmann dále naznačili, že optimální signalizace

dráhy PI3K závisí na kritické molekulární rovnováze mezi regulačními a katalytickými podjednotkami a proteiny IRS (Ueki et al., 2002 -B; Brachmann et al., 2005).

Jedna hypotéza negativního vlivu p85alpha na PI3K aktivitu předpokládá, že za normálních okolností existuje **regulační podjednotka ve stechiometrickém nadbytku ke katalytické podjednotce**, což vede k určitému počtu volných monomerů p85alpha, které nejsou spojeny s p110alpha katalytickou podjednotkou. Dle autorů tak zvýšení nebo snížení exprese p85alpha posouvá rovnováhu buď ve prospěch **volné p85alpha** nebo **p85alpha-p110alpha komplexů**, přičemž **pouze komplexy jsou zodpovědné za aktivitu PI3K**. A jelikož p85alpha monomer a p85alpha-p110alpha heterodimer **soutěží spolu o stejné vazebné místo** na tyrosin-fosforylovaném IRS proteinu, tato nerovnováha pak může vést buď ke **zvýšené nebo ke snížené PI3K aktivitě** (Draznin, 2006).

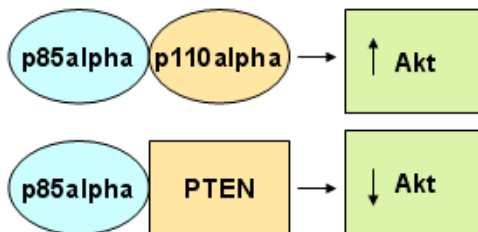
Luo dále naznačil další možnost přímého inhibičního vlivu p85alpha na PI3K signalizaci, a to sice formací **sekvestračního komplexu** mezi p85alpha a IRS-1, která vede k signální inhibici IRS-1 (Luo et al., 2005).

#### **5.4 Mechanismy nepřímého negativního účinku p85alpha na signální dráhu PI3K/Akt**

Ueki však ve studii, kde p85alpha (-/-) buňky měly 50% snížení aktivity PI3K, ale jen 30% snížení aktivity Akt (Ueki et al., 2003), naznačil existenci mechanismů, kterými regulační podjednotky upravují signály vedené PI3K nezávisle na její kinázové aktivitě, distálně od PI3K, prostřednictvím interakce s dalšími signálními molekulami (Ueki et al., 2000). Také Brachmann naznačil, že **p85 podjednotky mohou hrát negativní roli v inzulinové signalizaci nezávisle na jejich roli coby mediátory PI3K aktivace** (Brachmann et al., 2005), a to několika dalšími mechanismy, např. skrze JNK (Taniguchi et al., 2007), glykogen syntázu (Ueki, 2003), akumulaci nukleárního X-box-vazebného proteinu-1 (XBP-1) (Winnay et al., 2010) aj.

Jiná a asi pravděpodobnější hypotéza (Chagpar et al., 2010) předpokládá, že p85alpha je duální regulační protein jak pro p110-PI3K, tak pro PTEN-PIP3 fosfatázu. **P110-PI3K vede k tvorbě klíčového signálního lipidu PIP3, který je defosforylován PIP3-fosfatázou-PTEN na PIP2** (Obrázek 5). Chagpar et al. prokázal, že **p85alpha** se může přímo vázat a **stimulovat aktivitu fosfatázy PTEN**, což vede k defosforylaci PIP3, a tedy ke **snížení aktivity Akt**.

Obrázek 10: Účinky p85alpha na aktivitu Akt (Akt, proteinkináza Akt; p85alpha, p85alpha podjednotka PI3K (fosfatidylinositol-3-kinázy); p110alpha, p110alpha podjednotka PI3K; PTEN, phosphatase and tensin homolog).



Inhibiční účinek p85alpha na p110alpha katalytickou aktivitu se ukázal být závislý na p85 N-konci (SH3-BH (Bcl-2 homologní) doména p85alpha), což je v souladu s tím, že PTEN interaguje právě s touto oblastí p85alpha, jak se dříve spekulovalo. Tato oblast však není přítomná u menších izoform p55alpha a p50alpha (Chagpar et al., 2010). P85alpha váže a stabilizuje preferenčně p110alpha, proto když je p85alpha v nízké koncentraci, je všechna vázána na p110alpha (Ueki et al., 2002 -B). Ve chvíli, **kdy je p110alpha satureována, může se přebývající volná p85alpha vázat na PTEN** a pozitivně regulovat její fosfatázovou aktivitu. PI3K signalizace je u normálních myši přechodná jako výsledek **rovnováhy mezi produkcí PIP3 stimulovanou komplexem p85alpha-p110alpha a defosforylací PIP3 stimulovanou komplexem p85alpha-PTEN** (Chagpar et al., 2010). Taniguchi zjistil, že myši se sníženou expresí p85alpha v játrech měly zvýšenou aktivitu Akt, což bylo spojeno se zlepšenou inzulínovou senzitivitou, a tato zvýšená aktivita Akt korelovala se zvýšením hladiny PIP3, které bylo dáno alespoň částečně sníženou aktivitou PTEN (Taniguchi et al., 2006).

### 5.5 Vliv změn exprese p85alpha na inzulínovou/IGF-1 signalizaci-experimentální studie

Pokud jsou tedy hladiny **p85alpha snižené**, např. při heterozygotním vyřazení Pik3r1/p85alpha (-/+), dochází k selektivnímu **poklesu komplexu p85alpha-PTEN**, ale k téměř normálnímu množství komplexu p85alpha-p110alpha, což vede k poruše PTEN zprostředkované PIP3 defosforylace a k trvale zvýšeným hladinám PIP3, zvýšené aktivitě Akt a **zvýšené inzulínové senzitivě** (Chagpar et al., 2010).

V experimentálních studiích pak heterozygotní vyřazení p85alpha (p85+/-), resp. snížení p85alpha, vedlo k zachování inzulínové senzitivity u myši i přes těžkou obezitu (McCurdy et al., 2012), ochraně před diabetem u inzulín-rezistentních myši (Mauvais-Jarvis et al., 2002), zlepšení inzulínové senzitivity u obézních myši (Moriarty et al., 2009) či ke snížení

akumulace makrofágů do tukové tkáně, prozánětlivé genové exprese a sekrece chemokinů u myši s obezitou (McCurdy et al., 2012).

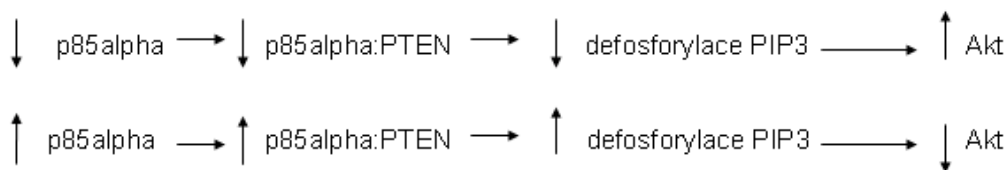
Ueki uvedl, že heterozygotní vyřazení *Pik3r1* vedoucí ke zvýšení produkce PIP3 a aktivity Akt je spojeno také se **sníženou apoptózou** vlivem zvýšené signalizace IGF-1 (Ueki et al., 2002 -B). Snížení množství p85alpha tak bylo navrženo jako možná **strategie jak zvýšit signalizaci inzulínu/IGF-1** a případná cesta k **prodloužení přežívání buněk, prevenci apoptózy buněk** (Ueki et al., 2002 -B) nebo **k léčbě diabetu 2. typu** (Mauvais-Jarvis et al., 2002).

**Pokud p85alpha úplně chybí** při homozygotním vyřazení (*p85alpha (-/-)*), může ji nahradit **p50alpha** a regulovat aktivitu p110alpha. P50alpha však není schopná pozitivně regulovat PTEN, jelikož postrádá pro tuto vazbu nezbytnou SH3-BH doménu, což v konečném důsledku ústí také ve zvýšenou a trvalou aktivitu PI3K Akt a **zvýšenou inzulínovou senzitivitu** (Chagpar et al., 2010). U myši s úplným vyřazením genu pro p85alpha (*Pik3r1 (-/-)*) bylo zvýšeno vychytávání glukózy v bílé tukové tkáni a kosterním svalu a lepší inzulínová senzitivita vlivem zvýšené produkce PIP3 (Terauchi et al., 2004; Terauchi et al., 1999). Zajímavé je, že i *p55alpha/p50alpha* dvojitý knockout ve svalu u myši byl spojený se zvýšenou inzulínovou senzitivitou (Chen et al., 2004).

V Hallmanově studii na „*p85alpha null*“ embryonálních kmenových buňkách byla ztráta p85alpha spojena s narušenou IGF-1 signalizací, menším vzrůstem, poruchami regulace buněčného cyklu a zvýšenou apoptózou (Hallman et al., 2003). **Ztráta kompletní signalizace třídy 1a PI3K** (*p85alpha/p55alpha/p50alpha* i *p85beta*) v kosterním svalu u myši vedla k **těžké poruše signalizace PI3K**, inzulínové rezistenci ve svalu, celotělové glukózové intoleranci, zvýšenému obsahu tuku v těle a ke snížení hmotnosti svalů a velikosti svalových vláken (Luo et al., 2006). **Úplný „PI3K knockout“** pak byl **letální**.

V několika studiích naopak **zvýšená exprese p85alpha** významně **inhibovala aktivitu PI3K ve svalu** u transgenních myši nebo v kulturách svalových buněk (Barbour et al., 2004; Giorgino et al., 1997; Singleton et al., 2000).

Obrázek 11: Vlivy změn exprese p85alpha na aktivitu Akt (Akt, proteinkináza Akt; p85alpha, p85alpha podjednotka PI3K (fosfatidylinositol-3-kinázy); PIP3, fosfatidylinositol-3-fosfát; PTEN, phosphatase and tensin homolog).



## **5.6 Vliv inzulinové rezistence na expresi p85alpha-experimentální i klinické studie**

Avšak nejen, že p85alpha reguluje účinek inzulinu/IGF-1, platí i opačná interakce, že **inzulin je významným regulátorem p85alpha podjednotky.**

P85alpha v kontextu inzulinové rezistence zkoumalo velký počet studií s tím, že inzulinová rezistence byla spojena jak se **zvýšenou** (Catalano et al., 2002; Friedman et al., 1999; Bandyopadhyay et al., 2005; Cornier et al., 2006), tak se **sníženou nebo nezměněnou** (Colomiere et al., 2009; Colomiere et al., 2010; Anai et al., 1998; Kerouz et al., 1997; Ishizuka et al., 1999; Shao et al., 2000) **p85alpha mRNA expresí.**

### **5.6.1 Zvýšená bazální hladina exprese p85alpha u inzulinové rezistence**

Zvýšená bazální hladina exprese p85alpha byla zjištěna v **klinických pracech** např. v tukové tkáni u žen s gestačním diabetes mellitus (GDM) (spolu se snížením IRS-1) (Catalano et al., 2002), dále v kosterním svalu u diabetiků 2. typu a obézních (Tsuchida et al., 2002; Bandyopadhyay et al., 2005), v kosterním svalu u osob na vysokotukové dietě (Adochio et al., 2009), u těhotných žen nebo u žen s GDM (Friedman et al., 1999). Zvýšení exprese p85alpha v kosterním svalu označil Cornier et al. za jednu z možných prvních molekulárních poruch v mechanismu inzulinové rezistence spojené s přejídáním u lidí (Cornier et al., 2006). Ukázalo se, že zvýšení p85alpha exprese hraje také klíčovou roli v inzulinové rezistenci a svalové atrofii vyvolané glukokortikoidy (Kuo et al., 2012; Singleton et al., 2000). **Experimentálně** pak byla zvýšená p85alpha také v tukové tkáni u obézních myší krmených vysokotukovou dietou (McCurdy et al., 2012).

### **5.6.2 Snížená bazální hladina exprese p85alpha u inzulinové rezistence**

Některé **klinické práce** však ukázaly sníženou p85alpha expresi často spolu s dalšími molekulami inzulinové signální kaskády, včetně GLUT4 (Colomiere et al., 2009; Colomiere

et al., 2010; Vaag et al., 2006), IRS-1 a p110 (Ozzane et al., 2006) u obezity či inzulín-rezistentních stavů, např. v placentě (Colomiere et al., 2009) nebo kosterním svalu (Colomiere et al., 2010) žen s GDM léčených inzulínem s ještě nižší expresí u obézních z nich (Colomiere et al., 2009) či v tukové tkáni u mužů s nízkou porodní hmotností (Ozzane et al., 2006) nebo ve svalu u osob narozených jako SGA (Vaag et al., 2006). **Experimentálně** pak v tuku u potomků obézních myší (Fernandez-Twinn et al., 2014), v játrech myšního *ob/ob* modelu inzulínové rezistence a obezity/diabetu 2. typu (Kerouz et al., 1997; Anai et al., 1998) nebo v kosterním svalu u myší s GDM (Ishizuka et al., 1999).

### **5.6.3 Vliv akutní stimulace inzulínem na expresi p85alpha**

U **zdravých** štíhlých kontrolních subjektů vedla akutní hyperinzulinémie (clampy) v několika studiích ke **zvýšení exprese p85alpha v podkožní tukové tkáni** (Faraj et al., 2008; Faraj et al., 2006; Ducluzeau et al., 2001; Andreelli et al., 1999) nebo ve svalu (Lefai et al., 2011, Ducluzeau et al., 2001, Andreelli et al., 1999), a to i u dospělých s GH deficitem před i po 1 roce léčby rhGH (Khalfallah et al., 2001). Avšak **u diabetiků 2. typu či osob s inzulínovou rezistencí nebyla tato stimulace** zřejmě pro defekt v regulaci a účinku inzulínu na **p85alpha přítomna** (Lefai et al., 2001; Ducluzeau et al., 2001; Andreelli et al., 1999).

V některých studiích však byl pozorován stimulační efekt inzulínu na p85alpha i u subjektů s obezitou, inzulínovou rezistencí a/nebo diabetem (Anai et al., 1999; Tsuchida et al., 2002), konkrétně např. ve studii u inzulín-rezistentních nediabetických obézních pacientů, u hyperglykemických diabetiků 1. typu ve svalu a tukové tkáni (Ducluzeau et al., 2001) a ve svalu u mužů s nízkou porodní hmotností (Jensen et al., 2008).

**Experimentálně** byla snížena inzulínem stimulovaná fosforylace tyrosinu p85alpha ve svalu a tukové tkáni u modelu myší s obezitou, inzulínovou rezistencí a diabetem 2. typu (Shao et al., 2000). U jiného potkaního modelu inzulínové rezistence nevedl inzulín ke změně množství p85alpha asociované s fosfo-tyrosinem IRS oproti kontrolním potkanům (Furuhata et al., 2002). Nicméně v játrech potkanů na vysokotukové dietě inzulín zvýšil p85alpha a aktivity spojené s aktivací PI3K a IRS-1 a -2. (Anai et al., 1999).

## **5.7 GH regulace p85alpha exprese a vztah k inzulínové rezistenci**

P85alpha je jedním ze souboru identifikovaných genů regulovaných GH (např. spolu se SOCS2, IGF-1 aj.) (Chen et al., 2009). Důležitá úloha GH při regulaci exprese p85alpha podjednotky byla prokázána v bílé tukové tkáni u myší. Exprese p85alpha byla snížena v bílé



tukové tkáni myši s izolovaným deficitem GH a došlo k rychlému navýšení její exprese po podání GH. Naopak u myši s chronickým nadbytkem GH byla p85alpha exprese v tuku zvýšená a ke zvýšení došlo také v 3T3-F442A adipocytech při jejich léčbě/inkubaci s GH. Ukázalo se, že **GH skrze regulaci exprese p85alpha ovlivňuje aktivitu PI3K v tukové tkáni**. Inzulinem stimulované zvýšení aktivity PI3K bylo signifikantní u myši s GH deficitem, ale nikoli u myši s nadbytkem GH (del Rincon et al., 2007).

I další studie naznačily přímý vztah mezi **nadbytkem GH a stimulací tkáňové exprese p85alpha a následným rozvojem inzulínové rezistence** (de Castro Barbosa et al., 2009; Barbour et al., 2005). Např. u potkanů se zvýšenou produkcí GH byla zvýšená exprese p85alpha ve svalu spolu se snížením GLUT4 ve svalu a tukové tkáni, snížením fosforylace IRS-1, -2 a Akt a naopak zvýšením fosforylace tyrosinu JAK2 a STAT5 ve svalu (de Castro Barbosa et al., 2009). V jiné studii měly myši p85beta (-/-) v reakci na GH zvýšenou expresi p85alpha a sníženou inzulinem stimulovanou aktivitu PI3K ve svalu. Na rozdíl od toho měly myši p85alpha (-/+) se sníženou expresí p85alpha zachovanou inzulínovou senzitivitu a aktivitu PI3K. Barbour zde naznačuje možnost **inhibice p85alpha** jakožto **terapeutické strategie** pro zvýšení inzulínové senzitivity ve svalu (Barbour et al., 2005). V předchozí studii těchto autorů vedl u myši lidský placentární GH také k vysoce signifikantnímu nárůstu p85alpha v kosterním svalu, zároveň ke snížené inzulinem stimulované translokaci GLUT4 do plazmatické membrány, snížené expresi INS-R a ke snížené schopnosti inzulínu stimulovat asociaci p110alpha s IRS-1 (Barbour et al., 2004).

Předpokládá se, že PI3K zvyšuje sekreci **adiponektinu** z 3T3-L1 adipocytů (del Rincon et al., 2007; Pereira et al., 2005). Ve studii del Rincon et al. zvýšila zvýšená exprese GH u myši expresi p85alpha, (čímž se snižuje aktivita PI3K), a značně snížila adiponektin, zatímco GH deficit snížil p85alpha, (zvýšila se aktivita PI3K), a zvýšil adiponektin v epididymálním tuku u myši (del Rincon et al., 2007).

## **6. VÝZNAM KOMPONENT OSY GH/IGF-1 PRO TUKOVOU TKÁŇ**

### **6.1 GH/GH-R/GHBP a tuková tkáň**

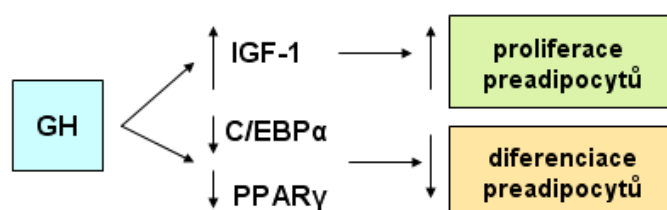
#### **6.1.1 GH a jeho úloha v adipogenezi**

Garten et al. označil tukovou tkáň jako hlavní cíl účinku GH (Garten et al., 2012). GH zprostředkovává své účinky na tukovou tkáň přes své specifické receptory (GH-R) přítomné jak na preadipocytech, tak na zralých adipocytech (Richelsen, 1997). Během diferenciaci

preadipocytů v adipocyty 3T3-L1 myši byla exprese GH-R významně zvýšená (Zou et al., 1997). GH může působit také nepřímo skrze GH indukovanou sekreci IGF-1 (Richelsen, 1997; Coleman et al., 1994). Zjistilo se, že **GH zvyšuje zásobu preadipocytů stimulací jejich proliferace/mitogeneze prostřednictvím stimulace IGF-1**. Po přidání monoklonální protilátky anti-IGF-1 byl tento mitogenní efekt hGH potlačen (Wabitsch et al., 1996 -A). Ve studii Fleenora et al. stimuloval GH zvýšení IGF-1 mRNA v diferencujících se, ale nikoli v nediferencovaných buňkách (Fleenor et al., 2006).

Naproti tomu **GH inhiboval diferenciaci bovinních preadipocytů** ve zralé adipocyty, a to skrze inhibici exprese C/EBP $\alpha$  (vazebný protein  $\alpha$  CCAAT enhanceru) závislou na STAT5b a skrze inhibici exprese PPAR $\gamma$  na STAT5b nezávislou (Zhao et al., 2014). Lidský GH snižoval počet diferencujících se lidských preadipocytů a potlačoval v nich expresi glycerol-3-fosfát dehydrogenázy (GPDH), markeru diferenciaci tukové tkáně (Wabitsch et al., 1996 -A). V jiné studii však GH v diferencujících se 3T3-F442A preadipocytech aktivitu lipogenního enzymu GPDH stimuloval, ale měl zanedbatelný účinek na jeho aktivitu v diferencovaných adipocytech (Dietz et Schwarz, 1991). Podání anti-IGF-1 nepotlačilo snížení diferenciaci preadipocytů indukované hGH (Wabitsch et al., 1996 -B), což svědčí pro efekt GH nezávislý na IGF-1. V nově diferencovaných adipocytech měl GH přímou antiadipogenní aktivitu, vedl k potlačení vychytávání glukózy a lipogeneze, stimuloval lipolýzu (Wabitsch et al., 1996 -A). **GH tak snižuje objem zralých adipocytů**, čímž potlačuje expanzi tukové tkáně a snižuje množství tělesného tuku (Blüher et al., 2005).

*Obrázek 12: Účinky GH na vývoj tukové tkáně (C/EBP $\alpha$ , vazebný protein  $\alpha$  CCAAT enhanceru; GH, růstový hormon; IGF-1, inzulinu podobný růstový faktor-1; PPAR $\gamma$ ; receptor  $\gamma$  aktivovaný peroxisomovými proliferátory).*



### 6.1.2 Vliv účinku GH na množství tukové tkáně

Spojení **zvýšeného působení GH a redukce tukové tkáně** potvrdily četné dřívější studie (Berryman et al., 2004; Oberbauer et Murray, 1998).

Léčba *in vivo* a inkubace *in vitro* tukové tkáně nebo izolovaných adipocytů s GH vede ke snížení transportu glukózy a snížení lipogeneze, především na úrovni genu syntázy mastných kyselin (Louveau et Gondret, 2004). U transgenních myší se zvýšenou expresí bGH (bovinní GH) byla naznačena určitá odolnost vůči dietou indukované obezitě oproti kontrolním a GH-R (-/-) myším (Berryman et al., 2006).

Podobně snižovala léčba GH množství tukové hmoty u dívek s Turnerovým syndromem (Gravholt et al., 2002). Podání GH u pacientů s GH deficitem snížilo celkový a viscerální tuk (Beauregard et al., 2008) a zvýšilo beztukovou tělesnou hmotu (lean body mass-LBM) (Cuneo et al., 1998). Plöckinger a Reuter pak u pacientů s akromegalií popsali snížené množství tukové tkáně právě vlivem GH zprostředkované suprese akumulace lipidů a zvýšené lipolýzy (Plöckinger et Reuter et al., 2008).

Naopak myši s **deficitem nebo nízkými hladinami GH** měly abnormálně **velké zásoby tuku** i přes normální příjem energie (Donahue et Beamer, 1993), resp. vyšší množství bílého tuku ve srovnání s kontrolní skupinou (Oberbauer et Murray, 1998). List et al. popsal u **GH-R (-/-) myší** jejich dvě nejzřetelnější charakteristiky- **extrémní inzulinovou senzitivitu v přítomnosti obezity** a mimo to také dlouhověkost (List et al., 2011). Zajímavé je, že tyto myši nemají žádný prospěch z kalorické restrikce, co se týče inzulinové senzitivity a dlouhověkosti (Bonkowski et al., 2009). Odstranění tuku těmto myším zároveň nezlepšilo, ale spíše zhoršilo inzulinovou signalizaci na rozdíl od normálních myší, což naznačuje, že **při absenci signalizace GH je sekreční aktivita viscerálního tuku značně změněna** a nečekaně vykazuje zvýšenou inzulinovou senzitivitu (Masternak et al., 2012).

Děti s deficitem GH měly zvětšené adipocyty a jejich počet byl nižší ve srovnání se zdravými dětmi, tyto změny se po podání GH upravily do normálu (Wabitsch et al., 1996 -A). Olarescu et al. ve své studii popsala signifikantní **zlepšení inzulinové rezistence** a pokles vaskulárního endotelového růstového faktoru (VEGF) a monocytárního chemoatrakčního proteinu-1 (MCP1) po léčbě akromegalie **i přes nárůst celkového množství tuku**. Domnívá se, že expanze tukové tkáně nemusí být nutně spojena s porušením inzulinové senzitivity, jelikož normálně funkční tuková tkáň chrání před diabetem především tím, že slouží ke skladování VMK (Bays, 2011; Olarescu et al., 2014).

### **6.1.3 Paradoxní „insulin-like“ účinek GH**

Účinek GH na tukovou tkáň však závisí na době jeho efektu. Již v roce 1991 poukázali Møller a Jørgensen na záznamy o paradoxních „insulin-like“ účincích GH pozorovaných na

pacientech s **dlouhodobým nedostatkem GH v úvodu po podání GH**. To, zda souvisely se zvýšením aktivity IGF-1, nebylo jasně vysvětleno (Møller et Jørgensen, 1991).

Četné studie ukázaly, že ve tkáních s **předchozí deprivací GH je krátkodobá stimulace pomocí GH schopna napodobit účinky inzulínu**, včetně stimulace vychytávání aminokyselin, glukózy a lipogeneze (Perrini et al., 2008). 4 hodinová inkubace diferencovaných adipocytů s hGH přechodně zvýšila oxidaci glukózy a akumulaci lipidů, ale po 48 hodinách již hGH tyto procesy inhiboval (Schwartz et Carter-Su, 1988). Také Oberbauer et al. zjistil, že časná přechodná expozice zvýšeným hladinám GH u myši vedla asi k 300% nárůstu bílé tukové tkáně vlivem hypertrofie a hyperplazie adipocytů a že tento efekt byl spojen se zvýšením hladin inzulínu (Oberbauer et al., 1997). Inkubace izolovaných adipocytů podkožní tukové tkáně s GH u dětí s GH deficitem v rámci Prader-Williho syndromu vedla ke stimulaci inzulínem indukované lipogeneze, ale neměla vliv na inzulínem indukovanou inhibici lipolýzy (Kamel et al., 1998). Björgell et al. uvedl, že antilipolytický, „insulin-like“ efekt GH je způsoben defosforylací HSL (Björgell et al., 1984).

**GH paradoxně zvyšoval preadipocytární diferenciaci 3T3-L1 buněk a lidských preadipocytů z břišní tukové tkáně také vlivem snížení sekrece interleukinu-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) (inhibitoru adipogeneze) z makrofágů**. Tento efekt byl ale patrný také pouze během první (časné) fáze diferenciaci adipocytů. Zvýšení adipogeneze/preadipocytární diferenciaci bylo nezávislé na IGF-1 (Lu et al., 2010).

Zajímavé výsledky přinesla také studie Coshigana et al., která ukázala, jak různý stupeň blokady signalizace GH může vést k dramaticky rozdílným fenotypům. Naznačila tak, že **GH** by mohl hrát paradoxní roli v metabolismu tukové tkáně, tím, že **je zapotřebí na začátku pro vytvoření adipocytů a poté má důležitou roli v inhibici ukládání tuku ve zralých adipocytech**. Uvádí také, že GHA myši s pouze sníženým účinkem GH, který však může být ještě dostatečný ke spuštění diferenciaci adipocytů, měly více tuku než GH (-/-) myši s úplným vyřazením genu pro GH pravděpodobně proto, že kompletní chybění účinku GH může již tvorbu adipocytů blokovat (Coshigano et al., 2003). K podobnému závěru došel i Davies ve studii, kde závažný nedostatek GH u (*dw/dw*) myši s GH deficitem vedl i přes normální příjem potravy k paradoxní štíhlosti abdominálně, což by mohl být výsledek právě poruchy diferenciaci preadipocytů a proliferace adipocytů (Davies et al., 2007).

#### **6.1.4 Stimulace lipolýzy**

Okamžité zvýšení sérové koncentrace VMK po expozici GH poukazuje právě na lipolýzu, jako na hlavní efekt GH *in vivo* (Zhao et al., 2011).

Jedním z klíčových enzymů zodpovědných za lipolýzu, tedy za **uvolnění VMK z tukové tkáně**, je **hormon senzitivní lipáza (HSL)**. Inhibice lipolýzy farmakologickou supresí HSL ruší vliv GH na VMK, což ukazuje, že HSL je cílem účinku GH (Zhao et al., 2011). Ve studii na kultuře 3T3-F442A adipocytů bylo zvýšení aktivity HSL indukované GH spojeno se zvýšeným uvolňováním glycerolu v závislosti na dávce (Dietz et Schwarz, 1991).

Další enzym, jehož aktivitu GH ovlivňuje, je **lipoproteinová lipáza (LPL)**. LPL hydrolyzuje na triglyceridy bohaté chylomikrony a částice VLDL v krevním oběhu tukové tkáně a vede k formaci IDL a LDL, a tak **poskytuje VMK k akumulaci triglyceridů do zásob tukové tkáně a pro kosterní sval pro oxidaci a tvorbu energie. GH má výrazný inhibiční vliv na aktivitu LPL v tukové tkáni** (Richelsen, 1997; Richelsen, 1999). (LPL aktivita v tukové tkáni a kosterním svalu je obecně regulována recipročně) (Richelsen, 1999).

Léčba GH u obézních dětí a dospělých snižovala množství tuku a akumulaci triglyceridů inhibicí LPL a zvyšovala lipolýzu jak skrze aktivitu HSL, tak skrze indukci beta-adrenergních receptorů (Nam et al., 2000). V lidských adipocytech *in vitro* je popisována buď žádná změna nebo snížení **aktivity** LPL v reakci na GH (Simsolo, 1995; Richelsen et al., 2000). V podkožní tukové tkáni u pacientů s akromegalií však byla zjištěna signifikantně zvýšená **exprese** LPL (Hochberg et al., 2015) a zvýšení exprese LPL v reakci na GH bylo také prokázáno na kulturách preadipocytů (Pradines-Figueres et al., 2015) a v tukové tkáni pacientů s GH deficitem po léčbě GH (Khalfallah et al., 2001).

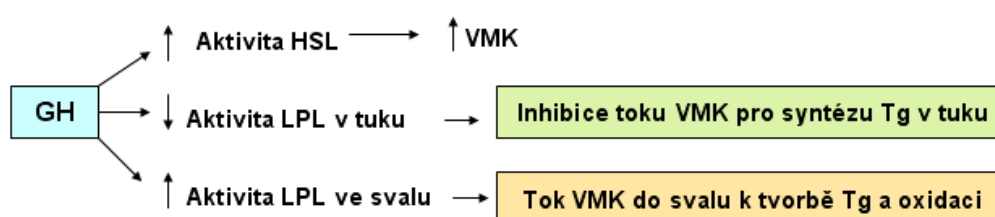
U bGH transgenních myší však bylo menší množství tukové tkáně spojeno se zvýšenou aktivitou LPL v tuku a srdci a beta-adrenergní stimulovanou lipolýzou (Frick et al., 2001). Aktivita LPL se snížila vlivem IGF-1, ale zvýšila podáním inzulínu v tukové tkáni u hypofyzektomovaných potkanů (Oscarsson et al., 1999 -A).

**Jaterní lipáza (HL)** je příbuzným lipolytickým enzymem s jasnější tkáňovou distribucí než LPL a přispívá k regulaci plazmatických hladin triglyceridů. Mutace v HL genu mohou být spojeny se zvýšenou triglyceridémií. HL zvyšuje clearance triglyceridů z VLDL a chybění HL je spojeno se zvýšenými hladinami HDL. Jedna z jejích hlavních funkcí je konverze IDL na LDL (Chatterjee et Sparks, 2011). Několik studií na potkanech ukazuje, že GH zvyšuje post-heparinovou-plazmatickou aktivitu HL (PHP-HL) a HL aktivitu v játrech. U lidí měl GH variabilní účinky na PHP-HL aktivitu (Oscarsson et al., 1999 -B). Ve studii u potkanů zvyšoval GH jaterní syntézu triglyceridů a zvyšoval jejich sekreci a snižoval účinek PPAR $\alpha$  (Ljungberg et al., 2007).

Ve studii Zhao et al. však léčba GH u mužů s GH deficitem nevedla k signifikantním změnám exprese enzymů lipolýzy v tukové tkáni včetně lipázy triglyceridů tukové tkáně (**ATGL**),

HSL, lipázy monoglyceridů (**MGLL**) a ani LPL. Měla však vliv na jiné, nové enzymy. Autoři zde navrhli, že **mechanismem inhibice CIDEA** (nového skladovacího proteinu tukových kapének, cell death-inducing DFFA-like effector a) **vede GH k inhibici ukládání triglyceridů** v buňce a usnadňuje tak dostupnost triglyceridů pro **hydrolýzu prostřednictvím hydrolázy triglyceridů PNPLA3** (patatin-like phospholipase domain containing-3) spolu se stimulací syntézy DAG (Zhao et al., 2011).

*Obrázek 13: Vliv GH na enzymy lipolýzy (GH, růstový hormon; HSL, hormon senzitivní lipáza; LPL, lipoproteinová lipáza; Tg, triglyceridy; VMK, volné mastné kyseliny).*



### 6.1.5 Další mechanismy účinku GH na tukovou tkáň

Ukázalo se, že GH by mohl negativně regulovat expresi **UCP1** (uncoupling protein-1) v hnědé tukové tkáni. Ve studii u GHA transgenních myší nebo u myší s vyřazením genu pro GH-R/GHBP byla hladina UCP1 zvýšená a naopak nižší byla u velkých (bGH transgenních) zvířat v porovnání s kontrolní skupinou (Li et al., 2003).

Nadbytek GH/IGF-1 může také snižovat sérovou hladinu **leptinu** snížením množství tělesného tuku nebo jiným neznámým mechanismem. U akromegaliků byla sérová hladina leptinu signifikantně nižší než u normálních subjektů i po korekci na procento tělesného tuku (Miyakawa et al., 1998).

Možný podíl na redukcii tukové tkáně u akromegaliků může mít také inhibice enzymu **HSD1** (hydroxysteroid-dehydrogenázy-1) zprostředkovaná GH, kdy dochází k inhibici konverze kortizonu na kortizol. Naopak u GH deficitu dochází ke zvýšené konverzi inaktivního kortizonu na aktivní kortizol v játrech a tukové tkáni, což by mohlo vést ke zvýšení jaterní produkce glukózy a k viscerální obezitě (Moore et al., 1999).

Důležitým negativním regulátorem GH signalizace v tukové tkáni se ukázal být **SOCS2**, jehož zvýšená exprese v prasečích adipocytech signifikantně snížila GH indukovaný nárůst mRNA exprese PPAR $\gamma$ , FAS (syntázy mastných kyselin), ATGL a HSL (Yang et al., 2012).

### **6.1.6 Lokální diverzita účinků GH na tukovou tkáň**

Bylo zjištěno, že preadipocyty lidské podkožní tukové tkáně mají největší diferenciační kapacitu, střední je u mezenterálních preadipocytů a nejnižší v omentálním tuku (Tchkonia et al., 2005). Existují četné záznamy o tom, že **tuková tkáň není prostřednictvím GH ovlivňována uniformně** (Berryman et al., 2011; Flint et al., 2006; Gardner et al., 2012), ale v závislosti na lokalitě, včetně rozdílů mezi viscerální a subkutánní tukovou tkání.

Ve studii Berrymana et al. byly GH-R (-/-) myši charakterizovány zvýšeným procentem tělesného tuku s největším nárůstem tukové hmoty **v podkoží** (Berryman et al., 2004). Flint et al. popsal, že GH-R-KO myši měly snížený počet adipocytů viscerálních, zatímco počet **subkutánních** adipocytů byl zvýšen. I přes to byla jejich tělesná hmotnost snížena o 40-50 % (Flint et al., 2006). Léčba GH u dětí SGA byla spojena s prohloubením deficitu **podkožního tuku** (Ibáñez et al., 2010).

Pacienti s **akromegalií** měli více snížené množství viscerální oproti subkutánní tukové tkáni a toto snížení korelovalo s vyšší aktivitou onemocnění. Intramuskulární tuková tkáň však byla zvýšena, což by dle autorů mohlo přispívat k inzulinové rezistenci přítomné u akromegalie vlivem GH (Freda et al., 2008). Podobně snížení podkožního a viscerálního tuku, ale **zvýšení intramuskulárního obsahu lipidů** bylo popsáno také po 6 měsíční léčbě GH u premenopauzálních obézních žen (Bredella et al., 2012). Ve studii Plöckingera a Reutera byla léčba pacientů s akromegalií antagonistou GH-R (pegvisomantem) spojena se zvýšením množství tukové tkáně intraabdominálně, ale nikoliv subkutánně (Plöckinger et Reuter, 2008). U **osob s GH deficitem** bylo vyšší množství subkutánní abdominální tukové tkáně než u osob s aktivní akromegalií (Lin et al., 2012). Léčba GH u dospělých pacientů s deficitem GH vedla k poklesu celkového množství tuku, především ale k poklesu trunkálního tuku (Biller et al., 2011). V jiné studii u pacientů s GH deficitem byla léčba GH spojena se snížením viscerálního tuku o 30 % a subkutánního o 13 % (Bengtsson et al., 1993).

### **6.1.7 GHBP a tuková tkáň**

GHBP má úzký vztah k tělesnému složení a viscerálnímu tělesnému tuku (Doehner et al., 2001). **GHBP hladiny bývají zvýšené u obezity** (Frystyk et al., 1999; Scacchi et al., 1999). U dospělých s GH deficitem na GH léčbě byla zjištěna silná pozitivní korelace mezi GHBP a leptinem a procentem tělesného tuku (Florkowski et al., 1999). V jiné studii byla 4 měsíční substituční léčba GH dospělých s deficitem GH spojena s redukcí tělesného tuku a poklesem GHBP v séru (Fisker et al., 2001).

## 6.2 IGF-1 a tuková tkáň

### 6.2.1 IGF-1 a diferenciacie adipocytů - experimentální studie

Již starší studie Petera et al. popisuje, že IGF-1 mRNA hladiny v bílé tukové tkáni u potkana jsou v podobném rozmezí jako jeho exprese v játrech (hlavní zdroj sérového IGF-1) a daleko vyšší než v jiných tkáních a že lokálně produkovaný IGF-1 spolu s IGF-BPs, které modulují účinek IGF-1 v tukové tkáni (Hausman et al., 2002; Boney et al., 1994), mají klíčovou parakrinní/autokrinní úlohu (Richelsen, 1997; Wabitsch et al., 1995) při *in vivo* diferenciaci tukových buněk ze stromovaskulárních buněk (Peter et al., 1993). O schopnosti IGF-1 **indukovat a regulovat adipogenezi a diferenciaci preadipocytů** svědčí celá řada experimentálních studií *in vivo* a *in vitro* (Boney et al., 1994; Peter et al., 1993; Chen et al., 1995; Smith et al., 1988; Scavo et al., 2004; Lorenzo et al., 1993). hGH stimuloval proliferaci potkaních i lidských preadipocytů skrze zvýšení produkce IGF-1 (Wabitsch et al., 1994 -A, -B). Fetální potkaní adipocyty hnědé tukové tkáně inkubované s IGF-1 a inzulinem měly zvýšenou mRNA expresi genů spojených s adipogenezí – FAS, GPDH, GLUT4 a sníženou expresi PEPCCK. Také zvýšily vychytávání glukózy a lipidů (Teruel et al., 1996). Inzulin/IGF-1 stimuluje diferenciaci hnědých preadipocytů skrze fosforylaci IRS-1 a aktivací dvou signálních kaskád: 1) Ras-ERK1/2 dráha k aktivaci CREB a 2) dráha PI3K-Akt k deaktivaci FoxO1. Tyto dvě dráhy v kombinaci vedou k potlačení exprese necdinu (protein regulující buněčný cyklus) a umožní klonální expanzi a koordinovanou genovou expresi nutnou k dokončení diferenciacie adipocytů hnědé tukové tkáně (Cypess et al., 2011).

*Obrázek 14: Vliv IGF-1 na vývoj tukové tkáně* (Akt, proteinkináza Akt; CREB, vazebný protein cAMP responsivního elementu; ERK1/2, extracelulárním signálem regulované kinázy 1/2; FoxO1, forkhead box O1; IGF-1, inzulinu podobný růstový faktor-1; IRS, inzulinový receptorový substrát; PI3K, fosfatidylinositol-3-kináza; Ras, Ras protein (Rat sarcoma)).



U fetálních adipocytů hnědé tukové tkáně potkanů bylo na PI3K závislé vychytávání glukózy, IGF-1 stimulovaná exprese adipogenních genů jako FAS, GPDH, acetyl-koenzym A-karboxyláza a UCP a diferenciacie adipocytů, naproti tomu IGF-1 stimulovaná proliferace adipocytů byla na PI3K nezávislá (Valverde et al., 1997). Fyziologické koncentrace inzulinu a



IGF-1 synergicky působily na diferenciaci mezenterických stromálních vaskulárních buněk v mezenterické viscerální adipocyty. Samotný IGF-1 byl schopen indukovat expresi C/EBP $\alpha$  a adipocytárního lipidového vazebného proteinu (aP2), ale nikoli už akumulaci tukových kapének, která souvisí s maturací adipocytů (Sato et al., 2008). **IGF-1 také chrání lidské tukové buňky před apoptózou** udržováním exprese antiapoptotických proteinů (Fischer-Posovszky et al., 2004). V primární kultuře preadipocytů štíhlých prepubertálních dětí stimuloval IGF-1 diferenciaci více ve viscerálních než podkožních buňkách. **Odstranění inzulinu z diferenciacního média vedlo k zastavení adipogeneze** jak u viscerálních, tak u podkožních preadipocytů (Grohmann et al., 2005).

U myši korelovaly sérové koncentrace IGF-1 pozitivně a IGFBP-3 negativně s množstvím tělesného tuku (Rogozina et al., 2009).

### **6.2.2 IGF-1 a tuková tkáň- klinické studie**

Některé práce ukázaly, že **léčba IGF-1**, např. u Laronova syndromu (deficitu GH-R) u dětí, může přispívat ke **zvýšení množství tukové tkáně** (Laron et al., 2006). IGF-1 stimuloval adipogenezi také u endokrinní orbitopatie zvýšením PPAR $\gamma$  skrze aktivaci IGF-1R a dráhu PI3K (Zhao et al., 2013). Léčba IGF-1 zmírnila zvýšenou delipidaci a apoptózu adipocytů spojenou s léčbou HIV ritonavirem. Léčba IGF-1 pacientů s lipodystrofií v souvislosti s infekcí HIV však nevedla ke zvýšení množství podkožní tukové tkáně, ale proporcčně snížila abdominální tuk (Kim et al., 2013). V jiné studii dlouhodobá léčba Laronova syndromu u dětí i dospělých pomocí IGF-1 také snížila množství podkožního tuku (Laron et al., 1993). Mauras a Haymond uvedli, že **IGF-1 může při dlouhodobém působení zvyšovat oxidaci lipidů pravděpodobně jako výsledek chronické inzulinopenie** (Mauras et Haymond, 2005).

### **6.3 IGF-2 a tuková tkáň**

IGF-1 a IGF-2 mají zřejmě rozdílné účinky při vývoji tukové tkáně. U 7 denních prasátek byla v podkožní tukové tkáni mRNA exprese IGF-2 o mnoho vyšší ve stromovaskulárních buňkách oproti izolovaným adipocytům, zatímco IGF-1 mRNA exprese byla vyšší v adipocytech. Během prvních 6 dnů života exprese IGF-2 klesala a naopak se zvyšovala exprese pozdních ukazatelů diferenciacie adipocytů a také IGF-1, inzulinu a IGF-1R (Gardan et al., 2008). V podkožní tukové tkáni u prasat Landrace byly také mRNA hladiny exprese IGF-2 signifikantně vyšší 30. den po narození než pozdější dny, kdy postupně klesaly až do 120. dne a 150. den začaly opět narůstat. U Taihu prasat byl IGF-2 nejnížší 90. den po

narození, rychle se zvýšil 120. den a poté opět klesal. Pokles IGF-2 by snad mohl být spojen s hyperplázií adipocytů (Guo et al., 2008).

Obézní dívky měly stejné hladiny IGF-2 jako štíhlé, po redukci hmotnosti se hladiny IGF-2 a IGFBP-2 zvýšily (Wabitsch et al., 1996 -C).

#### **6.4 IGF-1R a INS-R a adipogeneze**

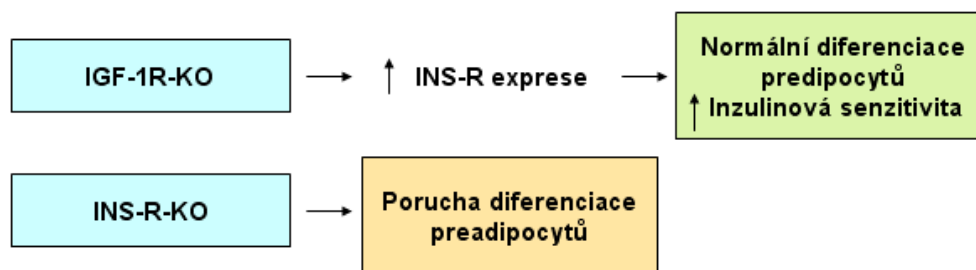
Z hlediska diferenciaci preadipocytů a akumulace tukové tkáně je v řadě studií zkoumána nejen úloha IGF-1 a jeho vazebných proteinů, ale také úloha IGF-1R a INS-R. **Porucha diferenciaci preadipocytů hnědé tukové tkáně myši byla přítomna u myši s vyřazením INS-R, nicméně zvýšená exprese INS-R také vedla k inhibici diferenciaci těchto buněk a ke snížení exprese adipogenních markerů PPAR $\gamma$ , GLUT4 a FAS (Entingh et al., 2003).** V jiné práci byla diferenciaci kontrolních preadipocytů inhibována zvýšenou expresí INS-R, avšak zvýšená exprese IGF-1R ve stejné míře k inhibici adipogeneze nevedla. V preadipocytech hnědé tukové tkáně myši stimuloval inzulin fosforylaci homodimeru INS-R, zatímco IGF-1 aktivoval jak homodimer IGF-1R, tak hybridní receptory. Zajímavé je, že u myši s vyřazením INS-R (INS-R-KO) bylo při nízkých koncentracích IGF-1 narušeno zvýšení fosforylované Akt stimulované IGF-1, což naznačuje, že **INS-R je nutný jak pro fosforylaci Akt stimulovanou inzulinem, tak i prostřednictvím IGF-1.** V kontrolních buňkách měl IGF-1 při stejné dávce oproti inzulinu silnější stimulační vliv na fosforylaci Akt a MAPK. Entingh-Pearsall a Kahn uvádí, že INS-R je potřeba pro diferenciaci preadipocytů hnědé tukové tkáně, zatímco IGF-1R nikoli. Dále však naznačili, že při signalizaci oběma receptory při adipogenezi vznikají rozdílné signály a že **jak INS-R, tak IGF-1R mají nezávislé role v adipogenezi, které nemohou být vzájemně nahrazeny,** a že pro adipogenezi mohou být důležité jak množství, tak rovnováha mezi těmito dvěma receptory (Entingh-Pearsall et Kahn, 2004).

Význam úlohy IGF-1R exprimovaného v tukové tkáni poodhalila dále studie Klöttinga et al., kde model myši IGF-1R<sup>ap2Cre</sup> s vyřazením IGF-1R v tukové tkáni měl zvýšené množství tukové tkáně, což naznačuje, že **signalizace IGF-1R v tukové tkáni není klíčová pro vývoj a diferenciaci tukové tkáně *in vivo*.** IGF-1 mRNA exprese byla překvapivě v tukové tkáni (i v játrech) signifikantně zvýšena a dále se ještě zvýšila po stimulaci IGF-1. Tyto výsledky naznačují existenci negativní zpětné vazby IGF-1 skrze IGF-1R na jeho vlastní expresi v adipocytech (Klötting et al., 2008).

**Chybění IGF-1R** ve fetálních hnědých adipocytech v jiné studii bylo však při stimulaci inzulinem spojeno **s absencí zvýšení markerů adipogeneze a diferenciaci** (FAS,

ADD1/SREBP (adipocyte determination and differentiation-dependent factor 1/sterol regulatory element-binding protein), UCP1 a C/EBPalpha (Mur et al., 2003). Klöting však zmiňuje studii Entingh-Pearsalla a Kahna, kde většina preadipocytů hnědé tukové tkáně s **vyřazením IGF-1R byla schopna normální diferenciaci** a markery adipogeneze (PPAR $\gamma$  a GLUT4) zde byly exprimovány, přičemž autoři navrhují, že účinky IGF-1 (růst a diferenciaci) by mohly být zprostředkovány **INS-R**, který byl u těchto myši v tukové tkáni zvýšen (Klöting et al., 2008; Entingh-Pearsall et Kahn, 2004). V hnědých adipocytech s deficitem IGF-1R byla v jiných studiích také zjištěna **vyšší inzulínová senzitivita** (Klöting et al., 2008; Mur et al., 2002).

Obrázek 15: Význam IGF-1R a INS-R při diferenciaci preadipocytů (IGF-1R-KO, vyřazení genu pro IGF-1R; INS-R, inzulínový receptor; INS-R-KO, vyřazení genu pro INS-R)



### 6.5 IGFBP-1 a tuková tkáň

Myši se **zvýšenou expresí IGFBP-1** s dietou se zvýšeným obsahem sacharózy zvýšily hmotnost signifikantně méně a **množství epididymální tukové tkáně bylo signifikantně menší** ve srovnání s kontrolními myši. Měly také menší velikost adipocytů a nižší mitogenní odpověď těchto buněk v reakci na IGF-1 a sníženou stimulaci GPDH (ukazatele míry adipocytární diferenciaci) (Rajkumar et al., 1999). Zvýšení mRNA exprese IGFBP-1 i jeho proteinu v bílé tukové tkáni bylo zjištěno při příjmu **zeleného čaje** u kontrolních a vysokotukovou dietou krměných myši a tato exprese korelovala negativně s hmotností tukové tkáně. Expresi IGFBP-1 zvyšoval příjem zeleného čaje a jeho hlavní polyfenol (epigallocatechin gallat) také v 3T3-L1 adipocytech. IGFBP-1 tak může hrát roli v **prevenci obezity** spojené s pitím zeleného čaje (Ueda et Ashida, 2012).

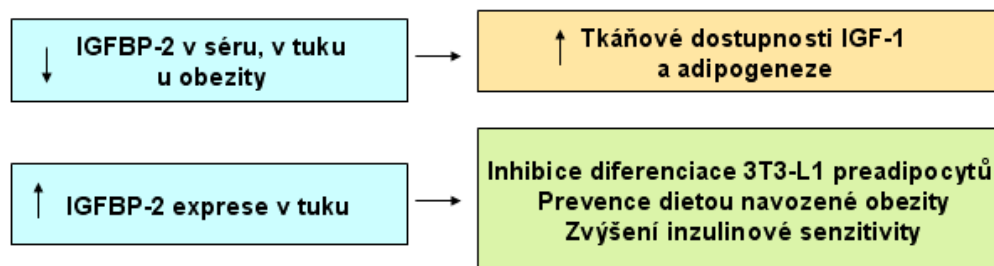
### 6.6 IGFBP -2 a tuková tkáň

IGFBP-2 byl označen za hlavní vazebný protein secernovaný diferencujícími se preadipocyty bílé tukové tkáně, což svědčí pro jeho význam v autokrinní regulaci adipocytů (Wheatcroft et al., 2007) a v **modulaci IGF-1 účinku při adipogenezi** (Boney et al., 1994). V *in vitro*

studiích inhiboval IGFBP-2 proliferaci buněk závislou na IGF a jeho negativní regulační vliv na postnatální růst se projevil ve dvou studiích u transgenních myší se zvýšenou expresí IGFBP-2 a zpomaleným růstem a nižší LBM (Hoeftlich et al., 1999; Rehfeldt et al., 2010). Ve studii Rehfeldta et al. však měly tyto myši vyšší procento tuku, což však mohlo být jen relativní vzhledem ke snížení LBM (Rehfeldt et al., 2010). Inbrední myši s nízkou hmotností měly oproti kontrolním myším a myším s vysokou hmotností signifikantně zvýšené IGFBP-2 v séru a IGFBP-2 mRNA expresi v játrech. Myši s vysokou hmotností měly jaterní expresi IGFBP-2 mRNA signifikantně sníženou oproti kontrolním myším (Hoeftlich et al., 1998). Li a Picard ve své práci u **obézních *ob/ob*, diabetických *db/db* myší** a myší na vysokotukové dietě našli signifikantně **nižší mRNA expresi IGFBP-2** ve viscerální, (ale nikoli v podkožní) **bílé tukové tkáni** ve srovnání se štíhlými zvířaty (Li et Picard, 2010).

