

Aus dem Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin

(Direktor Prof. Dr. med. M. Nauck)

der Universitätsmedizin der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

**IGF-I und IGFBP-3 bei
Patienten mit Lebererkrankungen**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

(Dr. med.)

der

Universitätsmedizin

der

Ernst-Moritz-Arndt-Universität

Greifswald

2014

vorgelegt von

Grit Wallek

geb. am 21.03.1984

in Köthen

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reiner Biffar

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Jens Gerd Scharf

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Henri Wallaschowski

Ort, Raum: Friedrich-Loeffler-Strasse 23c, 17487 Greifswald

Hörsaal des Institutes für Anatomie

Tag der Disputation: 26.02.2014

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	7
2.	METHODEN	10
	2.1. Patienten	10
	2.2. Labormethoden	10
	2.3. Statistik	11
3.	ERGEBNISSE	12
	3.1. Patientenkollektiv	12
	3.2. Assoziation zwischen Transaminasen und IGF-I und IGFBP-3	13
	3.3. Assoziation zwischen Child-Pugh-Score und IGF-I und IGFBP-3	15
4.	DISKUSSION	16
5.	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	20
6.	LITERATURVERZEICHNIS	21
7.	ANHANG	24
	7.1. Wissenschaftliche Publikation	24
	7.2. Eidesstattliche Erklärung	32

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1	Eigenschaften von Patienten und Vergleichsgruppe	12
Tabelle 2	Assoziation zwischen ALAT, ASAT, GGT und IGF-I	13

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1	Assoziation zwischen Transaminasen und IGF-I-Konzentration in der Gesamtpopulation aus Patienten und Kontrollen	14
Abbildung 2	Assoziation zwischen Transaminasen und IGFBP-3-Konzentration in der Gesamtpopulation aus Patienten und Kontrollen	14
Abbildung 3	Boxplots zur Darstellung der Unterschiede zwischen Patienten im fortgeschrittenen Krankheitsstadium und der lebergesunden Vergleichsgruppe in Bezug auf Transaminasen und IGF-I, IGFBP-3-Werte	15

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ALAT	Alanin-Aminotransferase
ASAT	Aspartat-Aminotransferase
BMI	Body Mass Index
GGT	Gamma-Glutamyl-Transferase
GH	Growth Hormone, Wachstumshormon
GLDH	Glutamatdehydrogenase
HGF	Hepatocyte Growth Factor
IGF-I	Insulin-like growth factor I
IGF-II	Insulin-like growth factor II
IGFBP	Insulin-like growth factor Binding Protein
IGFBP-3	Insulin-like growth factor Binding Protein 3
SHIP	Study of Health in Pommerania
TGF β 1	Transforming Growth Factor Beta -1
VK	Variationskoeffizient

1. EINLEITUNG

Im Rahmen einer aktuellen Erhebung der deutschen Rentenversicherung zur Abschätzung der sozialmedizinischen Bedeutung chronischer Lebererkrankungen ist eine genaue Quantifizierung der Prävalenz chronischer Hepatitiden aufgrund der hohen Dunkelziffer nicht möglich [1]. Die Anzahl der Patienten mit einer sich daraus entwickelnden Leberzirrhose wird in Deutschland auf ca. 2 – 2.5 Millionen geschätzt [2].

Die Leber als das stoffwechselaktivste Organ des menschlichen Organismus spielt eine zentrale Rolle im Lipid-, Glukose- und Proteinstoffwechsel; sie ist für die Synthese von Plasmaproteinen und die Bildung der Galle wie auch die Entgiftung und Biotransformation von Stoffwechselprodukten und Medikamenten essentiell. Die Leber gilt als Hauptsyntheseort zahlreicher Hormone so auch der hypophysär gesteuerten Somatomedine (Insulin-like growth factor I und II, IGF-I und IGF-II) und deren Bindungsproteine (Insulin-like growth factor-binding proteins, IGFBP 1 bis 6).

IGF-I wird nach Stimulation durch das hypophysäre Wachstumshormon (Growth hormone, GH) von der Leber sezerniert. In geringerem Maße sind jedoch auch Fibroblasten, Chondroblasten und Osteoblasten zur Synthese dieses Faktors fähig. IGF-I-Rezeptoren werden von nahezu allen Geweben des menschlichen Körpers exprimiert. Dadurch wird klar, welchen Einfluss IGF-I auf die Physiologie des Menschen nimmt. Eine Hauptaufgabe ist die Stimulation des Zellwachstums im Skelettmuskel, Knorpel und Knochen, in der Leber, den Nieren, Nerven, in der Lunge und im blutbildenden System. Das erklärt auch die Schwankungen der IGF-I-Konzentration im Blut im Laufe des Lebens. Die physiologische Maximalkonzentration liegt während der Pubertät vor. Über den Zeitraum des Erwachsenenalters wird ein niedrigeres Niveau erreicht und konstant gehalten, um dann erst mit Beginn des Seniums erneut abzusinken. Dies spiegelt sich in alters- und geschlechtsabhängigen Referenzbereichen für IGF-I wieder [3]. Im Blut wird IGF-I zu 99% an Bindeproteine(IGFBP) gebunden transportiert. Nur 1 % - das nicht gebundene, freie IGF-I - ist stoffwechselaktiv. Insgesamt existieren 6 verschiedene IGF-binding proteins. IGFBP-3 ist das bedeutsamste Bindungsprotein. Bis zu 80 % des IGF-I sind an IGFBP-3 in einem molaren Verhältnis von 1:1 gebunden.

IGF-I und IGFBP-3 werden in der endokrinologischen Diagnostik von verschiedenen Systemerkrankungen, wie zum Beispiel Akromegalie und Kleinwuchs, eingesetzt. Häufig treten dabei Schwierigkeiten bei der Interpretation der Laborergebnisse auf. Die IGF-I- und IGFBP-3-Konzentrationen unterliegen nicht nur der Wirkung von GH, sondern können durch

eine Vielzahl weiterer Faktoren beeinflusst werden. So gelten Schilddrüsen-, adrenale und ovarielle Hormone, Nahrungsaufnahme wie auch Gewichtsverlust, Sport, gesunde Schlafhygiene und Stressreduktion als stimulierend für die IGF-I-Transkription [4-10].

Seit mehreren Jahren ist bekannt, dass chronische Lebererkrankungen - egal welcher Genese - mit einem Abfall der IGF-I-Konzentration im Serum einhergehen [5, 11-15]. Bisher nicht geklärt ist aber, ab welchem Stadium der Lebererkrankung der Abfall der IGF-I-Konzentration beginnt, und ob dieser Wert zum Abschätzen des weiteren Verlaufs als prognostischer Marker oder als Frühmarker für eine beginnende schwerwiegende Lebererkrankung genutzt werden kann. Schwierig wird die Interpretation der Parameter IGF-I und IGFBP-3 im Rahmen der endokrinologischen Diagnostik bei gleichzeitigem Vorliegen einer hepatischen Erkrankung. Unklar ist, welche weiteren Laborparameter in einem solchen Fall in die Bewertung einbezogen werden könnten. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es herauszukristallisieren, ob und in wie weit eine Assoziation zwischen den Transaminaseaktivitäten und Serumspiegeln von IGF-I und IGFBP-3 möglich ist.

Im klinischen Alltag steht dem Untersucher eine große Palette klinischer und laborchemischer Tests zur Verfügung, um Aussagen über den Funktionszustand und die Zellintegrität der Leber zu treffen. Der Nachweis einer gestörten Zellintegrität wird durch die Bestimmung der Leberenzyme Alanin-Aminotransferase (ALAT), Aspartat-Aminotransferase (ASAT) und Gamma-Glutamyl-Transferase (GGT) geführt. Eine erhöhte Aktivität der ALAT - ein bevorzugt im Zytosol der Leberzelle lokalisiertes Enzym - weist auf einen milden Leberzellschaden hin. Bei schwerwiegenden Veränderungen des Gewebes mit Leberzellnekrosen sind auch die in den Mitochondrien befindlichen Enzyme ASAT und Glutamat-Dehydrogenase (GLDH) vermehrt im Serum nachweisbar. Das in einem bestimmten Verhältnis unterschiedliche Ansteigen der Leberenzyme wird mit Hilfe des De-Ritis-Quotienten objektiviert. Hierdurch gelingt eine Aussage über den Schweregrad und auch die Genese der Lebererkrankung.

Die Syntheseleistung wird durch Albumin, die Cholinesterase und Gerinnungsfaktoren quantifiziert. Ammoniak- und Bilirubinspiegelbestimmungen dienen dem Nachweis der Entgiftungsfunktion. Vereint werden diese Parameter im Child-Pugh-Score. Hierbei handelt es sich um einen international anerkannten Bewertungsspiegel für die Abschätzung einer Leberfunktionsstörung. Je nach Stadium des Funktionsverlustes werden Albumin, Bilirubin, Quickwert, der sonographische Nachweis von Ascites und die hepatische Encephalopathie mit einer Punktzahl zwischen eins bis drei bewertet. Die Summe aller fünf bewerteten Kriterien

dient der Vorhersage über das inter- und intraindividuelle Mortalitäts- und Komplikationsrisiko der Patienten mit einer Leberzirrhose [16].

Ziel der vorliegenden Promotionsarbeit ist es, den Zusammenhang zwischen IGF-I- bzw. IGFBP-3-Serumkonzentrationen und Parametern, die eine Lebererkrankung anzeigen systematisch zu untersuchen.

2. METHODEN

2.1. Patienten

Für die Auswertung der hier vorliegenden Arbeit wurden Daten von insgesamt 127 stationär aufgenommenen Patienten (36 Frauen, 91 Männer) herangezogen. Der Einschluss erfolgte anhand eindeutiger Hinweise auf eine Leberzirrhose in der abdominalen Sonographie [17, 18] oder bei um das Dreifache erhöhten Normwerten der ALAT, ASAT oder GGT.

Von diesen 127 Patienten wurden bei 40 Probanden weiterführende Informationen, wie der Child-Pugh-Score [19], anamnestische Daten, die Ursache und Dauer der bestehenden Lebererkrankung erhoben.

Die leitliniengerechte Therapie der Patienten erfolgte unabhängig von der Studie durch die jeweiligen behandelnden Ärzte. Für die Studie liegt ein positives Votum der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Greifswald (Registrierungsnummer BB46/08) vor. Die Patienten gaben ihr Einverständnis zur Teilnahme an der Studie. Ausschlusskriterien waren die Ablehnung der Teilnahme an der Studie, ein Alter unter 18 Jahren, eine bestehende Schwangerschaft, ein fortgeschrittenes Malignom mit Ausnahme des hepatozellulären Karzinoms, eine schwere Demenzerkrankung sowie psychiatrische Grunderkrankungen [20]. Als Kontrollgruppe fungierten 508 lebergesunde Probanden der Study of Health in Pomerania (SHIP), welche nach Alter und Geschlecht sowie unter Beachtung folgender Ausschlusskriterien selektiert worden waren: Diabetes mellitus, Tumorleiden, Nieren- und Lebererkrankungen jeglicher Genese, Erkrankungen der Hypophyse, Adipositas ($\text{BMI} > 30 \text{ kg/m}^2$) oder Unterernährung ($\text{BMI} < 18 \text{ kg/m}^2$) [3, 6].

2.2. Labormethoden

Nach der Abnahme wurden die Blutproben zentrifugiert und anschließend das Serum der gesammelten Blutproben bis zum Tag der Analyse bei -80°C tiefgefroren. IGF-I und IGFBP-3 wurden mittels eines Chemilumineszenz-Immunoassays bestimmt (Immulite 2500, Siemens Healthcare Diagnostics, Eschborn, Germany). Die analytische Sensitivität des IGF-I-Assays betrug 20 ng/ml, die des IGFBP-3-Assays betrug 100 ng/ml. Für beide Assays wurden jeweils Qualitätskontrollen in 2 Levels (Low, High) mitgeführt. Für IGF-I lag der Variationskoeffizient (VK) im Low Level bei 4,12 %, im High Level bei 3,78 %. Für IGFBP-3 waren die VKs im Low Level 3,59 % und im High Level 6,67 %.

Die ASAT, ALAT und GGT wurden photometrisch gemessen (Dimension RxL oder Dimension Vista, Siemens Healthcare Diagnostics, Eschborn, Germany). Kreatinin wurde mittels der Jaffè-Methode bestimmt (Dimension RxL oder Dimension Vista, Siemens Healthcare Diagnostics, Eschborn, Germany).

2.3. Statistik

Zur Beschreibung der Stichproben wurden Verfahren der deskriptiven Statistik angewandt. Der Vergleich von Mittelwerten (Medianen) erfolgte durch den Wilcoxon-Test. Für nominalskalierte Merkmale wurden die erwarteten mit den beobachteten Häufigkeiten mittels Chi-Quadrat-Test (χ^2) verglichen. Zur Erfassung der Assoziationen zwischen Leberenzymwerten und IGF-I- sowie IGFBP-3-Werten wurden lineare Regressionsmodelle adjustiert für Alter, Geschlecht und Kreatinin berechnet. Die Methode der fraktionalen Polynome (FPs) 2. Grades mit Potenzen aus dem Set $(-2, -1, -0.5, 0, 0.5, 1, 2, 3)$ wurde zur Untersuchung möglicher nicht-linearer Zusammenhänge genutzt. Der Likelihood-Ratio Test wurde zur Ermittlung des Modells mit der besten Anpassung errechnet. Alle multivariablen Analysen der IGF-I- und IGFBP-3-Werte wurden unter dem Vorsatz der Reduktion von Ausreißern mit einer Power-Transformation bearbeitet. Der Child-Pugh-Score wurde mit den IGF-I- und IGFBP-3-Werten der Studienpopulation verglichen. Ein p-Wert < 0.05 wurde als statistisch signifikant angenommen. Alle statistischen Analysen erfolgten mit dem Softwareprogramm Stata 11.0 (Stata Corporation, College Station, TX).

3. ERGEBNISSE

3.1. Patientenkollektiv

Tabelle 1 zeigt eine Gegenüberstellung der Patienten- und Kontrollgruppe. Die Patienten zeigten im Vergleich zu der gesunden Kontrollgruppe höhere Aktivitäten der ASAT von 0,95 $\mu\text{katal/l}$ (0,67 $\mu\text{katal/l}$; 1,70 $\mu\text{katal/l}$) vs. 0,37 $\mu\text{katal/l}$ (0,33 $\mu\text{katal/l}$; 0,44 $\mu\text{katal/l}$), der ALAT von 0,93 $\mu\text{katal/l}$ (0,60 $\mu\text{katal/l}$; 1,70 $\mu\text{katal/l}$) vs. 0,47 $\mu\text{katal/l}$ (0,34 $\mu\text{katal/l}$; 0,62 $\mu\text{katal/l}$), der GGT von 4,70 $\mu\text{katal/l}$ (2,50 $\mu\text{katal/l}$; 7,60 $\mu\text{katal/l}$) vs. 0,47 μkatal (0,33 μkatal ; 0,76 μkatal) und niedrigere Werte für IGF-I von 66,7 ng/ml (37,5 ng/ml; 104,0 ng/ml) vs. 137,0 ng/ml (110,5 ng/ml; 172,5 ng/ml) sowie IGFBP-3 von 2670 ng/ml (1520 ng/ml; 4030 ng/ml) vs. 3895 ng/ml (3305 ng/ml; 4420 ng/ml). Die Aktivitäten der Transaminasen der Patienten liegen oberhalb der jeweiligen Referenzbereiche (Normalbereich ASAT für Männer und Frauen $<0,59 \mu\text{katal/l}$; ALAT für Männer $<0,77 \mu\text{katal/l}$, ALAT für Frauen $<0,60 \mu\text{katal/l}$; GGT für Männer $<0,96 \mu\text{katal/l}$, GGT für Frauen $<0,65 \mu\text{katal/l}$).