Ballerini et al. zjistil nižší sérové hladiny IGFBP-2 a poměr IGFBP-2/IGF-1 u obézních dětí než u kontrol. BMI a inzulin zde inverzně predikovaly IGFBP-2 v séru. Popsal, že **snížení IGFBP-2 v séru u obézních dětí** může naznačovat **zvýšení tkáňové dostupnosti IGF-1** a jeho účinku (Ballerini et al., 2004). V jiné studii u obézních dětí však IGFBP-2 mRNA exprese v podkožní tukové tkáni korelovala (překvapivě) pozitivně s procentem tělesného tuku, nezávisle na stupni inzulinové senzitivity, s kterou korelovala negativně (Claudio et al., 2010). Jak Claudio, tak Li a Picard se domnívají, že IGFBP-2 exprese a sekrece z adipocytů v bílé tukové tkáni by mohla být jedním z lokálních mechanismů adipocytů vedoucích k **omezení dalšího hromadění tuku** (Claudio et al., 2010) a **k prevenci dietou navozené obezity a s věkem spojené inzulinové rezistence** (Li et Picard, 2010). I Wheatcroft popsál u transgenních myší se **zvýšenou expresí IGFBP-2 nižší vnímavost k obezitě a zlepšení inzulinové senzitivity** při vysokotukové/vysokoenergetické dietě. Jeho *in vitro* studie ukázala také přímý efekt IGFBP-2 v prevenci adipogeneze, kdy **rekombinantní IGFBP-2 (rIGFBP-2) blokoval diferenciaci 3T3-L1 buněk** (Wheatcroft et al., 2007). To, zda podání IGFBP-2 může regulovat adipogenezi *in vivo*, a mechanismy, resp. domény IGFBP-2, které by tento efekt zprostředkovávaly, zkoumala studie Xi et al. (Xi et al., 2013). Lidské viscerální adipocyty produkovaly signifikantně více IGFBP-2 než subkutánní adipocyty. Při inkubaci s IGFBP-2 došlo k signifikantnímu snížení adipo/lipogeneze ve viscerálních, ale nikoli subkutánních adipocytech, a to nezávisle na IGF-1. Tato inhibice zahrnovala asociaci IGFBP-2 s buněčnými povrchy a aktivaci signálních drah integrinů (Yau et al., 2015). Ve studii Li a Picarda (Li et Picard, 2010) viscerální exprese IGFBP-2, avšak nikoli podkožní ve studii Claudia et al. (Claudio et al., 2010) významně korelovala s jeho cirkulujícími hladinami, což by svědčilo o důležitosti viscerální tukové tkáně jako zdroje cirkulujícího IGFBP-2.

Obrázek 16: **IGFBP-2 a tuková tkáň** (IGF-1, inzulínu podobný růstový faktor-1; IGFBP-2, IGF-vazebný protein-2).



### 6.7 IGFBP-3 a tuková tkáň

IGFBP-3 je důležitým modulátorem anabolických a mitogenních účinků IGF-1. Mnoho studií ukázalo, že také IGFBP-3 by mohl mít úlohu v regulaci metabolismu tukové tkáně (viz dále). IGFBP-3 je produkován řadou tkání včetně preadipocytů a diferencovaných adipocytů lidské podkožní tukové tkáně, kde se jeho hladiny spolu s IGF-1 zvyšují během jejich diferenciaci (Wabitsch et al., 2000). Zatímco však IGF-1 tento proces stimuluje, **IGFBP-3 inhibuje jak diferenciaci preadipocytů**, tak funkci diferencovaných adipocytů (Baxter et al., 2009). Podobně Chan et al. popsal, že přidání exogenního IGFBP-3 k adipocytům a exprese IGFBP-3 v lidských preadipocytech inhibuje diferenciaci adipocytů skrze inhibici heterodimerizace PPAR $\gamma$  s retinoidním X receptorem  $\alpha$  (RXR  $\alpha$ ) *in vitro* (Chan et al., 2009). Dalším mechanismem by mohla být aktivace Smad signalizace v 3T3-L1 buňkách zprostředkovaná IGFBP-3, která je spojena s inhibicí adipogenní diferenciaci (de Silva et al., 2012).

Na druhou stranu bylo však také popsáno, že u prepubertálních dětí IGFBP-3 stimuloval diferenciaci, a to ve viscerálních i v subkutánních adipocytech (Grohmann et al., 2005).

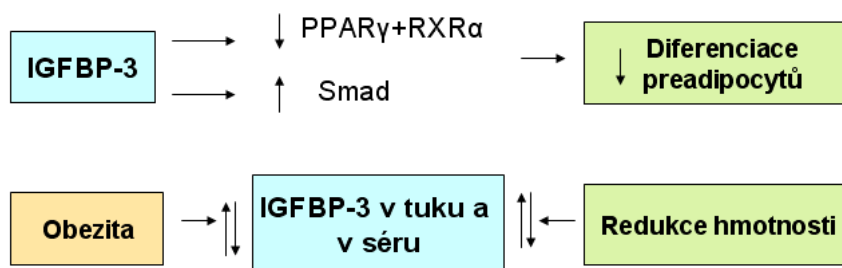
Odlišení vlivu schopnosti IGFBP-3 vázat IGF-1 a jeho samostatné na IGF-1 nezávislé role v adipogenezi zkoumaly studie myši se zvýšenou expresí mutovaného IGFBP-3 postrádajícího schopnost vázat IGF-1 (Tg-mut). Množství viscerálního a hnědého tuku se zvyšovalo věkem u myši Tg-mut, ale nikoli u myši se zvýšenou expresí normálního IGFBP-3 (Tg-norm), který schopnost vazby k IGF-1 měl. Tg-norm myši měly vyšší expresi UCP1 v hnědé tukové tkáni a snížené množství tuku, naproti tomu Tg-mut myši měly poruchu exprese UCP1 v hnědém tuku a zvýšené množství tuku (Nguyen et al., 2015). Z této studie tedy zřejmě vyplývá, že IGFBP-3 by mohl mít **protektivní roli při vzniku obezity právě vlivem snížení biodostupnosti volného IGF-1**.

Avšak podobně jako u vlivu IGFBP-3 na glukózový metabolismus ani studie zkoumající vztahy IGFBP-3 s tukovou tkání **nejsou jednoznačné**.

Mohanraj ve své práci zmínila studii Palau et al., kde potkani s dietou indukovanou **obezitou** měli **sníženou expresi IGFBP-3** v mezenteriálním tuku, oproti kontrolním potkanům, což dle autorů naznačuje, že IGFBP-3 by mohl mít protektivní vliv proti obezitě (Palau et al., 2012; Mohanraj et al., 2013). Naproti tomu ale v jiné studii u **obézních** myší krmených vysokotukovou dietou byla zjištěna **zvýšená exprese IGFBP-3** ve viscerální tukové tkáni a **kalorická restrikce vedla k jejímu poklesu** jak u obézních, tak u štíhlých myší (Kurki et al., 2012).

V klinické studii u obézních žen bylo však **snížení hmotnosti spojeno s tendencí ke zvýšení exprese IGFBP-3** v podkožní tukové tkáni (Campbell et al., 2013). Podobně De Pergola et al. popsal zvýšení sérových hladin IGFBP-3 po hmotnostní redukci u obézních žen (De Pergola et al., 1998). V další studii u žen s vysokým stupněm obezity byly zjištěny nižší sérové hladiny IGFBP-3 ve srovnání s kontrolní skupinou (De Marinis et al., 2004). V jiných klinických studiích však byly popisovány zvýšené (Frystyk et al., 1999) nebo normální (Nam et al., 1997) **sérové hladiny IGFBP-3** u obezity s **tendencí k poklesu po hmotnostní redukci** (Wabitsch et al., 1996; Argente et al., 1997; Giusti et al., 2005).

*Obrázek 17: IGFBP-3 a tuková tkáň (IGFBP-3, IGF-vazebný protein-3; PPAR $\gamma$ , receptor  $\gamma$  aktivovaný peroxisomovými proliferátory; RXR $\alpha$ , retinoidní X receptor  $\alpha$ ; Smad, kombinace MAD (mothers against decapentaplegic) a proteinu SMA (gen *sma* pro small body size)).*



## 7. KOMPONENTY OSY GH/IGF-1 A ZÁNĚT

### 7.1 Patofyziologie subklinického zánětu u obezity a diabetes mellitus 2. typu

Obezita je spojena s chronickým zánětem mírného stupně (tzv. subklinickým zánětem), který, jak se ukázalo, je jedním z mechanismů vedoucích k inzulínové rezistenci (Xu et al., 2003). Ke vzniku **subklinického zánětu v tukové tkáni** u metabolického syndromu přispívají jak

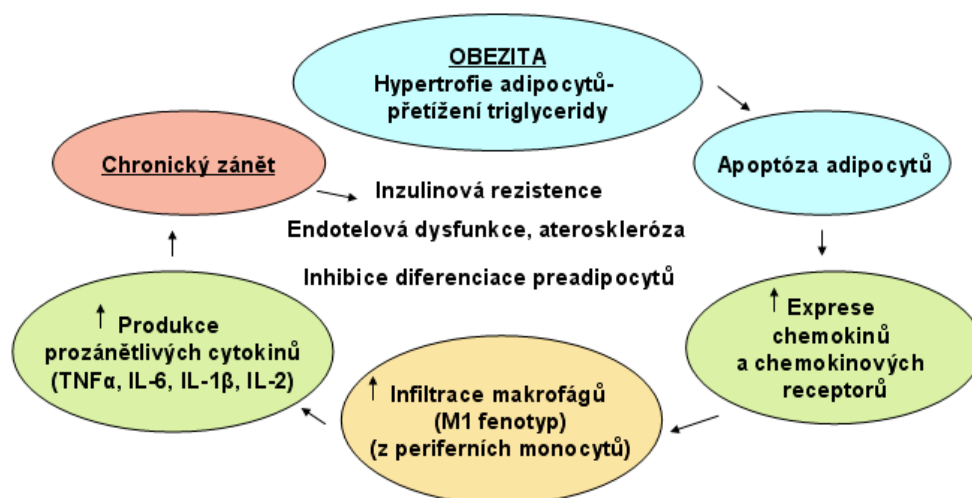
adipocyty, tak imunokompetentní buňky přítomné v tukové tkáni (Xu et al., 2003; Canello et al., 2005, Suganami et al., 2005). Zvýšené množství tukové tkáně u obezity je spojeno s **hypertrofií adipocytů** v důsledku přetížení triglyceridy vedoucí k jejich nadměrné **apoptóze**. Následná zvýšená **infiltrace makrofágů** doprovázená zvýšenou produkcí **prozánětlivých faktorů** vysvětluje spojení mezi obezitou, dysfunkcí tukové tkáně, přítomností chronického zánětu a vznikem inzulinové rezistence (Cinti et al., 2005). Makrofágy v tukové tkáni představují dva různé fenotypy, M1 a M2. V tukové tkáni štíhlých jedinců exprimují makrofágy markery M2 aktivace a produkují protizánětlivé cytokiny jako je interleukin-10 (IL-10). Naproti tomu tuková tkáň u obézních jedinců a u zvířecích modelů obezity je infiltrována velkým počtem makrofágů, které exprimují M1 znaky a secernují prozánětlivé cytokiny, jako je TNF $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-2 (Fujisaka et al., 2009; Sica et Mantovani, 2012), které dále spouští lokální zánětlivou reakci a ovlivňují endokrinní funkci adipocytů ve smyslu zvýšení produkce metabolicky negativních faktorů (Bourlier et Bouloumie, 2009). Ty se pak spolupodílejí na vzniku inzulinové rezistence prostřednictvím **inhibice postreceptorové inzulinové signální kaskády** (Zeyda et Stulnig, 2009) a akcelerují rozvoj endoteliální dysfunkce, potažmo aterosklerózy (Berg et Scherer, 2005). **Makrofágy** mohou také hrát roli v **poruše adipogeneze**, která je přítomná u obézních jedinců. Inkubační médium z makrofágů inhibovalo diferenciaci 3T3-L1 i lidských preadipocytů, a tím snižovalo schopnost tukové tkáně fungovat jako rezervoár mastných kyselin (Constant et al., 2006; Lacasa et al., 2007), což může přispívat k **redistribuci mastných kyselin do jater a svalů** a k systémové inzulinové rezistenci (Jensen, 2008). Suganami et al. popsal, že komunikace mezi adipocyty a makrofágy zahrnující VMK a TNF $\alpha$  vytváří začarovaný kruh rozvoje zánětu v tukové tkáni vedoucího k systémovému zánětu mírného stupně (Suganami et al., 2005).

Bylo prokázáno, že většina makrofágů přítomných v tukové tkáni pochází z **cirkulujících periferních mononukleárních buněk** mimo tukovou tkáň (Curat et al., 2004). Ty jsou do tukové tkáně přitahovány některými chemoatraktanty produkovanými hypertrofickými adipocyty, rezidenčními stromálními makrofágy a T-lymfocyty (Suganami et al., 2005; Bourlier et Bouloumie, 2009). V předchozích studiích, včetně naší studie (Mraz et al., 2011), byla zjištěna zvýšená genová exprese celé řady chemokinů a jejich odpovídajících receptorů u obézních subjektů v tukové tkáni (Dahlman et al., 2005; Huber et al., 2008), což naznačuje, že obezita samotná zvyšuje chemoatrakční potenciál podkožní tukové tkáně. Spektrum chemokinů se zvýšenou expresí bylo pak ještě širší u diabetických pacientů (Mraz et al., 2011). Zvýšená mRNA exprese těchto chemokinů korelovala pozitivně s množstvím tukové

tkáně (Kamei et al., 2006). Současně přítomná nižší exprese protizánětlivého a inzulinsenzitizujícího adiponektinu a AdipoR1 a naopak zvýšená exprese prozánětlivého faktoru rezistinu v tukové tkáni spolu se zvýšenou expresí několika chemokinových receptorů, ale také dalších receptorů účastnících se regulace produkce chemokinů a cytokinů (TLR-2, -4, IL-6 receptor atd.) v periferních monocytech u jedinců s diabetem 2. typu svědčí o silně prozánětlivém a chemoatrakčním stavu podkožní tukové tkáně pro makrofágy, T-lymfocyty a další imunokompetentní buňky a o **intenzivním vzájemném působení hormonů a cytokinů mezi podkožní tukovou tkání a periferními monocyty** (Mraz et al., 2011).

Krátkodobá dietní intervence spojená s redukcí hmotnosti vedla k významnému poklesu mRNA exprese téměř všech měřených chemokinových a cytokinových receptorů v periferních monocytech, které byly před intervencí zvýšené, což naznačuje možnost snížení reaktivity na chemotaktické signály spolu se snížením infiltrace tukové tkáně monocyty vlivem krátkodobé dietní intervence (Mraz et al., 2011).

*Obrázek 18: Mechanismy vzniku subklinického zánětu v tukové tkáni u obezity (TNF $\alpha$ , tumor nekrotizující faktor  $\alpha$ ; IL-2, interleukin-2; IL-6, interleukin-6; IL-1 $\beta$ , interleukin-1 $\beta$ ).*



## 7.2 Úloha GH/IGF-1 v imunitním systému

U hypofyzektomovaných hlodavců byly pozorovány defekty jak v humorální, tak buněčné imunitě. Podání GH nebo IGF-1 normalizovalo imunodeficit u Snell zakrslých myši. U pacientů s GH deficitem však nebyla zjištěna žádná klinicky signifikantní imunodeficeence, což může být také dáno normálním množstvím PRL, vzhledem k tomu, že lidský GH aktivuje také PRL-receptor na lidských neutrofilech a PRL s GH sdílí významné imunoregulační vlastnosti. Dlouhodobý dopad chybění vlivu IGF-1 na imunitní pochody zůstává neznámý



z toho důvodu, že téměř všechny myši s nulovou mutací IGF-1R umírají krátce po narození (Kelley et al., 2007).

### **7.2.1 GH/IGF-1 a imunitní buňky-stimulace proliferace a diferenciac**

**GH je exprimován** nejen v předním laloku hypofýzy, ale také **imunitními buňkami** včetně periferních mononukleárních buněk, T-lymfocytů, B-lymfocytů, monocytů, makrofágů a neutrofilů. Tyto buňky také **nesou GH-R** (Hattori et al., 2009; Zarkesh-Esfahani et al., 2000; Fernández-Peréz et al., 2010; Rapaport et al., 1995; Lu et al., 2010) a jsou tedy **cílem účinku GH** (Warwick-Davies et al., 1995 -A; Chappel, 1999). Sekrece GH z imunitních buněk je stimulována cytokiny a mitogeny (Hattori et al., 2009).

Molekuly IGF-1 a IGF-2, které se obě mohou vázat na IGF-1R, mohou také modulovat určité funkce imunitního systému. Koojiman et al. studoval **expresi IGF-1R na subpopulacích periferních mononukleárních buněk**. IGF-1R byly hojně zastoupeny na monocytech, NK buňkách (natural killer cells, přirození zabíječi) a CD4<sup>+</sup> Th buňkách, střední množství receptorů bylo zjištěno na CD8<sup>+</sup> supresorových/cytotoxických buňkách a relativně málo receptorů na B-buňkách. IGF-1 měl v této studii skrze IGF-1R pozitivní efekt na stimulaci cytotoxicity NK buněk (Koojiman et al., 1992 -A). V jiné studii došel Stuart et al. k závěru, že se IGF-1 váže na IGF-1R převážně na monocytech a na B-lymfocytech (Stuart et al., 1991). Za hlavní typ leukocytů, které syntetizují a secernují IGF-1, byly označeny makrofágy včetně mikroglií (Arkins et al., 1993).

**GH a IGF-1 mají řadu imunoregulačních účinků**. Stimulují maturaci myeloidních buněk, migraci fagocytů (neutrofilů a monocytů), tvorbu reaktivního kyslíku a peroxidu vodíku, v makrofázích zvyšují aktivitu opsoninů a obsah lyzozomálního enzymu (Saito et al., 1996). **GH zvyšuje** aktivitu NK buněk a zabíjecí kapacitu neutrofilů a makrofágů (Kooijman et al., 1996; Weigent, 1996; Kelley et al., 2007), **proliferaci makrofágů** (Lu et al., 2010; Smith et al., 2000), thymopoezu a vývoj T-buněk, čehož se zkouší využívat u pacientů s T-buněčnou imunodeficiencí a s AIDS (acquired immunodeficiency syndrome). GH dále moduluje produkci cytokinů, podporuje vývoj B-buněk a produkci protilátek, zvyšuje adhezi neutrofilů a **migraci monocytů**, má antiapoptotický efekt (Hattori et al., 2009) a u lymfocytů stimuluje produkci interferonu  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) (Kelley et al., 2007).

**IGF-1 stimuloval proliferaci lidských periferních mononukleárních buněk**, T-lymfocytů (Koojiman et al., 1992 -B) a lidských myeloblastických leukemických buněk (Li et al., 1998). V přítomnosti **IGF-1 se monocyty** izolované od pacientů s GH deficitem **diferencovaly v makrofágy** (Serri et al., 2004). IGF-1 byl také zkoumán v souvislosti s posílením neonatální

imunity, kdy stimuloval maturaci pupečnickových T-buněk a za přispění IL-6 inhiboval jejich apoptózu (Law et al., 2008). IGF-1 a lidský GH měly pozitivní vliv na stimulaci proliferace a maturace lidských dřevňových myeloidních buněk v granulocyty *in vitro* (Merchav et al., 1988). IGF-1 také inhiboval spontánní apoptózu lidských granulocytů z periferní krve *in vitro* (Koojiman et al., 2002). V jiné studii IGF-1 zvýšil fagocytózu a tzv. „respiratory burst“ (respirační vzplanutí) a snížil hladiny TNF $\alpha$  v séru neutrofilů a monocytů (Balteskard et al., 1998).

*Tabulka A: GH, IGF-1 stimulované imunitní procesy* (GH, růstový hormon; IGF-1, inzulinu podobný růstový faktor-1; IFN $\gamma$ , interferon  $\gamma$ ; NK buňky, přirození zabíječi (natural killer cells)).

**GH, IGF-1 stimulované imunitní procesy**

GH	IGF-1
Maturace myeloidních buněk	Proliferace mononukleárních buněk, T-lymfocytů
Proliferace makrofágů	Diferenciace monocytů v makrofágy
Migrace monocytů	Maturace T-buněk
Aktivita NK buněk	Maturace myeloidních buněk v granulocyty
Vývoj T- a B-buněk	Stimulace fagocytózy
Produkce cytokinů, protilátek, IFN $\gamma$	Inhibice apoptózy
Adheze neutrofilů	

### 7.2.2 Stimulační (nepříznivé) účinky GH na zánět

Arikan uvedl, že akromegalie podobně jako obezita nebo diabetes mellitus 2. typu by také mohla být spojena se subklinickým zánětem (Arikan et al., 2008). Ueland et al. zjistil, že **pacienti s akromegalií** měli značně snížené sérové hladiny antagonisty receptoru pro IL-1 (IL-1Ra) a zvýšené IL-1 $\beta$ , což naznačuje **zvýšenou IL-1 aktivitu**. IGF-1/GH v makrofázích signifikantně snižovaly uvolňování IL-1Ra a zvyšovaly IL-1 $\beta$  (Ueland et al., 2010).

Olarescu et al. uvedla, že u akromegalie jsou makrofágy a další imunitní buňky v **tukové tkáni** vystaveny vysokým lokálním koncentracím VMK uvolněných vlivem GH stimulované lipolýzy a že VMK mohou potenciálně účinkovat samy o sobě jako signály aktivující zánět v makrofázích interakcí s **TLR-4–NF $\kappa$ B/JNK** zánětlivými signálními dráhami. Dále také popsala, že **GH přímým zvýšením zánětlivého potenciálu zralých adipocytů může stimulovat inzulinovou rezistenci v tukové tkáni u aktivní akromegalie**. V lidských

adipocytech u akromegaliků stimuloval GH, ale nikoli IGF-1 zánět **zvýšením VEGF** (hlavní regulátor angiogeneze) a **MCPI** (rekrutuje imunitní buňky do místa zánětu) exprese *in vitro* a byla prokázána korelace mezi sérovými hladinami VEGF a inzulinovou rezistencí (Olarescu et al., 2014). V dřívější studii stejná autorka zjistila zvýšené hladiny nikotinamid fosforibosyltransferázy (NAMPT, visfatinu) v séru u aktivní akromegalie i její *in vitro* exprese v adipocytech po GH stimulaci a naznačila, že **NAMPT** by mohl být prozánětlivý mediátor přispívající k infiltraci monocytů do tukové tkáně (Olarescu et al., 2012). **Na druhou stranu Hochberg et al.** v nedávné studii u akromegaliků zjistil nižší mRNA expresi prozánětlivé proteinkinázy IKK $\beta$  a tendenci k nižší expresi prozánětlivých cytokinů IL-1 $\beta$ , IL-6 a MCP1 v podkožní tukové tkáni a naznačil tak, že **inzulinová rezistence u těchto pacientů není dána vlivem zvýšené prozánětlivé signalizace** (Hochberg et al., 2015).

GH ve vysokých dávkách zvýšil produkci IL-1 $\alpha$ , IL-6 a TNF $\alpha$  v lidských lipopolysacharidem (LPS) aktivovaných **monocytech** z plné krve kriticky nemocných dospělých, což mohlo být důvodem jejich zvýšené morbidity a mortality spojené se septickým šokem a infekcemi (Uronen-Hansson et al., 2003). Vysoké dávky GH v jiné studii u zdravých dobrovolníků však neměly vliv na sekreci prozánětlivých cytokinů (TNF $\alpha$ , IL-6 a IFN $\gamma$ ) z aktivovaných periferních monocytů (Zarkesh-Esfahani et al., 2000).

V 3T3-F442A **preadipocytech** zvyšoval GH aktivitu **NFkB**, čímž se zvýšila zánětlivá odpověď stimulací produkce cytokinů včetně TNF $\alpha$ , IL-6 a MCP1, v **makrofázích** však GH aktivitu NFkB snižoval (Kumar et al., 2014).

U GH-R-KO dlouhověkových myší s dobrou inzulinovou senzitivitou byly snižené hladiny prozánětlivého IL-6 v epididymální a perinefrické **tukové tkáni** v porovnání s kontrolní skupinou. Podobná tendence byla v těchto tukových depech i u TNF $\alpha$  (Wang et al., 2006). Masivní zvýšení hladin GH u GH transgenních myší bylo spojeno se zvýšením prozánětlivých cytokinů v adipocytech (Wang et al., 2007).

### **7.2.3 Inhibiční (příznivé) účinky GH na zánět**

Nicméně v řadě jiných studií měl GH příznivý vliv na zánět. Za předpokládaný příznivý vliv GH u sepse prasátek se pokládalo **snížení sérového TNF $\alpha$**  (Balteskard et al., 1997). V lidských **monocytech** inhiboval GH nukleární translokaci NFkB stimulovanou LPS (Haeffner et al., 1997). Vlivem **inhibice NFkB v makrofázích** potlačoval GH také sekreci IL-1 $\beta$  (inhibitoru adipogeneze) z makrofágů (Lu et al., 2010). Vyřazení genu pro GH-R na makrofázích u myší (**MacGH-R-KO**) s dietou indukovanou obezitou mělo nečekaně negativní vliv na glukózovou homeostázu, což bylo dáno akcentací zánětu, zvýšeným

množstvím makrofágů se shiftem k M1 polarizaci spolu se **zvýšenou expresí prozánětlivých cytokinů** (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 a osteopontinu) **v tukové tkáni** (Lu et al., 2013).

**V adipocytech** (Reynolds et al., 2014; Reynolds et al., 2013 -A) a v diferencovaných **makrofázích** z hematopoetických buněk kostní dřeně (Reynolds et al., 2013 -B) potkaních potomků samic s podvýživou během gravidity **zabránilo předlčení GH prozánětlivému fenotypu** (zvýšené sekreci prozánětlivých cytokinů, zvýšené expresi cytokinů a jejich receptorů a zvýšené signalizaci TLR-4/NFkB). Podávání GH v nízké dávce snižovalo expresi TLR-2 a TNF $\alpha$  na **adipocytech** ve viscerálním tuku myši, a tak zřejmě skrze účinek IGF-1 inhibovalo změny vyvolané vysokotukovou dietou spojené s inzulinovou rezistencí (Kubota et al., 2008). V jiné studii **u mužů s GH deficitem** snížil GH **v tukové tkáni** signalizaci a expresi genů kódujících komponenty extracelulární matrix a transformační růstový faktor  $\beta$  (TGF $\beta$ ), což naznačuje příznivý vliv na zánět v tukové tkáni (Zhao et al., 2011).

Řada studií potvrdila snížení hladin vysoce senzitivního C-reaktivního proteinu (hsCRP) (Deepak et al., 2010), event. i IL-6 po léčbě GH (Sesnilo et al., 2000; Franco et al., 2007) nebo **snížení hsCRP u akromegalie** (Andreassen et al., 2007). Naopak léčba akromegalie (Lin et al., 2012) nebo stavy s GH deficitem byly spojeny se zvýšením sérových hladin hsCRP a YKL-40 (reaktantu akutní fáze) (Andreassen et al., 2007).

#### **7.2.4 Stimulační (nepříznivé) účinky IGF-1 na zánět**

Che et al. uvedl, že IGF-1 je stimulující faktor pro cytokiny indukovaný zánět endotelových buněk a může hrát roli v časných fázích aterogeneze, např. **zvýšením TNF $\alpha$  indukované exprese adhezních molekul** v endotelových buňkách vedoucí ke zvýšení adheze monocytů (Che et al., 2002). Ve studii Klugeho et al. se **zvýšila mRNA exprese IGF-1 na monocytech/makrofázích** z místa zánětu po **mikroembolizaci srdce** a IGF-1 se účastnil zánětem indukovaných angiogenních a reparačních procesů (Kluge et al., 1997).

Úloha IGF-1 v regulaci zánětlivých a imunitních pochodů je však zřejmě komplexnější. V některých případech se ukázalo, že **při nízkých koncentracích IGF-1 stimuluje proliferaci** hladkých svalových buněk arterií a **při vysokých koncentracích ji inhibuje**, což naznačuje, že IGF-1 by mohl být jak proaterogenní, tak protiataterogenní faktor (Mohanraj et al., 2013).

#### **7.2.5 Inhibiční (příznivé) účinky IGF-1 na zánět**

Jiné experimentální záznamy ukázaly, že IGF-1 měl antioxidační, protizánětlivé a antiapoptotické účinky na cévní systém spojené se snížením aterosklerotických plátů a

**stimulací stabilizace ateroplátů** (Higashi et al., 2014). Anwar et al. popsali, že  $\text{TNF}\alpha$  indukované snížení exprese IGF-1 v hladké svalovině cév v aterosklerotických plátech může hrát roli u akutního infarktu myokardu zvýšením nestability plátů (Anwar et al., 2002). V jiné studii v aortách obézních potkanů **exacerboval chronický deficit GH/IGF-1** vysokotukovou dietou indukovaný **zánět**, endotelovou dysfunkci, oxidační stres a expresi zánětlivých markerů ( $\text{TNF}\alpha$ , intercelulární adhezni molekuly-1 (ICAM-1)) (Bailey-Downs et al., 2012).

IGF-1 může být klíčovým regulátorem neonatálních imunitních reakcí při maturačních procesech a zánětu prostřednictvím inhibice prozánětlivých Th1 odpovědí. Přidání IGF-1 do kultury plné pupečnickové krve **inhibovalo sekreci  $\text{IFN}\gamma$**  ze stimulovaných **mononukleárních buněk** (Puzik et al., 2012). IGF-1 produkovaný monocyty/makrofágy při svalovém poranění je klíčovým faktorem hojení a polarizace makrofágů při zánětlivé fázi a regeneraci (Tonkin et al., 2015).

Také v jiné studii **snižovaly** nízké dávky GH skrze účinek IGF-1 **populaci TLR-2/ $\text{TNF}\alpha$  koexprimujících adipocytů** ve viscerálním tuku u myši na vysokotukové dietě. IGF-1, ale nikoliv GH inhiboval na 3T3-L1 buňkách expresi  $\text{TNF}\alpha$  a TLR-2 stimulovanou VMK (Kubota et al., 2008). **IGF-1** je také pravděpodobným **mediátorem při remisi diabetu 1. typu** myši po transplantaci embryonální hnědé tukové tkáně díky svým **adipogenním a protizánětlivým vlastnostem** (Gunawardana et Piston, 2015). V lidských podkožních, ale nikoli omentálních preadipocytech obézních jedinců snižoval IGF-1 mastnými kyselinami indukovanou fosforylaci JNK1 a expresi  $\text{TNF}\alpha$  skrze aktivaci Akt (Neacsu et al., 2013).

**Inverzní asociace mezi IGF-1 hladinami** a zánětlivými ukazateli včetně **hsCRP** a IL-6 byly zjištěny u akromegalie (Lohr et al., 2014) a v dalších subpopulacích ze studií SHIP (Study of Health in Pomerania) (Lohr et al., 2014), resp. CHS (Cardiovascular Health Study) (Rajpathak et al., 2008) či u starší populace (Andreassen et al., 2010).

Osa GH/IGF-1 může modulovat zánětlivé procesy, nicméně, jak je patrné z výše uvedených studií, tyto vztahy jsou komplikované a nelze jasně stanovit, zda jsou *in vivo* účinky GH/IGF-1 především **pro-** nebo **protizánětlivé** (Andreassen et al., 2012).

### **7.2.6 IGFBP-3 a protizánětlivý a antiproliferační vliv na imunitní buňky**

Bylo zjištěno, že na rozdíl od IGF-1 má **IGFBP-3 antiproliferační aktivitu proti myeloidním leukemickým buňkám**, a to prostřednictvím zesílení účinku retinoidů (Ikezoe et al., 2004). Z výsledků studií vyplývá, že IGFBP-3 hraje významnou roli v **regulaci apoptózy**

**monocytárních buněk** na IGF-1 nezávislém způsobu, ale také že moduluje biologickou dostupnost IGF-1 a jeho antiapoptotické účinky. Exprese IGFBP-3 byla významně zvýšená při apoptóze stimulované LPS (Agnese et al., 2002).

Uvádí se, že IGFBP-3 má protinádorové a **protizánětlivé účinky nezávislé na IGF-1** skrze specifický IGFBP-3 receptor (IGFBP-3R), které zahrnují aktivaci dráhy kaspázy a interakci s NFkB signalizací (Han et al., 2011; Ingermann et al., 2010; Mohanraj et al., 2013). Několik studií ukázalo, že IGFBP-3 je schopný **inhibovat NFkB dráhu** (Williams et al., 2007). V lidských **adipocytech** IGFBP-3 inhiboval TNF $\alpha$  indukovanou aktivitu NFkB na IGF nezávislém způsobu, **snížoval MCP1 hladiny**, potlačil TNF $\alpha$  indukovanou inhibici vychytávání glukózy a normalizoval hladiny IRS-1, GLUT4 a adiponektinu. V lidských aortálních **endotelových buňkách** (HAEC) IGFBP-3 také inhiboval TNF $\alpha$ , CRP a vysokou glykemií indukovanou aktivitu NFkB a následně skrze IGFBP-3R potlačoval adhezi monocytů k těmto buňkám **inhibicí TNF $\alpha$  indukovaných adhezních molekul ICAM-1, VCAM-1** (adhezní molekula cévních buněk-1) a MCP1 distálně od NFkB dráhy, a to nezávisle na IGF-1 (Mohanraj et al., 2013). Mohanraj et al. také ukázala, že M2 **makrofágy** (metabolicky pozitivní) exprimují vyšší hladiny IGFBP-3 než M1 makrofágy a naznačila, že nižší exprese IGFBP-3 makrofágy u obezity včetně vyšší proteolýzy IGFBP-3 může přispívat k obezitě a inzulinové rezistenci (Mohanraj et al., 2013).

Rajpathak demonstroval **inverzní vztahy také mezi IGFBP-3 v séru a hsCRP** a IL-6 u starší populace (Rajpathak et al., 2008). Vysoké plazmatické hladiny CRP a IL-6 u starších pacientů s podvýživou byly spojeny s vysokými hladinami proteolyzovaného IGFBP-3 (Raynaud-Simon et al., 2002).

Uvažuje se také o potenciálním **léčebném vlivu IGFBP-3 u diabetické retinopatie** pro jeho možný protektivní vliv (Lau et al., 2013) daný např. snížením adheze monocytů k endotelu retiny snížením hladin ICAM-1 (Zhang et al., 2013 -A), inhibicí apoptózy retinálních endotelových buněk skrze aktivaci IGFBP-3R (Zhang et al., 2013 -B), snížením exprese TNF $\alpha$  (Zhang et al., 2014) či obnovením integrity cév (Kielszewski et al., 2011).

*Tabulka B: Protizánětlivé účinky IGF-1 a IGFBP-3* (HAEC, lidské aortální endotelové buňky; ICAM-1, intercelulární adhezni molekula-1; IFN $\gamma$ , interferon  $\gamma$ ; IGF-1, inzulinu podobný růstový faktor-1; IGFBP-3, IGF-vazebný protein-3; JNK1, c-Jun N-terminální kináza-1; MCP1, monocytární chemoatrakční protein-1; NF $\kappa$ B, nukleární faktor kappa B; TLR-2, toll-like receptor-2; TNF $\alpha$ , tumor nekrotizující faktor  $\alpha$ ; VCAM-1, adhezni molekula cévních buněk-1).

**Protizánětlivé účinky IGF-1 a IGFBP-3**

IGF-1	IGFBP-3
<b>Inhibice</b> exprese TLR-2/TNF $\alpha$ indukované VMK na adipocytech	<b>Antiproliferační účinky</b> proti myeloidním buňkám
<b>Inhibice</b> JNK1 fosforylace, TNF $\alpha$ exprese indukované VMK v preadipocytech	<b>Apoptóza monocytů</b> (skrze na IGF-1 závislé i nezávislé mechanismy)
<b>Snížení</b> prozánětlivé odpovědi Th1 u novorozenců	<b>Snížení</b> TNF $\alpha$ indukované NF $\kappa$ B aktivity v adipocytech, v HAEC
<b>Snížení</b> sekrece IFN $\gamma$ z monocytů pupečnickové krve	<b>Snížení</b> TNF $\alpha$ indukované exprese ICAM-1, VCAM-1, MCP1, snížení adheze monocytů k HAEC

### **7.3 Inhibiční vliv zánětu na osu GH/IGF-1**

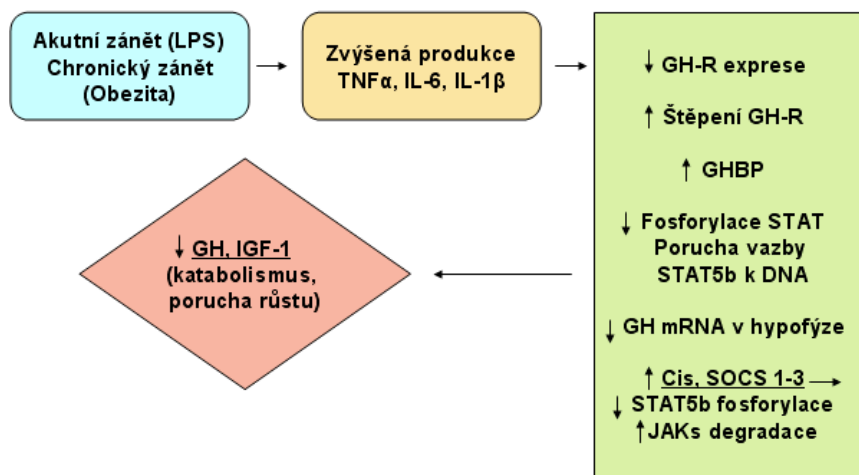
Jak akutní zánět (např. LPS indukovaná sepse) (Wojnar et al., 1999; Papastathi et al., 2013), tak chronické **zánětlivé stavy** (Savage et al., 2011), kterým může být např. i **obezita** či nadváha (Savastano et al., 2011), jsou spojeny se **zvýšenou hladinou prozánětlivých cytokinů** (TNF $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ ) a zároveň se **sníženými hladinami GH/IGF-1**.

Experimentální modely zánětlivých chorob u zvířat odhalily **několik mechanismů vedoucích ke snížené aktivitě GH/IGF-1**: TNF $\alpha$  stimulované snížení množství (downregulace) GH-R (DiFidele et al., 2005), proteolytické štěpení GH-R (Wang et al., 2008), zvýšení GHBP (O'Leary et al., 2000), snížení fosforylace/aktivace STAT5 (DiFidele et al., 2005), dále porucha vazby STAT5b k DNA (Ahmed et al., 2007; Chen et al., 2010), snížené GH mRNA hladiny v hypofýze (Lopez-Calderon et al., 1999). Některé zánětlivé cytokiny včetně TNF $\alpha$  a IL-6 mohou zvýšit jaterní mRNA expresi Cis (SH2 doménu obsahujícího proteinu inducibilního cytokiny) a SOCS1-3 a ty zas mohou inhibovat signalizaci GH zabráněním fosforylace STAT5b závislé na GH-R/JAK2 (Colson et al., 2000) nebo mohou stimulovat proteasomální degradaci JAKs (Zhang et al., 1999).

Během zánětu vede rezistence jater k účinkům GH ke snížení exprese IGF-1, k aktivaci katabolismu a případně k poruchám růstu. Kriticky nemocné děti mají často nízké hladiny IGF-1 a -2 a IGFBP-3 spolu se zvýšenými hladinami GH (Gardelis et al., 2005). V některých

katabolických stavech se však může kombinovat periferní rezistence ke GH a somatotropní insuficience (Gianotti et al., 1998). Hladiny GH také pravděpodobně závisí na délce trvání zánětu/stresu. Akutní stres (i.v. administrace IL-1 $\beta$  a TNF $\alpha$  potkanům) byl následován signifikantním snížením plazmatických hladin GH snad souvisejícím se stimulací CRH (corticotropin releasing hormone). Po chronickém stresu (indukovaná artritida) došlo naopak k signifikantnímu zvýšení GH hladin (Corsi et al., 1997).

*Obrázek 19: Mechanismy snížení GH/IGF-1 vlivem zánětu* (Cis, protein obsahující SH2 doménu inducibilní cytokiny; DNA, deoxyribonukleová kyselina; GH, růstový hormon; GHBP, GH vazebný protein; GH-R, receptor růstového hormonu; IGF-1, inzulinu podobný růstový faktor-1; IL-6, interleukin-6; IL-1 $\beta$ , interleukin-1 $\beta$ ; JAKs, Janus kinázy; LPS, lipopolysacharid; TNF $\alpha$ , tumor nekrotizující faktor  $\alpha$ ; STAT, signální transducer a aktivátor transkripce; SOCS, supresory cytokinové signalizace).



### 7.3.1 Obezita a komponenty osy GH/IGF-1

**Obezita** je často popisována jako **stav suprese GH** a je spojena se značným snížením spontánní sekrece GH a nižšími hladinami IGF-1 (Rasmussen et al., 1995; Rasmussen et al., 2010), což může souviset právě se zvýšenou hladinou prozánětlivých cytokinů u obezity (Savastano et al., 2011). Patofyziologický mechanismus odpovědný za nízkou sekreci GH u obezity je však pravděpodobně multifaktoriální. Mezi dalšími zvažovanými faktory se uvádí chronický stav zvýšené sekrece somatostatinu, zvýšené hladiny VMK nebo snížená sekrece ghrelinu (Alvarez-Castro et al., 2011). Nam a Marcus popisují, že snížená sekrece GH u obezity se považuje za konsekvenci a nikoli za příčinu obezity (Nam et Marcus, 2000). Avšak např. autoři výše zmíněné studie Lu et al., ve které **GH zvyšoval adipocytární diferenciaci vlivem snížení sekrece IL-1 $\beta$  (inhibitoru adipogeneze) z makrofágů**, se domnívají, že



snížení sekrece a účinku GH u obezity může snížením počtu adipocytů a omezením kapacity tukové tkáně pro skladování mastných kyselin přispívat k inzulinové rezistenci a že **GH může chránit před nepříznivými účinky obezity na metabolismus** (Lu et al., 2010). Poskytují tak mechanistické vysvětlení pro pozorovaný pokles počtu adipocytů u dětí s GH deficitem (Lu et al., 2010). Ačkoli snížená sekrece GH u obezity může snížit tvorbu IGF-1 v játrech i v adipocytech, **u pacientů s obezitou byly popsány vedle snížených a normálních také vysoké hladiny IGF-1 pravděpodobně v důsledku zvýšené produkce IGF-1 (a GHBP) nadměrným množstvím tukové tkáně** (Nam et Marcus, 2000).

Erman et al. **u obézních žen demonstroval GH rezistenci vlivem snížené exprese GH-R na adipocytech** (Erman et al., 2011 -A, -B), což by mohlo souviset s tím, proč podávání GH není účinnou léčbou pro jedince s idiopatickou obezitou. Naznačil dále, že GH-R transkripce může být v tukové tkáni u obézních ovlivněna vlivem zvýšené aktivity TNF $\alpha$ , hypoxií indukibilního faktoru 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) a glukokortikoidů (tři nejzásadnějších promotorů GH-R) (Erman et al., 2011 -A). Buijs et al. také uvedl, že hyposomatotropismus u obezity není kompenzován zvýšenou odpovědí tukové tkáně k účinku GH, což vede k omezení lipolýzy (Buijs et al., 2002).

### **7.3.2 Vliv zánětu na IGFBPs**

Akutní zánět u potkanů **snížil** také sérové hladiny **IGFBP-3**, a to spíše snížením jeho syntézy v játrech než zvýšením jeho proteolýzy. Tento efekt se zdál být nezávislý na GH a IGF-1 (Priego et al., 2003). Pacienti s ulcerózní kolitidou nebo Crohnovou chorobou měli také **snížené** sérové koncentrace **IGFBP-3** (Katsanos et al., 2001).

Artritida u potkanů však **zvýšila** sérové hladiny **IGFBPs** (Lopez-Calderon et al., 1999). Jiní autoři uvedli, že zvýšená akumulace IGFBP-1 v kosterním svalu při infekci může potenciálně inhibovat na IGF závislou proteosyntézu (Frost et Lang, 2004). Chronické podání LPS u potkanů snížilo sérové IGF-1 a obsah GH v hypofýze, ale **zvýšilo sérové IGFBP-1-4**. Tyto změny by mohly být důležitými mechanismy v poklesu tělesné hmotnosti během chronického zánětu (Soto et al., 1998).

## **8. VLIV KALORICKÉ RESTRIKCE NA KOMPONENTY OSY GH/IGF-1**

### **8.1 Vliv kalorické restriktce/lačnění na GH/IGF-1 komponenty**

To, že příjem proteinů a zvláště energetický příjem jsou důležitými regulátory sérových hladin IGF-1, je známo již déle (Isley et al., 1983). Účinky GH/IGF-1 osy mohou být regulovány podle nutričního stavu a tkáňově specificky, kdy **lačnění vede k omezení růst stimuluujících účinků GH a tvorby IGF-1 a naopak k podpoře účinků mobilizujících lipidy/ lipolýze**. Přesné mechanismy této regulace však zůstávají nejasné (Norbeck et al., 2007; Møller et al., 2009).

#### **8.1.1 Experimentální studie-sérové hladiny i exprese**

U lačnicích ryb byla zjištěna **snížená mRNA exprese GH-R v játrech** a žábrech, v **tukové tkáni** však byla tato exprese **zvýšená** a došlo k **depleci lipidů**. S tím bylo spojeno **snížení IGF-1 mRNA exprese v játrech, tuku** a žábrech a snížení jeho sérové hladiny (Norbeck et al., 2007). U lačnicích potkanů došlo po 5 dnech léčby bGH k poklesu mRNA exprese GH-R v játrech. Paralelní změny probíhaly i u sérových hladin IGF-1 (Ohashi et al., 1995; Kaji et al., 1994). I Butler et al. popisuje **refrakternost jater k působení GH během negativní energetické bilance** u skotu (Butler et al., 2003). Kalorická restriktce je tedy zpravidla spojena s poklesem exprese IGF-1 v játrech a jeho sérových hladin. Refrakternost ke GH v trvalém lačnicím stavu může být výhodná **k zabránění anabolických účinků GH** (Ohashi et al., 1995; Kaji et al., 1994).

Dlouhodobá kalorická restriktce snížila mRNA expresi IGF-1 v kosterním svalu jak u normálních, tak u GH-R-KO myší. V játrech u GH-R-KO myší vedla však tato restriktce ke zvýšení IGF-1 mRNA exprese (Masternak et al., 2005). Prasata malého vzrůstu vlivem výživy měla nižší IGF-2 a GH-R mRNA expresi ve svalu, naproti tomu v tukové tkáni byly IGF-1 a IGF-2 mRNA nejvyšší u těchto prasat (Matteri et al., 2000). U plodů prasat se spontánní intrauterinní růstovou retardací byla snížená IGF-1 mRNA, ale zvýšená IGF-2 mRNA v podkožní tukové tkáni ve srovnání s prasaty se střední porodní hmotností (Gondret et al., 2013).

Delší 28 denní restriktce energetického příjmu u lachtanů vedla vedle poklesu sérových koncentrací IGF-1 navíc také ke **vzestupu hladin GH a IGFBP-2** (Richmond et al., 2010). 48 hodinové lačnění potkanů či matek plodů potkanů u nich vedlo ke snížení IGF-1 mRNA,

ale ke **zvýšení IGFBP-1 mRNA v játrech**, s čímž mohou být spojeny zjištěné změny v hladinách inzulínu a glukózy a což může přispívat k růstové retardaci u plodů (Li et al., 1999; Straus et al., 1991). U plodů potkanů podvyživených matek byla oproti kontrolním plodům snižená jaterní mRNA exprese IGFBP-1. Po porodu se snížila sérová hladina IGF-1 a zároveň se u obou skupin zvýšily sérové hladiny IGFBP-1 a -2 paralelně s jejich mRNA expresí v játrech (Rivero et al., 1995). Hladovění u PEPCK-IGF-2 transgenických myší se zvýšenou expresí a sérovou hladinou IGF-2 vedlo k výraznějšímu poklesu IGF-1 a **zvýšení IGFBP-2 v séru** v porovnání s kontrolní skupinou (Wolf et al., 1994).

### **8.1.2 Klinické studie-sérové hladiny**

Jak bylo uvedeno výše, sérové hladiny IGF-1 jsou závislé na dietě a složení stravy. Je známo, že hladiny IGF-1 jsou nižší u veganů ve srovnání s lakto-ovo-vegetariány a omnivory (Allen et al., 2002).

Kombinace lačnění a podání GH u zdravých mužů vedlo ke snížení rychlosti clearance GH, zvýšené lipolýze, snížené aktivitě IGF-1 a snížené inzulínové senzitivitě a poruše aktivity JAK/STAT dráhy (Møller et al., 2009). **Snížení sérových hladin IGF-1** bylo pozorováno po **kalorické restrikci** u obézních dívek (Wabitsch et al., 1996), krátké nízkotučné dietě doprovázené rychlým poklesem hmotnosti u obézních žen (De Pergola et al., 1998) či po 4 denním lačnění u neobézních jedinců (Bang et al., 1994). U obézních bez diabetu zde nastalo mírné snížení hladin, zatímco u obézních diabetiků 2. typu nebyla pozorována žádná změna, což autoři přisuzují možné inzulínové rezistenci (Bang et al., 1994).

Ve studii Banga et al. se po 4 denním lačnění také **zvýšilo IGFBP-1** v séru u obézních a zdravých subjektů, ale nikoli u diabetiků 2. typu (Bang et al., 1994). Kalorická restrikce vedla ke zvýšení IGFBP-1 u dospělých, ale nikoli u dětí (Smith et al., 1995). Lačnění zvýšilo IGFBP-1 v séru jak u kontrolních subjektů, tak u akromegaliků, kde byly ale hladiny nižší než u kontrolní skupiny (Grottoli et al., 2008). Ke **zvýšení IGFBP-2** hladin v séru vedla restrikce proteinů ve stravě, a to jak u dospělých, tak u dětí (Smith et al., 1995). IGFBP-2 v séru se zvýšilo také po 9 denním lačnění u zdravých subjektů (Clemmons et al., 1991). Rasmussen et al. uvedl, že **IGFBP-2 by tak mohl mít úlohu v regulaci dostupnosti IGF-1 během krátkodobé kalorické restrikce** (Rasmussen et al., 2006).

Po krátké nízkotučné dietě doprovázené rychlým poklesem hmotnosti u obézních jedinců došlo ke **zvýšení IGFBP-3** v séru (De Pergola et al., 1998). Kalorická restrikce byla však u dětí spojena s **poklesem IGFBP-3** v séru (Smith et al., 1995). U akromegalických pacientů ve

studii Grottoli et al. byly zjištěny podobné sérové hladiny IGFBP-3 jako u kontrolní skupiny a **nezměnily se** ani po 36 hodinách lačnění u žádné ze skupin (Grottoli et al., 2008).

Pokles volného IGF-1 při absenci zvýšení snížených hladin GH a IGFBP-1-3 proteolytické aktivity nastal u obezních subjektů po 4 denní nízkokalorické dietě. Autor zde naznačuje, že **volné IGF-1 zřejmě není hlavním regulátorem zpětnovazebného snížení hladin GH** u obezních jedinců s dietou (Rasmussen et al., 2006). V jiné studii Goya et al. naznačuje, že IGF/IGFBP by mohly být regulovány nezávisle na GH, ale zprostředkovaně skrze rovnováhu mezi inzulinem a nutričním stavem (Goya et al., 1996).

### **8.1.3 Snížení IGF-1 po kalorické restrikci jako protinádorový mechanismus**

Mnohé metabolické důsledky energetické restrikce pramení právě ze snížení hladin inzulinu a IGF-1. Tento efekt snížení IGF-1 a jeho proliferačních schopností byl studován hlavně v kontextu protinádorového účinku energetické restrikce (Giovannucci et al., 2001).

U samic myší byla intermitentní kalorická restrikce spojena se signifikantně nižším sérovým IGF-1 a poměrem IGF-1/IGFBP-3 než u myší s chronickou kalorickou restrikcí a zdála se tak účinnější v prevenci vzniku tumoru prsu u myší (Rogozina et al., 2009). **Ketogenní dieta s vysokým obsahem tuku bez obsahu sacharidů** u myší s karcinomem prostaty byla spojena se sníženými sérovými hladinami inzulinu, IGF-1, poměrem IGF-1/IGFBP-1 a poměrem IGF-1/IGFBP-3 a **prodlouženým přežíváním** oproti myším s dietou s vyrovnaným poměrem sacharidů a tuků. Byly také potlačeny dráhy spojené s inhibicí apoptózy, zánětem, inzulinovou rezistencí a obezitou (Mavropoulos et al., 2009). **Kalorická restrikce snížila počet** experimentálně indukovaných **tumorů tlustého střeva** u myší, hladinu prozánětlivých cytokinů, IGF-1 a proliferaci a zvýšila IGFBP-3 a apoptózu (Olivo-Marston et al., 2014). 48 hodinové **lačnění** vedlo u potkanů **k poklesu** hmotnosti, IGF-1 a GLP-2 v plazmě, poklesu **jejunální mukózní buněčnosti** a jejunální IGF-1 mRNA (Nelson et al., 2008).

Naopak **dieta s vysokým obsahem sacharózy** u myší s mutací Apc genu s mnohočetnou střevní neoplázií (Min) **zvýšila intestinální epiteliální buněčnou proliferaci a tumorigenezi** a jaterní IGF-1 mRNA a ve střevě také zvýšila IGF-2 a snížila IGFBP-3 expresi (Wang et al., 2009).

### **8.2 Vliv zvýšeného kalorického příjmu na GH/IGF-1 komponenty**

IGF-1 byl signifikantně zvýšený v séru a v játrech u myší s vysokou hmotností a u myší na vysokoproteinové dietě (Timtchenko et al., 1999). Protein ve stravě zvýšil IGF-1 také

v tukové tkáni u prasat (Brameld et al., 1996). Vysokoproteinová dieta nezvýšila IGF-2 v séru u kontrolních myší, ale pouze u IGF-2 transgenních myší (Blackburn et al., 1997 -A).