Tabelle 1 Eigenschaften von Patienten und Vergleichsgruppe

	Patienten (n=127)	Kontrollen (n=508)	p-Wert*
Alter	50,2 (45,0; 59,9)	50,0 (41,0; 61,0)	0,515
Männer	91 (71,7%)	364 (71,7%)	0,999
IGF-I in ng/ml	66,7 (37,5; 104,0)	137,0 (110,5; 172,5)	$<0,001$
IGFBP-3 in ng/ml	2670 (1520; 4030)	3895 (3305; 4420)	$<0,001$
ALAT in $\mu\text{katal/l}$	0,93 (0,60; 1,70)	0,47 (0,34; 0,62)	$<0,001$
ASAT in $\mu\text{katal/l}$	0,95 (0,67; 1,70)	0,37 (0,30; 0,44)	$<0,001$
GGT in $\mu\text{katal/l}$	4,70 (2,50; 7,60)	0,47 (0,33; 0,76)	$<0,001$
Kreatinin in $\mu\text{mol/l}$	74 (63; 91)	85 (78; 93)	$<0,001$

ASAT Aspartat-Aminotransferase; ALAT Alanin-Aminotransferase;

GGT Gamma-Glutamyl-Transferase; IGF-I Insulin-like Growth Faktor I

3.2. Assoziation zwischen Transaminasen und IGF-I und IGFBP-3

Es zeigte sich keine einheitliche Assoziation zwischen erhöhten Aktivitäten der Transaminasen und erniedrigten IGF-I- und IGFBP-3-Konzentrationen innerhalb der Patientengruppe allein. Mit Einbeziehung der gesunden Kontrollgruppe konnte diese Assoziation allerdings gezeigt werden (**Tabelle 2, Abbildung 1 und 2**).

Alleinig für ALAT und IGFBP-3 war diese negative Assoziation statistisch nicht signifikant ($p=0,326$).

Tabelle 2 Assoziation zwischen ALAT, ASAT, GGT und IGF-I

Transformation		Patienten (n = 127)
		β (95%-KI); p-Wert
IGF-I		
ALAT in $\mu\text{katal/l}$	ALAT ¹	54,7 (12,8; 96,5); 0,011
ASAT in $\mu\text{katal/l}$	ASAT ¹	-46,6 (-91,1; -2,1); 0,040
GGT in $\mu\text{katal/l}$	GGT ¹	-26,0 (-72,2; 20,2); 0,267
Transformation		Patienten und Kontrollen (n = 635)
		β (95%-KI); p-Wert
IGF-I		
ALAT in $\mu\text{katal/l}$	ALAT ¹	-73,2 (-103,0; -43,4); <0,001
ASAT in $\mu\text{katal/l}$	ASAT ¹	-303,2 (-353,6; -252,9) ; <0,001
	$\log(\text{ASAT}) * \text{ASAT}^1$	489,6 (354,8; 624,5) ; <0,001
GGT in $\mu\text{katal/l}$	GGT ⁻¹	22,2 (18,2; 26,2); <0,001

ASAT Aspartat-Aminotransferase; ALAT Alanin-Aminotransferase; KI Konfidenzintervall;
GGT Gamma-Glutamyl-Transferase; IGF-I Insulin-like Growth Faktor I

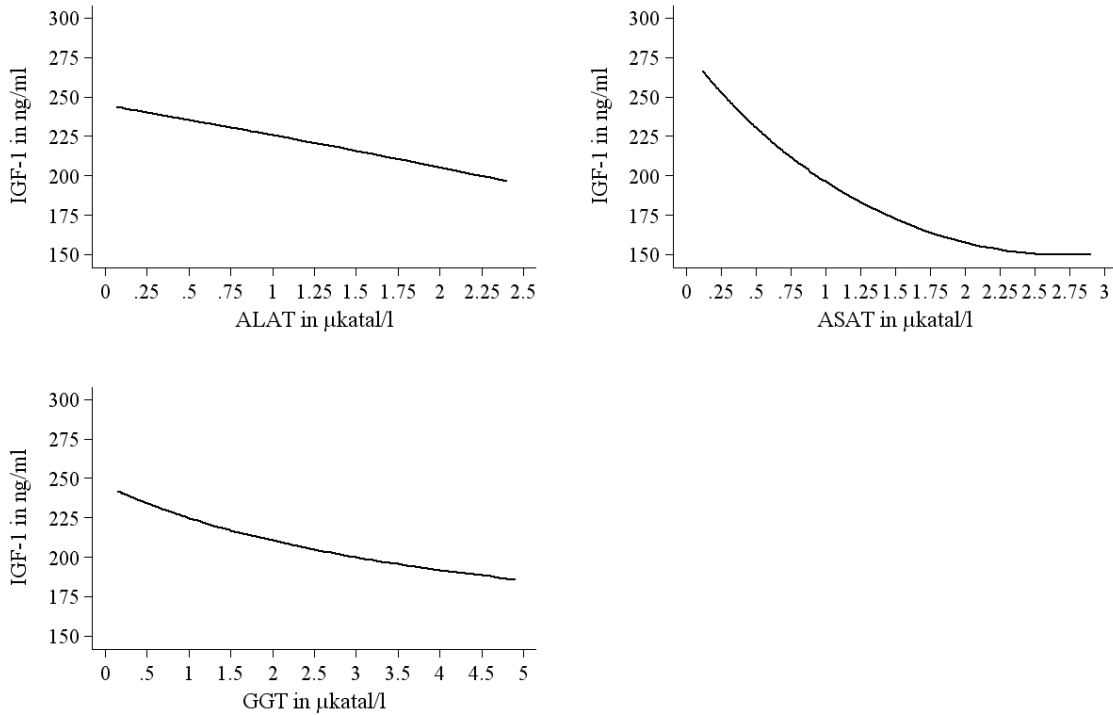


Abbildung 1 Assoziation zwischen Transaminasen und IGF-I-Konzentration in der Gesamtpopulation aus Patienten und Kontrollen