Vyšší příjem mléčných bílkovin, soji a kalcia ve stravě u premenopauzálních žen byl také pozitivně spojen s koncentracemi IGF-1 (Gann et al., 2005).

Sebert et al. uvedl, že zvýšené sérové koncentrace IGF-1 spolu se změnami exprese PPAR $\alpha$ ,  $\gamma$  ve svalu u obézních mladých prasat překrmovaných dietou západního typu se mohou částečně podílet na příznivé regulaci jejich glykémie a hladin triglyceridů **skrze zvýšení množství tuku**, což u nich udržuje vysokou citlivost k inzulínu (Sebert et al., 2005). **Preventivní vliv vysokých hladin inzulínu a IGF-1 v séru na rozvoj diabetu**, které korespondovaly s jejich expresí v játrech, byl popsán také u berlínských vysoce obézních myší (Schafer et al., 2011).

Starší obézní myši krmené vysokotukovou dietou měly kromě hyperglykémie a hyperinzulinémie také sníženou IGFBP-1 mRNA expresi v játrech (Hoffler et al., 2009).

**Obezita** u myší krměných vysokotukovou dietou byla spojena se **zvýšenou expresí IGFBP-3** ve viscerální **tukové tkáni a kalorická restrikce vedla k jejímu poklesu** jak u obézních, tak u štíhlých myší (Kurki et al., 2012).

## **9. HYPOTÉZA A CÍLE PRÁCE**

Na základě výše uvedených poznatků předpokládáme, že změny lokální exprese komponent osy GH/IGF-1 v tukové tkáni (a cirkulujících monocyttech) se mohou významně podílet na etiopatogeneze poruchy glukózové tolerance, mimo jiné i prostřednictvím regulace subklinického zánětu, a přispívat ke změnám metabolismu tukové tkáně ve smyslu poruchy její diferenciaci a změn v jejím množství u pacientů s diabetes mellitus 2. typu a obezitou, potažmo i u akromegaliků. Dále předpokládáme, že změny sérových hladin nebo lokální mRNA exprese IGF-1 komponent vlivem kalorické restrikce mohou alespoň částečně přispívat k pozitivním metabolickým účinkům nízkokalorické diety. Tyto změny prakticky nebyly u lidí dosud systematicky zkoumány. Dále předpokládáme, že u akromegalie je mRNA exprese GH/IGF-1 komponent a p85alpha podjednotky PI3K v podkožní tukové tkáni ovlivněna dlouhodobě zvýšenými sérovými hladinami GH/IGF-1/inzulinu a že tyto změny exprese by mohly sehrávat roli při rozvoji inzulínové rezistence nebo při snížení množství tukové tkáně u akromegalie.

Specifické cíle naší práce byly následující:

1. Zkoumat úlohu komponent osy GH/IGF-1 v dysregulaci glukózového metabolismu prostřednictvím ovlivnění subklinického zánětu a množství tukové tkáně, a to primárně na úrovni tkáňové exprese IGF-1 komponent v podkožní tukové tkáni a periferních monocyttech u obézních jedinců s a bez diabetu 2. typu.
2. Zjistit možné změny sérových hladin a tkáňových mRNA expresí IGF-1 komponent vyvolané nízkokalorickou dietou u obézních diabetiček a zkoumat jejich možnou souvislost s pozitivním ovlivněním metabolismu.
3. Zkoumat efekt zvýšených hladin GH/IGF-1 komponent v séru u akromegalie na mRNA expresi komponent osy GH/IGF-1 v podkožní tukové tkáni a případné souvislosti s inzulínovou rezistencí nebo změnami množství tukové tkáně u těchto pacientů.
4. Ověřit, zda platí přímý vztah mezi zvýšenými sérovými hladinami inzulínu a GH a zvýšením tkáňové mRNA exprese p85alpha podjednotky PI3K i mimo experimentální studie,

tj. také u pacientů s akromegalií, a zda lze tímto mechanismem částečně vysvětlit rozvoj inzulinové rezistence v tukové tkáni akromegaliků.

## **10. METODIKA STUDIE**

Všechna klinická a laboratorní vyšetření byla prováděna na 3. interní klinice VFN ve spolupráci s Ústavem klinické biochemie a laboratorní diagnostiky VFN.

### **10.1 Vyšetření antropometrických, biochemických a hormonálních parametrů**

U všech vyšetřovaných subjektů byla změřena tělesná výška a hmotnost a vypočítán body mass index (BMI – hmotnost v kg/výška v m<sup>2</sup>). Tělesné složení bylo určeno pomocí DEXA (Dual-Energy X-Ray Absorptiometry (DEXA, Hologic Discovery, USA)). Odběry krevních vzorků byly provedeny za standardních podmínek po celonočním lačnění mezi 7. a 8. hodinou ránní. Do 30 minut byly vzorky zpracovány pomocí centrifugace (10 min při 1000 x g) a séra byla dále uskladněna při teplotě -80°C k dalšímu vyšetření.

Základní biochemické parametry byly stanoveny standardními laboratorními metodami. Hodnota LDL-cholesterolu byla vypočítána podle Friedwaldova vzorce. Glykovaný hemoglobin byl analyzován vysokovýkonnou kapalinovou chromatografií (HPLC) na analyzáru Variant II BioRad (BioRad). HOMA index (HOMeostasis Model Assessment) byl vypočítán pomocí vzorce: sérová koncentrace inzulinu nalačno (mIU/l) x glykémie nalačno/22,5 (Matthews, 1985).

Sérové hladiny celkového IGF-1 a GH byly měřeny IRMA kity (Immunotech, Prague, Czech Republic). Plazmatické hladiny volného IGF-1 byly měřeny ELISA kitem (Diagnostic Systems Laboratories, Inc., Webster, USA). Hladiny IGFBP-1, IGFBP-2 a IGFBP-3 byly měřeny ELISA kity (DiaSource ImmunoAssays S.A., Nivelles, Belgie). Sérové hladiny adiponektinu byly měřeny komerčním ELISA kitem (Linco Research, St. Charles, Missouri, USA). Sérové hladiny leptinu byly měřeny komerčním ELISA kitem (Biovendor, Brno, Česká republika). Sérové hladiny CRP byly měřeny vysoce senzitivním ELISA kitem (Bender Medsystems, Vídeň, Rakousko). Sérové hladiny inzulinu byly měřeny RIA kitem (Cis Bio International, Gif-sur-Yvette, Francie). Sérové hladiny estradiolu byly měřeny chemiluminescentní imunoassay technologií (CMIA) Chemiflex<sup>TM</sup> (ABBOTT laboratoriem, USA).

Intra- a interassay variabilita všech měření byla do 10 % resp. 15 %.

### **10.2 Biopsie podkožní tukové tkáně**

Biopsie podkožní tukové tkáně byla u pacientů prováděna v ranních hodinách současně s krevními odběry po 10-12 hodinovém lačnění. Vzorky tukové tkáně byly odebírány z oblasti



břišní stěny cca 10-15 cm laterálně od pupku. Po zarouškování a dezinfekci místa odběru bylo provedeno lokální znecitlivění 20 ml 1% trimecainu (Mesocain 1% inj. sol.). Následně byl skalpelem proveden krátký řez (3-4 mm), kterým byla paralelně s břišní stěnou zavedena plastová kanyla s kovovým zavaděčem (Braunüle MT, 12G, délka 80 mm, vnitřní/vnější průměr 2,2/2,7 mm, Braun Melsungen, Německo). Po opatrném rozrušení podkožní tukové tkáně byl odstraněn kovový zavaděč, na kanylu byla připojena 20 ml stříkačka a pomocí podtlaku bylo odebráno požadované množství tukové tkáně (200-1000 mg). Vzorky tkáně byly rozděleny do plastových zkumavek (Eppendorf AG, Německo, obsah 1,5 ml) s 1 ml RNA stabilizujícího činidla (RNAlater, Quiagen, Německo), okamžitě zamrazeny na -80°C a uloženy k dalšímu zpracování.

### **10.3 Izolace krevních monocytů**

Krevní vzorky použité k izolaci periferních monocytů byly odebírány do média obsahujícího Na-EDTA a zpracovány do 2 hodin po odběru. Leukocyty se ze vzorků získávaly pomocí Ficoll-Paque<sup>TM</sup> Plus (Amersham Biosciences AB, Švédsko). Do 50 ml zkumavky Falcon bylo napipetováno 3,5 ml Ficoll-Paque<sup>TM</sup> Plus a následně bylo pomalu přidáno 5 ml krevního vzorku. Po centrifugaci byly agregáty leukocytů přeneseny do další zkumavky obsahující 10 ml PBS (0,001M PBS, pH 7,4) a opětovně centrifugovány. Supernatant se odsál a buněčná peleta byla rozpuštěna v roztoku DE-GAS (0,01 M PBS pH 7,4; 0,5 M EDTA pH 8,0 a 1% BSA). Monocyty byly dále izolovány magnetickou izolační metodou za použití magnetických mikrokuliček značených monocytovým antigenem CD14 (MiniMacs Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Německo). Poté byla z CD14<sup>+</sup> monocytů na přístroji MagNA Pure instrument pomocí izolačního kitu MagNA Pure Compact RNA Isolation kit (Roche Diagnostics GmbH, Německo) izolována celková RNA.

### **10.4 Stanovení exprese mRNA**

Vzorky podkožní tukové tkáně byly homogenizovány na automatickém homogenizátoru MagNA Lyser použitím kuliček MagNA Lyser Green Beads (Roche Diagnostics GmbH, Německo). Celková RNA byla extrahována z homogenizovaných vzorků na přístroji MagNA Pure Instrument použitím kitu MagNA Pure Compact RNA Isolation kit (tissue) (Roche Diagnostics GmbH, Německo). Koncentrace RNA byla stanovena spektrofotometrickým měřením absorbance při 260 nm (BioPhotometer, Eppendorf AG, Hamburg, Německo nebo NanoPhotometer, Implen, Mnichov, Německo). Integrita RNA a její případná kontaminace

DNA byly kontrolovány elektroforeticky vizualizací 18S a 28S ribozomálních pruhů na 1% agarózovém gelu s ethidium bromidem.

Pro reverzní transkripci bylo použito 0,25 µg celkové RNA. Pro syntézu první větve cDNA byly použity náhodné primery, postup byl podle návodu High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Získaná cDNA byla použita pro stanovení relativní genové exprese IGF-1, IGF-2, IGF-1R, IGF-2R, IGF1BP-1, IGF1BP-2, IGF1BP-3, GH, GH-R, p85alpha, INS-R a beta-2-mikroglobulinu (B2M) pomocí qRT-PCR pomocí TaqMan® Universal PCR MasterMix, NO AmpErase® UNG a specifických TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems, CA, USA). PCR pro každý gen byla amplifikována zvlášť. Vzorky cDNA byly do dalšího zpracování skladovány při -20°C.

Stanovení genové exprese bylo provedeno na přístroji ABI PRISM 7500 Instrument (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Bylo provedeno 45 cyklů s následujícími parametry: 2 minuty při 50°C, 10 minut při 95°C a v každém cyklu 15 s denaturace při 95°C a 1 minuta při 60°C pro elongaci. Všechny vzorky byly měřeny alespoň v duplikátu. Data byla vyjádřena jako prahové hodnoty ( $C_T$ ), tzn. jako změna fluorescence v reálném čase. Pro každý vzorek byla z důvodu kompenzace rozdílů v množství použité RNA v reakční směsi a proměnlivé účinnosti reverzní transkripce stanovována také endogenní kontrola beta-2-mikroglobulin. Výsledky byly normalizovány na průměr těchto hodnot. Relativní genová exprese sledovaných genů byla vypočítána podle vzorce  $2^{-\Delta C_t}$  ( $\Delta C_t = C_{t_{\text{target}}} - C_{t_{\text{B2M}}}$ ).

### **10.5 Nízkokalorická dieta (VLCD – very-low-calorie diet)**

Obézní pacientky s diabetes mellitus 2. typu podstoupily v rámci redukčního pobytu na 3. interní klinice VFN dvoutýdenní hospitalizaci s nízkokalorickou dietou o energetickém obsahu 600 kcal (2500 kJ)/den.

### **10.6 Statistická analýza dat**

Statistické zpracování dat bylo provedeno pomocí programu SigmaStat (SPSS Inc., USA). Před analýzou byly všechny kontinuální proměnné zhodnoceny z hlediska normality (Kolmogorov-Smirnov test). Antropometrické, biochemické a hormonální parametry byly vyjádřeny jako průměr ± SD (směrodatná odchylka průměru), pokud není uvedeno jinak.

K vyhodnocení dat byly dle typu dat v jednotlivých podstudiích použity následující metody a testy: párový a nepárový  $t$ -test resp. Mann-Whitney Rank Sum Test nebo Wilcoxonův Signed-Rank Test, jednocestná analýza rozptylu (One-Way ANOVA) následovaná Holm-Sidakovým nebo Dunnovým testem.

Závislost mezi jednotlivými faktory byla hodnocena pomocí Spearmanova korelačního testu (Rho) a mnohočetné (Backward stepwise) regresní analýzy. Za statisticky významné byly považovány rozdíly a korelace, kde  $p$  bylo menší než 0,05.

## 11. VLASTNÍ VÝSLEDKY

### 11.1 Sérové koncentrace a tkáňová mRNA exprese komponent osy IGF-1 u žen s diabetem 2. typu a obezitou: vliv nízkokalorické diety

**Cíl práce:** Komponenty osy GH/IGF-1 se podílejí na regulaci glukózové homeostázy a imunitních a zánětlivých pochodů a hrají důležitou roli v diferenciaci imunitních i adipocytárních buněk. Cílem naší studie bylo stanovit sérové koncentrace a mRNA expresi těchto komponent v podkožní tukové tkáni a periferních monocytech u obezích žen s a bez diabetu 2. typu a zjistit jejich možnou úlohu při regulaci subklinického zánětu periferními monocyty, v dysregulaci glukózového metabolismu a množství tukové tkáně a v pozitivním metabolickém efektu dietní intervence.

**Metodika:** Do studie bylo zařazeno 13 obezích pacientek s diabetes mellitus 2. typu (DM2), 11 obezích žen bez diabetes mellitus 2. typu (OB) a 18 zdravých štíhlých žen (C). Sérové hladiny vybraných metabolických parametrů byly stanoveny standardními laboratorními metodami. Sérové hladiny hormonů a GH/IGF-1 komponent byly stanoveny pomocí komerčních kitů ELISA, IRMA, RIA. mRNA exprese vybraných genů byla stanovena pomocí RT PCR ve vzorcích podkožní tukové tkáně a izolovaných periferních monocytech za bazálních podmínek a u DM2 skupiny po 2 týdnech nízkokalorické diety (energetický příjem 2500 kJ/den).

#### **Výsledky:**

Za bazálních podmínek měly obezní DM2 ženy signifikantně sníženou IGF-1, IGF-1R, IGFBP-2 a IGFBP-3 mRNA expresi v podkožní tukové tkáni (*Graf 2A-D*) a zvýšenou IGF-1R mRNA expresi v periferních monocytech (*Graf 1A*) ve srovnání s C skupinou. U OB skupiny měly IGF-1R v periferních monocytech (*Graf 1A*) a IGF-1 (*Graf 2A*) a IGFBP-2 (*Graf 2C*) v podkožní tukové tkáni nesignifikantní tendenci ke stejným změnám jako u DM2. IGF-1R (*Graf 2B*) a IGFBP-3 (*Graf 2D*) exprese v podkožní tukové tkáni byly srovnatelné mezi OB a C skupinou. Dva týdny nízkokalorické diety vedly u obezích diabetiček ke snížení hmotnosti ( $138,3 \pm 6,3$  vs.  $128,8 \pm 5,9$  kg,  $p < 0,05$ ) a ke zlepšení metabolického profilu (HOMA-index  $12,07 \pm 1,93$  vs.  $8,75 \pm 1,43$ ,  $p < 0,05$ ). Došlo u nich zároveň ke zvýšení IGFBP-2 v séru ( $232 \pm 30$  vs.  $259 \pm 23$  ng/ml,  $p < 0,05$ ) a v podkožní tukové tkáni (*Graf 2C*) a ke zvýšení IGFBP-3 v periferních monocytech (*Graf 1B*).

**Závěr:** Snížená exprese IGF-1, IGF-1R, IGFBP-2 a IGFBP-3 v podkožní tukové tkáni u DM2 by mohla přispívat ke změnám diferenciační kapacity tukové tkáně a zvýšená IGF-1R exprese

v periferních monocytech u DM2 by mohla hrát úlohu v regulaci subklinického zánětu periferními monocyty. Zvýšení IGFBP-2 v séru a v podkožní tukové tkáni a IGFBP-3 v periferních monocytech by zas mohlo přispívat k metabolickému zlepšení po VLCD.

Výsledky této práce byly publikovány v časopisu *Molecular and Cellular Endocrinology*, plný text článku v otištěné verzi je uveden v příloze.

### **11.2 Možná úloha změn lokální mRNA exprese komponent osy GH/IGF-1/inzulin v podkožní tukové tkáni v metabolických odchylkách u pacientů s akromegalií**

**Cíl práce:** Naším cílem bylo zjistit vliv chronicky zvýšených sérových hladin GH/IGF-1 na mRNA expresi vybraných komponent osy GH/IGF-1/inzulin včetně p85alpha regulační podjednotky PI3K, (jejíž zvýšení po stimulaci GH bylo v experimentálních studiích spojeno s inzulinovou rezistencí), v podkožní tukové tkáni u pacientů s nově zjištěnou akromegalií a srovnat tyto nálezy s kontrolními zdravými subjekty za účelem nalezení případných asociací těchto změn s poruchou inzulinové senzitivity a snížením množství tukové tkáně přítomných u pacientů s akromegalií.

**Metodika:** Do studie bylo zařazeno 12 pacientů s aktivní akromegalií (AC) a 12 zdravých štíhlých kontrolních subjektů (C). Sérové hladiny hormonů a GH/IGF-1 komponent byly stanoveny pomocí komerčních kitů ELISA, IRMA, RIA. mRNA exprese vybraných genů ve vzorcích podkožní tukové tkáně byla stanovena pomocí RT PCR.

**Výsledky:** AC skupina měla v porovnání s C skupinou signifikantně snížené procento celkového ( $21,4 \pm 5,7$  vs.  $29,3 \pm 5,1$  (%),  $p=0,021$ ) a trunkálního ( $20,3 \pm 5,1$  vs.  $27,7 \pm 4,9$  (%),  $p=0,019$ ) tělesného tuku a zvýšený HOMA-index ( $10,01$  ( $8,03-13,69$ ) vs.  $1,88$  ( $1,35-2,81$ ),  $p=0,006$ ). V podkožní tukové tkáni měli AC signifikantně zvýšené mRNA exprese IGF-1 a IGFBP-3 (*Graf 3*), které obě pozitivně korelovaly s hladinou GH v séru (*Tabulka 4*). P85alpha mRNA exprese v podkožní tukové tkáni se signifikantně nelišila mezi skupinami (*Graf 3*). IGF-1 a IGFBP-3 exprese v podkožní tukové tkáni nebyly nezávisle spojeny s procentem celkového a trunkálního tuku ani s HOMA-indexem (*Tabulka 5 a 6*). IGFBP-3 exprese však byla nezávislým prediktorem exprese inzulinového receptoru (INS-R) a p85alpha v podkožní tukové tkáni (*Tabulka 6*).

**Závěr:** Tyto výsledky naznačují, že zvýšená produkce GH u akromegalie vede ke zvýšení IGF-1 a IGFBP-3 mRNA exprese v podkožní tukové tkáni, zatímco vliv na p85alpha mRNA expresi nebyl signifikantní. Zvýšení IGF-1 a IGFBP-3 v podkožní tukové tkáni

pravděpodobně nepřispívá k systémovým změnám inzulínové senzitivity a množství tukové tkáně u akromegalie. IGFBP-3 by však vzhledem k nezávislé asociaci s INS-R a p85alpha mohl mít lokální vliv na inzulínovou senzitivitu v podkožní tukové tkáni u těchto pacientů.

Výsledky této práce byly přijaty k publikaci v časopisu *Physiological Research*, plný text článku je uveden v příloze.

## 12. DISKUZE

Mezi cirkulujícími monocyty a tukovou tkání byly při rozvoji systémového subklinického zánětu, diabetu 2. typu a jeho aterosklerotických komplikací v předchozích studiích popsány složité interakce (Mraz et al., 2011; Bourlier et Bouloumie, 2009; Suganami et al., 2005). **Signifikantně zvýšená mRNA exprese IGF-1R v monocytech** u pacientek s diabetem 2. typu ve srovnání jak s obézními, tak kontrolními subjekty, kterou jsme prokázali v naší práci, naznačuje možný podíl komponent osy IGF-1 na regulaci zánětlivého stavu periferních monocytů u pacientek s diabetem 2. typu. Dřívější studie ukázaly, že IGF-1 se účastní rozvoje endoteliální dysfunkce zvýšením prozánětlivé signální transdukce cytokiny (Che et al., 2002). Byly popsány také pozitivní vlivy IGF-1 na stimulaci maturace myeloidních buněk, migraci fagocytů (neutrofilů a monocytů) (Saito et al., 1996), proliferaci lidských periferních mononukleárních buněk a T-lymfocytů (Koojiman et al., 1992 -B) i na zrání a inhibici apoptózy T-buněk z pupečnickové krve (Law et al., 2008). V přítomnosti IGF-1 se monocyty izolované od pacientů s GH deficitem diferencovaly v makrofágy (Serri et al., 2004). Tyto nálezy naznačují, že IGF-1 má zřejmě obecnější úlohu v regulaci zánětlivých a imunologických procesů. Zvýšená vazebná kapacita pro IGF-1 daná zvýšením IGF-1R exprese na periferních monocytech u obézních pacientek a pacientek s diabetem 2. typu, zjištěná v naší práci, by tak mohla naznačovat novou regulační úlohu IGF-1 v rozvoji subklinického zánětu prostřednictvím **prozánětlivé aktivace periferních monocytů**.

V naší předchozí práci (Mraz et al., 2011) měli pacienti s diabetem 2. typu výraznější expresní profil různých prozánětlivých chemokinů, cytokinů a prozánětlivých receptorů na periferních monocytech než obézní subjekty bez poruchy glukózového metabolismu, což naznačuje důležitou úlohu periferních monocytů v progresi metabolické poruchy od prosté obezity a inzulinové rezistence ke zjevné poruše glukózového metabolismu. Podobné nálezy byly zjištěny v naší studii u mRNA expresí komponent osy IGF. Na rozdíl od signifikantně zvýšené IGF-1R mRNA exprese v periferních monocytech a signifikantně snížené IGF-1 a IGFBP-2 mRNA exprese v podkožní tukové tkáni obézních pacientek s diabetem 2. typu byl prokázán pouze nesignifikantní trend k těmto změnám u obézních subjektů bez diabetu. Tyto nálezy poukazují na možnou úlohu lokálních změn mRNA exprese komponent osy IGF-1 v postupné progresi metabolické poruchy. Průřezový design naší studie však nedovoluje vyloučit alternativní možnost, tj. že rozdíly v hladinách inzulinu a glukózy mezi DM2 skupinou a obézní skupinou bez DM2 mohly přispět ke změnám mRNA exprese komponent osy IGF-1.

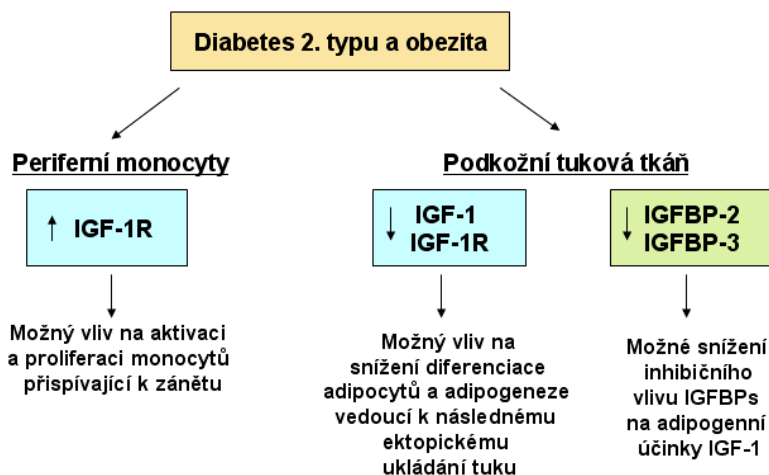
Zatímco změny exprese komponent osy IGF-1 v periferních monocytech byly většinou méně vyjádřené, obezita a diabetes 2. typu byly spojeny s výraznějšími změnami exprese komponent osy IGF-1 v podkožní tukové tkáni. Zjistili jsme **sníženou IGF-1, IGFBP-2, IGFBP-3** a na rozdíl od periferních monocytů také **sníženou IGF-1R mRNA expresi v podkožní tukové tkáni** u pacientů s diabetem 2. typu, což naznačuje rozdílnou regulaci těchto molekul v tukové tkáni a v periferních monocytech. Předchozí studie prokázaly důležitou roli IGF-1 a IGF-1R v adipogenezi, při stimulaci proliferace a diferenciace preadipocytů a adipocytů (Blüher et al., 2005; Peter et al., 1993; Sato et al., 2008; Mur et al., 2003; Valverde et al., 1997), akumulaci lipidů *in vitro* (Grohmann et al., 2005) a při modulaci expanze bílé tukové tkáně (Klötting et al., 2008). Některé studie sice snižují význam IGF-1R při diferenciaci adipocytů v porovnání s INS-R (Klötting et al., 2008; Entingh-Pearsall et Kahn, 2004), je však pravděpodobné, že při signalizaci oběma receptory při adipogenezi vznikají rozdílné signály a že INS-R i IGF-R mají nezávislé role v adipogenezi, které nemohou být vzájemně nahrazeny (Entingh-Pearsall et Kahn, 2004). Snížená IGF-1 a IGF-1R mRNA exprese v podkožní tukové tkáni, zjištěná v naší studii, by tak mohla přispívat ke **snížené diferenciační kapacitě tukové tkáně** u obézních diabetiků 2. typu. Tato porucha by tak mohla vést k nadměrné akumulaci lipidů ve tkáních mimo tuková depa a napomáhat rozvoji inzulinové rezistence a dalších přidružených metabolických poruch.

Ačkoli Grohmann et al. prokázal stimulační vliv IGFBP-3 na diferenciaci viscerálních a subkutánních adipocytů u dětí (Grohmann et al., 2005), další práce potvrdily inhibiční vliv IGFBP-3 na diferenciaci preadipocytů i na funkci diferencovaných adipocytů (Baxter et al., 2009; Chan et al., 2009; de Silva et al., 2012). **Snížená IGFBP-3 mRNA exprese v podkožní tukové tkáni** u našich obézních pacientek s diabetem je v souladu se sníženou expresí IGFBP-3 v mezenterálním tuku u potkanů s dietou indukovanou obezitou, což dle autorů této studie naznačuje, že **IGFBP-3 by mohl mít protektivní vliv proti obezitě** (Palau et al., 2012; Mohanraj et al., 2013).

Snížené IGF-1 a IGFBP-3 mRNA exprese v podkožní tukové tkáni mohou také souviset s **nízkou sérovou hladinou GH** zjištěnou u obézních diabetiček 2. typu v naší studii, jelikož minulé studie ukázaly stimulační vliv GH na sérové i tkáňové hladiny těchto komponent (Vikman et al., 1991; Wester et al., 1998; Lemmey et al., 1997).



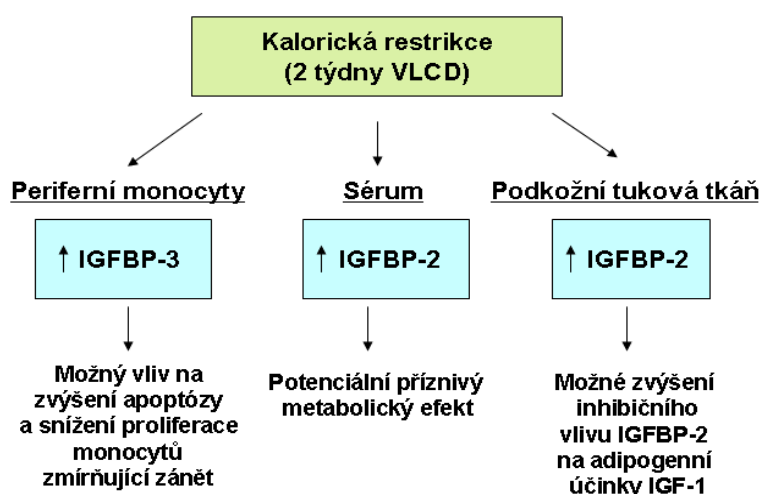
Obrázek 20: Vliv diabetu 2. typu a obezity na lokální expresi komponent osy IGF-1 a možné dopady těchto změn (IGF-1, inzulinu podobný růstový faktor -1; IGF-1R, receptor inzulinu podobného růstového faktoru-1; IGFBP, IGF-vazebné proteiny).



Dva týdny přísné kalorické restrikce významně snížily tělesnou hmotnost, zlepšily metabolické parametry a snížily hladiny CRP, což svědčí o snížení subklinického zánětu u našich pacientek s diabetem 2. typu. V našich předchozích pracích (Dolinkova et al., 2008; Mraz et al., 2011) u podobných skupin obezných žen s a bez diabetu 2. typu vedla VLCD ke konzistentnímu poklesu mRNA exprese téměř všech stimulovaných chemokinů a cytokinových receptorů v periferních monocytech, což naznačuje jejich sníženou odpověď vůči chemotaktickým signálům. Tento pokles by následně mohl snížit množství monocytů vstupujících do tukové tkáně a částečně tak vysvětlit pozitivní metabolický efekt krátkodobé VLCD. Zajímavé je, že jsme v aktuální studii nepozorovali žádný vliv VLCD na IGF-1R mRNA expresi v periferních monocytech. Na druhou stranu jsme zjistili **signifikantní zvýšení IGFBP-3 mRNA exprese v periferních monocytech po VLCD**, která dosáhla dokonce vyšších hladin než u kontrolní skupiny. Tento nálezný může být důležitý vzhledem k popsané úloze IGFBP-3 při stimulaci zástavy růstu a apoptózy buněk a jeho antiproliferativní aktivitě u myeloidních leukemických buněk (Ikezoe et al., 2004). IGFBP-3 byl zvýšen u lipopolysacharidem indukované apoptózy lidských monocytů (Agnese et al., 2002). Mohanraj pak poukázala také na protizánětlivé na IGF-1 nezávislé účinky IGFBP-3 skrze interakci s NFκB signalizací (Han et al., 2011; Ingermann et al., 2010; Mohanraj et al., 2013). Domníváme se proto, že zvýšení IGFBP-3 exprese v periferních monocytech po VLCD v naší studii by mohlo přispívat ke **snížení prozánětlivé monocytární aktivity spojené s metabolickým zlepšením po VLCD**.

Dalším významným efektem VLCD, zjištěným v naší studii, byla **normalizace významně snížené IGFBP-2 mRNA exprese v podkožní tukové tkáni** u obézních subjektů s diabetem 2. typu. Bylo naznačeno, že IGFBP-2 je důležitým modulátorem účinku IGF-1 při adipogenezi (Boney et al., 1994). V řadě *in vitro* studií se ukázalo, že IGFBP-2 inhibuje IGF dependentní proliferaci buněk (Hoefflich et al., 1999; Rehfeldt et al., 2010). U geneticky obézních *ob/ob*, *db/db* myši a myši s obezitou vyvolanou vysokotukovou dietou byla také zjištěna signifikantně nižší IGFBP-2 mRNA exprese ve viscerální, ale nikoli podkožní tukové tkáni ve srovnání se štíhlými zvířaty (Li et Picard, 2010). Wheatcroft popsál, že transgenní IGFBP-2 myši byly rezistentní k rozvoji obezity a inzulinové rezistence. Jeho *in vitro* studie ukázala také přímý efekt IGFBP-2 v prevenci adipogeneze, kdy rIGFBP-2 blokoval diferenciaci 3T3-L1 buněk (Wheatcroft et al., 2007). Na základě těchto údajů byla vyslovena hypotéza, že IGFBP-2 secernovaný z bílé tukové tkáně přispívá k prevenci dietou navozené obezity a s věkem spojené inzulinové rezistence u myši (Li et Picard, 2010). Některé předchozí studie ukázaly zvýšení sérových hladin IGFBP-2 po lačnění (Clemmons et al., 1991) nebo po restrikci proteinů ve stravě (Smith et al., 1995). Významné zvýšení IGFBP-2 v séru a jeho exprese v podkožní tukové tkáni v naší studii po VLCD je tak v souladu s jeho navrhovanou úlohou **modulátoru pozitivních metabolických účinků** jak na lokální, tak na systémové úrovni pravděpodobně skrze **regulaci adipogenní kapacity tukové tkáně, omezení dalšího přírůstku hmotnosti** (Claudio et al., 2010) a **regulaci biodostupnosti IGF-1** během krátkodobé kalorické restrikce u obézních subjektů (Rasmussen et al., 2006).

Obrázek 21: Vliv kalorické restrikce na hladiny komponent osy IGF-1 a možné dopady těchto změn (IGF-1, inzulinu podobný růstový faktor-1; IGFBP, IGF-vazebný protein; VLCD, nízkokalorická dieta).



V naší studii jsme neprokázali signifikantní změnu IGFBP-3 mRNA exprese v podkožní tukové tkáni po VLCD, avšak v jiné studii u obézních žen bylo snížení hmotnosti spojeno s tendencí ke zvýšení exprese IGFBP-3 v podkožní tukové tkáni (Campbell et al., 2013). Naopak u myši byla obezita spojena se zvýšenou expresí IGFBP-3 ve viscerální tukové tkáni a kalorická restrikce vedla k jejímu poklesu (Kurki et al., 2012).

V první části naší práce jsme tedy ukázali, že obézní ženy s diabetem 2. typu mají v porovnání s kontrolní skupinou **sníženou mRNA expresi IGF-1, IGF-1R, IGFBP-2 a IGFBP-3 v podkožní tukové tkáni**, což by mohlo přispívat ke změnám v diferenciací kapacitě tukové tkáně a jejího množství, a zároveň **zvýšenou IGF-1R mRNA expresi v periferních monocytech**, která by se mohla podílet na regulaci subklinického zánětu periferními monocyty. Zjistili jsme také signifikantní **zvýšení IGFBP-2 v séru i v tukové tkáni a zvýšení IGFBP-3 v periferních monocytech po VLCD**. Tyto změny by mohly hrát roli v metabolickém zlepšení po VLCD. Přesný mechanismus regulace exprese komponent osy IGF-1 v podkožní tukové tkáni nebo periferních monocytech, jeho klinický význam a kauzální vztah k regulaci metabolických změn a subklinického zánětu u obezity a diabetu 2. typu je však třeba zkoumat v dalších studiích.

2. Ve druhé části naší práce nás zajímal vliv dlouhodobě zvýšených hladin GH/IGF-1 u neléčených akromegaliků na mRNA expresi vybraných komponent osy GH/IGF-1/inzulin v podkožní tukové tkáni a možné souvislosti těchto změn s poruchou inzulinové senzitivity a snížením množství tukové tkáně přítomných u těchto pacientů. V porovnání se zdravými štíhlými subjekty jsme našli **u akromegaliků v podkožní tukové tkáni signifikantně zvýšenou mRNA expresi IGF-1 a IGFBP-3**. Jak IGF-1, tak IGFBP-3 mRNA exprese pozitivně korelovala se sérovou hladinou GH, což naznačuje **přímý stimulační vliv GH** na lokální produkci IGF-1 a IGFBP-3 v podkožním tuku. V předchozích studiích byla produkce IGF-1 tukovou tkáni po stimulaci GH zjištěna v experimentálních podmínkách i u zdravých osob (Vikman et al., 1991; Peter et al., 1993; Wabitsch et al., 1996; Jørgensen et al., 2006). Peter et al. popsal, že v tukové tkáni u potkanů je mRNA exprese všech IGFBPs, včetně IGFBP-3, regulována GH (Peter et al., 1993). Další experimentální studie ukázaly stimulační vliv GH na IGFBP-3 expresi v játrech, svalu a kůži u potkanů s GH deficitem (Lemmey et al., 1997), na sérovou hladinu IGFBP-3 u prasat (Wester et al., 1998) nebo na jeho sekreci z prasečí tukové tkáně (Chen et al., 1996) nebo z lidských preadipocytů (Wabitsch et al., 2000). Nedávná studie u akromegaliků také zjistila zvýšenou IGF-1 a IGFBP-3 mRNA

expresi v jejich podkožní tukové tkáni (Hochberg et al., 2015). V naší studii byl **GH jedním z nezávislých prediktorů IGFBP-3 mRNA exprese v podkožní tukové tkáni**, což potvrzuje přímou regulační úlohu GH.

Dřívější studie zjistily stimulační vliv IGF-1 na mRNA expresi IGFBP-3 v kůži (Lemmey et al., 1997) nebo v játrech (Gosteli-Peter et al., 1994), avšak pokud je nám známo, žádná podobná zjištění dosud neexistují pro tento efekt v tukové tkáni. V naší studii byla **IGF-1 mRNA exprese nezávislým prediktorem IGFBP-3 mRNA exprese v podkožní tukové tkáni a obráceně**, což poukazuje na jejich možné vzájemné lokální interakce.

U **akromegalických pacientů** jsme podle očekávání zjistili signifikantně **nižší procento celkového a trunkálního tuku** a zvýšené procento LBM ve srovnání s kontrolní skupinou, což je v souladu s nálezy z předchozích studií (Katznelson et al., 2009). Dále jsme pozorovali **inverzní vztah** mezi IGFBP-3 expresí v tukové tkáni a procentem celkového a trunkálního tuku a mezi IGF-1 expresí v tukové tkáni a procentem trunkálního tuku, což naznačuje možný kauzální vztah. Předchozí práce ukázaly, že během diferenciaci lidských preadipocytů dochází ke zvyšování exprese IGF-1 i IGFBP-3 (Baxter et al., 2009). Zatímco však IGF-1 stimuluje tento proces a adipogenezi (Peter et al., 1993; Chen et al., 1995), IGFBP-3 má na tyto procesy inhibiční účinky (Baxter et al., 2009; Chan et al., 2009). V souladu s tímto efektem IGFBP-3 měly v první studii naší práce obézní ženy s diabetem sníženou mRNA expresi IGFBP-3 v podkožním tuku. I když se myšlenka lokální regulační úlohy IGF-1 a IGFBP-3 v podkožní tukové tkáni zdá lákavá, **IGF-1 ani IGFBP-3 mRNA exprese v podkožním tuku nebyly v naší studii nezávislými prediktory procenta celkového nebo trunkálního tuku**. Tento koncept by však jistě zasluhoval další zkoumání.

Za účelem podrobnějšího porozumění možné regulační úlohy lokálních změn mRNA exprese IGF-1 a IGFBP-3 v systémových metabolických změnách u akromegalie jsme zkoumali vztahy mezi IGF-1 a IGFBP-3 mRNA expresí v podkožní tukové tkáni a vybranými parametry glukózového metabolismu a inzulínové rezistence. V předchozích studiích byla IGF-1 exprese v myších transplantátech tukové tkáně spojena s protizánětlivými a příznivými metabolickými vlivy u diabetických myší (Gunawardana et Piston, 2015). Jak IGF-1 (Kubota et al., 2008; Neacsu et al., 2013), tak IGFBP-3 (Mohanraj et al., 2013) vykazovaly protizánětlivé a inzulín-senzitizující účinky v adipocytech. Na druhou stranu několik studií ukázalo, že IGFBP-3 může v adipocytech různými mechanismy snižovat inzulínovou senzitivitu (Kim et al., 2007; Chan et al., 2005). V naší studii jsme **nezjistili nezávislou asociaci IGF-1 nebo IGFBP-3 mRNA exprese v podkožním tuku s HOMA-indexem**,

kteřý byl u AC skupiny signifikantně zvýšen, zjistili jsme však, že **IGFBP-3 exprese byla nezávislým prediktorem INS-R a p85alpha exprese v podkožním tuku**. To by mohlo poukazovat na možnou lokální úlohu IGFBP-3 v regulaci inzulínové senzitivity v tukové tkáni u akromegaliků.

U akromegalie je zvýšená inzulínová rezistence často přítomna paradoxně i přes snížené množství tukové tkáně. Vedle řady studií dokládajících různé lokální mechanismy GH navozené inzulínové rezistence v tukové tkáni (Castro et al., 2004; Smith et al., 1997) však některé experimentální práce naznačily, že účinek GH v tukové tkáni není klíčový z hlediska efektu na celkovou inzulínovou rezistenci (List et al., 2013; Johansen et al., 2005). V naší studii **nebyla prokázána signifikantní asociace HOMA-indexu se sníženým procentem celkového nebo trunkálního tuku**. Tyto nálezy mohou podporovat hypotézu, že u akromegalie pravděpodobně tuková tkáň není hlavním činitelem přispívajícím k celkové tělesné inzulínové rezistenci, a poukazují tak na játra nebo na kosterní sval jako na další důležité hráče.

Řada předchozích experimentálních studií naznačila důležitou úlohu nadbytku GH při stimulaci exprese p85alpha regulační podjednotky PI3K a následný rozvoj GH navozené inzulínové rezistence (del Rincon et al., 2007; de Castro Barbosa et al., 2009; Barbour et al., 2005). Snížení p85alpha exprese bylo na druhou stranu navrženo jako jeden z možných mechanismů pro léčbu diabetu 2. typu (Mauvais-Jarvis et al. 2002). Dalším důležitým regulátorem p85alpha je inzulín. Inzulín-rezistentní stavy byly v předchozích studiích spojeny s nesourodými výsledky ukazujícími jak zvýšenou (Adochio et al., 2009; Cornier et al., 2006), tak sníženou (Anai et al., 1998) tkáňovou (játra, svaly) expresi p85alpha a také poruchu stimulačního vlivu akutní hyperinzulinémie na p85alpha expresi (Lefai et al., 2001). V našem souboru **vedly dlouhodobě zvýšené sérové hladiny GH/inzulínu u pacientů s akromegalií pouze k nesignifikantnímu zvýšení p85alpha mRNA exprese v podkožní tukové tkáni** ve srovnání s kontrolní skupinou, což je v souladu s výsledkem nedávné studie u pacientů s akromegalií (Hochberg et al., 2015). Nenalezli jsme ani žádné signifikantní korelace mezi sérovými hladinami GH/IGF-1/inzulínu a expresí p85alpha, ani mezi p85alpha a metabolickými parametry (HOMA-index, glykémie nalačno, inzulínémie nalačno, HbA1c). **P85alpha exprese byla pozitivně spojena s expresí INS-R v podkožním tuku**, což naznačuje možnou paralelní regulaci jejich expresí.

Souhrnně lze říci, že ve druhé části naší práce jsme zjistili signifikantně **zvýšenou mRNA expresi IGF-1 a IGFBP-3 v podkožní tukové tkáni** u pacientů s akromegalií. Ani jeden

z těchto faktorů však nezávisle nepredikoval změny v tělesném složení nebo v systémové inzulinové senzitivitě u těchto pacientů. Jejich **lokální účinek na adipogenezi a inzulinovou senzitivitu v podkožní tukové tkáni** však může být přítomný a k jeho dalšímu zkoumání je třeba dalších studií. Naše výsledky zároveň nepodporují zvýšení exprese p85alpha podjednotky PI3K jako mechanismus GH navozené inzulinové rezistence v podkožní tukové tkáni u pacientů s akromegalií.

### **13. ZÁVĚR A SHRUTÍ VÝSLEDKŮ PRÁCE**

Současná pandemie obezity a diabetes mellitus 2. typu jakožto rizikových faktorů rozvoje kardiovaskulárních, onkologických i dalších onemocnění představuje v dnešní době jeden z nejpálčivějších medicínských i socioekonomických problémů. Jedním ze zásadních patogenetických mechanismů přispívajících ke glukózové intoleranci a diabetu 2. typu je **inzulinová rezistence**. Mezi příčiny inzulinové rezistence patří mj. **subklinický zánět v tukové tkáni** spojený se zvýšenou infiltrací tukové tkáně imunokompetentními buňkami a zvýšenou produkcí prozánětlivých cytokinů potenciálně **interferující s inzulinovou signalizační kaskádou**. Dalším mechanismem, který může zhoršovat inzulinovou senzitivitu, může být **ektopické ukládání tukové tkáně** jako následek **porušené diferenciaci adipocytů**. IGF-1 je molekula s pleiotropními účinky, která může zasahovat do každého z těchto procesů. Díky podobnosti struktur molekuly IGF-1 s molekulou inzulinu a jejich odpovídajících receptorů vykazuje IGF-1 příznivé účinky na glukózovou homeostázu, což ukázala řada experimentálních i klinických studií. **IGF-1** zároveň disponuje významnými stimulačními účinky na **proliferaci a diferenciaci** celé řady buněk včetně **adipocytů a monocytů**, a tím ovlivňuje **adipogenezi a zánětlivou aktivitu**. Jeho účinky jsou pak modulovány jeho **vazebnými proteiny**, které však vykazují také řadu na IGF-1 nezávislých efektů.

Cílem naší práce bylo přinést další poznatky o úloze GH/IGF-1 a dalších komponent této osy v regulaci těchto procesů v kontextu dvou inzulin-rezistentních jednotek **diabetu 2. typu a akromegalie**.

V naší práci nás zajímalo, jak se liší lokální mRNA exprese IGF-1 komponent u obézních diabetiček a obézních žen bez diabetu ve srovnání se štíhlými zdravými osobami. Celá řada zejména experimentálních studií prokázala **stimulační vliv IGF-1 na adipogenezi**, konkrétně na proliferaci a diferenciaci preadipocytů zprostředkovanou **skrze IGF-1R**. **Obézní diabetičky 2. typu** v naší studii měly významně **sníženou mRNA expresi IGF-1 i IGF-1R v podkožní tukové tkáni**, což by mohlo souviset s potenciálním **snížením proliferační a diferenciační schopnosti tukové tkáně**. Současně byla u těchto subjektů nalezena signifikantně **snížená mRNA exprese IGFBP-2 a IGFBP-3**. V experimentálních studiích blokoval IGFBP-2 adipogenezi a ztráta schopnosti IGFBP-3 vázat IGF-1 byla v jiné studii u myši spojena se zvýšeným množstvím tukové tkáně. Právě vzhledem ke schopnosti IGFBPs vázat volné IGF-1 a blokovat jeho účinky by uvedené snížení vazebných proteinů v naší studii mohlo přispívat ke **zvýšení proadipogenního vlivu IGF-1** u obézních diabetiček. Celkový

potenciální vliv těchto změn na metabolismus tukové tkáně, resp. na inzulinovou rezistenci u obezity a diabetu je však třeba ověřit v dalších studiích i vzhledem k tomu, že tuková tkáň může mít z hlediska inzulinové rezistence jak příznivý význam k zabránění ektopického ukládání tuku, tak negativní význam při výrazném zvýšení jejího množství.

**Zvýšení IGFBP-2 v séru a v podkožní tukové tkáni**, které nastalo **po nízkokalorické dietě** u obézních diabetiček, zapadá vzhledem k dřívějším nálezům, dokumentujícím jednak inhibiční vlivy IGFBP-2 na adipogenezi a jednak asociace mezi zvýšenými hladinami IGFBP-2 a zlepšením inzulinové rezistence, do **zlepšeného metabolického profilu** těchto pacientek po této intervenci. To, zda se zvýšení IGFBP-2 v séru a podkožním tuku mohlo kauzálně přímo podílet na zlepšení metabolického profilu a snížení hmotnosti, nebo zda jde o změny sekundární, zasluhuje pozornost dalších studií.

IGF-1 se podílí také na stimulaci proliferace, diferenciace a naopak na inhibici apoptózy imunokompetentních buněk včetně periferních mononukleárních buněk. Další změnou u obézních diabetiček 2. typu v naší studii byla signifikantně **zvýšená mRNA exprese IGF-1R v periferních monocytech**, což by mohlo vypovídat o případné **zvýšené proliferační aktivitě těchto imunokompetentních buněk**, které jsou při diabetu a obezitě rekrutovány do tukové tkáně, kde se podílejí na rozvoji **chronického zánětu mírného stupně**. Naopak IGFBP-3 v dřívějších studiích vykazoval antiproliferační účinky na imunitní buňky a hrál významnou roli v regulaci apoptózy monocytárních buněk. Nízkokalorická dieta u obézních diabetiček v naší práci měla za následek signifikantní **zvýšení IGFBP-3 exprese v periferních monocytech**, což by dle předchozích nálezů mohlo naznačovat potenciální **zmírnění aktivity subklinického zánětu na úrovni periferních monocytů**.

U **akromegaliků** jsme oproti kontrolním subjektům našli signifikantní rozdíly v mRNA expresi **v podkožním tuku** pouze u dvou komponent osy GH/IGF-1/inzulin, a to u **IGF-1 a IGFBP-3**, které byly u akromegaliků **signifikantně zvýšené**, a jejich pozitivní korelace se sérovými hladinami GH podporuje možnost **přímého stimulačního vlivu GH** na tyto exprese. Vzhledem k lokálním účinkům, byť pravděpodobně protichůdným, obou těchto komponent v tukové tkáni ve smyslu ovlivnění **adipogeneze**, dokumentovaným v předchozích studiích, jsme testovali, zda změny jejich exprese zjištěné v podkožní tukové tkáni nemohou souviset s celkově sníženým množstvím tukové tkáně u akromegaliků. Ani jeden parametr nekoreloval nezávisle s procentem celkového nebo trunkálního tuku, přičemž pravděpodobně nejsilnějším kointerferujícím faktorem se jeví sérová hladina GH (negativní korelace sérového GH a procenta celkového a trunkálního tuku).



Ta se pravděpodobně projevila také ve **snížení IGF-1 a IGFBP-3 mRNA exprese v podkožní tukové tkáni u obézních diabetiček** v první části naší práce, u kterých byla naopak snižena.

Podobně tomu bylo při testování vlivu zvýšení těchto dvou expresí na ovlivnění celkové inzulínové senzitivity. U **IGF-1** by se na základě předchozích studií dalo očekávat **příznivé ovlivnění glukózového metabolismu**, zatímco u **IGFBP-3** jsou nálezy týkající se vlivu na inzulínovou rezistenci v tukové tkáni někdy **protichůdné**. Zpětnou regresní analýzou v naší studii nebyl prokázán nezávislý vliv zvýšené IGF-1 nebo IGFBP-3 exprese na systémovou inzulínovou rezistenci hodnocenou v naší studii pomocí HOMA-indexu. **Exprese IGFBP-3** však byla jedním z **nezávislých prediktorů INS-R a p85alpha exprese v podkožní tukové tkáni**. To by mohlo svědčit o možné **lokální úloze IGFBP-3 při regulaci inzulínové senzitivity v podkožní tukové tkáni** u akromegaliků. Konkrétní mechanismy této regulace mohou být podnětem pro další zkoumání v této oblasti.

Konečně, zajímalo nás, zda také u akromegalie dochází ke zvýšení tkáňové exprese p85alpha regulační podjednotky PI3K vlivem stimulace GH a zda by toto případné zvýšení mohlo být jedním z mechanismů inzulínové rezistence, tak jak to bylo dokumentováno v několika předchozích experimentálních studiích s nadbytkem GH. Absence signifikantního rozdílu v mRNA expresi p85alpha v podkožní tukové tkáni mezi akromegaliky a kontrolní skupinou stejně jako signifikantních korelací mezi p85alpha a sérovou hladinou GH nebo parametry inzulínové rezistence však tento koncept u našich pacientů s akromegalií nepodporuje.

Terapeutické využití komponent osy GH/IGF-1 je pravděpodobně částečně limitováno vysokou mírou **různorodosti účinků jednotlivých molekul**. Např. IGF-1 má sice díky podobnosti své struktury molekule inzulínu příznivý vliv na glukózový metabolismus, event. na složení těla, což se ukázalo i v klinických studiích, avšak limitací v jeho užití může být jeho mitogenní potenciál související s rizikem kancerogeneze. U IGFBP-3 byly v dřívějších experimentálních studiích na jedné straně vyzdvihovány jeho protizánětlivé vlastnosti v tukové tkáni a jeho inhibiční vliv na adipogenezi díky vyvázání volného IGF-1. Na druhou stranu v tukové tkáni v jiných studiích vykazoval účinky snižující inzulínovou senzitivitu. I u IGFBP-1 jsou nalézány vzájemně protichůdné výsledky, co se týče jeho hladin u poruch metabolismu glukózy. V neposlední řadě jsou to studie týkající se úlohy GH/IGF-1 v regulaci zánětlivých pochodů, které přinášejí důkazy jak o prozánětlivých, tak protizánětlivých účincích obou komponent. Snad **nejnadějněji** by se mohl jevit **IGFBP-2**, který měl

v experimentálních studiích preventivní vliv na rozvoj obezity a zároveň jeho zvýšené hladiny byly spojeny v řadě studií s příznivým stavem glukózového metabolismu.

Interpretace výsledků studií je často komplikována neschopností odlišit následek od příčiny a předpokládanými současně se vyskytujícími kompenzačními mechanismy. I přes rozporuplnost některých výsledků svědčí však dosavadní nálezy o nesporném významu komponent osy GH/IGF-1 v regulaci glukózového metabolismu, adipogeneze i zánětlivých pochodů. A právě tato rozporuplnost může podněcovat motivaci k dalšímu zkoumání jejich úlohy směřujícímu k jejich případnému terapeutickému využití u inzulin-rezistentních stavů.

## **14. LITERATURA**

- ACCILI D, DRAGO J, LEE EJ, JOHNSON MD, COOL MH, SALVATORE P, ASICO LD, JOSE PA, TAYLOR SI, WESTPHAL H: Early neonatal death in mice homozygous for a null allele of the insulin receptor gene. *Nat Genet* **12**(1): 106-109, 1996.
- ADOCHIO RL, LEITNER JW, GRAY K, DRAZNIN B, CORNIER MA: Early responses of insulin signaling to high-carbohydrate and high-fat overfeeding. *Nutr Metab (Lond)*. **6**(37), 2009 Sep 28.
- AGNESE DM, CALVANO JE, HAHM SJ, CALVANO SE, LOWRY SF: Insulin-like growth factor binding protein-3 is upregulated in LPS-treated THP-1 cells. *Surg Infect (Larchmt)* **3**(2): 119-125; discussion 125-116, 2002.
- AHMED SF, FARQUHARSON C, MCGROGAN P, RUSSELL RK: Pathophysiology and management of abnormal growth in children with chronic inflammatory bowel disease. *World Rev Nutr Diet* **106**: 142-148, 2013.
- AHMED TA, BUZZELLI MD, LANG CH, CAPEN JB, SHUMATE ML, NAVARATNARAJAH M, NAGARAJAN M, COONEY RN: Interleukin-6 inhibits growth hormone-mediated gene expression in hepatocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **292**(6): G1793-1803, 2007.
- ALBERINI CM, CHEN DY: Memory enhancement: consolidation, reconsolidation and insulin-like growth factor 2. *Trends Neurosci* **35**(5): 274-283, 2012.
- ALBISTON AL, HERINGTON AC: Tissue distribution and regulation of insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-3 messenger ribonucleic acid (mRNA) in the rat: comparison with IGF-I mRNA expression. *Endocrinology* **130**(1): 497-502, 1992.
- ALLEN NE, APPLEBY PN, DAVEY GK, KAAKS R, RINALDI S, KEY TJ: The associations of diet with serum insulin-like growth factor I and its main binding proteins in 292 women meat-eaters, vegetarians, and vegans. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **11**(11): 1441-1448, 2002.
- ALVAREZ-CASTRO P, SANGIAO-ALVARELLOS S, BRANDON-SANDA I, CORDIDO F: [Endocrine function in obesity]. *Endocrinol Nutr* **58**(8): 422-432, 2011.
- ANAI M, FUNAKI M, OGIHARA T, KANDA A, ONISHI Y, SAKODA H, INUKAI K, NAWANO M, FUKUSHIMA Y, YAZAKI Y, KIKUCHI M, OKA Y, ASANO T: Enhanced insulin-stimulated activation of phosphatidylinositol 3-kinase in the liver of high-fat-fed rats. *Diabetes* **48**(1): 158-169, 1999.
- ANAI M, FUNAKI M, OGIHARA T, TERASAKI J, INUKAI K, KATAGIRI H, FUKUSHIMA Y, YAZAKI Y, KIKUCHI M, OKA Y, ASANO T: Altered expression levels and impaired steps in the pathway to phosphatidylinositol 3-kinase activation via insulin receptor substrates 1 and 2 in Zucker fatty rats. *Diabetes* **47**(1): 13-23, 1998 Jan.
- ANDREASSEN M, FRYSTYK J, FABER J, KRISTENSEN LO: GH activity and markers of inflammation: a crossover study in healthy volunteers treated with GH and a GH receptor antagonist. *Eur J Endocrinol* **166**(5): 811-819, 2012.
- ANDREASSEN M, RAYMOND I, HILDEBRANDT P, KISTORP C, RATHCKE C, VESTERGAARD H, FABER J, KRISTENSEN LO: Associations between plasma insulin-like growth factor-I and the markers of inflammation interleukin 6, C-reactive protein and YKL-40 in an elderly background population. *Inflamm Res* **59**(7): 503-510, 2010.
- ANDREASSEN M, VESTERGAARD H, KRISTENSEN LO: Concentrations of the acute phase reactants high-sensitive C-reactive protein and YKL-40 and of interleukin-6 before and after treatment in patients with acromegaly and growth hormone deficiency. *Clin Endocrinol (Oxf)* **67**(6): 909-916, 2007.
- ANDREELLI F, LAVILLE M, DUCLUZEAU PH, VEGA N, VALLIER P, KHALFALLAH Y, RIOU JP, VIDAL H: Defective regulation of phosphatidylinositol-3-kinase gene

expression in skeletal muscle and adipose tissue of non-insulin-dependent diabetes mellitus patients. *Diabetologia* **42**(3): 358-364, 1999.

ANWAR A, ZAHID AA, SCHEIDEGGER KJ, BRINK M, DELAFONTAINE P: Tumor necrosis factor-alpha regulates insulin-like growth factor-1 and insulin-like growth factor binding protein-3 expression in vascular smooth muscle. *Circulation* **105**(10): 1220-1225, 2002.

ARAFAT AM, WEICKERT MO, FRYSTYK J, SPRANGER J, SCHOFEL C, MOHLIG M, PFEIFFER AF: The role of insulin-like growth factor (IGF) binding protein-2 in the insulin-mediated decrease in IGF-I bioactivity. *J Clin Endocrinol Metab* **94**(12): 5093-5101, 2009.

ARANY E, STRAIN AJ, HUBE MJ, PHILLIPS ID, HILL DJ: Interactive effects of nutrients and hormones on the expression of insulin-like growth factor binding protein-1 (IGFBP-1) mRNA and peptide, and IGF I release from isolated adult rat hepatocytes. *J Cell Physiol* **155**(2): 426-435, 1993.

ARGENTE J, CABALLO N, BARRIOS V, POZO J, MUNOZ MT, CHOWEN JA, HERNANDEZ M: Multiple endocrine abnormalities of the growth hormone and insulin-like growth factor axis in prepubertal children with exogenous obesity: effect of short- and long-term weight reduction. *J Clin Endocrinol Metab* **82**(7): 2076-2083, 1997.

ARIKAN S, BAHCECI M, TUZCU A, GOKALP D: Serum tumour necrosis factor-alpha and interleukin-8 levels in acromegalic patients: acromegaly may be associated with moderate inflammation. *J Clin Endocrinol (Oxf)* **70**: 498-499, 2009 Mar.

ARKINS S, REBEIZ N, BIRAGYN A, REESE DL, KELLEY KW: Murine macrophages express abundant insulin-like growth factor-I class I Ea and Eb transcripts. *Endocrinology* **133**(5): 2334-2343, 1993.

AROSIO M GS, BRUZZI P, FAGLIA G, MINUTO F, BARRECA A: Diagnostic value of the acid-labile subunit in acromegaly: evaluation in comparison with insulin-like growth factor (IGF) I, and IGF-binding protein-1, -2, and -3. *J Clin Endocrinol Metab*. **86**(3): 1091-1098, 2001 Mar.

ASGHAR Z, YAU D, CHAN F, LEROITH D, CHAN CB, WHEELER MB: Insulin resistance causes increased beta-cell mass but defective glucose-stimulated insulin secretion in a murine model of type 2 diabetes. *Diabetologia* **49**(1): 90-99, 2006.

BAIBAS N, BAMIA C, VASSILOPOULOU E, SDROLIAS J, TRICHOPOULOU A, TRICHOPOULOS D: Dietary and lifestyle factors in relation to plasma insulin-like growth factor I in a general population sample. *Eur J Cancer Prev* **12**(3): 229-234, 2003.

BAILEY-DOWNS LC, SOSNOWSKA D, TOTTH P, MITSCHELEN M, GAUTAM T, HENTHORN JC, BALLABH P, KOLLER A, FARLEY JA, SONNTAG WE, CSISZAR A, UNGVARI Z: Growth hormone and IGF-1 deficiency exacerbate high-fat diet-induced endothelial impairment in obese Lewis dwarf rats: implications for vascular aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **67**(6): 553-564, 2012.

BALTESKARD L, UNNEBERG K, HALVORSEN D, HANSEN JB, REVHAUG A: Effects of insulin-like growth factor 1 on neutrophil and monocyte functions in normal and septic states. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* **22**(3): 127-135, 1998.

BALTESKARD L, UNNEBERG K, HALVORSEN D, YTREBO LM, WAAGE A, SJURSEN H, REVHAUG A: The influence of growth hormone on tumour necrosis factor and neutrophil leukocyte function in sepsis. *Scand J Infect Dis* **29**(4): 393-399, 1997.

BANDYOPADHYAY GK, YU JG, OFRECIO J, OLEFSKY JM: Increased p85/55/50 expression and decreased phosphatidylinositol 3-kinase activity in insulin-resistant human skeletal muscle. *Diabetes* **54**(8): 2351-2359, 2005.

BANG P, BRISMAR K, ROSENFELD RG, HALL K: Fasting affects serum insulin-like growth factors (IGFs) and IGF-binding proteins differently in patients with noninsulin-

dependent diabetes mellitus versus healthy nonobese and obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab* **78**(4): 960-967, 1994.

BANG P, NYGREN J, CARLSSON-SKWIRUT C, THORELL A, LJUNGQVIST O: Postoperative induction of insulin-like growth factor binding protein-3 proteolytic activity: relation to insulin and insulin sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab* **83**(7): 2509-2515, 1998.

BARBOUR LA, MIZANOR RAHMAN S, GUREVICH I, LEITNER JW, FISCHER SJ, ROPER MD, KNOTTS TA, VO Y, MC CURDY CE, YAKAR S, LEROITH D, KAHN CR, CANTLEY LC, FRIEDMAN JE, DRAZNIN B: Increased P85alpha is a potent negative regulator of skeletal muscle insulin signaling and induces in vivo insulin resistance associated with growth hormone excess. *J Biol Chem*. **280**(45): 37489-37494, 2005.

BARBOUR LA MRS, GUREVICH I, LEITNER JW, FISCHER SJ, ROPER MD, KNOTTS TA, VO Y, MC CURDY CE, YAKAR S, LEROITH D, KAHN CR, CANTLEY LC, FRIEDMAN JE, DRAZNIN B: Increased P85alpha is a potent negative regulator of skeletal muscle insulin signaling and induces in vivo insulin resistance associated with growth hormone excess. *J Biol Chem*. **280**(45): 37489-37494, 2005.

BARBOUR LA, SHAO J, QIAO L, LEITNER W, ANDERSON M, FRIEDMAN JE, DRAZNIN B: Human placental growth hormone increases expression of the p85 regulatory unit of phosphatidylinositol 3-kinase and triggers severe insulin resistance in skeletal muscle. *Endocrinology* **145**(3): 1144-1150, 2004.

BARTHOLOMEW EF MF, NATH JL: Fundamentals of anatomy & physiology. *Upper Saddle River, NJ: Pearson Education Inc.*: 616-617, 2009.

BARTKE A, SUN LY, LONGO V: Somatotrophic signaling: trade-offs between growth, reproductive development, and longevity. *Physiol Rev* **93**(2): 571-598, 2013.

BARZILAI N, SHE L, LIU BQ, VUGUIN P, COHEN P, WANG J, ROSSETTI L: Surgical removal of visceral fat reverses hepatic insulin resistance. *Diabetes* **48**(1): 94-98, 1999.

BATES PC, LOUGHNA PT, PELL JM, SCHULSTER D, MILLWARD DJ: Interactions between growth hormone and nutrition in hypophysectomized rats: body composition and production of insulin-like growth factor-I. *J Endocrinol* **139**(1): 117-126, 1993.

BAXTER RC, TWIGG SM: Actions of IGF binding proteins and related proteins in adipose tissue. *Trends Endocrinol Metab* **20**(10): 499-505, 2009.

BAYS HE: Adiposopathy is "sick fat" a cardiovascular disease? *J Am Coll Cardiol* **57**(25): 2461-2473, 2011.

BEAUREGARD C, UTZ AL, SCHAUB AE, NACHTIGALL L, BILLER BM, MILLER KK, KLIBANSKI A: Growth hormone decreases visceral fat and improves cardiovascular risk markers in women with hypopituitarism: a randomized, placebo-controlled study. *J Clin Endocrinol Metab* **93**(6): 2063-2071, 2008.

BENGTSSON BA, EDEN S, LONN L, KVIST H, STOKLAND A, LINDSTEDT G, BOSAEUS I, TOLLI J, SJOSTROM L, ISAKSSON OG: Treatment of adults with growth hormone (GH) deficiency with recombinant human GH. *J Clin Endocrinol Metab* **76**(2): 309-317, 1993.

BEREKET A, LANG CH, WILSON TA: Alterations in the growth hormone-insulin-like growth factor axis in insulin dependent diabetes mellitus. *Horm Metab Res* **31**(2-3): 172-181, 1999.

BERG AH, SCHERER PE: Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circ Res* **96**(9): 939-949, 2005.

BERRYMAN DE LE, SACKMANN-SALA L, LUBBERS E, MUNN R, KOPCHICK JJ: Growth hormone and adipose tissue: beyond the adipocyte. *Growth Horm IGF Res*. **21**(3): 113-123, 2011 Jun.

BERRYMAN DE, LIST EO, COSCHIGANO KT, BEHAR K, KIM JK, KOPCHICK JJ: Comparing adiposity profiles in three mouse models with altered GH signaling. *Growth Horm IGF Res.* **14**(4): 309-318, 2004 Aug.

BERRYMAN DE, LIST EO, KOHN DT, COSCHIGANO KT, SEELEY RJ, KOPCHICK JJ: Effect of growth hormone on susceptibility to diet-induced obesity. *Endocrinology* **147**(6): 2801-2808, 2006.

BILLER BM, JI HJ, AHN H, SAVOY C, SIEPL EC, POPOVIC V, COCULESCU M, ROEMMLER J, GAVRILA C, COOK DM, STRASBURGER CJ: Effects of once-weekly sustained-release growth hormone: a double-blind, placebo-controlled study in adult growth hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* **96**(6): 1718-1726, 2011.

BINOUX M: The IGF system in metabolism regulation. *Diabete Metab* **21**(5): 330-337, 1995.

BJORGELL P, ROSBERG S, ISAKSSON O, BELFRAGE P: The antilipolytic, insulin-like effect of growth hormone is caused by a net decrease of hormone-sensitive lipase phosphorylation. *Endocrinology* **115**(3): 1151-1156, 1984.

BLACKBURN A, DRESSENDORFER RA, BLUM WF, ERHARD M, BREM G, STRASBURGER CJ, WOLF E: A Interactions of insulin-like growth factor (IGF)-II and growth hormone in vivo: circulating levels of IGF-I and IGF-binding proteins in transgenic mice. *Eur J Endocrinol* **137**(6): 701-708, 1997.

BLÜHER S KJ, KIESS W, BUTENANDT O: Insulin-like growth factor I, growth hormone and insulin in white adipose tissue. . *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* **19**(4): 577-587, 2005 Dec.

BOLINDER J, OSTMAN J, WERNER S, ARNER P: Insulin action in human adipose tissue in acromegaly. *J Clin Invest* **77**(4): 1201-1206, 1986.

BONEY CM, MOATS-STAAATS BM, STILES AD, D'ERCOLE AJ: Expression of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-binding proteins during adipogenesis. *Endocrinology* **135**(5): 1863-1868, 1994.

BONI-SCHNETZLER M, GOSTELI-PETER MA, MORITZ W, FROESCH ER, ZAPF J: Reduced ob mRNA in hypophysectomised rats is not restored by growth hormone (GH), but further suppressed by exogenously administered insulin-like growth factor (IGF) I. *Biochem Biophys Res Commun* **225**(1): 296-301, 1996.

BONKOWSKI MS, DOMINICI FP, ARUM O, ROCHA JS, AL REGAIEY KA, WESTBROOK R, SPONG A, PANICI J, MASTERNAK MM, KOPCHICK JJ, BARTKE A: Disruption of growth hormone receptor prevents calorie restriction from improving insulin action and longevity. *PLoS One* **4**(2): e4567, 2009.

BOURLIER V, BOULOUMIE A: Role of macrophage tissue infiltration in obesity and insulin resistance. *Diabetes Metab* **35**(4): 251-260, 2009.

BRACHMANN SM, UEKI K, ENGELMAN JA, KAHN RC, CANTLEY LC: Phosphoinositide 3-kinase catalytic subunit deletion and regulatory subunit deletion have opposite effects on insulin sensitivity in mice. *Mol Cell Biol* **25**(5): 1596-1607, 2005.

BRAMELD JM, ATKINSON JL, SAUNDERS JC, PELL JM, BUTTERY PJ, GILMOUR RS: Effects of growth hormone administration and dietary protein intake on insulin-like growth factor I and growth hormone receptor mRNA Expression in porcine liver, skeletal muscle, and adipose tissue. *J Anim Sci* **74**(8): 1832-1841, 1996.

BREDELLA MA, LIN E, BRICK DJ, GERWECK AV, HARRINGTON LM, TORRIANI M, THOMAS BJ, SCHOENFELD DA, BREGGIA A, ROSEN CJ, HEMPHILL LC, WU Z, RIFAI N, UTZ AL, MILLER KK: Effects of GH in women with abdominal adiposity: a 6-month randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Eur J Endocrinol* **166**(4): 601-611, 2012.

BROOKE AM, DRAKE WM: Serum IGF-I levels in the diagnosis and monitoring of acromegaly. *Pituitary* **10**(2): 173-179, 2007.

BUIJS MM, BURGGRAAF J, LANGENDONK JG, SCHOEMAKER RC, FROLICH M, ARNDT JW, COHEN AF, ROMIJN JA, ACKERMANS MT, SAUERWEIN HP, MEINDERS AE, PIJL H: Hyposomatotropism blunts lipolysis in abdominally obese women. *J Clin Endocrinol Metab* **87**(8): 3851-3858, 2002.

BUNN RC, FOWLKES JL: Insulin-like growth factor binding protein proteolysis. *Trends Endocrinol Metab* **14**(4): 176-181, 2003.

BUTLER AA, AMBLER GR, BREIER BH, LEROITH D, ROBERTS CT, JR., GLUCKMAN PD: Growth hormone (GH) and insulin-like growth factor-I (IGF-I) treatment of the GH-deficient dwarf rat: differential effects on IGF-I transcription start site expression in hepatic and extrahepatic tissues and lack of effect on type I IGF receptor mRNA expression. *Mol Cell Endocrinol* **101**(1-2): 321-330, 1994.

BUTLER AA, FUNK B, BREIER BH, LEROITH D, ROBERTS CT, JR., GLUCKMAN PD: B Growth hormone (GH) status regulates GH receptor and GH binding protein mRNA in a tissue- and transcript-specific manner but has no effect on insulin-like growth factor-I receptor mRNA in the rat. *Mol Cell Endocrinol* **116**(2): 181-189, 1996.

BUTLER AA, GALLAHER BW, AMBLER GR, GLUCKMAN PD, BREIER BH: A IGF-I and IGF-binding protein-3 in plasma of GH-deficient rats. *J Endocrinol* **150**(1): 67-76, 1996.

BUTLER ST, MARR AL, PELTON SH, RADCLIFF RP, LUCY MC, BUTLER WR: Insulin restores GH responsiveness during lactation-induced negative energy balance in dairy cattle: effects on expression of IGF-I and GH receptor 1A. *J Endocrinol* **176**(2): 205-217, 2003.

CAMPBELL GS: Growth-hormone signal transduction. *J Pediatr* **131**(1 Pt 2): S42-44, 1997.

CANCELLO R HC, VIGUERIE N, TALEB S, POITOU C, ROUAULT C, COUPAYE M, PELLOUX V, HUGOL D, BOUILLOT JL, BOULOUMIÉ A, BARBATELLI G, CINTI S, SVENSSON PA, BARSH GS, ZUCKER JD, BASDEVANT A, LANGIN D, CLÉMENT K: Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss. *Diabetes*. **54**: 2277-2286, 2005.

CARON PJ, BEVAN JS, PETERSENN S, FLANAGAN D, TABARIN A, PREVOST G, MAISONOBE P, CLERMONT A, INVESTIGATORS P: Tumor shrinkage with lanreotide Autogel 120 mg as primary therapy in acromegaly: results of a prospective multicenter clinical trial. *J Clin Endocrinol Metab* **99**(4): 1282-1290, 2014.

CARTER-SU C, KING AP, ARGETSINGER LS, SMIT LS, VANDERKUUUR J, CAMPBELL GS: Signalling pathway of GH. *Endocr J* **43** **Suppl**: S65-70, 1996.

CARTER-SU C, RUI L, HERRINGTON J: Role of the tyrosine kinase JAK2 in signal transduction by growth hormone. *Pediatr Nephrol* **14**(7): 550-557, 2000.

CASELLAS A, SALAVERT A, AGUDO J, AYUSO E, JIMENEZ V, MOYA M, MUNOZ S, FRANCKHAUSER S, BOSCH F: Expression of IGF-I in pancreatic islets prevents lymphocytic infiltration and protects mice from type 1 diabetes. *Diabetes* **55**(12): 3246-3255, 2006.

CASTRO FC, DELGADO EF, BEZERRA RM, LANNA DP: Effects of growth hormone on insulin signal transduction in rat adipose tissue maintained in vitro. *Endocr Res* **30**(2): 225-238, 2004.

CATALANO PM, NIZIELSKI SE, SHAO J, PRESTON L, QIAO L, FRIEDMAN JE: Downregulated IRS-1 and PPARgamma in obese women with gestational diabetes: relationship to FFA during pregnancy. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **282**(3): E522-533, 2002.

CIARALDI TP, CARTER L, REHMAN N, MOHIDEEN P, MUDALIAR S, HENRY RR: Insulin and insulin-like growth factor-1 action on human skeletal muscle: preferential effects of insulin-like growth factor-1 in type 2 diabetic subjects. *Metabolism* **51**(9): 1171-1179, 2002.

CINGEL-RISTIC V, VAN NECK JW, FRYSTYK J, DROP SL, FLYVBJERG A: Administration of human insulin-like growth factor-binding protein-1 increases circulating levels of growth hormone in mice. *Endocrinology* **145**(9): 4401-4407, 2004.

CINTI S, MITCHELL G, BARBATELLI G, MURANO I, CERESI E, FALOIA E, WANG S, FORTIER M, GREENBERG AS, OBIN MS: Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res* **46**(11): 2347-2355, 2005.

CLAUDIO M, BENJAMIM F, RICCARDO B, MASSIMILIANO C, FRANCESCO B, LUCIANO C: Adipocytes IGFBP-2 expression in prepubertal obese children. *Obesity (Silver Spring)* **18**(10): 2055-2057, 2010.

CLEMMONS D, MAILE L, XI G, SHEN X, RADHAKRISHNAN Y: Igf-I signaling in response to hyperglycemia and the development of diabetic complications. *Curr Diabetes Rev* **7**(4): 235-245, 2011.

CLEMMONS DR: Involvement of insulin-like growth factor-I in the control of glucose homeostasis. *Curr Opin Pharmacol* **6**(6): 620-625, 2006.

CLEMMONS DR, SNYDER DK, BUSBY WH, JR.: Variables controlling the secretion of insulin-like growth factor binding protein-2 in normal human subjects. *J Clin Endocrinol Metab* **73**(4): 727-733, 1991.

COLAO A, FERONE D, MARZULLO P, LOMBARDI G: Systemic complications of acromegaly: epidemiology, pathogenesis, and management. *Endocr Rev* **25**(1): 102-152, 2004.

COLEMAN ME, RUSSELL L, ETHEERTON TD: Porcine somatotropin (pST) increases IGF-I mRNA abundance in liver and subcutaneous adipose tissue but not in skeletal muscle of growing pigs. *J Anim Sci* **72**(4): 918-924, 1994.

COLOMIERE M, PERMEZEL M, LAPPAS M: Diabetes and obesity during pregnancy alter insulin signalling and glucose transporter expression in maternal skeletal muscle and subcutaneous adipose tissue. *J Mol Endocrinol* **44**(4): 213-223, 2010.

COLOMIERE M, PERMEZEL M, RILEY C, DESOYE G, LAPPAS M: Defective insulin signaling in placenta from pregnancies complicated by gestational diabetes mellitus. *Eur J Endocrinol* **160**(4): 567-578, 2009.

COLSON A, LE CAM A, MAITER D, EDERY M, THISSEN JP: Potentiation of growth hormone-induced liver suppressors of cytokine signaling messenger ribonucleic acid by cytokines. *Endocrinology* **141**(10): 3687-3695, 2000.

COMBES S, LOUVEAU I, BONNEAU M: Effect of GH administration on GH and IGF-I receptors in porcine skeletal muscle and liver in relation to plasma GH-binding protein. *J Endocrinol* **155**(1): 19-26, 1997.

COMBETTES-SOUVERAIN M, ISSAD T: Molecular basis of insulin action. *Diabetes Metab* **24**(6): 477-489, 1998.

CONSTANT VA, GAGNON A, LANDRY A, SORISKY A: Macrophage-conditioned medium inhibits the differentiation of 3T3-L1 and human abdominal preadipocytes. *Diabetologia* **49**(6): 1402-1411, 2006.

CORDAIN L, EADES MR, EADES MD: Hyperinsulinemic diseases of civilization: more than just Syndrome X. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **136**(1): 95-112, 2003.

CORNIER MA, BESSESEN DH, GUREVICH I, LEITNER JW, DRAZNIN B: Nutritional upregulation of p85alpha expression is an early molecular manifestation of insulin resistance. *Diabetologia* **49**(4): 748-754, 2006 Apr.

CORNU M, MODI H, KAWAMORI D, KULKARNI RN, JOFFRAUD M, THORENS B: Glucagon-like peptide-1 increases beta-cell glucose competence and proliferation by translational induction of insulin-like growth factor-1 receptor expression. *J Biol Chem* **285**(14): 10538-10545, 2010.



CORSI MM, FULGENZI A, GAJA G, FALCHI M, BERTELLI AA, BOCTELLI AA, FERRERO ME: Effect of acute and chronic inflammation on plasma growth hormone levels in rats. *Drugs Exp Clin Res* **23**(3-4): 117-122, 1997.

COSCHIGANO KT, HOLLAND AN, RIDERS ME, LIST EO, FLYVBJERG A, KOPCHICK JJ: Deletion, but not antagonism, of the mouse growth hormone receptor results in severely decreased body weights, insulin, and insulin-like growth factor I levels and increased life span. *Endocrinology* **144**(9): 3799-3810, 2003.

CROWE FL, KEY TJ, ALLEN NE, APPLEBY PN, RODDAM A, OVERVAD K, GRONBAEK H, TJONNELAND A, HALKJAER J, DOSSUS L, BOEING H, KROGER J, TRICHOPOULOU A, DILIS V, TRICHOPOULOS D, BOUTRON-RUAULT MC, DE LAUZON B, CLAVEL-CHAPELON F, PALLI D, BERRINO F, PANICO S, TUMINO R, SACERDOTE C, BUENO-DE-MESQUITA HB, VRIELING A, VAN GILS CH, PEETERS PH, GRAM IT, SKEIE G, LUND E, RODRIGUEZ L, JAKSZYN P, MOLINA-MONTES E, TORMO MJ, BARRICARTE A, LARRANAGA N, KHAW KT, BINGHAM S, RINALDI S, SLIMANI N, NORAT T, GALLO V, RIBOLI E, KAAKS R: The association between diet and serum concentrations of IGF-I, IGFBP-1, IGFBP-2, and IGFBP-3 in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **18**(5): 1333-1340, 2009.

CUNEO RC, JUDD S, WALLACE JD, PERRY-KEENE D, BURGER H, LIM-TIO S, STRAUSS B, STOCKIGT J, TOPLISS D, ALFORD F, HEW L, BODE H, CONWAY A, HANDELSMAN D, DUNN S, BOYAGES S, CHEUNG NW, HURLEY D: The Australian Multicenter Trial of Growth Hormone (GH) Treatment in GH-Deficient Adults. *J Clin Endocrinol Metab* **83**(1): 107-116, 1998.

CURAT CA, MIRANVILLE A, SENGENES C, DIEHL M, TONUS C, BUSSE R, BOULOUMIE A: From blood monocytes to adipose tissue-resident macrophages: induction of diapedesis by human mature adipocytes. *Diabetes* **53**(5): 1285-1292, 2004.

CYPESS AM, ZHANG H, SCHULZ TJ, HUANG TL, ESPINOZA DO, KRISTIANSSEN K, UNTERMAN TG, TSENG YH: Insulin/IGF-I regulation of necdin and brown adipocyte differentiation via CREB- and FoxO1-associated pathways. *Endocrinology* **152**(10): 3680-3689, 2011.

DAHLMAN I, KAAMAN M, OLSSON T, TAN GD, BICKERTON AS, WAHLEN K, ANDERSSON J, NORDSTROM EA, BLOMQUIST L, SJOGREN A, FORSGREN M, ATTERSAND A, ARNER P: A unique role of monocyte chemoattractant protein 1 among chemokines in adipose tissue of obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab* **90**(10): 5834-5840, 2005.

DAVI MV, DALLE CARBONARE L, GIUSTINA A, FERRARI M, FRIGO A, LO CASCIO V, FRANZIA G: Sleep apnoea syndrome is highly prevalent in acromegaly and only partially reversible after biochemical control of the disease. *Eur J Endocrinol* **159**(5): 533-540, 2008.

DAVIES JS, GEVERS EF, STEVENSON AE, COSCHIGANO KT, EL-KASTI MM, BULL MJ, ELFORD C, EVANS BA, KOPCHICK JJ, WELLS T: Adiposity profile in the dwarf rat: an unusually lean model of profound growth hormone deficiency. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **292**(5): E1483-1494, 2007.

DE CASTRO BARBOSA T, DE CARVALHO JE, POYARES LL, BORDIN S, MACHADO UF, NUNES MT: Potential role of growth hormone in impairment of insulin signaling in skeletal muscle, adipose tissue, and liver of rats chronically treated with arginine. *Endocrinology* **150**(5): 2080-2086, 2009.

DE KORT SW, VAN DOORN J, VAN DE SANDE AG, LEUNISSEN RW, HOKKEN-KOELEGA AC: Serum insulin-like growth factor-binding protein-2 levels and metabolic and cardiovascular risk factors in young adults and children born small for gestational age. *J Clin Endocrinol Metab* **95**(2): 864-871, 2010.

DE MARINIS L, BIANCHI A, MANCINI A, GENTILELLA R, PERRELLI M, GIAMPIETRO A, PORCELLI T, TILARO L, FUSCO A, VALLE D, TACCHINO RM: Growth hormone secretion and leptin in morbid obesity before and after biliopancreatic diversion: relationships with insulin and body composition. *J Clin Endocrinol Metab* **89**(1): 174-180, 2004.

DE PERGOLA G, ZAMBONI M, PANNACCIULLI N, TURCATO E, GIORGINO F, ARMELLINI F, LOGOLUSO F, SCIARAFFIA M, BOSELLO O, GIORGINO R: Divergent effects of short-term, very-low-calorie diet on insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding protein-3 serum concentrations in premenopausal women with obesity. *Obes Res* **6**(6): 408-415, 1998.

DE SEVILLA L, MCCUNE SA, WHITE ME: Insulin-like growth factor mRNA expression in tissues of lean and obese male SHFF/Mcc-fa(cp) rats. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **109**(2-3): 371-382, 1994.

DE SILVA HC, FIRTH SM, TWIGG SM, BAXTER RC: Interaction between IGF binding protein-3 and TGFbeta in the regulation of adipocyte differentiation. *Endocrinology* **153**(10): 4799-4807, 2012.

DEEPAK D, DAOUSI C, JAVADPOUR M, CLARK D, PERRY Y, PINKNEY J, MACFARLANE IA: The influence of growth hormone replacement on peripheral inflammatory and cardiovascular risk markers in adults with severe growth hormone deficiency. *Growth Horm IGF Res* **20**(3): 220-225, 2010.

DEL RINCON JP, IIDA K, GAYLINN BD, MCCURDY CE, LEITNER JW, BARBOUR LA, KOPCHICK JJ, FRIEDMAN JE, DRAZNIN B, THORNER MO: Growth hormone regulation of p85alpha expression and phosphoinositide 3-kinase activity in adipose tissue: mechanism for growth hormone-mediated insulin resistance. *Diabetes* **56**(6): 1638-1646, 2007.

DEVEDJIAN JC, GEORGE M, CASELLAS A, PUJOL A, VISA J, PELEGRIN M, GROS L, BOSCH F: Transgenic mice overexpressing insulin-like growth factor-II in beta cells develop type 2 diabetes. *J Clin Invest* **105**(6): 731-740, 2000.

DI COLA G, COOL MH, ACCILI D: Hypoglycemic effect of insulin-like growth factor-1 in mice lacking insulin receptors. *J Clin Invest* **99**(10): 2538-2544, 1997.

DIETZ J, SCHWARTZ J: Growth hormone alters lipolysis and hormone-sensitive lipase activity in 3T3-F442A adipocytes. *Metabolism* **40**(8): 800-806, 1991.

DIFEDELE LM, HE J, BONKOWSKI EL, HAN X, HELD MA, BOHAN A, MENON RK, DENSON LA: Tumor necrosis factor alpha blockade restores growth hormone signaling in murine colitis. *Gastroenterology* **128**(5): 1278-1291, 2005.

DOEHNER W, PFLAUM CD, RAUCHHAUS M, GODSLAND IF, EGERER K, CICOIRA M, FLOREA VG, SHARMA R, BOLGER AP, COATS AJ, ANKER SD, STRASBURGER CJ: Leptin, insulin sensitivity and growth hormone binding protein in chronic heart failure with and without cardiac cachexia. *Eur J Endocrinol* **145**(6): 727-735, 2001.

DOGLIO A, DANI C, FREDRIKSON G, GRIMALDI P, AILHAUD G: Acute regulation of insulin-like growth factor-I gene expression by growth hormone during adipose cell differentiation. *EMBO J* **6**(13): 4011-4016, 1987.

DOLINKOVA M, DOSTALOVA I, LACINOVA Z, MICHALSKY D, HALUZIKOVA D, MRAZ M, KASALICKY M, HALUZIK M: The endocrine profile of subcutaneous and visceral adipose tissue of obese patients. *Mol Cell Endocrinol* **291**(1-2): 63-70, 2008.

DOMENE H, KRISHNAMURTHI K, ESHET R, GILAD I, LARON Z, KOCH I, STANNARD B, CASSORLA F, ROBERTS CT, JR., LEROITH D: Growth hormone (GH) stimulates insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-I-binding protein-3, but not GH receptor gene expression in livers of juvenile rats. *Endocrinology* **133**(2): 675-682, 1993.

DOMENE HM, MEIDAN R, YAKAR S, SHEN-ORR Z, CASSORLA F, ROBERTS CT, JR., LEROITH D: Role of GH and IGF-I in the regulation of IGF-I, IGF-I receptor and IGF binding protein gene expression in the rat spleen. *Regul Pept* **52**(3): 215-226, 1994.

DOMINICI FP, ARGENTINO DP, MUNOZ MC, MIQUET JG, SOTELO AI, TURYN D: Influence of the crosstalk between growth hormone and insulin signalling on the modulation of insulin sensitivity. *Growth Horm IGF Res* **15**(5): 324-336, 2005.

DOMINICI FP, AROSTEGUI DIAZ G, BARTKE A, KOPCHICK JJ, TURYN D: Compensatory alterations of insulin signal transduction in liver of growth hormone receptor knockout mice. *J Endocrinol* **166**(3): 579-590, 2000.

DOMINICI FP, CIFONE D, BARTKE A, TURYN D: Loss of sensitivity to insulin at early events of the insulin signaling pathway in the liver of growth hormone-transgenic mice. *J Endocrinol* **161**(3): 383-392, 1999.

DOMINICI FP, TURYN D: Growth hormone-induced alterations in the insulin-signaling system. *Exp Biol Med (Maywood)* **227**(3): 149-157, 2002.

DONAHUE LR, BEAMER WG: Growth hormone deficiency in 'litttle' mice results in aberrant body composition, reduced insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-binding protein-3 (IGFBP-3), but does not affect IGFBP-2, -1 or -4. *J Endocrinol* **136**(1): 91-104, 1993.

DRAZNIN B: Molecular mechanisms of insulin resistance: serine phosphorylation of insulin receptor substrate-1 and increased expression of p85alpha: the two sides of a coin. *Diabetes* **55**(8): 2392-2397, 2006.

DROSTE M, DOMBERG J, BUCHFELDER M, MANN K, SCHWANKE A, STALLA G, STRASBURGER CJ: Therapy of acromegalic patients exacerbated by concomitant type 2 diabetes requires higher pegvisomant doses to normalise IGF1 levels. *Eur J Endocrinol* **171**(1): 59-68, 2014.

DUCLUZEAU PH, PERRETTI N, LAVILLE M, ANDREELLI F, VEGA N, RIOU JP, VIDAL H: Regulation by insulin of gene expression in human skeletal muscle and adipose tissue. Evidence for specific defects in type 2 diabetes. *Diabetes* **50**(5): 1134-1142, 2001.

DUGO L, COLLIN M, ALLEN DA, MURCH O, FOSTER SJ, YAQOOB MM, THIEMERMANN C: Insulin reduces the multiple organ injury and dysfunction caused by coadministration of lipopolysaccharide and peptidoglycan independently of blood glucose: role of glycogen synthase kinase-3beta inhibition. *Crit Care Med* **34**(5): 1489-1496, 2006.

DUGO L, COLLIN M, THIEMERMANN C: Glycogen synthase kinase 3beta as a target for the therapy of shock and inflammation. *Shock* **27**(2): 113-123, 2007.

DUNGER D, YUEN K, ONG K: Insulin-like growth factor I and impaired glucose tolerance. *Horm Res* **62 Suppl 1**: 101-107, 2004.

DUROVCOVA V, KRSEK M, HALUZIK M: [Pathogenesis of insulin resistance in different endocrinopathies]. *Vnitr Lek* **54**(4): 368-376, 2008.

ENTINGH-PEARSALL A, KAHN CR: Differential roles of the insulin and insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptors in response to insulin and IGF-I. *J Biol Chem* **279**(36): 38016-38024, 2004.

ENTINGH AJ, TANIGUCHI CM, KAHN CR: Bi-directional regulation of brown fat adipogenesis by the insulin receptor. *J Biol Chem* **278**(35): 33377-33383, 2003.

ERMAN A, VEILLEUX A, TCHERNOF A, GOODYER CG: B Human growth hormone receptor (GHR) expression in obesity: I. GHR mRNA expression in omental and subcutaneous adipose tissues of obese women. *Int J Obes (Lond)* **35**(12): 1511-1519, 2011.

ERMAN A, WABITSCH M, GOODYER CG: A Human growth hormone receptor (GHR) expression in obesity: II. Regulation of the human GHR gene by obesity-related factors. *Int J Obes (Lond)* **35**(12): 1520-1529, 2011.

ERONDU NE, DAKE BL, MOSER DR, LIN M, BOES M, BAR RS: Regulation of endothelial IGFBP-3 synthesis and secretion by IGF-I and TGF-beta. *Growth Regul* **6**(1): 1-9, 1996.

ESPINOSA DE LOS MONTEROS AL, CARRASCO CA, ALBARRAN AA, GADELHA M, ABREU A, MERCADO M: The role of primary pharmacological therapy in acromegaly. *Pituitary* **17 Suppl 1**: S4-10, 2014.

FAHLBUSCH R, HONEGGER J, BUCHFELDER M: Evidence supporting surgery as treatment of choice for acromegaly. *J Endocrinol* **155 Suppl 1**: S53-55, 1997.

FAN Y, MENON RK, COHEN P, HWANG D, CLEMENS T, DIGIROLAMO DJ, KOPCHICK JJ, LE ROITH D, TRUCCO M, SPERLING MA: Liver-specific deletion of the growth hormone receptor reveals essential role of growth hormone signaling in hepatic lipid metabolism. *J Biol Chem* **284**(30): 19937-19944, 2009.

FARAJ M, BEAUREGARD G, LOIZON E, MOLDES M, CLEMENT K, TAHIRI Y, CIANFLONE K, VIDAL H, RABASA-LHORET R: Insulin regulation of gene expression and concentrations of white adipose tissue-derived proteins in vivo in healthy men: relation to adiponutrin. *J Endocrinol* **191**(2): 427-435, 2006.

FARAJ M, BEAUREGARD G, TARDIF A, LOIZON E, GODBOUT A, CIANFLONE K, VIDAL H, RABASA-LHORET R: Regulation of leptin, adiponectin and acylation-stimulating protein by hyperinsulinaemia and hyperglycaemia in vivo in healthy lean young men. *Diabetes Metab* **34**(4 Pt 1): 334-342, 2008.

FEDERICI M, PORZIO O, ZUCARO L, FUSCO A, BORBONI P, LAURO D, SESTI G: Distribution of insulin/insulin-like growth factor-I hybrid receptors in human tissues. *Mol Cell Endocrinol* **129**(2): 121-126, 1997.

FERNÁNDEZ-PÉREZ L NJ, STÅHLBERG N SANTANA-FARRÉ R, BORONAT M, MARRERO D, HENRÍQUEZ-HERNÁNDEZ L, NORSTEDT G, FLORES-MORALES A.: The effect of in vivo growth hormone treatment on blood gene expression in adults with growth hormonedeficiency reveals potential biomarkers to monitor growth hormone therapy. *Clin Endocrinol (Oxf)*. **72**(6): 800-806, 2010 Jun.

FERNANDEZ-TWINN DS, ALFARADHI MZ, MARTIN-GRONERT MS, DUQUE-GUIMARAES DE, PIEKARZ A, FERLAND-MCCOLLOUGH D, BUSHELL M, OZANNE SE: Downregulation of IRS-1 in adipose tissue of offspring of obese mice is programmed cell-autonomously through post-transcriptional mechanisms. *Mol Metab* **3**(3): 325-333, 2014.

FERNANDEZ AM, KIM JK, YAKAR S, DUPONT J, HERNANDEZ-SANCHEZ C, CASTLE AL, FILMORE J, SHULMAN GI, LE ROITH D: Functional inactivation of the IGF-I and insulin receptors in skeletal muscle causes type 2 diabetes. *Genes Dev* **15**(15): 1926-1934, 2001.

FISCHER-POSOVSZKY P, TORNQVIST H, DEBATIN KM, WABITSCH M: Inhibition of death-receptor mediated apoptosis in human adipocytes by the insulin-like growth factor I (IGF-I)/IGF-I receptor autocrine circuit. *Endocrinology* **145**(4): 1849-1859, 2004.

FISKER S, KRISTENSEN K, ROSENFALCK AM, PEDERSEN SB, EBDROP L, RICHELSEN B, HILSTED J, CHRISTIANSEN JS, JORGENSEN JO: Gene expression of a truncated and the full-length growth hormone (GH) receptor in subcutaneous fat and skeletal muscle in GH-deficient adults: impact of GH treatment. *J Clin Endocrinol Metab* **86**(2): 792-796, 2001.

FLEENOR D, ARUMUGAM R, FREEMARK M: Growth hormone and prolactin receptors in adipogenesis: STAT-5 activation, suppressors of cytokine signaling, and regulation of insulin-like growth factor I. *Horm Res* **66**(3): 101-110, 2006.

FLINT DJ BN, BOUMARD S, KOPCHICK JJ, KELLY P.: Developmental aspects of adipose tissue in GH receptor and prolactin receptor genedisrupted mice: site-specific effects

upon proliferation, differentiation and hormonesensitivity. *J Endocrinol.* **191**(1): 101-111, 2006 Oct.

FLORKOWSKI CM, BARNARD R, LIVESEY JH, VEVERIS T, ESPINER EA, DONALD RA: Growth hormone binding protein correlates strongly with leptin and percentage body fat in GH-deficient adults, is increased by GH replacement but does not predict IGF-I response. *Growth Horm IGF Res* **9**(1): 35-40, 1999.

FORNONI A, ROSENZWEIG SA, LENZ O, RIVERA A, STRIKER GE, ELLIOT SJ: Low insulin-like growth factor binding protein-2 expression is responsible for increased insulin receptor substrate-1 phosphorylation in mesangial cells from mice susceptible to glomerulosclerosis. *Endocrinology* **147**(7): 3547-3554, 2006.

FOSTER CM HP, JING HW, SCHWARTZ J.: Effects of human growth hormone on insulin-stimulated glucose metabolism in 3T3-F442A adipocytes. *Endocrinology.* **123**(2), 1988 Aug.

FRAME MC: Src in cancer: deregulation and consequences for cell behaviour. *Biochim Biophys Acta* **1602**(2): 114-130, 2002.

FRANCO C, ANDERSSON B, LONN L, BENGTSSON BA, SVENSSON J, JOHANSSON G: Growth hormone reduces inflammation in postmenopausal women with abdominal obesity: a 12-month, randomized, placebo-controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab* **92**(7): 2644-2647, 2007.

FRASCA F, PANDINI G, SCALIA P, SCIACCA L, MINEO R, COSTANTINO A, GOLDFINE ID, BELFIORE A, VIGNERI R: Insulin receptor isoform A, a newly recognized, high-affinity insulin-like growth factor II receptor in fetal and cancer cells. *Mol Cell Biol* **19**(5): 3278-3288, 1999.

FREDA PU, SHEN W, HEYMSFIELD SB, REYES-VIDAL CM, GEER EB, BRUCE JN, GALLAGHER D: Lower visceral and subcutaneous but higher intermuscular adipose tissue depots in patients with growth hormone and insulin-like growth factor I excess due to acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab* **93**(6): 2334-2343, 2008.

FRICK F, BOHLOOLY YM, LINDEN D, OLSSON B, TORNELL J, EDEN S, OSCARSSON J: Long-term growth hormone excess induces marked alterations in lipoprotein metabolism in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **281**(6): E1230-1239, 2001.

FRIEDMAN JE, ISHIZUKA T, SHAO J, HUSTON L, HIGHMAN T, CATALANO P: Impaired glucose transport and insulin receptor tyrosine phosphorylation in skeletal muscle from obese women with gestational diabetes. *Diabetes* **48**(9): 1807-1814, 1999.

FROST RA, LANG CH: Alteration of somatotrophic function by proinflammatory cytokines. *J Anim Sci* **82 E-Suppl**: E100-109, 2004.

FRUEHWALD-SCHULTES B, OLTMANNS KM, TOSCHEK B, SOPKE S, KERN W, BORN J, FEHM HL, PETERS A: Short-term treatment with metformin decreases serum leptin concentration without affecting body weight and body fat content in normal-weight healthy men. *Metabolism* **51**(4): 531-536, 2002.

FRYSTYK J: Free insulin-like growth factors -- measurements and relationships to growth hormone secretion and glucose homeostasis. *Growth Horm IGF Res* **14**(5): 337-375, 2004.

FRYSTYK J, GROFTE T, SKJAERBAEK C, ORSKOV H: The effect of oral glucose on serum free insulin-like growth factor-I and -II in health adults. *J Clin Endocrinol Metab* **82**(9): 3124-3127, 1997.

FRYSTYK J, SKJAERBAEK C, VESTBO E, FISKE S, ORSKOV H: Circulating levels of free insulin-like growth factors in obese subjects: the impact of type 2 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* **15**(5): 314-322, 1999.

FUJISAKA S, USUI I, BUKHARI A, IKUTANI M, OYA T, KANATANI Y, TSUNEYAMA K, NAGAI Y, TAKATSU K, URAKAZE M, KOBAYASHI M, TOBE K: Regulatory mechanisms for adipose tissue M1 and M2 macrophages in diet-induced obese mice. *Diabetes* **58**(11): 2574-2582, 2009.

FURUHATA Y, YONEZAWA T, TAKAHASHI M, NISHIHARA M: Impaired insulin signaling in the liver of transgenic rats with low circulating growth hormone levels. *J Endocrinol* **172**(1): 127-136, 2002.

FUSCO A, MIELE L, D'UONNOLO A, FORGIONE A, RICCARDI L, CEFALO C, BARINI A, BIANCHI A, GIAMPIETRO A, CIMINO V, LANDOLFI R, GRIECO A, DE MARINIS L: Nonalcoholic fatty liver disease is associated with increased GHBP and reduced GH/IGF-I levels. *Clin Endocrinol (Oxf)* **77**(4): 531-536, 2012.

GANN PH, KAZER R, CHATTERTON R, GAPSTUR S, THEDFORD K, HELENOWSKI I, GIOVANAZZI S, VAN HORN L: Sequential, randomized trial of a low-fat, high-fiber diet and soy supplementation: effects on circulating IGF-I and its binding proteins in premenopausal women. *Int J Cancer* **116**(2): 297-303, 2005.

GARDAN D, MOUROT J, LOUVEAU I: Decreased expression of the IGF-II gene during porcine adipose cell differentiation. *Mol Cell Endocrinol* **292**(1-2): 63-68, 2008.

GARDELIS JG, HATZIS TD, STAMOGIANNOU LN, DONA AA, FOTINO AD, BRESTAS PS, CONSTANTOPOULOS AG: Activity of the growth hormone/insulin-like growth factor-I axis in critically ill children. *J Pediatr Endocrinol Metab* **18**(4): 363-372, 2005.

GARDNER CJ IA, DAOUSI C, MCFARLANE IA, JOSEPH F, BELL JD, THOMAS EL, ADAMS VL, KEMP GJ, CUTHBERTSON DJ.: Hepatic steatosis, GH deficiency and the effects of GH replacement: a Liverpool magneticresonance spectroscopy study. *Eur J Endocrinol*. **166**(6): 993-1002, 2012 Jun.

GARTEN A, SCHUSTER S, KIESS W: The insulin-like growth factors in adipogenesis and obesity. *Endocrinol Metab Clin North Am*. **41**(2): 283-295, 2012 Jun.

GAUSE I, EDEN S: Hormonal regulation of growth hormone binding and responsiveness in adipose tissue and adipocytes of hypophysectomized rats. *J Endocrinol* **105**(3): 331-337, 1985.

GIANNINI S, BENVENUTI S, LUCIANI P, MANUELLI C, CELLAI I, DELEDDA C, PEZZATINI A, VANNELLI GB, MANESCHI E, ROTELLA CM, SERIO M, PERI A: Intermittent high glucose concentrations reduce neuronal precursor survival by altering the IGF system: the involvement of the neuroprotective factor DHCR24 (Seladin-1). *J Endocrinol* **198**(3): 523-532, 2008.

GIANOTTI L, BROGLIO F, AIMARETTI G, ARVAT E, COLOMBO S, DI SUMMA M, GALLIOLI G, PITTONI G, SARDO E, STELLA M, ZANELLO M, MIOLA C, GHIGO E: Low IGF-I levels are often uncoupled with elevated GH levels in catabolic conditions. *J Endocrinol Invest* **21**(2): 115-121, 1998.

GIORGINO F, PEDRINI MT, MATERA L, SMITH RJ: Specific increase in p85alpha expression in response to dexamethasone is associated with inhibition of insulin-like growth factor-I stimulated phosphatidylinositol 3-kinase activity in cultured muscle cells. *J Biol Chem* **272**(11): 7455-7463, 1997.

GIOVANNUCCI E: Insulin, insulin-like growth factors and colon cancer: a review of the evidence. *J Nutr* **131**(11 Suppl): 3109S-3120S, 2001.

GIUSTI V, GASTEYGER C, SUTER M, HERAIEF E, GAILLARD RC, BURCKHARDT P: Gastric banding induces negative bone remodelling in the absence of secondary hyperparathyroidism: potential role of serum C telopeptides for follow-up. *Int J Obes (Lond)* **29**(12): 1429-1435, 2005.

GIUSTINA A, CHANSON P, KLEINBERG D, BRONSTEIN MD, CLEMMONS DR, KLIBANSKI A, VAN DER LELY AJ, STRASBURGER CJ, LAMBERTS SW, HO KK, CASANUEVA FF, MELMED S, ACROMEGALY CONSENSUS G: Expert consensus document: A consensus on the medical treatment of acromegaly. *Nat Rev Endocrinol* **10**(4): 243-248, 2014.

GONDRET F, PERE MC, TACHER S, DARE S, TREFEU C, LE HUEROU-LURON I, LOUVEAU I: Spontaneous intra-uterine growth restriction modulates the endocrine status and the developmental expression of genes in porcine fetal and neonatal adipose tissue. *Gen Comp Endocrinol* **194**: 208-216, 2013.

GOOSSENS GH: The role of adipose tissue dysfunction in the pathogenesis of obesity-related insulin resistance. *Physiol Behav* **94**(2): 206-218, 2008.

GOSTELI-PETER MA, WINTERHALTER KH, SCHMID C, FROESCH ER, ZAPF J: Expression and regulation of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-binding protein messenger ribonucleic acid levels in tissues of hypophysectomized rats infused with IGF-I and growth hormone. *Endocrinology* **135**(6): 2558-2567, 1994.

GOYA L, DE LA PUENTE A, RAMOS S, MARTIN MA, ESCRIVA F, PASCUAL-LEONE AM: Regulation of insulin-like growth factor-I and -II by glucose in primary cultures of fetal rat hepatocytes. *J Biol Chem* **274**(35): 24633-24640, 1999.