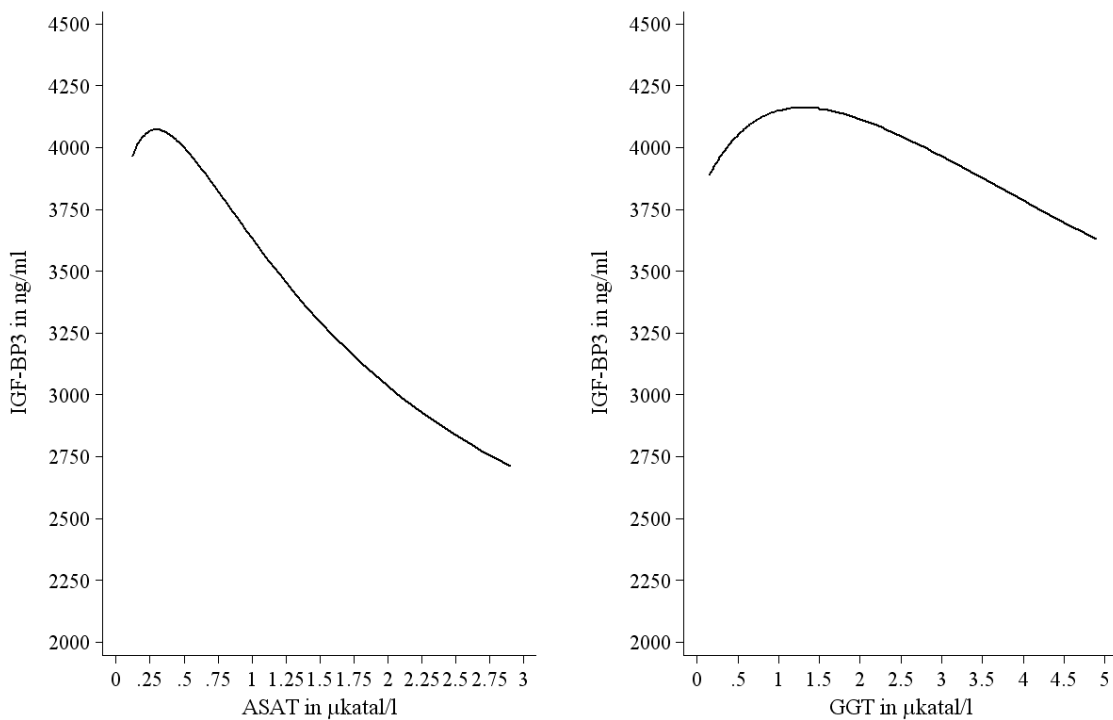


Abbildung 2 Assoziation zwischen Transaminasen und IGF-BP3-Konzentration in der Gesamtpopulation aus Patienten und Kontrollen

3.3. Assoziation zwischen Child-Pugh Score und IGF-I und IGFBP-3

Die Patientengruppe allein wurde detaillierter unter Verwendung des Child-Pugh-Scores betrachtet. Patienten mit einem Child-Pugh-Score C (dekompensierte Leberzirrhose) zeigten signifikant niedrigere IGF-I-Werte als Patienten mit einem Child-Pugh-Score A und B (**Abbildung 3**).

Für IGFBP-3 war diese Assoziation ebenfalls nachzuvollziehen, allerdings nicht statistisch signifikant ($\beta=-642,6$; 95% Konfidenzintervall= $-1334,0$; $48,8$; $p=0,068$).

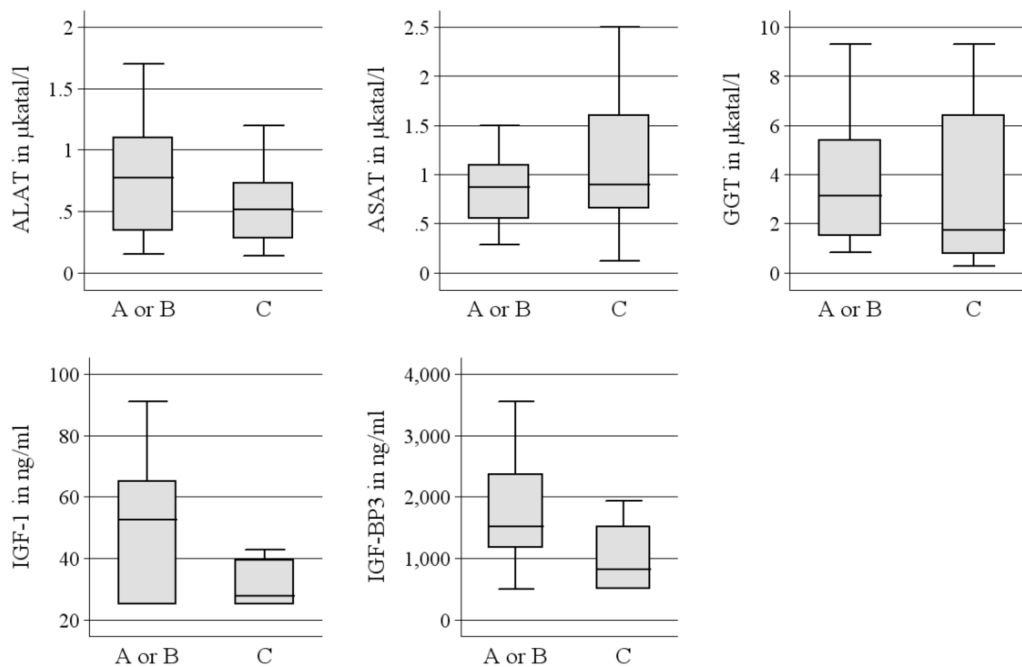


Abbildung 3 Boxplots zur Darstellung der Unterschiede zwischen Patienten im fortgeschrittenen Krankheitsstadium und der lebergesunden Vergleichsgruppe in Bezug auf Transaminasen und IGF-I-/IGFBP-3-Konzentrationen

4. DISKUSSION

IGF-I und IGFBP-3 sind wichtige Laborparameter in der endokrinologischen Diagnostik. Die richtige Interpretation der Laborergebnisse von IGF-I und IGFBP-3 ist unerlässlich. Alle bisher durchgeführten Untersuchungsreihen, die sich mit IGF-I und Leberfunktionsstörungen beschäftigen, bestätigen, dass eine Assoziation zwischen Leberfunktionsstörungen und den IGF-I- und IGFBP-3-Spiegeln besteht.

In der Mehrheit wird eine Abnahme der IGF-I- und auch IGFBP-3-Spiegel bei zunehmender Verschlechterung der Leberleistung beschrieben. Die Ursachen für diese Abnahme sind vielgestaltig und nach wie vor unzureichend erklärt.

In den letzten Jahren wurde zunehmend deutlich, dass es sich in der Beziehung zwischen IGF-I und chronischen Lebererkrankungen nicht um eine unidirektionale Beziehung handelt. Immer mehr Studien beschäftigen sich mit dem Thema, welchen Einfluss IGF-I auf die Pathophysiologie der Entwicklung einer Leberzirrhose hat [11, 21-25]. Es konnte nachgewiesen werden, dass IGF-I durch die Aktivierung der im Disse-Raum befindlichen Sternzellen eine zentrale Rolle in der Fibrogenese der Leber einnimmt [24]. In vivo führen erhöhte IGF-I-Spiegel zu einer Verbesserung der Zytokinantwort - Stimulation von Hepatozyte Growth Factor (HGF) und Suppression von Transforming Growth Factor (TGF β 1) - auf Leberzellschädigungen und so zu einer Hemmung aktivierter Sternzellen und einer damit zusammenhängenden Beschleunigung der Leberzellregeneration und Verlangsamung des fibrotischen Umbaus [25]. Ziel aktueller wissenschaftlicher Studien ist es, Wege zu finden, IGF-I-Spiegel - in Stadien der verminderten GH-Antwort und der nachlassenden Fähigkeit der Leberzelle IGF-I zu bilden - künstlich anzuheben. Zwei Verfahren wurden bisher in klinischen Studien am Menschen getestet. Zum einen wird durch eine Überflutung mit GH versucht, die GH-Resistenz der Leberzelle zu durchbrechen und die selbstständige IGF-I Produktion wieder in Gang zu setzen. Die andere Variante ist eine Anhebung der IGF-I-Werte durch exogen zugeführtes rekombinantes IGF-I [4].

Die Bedeutung dieser Forschungen ist nicht zu unterschätzen, bedenkt man, dass die Zahl der Menschen, die aufgrund verminderter Erwerbsfähigkeit infolge einer chronischen Lebererkrankung vorzeitig aus dem Berufsleben ausscheiden, stetig zunimmt [1, 2].