GOYA L, RIVERO F, MARTIN MA, ARAHUETES R, HERNANDEZ ER, PASCUAL-LEONE AM: Effects of refeeding of undernourished and insulin treatment of diabetic neonatal rats on IGF and IGFBP. *Am J Physiol* **271**(2 Pt 1): E223-231, 1996.

GRAVHOLT CH, NAERAA RW, BRIXEN K, KASTRUP KW, MOSEKILDE L, JORGENSEN JO, CHRISTIANSEN JS: Short-term growth hormone treatment in girls with Turner syndrome decreases fat mass and insulin sensitivity: a randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover study. *Pediatrics* **110**(5): 889-896, 2002.

GROHMANN M, SABIN M, HOLLY J, SHIELD J, CROWNE E, STEWART C: Characterization of differentiated subcutaneous and visceral adipose tissue from children: the influences of TNF-alpha and IGF-I. *J Lipid Res* **46**(1): 93-103, 2005.

GROTTOLI S, GASCO V, MAINOLFI A, BECCUTI G, CORNELI G, AIMARETTI G, DIEGUEZ C, CASANUEVA F, GHIGO E: Growth hormone/insulin-like growth factor I axis, glucose metabolism, and lipolysis but not leptin show some degree of refractoriness to short-term fasting in acromegaly. *J Endocrinol Invest* **31**(12): 1103-1109, 2008.

GUINTO G, ABDO M, ZEPEDA E, ARECHIGA N, MERCADO M: Acromegaly: role of surgery in the therapeutic armamentarium. *Int J Endocrinol* **2012**: 306094, 2012.

GUNAWARDANA SC, PISTON DW: Insulin-independent reversal of type 1 diabetes in nonobese diabetic mice with brown adipose tissue transplant. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **308**(12): E1043-1055, 2015.

GUO Y, LU Y, HOULE D, ROBERTSON K, TANG Z, KOPCHICK JJ, LIU YL, LIU JL: Pancreatic islet-specific expression of an insulin-like growth factor-I transgene compensates islet cell growth in growth hormone receptor gene-deficient mice. *Endocrinology* **146**(6): 2602-2609, 2005.

GUO YJ, TANG GQ, LI XW, ZHU L, LI MZ: [Developmental expression changes of IGF2 and IGFBP3 genes in adipose tissue of two pig breeds]. *Yi Chuan* **30**(5): 602-606, 2008.

HACKETT RH, WANG YD, LARNER AC: Mapping of the cytoplasmic domain of the human growth hormone receptor required for the activation of Jak2 and Stat proteins. *J Biol Chem* **270**(36): 21326-21330, 1995.

HAEFFNER A, THIEBLEMONT N, DEAS O, MARELLI O, CHARPENTIER B, SENIK A, WRIGHT SD, HAEFFNER-CAVAILLON N, HIRSCH F: Inhibitory effect of growth hormone on TNF-alpha secretion and nuclear factor-kappaB translocation in lipopolysaccharide-stimulated human monocytes. *J Immunol* **158**(3): 1310-1314, 1997.

HAGLIND E, MALMLOF K, FAN J, LANG CH: Insulin-like growth factor-I and growth hormone administration in intestinal ischemia shock in the rat. *Shock* **10**(1): 62-68, 1998.

HALL K, HILDING A, THOREN M: Determinants of circulating insulin-like growth factor-I. *J Endocrinol Invest* **22**(5 Suppl): 48-57, 1999.

HALLMANN D, TRUMPER K, TRUSHEIM H, UEKI K, KAHN CR, CANTLEY LC, FRUMAN DA, HORSCH D: Altered signaling and cell cycle regulation in embryonal stem cells with a disruption of the gene for phosphoinositide 3-kinase regulatory subunit p85alpha. *J Biol Chem* **278**(7): 5099-5108, 2003.

HAN HJ, KANG CW, PARK SH: Tissue-specific regulation of insulin-like growth factors and insulin-like growth factor binding proteins in male diabetic rats in vivo and in vitro. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **33**(12): 1172-1179, 2006.

HAN J, JOGIE-BRAHIM S, HARADA A, OH Y: Insulin-like growth factor-binding protein-3 suppresses tumor growth via activation of caspase-dependent apoptosis and cross-talk with NF-kappaB signaling. *Cancer Lett* **307**(2): 200-210, 2011.

HANSEN I, TSALIKIAN E, BEAUFRERE B, GERICH J, HAYMOND M, RIZZA R: Insulin resistance in acromegaly: defects in both hepatic and extrahepatic insulin action. *Am J Physiol* **250**(3 Pt 1): E269-273, 1986.

HARRELA M, KOISTINEN H, KAPRIO J, LEHTOVIRTA M, TUOMILEHTO J, ERIKSSON J, TOIVANEN L, KOSKENVUO M, LEINONEN P, KOISTINEN R, SEPPALA M: Genetic and environmental components of interindividual variation in circulating levels of IGF-I, IGF-II, IGFBP-1, and IGFBP-3. *J Clin Invest* **98**(11): 2612-2615, 1996.

HATTORI N: Expression, regulation and biological actions of growth hormone (GH) and ghrelin in the immune system. *Growth Horm IGF Res* **19**(3): 187-197, 2009.

HAUSMAN GJ, RICHARDSON RL, SIMMEN FA: Expression of insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs) before and during the hormone sensitive period of adipose tissue development in the fetal pig. *Growth Dev Aging* **64**(1-2): 51-67, 2000.

HAUSMAN GJ, RICHARDSON RL, SIMMEN FA: Secretion of insulin-like growth factor (IGF)-I and -II and IGF binding proteins (IGFBPs) in fetal stromal-vascular (S-V) cell cultures obtained before and after the onset of adipogenesis in vivo. *Growth Dev Aging* **66**(1): 11-26, 2002.

HEALD AH, CRUICKSHANK JK, RISTE LK, CADE JE, ANDERSON S, GREENHALGH A, SAMPAYO J, TAYLOR W, FRASER W, WHITE A, GIBSON JM: Close relation of fasting insulin-like growth factor binding protein-1 (IGFBP-1) with glucose tolerance and cardiovascular risk in two populations. *Diabetologia* **44**(3): 333-339, 2001.

HEALD AH, KAUSHAL K, SIDDALS KW, RUDENSKI AS, ANDERSON SG, GIBSON JM: Insulin-like growth factor binding protein-2 (IGFBP-2) is a marker for the metabolic syndrome. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **114**(7): 371-376, 2006.

HERRINGTON J, CARTER-SU C: Signaling pathways activated by the growth hormone receptor. *Trends Endocrinol Metab* **12**(6): 252-257, 2001.

HERS I, BELL CJ, POOLE AW, JIANG D, DENTON RM, SCHAEFER E, TAVARE JM: Reciprocal feedback regulation of insulin receptor and insulin receptor substrate tyrosine phosphorylation by phosphoinositide 3-kinase in primary adipocytes. *Biochem J* **368**(Pt 3): 875-884, 2002.

HIGASHI Y, QUEVEDO HC, TIWARI S, SUKHANOV S, SHAI SY, ANWAR A, DELAFONTAINE P: Interaction between insulin-like growth factor-1 and atherosclerosis and vascular aging. *Front Horm Res* **43**: 107-124, 2014.

HILL DJ, HOGG J: Expression of insulin-like growth factors (IGFs) and their binding proteins (IGF BPs) during pancreatic development in rat, and modulation of IGF actions on rat islet DNA synthesis by IGF BPs. *Adv Exp Med Biol* **321**: 113-120; discussion 121-112, 1992.

HINTON PS, PETERSON CA, LO HC, YANG H, MCCARTHY D, NEY DM: Insulin-like growth factor-I enhances immune response in dexamethasone-treated or surgically stressed



rats maintained with total parenteral nutrition. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* **19**(6): 444-452, 1995.

HIOKI C, YOSHIDA T, KOGURE A, TAKAKURA Y, UMEKAWA T, YOSHIOKA K, SHIMATSU A, YOSHIKAWA T: Effects of growth hormone (GH) on mRNA levels of uncoupling proteins 1, 2, and 3 in brown and white adipose tissues and skeletal muscle in obese mice. *Horm Metab Res* **36**(9): 607-613, 2004.

HOEFLICH A, SCHMIDT P, FOLL J, ROTTMANN O, WEBER MM, KOLB HJ, PIRCHNER F, WOLF E: Altered growth of mice divergently selected for body weight is associated with complex changes in the growth hormone/insulin-like growth factor system. *Growth Horm IGF Res* **8**(2): 113-123, 1998.

HOEFLICH A, WU M, MOHAN S, FOLL J, WANKE R, FROEHLICH T, ARNOLD GJ, LAHM H, KOLB HJ, WOLF E: Overexpression of insulin-like growth factor-binding protein-2 in transgenic mice reduces postnatal body weight gain. *Endocrinology* **140**(12): 5488-5496, 1999.

HOENE M, WEIGERT C: The stress response of the liver to physical exercise. *Exerc Immunol Rev* **16**: 163-183, 2010.

HOFFLER U, HOBBIE K, WILSON R, BAI R, RAHMAN A, MALARKEY D, TRAVLOS G, GHANAYEM BI: Diet-induced obesity is associated with hyperleptinemia, hyperinsulinemia, hepatic steatosis, and glomerulopathy in C57Bl/6J mice. *Endocrine* **36**(2): 311-325, 2009.

HOCHBERG I, TRAN QT, BARKAN AL, SALTIEL AR, CHANDLER WF, BRIDGES D: Gene Expression Signature in Adipose Tissue of Acromegaly Patients. *PLoS One* **10**(6): e0129359, 2015.

HOLDAWAY IM, BOLLAND MJ, GAMBLE GD: A meta-analysis of the effect of lowering serum levels of GH and IGF-I on mortality in acromegaly. *Eur J Endocrinol* **159**(2): 89-95, 2008.

HOLDAWAY IM, RAJASOORYA RC, GAMBLE GD: Factors influencing mortality in acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab* **89**(2): 667-674, 2004.

HOOG A, SANDBERG-NORDQVIST AC, ABDEL-HALIM SM, CARLSSON-SKWIRUT C, GUENIFI A, TALLY M, OSTENSON CG, FALKMER S, SARA VR, EFENDIC S, SCHALLING M, GRIMELIUS L: Increased amounts of a high molecular weight insulin-like growth factor II (IGF-II) peptide and IGF-II messenger ribonucleic acid in pancreatic islets of diabetic Goto-Kakizaki rats. *Endocrinology* **137**(6): 2415-2423, 1996.

HORNEY MJ, SHIRLEY DW, KURTZ DT, ROSENZWEIG SA: Elevated glucose increases mesangial cell sensitivity to insulin-like growth factor I. *Am J Physiol* **274**(6 Pt 2): F1045-1053, 1998.

HOTAMISLIGIL GS: Inflammation and metabolic disorders. *Nature* **444**(7121): 860-867, 2006.

HOUSEKNECHT KL, PORTOCARRERO CP, JI S, LEMENAGER R, SPURLOCK ME: Growth hormone regulates leptin gene expression in bovine adipose tissue: correlation with adipose IGF-1 expression. *J Endocrinol* **164**(1): 51-57, 2000.

HOWARD JK, FLIER JS: Attenuation of leptin and insulin signaling by SOCS proteins. *Trends Endocrinol Metab* **17**(9): 365-371, 2006.

HUBER J, KIEFER FW, ZEYDA M, LUDVIK B, SILBERHUMER GR, PRAGER G, ZLABINGER GJ, STULNIG TM: CC chemokine and CC chemokine receptor profiles in visceral and subcutaneous adipose tissue are altered in human obesity. *J Clin Endocrinol Metab* **93**(8): 3215-3221, 2008.

CHAGPAR RB, LINKS PH, PASTOR MC, FURBER LA, HAWRYSH AD, CHAMBERLAIN MD, ANDERSON DH: Direct positive regulation of PTEN by the p85

subunit of phosphatidylinositol 3-kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(12): 5471-5476, 2010.

CHAN K, SPENCER EM: General aspects of insulin-like growth factor binding proteins. *Endocrine* **7**(1): 95-97, 1997.

CHAN SS, SCHEDLICH LJ, TWIGG SM, BAXTER RC: Inhibition of adipocyte differentiation by insulin-like growth factor-binding protein-3. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **296**(4): E654-663, 2009.

CHAN SS, TWIGG SM, FIRTH SM, BAXTER RC: Insulin-like growth factor binding protein-3 leads to insulin resistance in adipocytes. *J Clin Endocrinol Metab* **90**(12): 6588-6595, 2005.

CHAPPEL S: Growth hormone in immune reconstitution. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* **20**(5): 423-431, 1999.

CHATTERJEE C, SPARKS DL: Hepatic lipase, high density lipoproteins, and hypertriglyceridemia. *Am J Pathol* **178**(4): 1429-1433, 2011.

CHE W, LERNER-MARMAROSH N, HUANG Q, OSAWA M, OHTA S, YOSHIKUMI M, GLASSMAN M, LEE JD, YAN C, BERK BC, ABE J: Insulin-like growth factor-1 enhances inflammatory responses in endothelial cells: role of Gab1 and MEKK3 in TNF-alpha-induced c-Jun and NF-kappaB activation and adhesion molecule expression. *Circ Res* **90**(11): 1222-1230, 2002.

CHEN D, MAUVAIS-JARVIS F, BLUHER M, FISHER SJ, JOZSI A, GOODYEAR LJ, UEKI K, KAHN CR: p50alpha/p55alpha phosphoinositide 3-kinase knockout mice exhibit enhanced insulin sensitivity. *Mol Cell Biol* **24**(1): 320-329, 2004.

CHEN DY, STERN SA, GARCIA-OSTA A, SAUNIER-REBORI B, POLLONINI G, BAMBAH-MUKKU D, BLITZER RD, ALBERINI CM: A critical role for IGF-II in memory consolidation and enhancement. *Nature* **469**(7331): 491-497, 2011.

CHEN JW, HOJLUND K, BECK-NIELSEN H, SANDAHL CHRISTIANSEN J, ORSKOV H, FRYSTYK J: Free rather than total circulating insulin-like growth factor-I determines the feedback on growth hormone release in normal subjects. *J Clin Endocrinol Metab* **90**(1): 366-371, 2005.

CHEN JW, NIELSEN MF, CAUMO A, VILSTRUP H, CHRISTIANSEN JS, FRYSTYK J: Changes in bioactive IGF-I and IGF-binding protein-1 during an oral glucose tolerance test in patients with liver cirrhosis. *Eur J Endocrinol* **155**(2): 285-292, 2006.

CHEN NX, HAUSMAN GJ, WRIGHT JT: Influence of age and fetal hypophysectomy on porcine preadipocytes: insulin-like growth factor-I (IGF-I) response, receptor binding and IGF binding proteins secretion. *Growth Dev Aging* **59**(4): 193-206, 1995.

CHEN NX, HAUSMAN GJ, WRIGHT JT: Hormonal regulation of insulin-like growth factor binding proteins and insulin-like growth factor I (IGF-I) secretion in porcine stromal-vascular cultures. *J Anim Sci* **74**(10): 2369-2375, 1996.

CHEN NY, CHEN WY, KOPCHICK JJ: Liver and kidney growth hormone (GH) receptors are regulated differently in diabetic GH and GH antagonist transgenic mice. *Endocrinology* **138**(5): 1988-1994, 1997.

CHEN Y, BIADA J, SOOD S, RABKIN R: Uremia attenuates growth hormone-stimulated insulin-like growth factor-1 expression, a process worsened by inflammation. *Kidney Int* **78**(1): 89-95, 2010.

CHEN Y, LIN G, HUO JS, BARNEY D, WANG Z, LIVSHIZ T, STATES DJ, QIN ZS, SCHWARTZ J: A Computational and functional analysis of growth hormone (GH)-regulated genes identifies the transcriptional repressor B-cell lymphoma 6 (Bcl6) as a participant in GH-regulated transcription. *Endocrinology* **150**(8): 3645-3654, 2009.

CHISTIAKOV DA, NIKITIN AG, SMETANINA SA, BEL'CHIKOVA LN, SUPLOTOVA LA, SHESTAKOVA MV, NOSIKOV VV: The rs11705701 G>A polymorphism of IGF2BP2

is associated with IGF2BP2 mRNA and protein levels in the visceral adipose tissue - a link to type 2 diabetes susceptibility. *Rev Diabet Stud* **9**(2-3): 112-122, 2012.

CHO Y, ARIGA M, UCHIJIMA Y, KIMURA K, RHO JY, FURUHATA Y, HAKUNO F, YAMANOUCI K, NISHIHARA M, TAKAHASHI S: The novel roles of liver for compensation of insulin resistance in human growth hormone transgenic rats. *Endocrinology* **147**(11): 5374-5384, 2006.

IBÁÑEZ L L-BA, DÍAZ M, JARAMILLO A, MARÍN S, DE ZEGHER F.: Growth hormone therapy in short children born small for gestational age: effects on abdominal fat partitioning and circulating follistatin and high-molecular-weight adiponectin. *J Clin Endocrinol Metab.* **95**(5): 2234-2239, 2010 May.

IIDA K, DEL RINCON JP, KIM DS, ITOH E, NASS R, COSCHIGANO KT, KOPCHICK JJ, THORNER MO: Tissue-specific regulation of growth hormone (GH) receptor and insulin-like growth factor-I gene expression in the pituitary and liver of GH-deficient (lit/lit) mice and transgenic mice that overexpress bovine GH (bGH) or a bGH antagonist. *Endocrinology* **145**(4): 1564-1570, 2004.

IKEZOE T, TANOSAKI S, KRUG U, LIU B, COHEN P, TAGUCHI H, KOEFFLER HP: Insulin-like growth factor binding protein-3 antagonizes the effects of retinoids in myeloid leukemia cells. *Blood* **104**(1): 237-242, 2004.

INGERMANN AR, YANG YF, HAN J, MIKAMI A, GARZA AE, MOHANRAJ L, FAN L, IDOWU M, WARE JL, KIM HS, LEE DY, OH Y: Identification of a novel cell death receptor mediating IGFBP-3-induced anti-tumor effects in breast and prostate cancer. *J Biol Chem* **285**(39): 30233-30246, 2010.

INUKAI K, FUNAKI M, OGIHARA T, KATAGIRI H, KANDA A, ANAI M, FUKUSHIMA Y, HOSAKA T, SUZUKI M, SHIN BC, TAKATA K, YAZAKI Y, KIKUCHI M, OKA Y, ASANO T: p85alpha gene generates three isoforms of regulatory subunit for phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-Kinase), p50alpha, p55alpha, and p85alpha, with different PI 3-kinase activity elevating responses to insulin. *J Biol Chem* **272**(12): 7873-7882, 1997.

ISHIZUKA T, KLEPCZYK P, LIU S, PANKO L, LIU S, GIBBS EM, FRIEDMAN JE: Effects of overexpression of human GLUT4 gene on maternal diabetes and fetal growth in spontaneous gestational diabetic C57BLKS/J Lepr(db/+) mice. *Diabetes* **48**(5): 1061-1069, 1999.

ISLEY WL, UNDERWOOD LE, CLEMMONS DR: Dietary components that regulate serum somatomedin-C concentrations in humans. *J Clin Invest* **71**(2): 175-182, 1983.

J. M: Hypofyzární adenomy-kam směřuje léčba na počátku 21.století? *Vnitř Lek* **56**(7): 690-694, 2010.

JD N: Acromegaly. *Clin Endocrinol (Oxf)* **26**: 481-512, 1987.

JENSEN CB, MARTIN-GRONERT MS, STORGAARD H, MADSBAD S, VAAG A, OZANNE SE: Altered PI3-kinase/Akt signalling in skeletal muscle of young men with low birth weight. *PLoS One* **3**(11): e3738, 2008.

JENSEN MD: Role of body fat distribution and the metabolic complications of obesity. *J Clin Endocrinol Metab* **93**(11 Suppl 1): S57-63, 2008.

JERNSTROM H, DEAL C, WILKIN F, CHU W, TAO Y, MAJEED N, HUDSON T, NAROD SA, POLLAK M: Genetic and nongenetic factors associated with variation of plasma levels of insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-binding protein-3 in healthy premenopausal women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **10**(4): 377-384, 2001.

JEZKOVA J, MAREK J, HANA V, KRSEK M, WEISS V, VLADYKA V, LISAK R, VYMAZAL J, PECEN L: Gamma knife radiosurgery for acromegaly--long-term experience. *Clin Endocrinol (Oxf)* **64**(5): 588-595, 2006.

JOHANSEN T, LAURINO C, BARRECA A, MALMLOF K: Reduction of adiposity with prolonged growth hormone treatment in old obese rats: effects on glucose handling and early insulin signaling. *Growth Horm IGF Res* **15**(1): 55-63, 2005.

JORGENSEN JO, JESSEN N, PEDERSEN SB, VESTERGAARD E, GORMSEN L, LUND SA, BILLESTRUP N: GH receptor signaling in skeletal muscle and adipose tissue in human subjects following exposure to an intravenous GH bolus. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **291**(5): E899-905, 2006.

JOSHI RL, LAMOTHE B, CORDONNIER N, MESBAH K, MONTHIOUX E, JAMI J, BUCCHINI D: Targeted disruption of the insulin receptor gene in the mouse results in neonatal lethality. *EMBO J* **15**(7): 1542-1547, 1996.

JUUL A: Serum levels of insulin-like growth factor I and its binding proteins in health and disease. *Growth Horm IGF Res* **13**(4): 113-170, 2003.

KAJI H, OHASHI S, ABE H, CHIHARA K: Regulation of the growth hormone (GH) receptor and GH-binding protein mRNA. *Proc Soc Exp Biol Med* **206**(3): 257-262, 1994.

KALME T, SEPPALA M, QIAO Q, KOISTINEN R, NISSINEN A, HARRELA M, LOUKOVAARA M, LEINONEN P, TUOMILEHTO J: Sex hormone-binding globulin and insulin-like growth factor-binding protein-1 as indicators of metabolic syndrome, cardiovascular risk, and mortality in elderly men. *J Clin Endocrinol Metab* **90**(3): 1550-1556, 2005.

KAMEL A, MARGERY V, NORSTEDT G, THOREN M, LINDGREN AC, BRONNEGARD M, MARCUS C: Growth hormone (GH) treatment up-regulates GH receptor mRNA levels in adipocytes from patients with GH deficiency and Prader-Willi syndrome. *Pediatr Res* **38**(3): 418-421, 1995.

KAMEL A, NORGREN S, LINDGREN AC, LUTHMAN H, ARNER P, MARCUS C: Effect of growth hormone treatment on insulin action in adipocytes from children with Prader-Willi syndrome. *Eur J Endocrinol* **138**(5): 510-516, 1998.

KAMPMAN KA, RAMSAY TG, WHITE ME: Developmental changes in hepatic IGF-2 and IGFBP-2 mRNA levels in intrauterine growth-retarded and control swine. *Comp Biochem Physiol B* **104**(2): 415-421, 1993.

KANG HM, PARK S, KIM H: Insulin-like growth factor 2 enhances insulinogenic differentiation of human eyelid adipose stem cells via the insulin receptor. *Cell Prolif* **44**(3): 254-263, 2011.

KARNEVI E, SAID K, ANDERSSON R, ROSENDAHL AH: Metformin-mediated growth inhibition involves suppression of the IGF-I receptor signalling pathway in human pancreatic cancer cells. *BMC Cancer* **13**: 235, 2013.

KATSANOS KH, TSATSOULIS A, CHRISTODOULOU D, CHALLA A, KATSARAKI A, TSIANOS EV: Reduced serum insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and IGF-binding protein-3 levels in adults with inflammatory bowel disease. *Growth Horm IGF Res* **11**(6): 364-367, 2001.

KATZNELSON L: Alterations in body composition in acromegaly. *Pituitary* **12**(2): 136-142, 2009.

KEATING GM: Mecasermin. *BioDrugs* **22**(3): 177-188, 2008.

KELLEY KW, WEIGENT DA, KOOIJMAN R: Protein hormones and immunity. *Brain Behav Immun* **21**(4): 384-392, 2007.

KEROUZ NJ, HORSCH D, PONS S, KAHN CR: Differential regulation of insulin receptor substrates-1 and -2 (IRS-1 and IRS-2) and phosphatidylinositol 3-kinase isoforms in liver and muscle of the obese diabetic (ob/ob) mouse. *J Clin Invest* **100**(12): 3164-3172, 1997.

KHALFALLAH Y, SASSOLAS G, BORSON-CHAZOT F, VEGA N, VIDAL H: Expression of insulin target genes in skeletal muscle and adipose tissue in adult patients with growth

hormone deficiency: effect of one year recombinant human growth hormone therapy. *J Endocrinol* **171**(2): 285-292, 2001.

KIELCZEWSKI JL, HU P, SHAW LC, LI CALZI S, MAMES RN, GARDINER TA, MCFARLAND E, CHAN-LING T, GRANT MB: Novel protective properties of IGFBP-3 result in enhanced pericyte ensheathment, reduced microglial activation, increased microglial apoptosis, and neuronal protection after ischemic retinal injury. *Am J Pathol* **178**(4): 1517-1528, 2011.

KIESS W BO: Specific growth hormone receptors on human peripheral mononuclear cells: reexpression, identification, and characterization. *J Clin Endocrinol Metab* **60**: 740-746, 1985 Apr.

KIM HS, ALI O., SHIM, M., LEE, K. W., VUGUIN, P., MUZUMDAR, R., BARZILAI, N., COHEN, P.: Insulin-like growth factor binding protein-3 induces insulin resistance in adipocytes in vitro and in rats in vivo. *Pediatr Res* **61**(2): 159-164, 2007.

KIM CH1 PP, ZHAO H, YAKAR S, KAUFMAN JB, IGANAKI K, SHILOACH J, SCHERER PE, QUON MJ, LEROITH D.: MKR mice are resistant to the metabolic actions of both insulin and adiponectin: discordance between insulin resistance and adiponectin responsiveness. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **291**(2): E298-305, 2006.

KIM JW, RHOADS RP, SEGOALE N, KRISTENSEN NB, BAUMAN DE, BOISCLAIR YR: Isolation of the cDNA encoding the acid labile subunit (ALS) of the 150 kDa IGF-binding protein complex in cattle and ALS regulation during the transition from pregnancy to lactation. *J Endocrinol* **189**(3): 583-593, 2006.

KIM RJ, VAGHANI S, ZIFCHAK LM, QUINN JH, HE W, TEBAS P, FRANK I: In vitro and in vivo effects of IGF-I on adiposity in HIV-associated metabolic disease: a pilot study. *Arch Med Res* **44**(5): 361-369, 2013.

KLOTING N, KOCH L, WUNDERLICH T, KERN M, RUSCHKE K, KRONE W, BRUNING JC, BLUHER M: Autocrine IGF-1 action in adipocytes controls systemic IGF-1 concentrations and growth. *Diabetes* **57**(8): 2074-2082, 2008.

KLUGE A, ZIMMERMANN R, WEIHRAUCH D, MOHRI M, SACK S, SCHAPER J, SCHAPER W: Coordinate expression of the insulin-like growth factor system after microembolisation in porcine heart. *Cardiovasc Res* **33**(2): 324-331, 1997.

KOISTINEN H, KOISTINEN R, SELENIUS L, YLIKORKALA Q, SEPPALA M: Effect of marathon run on serum IGF-I and IGF-binding protein 1 and 3 levels. *J Appl Physiol (1985)* **80**(3): 760-764, 1996.

KOLYCHEV AP: [The structural organization of binding determinants in insulin-like growth factor-I (IGF-I) molecule]. *Zh Evol Biokhim Fiziol* **46**(1): 74-94, 2010.

KOOIJMAN R, COPPENS A, HOOGHE-PETERS E: IGF-I inhibits spontaneous apoptosis in human granulocytes. *Endocrinology* **143**(4): 1206-1212, 2002.

KOOIJMAN R, HOOGHE-PETERS EL, HOOGHE R: Prolactin, growth hormone, and insulin-like growth factor-I in the immune system. *Adv Immunol* **63**: 377-454, 1996.

KOOIJMAN R, WILLEMS M, DE HAAS CJ, RIJKERS GT, SCHUURMANS AL, VAN BUUL-OFFERS SC, HEIJNEN CJ, ZEGERS BJ: Expression of type I insulin-like growth factor receptors on human peripheral blood mononuclear cells. *Endocrinology* **131**(5): 2244-2250, 1992.

KOOIJMAN R, WILLEMS M, RIJKERS GT, BRINKMAN A, VAN BUUL-OFFERS SC, HEIJNEN CJ, ZEGERS BJ: B-Effects of insulin-like growth factors and growth hormone on the in vitro proliferation of T lymphocytes. *J Neuroimmunol* **38**(1-2): 95-104, 1992.

KRSEK M: Akromegalie a gigantismus. *Postgrad Med* **4**: 360-372, 2011.

KRSEK M: Akromegalie a medikamentózní léčba-editorial. *Vnitr Lek*, 2015.

KRSEK M, SKRHA J, SUCHARDA P, JUSTOVA V, LACINOVA Z: [Changes in IGF-I levels and its binding proteins in diabetes mellitus and obesity]. *Cas Lek Cesk* **142**(4): 216-219, 2003.

KUBOTA Y, UNOKI H, BUJO H, RIKIHISA N, UDAGAWA A, YOSHIMOTO S, ICHINOSE M, SAITO Y: Low-dose GH supplementation reduces the TLR2 and TNF-alpha expressions in visceral fat. *Biochem Biophys Res Commun* **368**(1): 81-87, 2008.

KUEMMERLE JF: IGF-I elicits growth of human intestinal smooth muscle cells by activation of PI3K, PDK-1, and p70S6 kinase. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **284**(3): G411-422, 2003.

KULKARNI RN: B Receptors for insulin and insulin-like growth factor-1 and insulin receptor substrate-1 mediate pathways that regulate islet function. *Biochem Soc Trans* **30**(2): 317-322, 2002.

KULKARNI RN, HOLZENBERGER M, SHIH DQ, OZCAN U, STOFFEL M, MAGNUSON MA, KAHN CR: A beta-cell-specific deletion of the Igf1 receptor leads to hyperinsulinemia and glucose intolerance but does not alter beta-cell mass. *Nat Genet* **31**(1): 111-115, 2002.

KUMAR PA, CHITRA PS, LU C, SOBHANADITYA J, MENON R: Growth hormone (GH) differentially regulates NF-kB activity in preadipocytes and macrophages: implications for GH's role in adipose tissue homeostasis in obesity. *J Physiol Biochem* **70**(2): 433-440, 2014.

KUO T, LEW MJ, MAYBA O, HARRIS CA, SPEED TP, WANG JC: Genome-wide analysis of glucocorticoid receptor-binding sites in myotubes identifies gene networks modulating insulin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(28): 11160-11165, 2012.

KURABAYASHI A, KAKINUMA Y, MORITA T, INOUE K, SATO T, FURIHATA M: Conditional VHL gene deletion causes hypoglycemic death associated with disproportionately increased glucose uptake by hepatocytes through an upregulated IGF-I receptor. *PLoS One* **8**(7): e69139, 2013.

KURKI E, SHI J, MARTONEN E, FINCKENBERG P, MERVAALA E: Distinct effects of calorie restriction on adipose tissue cytokine and angiogenesis profiles in obese and lean mice. *Nutr Metab (Lond)* **9**(1): 64, 2012.

LACASA D, TALEB S, KEOPHIPHATH M, MIRANVILLE A, CLEMENT K: Macrophage-secreted factors impair human adipogenesis: involvement of proinflammatory state in preadipocytes. *Endocrinology* **148**(2): 868-877, 2007.

LAM CS, CHEN MH, LACEY SM, YANG Q, SULLIVAN LM, XANTHAKIS V, SAFA R, SMITH HM, PENG X, SAWYER DB, VASAN RS: Circulating insulin-like growth factor-1 and its binding protein-3: metabolic and genetic correlates in the community. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **30**(7): 1479-1484, 2010.

LAMBERTS SW, ZWEENS M, VERSCHOOR L, DEL POZO E: A comparison among the growth hormone-lowering effects in acromegaly of the somatostatin analog SMS 201-995, bromocriptine, and the combination of both drugs. *J Clin Endocrinol Metab* **63**(1): 16-19, 1986.

LANDAU D, SEGEV Y, ESHET R, FLYVBJERG A, PHILLIP M: Changes in the growth hormone-IGF-I axis in non-obese diabetic mice. *Int J Exp Diabetes Res* **1**(1): 9-18, 2000.

LANG CH, VARY TC, FROST RA: Acute in vivo elevation of insulin-like growth factor (IGF) binding protein-1 decreases plasma free IGF-I and muscle protein synthesis. *Endocrinology* **144**(9): 3922-3933, 2003.

LARON Z: Insulin-like growth factor 1 (IGF-1): a growth hormone. *Mol Pathol* **54**(5): 311-316, 2001.

LARON Z, GINSBERG S, LILOS P, ARBIV M, VAISMAN N: Long-term IGF-I treatment of children with Laron syndrome increases adiposity. *Growth Horm IGF Res* **16**(1): 61-64, 2006.

LARON Z, KLINGER B: Body fat in Laron syndrome patients: effect of insulin-like growth factor I treatment. *Horm Res* **40**(1-3): 16-22, 1993.

LAU JC, KROES RA, MOSKAL JR, LINSSENMEIER RA: Diabetes changes expression of genes related to glutamate neurotransmission and transport in the Long-Evans rat retina. *Mol Vis* **19**: 1538-1553, 2013.

LAUGHLIN GA, BARRETT-CONNOR E, CRIQUI MH, KRITZ-SILVERSTEIN D: The prospective association of serum insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF-binding protein-1 levels with all cause and cardiovascular disease mortality in older adults: the Rancho Bernardo Study. *J Clin Endocrinol Metab* **89**(1): 114-120, 2004.

LAW HK, TU W, LIU E, LAU YL: Insulin-like growth factor I promotes cord blood T cell maturation through monocytes and inhibits their apoptosis in part through interleukin-6. *BMC Immunol* **9**: 74, 2008.

LE ROITH D: Seminars in medicine of the Beth Israel Deaconess Medical Center. Insulin-like growth factors. *N Engl J Med* **336**(9): 633-640, 1997.

LEE PD, CONOVER CA, POWELL DR: Regulation and function of insulin-like growth factor-binding protein-1. *Proc Soc Exp Biol Med* **204**(1): 4-29, 1993.

LEE PD, GIUDICE LC, CONOVER CA, POWELL DR: Insulin-like growth factor binding protein-1: recent findings and new directions. *Proc Soc Exp Biol Med* **216**(3): 319-357, 1997.

LEFAI E, ROQUES M, VEGA N, LAVILLE M, VIDAL H: Expression of the splice variants of the p85alpha regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase in muscle and adipose tissue of healthy subjects and type 2 diabetic patients. *Biochem J* **360**(Pt 1): 117-126, 2001.

LELBACH A, MUZES G, FEHER J: The insulin-like growth factor system: IGFs, IGF-binding proteins and IGFBP-proteases. *Acta Physiol Hung* **92**(2): 97-107, 2005.

LEMMEY AB, GLASSFORD J, FLICK-SMITH HC, HOLLY JM, PELL JM: Differential regulation of tissue insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP)-3, IGF-I and IGF type 1 receptor mRNA levels, and serum IGF-I and IGFBP concentrations by growth hormone and IGF-I. *J Endocrinol* **154**(2): 319-328, 1997.

LERARIO AC, EL-ANDERE W, WAJCHENBERG BL, OHNUMA LY, ROCHA MH, ANDRIOLO A: Insulin resistance in acromegaly: evaluation by studies of insulin binding to erythrocytes. *J Endocrinol Invest* **12**(3): 155-161, 1989.

LEROITH D, SAMPSON PC, ROBERTS CT, JR.: How does the mitogenic insulin-like growth factor I receptor differ from the metabolic insulin receptor? *Horm Res* **41 Suppl 2**: 74-78; discussion 79, 1994.

LEROITH D, YAKAR S: Mechanisms of disease: metabolic effects of growth hormone and insulin-like growth factor 1. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* **3**(3): 302-310, 2007.

LEUNG KC, DOYLE N, BALLESTEROS M, WATERS MJ, HO KK: Insulin regulation of human hepatic growth hormone receptors: divergent effects on biosynthesis and surface translocation. *J Clin Endocrinol Metab* **85**(12): 4712-4720, 2000.

LI Q, BREAT B, CZERNICHOW P: [Effects of fasting on expression of insulin-like growth factor-I and IGF binding protein-1 genes in the liver of rats]. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi* **33**(5): 289-291, 1999.

LI X, WU X, CAMACHO R, SCHWARTZ GJ, LEROITH D: Intracerebroventricular leptin infusion improves glucose homeostasis in lean type 2 diabetic MKR mice via hepatic vagal and non-vagal mechanisms. *PLoS One* **6**(2): e17058, 2011.

LI Y, KNAPP JR, KOPCHICK JJ: Enlargement of interscapular brown adipose tissue in growth hormone antagonist transgenic and in growth hormone receptor gene-disrupted dwarf mice. *Exp Biol Med (Maywood)* **228**(2): 207-215, 2003.

LI Z, PICARD F: Modulation of IGFBP2 mRNA expression in white adipose tissue upon aging and obesity. *Horm Metab Res* **42**(11): 787-791, 2010.

LI ZR, HROMCHAK R, MUDIPALLI A, BLOCH A: Tumor suppressor proteins as regulators of cell differentiation. *Cancer Res* **58**(19): 4282-4287, 1998.

LIANG SB, YANG XZ, TRIEU Y, LI Z, ZIVE J, LEUNG-HAGESTEIJN C, WEI E, ZOZULYA S, COSS CC, DALTON JT, FANTUS IG, TRUDEL S: Molecular target characterization and antimyeloma activity of the novel, insulin-like growth factor 1 receptor inhibitor, GTx-134. *Clin Cancer Res* **17**(14): 4693-4704, 2011.

LIAO L, DEARTH RK, ZHOU S, BRITTON OL, LEE AV, XU J: Liver-specific overexpression of the insulin-like growth factor-I enhances somatic growth and partially prevents the effects of growth hormone deficiency. *Endocrinology* **147**(8): 3877-3888, 2006.

LIM L, SPENCER SA, MCKAY P, WATERS MJ: Regulation of growth hormone (GH) bioactivity by a recombinant human GH-binding protein. *Endocrinology* **127**(3): 1287-1291, 1990.

LIN E, WEXLER TL, NACHTIGALL L, TRITOS N, SWEARINGEN B, HEMPHILL L, LOEFFLER J, BILLER BM, KLIBANSKI A, MILLER KK: Effects of growth hormone deficiency on body composition and biomarkers of cardiovascular risk after definitive therapy for acromegaly. *Clin Endocrinol (Oxf)* **77**(3): 430-438, 2012.

LINDGREN BF, ISAKSSON M, STERN I, HALL K: Insulin-like growth factor binding protein-1 from Hep G2 cells is potently inhibited by the truncated IGF-I analogue des-(1-3) IGF-I. *Acta Endocrinol (Copenh)* **128**(1): 81-87, 1993.

LIST EO, BERRYMAN DE, FUNK K, GOSNEY ES, JARA A, KELDER B, WANG X, KUTZ L, TROIKE K, LOZIER N, MIKULA V, LUBBERS ER, ZHANG H, VESEL C, JUNNILA RK, FRANK SJ, MASTERNAK MM, BARTKE A, KOPCHICK JJ: The role of GH in adipose tissue: lessons from adipose-specific GH receptor gene-disrupted mice. *Mol Endocrinol* **27**(3): 524-535, 2013.

LIST EO, BERRYMAN DE, FUNK K, JARA A, KELDER B, WANG F, STOUT MB, ZHI X, SUN L, WHITE TA, LEBRASSEUR NK, PIRTSKHALAVA T, TCHKONIA T, JENSEN EA, ZHANG W, MASTERNAK MM, KIRKLAND JL, MILLER RA, BARTKE A, KOPCHICK JJ: Liver-specific GH receptor gene-disrupted (LiGHRKO) mice have decreased endocrine IGF-I, increased local IGF-I, and altered body size, body composition, and adipokine profiles. *Endocrinology* **155**(5): 1793-1805, 2014.

LIST EO, SACKMANN-SALA L, BERRYMAN DE, FUNK K, KELDER B, GOSNEY ES, OKADA S, DING J, CRUZ-TOPETE D, KOPCHICK JJ: Endocrine parameters and phenotypes of the growth hormone receptor gene disrupted (GHR<sup>-/-</sup>) mouse. *Endocr Rev* **32**(3): 356-386, 2011.

LIU JL: Does IGF-I stimulate pancreatic islet cell growth? *Cell Biochem Biophys* **48**(2-3): 115-125, 2007.

LIU JP, BAKER J, PERKINS AS, ROBERTSON EJ, EFSTRATIADIS A: Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell* **75**(1): 59-72, 1993.

LIVINGSTONE C: IGF2 and cancer. *Endocr Relat Cancer* **20**(6): R321-339, 2013.

LJUNGBERG A, LINDEN D, AMEEN C, BERGSTROM G, OSCARSSON J: Importance of PPAR alpha for the effects of growth hormone on hepatic lipid and lipoprotein metabolism. *Growth Horm IGF Res* **17**(2): 154-164, 2007.

LOHR J, GROTEVENDT A, NAUCK M, VOLZKE H, WALLASCHOFSKI H, FRIEDRICH N: Relation of insulin-like growth factor-I and IGF binding protein 3 with markers of inflammation: results of a population-based study. *Clin Endocrinol (Oxf)* **80**(1): 148-154, 2014.

LONNROTH P, ASSMUNDSSON K, EDEN S, ENBERG G, GAUSE I, HALL K, SMITH U: Regulation of insulin-like growth factor II receptors by growth hormone and insulin in rat adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(11): 3619-3622, 1987.



LOPEZ-CALDERON A, SOTO L, MARTIN AI: Chronic inflammation inhibits GH secretion and alters the serum insulin-like growth factor system in rats. *Life Sci* **65**(20): 2049-2060, 1999.

LORENZO M, VALVERDE AM, TERUEL T, BENITO M: IGF-I is a mitogen involved in differentiation-related gene expression in fetal rat brown adipocytes. *J Cell Biol* **123**(6 Pt 1): 1567-1575, 1993.

LOUVEAU I, GONDRET F: GH and insulin affect fatty acid synthase activity in isolated porcine adipocytes in culture without any modifications of sterol regulatory element binding protein-1 expression. *J Endocrinol* **181**(2): 271-280, 2004.

LOUVEAU I, GONDRET F: Regulation of development and metabolism of adipose tissue by growth hormone and the insulin-like growth factor system. *Domest Anim Endocrinol* **27**(3): 241-255, 2004.

LU C, KUMAR PA, FAN Y, SPERLING MA, MENON RK: A novel effect of growth hormone on macrophage modulates macrophage-dependent adipocyte differentiation. *Endocrinology* **151**(5): 2189-2199, 2010.

LU C, KUMAR PA, SUN J, AGGARWAL A, FAN Y, SPERLING MA, LUMENG CN, MENON RK: Targeted deletion of growth hormone (GH) receptor in macrophage reveals novel osteopontin-mediated effects of GH on glucose homeostasis and insulin sensitivity in diet-induced obesity. *J Biol Chem* **288**(22): 15725-15735, 2013.

LU Y, HERRERA PL, GUO Y, SUN D, TANG Z, LEROITH D, LIU JL: Pancreatic-specific inactivation of IGF-I gene causes enlarged pancreatic islets and significant resistance to diabetes. *Diabetes* **53**(12): 3131-3141, 2004.

LUNDE JORGENSEN JO, KRARUP HANSEN T, SANDAHL CHRISTIANSEN J (2000). Normal Physiology of Growth Hormone in Adults. *Endotext*. L. J. De Groot, P. Beck-Peccoz, G. Chrousos *et al.* South Dartmouth (MA).

LUO J, FIELD SJ, LEE JY, ENGELMAN JA, CANTLEY LC: The p85 regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase down-regulates IRS-1 signaling via the formation of a sequestration complex. *J Cell Biol* **170**(3): 455-464, 2005.

LUO J, MURPHY LJ: Differential expression of the insulin-like growth factor binding proteins in spontaneously diabetic rats. *J Mol Endocrinol* **8**(2): 155-163, 1992.

LUO J, SOBKIW CL, HIRSHMAN MF, LOGSDON MN, LI TQ, GOODYEAR LJ, CANTLEY LC: Loss of class IA PI3K signaling in muscle leads to impaired muscle growth, insulin response, and hyperlipidemia. *Cell Metab* **3**(5): 355-366, 2006.

LUO JM, MURPHY LJ: Differential expression of insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding protein-1 in the diabetic rat. *Mol Cell Biochem* **103**(1): 41-50, 1991.

M S: *Vnitřní lékařství. Grada: Praha 2011, ISBN 978-80-247-2110-1* **2**, 2011.

MAITER D, WALKER JL, ADAM E, MOATSSTAATS B, MULUMBA N, KETELSLEGGERS JM, UNDERWOOD LE: Differential regulation by growth hormone (GH) of insulin-like growth factor I and GH receptor/binding protein gene expression in rat liver. *Endocrinology* **130**(6): 3257-3264, 1992.

MAREK J: Současné možnosti a perspektivy léčby akromegalie. *Cas Lek Cesk* **153**(3): 131-136, 2014.

MARTYN JA, KANEKI M, YASUHARA S: Obesity-induced insulin resistance and hyperglycemia: etiologic factors and molecular mechanisms. *Anesthesiology* **109**(1): 137-148, 2008.

MASTERNAK MM, AL-REGAIEY KA, DEL ROSARIO LIM MM, JIMENEZ-ORTEGA V, PANICI JA, BONKOWSKI MS, BARTKE A: Effects of caloric restriction on insulin pathway gene expression in the skeletal muscle and liver of normal and long-lived GHR-KO mice. *Exp Gerontol* **40**(8-9): 679-684, 2005.

MASTERNAK MM, BARTKE A: Growth hormone, inflammation and aging. *Pathobiol Aging Age Relat Dis* **2**, 2012.

MASTERNAK MM, BARTKE A, WANG F, SPONG A, GESING A, FANG Y, SALMON AB, HUGHES LF, LIBERATI T, BOPARAI R, KOPCHICK JJ, WESTBROOK R: Metabolic effects of intra-abdominal fat in GHRKO mice. *Aging Cell* **11**(1): 73-81, 2012.

MATTERI RL, DYER CJ, TOUCHETTE KJ, CARROLL JA, ALLEE GL: Effects of weaning on somatotrophic gene expression and circulating levels of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and IGF-2 in pigs. *Domest Anim Endocrinol* **19**(4): 247-259, 2000.

MATTHEWS DR, HOSKER JP, RUDENSKI AS, NAYLOR BA, TREACHER DF, TURNER RC: Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* **28**(7): 412-419, 1985.

MAURAS N, HAYMOND MW: Are the metabolic effects of GH and IGF-I separable? *Growth Horm IGF Res* **15**(1): 19-27, 2005.

MAUVAIS-JARVIS F, UEKI K, FRUMAN DA, HIRSHMAN MF, SAKAMOTO K, GOODYEAR LJ, IANNAcone M, ACCILI D, CANTLEY LC, KAHN CR: Reduced expression of the murine p85alpha subunit of phosphoinositide 3-kinase improves insulin signaling and ameliorates diabetes. *J Clin Invest* **109**(1): 141-149, 2002.

MAVROPOULOS JC, BUSCHEMEYER WC, 3RD, TEWARI AK, ROKHFELD D, POLLAK M, ZHAO Y, FEBBO PG, COHEN P, HWANG D, DEVI G, DEMARK-WAHNEFRIED W, WESTMAN EC, PETERSON BL, PIZZO SV, FREEDLAND SJ: The effects of varying dietary carbohydrate and fat content on survival in a murine LNCaP prostate cancer xenograft model. *Cancer Prev Res (Phila)* **2**(6): 557-565, 2009.

MCCANN JP, LOO SC, AALSETH DL, ABRIBAT T: Differential effects of GH stimulation on fasting and prandial metabolism and plasma IGFs and IGF-binding proteins in lean and obese sheep. *J Endocrinol* **154**(2): 329-346, 1997.

MCCURDY CE, SCHENK S, HOLLIDAY MJ, PHILP A, HOUCK JA, PATSOURIS D, MACLEAN PS, MAJKA SM, KLEMM DJ, FRIEDMAN JE: Attenuated Pik3r1 expression prevents insulin resistance and adipose tissue macrophage accumulation in diet-induced obese mice. *Diabetes* **61**(10): 2495-2505, 2012.

MELMED S: Acromegaly pathogenesis and treatment. *J Clin Invest* **119**(11): 3189-3202, 2009.

MENON RK, STEPHAN DA, RAO RH, SHEN-ORR Z, DOWNS LS, JR., ROBERTS CT, JR., LEROITH D, SPERLING MA: Tissue-specific regulation of the growth hormone receptor gene in streptozocin-induced diabetes in the rat. *J Endocrinol* **142**(3): 453-462, 1994.

MERCADO M, MOLITCH ME, BAUMANN G: Low plasma growth hormone binding protein in IDDM. *Diabetes* **41**(5): 605-609, 1992.

MERCHAV S, TATARSKY I, HOCHBERG Z: Enhancement of human granulopoiesis in vitro by biosynthetic insulin-like growth factor I/somatomedin C and human growth hormone. *J Clin Invest* **81**(3): 791-797, 1988.

MESOTTEN D, DELHANTY PJ, VANDERHOYDONC F, HARDMAN KV, WEEKERS F, BAXTER RC, VAN DEN BERGHE G: Regulation of insulin-like growth factor binding protein-1 during protracted critical illness. *J Clin Endocrinol Metab* **87**(12): 5516-5523, 2002.

MIYAKAWA M, TSUSHIMA T, MURAKAMI H, ISOZAKI O, DEMURA H, TANAKA T: Effect of growth hormone (GH) on serum concentrations of leptin: study in patients with acromegaly and GH deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* **83**(10): 3476-3479, 1998.

MOHANRAJ L, KIM HS, LI W, CAI Q, KIM KE, SHIN HJ, LEE YJ, LEE WJ, KIM JH, OH Y: IGFBP-3 inhibits cytokine-induced insulin resistance and early manifestations of atherosclerosis. *PLoS One* **8**(1): e55084, 2013.

MOLLER L, DALMAN L, NORRELUND H, BILLESTRUP N, FRYSTYK J, MOLLER N, JORGENSEN JO: Impact of fasting on growth hormone signaling and action in muscle and fat. *J Clin Endocrinol Metab* **94**(3): 965-972, 2009.

MOLLER N, JORGENSEN JO: Effects of growth hormone on glucose, lipid, and protein metabolism in human subjects. *Endocr Rev* **30**(2): 152-177, 2009.

MOLLER N, JORGENSEN JO, ABILDGARD N, ORSKOV L, SCHMITZ O, CHRISTIANSEN JS: Effects of growth hormone on glucose metabolism. *Horm Res* **36 Suppl 1**: 32-35, 1991.

MOORE JS, MONSON JP, KALTSAS G, PUTIGNANO P, WOOD PJ, SHEPPARD MC, BESSER GM, TAYLOR NF, STEWART PM: Modulation of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase isozymes by growth hormone and insulin-like growth factor: in vivo and in vitro studies. *J Clin Endocrinol Metab* **84**(11): 4172-4177, 1999.

MORA A, SAKAMOTO K, MCMANUS EJ, ALESSI DR: Role of the PDK1-PKB-GSK3 pathway in regulating glycogen synthase and glucose uptake in the heart. *FEBS Lett* **579**(17): 3632-3638, 2005.

MORIARTY MW, MCCURDY CE, JANSSEN RC, SHAW T, LEITNER JW, FRIEDMAN JE, DRAZNIN B: In vivo knockdown of p85alpha with an antisense oligonucleotide improves insulin sensitivity in Lep(ob/ob) and diet-induced obese mice. *Horm Metab Res* **41**(10): 757-761, 2009.

MOSES AC YS, MORROW LA, O'BRIEN M, CLEMMONS DR.: Recombinant human insulin-like growth factor I increases insulin sensitivity and improves glycemic control in type II diabetes. *Diabetes* **45**(1): 91-100, 1996 Jan.

MRAZ M LZ, DRAPALOVA J, HALUZIKOVA D, HORINEK A, MATOULEK M, TRACHTA P, KAVALKOVA P, SVACINA S, HALUZIK M. : The effect of very-low-calorie diet on mRNA expression of inflammation-related genes in subcutaneous adipose tissue and peripheral monocytes of obese patients with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab.* **96**(4): E606-613, 2011 Apr.

MUGGEO M, SAVIOLAKIS GA, BUSINARO V, VALERIO A, MOGHETTI P, CREPALDI G: Insulin receptor on monocytes from patients with acromegaly and fasting hyperglycemia. *J Clin Endocrinol Metab* **56**(4): 733-738, 1983.

MUR C, ARRIBAS M, BENITO M, VALVERDE AM: Essential role of insulin-like growth factor I receptor in insulin-induced fetal brown adipocyte differentiation. *Endocrinology* **144**(2): 581-593, 2003.

MUR C, VALVERDE AM, KAHN CR, BENITO M: Increased insulin sensitivity in IGF-I receptor--deficient brown adipocytes. *Diabetes* **51**(3): 743-754, 2002.

MURPHY LJ: Overexpression of insulin-like growth factor binding protein-1 in transgenic mice. *Pediatr Nephrol* **14**(7): 567-571, 2000.

MW K: "Structure and Function of Hormones: Growth Hormone". *Indiana State University*, 2006.

NAM SY, LEE EJ, KIM KR, CHA BS, SONG YD, LIM SK, LEE HC, HUH KB: Effect of obesity on total and free insulin-like growth factor (IGF)-1, and their relationship to IGF-binding protein (BP)-1, IGFBP-2, IGFBP-3, insulin, and growth hormone. *Int J Obes Relat Metab Disord* **21**(5): 355-359, 1997.

NAM SY, MARCUS C: Growth hormone and adipocyte function in obesity. *Horm Res* **53 Suppl 1**: 87-97, 2000.

NEACSU O, CLEVELAND K, XU H, TCHKONIA TT, KIRKLAND JL, BONEY CM: IGF-I attenuates FFA-induced activation of JNK1 phosphorylation and TNFalpha expression in human subcutaneous preadipocytes. *Obesity (Silver Spring)* **21**(9): 1843-1849, 2013.

NELSON DW, MURALI SG, LIU X, KOOPMANN MC, HOLST JJ, NEY DM: Insulin-like growth factor I and glucagon-like peptide-2 responses to fasting followed by controlled or ad libitum refeeding in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **294**(4): R1175-1184, 2008.

NEVADO C, VALVERDE AM, BENITO M: Role of insulin receptor in the regulation of glucose uptake in neonatal hepatocytes. *Endocrinology* **147**(8): 3709-3718, 2006.

NGUYEN KH, YAO XH, ERICKSON AG, MISHRA S, NYOMBA BL: Glucose intolerance in aging male IGFBP-3 transgenic mice: differential effects of human IGFBP-3 and its mutant IGFBP-3 devoid of IGF binding ability. *Endocrinology* **156**(2): 462-474, 2015.

NGUYEN KH, YAO XH, MOULIK S, MISHRA S, NYOMBA BL: Human IGF binding protein-3 overexpression impairs glucose regulation in mice via an inhibition of insulin secretion. *Endocrinology* **152**(6): 2184-2196, 2011.

NICULESCU D, PURICE M, COCULESCU M: Insulin-like growth factor-I correlates more closely than growth hormone with insulin resistance and glucose intolerance in patients with acromegaly. *Pituitary* **16**(2): 168-174, 2013.

NIELSEN C, GORMSEN LC, JESSEN N, PEDERSEN SB, MOLLER N, LUND S, JORGENSEN JO: Growth hormone signaling in vivo in human muscle and adipose tissue: impact of insulin, substrate background, and growth hormone receptor blockade. *J Clin Endocrinol Metab* **93**(7): 2842-2850, 2008.

NILSSON L, BINART N, BOHLOOLY YM, BRAMNERT M, EGECIOGLU E, KINDBLOM J, KELLY PA, KOPCHICK JJ, ORMANDY CJ, LING C, BILLIG H: Prolactin and growth hormone regulate adiponectin secretion and receptor expression in adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun* **331**(4): 1120-1126, 2005.

NORBECK LA, KITTLSON JD, SHERIDAN MA: Resolving the growth-promoting and metabolic effects of growth hormone: Differential regulation of GH-IGF-I system components. *Gen Comp Endocrinol* **151**(3): 332-341, 2007.

O'CONNELL T, CLEMMONS DR: IGF-I/IGF-binding protein-3 combination improves insulin resistance by GH-dependent and independent mechanisms. *J Clin Endocrinol Metab* **87**(9): 4356-4360, 2002.

O'CONNOR KG, TOBIN JD, HARMAN SM, PLATO CC, ROY TA, SHERMAN SS, BLACKMAN MR: Serum levels of insulin-like growth factor-I are related to age and not to body composition in healthy women and men. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **53**(3): M176-182, 1998.

O'LEARY MJ, QUINTON N, FERGUSON CN, PREEDY VR, ROSS RJ, HINDS CJ: In rats with sepsis, the acute fall in IGF-I is associated with an increase in circulating growth hormone-binding protein levels. *Intensive Care Med* **26**(10): 1547-1552, 2000.

OBERBAUER AM, MURRAY JD: Consequences of limited exposure to elevated growth hormone in the mature oMt1a-oGH transgenic mouse. *Growth Dev Aging* **62**(3): 87-93, 1998.

OBERBAUER AM, STERN JS, JOHNSON PR, HORWITZ BA, GERMAN JB, PHINNEY SD, BEERMANN DH, POMP D, MURRAY JD: Body composition of inactivated growth hormone (oMt1a-oGH) transgenic mice: generation of an obese phenotype. *Growth Dev Aging* **61**(3-4): 169-179, 1997.

OBERBAUER AM, STIGLICH C, MURRAY JD, KEEN CL, FONG DL, SMITH LB, CUSHWA S: Dissociation of body growth and adipose deposition effects of growth hormone in oMt1a-oGH transgenic mice. *Growth Dev Aging* **68**(1): 33-45, 2004.

OHASHI S, KAJI H, ABE H, CHIHARA K: Effect of fasting and growth hormone (GH) administration on GH receptor (GHR) messenger ribonucleic acid (mRNA) and GH-binding protein (GHBP) mRNA levels in male rats. *Life Sci* **57**(18): 1655-1666, 1995.

OLARESCU NC, UELAND T, GODANG K, LINDBERG-LARSEN R, JORGENSEN JO, BOLLERSLEV J: Inflammatory adipokines contribute to insulin resistance in active

acromegaly and respond differently to different treatment modalities. *Eur J Endocrinol* **170**(1): 39-48, 2014.

OLARESCU NC, UELAND T, LEKVA T, DAHL TB, HALVORSEN B, AUKRUST P, BOLLERSLEV J: Adipocytes as a source of increased circulating levels of nicotinamide phosphoribosyltransferase/visfatin in active acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab* **97**(4): 1355-1362, 2012.

OLIVIA M: Diabetes and Insulin Signaling: A New Strategy to Promote Pancreatic b Cell Survival. *Endocrinology*, 2008.

OLIVO-MARSTON SE, HURSTING SD, PERKINS SN, SCHETTER A, KHAN M, CROCE C, HARRIS CC, LAVIGNE J: Effects of calorie restriction and diet-induced obesity on murine colon carcinogenesis, growth and inflammatory factors, and microRNA expression. *PLoS One* **9**(4): e94765, 2014.

ORLOWSKI CC, OOI GT, BROWN DR, YANG YW, TSENG LY, RECHLER MM: Insulin rapidly inhibits insulin-like growth factor-binding protein-1 gene expression in H4-II-E rat hepatoma cells. *Mol Endocrinol* **5**(8): 1180-1187, 1991.

OSCARSSON J, OTTOSSON M, EDEN S: B Effects of growth hormone on lipoprotein lipase and hepatic lipase. *J Endocrinol Invest* **22**(5 Suppl): 2-9, 1999.

OSCARSSON J, OTTOSSON M, VIKMAN-ADOLFSSON K, FRICK F, ENERBACK S, LITHELL H, EDEN S: A GH but not IGF-I or insulin increases lipoprotein lipase activity in muscle tissues of hypophysectomised rats. *J Endocrinol* **160**(2): 247-255, 1999.

OZANNE SE, JENSEN CB, TINGEY KJ, MARTIN-GRONERT MS, GRUNNET L, BRONS C, STORGAARD H, VAAG AA: Decreased protein levels of key insulin signalling molecules in adipose tissue from young men with a low birthweight: potential link to increased risk of diabetes? *Diabetologia* **49**(12): 2993-2999, 2006.

PALAU N, REBUFFAT SA, ALTIRRIBA J, PIQUER S, HANZU FA, GOMIS R, BARBERA A: Role of IGFBP-3 in the regulation of beta-cell mass during obesity: adipose tissue/beta-cell cross talk. *Endocrinology* **153**(1): 177-187, 2012.

PANDINI G, FRASCA F, MINEO R, SCIACCA L, VIGNERI R, BELFIORE A: Insulin/insulin-like growth factor I hybrid receptors have different biological characteristics depending on the insulin receptor isoform involved. *J Biol Chem* **277**(42): 39684-39695, 2002.

PAO CI, FARMER PK, BEGOVIC S, GOLDSTEIN S, WU GJ, PHILLIPS LS: Expression of hepatic insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-binding protein-1 genes is transcriptionally regulated in streptozotocin-diabetic rats. *Mol Endocrinol* **6**(6): 969-977, 1992.

PAPASTATHI C, MAVROMMATIS A, MENTZELOPOULOS S, KONSTANDELOU E, ALEVIZAKI M, ZAKYNTINOS S: Insulin-like Growth Factor I and its binding protein 3 in sepsis. *Growth Horm IGF Res* **23**(4): 98-104, 2013.

PAULSEN SK, PEDERSEN SB, JORGENSEN JO, FISKER S, CHRISTIANSEN JS, FLYVBJERG A, RICHELSEN B: Growth hormone (GH) substitution in GH-deficient patients inhibits 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 messenger ribonucleic acid expression in adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab* **91**(3): 1093-1098, 2006.

PAV J, HILGERTOVA J, MAREK J, SRAMKOVA J: Insulin binding to erythrocyte receptors in acromegalic patients in relation to the activity of acromegaly and to concomitant diabetes mellitus. *Exp Clin Endocrinol* **88**(1): 76-80, 1986.

PEREIRA RI, DRAZNIN B: Inhibition of the phosphatidylinositol 3'-kinase signaling pathway leads to decreased insulin-stimulated adiponectin secretion from 3T3-L1 adipocytes. *Metabolism* **54**(12): 1636-1643, 2005.

PERRINI S, CARREIRA MC, CONSERVA A, LAVIOLA L, GIORGINO F: Metabolic implications of growth hormone therapy. *J Endocrinol Invest* **31**(9 Suppl): 79-84, 2008.

PETER MA, WINTERHALTER KH, BONI-SCHNETZLER M, FROESCH ER, ZAPF J: Regulation of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-binding proteins by growth hormone in rat white adipose tissue. *Endocrinology* **133**(6): 2624-2631, 1993.

PETER MA, WINTERHALTER, K. H., BONI-SCHNETZLER, M., FROESCH, E. R., ZAPF, J.: Regulation of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-binding proteins by growth hormone in rat white adipose tissue. *Endocrinology* **133**(6): 2624-2631, 1993.

PETERSENN S, SCHOPOHL J, BARKAN A, MOHIDEEN P, COLAO A, ABS R, BUCHELT A, HO YY, HU K, FARRALL AJ, MELMED S, BILLER BM, PASIREOTIDE ACROMEGALY STUDY G: Pasireotide (SOM230) demonstrates efficacy and safety in patients with acromegaly: a randomized, multicenter, phase II trial. *J Clin Endocrinol Metab* **95**(6): 2781-2789, 2010.

PETERSSON U, OSTGREN CJ, BRUDIN L, BRISMAR K, NILSSON PM: Low levels of insulin-like growth-factor-binding protein-1 (IGFBP-1) are prospectively associated with the incidence of type 2 diabetes and impaired glucose tolerance (IGT): the Soderakra Cardiovascular Risk Factor Study. *Diabetes Metab* **35**(3): 198-205, 2009.

PETRIK J, PELL JM, ARANY E, MCDONALD TJ, DEAN WL, REIK W, HILL DJ: Overexpression of insulin-like growth factor-II in transgenic mice is associated with pancreatic islet cell hyperplasia. *Endocrinology* **140**(5): 2353-2363, 1999.

PLOCKINGER U, REUTER T: Pegvisomant increases intra-abdominal fat in patients with acromegaly: a pilot study. *Eur J Endocrinol* **158**(4): 467-471, 2008.

PRADINES-FIGUERES A, BARCELLINI-COUGET S, DANI C, BAUDOIN C, AILHAUD G: Inhibition by serum components of the expression of lipoprotein lipase gene upon stimulation by growth hormone. *Biochem Biophys Res Commun* **166**(3): 1118-1125, 1990.

PRATIPANAWATR T, PRATIPANAWATR W, ROSEN C, BERRIA R, BAJAJ M, CUSI K, MANDARINO L, KASHYAP S, BELFORT R, DEFRONZO RA: Effect of IGF-I on FFA and glucose metabolism in control and type 2 diabetic subjects. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **282**(6): E1360-1368, 2002.

PRIEGO T, IBANEZ DE CACERES I, MARTIN AI, VILLANUA MA, LOPEZ-CALDERON A: Endotoxin decreases serum IGFBP-3 and liver IGFBP-3 mRNA: comparison between Lewis and Wistar rats. *Mol Cell Endocrinol* **199**(1-2): 23-28, 2003.

PUZIK A, RUPP J, TROGER B, GOPEL W, HERTING E, HARTEL C: Insulin-like growth factor-I regulates the neonatal immune response in infection and maturation by suppression of IFN-gamma. *Cytokine* **60**(2): 369-376, 2012.

RAILE K, KLAMMT J, LAUE S, GARTEN A, BLUHER M, KRALISCH S, KLOTING N, KIESS W: Glucose concentration and AMP-dependent kinase activation regulate expression of insulin receptor family members in rat islets and INS-1E beta cells. *Diabetologia* **48**(9): 1798-1809, 2005.

RAILE K, KLAMMT J, SCHNEIDER A, KELLER A, LAUE S, SMITH R, PFAFFLE R, KRATZSCH J, KELLER E, KIESS W: Clinical and functional characteristics of the human Arg59Ter insulin-like growth factor i receptor (IGF1R) mutation: implications for a gene dosage effect of the human IGF1R. *J Clin Endocrinol Metab* **91**(6): 2264-2271, 2006.

RAJASOORYA C, HOLDAWAY IM, WRIGHTSON P, SCOTT DJ, IBBERTSON HK: Determinants of clinical outcome and survival in acromegaly. *Clin Endocrinol (Oxf)* **41**(1): 95-102, 1994.

RAJKUMAR K, MODRIC T, MURPHY LJ: Impaired adipogenesis in insulin-like growth factor binding protein-1 transgenic mice. *J Endocrinol* **162**(3): 457-465, 1999.

RAJPATHAK SN GM, WYLIE-ROSETT J, HO GY, KAPLAN RC, MUZUMDAR R, ROHAN TE, STRICKLER HD: The role of insulin-like growth factor-I and its binding proteins in glucose homeostasis and type 2 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*. **25**(1): 3-12, 2009 Jan.

RAJPATHAK SN, MCGINN AP, STRICKLER HD, ROHAN TE, POLLAK M, CAPPOLA AR, KULLER L, XUE X, NEWMAN AB, STROTMAYER ES, PSATY BM, KAPLAN RC: Insulin-like growth factor-(IGF)-axis, inflammation, and glucose intolerance among older adults. *Growth Horm IGF Res* **18**(2): 166-173, 2008.

RAMSAY TG, WOLVERTON CK, STEELE NC: Alteration in IGF-I mRNA content of fetal swine tissues in response to maternal diabetes. *Am J Physiol* **267**(5 Pt 2): R1391-1396, 1994.

RANABIR S, REETU K: Stress and hormones. *Indian J Endocrinol Metab* **15**(1): 18-22, 2011.

RAO MN, MULLIGAN K, TAI V, WEN MJ, DYACHENKO A, WEINBERG M, LI X, LANG T, GRUNFELD C, SCHWARZ JM, SCHAMBELAN M: Effects of insulin-like growth factor (IGF)-I/IGF-binding protein-3 treatment on glucose metabolism and fat distribution in human immunodeficiency virus-infected patients with abdominal obesity and insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* **95**(9): 4361-4366, 2010.

RAPAPORT R SI, GREEN L, BARRETT P, LABUS J, SKUZA KA, CHARTOFF A, GOODE L, STENE M, PETERSEN BH.: Detection of human growth hormone receptors on IM-9 cells and peripheral blood mononuclear cell subsets by flow cytometry: correlation with growth hormone-binding protein levels. *J Clin Endocrinol Metab* **80**(9): 2612-2619, 1995 Sep.

RASMUSSEN MH: Obesity, growth hormone and weight loss. *Mol Cell Endocrinol* **316**(2): 147-153, 2010.

RASMUSSEN MH, JUUL A, KJEMS LL, HILSTED J: Effects of short-term caloric restriction on circulating free IGF-I, acid-labile subunit, IGF-binding proteins (IGFBPs)-1-4, and IGFBPs-1-3 protease activity in obese subjects. *Eur J Endocrinol* **155**(4): 575-581, 2006.

RASMUSSEN MH, JUUL A, KJEMS LL, SKAKKEBAEK NE, HILSTED J: Lack of stimulation of 24-hour growth hormone release by hypocaloric diet in obesity. *J Clin Endocrinol Metab* **80**(3): 796-801, 1995.

RAYNAUD-SIMON A, PERIN L, MEAUME S, LESOURD B, MOULIAS R, POSTEL-VINAY MC, LE BOUC Y: IGF-I, IGF-I-binding proteins and GH-binding protein in malnourished elderly patients with inflammation receiving refeeding therapy. *Eur J Endocrinol* **146**(5): 657-665, 2002.

REHFELDT C, RENNE U, SAWITZKY M, BINDER G, HOEFLICH A: Increased fat mass, decreased myofiber size, and a shift to glycolytic muscle metabolism in adolescent male transgenic mice overexpressing IGFBP-2. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **299**(2): E287-298, 2010.

RESMINI E, MINUTO F, COLAO A, FERONE D: Secondary diabetes associated with principal endocrinopathies: the impact of new treatment modalities. *Acta Diabetol* **46**(2): 85-95, 2009.

REYNOLDS CM, LI M, GRAY C, VICKERS MH: B-Pre-weaning growth hormone treatment ameliorates bone marrow macrophage inflammation in adult male rat offspring following maternal undernutrition. *PLoS One* **8**(7): e68262, 2013.

REYNOLDS CM, LI M, GRAY C, VICKERS MH: A-Preweaning growth hormone treatment ameliorates adipose tissue insulin resistance and inflammation in adult male offspring following maternal undernutrition. *Endocrinology* **154**(8): 2676-2686, 2013.

REYNOLDS CM, LI M, GRAY C, VICKERS MH: Early-life growth hormone treatment to offspring of undernourished mothers alters metabolic parameters in primary adipocytes in adulthood. *Growth Factors* **32**(1): 34-40, 2014.

RICO-BAUTISTA E, GREENHALGH CJ, TOLLET-EGNELL P, HILTON DJ, ALEXANDER WS, NORSTEDT G, FLORES-MORALES A: Suppressor of cytokine signaling-2 deficiency induces molecular and metabolic changes that partially overlap with growth hormone-dependent effects. *Mol Endocrinol* **19**(3): 781-793, 2005.

RICHELSEN B: Effect of growth hormone on adipose tissue and skeletal muscle lipoprotein lipase activity in humans. *J Endocrinol Invest* **22**(5 Suppl): 10-15, 1999.

RICHELSEN B: Action of growth hormone in adipose tissue. *Horm Res.* **48**(Suppl 5): 105-110, 1997.

RICHELSEN B, PEDERSEN SB, KRISTENSEN K, BORGLUM JD, NORRELUND H, CHRISTIANSEN JS, JORGENSEN JO: Regulation of lipoprotein lipase and hormone-sensitive lipase activity and gene expression in adipose and muscle tissue by growth hormone treatment during weight loss in obese patients. *Metabolism* **49**(7): 906-911, 2000.

RICHMOND JP, JEANNIARD DU DOT T, ROSEN DA, ZINN SA: Seasonal influence on the response of the somatotrophic axis to nutrient restriction and re-alimentation in captive Steller sea lions (*Eumetopias jubatus*). *J Exp Zool A Ecol Genet Physiol* **313**(3): 144-156, 2010.

RIM CH, YANG DS, PARK YJ, YOON WS, LEE JA, KIM CY: Radiotherapy for pituitary adenomas: long-term outcome and complications. *Radiat Oncol J* **29**(3): 156-163, 2011.

RINDERKNECHT E, HUMBEL RE: The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *J Biol Chem* **253**(8): 2769-2776, 1978.

RIVERO F, GOYA L, ALAEZ C, PASCUAL-LEONE AM: Effects of undernutrition and diabetes on serum and liver mRNA expression of IGFs and their binding proteins during rat development. *J Endocrinol* **145**(3): 427-440, 1995.

ROBERTSON K, LU Y, DE JESUS K, LI B, SU Q, LUND PK, LIU JL: A general and islet cell-enriched overexpression of IGF-I results in normal islet cell growth, hypoglycemia, and significant resistance to experimental diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **294**(5): E928-938, 2008.

RODGERS BD, ROALSON EH, THOMPSON C: Phylogenetic analysis of the insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) and IGFBP-related protein gene families. *Gen Comp Endocrinol* **155**(1): 201-207, 2008.

RODRIGUES TC, COSTENARO F, FEDRIZZI D, OLIVEIRA MD, LIMA PB, BOSCHI V, CZEPIELEWSKI MA: Diabetes mellitus in a cohort of patients with acromegaly. *Arq Bras Endocrinol Metabol* **55**(9): 714-719, 2011.

ROGOZINA OP, BONORDEN MJ, GRANDE JP, CLEARY MP: Serum insulin-like growth factor-I and mammary tumor development in ad libitum-fed, chronic calorie-restricted, and intermittent calorie-restricted MMTV-TGF-alpha mice. *Cancer Prev Res (Phila)* **2**(8): 712-719, 2009.

ROMERO CJ, NG Y, LUQUE RM, KINEMAN RD, KOCH L, BRUNING JC, RADOVICK S: Targeted deletion of somatotroph insulin-like growth factor-I signaling in a cell-specific knockout mouse model. *Mol Endocrinol* **24**(5): 1077-1089, 2010.

ROMERO CJ, PINE-TWADDELL E, SIMA DI, MILLER RS, HE L, WONDISFORD F, RADOVICK S: Insulin-like growth factor 1 mediates negative feedback to somatotroph GH expression via POU1F1/CREB binding protein interactions. *Mol Cell Biol* **32**(21): 4258-4269, 2012.

RUSSELL-JONES DL, BATES AT, UMPLEBY AM, HENNESSY TR, BOWES SB, HOPKINS KD, JACKSON N, KELLY J, SHOJAEI-MORADIE F, JONES RH, ET AL.: A comparison of the effects of IGF-I and insulin on glucose metabolism, fat metabolism and the cardiovascular system in normal human volunteers. *Eur J Clin Invest* **25**(6): 403-411, 1995.

SAITO H, INOUE T, FUKATSU K, MING-TSAN L, INABA T, FUKUSHIMA R, MUTO T: Growth hormone and the immune response to bacterial infection. *Horm Res* **45**(1-2): 50-54, 1996.

SALA E, FERRANTE E, LOCATELLI M, RAMPINI P, MANTOVANI G, GIAVOLI C, FILOPANTI M, VERRUA E, MALCHIODI E, CARRABBA G, AROSIO M, BECK-PECCOZ P, SPADA A, LANIA AG: Diagnostic features and outcome of surgical therapy of



acromegalic patients: experience of the last three decades. *Hormones (Athens)* **13**(1): 95-103, 2014.

SATA A, HO KK: Growth hormone measurements in the diagnosis and monitoring of acromegaly. *Pituitary* **10**(2): 165-172, 2007.

SATO T, NAGAFUKU M, SHIMIZU K, TAIRA T, IGARASHI Y, INOKUCHI J: Physiological levels of insulin and IGF-1 synergistically enhance the differentiation of mesenteric adipocytes. *Cell Biol Int* **32**(11): 1397-1404, 2008.

SAVAGE MO, SIMON D, CZERNICHOW PC: Growth hormone treatment in children on chronic glucocorticoid therapy. *Endocr Dev* **20**: 194-201, 2011.

SAVASTANO S, DI SOMMA C, PIZZA G, DE ROSA A, NEDI V, ROSSI A, ORIO F, LOMBARDI G, COLAO A, TARANTINO G: Liver-spleen axis, insulin-like growth factor-(IGF)-I axis and fat mass in overweight/obese females. *J Transl Med* **9**: 136, 2011.

SCACCHI M, PINCELLI AI, CAVAGNINI F: Growth hormone in obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* **23**(3): 260-271, 1999.

SCAVO LM, KARAS M, MURRAY M, LEROITH D: Insulin-like growth factor-I stimulates both cell growth and lipogenesis during differentiation of human mesenchymal stem cells into adipocytes. *J Clin Endocrinol Metab* **89**(7): 3543-3553, 2004.

SCIACCA L, COSTANTINO A, PANDINI G, MINEO R, FRASCA F, SCALIA P, SBRACCIA P, GOLDFINE ID, VIGNERI R, BELFIORE A: Insulin receptor activation by IGF-II in breast cancers: evidence for a new autocrine/paracrine mechanism. *Oncogene* **18**(15): 2471-2479, 1999.

SEBERT SP, LECANNU G, KOZLOWSKI F, SILIART B, BARD JM, KREMPF M, CHAMP MM: Childhood obesity and insulin resistance in a Yucatan mini-piglet model: putative roles of IGF-1 and muscle PPARs in adipose tissue activity and development. *Int J Obes (Lond)* **29**(3): 324-333, 2005.

SENTHIL D, CHOUDHURY GG, ABOUD HE, SONENBERG N, KASINATH BS: Regulation of protein synthesis by IGF-I in proximal tubular epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* **283**(6): F1226-1236, 2002.

SERRI O, LI L, MAINGRETTE F, JAFFRY N, RENIER G: Enhanced lipoprotein lipase secretion and foam cell formation by macrophages of patients with growth hormone deficiency: possible contribution to increased risk of atherogenesis? *J Clin Endocrinol Metab* **89**(2): 979-985, 2004.

SESMILO G, BILLER BM, LLEVADOT J, HAYDEN D, HANSON G, RIFAI N, KLIBANSKI A: Effects of growth hormone administration on inflammatory and other cardiovascular risk markers in men with growth hormone deficiency. A randomized, controlled clinical trial. *Ann Intern Med* **133**(2): 111-122, 2000.

SESTI G, FEDERICI M, LAURO D, SBRACCIA P, LAURO R: Molecular mechanism of insulin resistance in type 2 diabetes mellitus: role of the insulin receptor variant forms. *Diabetes Metab Res Rev* **17**(5): 363-373, 2001.

SHAO J, YAMASHITA H, QIAO L, FRIEDMAN JE: Decreased Akt kinase activity and insulin resistance in C57BL/KsJ-Lepr<sup>db/db</sup> mice. *J Endocrinol* **167**(1): 107-115, 2000.

SHELTON JG, STEELMAN LS, WHITE ER, MCCUBREY JA: Synergy between PI3K/Akt and Raf/MEK/ERK pathways in IGF-1R mediated cell cycle progression and prevention of apoptosis in hematopoietic cells. *Cell Cycle* **3**(3): 372-379, 2004.

SHEN WH, YANG X, BOYLE DW, LEE WH, LIECHTY EA: Effects of intravenous insulin-like growth factor-I and insulin administration on insulin-like growth factor-binding proteins in the ovine fetus. *J Endocrinol* **171**(1): 143-151, 2001.

SHEN WH, YIN Y, BROUSSARD SR, MCCUSKER RH, FREUND GG, DANTZER R, KELLEY KW: Tumor necrosis factor alpha inhibits cyclin A expression and retinoblastoma

hyperphosphorylation triggered by insulin-like growth factor-I induction of new E2F-1 synthesis. *J Biol Chem* **279**(9): 7438-7446, 2004.

SHEPHERD PR, WITHERS DJ, SIDDLE K: Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling. *Biochem J* **333** ( Pt 3): 471-490, 1998.

SHOBA L, AN MR, FRANK SJ, LOWE WL, JR.: Developmental regulation of insulin-like growth factor-I and growth hormone receptor gene expression. *Mol Cell Endocrinol* **152**(1-2): 125-136, 1999.

SCHAFFER N, WAGENER A, HANTSCHHEL C, MAUEL S, GRUBER AD, BROCKMANN GA: IGF-I contributes to glucose homeostasis in the Berlin Fat Mouse Inbred line. *Growth Factors* **29**(6): 298-309, 2011.

SCHNEIDER MR, LAHM H, WU M, HOEFLICH A, WOLF E: Transgenic mouse models for studying the functions of insulin-like growth factor-binding proteins. *FASEB J* **14**(5): 629-640, 2000.

SCHWARTZ J, CARTER-SU C: Effects of growth hormone on glucose metabolism and glucose transport in 3T3-F442A cells: dependence on cell differentiation. *Endocrinology* **122**(5): 2247-2256, 1988.

SICA A, MANTOVANI A: Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest* **122**(3): 787-795, 2012.

SILHA JV, GUI, Y., MURPHY, L. J.: Impaired glucose homeostasis in insulin-like growth factor-binding protein-3-transgenic mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **283**(5): E937-945, 2002.

SIMSOLO RB, EZZAT S, ONG JM, SAGHIZADEH M, KERN PA: Effects of acromegaly treatment and growth hormone on adipose tissue lipoprotein lipase. *J Clin Endocrinol Metab* **80**(11): 3233-3238, 1995.

SINGLETON JR, BAKER BL, THORBURN A: Dexamethasone inhibits insulin-like growth factor signaling and potentiates myoblast apoptosis. *Endocrinology* **141**(8): 2945-2950, 2000.

SIPROVA H SM: Akromegalie a medikamentózní léčba. *Vnitr Lek*, 2014.

SJÖGREN K1 JJ, ISAKSSON OG, OHLSSON C.: A transgenic model to determine the physiological role of liver-derived insulin-like growth factor I. *Minerva Endocrinol.* **27**(4): 299-311, 2002

SMITH JR, BENGHUZZI H, TUCCI M, PUCKETT A, HUGHES JL: The effects of growth hormone and insulin-like growth factor on the proliferation rate and morphology of RAW 264.7 macrophages. *Biomed Sci Instrum* **36**: 111-116, 2000.

SMITH PJ, WISE LS, BERKOWITZ R, WAN C, RUBIN CS: Insulin-like growth factor-I is an essential regulator of the differentiation of 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* **263**(19): 9402-9408, 1988.

SMITH TR, ELMENDORF JS, DAVID TS, TURINSKY J: Growth hormone-induced insulin resistance: role of the insulin receptor, IRS-1, GLUT-1, and GLUT-4. *Am J Physiol* **272**(6 Pt 1): E1071-1079, 1997.

SMITH WJ, UNDERWOOD LE, CLEMMONS DR: Effects of caloric or protein restriction on insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-binding proteins in children and adults. *J Clin Endocrinol Metab* **80**(2): 443-449, 1995.

SOLOMON SS, SIBLEY SD, CUNNINGHAM TM: Growth hormone receptors are up-regulated in diabetic adipocytes. *Endocrinology* **127**(3): 1544-1546, 1990.

SOOS MA, WHITTAKER J, LAMMERS R, ULLRICH A, SIDDLE K: Receptors for insulin and insulin-like growth factor-I can form hybrid dimers. Characterisation of hybrid receptors in transfected cells. *Biochem J* **270**(2): 383-390, 1990.

SOTO L, MARTIN AI, MILLAN S, VARA E, LOPEZ-CALDERON A: Effects of endotoxin lipopolysaccharide administration on the somatotrophic axis. *J Endocrinol* **159**(2): 239-246, 1998.

STRAUS DS, OOI GT, ORLOWSKI CC, RECHLER MM: Expression of the genes for insulin-like growth factor-I (IGF-I), IGF-II, and IGF-binding proteins-1 and -2 in fetal rat under conditions of intrauterine growth retardation caused by maternal fasting. *Endocrinology* **128**(1): 518-525, 1991.

STUART CA, MEEHAN RT, NEALE LS, CINTRON NM, FURLANETTO RW: Insulin-like growth factor-I binds selectively to human peripheral blood monocytes and B-lymphocytes. *J Clin Endocrinol Metab* **72**(5): 1117-1122, 1991.

SUGANAMI T, NISHIDA J, OGAWA Y: A paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes: role of free fatty acids and tumor necrosis factor alpha. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**(10): 2062-2068, 2005.

TAKAHASHI Y, KIPNIS DM, DAUGHADAY WH: Growth hormone secretion during sleep. *J Clin Invest* **47**(9): 2079-2090, 1968.

TALBOT K, WANG HY, KAZI H, HAN LY, BAKSHI KP, STUCKY A, FUINO RL, KAWAGUCHI KR, SAMOYEDNY AJ, WILSON RS, ARVANITAKIS Z, SCHNEIDER JA, WOLF BA, BENNETT DA, TROJANOWSKI JQ, ARNOLD SE: Demonstrated brain insulin resistance in Alzheimer's disease patients is associated with IGF-1 resistance, IRS-1 dysregulation, and cognitive decline. *J Clin Invest* **122**(4): 1316-1338, 2012.

TANIGUCHI CM, ALEMAN JO, UEKI K, LUO J, ASANO T, KANETO H, STEPHANOPOULOS G, CANTLEY LC, KAHN CR: The p85alpha regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase potentiates c-Jun N-terminal kinase-mediated insulin resistance. *Mol Cell Biol* **27**(8): 2830-2840, 2007.

TANIGUCHI CM, TRAN TT, KONDO T, LUO J, UEKI K, CANTLEY LC, KAHN CR: Phosphoinositide 3-kinase regulatory subunit p85alpha suppresses insulin action via positive regulation of PTEN. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(32): 12093-12097, 2006.

TERAUCHI Y, MATSUI J, KAMON J, YAMAUCHI T, KUBOTA N, KOMEDA K, AIZAWA S, AKANUMA Y, TOMITA M, KADOWAKI T: Increased serum leptin protects from adiposity despite the increased glucose uptake in white adipose tissue in mice lacking p85alpha phosphoinositide 3-kinase. *Diabetes* **53**(9): 2261-2270, 2004.

TERAUCHI Y, TSUJI Y, SATOH S, MINOURA H, MURAKAMI K, OKUNO A, INUKAI K, ASANO T, KABURAGI Y, UEKI K, NAKAJIMA H, HANAFUSA T, MATSUZAWA Y, SEKIHARA H, YIN Y, BARRETT JC, ODA H, ISHIKAWA T, AKANUMA Y, KOMURO I, SUZUKI M, YAMAMURA K, KODAMA T, SUZUKI H, YAMAMURA K, KODAMA T, SUZUKI H, KOYASU S, AIZAWA S, TOBE K, FUKUI Y, YAZAKI Y, KADOWAKI T: Increased insulin sensitivity and hypoglycaemia in mice lacking the p85 alpha subunit of phosphoinositide 3-kinase. *Nat Genet* **21**(2): 230-235, 1999.

TERUEL T, VALVERDE AM, BENITO M, LORENZO M: Insulin-like growth factor I and insulin induce adipogenic-related gene expression in fetal brown adipocyte primary cultures. *Biochem J* **319** ( Pt 2): 627-632, 1996.

THAKRAN S, ZHANG Q, MORALES-TIRADO V, STEINLE JJ: Pioglitazone restores IGFBP-3 levels through DNA PK in retinal endothelial cells cultured in hyperglycemic conditions. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **56**(1): 177-184, 2015.

THISSEN JP, KETELSLEGERS JM, UNDERWOOD LE: Nutritional regulation of the insulin-like growth factors. *Endocr Rev* **15**(1): 80-101, 1994.

THRAILKILL KM: Insulin-like growth factor-I in diabetes mellitus: its physiology, metabolic effects, and potential clinical utility. *Diabetes Technol Ther* **2**(1): 69-80, 2000.

TCHKONIA T, TCHOUKALOVA YD, GIORGADZE N, PIRTSKHALAVA T, KARAGIANNIDES I, FORSE RA, KOO A, STEVENSON M, CHINNAPPAN D, CARTWRIGHT A, JENSEN MD, KIRKLAND JL: Abundance of two human preadipocyte subtypes with distinct capacities for replication, adipogenesis, and apoptosis varies among fat depots. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **288**(1): E267-277, 2005.

TIMTCHENKO D, KRATZSCH J, SAUERWEIN H, WEGNER J, SOUFFRANT WB, SCHWERIN M, BROCKMANN GA: Fat storage capacity in growth-selected and control mouse lines is associated with line-specific gene expression and plasma hormone levels. *Int J Obes Relat Metab Disord* **23**(6): 586-594, 1999.

TONKIN J, TEMMERMAN L, SAMPSON RD, GALLEGO-COLON E, BARBERI L, BILBAO D, SCHNEIDER MD, MUSARO A, ROSENTHAL N: Monocyte/Macrophage-derived IGF-1 Orchestrates Murine Skeletal Muscle Regeneration and Modulates Autocrine Polarization. *Mol Ther* **23**(7): 1189-1200, 2015.

TORRES ALEMAN I: Role of insulin-like growth factors in neuronal plasticity and neuroprotection. *Adv Exp Med Biol* **567**: 243-258, 2005.

TOUSKOVA V, TRACHTA P, KAVALKOVA P, DRAPALOVA J, HALUZIKOVA D, MRAZ M, LACINOVA Z, MAREK J, HALUZIK M: Serum concentrations and tissue expression of components of insulin-like growth factor-axis in females with type 2 diabetes mellitus and obesity: the influence of very-low-calorie diet. *Mol Cell Endocrinol.* **25**(361): 172-178, 2012 Sep.

TRAINER PJ, DRAKE WM, KATZNELSON L, FREDU PU, HERMAN-BONERT V, VAN DER LELY AJ, DIMARAKI EV, STEWART PM, FRIEND KE, VANCE ML, BESSER GM, SCARLETT JA, THORNER MO, PARKINSON C, KLIBANSKI A, POWELL JS, BARKAN AL, SHEPPARD MC, MALSONADO M, ROSE DR, CLEMMONS DR, JOHANSSON G, BENGTSSON BA, STAVROU S, KLEINBERG DL, COOK DM, PHILLIPS LS, BIDLINGMAIER M, STRASBURGER CJ, HACKETT S, ZIB K, BENNETT WF, DAVIS RJ: Treatment of acromegaly with the growth hormone-receptor antagonist pegvisomant. *N Engl J Med* **342**(16): 1171-1177, 2000.

TROBEC K, VON HAEHLING S, ANKER SD, LAINSCAK M: Growth hormone, insulin-like growth factor 1, and insulin signaling-a pharmacological target in body wasting and cachexia. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* **2**(4): 191-200, 2011.

TSUCHIDA H, BJORNHOLM M, FERNSTROM M, GALUSKA D, JOHANSSON P, WALLBERG-HENRIKSSON H, ZIERATH JR, LAKE S, KROOK A: Gene expression of the p85alpha regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-kinase in skeletal muscle from type 2 diabetic subjects. *Pflugers Arch* **445**(1): 25-31, 2002.

TZANELA M: Dynamic tests and basal values for defining active acromegaly. *Neuroendocrinology* **83**(3-4): 200-204, 2006.

UEDA M, ASHIDA, H.: Green tea prevents obesity by increasing expression of insulin-like growth factor binding protein-1 in adipose tissue of high-fat diet-fed mice. *J Agric Food Chem* **60**(36): 8917-8923, 2012.

UEKI I, GIESY SL, HARVATINE KJ, KIM JW, BOISCLAIR YR: The acid-labile subunit is required for full effects of exogenous growth hormone on growth and carbohydrate metabolism. *Endocrinology* **150**(7): 3145-3152, 2009.

UEKI K, ALGENSTAEDT P, MAUVAIS-JARVIS F, KAHN CR: Positive and negative regulation of phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling pathways by three different gene products of the p85alpha regulatory subunit. *Mol Cell Biol* **20**(21): 8035-8046, 2000.

UEKI K, FRUMAN DA, BRACHMANN SM, TSENG YH, CANTLEY LC, KAHN CR: B Molecular balance between the regulatory and catalytic subunits of phosphoinositide 3-kinase regulates cell signaling and survival. *Mol Cell Biol* **22**(3): 965-977, 2002.

UEKI K, FRUMAN DA, YBALLE CM, FASSHAUER M, KLEIN J, ASANO T, CANTLEY LC, KAHN CR: Positive and negative roles of p85 alpha and p85 beta regulatory subunits of phosphoinositide 3-kinase in insulin signaling. *J Biol Chem* **278**(48): 48453-48466, 2003.

UELAND T, FOUIGNER SL, GODANG K, LEKVA T, SCHURGERS LJ, SCHOLZ H, HALVORSEN B, SCHREINER T, AUKRUST P, BOLLERSLEV J: Associations between

body composition, circulating interleukin-1 receptor antagonist, osteocalcin, and insulin metabolism in active acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab* **95**(1): 361-368, 2010.

ULLRICH A, SCHLESSINGER J: Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* **61**(2): 203-212, 1990.

URONEN-HANSSON H, ALLEN ML, LICHTAROWICZ-KRYNSKA E, AYNSLEY-GREEN A, COLE TJ, HOIDEN-GUTHENBERG I, FRYKLUND L, KLEIN N: Growth hormone enhances proinflammatory cytokine production by monocytes in whole blood. *Growth Horm IGF Res* **13**(5): 282-286, 2003.

VAAG A, JENSEN CB, POULSEN P, BRONS C, PILGAARD K, GRUNNET L, VIELWERTH S, ALIBEGOVIC A: Metabolic aspects of insulin resistance in individuals born small for gestational age. *Horm Res* **65 Suppl 3**: 137-143, 2006.

VALVERDE AM, LORENZO M, NAVARRO P, BENITO M: Phosphatidylinositol 3-kinase is a requirement for insulin-like growth factor I-induced differentiation, but not for mitogenesis, in fetal brown adipocytes. *Mol Endocrinol* **11**(5): 595-607, 1997.

VALVERDE AM, LORENZO M, PONS S, WHITE MF, BENITO M: Insulin receptor substrate (IRS) proteins IRS-1 and IRS-2 differential signaling in the insulin/insulin-like growth factor-I pathways in fetal brown adipocytes. *Mol Endocrinol* **12**(5): 688-697, 1998.

VALVERDE AM, NAVARRO P, TERUEL T, CONEJO R, BENITO M, LORENZO M: Insulin and insulin-like growth factor I up-regulate GLUT4 gene expression in fetal brown adipocytes, in a phosphoinositide 3-kinase-dependent manner. *Biochem J* **337 ( Pt 3)**: 397-405, 1999.

VAN NECK JW, DITS NF, CINGEL V, HOPPENBROUWERS IA, DROP SL, FLYVBJERG A: Dose-response effects of a new growth hormone receptor antagonist (B2036-PEG) on circulating, hepatic and renal expression of the growth hormone/insulin-like growth factor system in adult mice. *J Endocrinol* **167**(2): 295-303, 2000.

VELAZQUEZ MA, HERMANN D, KUES WA, NIEMANN H: Increased apoptosis in bovine blastocysts exposed to high levels of IGF1 is not associated with downregulation of the IGF1 receptor. *Reproduction* **141**(1): 91-103, 2011.

VIJAYAKUMAR A, WU, Y., SUN, H., LI, X., JEDDY, Z., LIU, C., SCHWARTZ, G. J., YAKAR, S., LEROITH, D.: Targeted loss of GHR signaling in mouse skeletal muscle protects against high-fat diet-induced metabolic deterioration. *Diabetes* **61**(1): 94-103, 2012.

VIKMAN K, CARLSSON B, BILLIG H, EDEN S: B Expression and regulation of growth hormone (GH) receptor messenger ribonucleic acid (mRNA) in rat adipose tissue, adipocytes, and adipocyte precursor cells: GH regulation of GH receptor mRNA. *Endocrinology* **129**(3): 1155-1161, 1991.

VIKMAN K, ISGAARD J, EDEN S: Growth hormone regulation of insulin-like growth factor-I mRNA in rat adipose tissue and isolated rat adipocytes. *J Endocrinol* **131**(1): 139-145, 1991.

VINCENT AM, FELDMAN EL: Control of cell survival by IGF signaling pathways. *Growth Horm IGF Res* **12**(4): 193-197, 2002.

WABITSCH M, BLUM WF, MUCHE R, HEINZE E, HAUG C, MAYER H, TELLER W: C Insulin-like growth factors and their binding proteins before and after weight loss and their associations with hormonal and metabolic parameters in obese adolescent girls. *Int J Obes Relat Metab Disord* **20**(12): 1073-1080, 1996.

WABITSCH M, BRAUN S, HAUNER H, HEINZE E, ILONDO MM, SHYMKO R, DE MEYTS P, TELLER WM: A-Mitogenic and antiadipogenic properties of human growth hormone in differentiating human adipocyte precursor cells in primary culture. *Pediatr Res* **40**(3): 450-456, 1996.

WABITSCH M, HAUNER H, HEINZE E, TELLER WM: The role of growth hormone/insulin-like growth factors in adipocyte differentiation. *Metabolism* **44**(10 Suppl 4): 45-49, 1995.

WABITSCH M, HEINZE E, HAUNER H, SHYMKO RM, TELLER WM, DE MEYTS P, ILONDO MM: B-Biological effects of human growth hormone in rat adipocyte precursor cells and newly differentiated adipocytes in primary culture. *Metabolism* **45**(1): 34-42, 1996.

WABITSCH M, HEINZE E, DEBATIN, K. M., BLUM, W. F.: IGF-I- and IGFBP-3-expression in cultured human preadipocytes and adipocytes. *Horm Metab Res* **32**(11-12): 555-559, 2000.

WABITSCH M HH, HEINZE E, TELLER WM.: The role of growth hormone/insulin-like growth factors in adipocyte differentiation. *Metabolism* **44**(10 Suppl 4): 45-49, 1995 Oct.

WAN YJ, HAN G, CAI Y, DAI T, KONISHI T, LENG AS: Hepatocyte retinoid X receptor-alpha-deficient mice have reduced food intake, increased body weight, and improved glucose tolerance. *Endocrinology* **144**(2): 605-611, 2003.

WANG B, BOBE G, LAPRES JJ, BOURQUIN LD: Dietary carbohydrate source alters gene expression profile of intestinal epithelium in mice. *Nutr Cancer* **61**(1): 146-155, 2009.

WANG JW, LI Y, MAO ZG, HU B, JIANG XB, SONG BB, WANG X, ZHU YH, WANG HJ: Clinical applications of somatostatin analogs for growth hormone-secreting pituitary adenomas. *Patient Prefer Adherence* **8**: 43-51, 2014.

WANG X, JIANG J, WARRAM J, BAUMANN G, GAN Y, MENON RK, DENSON LA, ZINN KR, FRANK SJ: Endotoxin-induced proteolytic reduction in hepatic growth hormone (GH) receptor: a novel mechanism for GH insensitivity. *Mol Endocrinol* **22**(6): 1427-1437, 2008.

WANG X, WANG L, ZHU L, PAN Y, XIAO F, LIU W, WANG Z, GUO F, LIU Y, THOMAS WG, CHEN Y: PAQR3 modulates insulin signaling by shunting phosphoinositide 3-kinase p110alpha to the Golgi apparatus. *Diabetes* **62**(2): 444-456, 2013.

WANG Z, AL-REGAIEY KA, MASTERNAK MM, BARTKE A: Adipocytokines and lipid levels in Ames dwarf and calorie-restricted mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **61**(4): 323-331, 2006.

WANG Z, MASTERNAK MM, AL-REGAIEY KA, BARTKE A: Adipocytokines and the regulation of lipid metabolism in growth hormone transgenic and calorie-restricted mice. *Endocrinology* **148**(6): 2845-2853, 2007.

WARWICK-DAVIES J, LOWRIE DB, COLE PJ: A-Growth hormone is a human macrophage activating factor. Priming of human monocytes for enhanced release of H2O2. *J Immunol* **154**(4): 1909-1918, 1995.

WASS JA: Growth hormone, insulin-like growth factor-I and its binding proteins in the follow-up of acromegaly. *J Endocrinol* **155** Suppl 1: S17-19; discussion S21, 1997.

WATERS MJ: The growth hormone receptor. *Growth Horm IGF Res*, 2015.

WATERS MJ, BROOKS AJ, CHHABRA Y: A new mechanism for growth hormone receptor activation of JAK2, and implications for related cytokine receptors. *JAKSTAT* **3**: e29569, 2014.

WATTSON DA, TANGUTURI SK, SPIEGEL DY, NIEMIERKO A, BILLER BM, NACHTIGALL LB, BUSSIÈRE MR, SWEARINGEN B, CHAPMAN PH, LOEFFLER JS, SHIH HA: Outcomes of proton therapy for patients with functional pituitary adenomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **90**(3): 532-539, 2014.

WEIGENT DA: Immunoregulatory properties of growth hormone and prolactin. *Pharmacol Ther* **69**(3): 237-257, 1996.

WEILAND M, BAHR F, HOHNE M, SCHURMANN A, ZIEHM D, JOOST HG: The signaling potential of the receptors for insulin and insulin-like growth factor I (IGF-I) in 3T3-

L1 adipocytes: comparison of glucose transport activity, induction of oncogene c-fos, glucose transporter mRNA, and DNA-synthesis. *J Cell Physiol* **149**(3): 428-435, 1991.

WEISBERG SP, MCCANN D, DESAI M, ROSENBAUM M, LEIBEL RL, FERRANTE AW, JR.: Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* **112**(12): 1796-1808, 2003.

WEISS O, ANNER H, NEPHESE I, ALAYOFF A, BURSZTYN M, RAZ I: Insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-I receptor gene expression in the kidney of the chronically hypoinsulinemic rat and hyperinsulinemic rat. *Metabolism* **44**(8): 982-986, 1995.

WESTER TJ, DAVIS TA, FIOROTTO ML, BURRIN DG: Exogenous growth hormone stimulates somatotrophic axis function and growth in neonatal pigs. *Am J Physiol* **274**(1 Pt 1): E29-37, 1998.

WHEATCROFT SB, KEARNEY MT, SHAH AM, EZZAT VA, MIELL JR, MODO M, WILLIAMS SC, CAWTHORN WP, MEDINA-GOMEZ G, VIDAL-PUIG A, SETHI JK, CROSSEY PA: IGF-binding protein-2 protects against the development of obesity and insulin resistance. *Diabetes* **56**(2): 285-294, 2007.

WHEATCROFT SB, KEARNEY MT, SHAH AM, GRIEVE DJ, WILLIAMS IL, MIELL JP, CROSSEY PA: Vascular endothelial function and blood pressure homeostasis in mice overexpressing IGF binding protein-1. *Diabetes* **52**(8): 2075-2082, 2003.

WILLIAMS AC, SMARTT H, AM HZ, MACFARLANE M, PARASKEVA C, COLLARD TJ: Insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP-3) potentiates TRAIL-induced apoptosis of human colorectal carcinoma cells through inhibition of NF-kappaB. *Cell Death Differ* **14**(1): 137-145, 2007.

WINNAY JN, BOUCHER J, MORI MA, UEKI K, KAHN CR: A regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase increases the nuclear accumulation of X-box-binding protein-1 to modulate the unfolded protein response. *Nat Med* **16**(4): 438-445, 2010.

WOJNAR MM, FAN J, LI YH, LANG CH: Endotoxin-induced changes in IGF-I differ in rats provided enteral vs. parenteral nutrition. *Am J Physiol* **276**(3 Pt 1): E455-464, 1999.

WOLF E, KRAMER R, BLUM WF, FOLL J, BREM G: Consequences of postnatally elevated insulin-like growth factor-II in transgenic mice: endocrine changes and effects on body and organ growth. *Endocrinology* **135**(5): 1877-1886, 1994.

WU Y, SUN H, BASTA-PLJAKIC J, CARDOSO L, KENNEDY OD, JASPER H, DOMENE H, KARABATAS L, GUIDA C, SCHAFFLER MB, ROSEN CJ, YAKAR S: Serum IGF-1 is insufficient to restore skeletal size in the total absence of the growth hormone receptor. *J Bone Miner Res* **28**(7): 1575-1586, 2013.

XI G, SOLUM MA, WAI C, MAILE LA, ROSEN CJ, CLEMMONS DR: The heparin-binding domains of IGFBP-2 mediate its inhibitory effect on preadipocyte differentiation and fat development in male mice. *Endocrinology* **154**(11): 4146-4157, 2013.

XU H, BARNES GT, YANG Q, TAN G, YANG D, CHOU CJ, SOLE J, NICHOLS A, ROSS JS, TARTAGLIA LA, CHEN H: Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* **112**(12): 1821-1830, 2003.

XU J MJ: Crosstalk between growth hormone and insulin signaling. *Vitam Horm.* **80**(125-53), 2009.

YAKAR S, KIM H, ZHAO H, TOYOSHIMA Y, PENNISI P, GAVRILOVA O, LEROITH D: B The growth hormone-insulin like growth factor axis revisited: lessons from IGF-1 and IGF-1 receptor gene targeting. *Pediatr Nephrol* **20**(3): 251-254, 2005.

YAKAR S, LIU JL, FERNANDEZ AM, WU Y, SCHALLY AV, FRYSTYK J, CHERNAUSEK SD, MEJIA W, LE ROITH D: Liver-specific igf-1 gene deletion leads to muscle insulin insensitivity. *Diabetes* **50**(5): 1110-1118, 2001.

YAKAR S, PENNISI P, KIM CH, ZHAO H, TOYOSHIMA Y, GAVRILOVA O, LEROITH D: A Studies involving the GH-IGF axis: Lessons from IGF-I and IGF-I receptor gene targeting mouse models. *J Endocrinol Invest* **28**(5 Suppl): 19-22, 2005.