In der vorliegenden Studie wurden Zusammenhänge zwischen Parametern, die eine Leberfunktionsstörung anzeigen (ALAT, ASAT, GGT) und IGF-I- und IGFBP-3-Konzentrationen im Serum untersucht. Das Ziel der Untersuchungsreihen war es zu prüfen,

ob sich die Transaminasen als Marker für die Interpretation der IGF-I- und IGFBP-3-Werte bei Vorliegen einer Leberfunktionsstörung eignen.

Bisherige Studien zeigen zwar einen Zusammenhang zwischen zunehmender Leberzellschädigung und abnehmender IGF-I-/ IGFBP-3-Konzentrationen. Ein konkreter Zusammenhang zwischen den einzelnen Parametern erfolgte bisher nur in wenigen Studien [5, 15, 30].

Im Rahmen des Studiendesigns der hier vorliegenden Studie, erfolgte zunächst der Versuch, innerhalb der Patientengruppe mit einer Lebererkrankung eine einheitliche Assoziation zwischen Veränderungen der Transaminasenaktivität (ALAT, ASAT und GGT) und den IGF-I- oder IGFBP-3-Konzentrationen herzustellen. Dies gelang allerdings nicht und war zunächst nicht überraschend. Bereits Assy et al. zeigte in zwei Studien, dass die IGF-I-Spiegel innerhalb der Gruppe der Erkrankten nur unwesentlich voneinander abweichen, während im Vergleich zu gesunden Kontrollgruppen signifikant niedrigere Serumspiegel nachweisbar waren [29].

Aus dieser Überlegung heraus, erfolgte eine detailliertere Betrachtungsweise mit Einbeziehung weiterer Variablen, die eine Leberzellschädigung anzeigen.

Unter Verwendung des Child-Pugh-Scores gelang es, einen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Erkrankungsstadien und den IGF-I- und IGFBP-3-Konzentrationen herauszuarbeiten. Es konnte gezeigt werden, dass Patienten mit einer dekompensierten Leberfunktionsstörung (Child-Pugh-Score C) signifikant niedrigere IGF-I-Werte aufwiesen als Patienten im noch kompensierten Krankheitsstadium (Child A/B). Anzumerken ist, dass signifikante Ergebnisse ausschließlich für die IGF-I-Konzentrationen, nicht aber für die IGFBP-3-Konzentrationen im Serum nachgewiesen werden konnten. Eine Tendenz zur negativen Korrelation zwischen dem Child-Pugh-Score und IGFBP-3 war aber durchaus zu erkennen. In der Literatur finden sich einige Studien, die zu ähnlichen Ergebnissen gekommen sind. Die meisten dieser Studien belegten allerdings einen signifikanten Zusammenhang zwischen fallenden IGF-I- und IGFBP-3-Werten und eine zunehmende Verschlechterung der Leberfunktion [14, 21, 26-32].

Donaghy et al. bestätigt verminderte IGF-I- und IGFBP-3-Werte mit zunehmender Leberfunktionsstörung. Als Ursache für den IGF-I-Mangel wird die zunehmende GH-Resistenz benannt. Zudem wird der Ursprung hinterfragt, dem die GH-Resistenz zu Grunde liegt, denn neben der schweren chronischen Lebererkrankung zeichnen sich auch Erkrankungen mit Proteinkatabolismus (lange Hungerperioden, Anorexia nervosa und

schwerste Polytraumata/ Beatmungspatienten) durch niedrige IGF-I-Werte aus. Eine Studie um Mendenhall et al. beschreibt sogar einen stärkeren Zusammenhang zwischen Malnutrition und IGF-I-Werten als zwischen Leberdysfunktion und IGF-I-Werten [8].

Die hier knapp verfehlte Korrelation zwischen zunehmender Verschlechterung der Leberfunktion und fallenden IGFBP-3-Werten ist am ehesten der unzureichenden Patientenselektion zuzuschreiben. Aufgenommen wurden alle Patienten, die die Studieneinschlusskriterien erfüllten, unabhängig von Alter, Vorerkrankungen, Ernährungsstatus etc.. Allerdings wird auch IGFBP-3 stark durch diese Faktoren beeinflusst.

Während der Großteil der aufgeführten Studien nur kleine Patienten- und Kontrollgruppen aufweisen - Donaghy (35 Patienten), Assy (53 Patienten, 10 Probanden in der Kontrollgruppe) und Scharf (40 Patienten und 20 Kontrollen) - ist ein großer Vorteil der vorgelegten Studie die große, gut definierte Gruppe von Kontrollpersonen ohne Lebererkrankungen [3, 6], die für weitere Analysen herangezogen wurde. Die Ergebnisse der Patientengruppe wurden in Zusammenhang mit dieser Kontrollgruppe gesetzt. Diese Untersuchungen zeigten signifikant niedrigere Serum IGF-I- und IGFBP-3-Werte für Patienten mit Lebererkrankungen im Vergleich zur lebergesunden Kontrollgruppe. Während in der Gruppe der lebergesunden Kontrollen sowohl IGF-I, IGFBP-3 als auch die Transaminasen im Normbereich zu finden waren, konnte mit Hilfe der großen Vergleichsgruppe der Unterschied zur Patientengruppe stärker herausgearbeitet werden. Erst durch diese detailliertere Differenzierung war die negative Korrelation zwischen steigenden Transaminasen und fallenden IGF-I- und IGFBP-3-Konzentrationen eindeutig nachweisbar. Während Palo et al. und Moller et al. die Ergebnisse unterstützen, zeigten Völzke et al. einen interessanten Unterschied auf. Obwohl er für IGF-I zur gleichen Schlussfolgerung kommt, lässt sich in seiner Studien für IGFBP-3 kein signifikanter Zusammenhang zu erhöhten Transaminasen herstellen. Vielmehr zeichnet sich eine Tendenz zu erhöhten IGFBP-3-Werten ab. Er schlussfolgert daraus, dass die IGFBP-3-Bildung in den Kupfferzellen und Hepatozyten unabhängig von den Leberzellveränderungen im Rahmen der Leberzellverfettung ablaufen muss. Allerdings untersuchten Völzke et al. nur Patienten in einem frühen Krankheitsstadium. Eine Übertragbarkeit auf andere Studien mit Probanden in weiter fortgeschrittenen Krankheitsstadien erscheint daher bedenklich [5, 15, 30].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Patienten mit Leberfunktionsstörungen - definiert durch erhöhte Transaminasenaktivitäten oder sonographische Auffälligkeiten [17, 18] - niedrigere IGF-I- und IGFBP-3-Konzentrationen aufweisen als die zur Kontrolle heranhegezogene Vergleichsgruppe der Lebergesunden.

Anzumerken ist allerdings, dass durch die Höhe der Transaminasenaktivitäten allein, keine definitive Aussage über die IGF-I- und IGFBP-3-Konzentrationen im Serum zu treffen sind. Diese Erkenntnis sollte bei der Erstellung von Referenzwerten für IGF-I und IGFBP-3 Anwendung finden. Die alleinige Betrachtung der Transaminasen als Labormarker für eine intakte Leberfunktion ist nicht ausreichend. Empfehlenswert ist es, zusätzliche Parameter wie den Child-Pugh-Score oder auch die Sonographie als Selektionskriterien mit heranzuziehen.

5. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

In der vorliegenden Studie wurde gezeigt, dass Patienten mit Lebererkrankungen niedrigere IGF-I- und IGFBP-3-Konzentrationen aufweisen als Lebergesunde. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass Leberfunktionsstörungen einen Einfluss auf die Homöostase des Hormonstoffwechsels und die Synthese von IGF-I und IGFBP-3 haben. Die Interpretation von IGF-I- und IGFBP-3-Werten - z. B. im Rahmen der endokrinologischen Diagnostik des hypothalamisch-hypophysären Regelkreises - sollte daher nie ohne Berücksichtigung möglicher Einflüsse durch Leberfunktionseinschränkungen erfolgen. Weitere Studien zur Klärung der Pathophysiologie des GH/ IGF-I-Regelkreises im Rahmen von chronischen Lebererkrankungen sind in jedem Fall erforderlich. Auch werden weitere umfangreichere Studien benötigt, um Laborparameter zu etablieren, die die Interpretation von IGF-I und IGFBP-3 bei Vorliegen von Lebererkrankungen erleichtern. Diesen Anspruch konnte die aktuelle Studie aufgrund der begrenzten Probandenzahl nicht erfüllen.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Brüggemann S. et. al. Sozialmedizinische Beurteilung der Leistungsfähigkeit von Menschen mit chronischen nicht-malignen Leber- und Gallenwegskrankheiten. Leitlinien für sozialmedizinische Begutachtung 2013 Feb; 5.
- [2] Oehler G. Krankheiten der Leber und Gallenweg. Sozialmedizinische Begutachtung für die gesetzliche Rentenversicherung 2011;376-390.
- [3] Friedrich N, Krebs A, Nauck M, Wallaschofski H. Age- and gender-specific reference ranges for serum insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF-binding protein-3 concentrations on the Immulite 2500: results of the Study of Health in Pomerania (SHIP). Clin Chem Lab Med 2010;48:115-20.
- [4] Bonefeld K, Møller S, Insulin-like growth factor-I and the liver. Liver Int. 2011 Aug; 31(7):911-9.
- [5] De Palo EF, Bassanello M, Lancerin F, Spinella P, Gatti R, D'Amico D, et al. GH/IGF system, cirrhosis and liver transplantation. Clin Chim Acta 2001;310:31-7.
- [6] Friedrich N, Alte D, Volzke H, Spilcke-Liss E, Ludemann J, Lerch MM, et al. Reference ranges of serum IGF-I and IGFBP-3 levels in a general adult population: results of the Study of Health in Pomerania (SHIP). Growth Horm IGF Res 2008;18:228-37.
- [7] Borofsky ND, Vogelmann JH, Krajcik RA, Orentreich N. Utility of insulin-like growth factor-1 as a biomarker in epidemiologic studies. Clin Chem 2002;48:2248-51.
- [8] Mendenhall CL, Chernausek SD, Ray MB, Gartside PS, Roselle GA, Grossman CJ, et al. The interactions of insulin-like growth factor I(IGF-I) with protein-calorie malnutrition in patients with alcoholic liver disease: V.A. Cooperative Study on Alcoholic Hepatitis VI. Alcohol Alcohol 1989;24:319-29.
- [9] Lepenies J, Wu Z, Stewart PM, Strasburger CJ, Quinkler M. IGF-I, IGFBP-3 and ALS in adult patients with chronic kidney disease. Growth Horm IGF Res 2010;20:93-100.
- [10] Brabant G, Wallaschofski H. Normal levels of serum IGF-I determinants and validity of current reference ranges. Pituitary , 2007;10:129–33.
- [11] Mirpuri E, Garcia-Trevijano ER, Castilla-Cortazar I, Berasain C, Quiroga J, Rodriguez-Ortigosa C, et al. Altered liver gene expression in CCl4-cirrhotic rats is partially normalized by insulin-like growth factor-I. Int J Biochem Cell Biol 2002;34:242-52.

- [12] Moller S, Becker U, Juul A, Skakkebaek NE, Christensen E. Prognostic value of insulinlike growth factor I and its binding protein in patients with alcohol-induced liver disease. EMALD group. *Hepatology* 1996;23:1073-8.
- [13] Colakoglu O, Taskiran B, Colakoglu G, Kizildag S, Ari Ozcan F, Unsal B. Serum insulin like growth factor-1 (IGF-I) and insulin like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) levels in liver cirrhosis. *Turk J Gastroenterol* 2007;18:245-9.
- [14] Vyzantiadis T, Theodoridou S, Giouleme O, Harsoulis P, Evgenidis N, Vyzantiadis A. Serum concentrations of insulin-like growth factor-I (IGF-I) in patients with liver cirrhosis. *Hepatogastroenterology* 2003;50:814-6.
- [15] Volzke H, Nauck M, Rettig R, Dorr M, Higham C, Brabant G, et al. Association between hepatic steatosis and serum IGF-I and IGFBP-3 levels in a population-based sample. *Eur J Endocrinol* 2009;161:705-13.
- [16] Renz-Polster H, Krautzig S, Wellhoener P, Preuss R, Brüning A. *Leber, Galle, Pankreas. Basislehrbuch Innere Medizin 4. Auflage*, Elsevier Urban & Fischer, München, Jena, 2008, S.656-719.
- [17] Simonovsky V. The diagnosis of cirrhosis by high resolution ultrasound of the liver surface. *Br J Radiol* 1999;72:29–34.
- [18] Allan R, Thoires K, Phillips M. Accuracy of ultrasound to identify chronic liver disease. *World J Gastroenterol*, 2010;16:3510–20.
- [19] Pugh RNM, Murray-Lyon IM, Dawson JL, Pietroni MC, Williams R. Transection of the esophagus for bleeding esophageal varices. *Brit J Surg.* 1973;60:646-54.
- [20] Hahn N, Bobrowski C, Weber E, Simon P, Kraft M, Aghdassi A, Raetzell M, Wilke M, Lerch M M, Mayerle J. Gesundheitsökonomische Aspekte der stationären Behandlung von Patienten mit dekompenzierter Leberzirrhose: eine prospektive Studie unter Nutzung eines evidenzbasierten Behandlungspfads *Z Gastroenterol* 2012;50:1–9.
- [21] Conchillo M, Prieto J, Quiroga J. Insulin-like growth factor I (IGF-I) and liver cirrhosis. *Rev Esp Enferm Dig* 2007;99:156-64.
- [22] Novosyadlyy R, Dargel R, Scharf JG. Expression of insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding proteins during thioacetamide-induced liver cirrhosis in rats. *Growth Horm IGF Res* 2005;15:313–23.
- [23] Conchillo M, de Knecht RJ, Payeras M, Quiroga J, Sangro B, Herrero JI, et al. Insulin-like growth factor I (IGF-I) replacement therapy increases albumin concentration in liver cirrhosis: results of a pilot randomized controlled clinical trial. *J Hepatol* 2005;43:630–6.

- [24] Guyot C, Lepreux S, Combe C, Doudnikoff E, Bioulac-Sage P, Balabaud C, Desmoulière A. Hepatic fibrosis and cirrhosis: the (myo)fibroblastic cell subpopulation involved. *Int J Biochem Cell Biol.* 2006; 38(2):135-51.
- [25] Sanz S, Pucilowska J B, Liu S, Rodríguez-Ortigosa C M, Brenner P K L, Brenner D A, Fuller C R, Simmons, Pardo A, Martínez-Chantar M-L, Fagin and Prieto J A. Expression of insulin-like growth factor I by activated hepatic stellate cells reduce fibrogenesis and enhances regeneration after liver injury, *Gut.* 2005; 54(1):134–141.
- [26] Wu YL, Ye J, Zhang S, Zhong J, Xi RP. Clinical significance of serum IGF-I, IGF-II and IGFBP-3 in liver cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2004;10:2740-3.
- [27] Scharf JG, Schmitz F, Frystyk J, Skjaerbaek C, Moesus H, Blum WF, et al. Insulin-like growth factor-I serum concentrations and patterns of insulin-like growth factor binding proteins in patients with chronic liver disease. *J Hepatol* 1996;25:689-99.
- [28] Donaghy A, Ross R, Gimson A, Hughes SC, Holly J, Williams R. Growth hormone, insulinlike growth factor-1, and insulinlike growth factor binding proteins 1 and 3 in chronic liver disease. *Hepatology* 1995;21:680-8.
- [29] Assy N, Pruzansky Y, Gaitini D, Shen Orr Z, Hochberg Z, Baruch Y. Growth hormone-stimulated IGF-I generation in cirrhosis reflects hepatocellular dysfunction. *J Hepatol* 2008;49:34-42.
- [30] Moller S, Juul A, Becker U, Flyvbjerg A, Skakkebaek NE, Henriksen JH. Concentrations, release, and disposal of insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins (IGFBP), IGF-I, and growth hormone in different vascular beds in patients with cirrhosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:1148-57.
- [31] Nedic O, Nikolic JA, Hajdukovic-Dragojlovic L, Todorovic V, Masnikosa R. Alterations of IGF-binding proteins in patients with alcoholic liver cirrhosis. *Alcohol* 2000;21:223-9.
- [32] Santolaria F, Gonzalez-Gonzalez G, Gonzalez-Reimers E, Martinez-Riera A, Milena A, Rodriguez-Moreno F, et al. Effects of alcohol and liver cirrhosis on the GH-IGF-I axis. *Alcohol* 1995;30:703-8.