YAKAR S, SETSER J, ZHAO H, STANNARD B, HALUZIK M, GLATT V, BOUXSEIN ML, KOPCHICK JJ, LEROITH D: Inhibition of growth hormone action improves insulin sensitivity in liver IGF-1-deficient mice. *J Clin Invest* **113**(1): 96-105, 2004.

YAMADA PM MH, HWANG D, ROOS KP, HEVENER AL, LEE KW.: Evidence of a role for insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-3 in metabolicregulation. *Endocrinology*. **151**(12): 5741-5750, 2010 Dec.

YANG HL, SUN C, SUN C, QI RL: Effect of suppressor of cytokine signaling 2 (SOCS2) on fat metabolism induced by growth hormone (GH) in porcine primary adipocyte. *Mol Biol Rep* **39**(9): 9113-9122, 2012.

YANG N, HUANG Y, JIANG J, FRANK SJ: Caveolar and lipid raft localization of the growth hormone receptor and its signaling elements: impact on growth hormone signaling. *J Biol Chem* **279**(20): 20898-20905, 2004.

YAU SW, HENRY BA, RUSSO VC, MCCONELL GK, CLARKE IJ, WERTHER GA, SABIN MA: Leptin enhances insulin sensitivity by direct and sympathetic nervous system regulation of muscle IGFBP-2 expression: evidence from nonrodent models. *Endocrinology* **155**(6): 2133-2143, 2014.

YAU SW, RUSSO VC, CLARKE IJ, DUNSHEA FR, WERTHER GA, SABIN MA: IGFBP-2 inhibits adipogenesis and lipogenesis in human visceral, but not subcutaneous, adipocytes. *Int J Obes (Lond)* **39**(5): 770-781, 2015.

YEOP HAN C, KARGI AY, OMER M, CHAN CK, WABITSCH M, O'BRIEN KD, WIGHT TN, CHAIT A: Differential effect of saturated and unsaturated free fatty acids on the generation of monocyte adhesion and chemotactic factors by adipocytes: dissociation of adipocyte hypertrophy from inflammation. *Diabetes* **59**(2): 386-396, 2010.

YOO EG, LEE WJ, KIM JH, CHAE HW, HYUN SE, KIM DH, KIM HS, OH Y: Insulin-like growth factor-binding protein-3 mediates high glucose-induced apoptosis by increasing oxidative stress in proximal tubular epithelial cells. *Endocrinology* **152**(8): 3135-3142, 2011.

YOUNIS HS, HIRAKAWA B, SCOTT W, TRAN P, BHAT G, AFFOLTER T, CHAPMAN J, HEYEN J, CHAKRAVARTY K, ALTON G: Antisense inhibition of S6 kinase 1 produces improved glucose tolerance and is well tolerated for 4 weeks of treatment in rats. *Pharmacology* **87**(1-2): 11-23, 2011.

YU J, ZHANG Y, MCILROY J, RORDORF-NIKOLIC T, ORR GA, BACKER JM: Regulation of the p85/p110 phosphatidylinositol 3'-kinase: stabilization and inhibition of the p110alpha catalytic subunit by the p85 regulatory subunit. *Mol Cell Biol* **18**(3): 1379-1387, 1998.

ZAKOVICOVA E ZVJ: Vliv endokrinních onemocnění na kompenzaci diabetes mellitus, sekundární diabetes mellitus. *Postgrad Med* **4**, 2009.

ZARKESH-ESFAHANI SH(1) KO, METCALFE RA, WATSON PF, VON LAUE S, WALTERS S., REVHAUG A WA, ROSS RJ.: High-dose growth hormone does not affect proinflammatory cytokine (tumor necrosis factor-alpha, interleukin-6, and interferon-gamma) release from activated peripheral blood mononuclear cells or after minimal to moderate surgical stress. *J Clin Endocrinol Metab* **85**: 3383-3390, 2000 Sep.

ZEYDA M, STULNIG TM: Obesity, inflammation, and insulin resistance--a mini-review. *Gerontology* **55**(4): 379-386, 2009.

ZHANG JG, FARLEY A, NICHOLSON SE, WILLSON TA, ZUGARO LM, SIMPSON RJ, MORITZ RL, CARY D, RICHARDSON R, HAUSMANN G, KILE BJ, KENT SB, ALEXANDER WS, METCALF D, HILTON DJ, NICOLA NA, BACA M: The conserved SOCS box motif in suppressors of cytokine signaling binds to elongins B and C and may



couple bound proteins to proteasomal degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(5): 2071-2076, 1999.

ZHANG Q, JIANG Y, TOUTOUNCHIAN JJ, SODERLAND C, YATES CR, STEINLE JJ: A-Insulin-like growth factor binding protein-3 inhibits monocyte adhesion to retinal endothelial cells in high glucose conditions. *Mol Vis* **19**: 796-803, 2013.

ZHANG Q, SODERLAND C, STEINLE JJ: B-Regulation of retinal endothelial cell apoptosis through activation of the IGFBP-3 receptor. *Apoptosis* **18**(3): 361-368, 2013.

ZHANG Q, SODERLAND D, STEINLE JJ: TNFalpha inhibits IGFBP-3 through activation of p38alpha and casein kinase 2 in human retinal endothelial cells. *PLoS One* **9**(7): e103578, 2014.

ZHANG YK, WU KC, LIU J, KLAASSEN CD: Nrf2 deficiency improves glucose tolerance in mice fed a high-fat diet. *Toxicol Appl Pharmacol* **264**(3): 305-314, 2012.

ZHAO AZ, ZHANG ZH, TEAGUE J, FUJIMOTO W, BEAVO JA: Attenuation of insulin secretion by insulin-like growth factor 1 is mediated through activation of phosphodiesterase 3B. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(7): 3223-3228, 1997.

ZHAO JT, COWLEY MJ, LEE P, BIRZNIECE V, KAPLAN W, HO KK: Identification of novel GH-regulated pathway of lipid metabolism in adipose tissue: a gene expression study in hypopituitary men. *J Clin Endocrinol Metab* **96**(7): E1188-1196, 2011.

ZHAO L, WANG A, CORL BA, JIANG H: Effect of growth hormone on the differentiation of bovine preadipocytes into adipocytes and the role of the signal transducer and activator of transcription 5b. *J Anim Sci* **92**(5): 1958-1967, 2014.

ZHAO P, DENG Y, GU P, WANG Y, ZHOU H, HU Y, CHEN P, FAN X: Insulin-like growth factor 1 promotes the proliferation and adipogenesis of orbital adipose-derived stromal cells in thyroid-associated ophthalmopathy. *Exp Eye Res* **107**: 65-73, 2013.

ZHENG WH, KAR S, QUIRION R: Insulin-like growth factor-1-induced phosphorylation of transcription factor FKHRL1 is mediated by phosphatidylinositol 3-kinase/Akt kinase and role of this pathway in insulin-like growth factor-1-induced survival of cultured hippocampal neurons. *Mol Pharmacol* **62**(2): 225-233, 2002.

ZOU L, MENON RK, SPERLING MA: Induction of mRNAs for the growth hormone receptor gene during mouse 3T3-L1 preadipocyte differentiation. *Metabolism* **46**(1): 114-118, 1997.

\* Zdroje k Obrázku 5:

<http://www.hindawi.com/journals/cggr/2012/384094.fig.001.jpg>,  
<http://www.clinicalnutritionjournal.com/cms/attachment/392655/2714656/gr1.jpg>,  
<http://www.cell.com/cms/attachment/557794/4000564/gr3.jpg>,  
[http://www.jcsm.info/documents/1104/Growth%20hormone,%20insulin-like%20growth%20factor%201,%20and%20insulin-Dateien/13539\\_2011\\_43\\_Fig1\\_HTML.gif](http://www.jcsm.info/documents/1104/Growth%20hormone,%20insulin-like%20growth%20factor%201,%20and%20insulin-Dateien/13539_2011_43_Fig1_HTML.gif),  
<http://www.ohsu.edu/xd/health/services/doernbecher/research-education/research/research-labs/ron-rosenfeld-lab.cfm>,  
<http://diabetesmanager.pbworks.com/f/1241631181/figure3.png>

## 15. PŘÍLOHY

### 15.1 Prohlášení autora

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 23.6. 2016

MUDr. Věra Toušková

### 15.2 Identifikační záznam

TOUŠKOVÁ, Věra. *Úloha komponent osy GH/IGF-1 v etiopatogeneze metabolických odchylek u diabetes mellitus 2. typu a akromegalie.* [The role of GH/IGF-1 axis components in the etiopathogenesis of metabolic disturbances in type 2 diabetes mellitus and acromegaly]. Praha, 2016. 178 stran. 4 přílohy. Dizertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, 3. interní klinika. Školitel: Haluzík, Martin.

### 15.3 Plné texty vlastních publikací tvořících podklady dizertační práce

Touskova V, Trachta P, Kavalkova P, Drapalova J, Haluzikova D, Mraz M, Lacinova Z, Marek J, Haluzik M. Serum concentrations and tissue expression of components of insulin-like growth factor-axis in females with type 2 diabetes mellitus and obesity: the influence of very-low-calorie diet. *Mol Cell Endocrinol.* 2012 Sep 25;361(1-2):172-8. doi: 10.1016/j.mce.2012.04.005. Epub 2012 Apr 24.

Touskova V, Klouckova J, Durovcova V, Lacinova Z, Kavalkova P, Trachta P, Kosak M, Mraz M, Haluzikova D, Hana V, Marek J, Krsek M a Haluzik M. The possible role of mRNA expression changes of GH/IGF-1/insulin axis components in subcutaneous adipose tissue in metabolic disturbances of patients with acromegaly. *Physiol Res.* 2016 Apr 12. [Epub ahead of print]



## Serum concentrations and tissue expression of components of insulin-like growth factor-axis in females with type 2 diabetes mellitus and obesity: The influence of very-low-calorie diet

V. Touskova<sup>a</sup>, P. Trachta<sup>a</sup>, P. Kavalkova<sup>a</sup>, J. Drapalova<sup>a</sup>, D. Haluzikova<sup>b</sup>, M. Mraz<sup>a</sup>, Z. Lacinova<sup>a</sup>, J. Marek<sup>a</sup>, M. Haluzik<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Third Department of Medicine, General University Hospital and First Faculty of Medicine, Charles University, 128 08 Prague 2, Czech Republic

<sup>b</sup>Department of Sports Medicine, General University Hospital and First Faculty of Medicine, Charles University, 128 08 Prague 2, Czech Republic

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 14 November 2011  
Received in revised form 13 April 2012  
Accepted 14 April 2012  
Available online 24 April 2012

#### Keywords:

Obesity  
Insulin-like growth factor-1  
Insulin-like growth factor-1 receptor  
Insulin-like growth factor binding protein  
Monocytes  
Adipose tissue

### ABSTRACT

We explored serum concentrations and mRNA expression of insulin-like-growth factor-1 (IGF-1) axis components in subcutaneous adipose tissue (SCAT) and peripheral monocytes (PM) of 18 healthy females, 11 obese non-diabetic females (OB) and 13 obese women with type 2 diabetes (T2DM) examined at baseline and after very-low-calorie diet (VLCD). T2DM women had decreased expression of IGF-1, IGF-1 receptor (IGF-1R), IGFBP-2 (IGF binding protein-2) and IGFBP-3 in SCAT and increased expression of IGF-1R in PM compared to control group. IGF-1R and IGFBP-3 mRNA expression in SCAT of OB was comparable to control group. In T2DM women VLCD increased serum levels and SCAT expression of IGFBP-2 and PM expression of IGFBP-3. We conclude that decreased IGF-1, IGF-1R and IGFBP-3 expression in SCAT and increased IGF-1R expression in PM of T2DM subjects might contribute to changes of fat differentiation capacity and to regulation of subclinical inflammation by PM, respectively. Increased SCAT and circulating IGFBP-2 and IGFBP-3 in PM might participate in metabolic improvements after VLCD.

© 2012 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Previous studies have shown that type 2 diabetes and pre-diabetic states are associated with altered circulating levels of IGF-1 and its binding proteins (IGFBPs) (Rajpathak et al., 2009). Most of cross-sectional studies have found that free IGF-1 levels are elevated in patients with impaired glucose tolerance and T2DM, while total IGF-1 levels are within normal range (Frystyk et al., 1999) or slightly decreased (Rasmussen et al., 2006). IGFBP-1 levels were low in these patients (Dunger et al., 2004). Furthermore, increased circulating IGFBP-3 may be a risk factor for insulin resistance and T2DM (Rajpathak et al., 2009). In contrast to changes of circulating levels of IGF-1 and its binding proteins, little is known about the relationship between tissue mRNA expression of IGF-1 axis components and the disturbances in glucose metabolism which are

closely interconnected with the development of subclinical inflammation.

In previous studies, low-grade subclinical inflammation arising in adipose tissue in obesity has been proposed to play an important role in the development of insulin resistance and diabetes (Wellen et Hotamisligil, 2003; Xu et al., 2003; Hotamisligil, 2006) with both adipocytes as well as adipose tissue macrophages contributing to this inflammatory process (Mraz et al., 2011; del Pozo et al., 2011). It has been suggested that most of the adipose tissue macrophages in fat are derived from circulating monocytes recruited to adipose tissue by various chemoattractants (Cancello et al., 2005). Our previous study has shown that the interplay between adipose tissue and circulating monocytes may be critically important in the development of the systemic subclinical inflammation and type 2 diabetes (Mraz et al., 2011). In the present work we therefore tried to explore, whether IGF-1 axis components contribute to dysregulation of glucose metabolism and the development of subclinical inflammation on the level of mRNA expression in peripheral monocytes and subcutaneous adipose tissue.

Previously, IGF-1 has been suggested as an important regulator of glucose and lipid metabolism in humans (Frystyk et al., 1997), a mediator of hormonal effects on the immune system (Koojiman et al., 1992b) and a potential modulator of responses to a variety

*Abbreviations:* VLCD, very-low-calorie diet; IGF-1, insulin-like growth factor-1; IGFBP, insulin-like growth factor binding protein; IGF-1R, insulin-like growth factor-1 receptor; PM, peripheral monocytes; SCAT, subcutaneous adipose tissue; T2DM, type 2 diabetes mellitus; GH, growth hormone.

\* Corresponding author. Address: Third Department of Medicine, First Faculty of Medicine, U Nemocnice 1, 128 08 Prague 2, Czech Republic. Tel.: +420 224962908; fax: +420 224919780.

E-mail address: [mhalu@f1.cuni.cz](mailto:mhalu@f1.cuni.cz) (M. Haluzik).

of immunological challenges (Stuart et al., 1991). Several studies have shown that IGF-1 has a regulatory role in inflammatory processes (Kluge et al., 1997; Che et al., 2002) and is, together with other IGF axis components, implicated in the regulation of adipocyte differentiation and lipid accumulation *in vitro* (Kloting et al., 2008).

In the current study, we hypothesized that IGF-1 axis components might have a role in the interplay between adipose tissue and peripheral monocytes in the development of subclinical inflammation in obesity and type 2 diabetes mellitus and might contribute both to underlying metabolic disturbances in T2DM patients and the positive metabolic effect of dietary intervention. To this end, we measured serum levels and subcutaneous adipose tissue (SCAT) and peripheral monocytes (PM) mRNA expression of selected components of the IGF-axis in obese non-diabetic and obese type 2 diabetic patients at baseline and studied its modulation by short-term dietary intervention in patients with type 2 diabetes.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Study subjects

Thirteen obese women with type 2 diabetes mellitus (T2DM group), 11 obese non-diabetic females (OB group) and 18 healthy normal-weight age-matched women (C group) were included in the study. Because of possible gender-related differences in the studied factors that might affect the results, only one gender was selected for investigation. The reason for choosing females over males was that the proportion of females in our Obesity and Diabetes Department is higher than males, which made patient recruitment easier.

Five out of thirteen T2DM patients had been treated with oral antidiabetic drugs (metformin, sulphonylurea derivatives or thiazolidinediones), 4 were treated with insulin and the rest by diet only. The antidiabetic treatment remained unchanged for at least three months prior to the start of the study.

Twelve out of thirteen diabetic patients were on antihypertensive treatment, 5 patients were treated by statins, one by fibrate. 3 patients received thyroid hormone substitution therapy. None of the patients had acute decompensation of diabetes, malignant tumor or acute infectious disease. In the obese non-diabetic group, 4 patients were treated with antihypertensives and one of them was on lipid-lowering medication with a statin. Control subjects had no history of obesity and/or diabetes mellitus, arterial hypertension or lipid metabolism disturbances and received no medication. Blood tests confirmed normal blood count, biochemical and hormonal parameters.

Both T2DM subjects and non-diabetic OB subjects were consecutively hospitalized in the 3rd Department of Medicine, General University Hospital, Prague for planned intensive in-hospital intervention aimed at body weight reduction using very-low-calorie diet and complex reeducation of the patients. All T2DM patients underwent a 2-week very-low-calorie diet (VLCD) with energy intake of 2500 kJ/day (600 kcal/day). The diet consisted of 50 g (33%) of saccharides (15–20 g of mono- and disaccharides, 30–35 g of polysaccharides), 20 g (31%) of lipids (6–8 g of saturated fatty acids, 12–14 g of unsaturated fatty acids) and 55 g of proteins (36%) per day. The diet contained 20 g of fiber per day.

The body weight of all study participants remained stable for at least 3 months before the beginning of the study. Written informed consent was signed by all participants before being enrolled in the study. The study was approved by Human Ethical Review Committee, 1st Faculty of Medicine and General University Hospital, Prague, Czech Republic, and was performed in accordance with the guidelines proposed in Declaration of Helsinki.

### 2.2. Anthropometric examination, blood and adipose tissue sampling

All patients with type 2 diabetes mellitus were examined twice; at basal state before the beginning of any intervention and after two weeks of VLCD, while obese non-diabetic and normal-weight healthy women were examined only once. All subjects were measured and weighted and their body mass index (BMI) was calculated. Percentage of total body fat was examined by bioimpedance analysis (Multi-frequency Bodystat QuadScan 4000, Douglas, UK) at body current flow of 5, 50, 100 and 200 kHz, respectively. Blood samples for IGF-1, IGFBPs, insulin, and biochemical parameters measurement were withdrawn between 07:00 and 08:00 h after 12 h of overnight fasting. Blood samples were separated by centrifugation for 10 min at 1000g within 30 min from blood collection. Serum was subsequently stored in aliquots at  $-80^{\circ}\text{C}$  until further analysis.

Blood samples for monocyte isolation were collected in Na-EDTA anticoagulant from all subjects and processed within 1–2 h.

Samples of subcutaneous adipose tissue for mRNA expression analysis were obtained from the abdominal region as described previously elsewhere (Dolezalova et al., 2007). Approximately 100 mg of tissue was collected to 1 ml of RNA stabilization Reagent (RNA later, Qiagen, Germany) and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until further analysis.

### 2.3. Hormonal and biochemical assays

Serum levels of total insulin-like growth factor-1 (IGF-1) were measured by IRMA kit (Immunotech, Prague, Czech Republic). LOD (Limit of detection) and LOQ (Limit of quantitation) were 12.0 ng/ml. Plasma levels of free insulin-like growth factor-1 (Free IGF-1) were measured by ELISA kit (Diagnostic Systems Laboratories, Inc., Webster, USA). LOD and LOQ was 0.015 ng/ml. Serum IGFBP-1, IGFBP-2 and IGFBP-3 levels were measured by ELISA kits (DiaSource ImmunoAssays S.A., Nivelles, Belgium). LOD was 0.4 ng/ml for IGFBP-1, 0.2 ng/ml for IGFBP-2 and 10 ng/ml for IGFBP-3. LOQ was 6.4 ng/ml for IGFBP-1, 4.2 ng/ml for IGFBP-2 and 10 ng/ml for IGFBP-3. Growth hormone (GH) levels were measured by IRMA kits (Immunotech, Prague, Czech Republic). LOD and LOQ were 0.10 mIU/l. Insulin concentrations were measured by RIA kit (Cis Bio International, Gif-sur-Yvette, France). LOD and LOQ were 2.0  $\mu\text{IU/ml}$ . Serum adiponectin levels were measured by commercial ELISA kit (Linco Research, St. Charles, Missouri, USA). LOD was 0.78 ng/ml and LOQ was 390 ng/ml. Serum leptin concentrations were measured by commercial ELISA kit (Biovendor, Brno, Czech Republic). LOD and LOQ were 0.2 ng/ml. Serum C-reactive protein (CRP) levels were measured by high sensitive ELISA (Bender Medsystems, Vienna, Austria) with a LOD of 3 pg/ml and LOQ 1.5 ng/ml. Serum estradiol concentrations were measured by chemiluminescent microparticle immunoassay (CMIA) technology, referred to as Chemiflex<sup>TM</sup> (ABBOTT Laboratories, IL 60064 USA). LOD and LOQ were 0.04 nmol/l.

The intra- and interassay variabilities for all methods were less than 5.0 and 10.0%, respectively.

Biochemical parameters (glucose, total and HDL-cholesterol and triglycerides) were measured in the Department of Biochemistry of General University Hospital, Prague by standard laboratory methods. The value of LDL-cholesterol was calculated according to Friedewald formula.

Glycated hemoglobin was analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC) on Variant II BioRad analyzer (BioRad).

### 2.4. Peripheral monocyte separation and total RNA isolation from monocytes and adipose tissue

Peripheral blood leukocytes were obtained from blood sample using Ficoll-Paque<sup>TM</sup> Plus (Amersham Biosciences AB, Sweden).

Monocytes were isolated from cell pellet with magnetic activated cell sorting technique (MiniMacs Miltenyi Biotec, Germany) using microbeads coated with CD14 antibody (MACS CD14 MicroBeads; Miltenyi Biotec, Germany). Total RNA was extracted from CD14 + monocyte samples on MagNA Pure instrument using MagNA Pure Compact RNA Isolation kit (Roche Diagnostics GmbH, Germany) as described in detail previously elsewhere (Mraz et al., 2011).

Samples of subcutaneous adipose tissue were homogenized on a MagNA Lyser Instrument using MagNA Lyser Green Beads (Roche Diagnostics GmbH, Germany). Total RNA was extracted from the homogenized sample using RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) as described in detail previously (Lacinova et al., 2008). The RNA concentration was determined from absorbance at 260 nm on a BioPhotometer (Eppendorf AG, Hamburg, Germany). The integrity of the RNA was checked by visualization of 18S and 28S ribosomal bands on 1% agarose gel with ethidium bromide.

### 2.5. Determination of mRNA expression by quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

Total RNA was used for reverse transcription to synthesize the first strand cDNA. Reverse transcription was performed using 0.25 µg of total RNA to synthesize the first strand cDNA using the random primers as per the instructions of the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Further cDNA was used for determination of relative gene expression of IGF-1, IGF-2, IGF-1R, IGFBP-1, IGFBP-2 and IGFBP-3 by qRT-PCR using TaqMan® Universal PCR MasterMix, NO AmpErase® UNG and specific TaqMan Gene expression Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA). The catalogue numbers for the assays were as follows: IGF-1 (Hs01547656\_m1), IGF-2 (Hs01005963\_m1), IGF-1R (Hs99999020\_m1), IGFBP-1 (Hs00426285\_m1), IGFBP-2 (Hs01040719\_m1) and IGFBP-3 (Hs00426289\_m1). Measurements of gene expression were performed on an ABI PRISM 7500 instrument (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Forty-five cycles were run with the following parameters: 2 min at 50 °C, 10 min at 95 °C and for each cycle 15 s at 95 °C for denaturation and 1 min at 60 °C for elongation. Controls with no template cDNA were performed with each assay and all samples were run in duplicate at a minimum. The increase in fluorescence was measured in real time and threshold cycle (Ct) values were obtained. To compensate for variations in the amount of RNA used and the variable efficiency of reverse transcription, the target gene Ct number was normalized to the endogenous reference beta-2-microglobulin (B2M) and the formula  $2^{-\Delta Ct}$  ( $\Delta Ct = Ct_{\text{Target}} - Ct_{\text{B2M}}$ ) was used to calculate relative gene expression. Quantification of mRNA was performed as described in detail previously elsewhere (Dolezalova et al., 2007).

### 2.6. Statistical analysis

Statistical analysis was performed on SigmaStat software (SPSS Inc., Chicago, IL). Anthropometric, biochemical, hormonal and gene expression results are expressed as means ± SEM (standard error of the means). Differences of serum parameters and gene expression between obese with/without T2DM and non-obese were evaluated using One-Way ANOVA followed by Holm-Sidak method or ANOVA on Ranks followed by Dunn's test as appropriate. Differences between obese women with T2DM before and after VLCD were evaluated using paired *t*-test or Wilcoxon Signed-Rank test as appropriate. Statistical significance was assigned to  $p < 0.05$ .

Spearman correlation test was used to calculate the relationships between serum IGF-1, IGFBP-1, IGFBP-2 levels, relative gene expression of IGF-1, IGFBP-3, IGF-1R in adipose tissue or relative gene expression of IGF-1R, IGFBP-3 in peripheral monocytes and other parameters. A  $p$  value  $< 0.05$  denoted statistical significance.

## 3. Results

### 3.1. Clinical, hormonal and metabolic characteristics of study subjects

Anthropometric, biochemical and hormonal characteristics of all study groups are summarized in Table 1. As expected, body weight, BMI, waist circumference and % of total body fat, circulating CRP and leptin levels were increased in both OB and T2DM patients relative to control group. On the contrary, circulating adiponectin levels were decreased in both OB and T2DM subjects compared to control group. Serum concentrations of insulin, glucose, HbA1c, triglycerides and HOMA-IR index were significantly increased and serum HDL-cholesterol levels were decreased in T2DM patients compared with control group. Serum levels of total and LDL-cholesterol did not differ among the groups (data not shown). Estradiol levels did not significantly differ among the groups. Serum levels of total IGF-1, IGFBP-1 and GH were significantly lower in obese women both with and without T2DM compared to controls. IGFBP-2 level was significantly decreased in obese women without diabetes, while in obese diabetic women IGFBP-2 level did not significantly differ from the control group. Similarly, levels of IGFBP-3 and free IGF-1 did not significantly differ among the groups.

### 3.2. Clinical, hormonal and metabolic characteristics of T2DM patients after VLCD

The influence of VLCD on anthropometric, biochemical and hormonal parameters is summarized in Table 1. Two weeks of VLCD in T2DM subjects significantly reduced BMI, body weight, waist circumference, HOMA-IR, levels of glucose, CRP, total cholesterol (data not shown), leptin and further reduced serum total IGF-1 concentrations. On the contrary, IGFBP-2 levels significantly increased after VLCD. Serum insulin, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, triglycerides, adiponectin as well as free IGF-1, IGFBP-1 and -3 levels were not significantly affected by VLCD. HbA1c was not assessed after VLCD.

### 3.3. mRNA expression of IGF-axis components in peripheral monocytes and subcutaneous adipose tissue

In peripheral monocytes, mRNA expression of IGF-1R was significantly increased in T2DM women compared to control group (Fig. 1A) and did not differ between OB and control group. IGFBP-3 and IGFBP-2 mRNA expression in PM did not significantly differ among the groups (data for IGFBP-2 not shown). mRNA expression of IGF-1, IGF-2 and IGFBP-1 was not detected in PM in any of the studied groups. Two weeks of VLCD did not change the IGF-1R and IGFBP-2 mRNA expression. After VLCD the IGFBP-3 mRNA expression in T2DM group became significantly higher compared to control and obese non-diabetic group (Fig. 1B).

In subcutaneous adipose tissue, IGF-1 and IGFBP-2 mRNA expression was decreased in T2DM women compared to control group (Fig. 2A and C) and IGF-1R and IGFBP-3 mRNA expression was significantly decreased in T2DM women compared to control and obese non-diabetic group (Fig. 2B and D). After VLCD, IGF-1, IGF-1R and IGFBP-3 expression did not change, whereas IGFBP-2 mRNA expression increased (Fig. 2C). mRNA expression of IGFBP-1 was not detected in SCAT. IGF-2 expression did not differ among the groups and was not affected by VLCD (data not shown).

### 3.4. Relationship of circulating IGF-axis components and its expression in PM and SCAT to other parameters

The relationship of circulating IGF-axis components and its mRNA expression in PM and SCAT to other parameters was



**Table 1**  
Clinical, hormonal and metabolic characteristics of study subjects.

	Controls	Obese non-diabetic	Obese T2DM	
			Before VLCD	After VLCD
Number (n)	18	11	13	13
Age (years)	49.5 ± 2.3	48.7 ± 3.0	54.2 ± 2.0	54.2 ± 2.0
Body mass index (kg/m <sup>2</sup> )	23.8 ± 0.4	45.0 ± 3.5*	51.8 ± 2.5*	49.1 ± 2.3* <sup>o</sup>
Body weight (kg)	67.9 ± 1.6	124.8 ± 7.7*	138.3 ± 6.3*	128.8 ± 5.9* <sup>o</sup>
Waist circumference (cm)	81 ± 2	126 ± 5*	137 ± 5*	133 ± 5* <sup>o</sup>
CRP (mg/l)	0.27 ± 0.10	1.57 ± 0.30*	2.44 ± 0.59*	1.55 ± 0.44* <sup>o</sup>
Fasting insulin (mIU/l)	18.7 ± 1.1	28.3 ± 4.0	30.8 ± 3.4*	27.3 ± 3.9
Fasting blood glucose (mmol/l)	4.77 ± 0.09	5.08 ± 0.27	8.35 ± 1.16*	6.45 ± 0.68* <sup>o</sup>
HbA1c (% IFCC)	3.58 ± 0.13	4.43 ± 0.39	6.58 ± 0.53*	Not assessed
HOMA-IR index	3.97 ± 0.26	6.45 ± 1.02	12.07 ± 1.93*	8.75 ± 1.43* <sup>o</sup>
HDL cholesterol (mmol/l)	1.67 ± 0.09	1.29 ± 0.15	1.04 ± 0.04*	0.95 ± 0.06*
Triglycerides (mmol/l)	1.19 ± 0.14	1.73 ± 0.36	1.91 ± 0.18*	1.68 ± 0.16
Leptin (ng/ml)	16.4 ± 2.6	56.1 ± 3.9*	60.8 ± 10.1*	52.4 ± 10.4* <sup>o</sup>
Adiponectin (mg/l)	13.2 ± 1.3	8.4 ± 1.1*	7.9 ± 1.3*	7.5 ± 0.8*
Estradiol (nmol/l)	0.24 ± 0.07	0.09 ± 0.01	0.22 ± 0.07	Not assessed
Free IGF-1 (ng/ml)	1.06 ± 0.22	0.72 ± 0.21	1.04 ± 0.12	0.89 ± 0.12
Total IGF-1 (μg/l)	200 ± 26	111 ± 23*	143 ± 14*	116 ± 13* <sup>o</sup>
IGFBP-1 (μg/l)	7.03 ± 1.18	2.13 ± 0.52*	2.25 ± 0.50*	2.50 ± 0.79
IGFBP-3 (mg/l)	2.95 ± 0.12	3.14 ± 0.21	2.86 ± 0.18	2.78 ± 0.15
IGFBP-2 (ng/ml)	344 ± 44	178 ± 36*	232 ± 30	259 ± 23*
GH (mIU/l)	14.18 ± 3.73	1.00 ± 0.33*	0.99 ± 0.23*	0.99 ± 0.20*

T2DM: type 2 diabetes mellitus, VLCD, very-low-calorie diet, IFCC, International Federation of Clinical Chemistry; IGF-1, insulin-like growth factor-1; IGFBP, insulin-like growth factor binding protein; GH, growth hormone.

Values are means ± SEM. Statistical significance is from One Way ANOVA or ANOVA on ranks as appropriate. Differences between obese women with T2DM before and after VLCD were evaluated using paired *t*-test or Wilcoxon Signed-Rank test as appropriate. Statistical significance was assigned to *p* < 0.05.

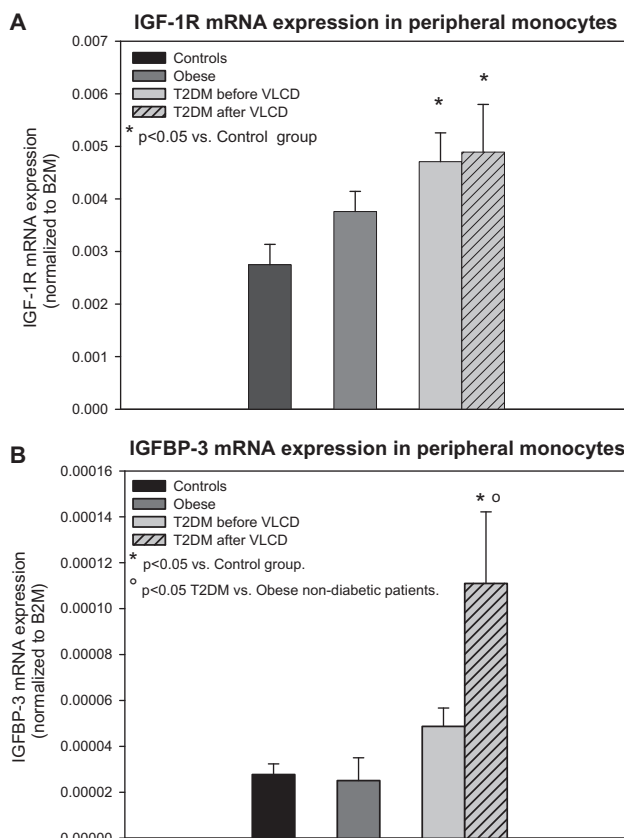
\**p* < 0.05 vs. non-obese controls, <sup>o</sup>*p* < 0.05 vs. T2DM before VLCD.

NS, non-significant.

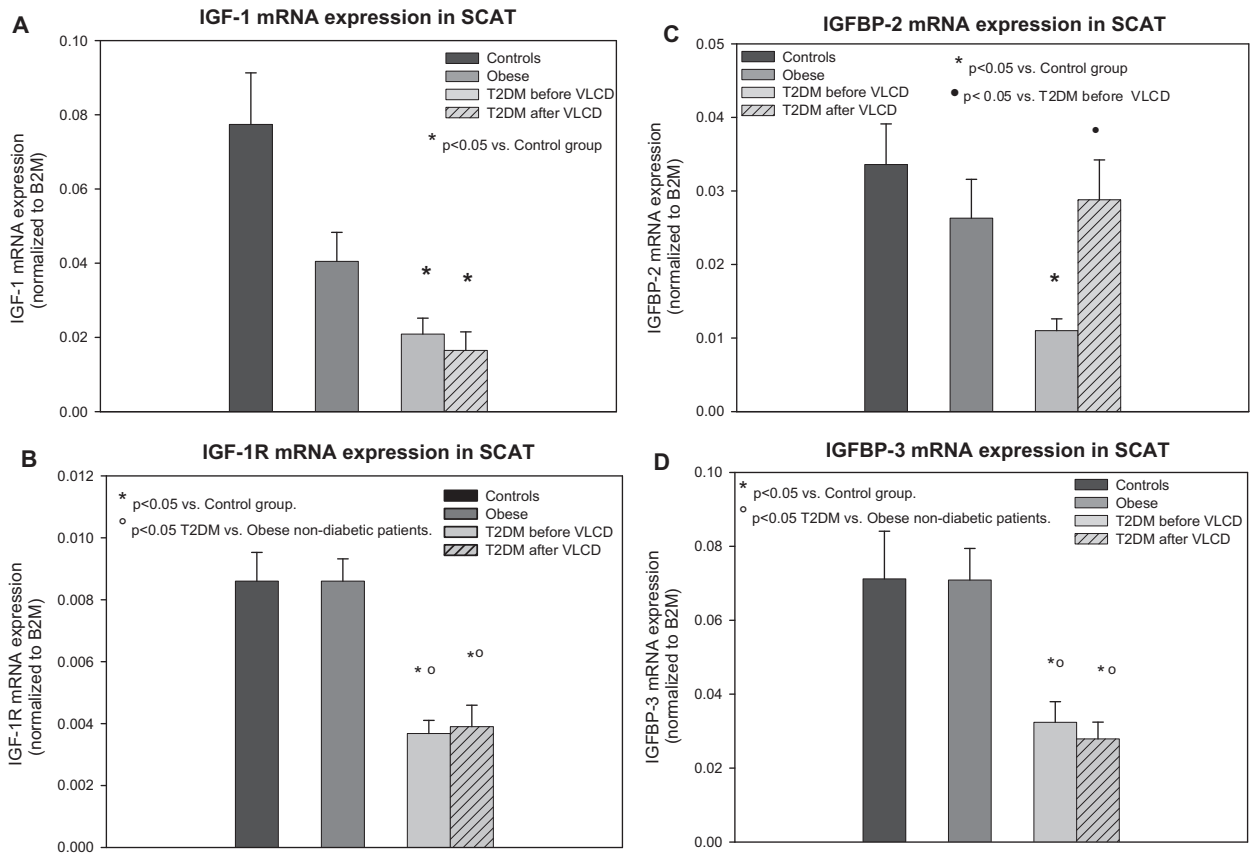
assessed in a combined population of healthy controls and obese subjects both with and without T2DM. Serum concentrations of IGF-1, IGFBP-1 and IGFBP-2 correlated inversely with BMI, serum insulin levels and HOMA index (*p* < 0.014). IGF-1, IGF-1R and IGFBP-3 mRNA expression in SCAT correlated inversely with BMI and glycaemia (*p* < 0.04). Moreover, IGF-1 and IGF-1R mRNA expression in SCAT negatively correlated with serum insulin levels and HOMA index (*p* < 0.04). IGF-1R and IGFBP-3 mRNA expression in PM positively correlated with BMI, glycaemia and HOMA index (*p* < 0.045). Serum insulin concentrations correlated positively with IGF-1R mRNA expression in PM (*p* < 0.045).

#### 4. Discussion

Previous studies documented the complex interactions between circulating monocytes and adipose tissue in the development of systemic subclinical inflammation, type 2 diabetes mellitus and its atherosclerotic complications (Mraz et al., 2011; Bourlier et Bouloumie, 2009; Suganami et al., 2005). Significantly increased IGF-1R mRNA expression in monocytes in T2DM patients relative to both OB and control groups documented in this study suggests a possible contribution of IGF-1 axis components to the regulation of peripheral monocytes inflammatory status in T2DM patients. Previously it has been reported that IGF-1 was involved in inflammation-induced angiogenic processes in the porcine model of sterile heart inflammation (Kluge et al., 1997) and in the development of endothelial cell dysfunction by enhancing pro-inflammatory cytokine signal transduction (Che et al., 2002). Positive effects of IGF-1 have been described on the stimulation of natural killer cell cytotoxicity and proliferation of human peripheral blood mononuclear cells (Koojiman et al., 1992a) as well as on the maturation and inhibition of apoptosis of cord blood monocyte-derived dendritic cells (Law et al., 2008). Moreover, in the presence of IGF-1 monocytes isolated from GH-deficient patients differentiated into macrophages (Serri et al., 2004). These findings suggest that IGF-1 has a more general role in the regulation of inflammatory and



**Fig. 1.** mRNA expression of IGF-1R (A) and IGFBP-3 (B) in peripheral monocytes of control lean women (black bars; *n* = 18), obese non-diabetic women (dark gray bars; *n* = 11) and obese women with T2DM before VLCD (gray bars) and obese women with T2DM after VLCD (shaded gray bars; *n* = 13). Values are means ± SEM. \**p* < 0.05 vs. control group. <sup>o</sup>*p* < 0.05 T2DM vs. obese non-diabetic patients.



**Fig. 2.** mRNA expression of IGF-1 (A), IGF-1R (B), IGFBP-2 (C) and IGFBP-3 (D) in subcutaneous adipose tissue (SCAT) of control lean women (black bars;  $n = 18$ ), obese non-diabetic women (dark gray bars;  $n = 11$ ) and obese women with T2DM before very-low-calorie diet (VLCD) – (gray bars) and obese women with T2DM after VLCD (shaded gray bars;  $n = 13$ ). Values are means  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  vs. control group. ° $p < 0.05$  T2DM vs. obese non-diabetic patients, \* $p < 0.05$  vs. T2DM before VLCD.

immunological processes. Therefore, increased binding capacity for IGF-1 due to elevated IGF-1R expression in peripheral monocytes of obese and T2DM patients documented in this study may suggest a novel regulatory role of IGF-1 in the development of subclinical inflammation through the proinflammatory activation of peripheral monocytes.

In our previous study (Mraz et al., 2011) T2DM subjects had a more pronounced expression profile of several proinflammatory chemokine, cytokine and other proinflammatory receptors in peripheral monocytes than obese subjects without glucose metabolism disturbances suggesting important role of monocytes in the progression of metabolic disturbances from simple obesity and insulin resistance to overt disturbances of glucose metabolism. Similar results were found in our present study as far as mRNA expression of IGF axis components is concerned. In contrast to significantly increased IGF-1R mRNA expression in peripheral monocytes and decreased IGF-1 and IGFBP-2 mRNA expression in subcutaneous adipose tissue of obese T2DM patients only a non-significant trend towards these changes was found in OB subjects without diabetes. These findings indicate a possible role of the changes in mRNA expression of local IGF axis components in gradual progression of metabolic disturbances. Nevertheless, the cross-sectional design of our study does not allow us to exclude the alternative possibility i.e., that the differences in insulin and glucose levels between T2DM and OB group contributed to the alterations in IGF-1 axis component mRNA expression.

While the changes in IGF-1 axis components in peripheral monocytes were mostly subtle, obesity and T2DM were associated with more pronounced alterations of IGF-1 axis components in

subcutaneous adipose tissue. We observed decreased IGF-1, IGFBP-2, IGFBP-3 and, in contrast to peripheral monocytes, also decreased IGF-1R mRNA expression in subcutaneous adipose tissue of T2DM patients suggesting different regulation of these molecules in fat relative to both peripheral monocytes and its circulating levels. Previous studies have documented an important role of IGF-axis components in the stimulation of differentiation of pre-adipocytes (Blüher et al., 2005; Peter et al., 1993; Sato et al., 2008; Wabitsch et al., 2000), in the regulation of adipocyte differentiation (Mur et al., 2003) and lipid accumulation in vitro (Grohmann et al., 2005) and in modulation of the expansion of white adipose tissue mass (Kloting et al., 2008). Decreased IGF-1, IGF-1R and IGFBP-3 mRNA expression in subcutaneous fat found in our study thus could have contributed to the reduced differentiation capacity of adipose tissue in obese T2DM patients. This defect may in turn lead to excessive lipid accumulation in non-adipose tissues and promote the development of insulin resistance and other accompanying metabolic pathologies.

Two weeks of stringent caloric restriction significantly decreased body weight, improved metabolic parameters and reduced CRP levels documenting the reduction of low-grade inflammation in our T2DM patients. In our previous studies (Dolinkova et al., 2008; Mraz et al. 2011) on similar study groups of obese females with and without T2DM VLCD induced a consistent decrease in mRNA expression of almost all up-regulated chemokine and cytokine receptors in peripheral monocytes suggesting its reduced response to chemotactic signals. This decrease could subsequently reduce monocyte recruitment into adipose tissue and partially explain positive metabolic effects of short-term VLCD. Interestingly, we did not observe



any effect of VLCD on IGF-1R mRNA expression in peripheral monocytes in this study. On the other hand, we detected an increase in IGFBP-3 mRNA expression in peripheral monocytes after VLCD reaching even higher levels than in control group. This finding could be important since IGFBP-3 was reported to be involved in the induction of growth arrest and apoptosis and to exert antiproliferative activity against myeloid leukemia cells (Ikezoe et al., 2004) and to be induced by LPS (lipopolysaccharide) stimulated apoptosis of human monocytic cells (Agnese et al., 2002). We therefore suggest that the increase of IGFBP-3 expression in peripheral monocytes after VLCD found in our study could have contributed to the down-regulation of proinflammatory monocytic activity associated with VLCD-induced metabolic improvement.

Another profound effect of VLCD found in our study was the normalization of markedly decreased IGFBP-2 mRNA expression in subcutaneous adipose tissue of obese T2DM subjects. It has been suggested that IGFBP-2 is an important modulator of IGF-1 action on adipogenesis (Boney et al., 1994). IGFBP-2 has been shown to inhibit IGF-dependent cell proliferation in a number of in vitro studies (Hoeflich et al., 1999). Significantly lower IGFBP-2 mRNA expression in visceral, but not in subcutaneous adipose tissue was found in genetically obese *ob/ob*, *db/db* mice and mice with high-fat-diet-induced obesity relative to lean animals (Li and Picard, 2010). Based on these data, it was suggested that IGFBP-2 secreted from white adipose tissue contributed to the prevention of diet-induced obesity and age-related insulin resistance in mice (Li and Picard, 2010). Markedly increased IGFBP-2 expression in subcutaneous adipose tissue found in our study after VLCD is in line with its suggested role as a modulator of positive metabolic effects on both local and systemic level possibly through the regulation of adipogenic capacity of adipose tissue, the limitation of further weight gain (Claudio et al., 2010) and the regulation of IGF-1 bioavailability during short-term calorie restriction in obese subjects (Clemmons et al., 1991).

We are aware that our study has several limitations such as relatively low number of subjects and its cross-sectional design that is not sufficient for a clear dissection of the cause and the consequence of the changes. The results could have also been affected by the fact that we have studied only female population. The interpretation of our results is rather difficult and sometimes speculative also due to the fact that only a very limited number of studies on the same topic have been published so far.

In summary, we have shown that obese T2DM subjects have decreased IGF-1, IGF-1R and IGFBP-3 expression in subcutaneous adipose tissue and increased IGF-1R expression in peripheral monocytes, which might contribute to changes in fat differentiation capacity and to regulation of subclinical inflammation by peripheral monocytes, respectively. We have also detected a significant increase in subcutaneous adipose tissue and circulating IGFBP-2 and peripheral monocyte IGFBP-3 after VLCD, that could play a role in metabolic improvements after VLCD. The precise mechanisms of regulation of IGF-1 axis components expression in subcutaneous adipose tissue or peripheral monocytes, its clinical significance and causal relationship to regulation of metabolic disarrangements and subclinical inflammation need to be addressed in further studies.

## Acknowledgement

Supported by RVO-VFN64165/2012 and IGA 10024-4.

## References

Agnese, D.M., Calvano, J.E., Hahn, S.J., Calvano, S.E., Lowry, S.F., 2002. Insulin-like growth factor binding protein-3 is upregulated in LPS-treated THP-1 cells. *Surg. Infect. (Larchmt)* 3, 119–125.

- Blüher, S., Kratzsch, J., Kiess, W., 2005. Insulin-like growth factor I, growth hormone and insulin in white adipose tissue. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 19, 577–587.
- Boney, C.M., Moats-Staats, B.M., Stiles, A.D., D'Ercole, A.J., 1994. Expression of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-binding proteins during adipogenesis. *Endocrinology* 135, 1863–1868.
- Bourlier, V., Bouloumie, A., 2009. Role of macrophage tissue infiltration in obesity and insulin resistance. *Diabetes Metab.* 35, 251–260.
- Cancello, R., Henegar, C., Viguier, N., Taleb, S., Poitou, C., Rouault, C., Coupaye, M., Pelloux, V., Hugol, D., Bouillot, J.L., Bouloumié, A., Barbatelli, G., Cinti, S., Svensson, P.A., Barsh, G.S., Zucker, J.D., Basdevant, A., Langin, D., Clément, K., 2005. Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss. *Diabetes* 54, 2277–2286.
- Che, W., Lerner-Marmarosh, N., Huang, Q., Osawa, M., Ohta, S., Yoshizumi, M., Glassman, M., Lee, J.D., Yan, C., Berk, B.C., Abe, J., 2002. Insulin-like growth factor-1 enhances inflammatory responses in endothelial cells: role of Gab1 and MEK3 in TNF-alpha-induced c-Jun and NF-kappaB activation and adhesion molecule expression. *Circ. Res.* 14, 1222–1230.
- Claudio, M., Benjamín, F., Riccardo, B., Massimiliano, C., Francesco, B., Luciano, C., 2010. Adipocytes IGFBP-2 expression in prepubertal obese children. *Obesity (Silver Spring)* 18, 2055–2057.
- Clemmons, D.R., Snyder, D.K., Busby, W.H., 1991. Variable controlling the secretion of insulin-like growth factor binding-2 in normal human subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 73, 727–738.
- Del Pozo, C.H., Calvo, R.M., Vesperinas-García, G., Gómez-Ambrosi, J., Frühbeck, G., Rubio, M.A., Obregon, M.J., 2011. Expression profile in omental and subcutaneous adipose tissue from lean and obese subjects. Repression of lipolytic and lipogenic genes. *Obes. Surg.* 21, 633–643.
- Dolezalova, R., Lacinova, Z., Dolinkova, M., Kleiblova, P., Haluzikova, D., Housa, D., Papezova, H., Haluzik, M., 2007. Changes of endocrine function of adipose tissue in anorexia nervosa: comparison of circulating levels versus subcutaneous mRNA expression. *Clin. Endocrinol. (Oxf)* 67, 674–678.
- Dolinková, M., Dostálová, I., Lacinova, Z., Michalský, D., Haluziková, D., Mráz, M., Kasalický, M., Haluzik, M., 2008. The endocrine profile of subcutaneous and visceral adipose tissue of obese patients. *Mol. Cell Endocrinol.* 291, 63–70.
- Dunger, D., Yuen, K., Ong, K., 2004. Insulin-like growth factor I and impaired glucose tolerance. *Horm. Res.* 62, 101–107.
- Frystyk, J., Grøfte, T., Skjaerbaek, C., Orskov, H., 1997. The effect of oral glucose on serum free insulin-like growth factor-I and -II in health adults. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82, 3124–3127.
- Frystyk, J., Skjaerbaek, C., Vestbo, E., Fisker, S., Orskov, H., 1999. Circulating levels of free insulin-like growth factors in obese subjects: the impact of type 2 diabetes. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 15, 314–322.
- Grohmann, M., Sabin, M., Holly, J., Crowne, E., Stewart, C., 2005. Characterization of differentiated subcutaneous and visceral adipose tissue from children: the influences of TNF-alpha and IGF-I. *J. Lipid Res.* 46, 93–103.
- Hoeflich, A., Wu, M., Mohan, S., Föll, J., Wanke, R., Froehlich, T., Arnold, G.J., Lahm, H., Kolb, H.J., Wolf, E., 1999. Overexpression of insulin-like growth factor-binding protein-2 in transgenic mice reduces postnatal body weight gain. *Endocrinology* 140, 5488–5496.
- Hotamisligil, G.S., 2006. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 14, 860–867.
- Ikezoe, T., Tanosaki, S., Krug, U., Liu, B., Cohen, P., Taguchi, H., Koefler, H.P., 2004. Insulin-like growth factor binding protein-3 antagonizes the effects of retinoids in myeloid leukemia cells. *Blood* 1, 237–242.
- Klötting, N., Koch, L., Wunderlich, T., Kern, M., Ruschke, K., Krone, W., Brüning, J.C., Blüher, M., 2008. Autocrine IGF-1 action in adipocytes controls systemic IGF-1 concentrations and growth. *Diabetes* 57, 2074–2082.
- Kluge, A., Zimmermann, R., Weihrach, D., Mohri, M., Sack, S., Schaper, J., Schaper, W., 1997. Coordinate expression of the insulin-like growth factor system after microembolisation in porcine heart. *Cardiovasc. Res.* 33, 324–331.
- Kooijman, R., Willems, M., De Haas, C.J., Rijkers, G.T., Schuurmans, A.L., Van Buul-Offers, S.C., Heijnen, C.J., Zegers, B.J., 1992a. Expression of type I insulin-like growth factor receptors on human peripheral blood mononuclear cells. *Endocrinology* 131, 2244–2250.
- Kooijman, R., Willems, M., Rijkers, G.T., Brinkman, A., van Buul-Offers, S.C., Heijnen, C.J., Zegers, B.J., 1992b. Effects of insulin-like growth factors and growth hormone on the in vitro proliferation of T lymphocytes. *J. Neuroimmunol.* 38, 95–104.
- Lacinova, Z., Dolinkova, M., Haluzikova, D., Krajickova, J., Haluzik, M., 2008. Comparison of manual and automatic (MagNA pure) isolation methods of total RNA from adipose tissue. *Mol. Biotechnol.* 38, 195–201.
- Law, H.K., Tu, W., Liu, E., Lau, Y.L., 2008. Insulin-like growth factor I promotes cord blood T cell maturation through monocytes and inhibits their apoptosis in part through interleukin-6. *BMC Immunol.* 17, 9–74.
- Li, Z., Picard, F., 2010. Modulation of IGFBP2 mRNA expression in white adipose tissue upon aging and obesity. *Horm. Metab. Res.* 42, 787–791.
- Mraz, M., Lacinova, Z., Drapalova, J., Haluzikova, D., Horinek, A., Matoulek, M., Trachta, P., Kavalkova, P., Svacina, S., Haluzik, M., 2011. The effect of very-low-calorie diet on mRNA expression of inflammation-related genes in subcutaneous adipose tissue and peripheral monocytes of obese patients with type 2 diabetes mellitus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 96, 606–613.
- Mur, C., Arribas, M., Benito, M., Valverde, A.M., 2003. Essential role of insulin-like growth factor I receptor in insulin-induced fetal brown adipocyte differentiation. *Endocrinology* 144, 581–593.