7. ANHANG

7.1. Wissenschaftliche Publikationen

Wallek G, Friedrich N, Ittermann T, Mayerle J, Völzke H, Nauck M, Spielhagen C.
IGF-I and IGFBP-3 in patients with liver disease.
J Lab Med 2013;37(1):13-20.

IGF-I and IGFBP-3 in patients with liver disease

Grit Wallek, Nele Friedrich, Till Ittermann, Julia Mayerle, Henry Völzke, Matthias Nauck and Christin Spielhagen

Abstract

Background: Hepatic stellate cells are stimulated by insulin-like growth factor I (IGF-I) and high IGF-I levels attenuate fibrogenesis and accelerate liver regeneration. This effect is mainly mediated by up regulation of hepatic growth factor and down regulation of transforming growth factor β 1. Thus, decreased IGF-I levels in patients point to an impaired regeneration potential in chronic liver failure. The objective of this study was to evaluate the relation between liver dysfunction and levels of IGF-I and IGF binding protein 3 (IGFBP-3) levels.

Methods: One hundred and twenty-seven patients aged 45 to 60 years (36 women, 91 men) with diagnosed liver disease were recruited for the study. From the Study of Health in Pomerania (SHIP), 508 healthy individuals were matched for age and sex as the control group. Associations between laboratory parameters of liver failure and IGF-I or IGFBP-3 were examined. Serum IGF-I and serum IGFBP-3 levels were measured by automated two-site chemiluminescence immunoassays.

Results: IGF-I and IGFBP-3 levels were significantly lower in patients with liver diseases. There was no detectable homogeneous relation between liver transaminases and IGF-I or IGFBP-3 levels in the patient group alone. Patients with a Child-Pugh - Score of C revealed lower levels of IGF-I than patients with Child-Pugh-Scores of B or A. In IGFBP-3, this association was also apparent, but statistically not significant. In pooled analyses of patients and healthy controls, negative associations between aspartate aminotransferase (ASAT) and γ - glutamyltranspeptidase (GGT) activities and IGF-I and IGFBP-3 levels, as well as between alanine aminotransferase (ALAT) activity and IGF-I levels were detected.

Conclusions: We demonstrated that compared with healthy controls patients with liver disease exhibited lower IGF-I and IGFBP-3 levels.

Keywords: IGF-I; IGFBP-3; liver diseases; transaminases.

Introduction

Activities of liver enzymes γ -glutamyltranspeptidase (GGT), aspartate aminotransferase (ASAT), alanine

aminotransferase (ALAT) and serum bilirubin, levels of plasma proteins, and prothrombin time [1 – 6] are clinical laboratory parameters that are used for diagnosis and monitoring of patients with liver disease. Some of these parameters reflect the function of hepatocytes (serum proteins including coagulation factors and albumin, bilirubin), other parameters are related to tissue damage including ASAT, ALAT and GGT. GGT activity is an established marker for liver cell damage and is elevated during the early damage process. With the progress of liver cell damage, an increase in serum ASAT can be detected at which increased ALAT activity is specific for liver cell damage. The severity of chronic liver damage, especially cirrhosis, is assessed based on the alteration of laboratory parameters and is categorized by the Child-Pugh-Score [1, 3, 7 – 9]. This diagnostic tool is defined by ascitic fluid, encephalopathy, albumin concentration, bilirubin concentration and the prolongation of prothrombin time to verify the stage of liver disease.

Growth hormone (GH) is the most powerful stimulus for hepatic insulin-like growth factor 1 (IGF-I) and IGF binding protein 3 (IGFBP-3) secretion. The liver represents the major source of circulating IGF-I and IGFBP-3. IGF-I demonstrates most of the GH-related effects [1, 10, 11]. The bioavailability of IGF-I is modified by IGFBPs. IGFBP-3 binds most circulating IGF. IGF-I concentration depends on GH secretion, nutritional status, age, sex and renal function [1, 12 – 16]. The role of IGF-I in the pathogenesis of liver cirrhosis is still not fully understood. In chronic liver disease, basal GH concentration is elevated, whereas serum levels of IGF-I and IGFBP-3 are decreased [1 – 4, 8 – 10, 14, 17 – 25]. Impaired IGF-I generation results in the loss of negative feedback on GH secretion and elevated GH levels. Another hypothesis to explain the high GH levels in cirrhotic patients is that the clearance of GH through GH receptors is decreased in patients with cirrhosis [24, 26].

Previous studies focused on the relation between IGF-I and different types of liver disease [5, 20, 27, 28] and showed that, irrespective of the origin of liver disease, IGF-I levels were low in these patients. Other studies investigated the effect of exogenous IGF-I application and revealed an improvement in liver function and a reduction in oxidative liver damage and fibrosis [7, 16, 21, 29]. Furthermore, the studies described that, due to its mitogenic, chemotactile and fibrogenic activities, IGF-I triggers hepatic stellate cells and myofibroblasts to induce mitosis and collagen production, promoting fibroproliferative processes in the injured liver [16, 30]. The present study associated laboratory parameters of liver dysfunction to IGF-I and IGFBP-3 levels.

Materials and methods

Patient characteristics

We analysed data from 127 consecutively recruited patients aged 45 to 60 years (mean age, 50.2 years; 36 women and 91 men) with liver dysfunction who were admitted to our hospital. A total of 87 patients were included because ALAT, ASAT or GGT activities were three times higher than the upper reference levels in blood, which was taken at hospital admission. A total of 40 patients were included because the presence of structural criteria on ultrasound indicated liver cirrhosis. Therapeutic success was monitored by the treating physicians. All patients received standard care for decompensating liver disease with respect to hospital and national guidelines. In the 40 patients we analysed, the cause of liver disease was based on anamnestic data and serological markers. Etiologies were recorded as followed: alcoholic liver disease (n = 26, 65 %), viral hepatitis (n = 3, 7.5 %), toxic liver disease (n = 3, 7.5 %), autoimmune disease of the liver (n = 3, 7.5 %) or liver disease of secondary to cardiac disease (n = 3, 7.5 %). The 40 patients with suspected liver cirrhosis were classified according to the Child-Pugh-Score. Of those randomly assigned patients, 4 presented with Child-Pugh-Score Class A (5 to 6 points), 18 with Child-Pugh-Score Class B (7 to 9 points) and 18 with Child-Pugh-Score Class C (10 to 15 points) [31]. In all 127 patients, IGF-I, IGFBP-3 serum levels, activity of ALAT, ASAT and GGT, and creatinine were determined. All patients gave informed written consent to participate in the study and for the scientific use of data. The Ethics Committee of the Medical Faculty of the University Greifswald gave approval for this study (registration number BB46/08). As the healthy control group (Table 1), we selected 508 individuals (364 men and 144 women) matched for age and sex from the Study of Health in Pomerania (SHIP) who did not have any of the following conditions: diabetes mellitus, cancer, renal disease, liver disease, disease of the pituitary gland and body mass index (BMI) > 30 or < 18 kg/m² [12, 32].