- Peter, M.A., Winterhalter, K.H., Böni-Schnetzler, M., Froesch, E.R., Zapf, J., 1993. Regulation of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-binding proteins by growth hormone in rat white adipose tissue. *Endocrinology* 133, 2624–2631.
- Rajpathak, S.N., Gunter, M.J., Wylie-Rosett, J., Ho, G.Y., Kaplan, R.C., Muzumdar, R., Rohan, T.E., Strickler, H.D., 2009. The role of insulin-like growth factor-I and its binding proteins in glucose homeostasis and type 2 diabetes. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 25, 3–12.
- Rasmussen, M.H., Juul, A., Kjems, L.L., Hilsted, J., 2006. Effects of short-term caloric restriction on circulating free IGF-I, acid-labile subunit, IGF-binding proteins (IGFBPs)-1–4, and IGFBPs-1–3 protease activity in obese subjects. *Eur. J. Endocrinol.* 155, 575–581.
- Sato, T., Nagafuku, M., Shimizu, K., Taira, T., Igarashi, Y., Inokuchi, J., 2008. Physiological levels of insulin and IGF-1 synergistically enhance the differentiation of mesenteric adipocytes. *Cell Biol. Int.* 32, 1397–1404.
- Serri, O., Li, L., Maingrette, F., Jaffry, N., Renier, G., 2004. Enhanced lipoprotein lipase secretion and foam cell formation by macrophages of patients with growth hormone deficiency: possible contribution to increased risk of atherogenesis? *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89, 979–985.
- Stuart, C.A., Meehan, R.T., Neale, L.S., Cintron, N.M., Furlanetto, R.W., 1991. Insulin-like growth factor-I binds selectively to human peripheral blood monocytes and B-lymphocytes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 72, 1117–1122.
- Suganami, T., Nishida, J., Ogawa, Y., 2005. A paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes: role of free fatty acids and tumor necrosis factor alpha. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25, 2062–2068.
- Wabitsch, M., Heinze, E., Debatin, K.M., Blum, W.F., 2000. IGF-I- and IGFBP-3-expression in cultured human preadipocytes and adipocytes. *Horm. Metab. Res.* 32, 555–559.
- Wellen, K.E., Hotamisligil, G.S., 2003. Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *J. Clin. Invest.* 112, 1785–1788.
- Xu, H., Barnes, G.T., Yang, Q., Tan, G., Yang, D., Chou, C.J., Sole, J., Nichols, A., Ross, J.S., Tartaglia, L.A., Chen, H., 2003. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 112, 1821–1830.

## **The possible role of mRNA expression changes of GH/IGF-1/insulin axis components in subcutaneous adipose tissue in metabolic disturbances of patients with acromegaly**

Touskova Vera<sup>1</sup>, Klouckova Jana<sup>2</sup>, Durovcova Viktoria<sup>1</sup>, Lacinova Zdena<sup>1,2</sup>, Kavalkova Petra<sup>2</sup>, Trachta Pavel<sup>1</sup>, Kosak Mikulas<sup>1</sup>, Mraz Milos<sup>1</sup>, Haluzikova Denisa<sup>3</sup>, Hana Vaclav<sup>1</sup>, Marek Josef<sup>1</sup>, Krsek Michal<sup>1</sup> and Haluzik Martin<sup>2,4</sup>

<sup>1</sup>Third Department of Medicine, <sup>2</sup>Institute of Medical Biochemistry and Laboratory Diagnostics and <sup>3</sup>Department of Sports Medicine, General University Hospital and First Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic

<sup>4</sup>Institute of Endocrinology, Prague, Czech Republic

### **Corresponding author:**

Martin Haluzik, Prof, MD, DSc.

Institute of Endocrinology

Národní 8, 116 94

Prague 1, Czech Republic

Tel.: + 420 224905350

Fax: + 420 224905350

e-mail: mhalu@lf1.cuni.cz

### **Abstract**

We explored the effect of chronically elevated circulating levels of growth hormone (GH)/insulin-like-growth-factor-1 (IGF-1) on mRNA expression of GH/IGF-1/insulin axis

components and p85alpha subunit of phosphoinositide-3-kinase (p85alpha) in subcutaneous adipose tissue (SCAT) of patients with active acromegaly and compared these findings with healthy control subjects in order to find its possible relationships with insulin resistance and body composition changes. Acromegaly group had significantly decreased percentage of truncal and whole body fat and increased homeostasis model assessment-insulin resistance (HOMA-IR). In SCAT, patients with acromegaly had significantly increased IGF-1 and IGF-binding protein-3 (IGFBP-3) expression that both positively correlated with serum GH. P85alpha expression in SCAT did not differ from control group. IGF-1 and IGFBP-3 expression in SCAT were not independently associated with percentage of truncal and whole body fat or with HOMA-IR while IGFBP-3 expression in SCAT was an independent predictor of insulin receptor as well as of p85alpha expression in SCAT. Our data suggest that GH overproduction in acromegaly group increases IGF-1 and IGFBP-3 expression in SCAT while it does not affect SCAT p85alpha expression. Increased IGF-1 or IGFBP-3 in SCAT of acromegaly group do not appear to contribute to systemic differences in insulin sensitivity but may have local regulatory effects in SCAT of patients with acromegaly.

**Keywords:**

acromegaly, GH/IGF-1/insulin axis components, adipose tissue, insulin resistance, p85alpha subunit of PI3K

**Short title:** IGF-1 and IGFBP-3 in acromegalic adipose tissue

**Abbreviations:**

AC, acromegaly group;

C, control group;

CRP, C-reactive protein;

DEXA, dual-energy X-ray absorptiometry;

GH, growth hormone;

GH-R, growth hormone receptor;

HDL, high-density lipoprotein;

HOMA-IR – homeostasis model assessment – insulin resistance;

IFCC, International Federation of Clinical Chemistry;

IGF-1, insulin-like growth factor-1;

IGF-2, insulin-like growth factor-2;

IGFBP-1-3, insulin-like growth factor binding protein-1-3;

IGF-1R, insulin-like growth factor-1 receptor;

IGF-2R, insulin-like growth factor-2 receptor;

INS-R, insulin receptor;

LBM, lean body mass;

LDL, low-density lipoprotein;

p85alpha, p85alpha subunit of phosphoinositide-3-kinase;

PI3K, phosphoinositide-3-kinase;

qRT-PCR, quantitative real-time PCR;

SCAT, subcutaneous adipose tissue.

## **1. Introduction**

Acromegaly is associated with an increased prevalence of glucose metabolism disorders. Clinically confirmed diabetes mellitus is observed in approximately one quarter of all patients with acromegaly (Droste et al. 2014). The degree of glucose intolerance has been reported to correlate with serum GH levels, age, duration of the disease and family history of diabetes (Resmini et al. 2009). Importantly, patients with acromegaly-associated diabetes display exponentially increased mortality rates, since untreated acromegaly and increased plasma insulin levels/insulin resistance in diabetes are both associated with higher rate of cardiovascular mortality and malignancies (Droste et al. 2014). GH-induced insulin resistance, increased hepatic glucose production and accentuated lipolysis contribute to the presence of diabetes and impaired glucose tolerance in acromegaly (Rodrigues et al. 2011). IGF-1 has rather opposing effects on insulin sensitivity and lipolysis than GH; however, in acromegaly, increased IGF-1 levels are unable to counteract the negative metabolic actions of GH excess (Resmini et al. 2009).

We have previously shown that type 2 diabetes and obesity are accompanied by differences not only in serum concentrations but also in mRNA expression of some GH/IGF-1/insulin axis components in subcutaneous adipose tissue and we suggested that these differences might contribute to overall metabolic and adipose tissue metabolism disturbances in type 2 diabetes and to their improvement after dietary intervention (Touskova et al. 2012).

Adipose tissue is the major target of growth hormone action (Garten et al. 2012) and increased lipolysis and reduced triglyceride accumulation together with inhibited preadipocyte differentiation due to elevated GH levels in acromegaly contribute to the reduction of adipose tissue mass (Plockinger et Reuter 2008; Richelsen 1997). GH may mediate its actions on adipose tissue via specific GH receptors on both preadipocytes and mature adipocytes, but some effects are mediated indirectly through the GH-regulated secretion of IGF-1 (Richelsen 1997). Locally produced IGFBP-1-3 have been suggested to play a protective role against obesity among other mechanisms also via inhibiting the stimulatory effects of IGF-1 on adipogenesis (Nguyen et al. 2015; Wheatcroft et al. 2007; Ueda et Ashida 2012), and to also have specific regulatory roles in glucose metabolism (Rajpathak et al. 2009; Claudio et al. 2010; Chan et al. 2005). Subcutaneous adipose tissue appears to be an interesting target tissue in terms of exploring GH effects, since several previous studies demonstrated differences in the amount of subcutaneous adipose tissue in accordance with differences of GH action (Berryman et al. 2004; Lin et al. 2012; Ibáñez et al. 2010).

Numerous studies showed several different mechanisms by which GH affects insulin sensitivity in adipose tissue, including interferences with insulin signalling cascade (Castro et al. 2004; Smith et al. 1997). Among others, an up-regulation of p85 $\alpha$  regulatory subunit of PI3K by GH has been considered as a potential explanation for the insulin resistance in white adipose tissue of mice with GH excess (del Rincon et al. 2007).

To our knowledge, the local expression of GH/IGF-1/insulin axis components in subcutaneous adipose tissue of patients with acromegaly has been very scarcely studied so far. In the current study, we hypothesized that chronically elevated GH/IGF-1/insulin serum levels in acromegalic patients might induce differences in mRNA expression of GH/IGF-1/insulin axis components in subcutaneous adipose tissue that may in turn contribute to dysregulation

of glucose metabolism and reduction of adipose tissue mass. To this end, we measured serum concentrations and mRNA expression of selected components of GH/IGF-1/insulin axis in subcutaneous adipose tissue together with metabolic and anthropometric parameters in acromegalic patients and compared them with the findings in healthy age-matched subjects. To gain further insight into the mechanism of GH-induced insulin resistance in subcutaneous adipose tissue in acromegaly we also explored the mRNA expression of p85alpha regulatory subunit of PI3K.

## **2.1. Methods**

### Study subjects

Twelve acromegalic patients (AC group, 8 men and 4 women, aged  $49.6 \pm 8.1$  years) and twelve lean healthy subjects (C group, 4 men and 8 women, aged  $50.7 \pm 5.2$  years) were included in the study. Acromegalic patients were examined at the moment of establishing the diagnosis of acromegaly, therefore they had no prior treatment for acromegaly. The diagnostic criteria for acromegaly were increased IGF-1 serum levels above the upper limit of the normal range (according to age) and the non-suppressibility of GH serum levels below 0.4 ng/ml in the oral glucose tolerance test. Exclusion criteria were age <18 years old, malignancy, inflammatory disease, type 1 diabetes, current treatment with glucocorticoids. Five out of twelve acromegalic patients were on antihypertensive treatment, three used oral antidiabetic treatment and one was treated with insulin. The treatment remained unchanged for at least three months prior to the start of the study. Control subjects had no history of acromegaly, obesity and/or diabetes mellitus, arterial hypertension, or lipid metabolism disturbances and received no medication. Blood tests confirmed normal blood count, biochemical and hormonal parameters.



During the program all acromegalic patients were hospitalized at the Third Department of Medicine, General University Hospital in Prague. Written informed consent was signed by all participants before the beginning of the study. The study was approved by Human Ethics Review Board, First Faculty of Medicine and General University Hospital, Prague, Czech Republic and was performed in accordance with the guidelines proposed in the Declaration of Helsinki.

## **2.2. Anthropometric examination, blood and adipose tissue sampling**

All participants included in the study were examined only once. All subjects were measured and weighted, and their BMI was calculated. Blood samples for biochemical and hormonal parameters measurement were taken after overnight fasting. Blood samples were separated by centrifugation for 10 min at 1000 x g within 30 min from blood collection. Serum or plasma was subsequently stored in aliquots at -80 °C until further analysis.

Samples of subcutaneous adipose tissue for mRNA expression analysis were obtained from abdominal region with subcutaneous needle aspiration biopsy from all participants.

Approximately 100 mg of adipose tissue was collected to 1 ml of RNA stabilization Reagent (RNAlater, Qiagen, Hilden, Germany) and stored at -80 °C until further analysis.

The amount and percentage of whole body fat, truncal body fat and lean body mass was assessed by body composition measurement using Dual-Energy X-Ray Absorptiometry (DEXA, Hologic Discovery, USA).

## **2.3. Hormonal and biochemical assays**

Serum levels of total insulin-like growth factor-1 (IGF-1) were measured by IRMA kit (Immunotech, Prague, Czech Republic). LOD (Limit of detection) and LOQ (Limit of quantitation) were 12.0 ng/ml. Serum IGFBP-1, IGFBP-2 and IGFBP-3 levels were measured

by ELISA kits (DiaSource ImmunoAssays S.A., Nivelles, Belgium). LOD was 0.4 ng/ml for IGFBP-1, 0.2 ng/ml for IGFBP-2 and 10 ng/ml for IGFBP-3. LOQ was 6.4 ng/ml for IGFBP-1, 4.2 ng/ml for IGFBP-2 and 10 ng/ml for IGFBP-3. Growth hormone (GH) levels were measured by IRMA kits (Immunotech, Prague, Czech Republic). LOD and LOQ were 0.10 mIU/l. Serum C-reactive protein (CRP) levels were measured by high sensitive ELISA (Bender Medsystems, Vienna, Austria) with a LOD of 3 pg/ml and LOQ 1.5 ng/ml. The intra- and interassay variabilities for all methods were less than 5.0 and 10.0 %, respectively. Biochemical parameters (fasting insulin, fasting blood glucose, HbA1c, total and HDL-cholesterol and triglycerides) were measured in the Department of Biochemistry of General University Hospital, Prague by standard laboratory methods. The value of LDL-cholesterol was calculated according to Friedewald formula.

### **2.3. Total RNA isolation from adipose tissue**

Samples of subcutaneous adipose tissue were homogenized on a MagNA Lyser Instrument using MagNA Lyser Green Beads (Roche Diagnostics GmbH, Germany). Total RNA from homogenized tissue was extracted on MagNA Pure instrument using Magna Pure Compact RNA Isolation kit (tissue) (Roche Diagnostics GmbH, Germany). The integrity of the RNA was checked by visualization of 18S and 28S ribosomal bands on 1 % agarose gel with ethidium bromide. The RNA concentration was determined from absorbance at 260 nm on a NanoPhotometer (Implen, Munchen, Germany).

### **2.4. Determination of mRNA expression by quantitative real-time PCR**

Total RNA was used for reverse transcription to synthesize the first strand cDNA. Reverse transcription was performed using 0.25 µg of total RNA to synthesize the first strand cDNA

using the random primers as per the instructions of the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Measurements of mRNA expression were performed on an ABI PRISM 7500 instrument (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using TaqMan® Universal PCR Master Mix, NO AmpErase® UNG and specific TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). All PCRs for each gene were amplified separately. Controls with no template cDNA were performed with each assay and all samples were run at least in duplicates. The increase in fluorescence was measured in real time and threshold cycle (Ct) values were obtained. To compensate for variations in RNA amount and efficiency of reverse transcription, beta-2-microglobulin was used as endogenous reference and results were normalized to the mean of these values. The formula  $2^{-\Delta Ct}$  was used to calculate relative gene expression.

## **2.6. Statistical analysis**

Statistical analysis was performed on SigmaStat software Version 3.0 and the graphs were created in Sigma Plot software Version 8.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Prior to analysis, all continuous variables were assessed for normality (Kolmogorov-Smirnov test).

Anthropometric, biochemical and hormonal data are expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD) or median (interquartile range), according to the normality of data. Comparisons of anthropometric, biochemical, hormonal and other parameters among the two groups studied (AC, C) were evaluated by Unpaired t-test or Mann-Whitney Rank Sum test as appropriate.

The associations between serum and mRNA expression of GH/IGF-1/insulin axis components and p85alpha in SCAT and other variables in a combined group of AC subjects and age-matched controls were estimated by Spearman's rank order correlation. Further backward stepwise regression analysis calculations were performed to show the independent

relationships of GH/IGF-1/insulin axis components, p85alpha in SCAT and other biochemical or anthropometric characteristics. Only the parameters with significant correlation from Spearman correlation test ( $p < 0.05$ ) were used for these analyses. In all statistical tests  $p$  values  $< 0.05$  were considered statistically significant.

### **3. Results**

#### **3.1. Anthropometric, metabolic and hormonal characteristics of study subjects**

Anthropometric, metabolic and hormonal characteristics of the study subjects (AC and C groups) are summarized in Table 1.

BMI and percentage of lean body mass were significantly increased in AC group compared with C group, while percentage of whole body fat and truncal fat were decreased in AC group relative to C group.

Serum levels of GH, total IGF-1 and IGFBP-3, fasting glucose, insulin, HbA1c, HOMA-IR and triglycerides were significantly increased in AC group compared with C group.

On the contrary, IGFBP-1, IGFBP-2, HDL and CRP serum levels were decreased in acromegalic patients. Total and LDL cholesterol did not significantly differ from control group.

#### **3.2. mRNA expression of GH/IGF-1/insulin axis components and p85alpha in subcutaneous adipose tissue**

The summary of mRNA expressions of GH/IGF-1/insulin axis components and p85alpha in subcutaneous adipose tissue of AC and C group is shown in Figure 1.

IGF-1 and IGFBP-3 mRNA expression in subcutaneous adipose tissue were significantly increased in patients with acromegaly compared with control group. GH-R, IGF1-R, IGF-2,

IGF-2R, IGFBP-2, INS-R, p85alpha mRNA expression did not significantly differ from control group. IGFBP-1 was not detected in adipose tissue.

### 3.3 Relationships of IGF-1 and IGFBP-3 mRNA expression in SCAT with other parameters

The relationships between IGF-1 and IGFBP-3 mRNA expression in SCAT (the only significantly increased parameters in SCAT in AC group compared to C group) with the other studied parameters were explored using Spearman correlation test. The significant associations are summarized in Table 2. Backward stepwise regression analysis was performed in order to explore the independent predictors of IGF-1 and IGFBP-3 mRNA expression in SCAT. The significant relationships are summarized in Table 3. In addition, we explored whether these two parameters might be independent predictors of selected metabolic (HOMA-IR, INS-R, p85alpha mRNA expression in SCAT) and body composition parameters (the percentage of truncal and whole body fat). The significant relationships are summarized in Table 4. The parameters used as independent variables for these selected metabolic and body composition parameters were the parameters with significant correlation in Spearman correlation test (data not reported).

IGF-1 mRNA expression in SCAT was inversely associated with percentage of truncal fat and positively with percentage of LBM. IGF-1 in SCAT correlated positively with serum GH, INS-R, GH-R, p85alpha and IGFBP-3 mRNA expression in SCAT and inversely with serum CRP levels (Table 2). IGF-1 mRNA expression in SCAT could be independently predicted only from **IGFBP-3 mRNA expression in SCAT** (Table 3).

IGFBP-3 mRNA expression in SCAT was inversely associated with percentage of truncal fat, whole body fat and positively with percentage of LBM. IGFBP-3 mRNA expression in SCAT correlated positively with fasting blood glucose, insulin, HOMA-IR, serum GH, mRNA

expression of IGF-1, INS-R, GH-R, p85alpha in SCAT and was inversely associated with serum CRP (Table 2). In Model 1 (including: fasting glucose, fasting insulin, HOMA-IR, serum CRP, serum GH, IGF-1 mRNA expression in SCAT as independent variables), IGFBP-3 mRNA expression in SCAT could be predicted from a linear combination of five independent variables: **fasting glucose, fasting insulin, serum GH, serum CRP levels and IGF-1 mRNA expression in SCAT** (Table 3). In Model 2 (including: percentage of truncal fat, whole body fat and LBM, IGF-1 and p85alpha mRNA expression in SCAT as independent variables), IGFBP-3 mRNA expression in SCAT could be predicted only from **IGF-1 mRNA expression in SCAT** (Table 3).

HOMA-IR could be independently predicted only from **serum IGF-1 levels** (Table 4).

INS-R mRNA expression in SCAT could be predicted from a linear combination of three independent variables: **IGFBP-3 in SCAT, serum HDL and IGF-1R in SCAT** (Table 4).

P85alpha mRNA expression in SCAT could be predicted from a linear combination of five independent variables: **SCAT mRNA expression of IGFBP-3, IGFBP-2, INS-R, GH-R and percentage of LBM** (Table 4).

**HbA1c** was found to be the independent predictor of percentage of truncal and whole body fat (Table 4).

**IGF-1 and IGFBP-3 in SCAT were not found to be among the independent predictors of HOMA-IR and percentage of truncal and whole body fat, while IGFBP-3 in SCAT was found to be an independent predictor of INS-R and p85alpha mRNA expression in SCAT.**

The other non-significant relationships are not reported.

## **Discussion**

The most important finding of our study is significantly increased mRNA expression of *IGF-1* and *IGFBP-3* in SCAT in patients with acromegaly relative to healthy lean subjects (Fig. 1). Both *IGF-1* and *IGFBP-3* mRNA expression in SCAT positively correlated with serum GH levels (Table 2) suggesting its direct stimulatory effect on local IGF-1 and IGFBP-3 production in subcutaneous fat. Previous studies have reported adipose tissue production of IGF-1 in response to GH stimulation in experimental conditions and in healthy individuals (Vikman et al. 1991; Peter et al. 1993; Wabitsch et al. 1996; Jørgensen et al. 2006). Peter et al. (Peter et al. 1993) reported that IGFBPs, including IGFBP-3 mRNA expression, in rat white adipose tissue were all regulated by GH. Other experimental studies showed a stimulatory effect of GH on IGFBP-3 expression in the liver, muscle and skin in GH deficient rats (Lemmey et al. 1997), on serum IGFBP-3 (Wester et al. 1998) or on its secretion from porcine adipose tissue (Chen et al. 1996) or human preadipocytes (Wabitsch et al. 2000). Recently, increased IGF-1 and IGFBP-3 mRNA expression was found also in SCAT of subjects with acromegaly (Hochberg et al. 2015). In our study, serum GH was one of the independent predictors of *IGFBP-3* mRNA expression in SCAT confirming its direct regulatory role (Table 3).

Previous studies demonstrated stimulatory effect of IGF-1 on skin (Lemmey et al. 1997) or liver (Gosteli-Peter et al. 1994) *IGFBP-3* mRNA expression, but to our best knowledge no such data exist to date for the presence of this effect in adipose tissue. Importantly, in our study *IGF-1* mRNA expression in SCAT was an independent predictor of *IGFBP-3* mRNA expression in SCAT and vice versa (Table 3), suggesting their possible local mutual regulatory interactions.

As expected, we found significantly decreased percentage of whole body as well as truncal fat and increased percentage of lean body mass in acromegalic patients compared to control group (Table 1), which is in agreement with previous studies (Katznelson 2009). Furthermore,

we observed an inverse relationship of *IGFBP-3* expression in SCAT with percentage of truncal and whole body fat and of *IGF-1* expression in SCAT with percentage of truncal fat (Table 2), suggesting a possible causal relationship. In previous studies, *IGF-1* and *IGFBP-3* expression have been shown to increase during human preadipocyte differentiation (Baxter et al. 2009). While *IGF-1* stimulates this process and adipogenesis (Peter et al. 1993; Chen et al. 1995) *IGFBP-3* has the opposite effects (Baxter et al. 2009; Chan et al. 2009). In our previous study obese diabetic women had decreased *IGFBP-3* mRNA expression in subcutaneous fat (Touskova et al. 2012). While the concept of local regulatory role of *IGF-1* and *IGFBP-3* in SCAT is tempting, we did not confirm *IGF-1* or *IGFBP-3* mRNA expression in SCAT as independent predictors of percentage of truncal and whole body fat in a backward stepwise regression analysis (Table 4), however this concept certainly warrants further investigation. To gain further insight into its possible regulatory role in systemic metabolic changes in acromegaly we explored the relationships between *IGF-1* and *IGFBP-3* mRNA expression in SCAT with selected markers of glucose metabolism and insulin resistance (Table 2). In previous studies, the *IGF-1* expression in adipose tissue transplants was shown to be associated with anti-inflammatory and favourable metabolic effects in diabetic mice (Gunawardana et Piston 2015). Both, *IGF-1* (Kubota et al. 2008; Neascu et al. 2013) and *IGFBP-3* (Mohanraj et al. 2013) exerted anti-inflammatory effects and insulin-sensitizing effects in adipocytes. On the other hand, several studies indicated that *IGFBP-3* may decrease insulin sensitivity in adipocytes by various mechanisms (Kim et al. 2007; Chan et al. 2005). In our current study we did not find an independent association of *IGF-1* or *IGFBP-3* in SCAT with HOMA-IR. Interestingly, *IGFBP-3* in SCAT was an independent predictor of *INS-R* as well as of *p85alpha* mRNA expression in SCAT (Table 4), suggesting possible local role of *IGFBP-3* in the regulation of insulin sensitivity in adipose tissue of AC.



In acromegaly, the increased insulin resistance is paradoxically often present despite the decreased amount of adipose tissue. For all the studies documenting different local mechanisms of GH-induced insulin resistance in adipose tissue (Castro et al. 2004; Smith et al. 1997), some experimental studies suggested that GH action in adipose tissue is not crucial in deterioration of the overall insulin resistance (List et al. 2013; Johansen et al. 2005). In our study, increased HOMA-IR was not significantly associated with the decreased percentage of whole body or truncal fat. These findings may support the hypothesis that in acromegaly, adipose tissue may not be the main site contributing to the whole body insulin resistance and point to the liver or the skeletal muscle as other important contributors.

Numerous previous experimental studies have suggested an important role of GH excess in the stimulation of p85alpha regulatory subunit of PI3K tissue expression and subsequent development of GH-induced insulin resistance (Del Rincon et al. 2007; de Castro Barbosa et al. 2009; Barbour et al. 2005). On the other hand, an attenuation of p85alpha expression has been proposed as one of the mechanisms for the treatment of type 2 diabetes (Mauvais-Jarvis et al. 2002). Insulin has been shown as another important regulator of p85alpha regulatory subunit. Insulin resistant conditions were previously associated with contrasting results showing increased (Adochio et al. 2009; Cornier et al. 2006) but also decreased (Anai et al. 1998) p85alpha tissue (liver, muscle) expression and also with blunted stimulatory effect of acute hyperinsulinemia on p85alpha tissue expression (Lefai et al. 2001). In our study, elevated serum GH/insulin levels in patients with acromegaly failed to increase *p85alpha* mRNA expression in subcutaneous adipose tissue where its mRNA expression was comparable to that of the control group (Fig. 1), which confirms the result of the recent study on patients with acromegaly (Hochberg et al. 2015). No significant relationships were found between serum GH/IGF-1/insulin and *p85alpha* in SCAT or between *p85alpha* in SCAT and metabolic parameters (HOMA-IR, fasting blood glucose, insulin, HbA1c) arguing against an

involvement of p85alpha regulatory subunit in SCAT in mediating the metabolic effects of systemic GH excess in acromegaly. P85alpha was positively associated with INS-R mRNA expression in SCAT, suggesting a possible parallel regulation of their expressions.

The limitations of our study include the relatively low number of study subjects and the cross-sectional design of the study. We are aware that the correlations found in our study do not necessarily establish a causal connection and that the mRNA expression differences in subcutaneous adipose tissue might be secondary to insulin resistance. In addition, for the assessment of insulin resistance we have only measured HOMA-IR and did not perform hyperinsulinemic euglycemic clamp that would be more precise for the whole body insulin sensitivity evaluation.

In conclusion, in our study we found increased *IGF-1* and *IGFBP-3* mRNA expression in subcutaneous adipose tissue of patients with acromegaly. None of these factors independently predicted the changes in body composition or systemic insulin sensitivity. Nevertheless, their local effect on adipogenesis and insulin sensitivity in subcutaneous adipose tissue could be present and further investigation of this possibility is needed. On the contrary, our data do not support an up-regulation of *p85alpha* subunit of PI3K expression as a mechanism of GH-induced insulin resistance in subcutaneous adipose tissue of acromegalic patients.

Acknowledgements: Supported by RVO-VFN 64165.

## **References**

ADOCHIO RL, LEITNER JW, GRAY K, DRAZNIN B, CORNIER MA: Early responses of insulin signaling to high-carbohydrate and high-fat overfeeding. *Nutr Metab (Lond)*. **6(37)**, 2009 Sep 28.  
ANAI M, FUNAKI M, OGIHARA T, TERASAKI J, INUKAI K, KATAGIRI H, FUKUSHIMA Y, YAZAKI Y, KIKUCHI M, OKA Y, ASANO T: Altered expression levels

and impaired steps in the pathway to phosphatidylinositol 3-kinase activation via insulin receptor substrates 1 and 2 in Zucker fatty rats. *Diabetes* **47**(1): 13-23, 1998 Jan.

BARBOUR LA, MIZANOR RAHMAN S, GUREVICH I, LEITNER JW, FISCHER SJ, ROPER MD, KNOTTS TA, VO Y, MC CURDY CE, YAKAR S, LEROITH D, KAHN CR, CANTLEY LC, FRIEDMAN JE, DRAZNIN B: Increased P85alpha is a potent negative regulator of skeletal muscle insulin signaling and induces in vivo insulin resistance associated with growth hormone excess. *J Biol Chem*. **280**(45): 37489-37494, 2005.

BAXTER RC, TWIGG SM: Actions of IGF binding proteins and related proteins in adipose tissue. *Trends Endocrinol Metab* **20**(10): 499-505, 2009.

BERRYMAN DE, LIST EO, COSCHIGANO KT, BEHAR K, KIM JK, KOPCHICK JJ: Comparing adiposity profiles in three mouse models with altered GH signaling. *Growth Horm IGF Res*. **14**(4): 309-318, 2004 Aug.

CASTRO FC, DELGADO EF, BEZERRA RM, LANNA DP: Effects of growth hormone on insulin signal transduction in rat adipose tissue maintained in vitro. *Endocr Res* **30**(2): 225-238, 2004.

CLAUDIO M, BENJAMIM F, RICCARDO B, MASSIMILIANO C, FRANCESCO B, LUCIANO C: Adipocytes IGF1R expression in prepubertal obese children. *Obesity (Silver Spring)* **18**(10): 2055-2057, 2010.

CORNIER MA, BESSESEN DH, GUREVICH I, LEITNER JW, DRAZNIN B: Nutritional upregulation of p85alpha expression is an early molecular manifestation of insulin resistance. *Diabetologia* **49**(4): 748-754, 2006 Apr.

DE CASTRO BARBOSA T, DE CARVALHO JE, POYARES LL, BORDIN S, MACHADO UF, NUNES MT: Potential role of growth hormone in impairment of insulin signaling in skeletal muscle, adipose tissue, and liver of rats chronically treated with arginine. *Endocrinology* **150**(5): 2080-2086, 2009.

DEL RINCON JP, IIDA K, GAYLINN BD, MCCURDY CE, LEITNER JW, BARBOUR LA, KOPCHICK JJ, FRIEDMAN JE, DRAZNIN B, THORNER MO: Growth hormone regulation of p85alpha expression and phosphoinositide 3-kinase activity in adipose tissue: mechanism for growth hormone-mediated insulin resistance. *Diabetes* **56**(6): 1638-1646, 2007.

DROSTE M, DOMBERG J, BUCHFELDER M, MANN K, SCHWANKE A, STALLA G, STRASBURGER CJ: Therapy of acromegalic patients exacerbated by concomitant type 2 diabetes requires higher pegvisomant doses to normalise IGF1 levels. *Eur J Endocrinol* **171**(1): 59-68, 2014.

GARTEN A, SCHUSTER S, KIESS W: The insulin-like growth factors in adipogenesis and obesity. *Endocrinol Metab Clin North Am*. **41**(2): 283-295, 2012 Jun.

GOSTELI-PETER MA, WINTERHALTER KH, SCHMID C, FROESCH ER, ZAPF J: Expression and regulation of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-binding protein messenger ribonucleic acid levels in tissues of hypophysectomized rats infused with IGF-I and growth hormone. *Endocrinology* **135**(6): 2558-2567, 1994.

GUNAWARDANA SC, PISTON DW: Insulin-independent reversal of type 1 diabetes in nonobese diabetic mice with brown adipose tissue transplant. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **308**(12): E1043-1055, 2015.

HOCHBERG I, TRAN QT, BARKAN AL, SALTIEL AR, CHANDLER WF, BRIDGES D: Gene Expression Signature in Adipose Tissue of Acromegaly Patients. *PLoS One* **10**(6): e0129359, 2015.

CHAN SS, SCHEDLICH LJ, TWIGG SM, BAXTER RC: Inhibition of adipocyte differentiation by insulin-like growth factor-binding protein-3. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **296**(4): E654-663, 2009.

CHAN SS, TWIGG SM, FIRTH SM, BAXTER RC: Insulin-like growth factor binding protein-3 leads to insulin resistance in adipocytes. *J Clin Endocrinol Metab* **90**(12): 6588-6595, 2005.

CHEN NX, HAUSMAN GJ, WRIGHT JT: Influence of age and fetal hypophysectomy on porcine preadipocytes: insulin-like growth factor-I (IGF-I) response, receptor binding and IGF binding proteins secretion. *Growth Dev Aging* **59**(4): 193-206, 1995.

CHEN NX, HAUSMAN GJ, WRIGHT JT: Hormonal regulation of insulin-like growth factor binding proteins and insulin-like growth factor I (IGF-I) secretion in porcine stromal-vascular cultures. *J Anim Sci* **74**(10): 2369-2375, 1996.

IBÁÑEZ L, LOPEZ-BERMEJO A, DÍAZ M, JARAMILLO A, MARÍN S, DE ZEGHER F: Growth hormone therapy in short children born small for gestational age: effects on abdominal fat partitioning and circulating follistatin and high-molecular-weight adiponectin. *J Clin Endocrinol Metab.* **95**(5): 2234-2239, 2010 May.

JOHANSEN T, LAURINO C, BARRECA A, MALMLOF K: Reduction of adiposity with prolonged growth hormone treatment in old obese rats: effects on glucose handling and early insulin signaling. *Growth Horm IGF Res* **15**(1): 55-63, 2005.

JORGENSEN JO, JESSEN N, PEDERSEN SB, VESTERGAARD E, GORMSEN L, LUND SA, BILLESTRUP N: GH receptor signaling in skeletal muscle and adipose tissue in human subjects following exposure to an intravenous GH bolus. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **291**(5): E899-905, 2006.

KATZNELSON L: Alterations in body composition in acromegaly. *Pituitary* **12**(2): 136-142, 2009.

KIM HS, ALI O, SHIM M, LEE KW, VUGUIN P, MUZUMDAR R, BARZILAI N, COHEN P: Insulin-like growth factor binding protein-3 induces insulin resistance in adipocytes in vitro and in rats in vivo. *Pediatr Res* **61**(2): 159-164, 2007.

KUBOTA Y, UNOKI H, BUJO H, RIKIHISA N, UDAGAWA A, YOSHIMOTO S, ICHINOSE M, SAITO Y: Low-dose GH supplementation reduces the TLR2 and TNF-alpha expressions in visceral fat. *Biochem Biophys Res Commun* **368**(1): 81-87, 2008.

LEFAI E, ROQUES M, VEGA N, LAVILLE M, VIDAL H: Expression of the splice variants of the p85alpha regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase in muscle and adipose tissue of healthy subjects and type 2 diabetic patients. *Biochem J* **360**(Pt 1): 117-126, 2001.

LEMMEY AB, GLASSFORD J, FLICK-SMITH HC, HOLLY JM, PELL JM: Differential regulation of tissue insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP)-3, IGF-I and IGF type 1 receptor mRNA levels, and serum IGF-I and IGFBP concentrations by growth hormone and IGF-I. *J Endocrinol* **154**(2): 319-328, 1997.

LIN E, WEXLER TL, NACHTIGALL L, TRITOS N, SWEARINGEN B, HEMPHILL L, LOEFFLER J, BILLER BM, KLIBANSKI A, MILLER KK: Effects of growth hormone deficiency on body composition and biomarkers of cardiovascular risk after definitive therapy for acromegaly. *Clin Endocrinol (Oxf)*. **77**(3): 430-438, 2012 Sep.

LIST EO, BERRYMAN DE, FUNK K, GOSNEY ES, JARA A, KELDER B, WANG X, KUTZ L, TROIKE K, LOZIER N, MIKULA V, LUBBERS ER, ZHANG H, VESEL C, JUNNILA RK, FRANK SJ, MASTERNAK MM, BARTKE A, KOPCHICK JJ: The role of GH in adipose tissue: lessons from adipose-specific GH receptor gene-disrupted mice. *Mol Endocrinol* **27**(3):524-35, 2013.

MAUVAIS-JARVIS F, UEKI K, FRUMAN DA, HIRSHMAN MF, SAKAMOTO K, GOODYEAR LJ, IANNAcone M, ACCILI D, CANTLEY LC, KAHN CR: Reduced expression of the murine p85 $\alpha$  subunit of phosphoinositide 3-kinase improves insulin signaling and ameliorates diabetes *J Clin Invest.* **109**(1): 141-149, 2002 January 1.

MOHANRAJ L, KIM HS, LI W, CAI Q, KIM KE, SHIN HJ, LEE YJ, LEE WJ, KIM JH, OH Y: IGFBP-3 inhibits cytokine-induced insulin resistance and early manifestations of atherosclerosis. *PLoS One* **8**(1): e55084, 2013.

NEACSU O, CLEVELAND K, XU H, TCHKONIA TT, KIRKLAND JL, BONEY CM: IGF-I attenuates FFA-induced activation of JNK1 phosphorylation and TNF $\alpha$  expression in human subcutaneous preadipocytes. *Obesity (Silver Spring)* **21**(9): 1843-1849, 2013.

NGUYEN KH, YAO XH, ERICKSON AG, MISHRA S, NYOMBA BL: Glucose intolerance in aging male IGFBP-3 transgenic mice: differential effects of human IGFBP-3 and its mutant IGFBP-3 devoid of IGF binding ability. *Endocrinology* **156**(2): 462-474, 2015.

PETER MA, WINTERHALTER KH, BONI-SCHNETZLER M, FROESCH ER, ZAPF J: Regulation of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-binding proteins by growth hormone in rat white adipose tissue. *Endocrinology* **133**(6): 2624-2631, 1993.

PLÖCKINGER U, REUTER T: Pegvisomant increases intra-abdominal fat in patients with acromegaly: a pilot study. *Eur J Endocrinol.* **158**(4): 467-471, 2008 Apr.

RAJPATHAK SN, GUNTER MJ, WYLIE-ROSETT J, HO GY, KAPLAN RC, MUZUMDAR R, ROHAN TE, STRICKLER HD: The role of insulin-like growth factor-I and its binding proteins in glucose homeostasis and type 2 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev.* **25**(1): 3-12, 2009 Jan.

RESMINI E, MINUTO F, COLAO A, FERONE D: Secondary diabetes associated with principal endocrinopathies: the impact of new treatment modalities. *Acta Diabetol* **46**(2): 85-95, 2009.

RICHELSEN B: Action of growth hormone in adipose tissue. *Horm Res.* **48**(Suppl 5): 105-110, 1997.

RODRIGUES TC, COSTENARO F, FEDRIZZI D, OLIVEIRA MD, LIMA PB, BOSCHI V, CZEPIELEWSKI MA: Diabetes mellitus in a cohort of patients with acromegaly. *Arq Bras Endocrinol Metabol* **55**(9): 714-719, 2011.

SMITH TR, ELMENDORF JS, DAVID TS, TURINSKY J: Growth hormone-induced insulin resistance: role of the insulin receptor, IRS-1, GLUT-1, and GLUT-4. *Am J Physiol.* **272**(6 Pt 1): E1071-1079, 1997 Jun.

TOUSKOVA V, TRACHTA P, KAVALKOVA P, DRAPALOVA J, HALUZIKOVA D, MRAZ M, LACINOVA Z, MAREK J, HALUZIK M: Serum concentrations and tissue expression of components of insulin-like growth factor-axis in females with type 2 diabetes mellitus and obesity: the influence of very-low-calorie diet. *Mol Cell Endocrinol.* **25**(361): 172-178, 2012 Sep.

UEDA M, ASHIDA H: Green tea prevents obesity by increasing expression of insulin-like growth factor binding protein-1 in adipose tissue of high-fat diet-fed mice. *J Agric Food Chem* **60**(36): 8917-8923, 2012.

VIKMAN K, ISGAARD J, EDEN S: Growth hormone regulation of insulin-like growth factor-I mRNA in rat adipose tissue and isolated rat adipocytes. *J Endocrinol* **131**(1): 139-145, 1991.

WABITSCH M, HEINZE E, DEBATIN KM, BLUM WF: IGF-I- and IGFBP-3-expression in cultured human preadipocytes and adipocytes. *Horm Metab Res* **32**(11-12): 555-559, 2000.

WABITSCH M, HEINZE E, HAUNER H, SHYMKO RM, TELLER WM, DE MEYTS P, ILONDO MM: Biological effects of human growth hormone in rat adipocyte precursor cells and newly differentiated adipocytes in primary culture. *Metabolism* **45**(1): 34-42, 1996.

WESTER TJ, DAVIS TA, FIOROTTO ML, BURRIN DG: Exogenous growth hormone stimulates somatotrophic axis function and growth in neonatal pigs. *Am J Physiol* **274**(1 Pt 1): E29-37, 1998.

WHEATCROFT SB, KEARNEY MT, SHAH AM, EZZAT VA, MIELL JR, MODO M, WILLIAMS SC, CAWTHORN WP, MEDINA-GOMEZ G, VIDAL-PUIG A, SETHI JK,

CROSSEY PA: IGF-binding protein-2 protects against the development of obesity and insulin resistance. *Diabetes* 56(2): 285-294, 2007.

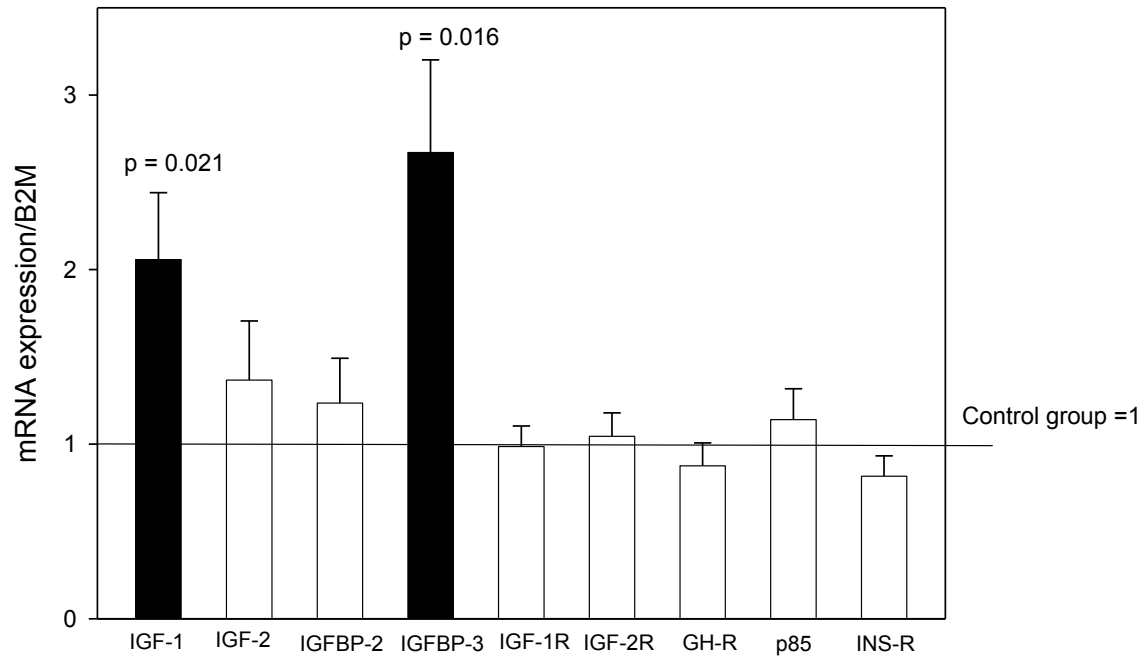
**Table 1. Clinical, anthropometric, metabolic and hormonal characteristics of the study groups**

	<b>Control group</b>	<b>AC group</b>	<b>P - value</b>
<b>No. of subjects</b>	12	12	NA
<b>Sex (male/female)</b>	4/8	8/4	NA
<b>Age (years)</b>	50.7 ± 5.2	49.6 ± 8.1	0.701
<b>Body mass index (kg/m<sup>2</sup>)</b>	23.5 (22.0-25.2)	31.0 (28.5-33.5)	<b>&lt;0.001</b>
<b>Whole body fat (%)</b>	29.3 ± 5.1	21.4 ± 5.7	<b>0.021</b>
<b>Truncal fat (%)</b>	27.7 ± 4.9	20.3 ± 5.1	<b>0.019</b>
<b>Lean body mass (%)</b>	69.0 ± 5.1	77.1 ± 6.2	<b>0.023</b>
<b>Fasting blood glucose (mmol/l)</b>	4.97 ± 0.37	6.06 ± 0.85	<b>&lt;0.001</b>
<b>Fasting insulin (mIU/l)</b>	19.2 ± 6.8	45.3 ± 25.1	<b>0.006</b>
<b>HbA1c (% IFCC)</b>	3.72 ± 0.84	4.70 ± 0.76	<b>0.014</b>
<b>HOMA-IR index</b>	1.88 (1.35-2.81)	10.01 (8.03-13.69)	<b>0.006</b>
<b>Triglycerides (mmol/l)</b>	1.17 ± 0.41	2.02 ± 0.76	<b>0.004</b>
<b>Total cholesterol (mmol/l)</b>	5.25 ± 0.72	4.73 ± 0.81	0.107
<b>LDL cholesterol (mmol/l)</b>	3.30 ± 0.72	2.77 ± 0.74	0.087
<b>HDL cholesterol (mmol/l)</b>	1.42 ± 0.31	1.04 ± 0.22	<b>0.009</b>
<b>CRP (mg/l)</b>	0.49 (0.23-2.00)	0.09 (0.07-0.22)	<b>0.004</b>
<b>GH (mIU/l)</b>	1.5 (0.6-2.3)	61.1 (9.7 -96.1)	<b>0.003</b>
<b>Total IGF-1 (ug/l)</b>	137 (127-154)	1028 (655-1429)	<b>&lt;0.001</b>
<b>IGFBP-1 (ug/l)</b>	6.53 (2.64-10.03)	0.12 (0.05-0.49)	<b>&lt;0.001</b>
<b>IGFBP-2 (ug/l)</b>	293 (232-332)	141 (89-163)	<b>0.006</b>
<b>IGFBP-3 (mg/l)</b>	2.97 ± 0.58	6.89 ± 1.27	<b>&lt;0.001</b>

Normally distributed data are shown as mean ± SD, non-parametric data as median (interquartile range). Statistical significance is from Unpaired t-test or Mann-Whitney Rank Sum test as appropriate. P value <0.05 indicated statistical significance. Values were adjusted for sex in both AC and C group and for the presence of diabetes in AC group. AC, acromegalic group; C, control group; CRP, C-reactive protein; GH, growth hormone; HbA1c, glycated hemoglobin; HDL, high-density lipoprotein; HOMA-IR – homeostasis model assessment – insulin resistance; IFCC, International Federation of Clinical Chemistry;

IGF-1, insulin-like growth factor-1; IGFBP, insulin-like growth factor binding protein; LDL, low-density lipoprotein; NA, not applicable.

**Figure 1. GH/IGF-1/insulin axis components and p85alpha mRNA expression differences in SCAT of AC group (n=12) relative to control group (n=12)**



The mean relative mRNA expressions for the parameters of acromegalic group are expressed as relative ratio to the mean mRNA expression of control group that is taken as 1.0 (line-Control group) for every gene separately.

Statistical significance is from Unpaired t-test or Mann-Whitney Rank Sum test as appropriate. P value <0.05 indicated statistical significance. Values were adjusted for sex in both AC and C group and for the presence of diabetes in AC group.

GH-R, growth hormone receptor; IGF-1, insulin-like growth factor-1; IGF-2, insulin-like growth factor-2; IGFBP, insulin-like growth factor binding protein; IGF-1R, insulin-like growth factor-1 receptor; IGF-2R, insulin-like growth factor-2 receptor; INS-R, insulin receptor; p85, p85alpha subunit of phosphoinositide-3-kinase.

**Table 2. The significant relationships of mRNA expression of IGF-1 and IGFBP-3 in SCAT with anthropometric, metabolic parameters, serum and SCAT GH/IGF-1/insulin axis components and p85alpha in combined population of acromegalic patients and normal-weight healthy subjects**

	<b>SCAT (n=24)</b>			
	<b>IGF-1</b>		<b>IGFBP-3</b>	
	<b>R</b>	<b>p</b>	<b>R</b>	<b>p</b>
<b>Truncal fat (%)</b>	-0.552	<b>0.039</b>	-0.574	<b>0.031</b>
<b>Whole body fat (%)</b>	-0.446	0.105	-0.543	<b>0.043</b>
<b>LBM (%)</b>	0.615	<b>0.024</b>	0.613	<b>0.019</b>
<b>Fasting blood glucose</b>	0.292	0.174	0.453	<b>0.030</b>
<b>Fasting insulin</b>	0.332	0.162	0.511	<b>0.021</b>
<b>HOMA-IR index</b>	0.330	0.151	0.541	<b>0.009</b>
<b>CRP</b>	-0.699	<b>&lt;0.001</b>	-0.449	<b>0.041</b>
<b>Serum GH</b>	0.555	<b>0.009</b>	0.552	<b>0.013</b>
<b>IGF-1 in SCAT</b>	x	x	0.837	<b>&lt;0.001</b>
<b>IGFBP-3 in SCAT</b>	0.837	<b>&lt;0.001</b>	x	x
<b>INS-R in SCAT</b>	0.516	<b>0.014</b>	0.486	<b>0.022</b>
<b>GH-R in SCAT</b>	0.463	<b>0.023</b>	0.437	<b>0.033</b>
<b>p85alpha in SCAT</b>	0,841	<b>&lt;0.001</b>	0,717	<b>&lt;0.001</b>

Statistical significance is from Spearman correlation test. Statistical significance was assigned to  $p < 0.05$ .

CRP, C-reactive protein; GH, growth hormone; GH-R, growth hormone receptor; HOMA-IR – homeostasis model assessment – insulin resistance; IGF-1, insulin-like growth factor-1; IGFBP, insulin-like growth factor binding protein; INS-R, insulin receptor; LBM, lean body mass; p85alpha, p85alpha subunit of phosphoinositide-3-kinase; SCAT, subcutaneous adipose tissue.

The non-significant correlations are not reported.

**Table 3. The independent predictors of IGF-1 and IGFBP-3 mRNA expression in SCAT**

<b>Dependent</b>	<b>Independent</b>	<b>p</b>	<b>Standardized coefficients beta</b>	<b>AdjR<sup>2</sup></b>



IGF-1 in SCAT	IGFBP-3 in SCAT	0.010	0.569	0.839	
(Model 1)	Fasting glucose	<0.001	0.0539	0.971	
	Fasting insulin	0.024	-6.18*10 <sup>-4</sup>		
	Serum GH	0.002	7.71*10 <sup>-4</sup>		
	Serum CRP	0.016	0.0106		
	IGF-1 in SCAT	<0.001	0.568		
(Model 2)	IGFBP-3 in SCAT	IGF-1 in SCAT	<0.001	0.541	0.833

Statistical significance is from backward stepwise regression analysis. Statistical significance was assigned to  $p < 0.05$ .

CRP, C-reactive protein; GH, growth hormone; IGF-1, insulin-like growth factor-1; IGFBP, insulin-like growth factor binding protein; SCAT, subcutaneous adipose tissue.

The non-significant correlations are not reported.

**Table 4. The independent predictors of selected metabolic and body composition parameters**

Dependent	Independent	p	Standardized coefficients beta	AdjR <sup>2</sup>
HOMA-IR	Serum IGF-1	<0.001	0.0162	0.682
INS-R in SCAT	<b>IGFBP-3 in SCAT</b>	<0.001	0.109	0.809
	HDL	<0.001	0.0351	
	IGF-1R in SCAT	0.027	4.479	
P85alpha in SCAT	<b>IGFBP-3 in SCAT</b>	<0.001	0.166	0.981
	IGFBP-2 in SCAT	<0.001	3.144	
	INS-R in SCAT	0.013	0.318	
	GH-R in SCAT	<0.001	-0.0451	
	LBM (%)	0.006	-9.72*10 <sup>-4</sup>	

Truncal fat (%)	HbA1c	0.009	-4.866	0.505
Whole body fat (%)	HbA1c	0.011	-4.896	0.479

Statistical significance is from backward stepwise regression analysis. Statistical significance was assigned to  $p < 0.05$ .

GH, growth hormone; GH-R, growth hormone receptor; HbA1c, glycated hemoglobin; HDL, high-density lipoprotein; HOMA-IR – homeostasis model assessment – insulin resistance; IGF-1, insulin-like growth factor-1; IGFBP, insulin-like growth factor binding protein; IGF-1R, insulin-like growth factor-1 receptor; INS-R, insulin receptor; LBM, lean body mass; p85alpha, p85alpha subunit of phosphoinositide-3-kinase; SCAT, subcutaneous adipose tissue. The non-significant correlations are not reported.