Laboratory methods

Serum samples were stored at – 80 ° C until analysis. IGF-I and IGFBP-3 concentrations were determined using an automated chemiluminescent immunometric assay on an Immulite 2500 analyzer (Siemens Healthcare Diagnostics, Eschborn, Germany), as previously described [32]. Analytical sensitivity of the IGF-I assay was 20 ng/mL. The IGF-I assay has been calibrated against the World Health Organization international reference reagent 1988, IGF-I 87/518. Two levels of quality control material were measured with each series. Analytical sensitivity of the IGFBP-3 assay was 100ng/mL. The IGFBP-3 assay has been calibrated against the World Health Organization international reference reagent, IGFBP-3 93/560. Two levels of quality control material were measured with each series. ASAT, ALAT and GGT activities were measured photometrically using Dimension RxL or Dimension Vista instruments

(Siemens Healthcare Diagnostics). Serum creatinine concentrations were determined using the Jaffé method.

Statistical analysis

Data for quantitative characteristics are expressed as the median and interquartile range. Data for qualitative characteristics are expressed as percentages and absolute numbers, as indicated. Differences between the study populations were tested by the Wilcoxon test for continuous data and by the χ^2 -test for categorical data. Activities of ALAT, ASAT and GGT were associated with IGF-I and IGFBP-3 levels by linear regression models adjusted for age, sex and serum creatinine levels. Fractional polynomials (FPs) were applied to explore and graph nonlinear associations [33]. A dose-response relation was found using FPs up to degree 2 with all possible combinations of powers selected from the set (–2, –1, –0.5, 0, 0.5, 1, 2, 3), and they were then compared using the log likelihood to determine the best-fitting model. If none of the FP models fit the data significantly better than the linear model, linear regression was applied. For all multivariable analyses, IGF-I and IGFBP-3 levels were transformed by a power transformation to reduce the effects of outliers on the FPs [33]. Associations were first determined for patients and then for the pooled population of patients and controls. The Child-Pugh-Score was associated with IGF-I and IGFBP-3 levels in patients. In all analyses, a p-value < 0.05 was considered to be statistically significant. All statistical analyses were performed by Stata 11.0 (Stata Corporation, College Station, TX, USA).

Results

Table 1 shows the characteristics of the study population stratified by patients and controls. Patients had higher activities of serum ALAT, ASAT and GGT and lower levels of IGF-I and IGFBP-3 compared with controls. Results of multivariable regression analyses are given in Table 2. Among patients, ALAT activities were positively associated with IGF-I levels, whereas this relation was inversely associated in the pooled population of patients and controls. Further, ASAT activity was inversely associated with IGF-I levels in patients alone as well as in the pooled population. No association became apparent between GGT activities and IGF-I levels in

Table 1 Characteristics of the study population and control group.

	Patients (n=127)	Controls (n=508)	p-Value ^a
Age, years	50.2 (45.0; 59.9)	50.0 (41.0; 61.0)	0.515
Males	91 (71.7%)	364 (71.7%)	0.999
IGF-1, ng/mL	66.7 (37.5; 104.0)	137.0 (110.5; 172.5)	<0.001
IGFBP-3, ng/mL	2670 (1520; 4030)	3895 (3305; 4420)	<0.001
ALAT, μ kat/L	0.93 (0.60; 1.70)	0.47 (0.34; 0.62)	<0.001
ASAT, μ kat/L	0.95 (0.67; 1.70)	0.37 (0.30; 0.44)	<0.001
GGT, μ kat/L	4.70 (2.50; 7.60)	0.47 (0.33; 0.76)	<0.001
Creatinine, μ mol/L	74 (63; 91)	85 (78; 93)	<0.001

ASAT, aspartate aminotransferase; ALAT, alanine aminotransferase; GGT, γ -glutamyltranspeptidase; IGF-1, insulin-like growth factor 1; IGFBP-3, insulin-like growth factor binding protein 3. Data are absolute numbers (percentages) or means (standard deviation). ^ap-Values were calculated with the χ^2 -test for categorical and the Wilcoxon test for continuous variables.

patients. However, in the pooled population an inverse relation between GGT activities and IGF-I levels was found. With respect to IGFBP-3, a positive relation with ALAT activities in patients but not in the pooled population was detected. The opposite was found for GGT activities which were only inversely associated with IGFBP-3 levels in the pooled population. In both populations, ASAT was inversely associated with IGFBP-3 levels. All significant associations between transaminases activities and IGF-I or IGFBP-3 levels in the pooled population are illustrated in Figures 1 and 2. To consider a possible effect of kidney function on our results, all models were furthermore adjusted for serum creatinine levels. However, this adjustment did not change the results substantially (data not shown) [15].

In a subsample of 40 patients, the Child-Pugh-Score was available. Of those, 18 patients were diagnosed with decompensate liver cirrhosis with an expected median survival of 24 months (Child-Pugh-Score C). Multivariable regression analyses revealed that patients with decompensated liver cirrhosis (Child-Pugh-Score C; total number, 18) had significantly lower IGF-I levels compared with patients with clinically less advanced cirrhosis [total number, 22, Child-Pugh-Scores A and B, respectively; $\beta = -26.6$; 95 % confidence interval

(CI) = -51.5 ; -1.7 ; $p = 0.037$; Figure 3]. IGFBP-3 levels did not differ significantly between patients with decompensate liver cirrhosis or compensated disease ($\beta = -642.6$; 95 % CI = -1334.0 ; 48.8 ; $p = 0.068$). Using the Child-Pugh-Score as an exposition variable we obtained similar results.

Discussion

Chronic liver failure is associated with severe hormonal and metabolic diversifications. The main aim of our study was to determine an association between liver cell damage and IGF-I/IGFBP-3 serum concentration. We studied the relationship between laboratory parameters for liver dysfunction and serum IGF-I and IGFBP-3 levels using data from 127 hospitalized patients with a confirmed diagnosis of liver disease. As a control group, we used 508 age- and sex-matched controls selected from a large population-based study.

The results of our study confirm those from previous studies, which detected lower serum IGF-I and IGFBP-3 levels in patients with liver disease compared with healthy controls [4 – 6, 8, 9, 18 – 21].

Table 2 Associations between ALAT, ASAT, GGT and IGF-1 or IGFBP-3.

Transformations		Patients (n=127) β (95% CI); p-value	Transformations	Patients and controls (n=635) β (95% CI); p-value
IGF-1				
ALAT, μ kat/L	ALAT ¹	54.7 (12.8; 96.5); 0.011	ALAT ¹	-73.2 (-103.0; -43.4); <0.001
ASAT, μ kat/L	ASAT ¹	-46.6 (-91.1; -2.1); 0.040	ASAT ¹	-303.2 (-353.6; -252.9); <0.001
			log(ASAT)*ASAT ¹	489.6 (354.8; 624.5); <0.001
GGT, μ kat/L	GGT ¹	-26.0 (-72.2; 20.2); 0.267	GGT ¹	22.2 (18.2; 26.2); <0.001
IGFBP-3				
ALAT, μ kat/L	ALAT ¹	1176.2 (16.8; 2335.6); 0.047	ALAT ¹	-307.2 (-920.8; 306.4); 0.326
ASAT, μ kat/L	ASAT ¹	-1343.8 (-2561.3; -126.3); 0.031	ASAT ²	430.1 (237.4; 622.8); <0.001
			log(ASAT)*ASAT ²	219.2 (105.1; 333.2); <0.001
GGT, μ kat/L	GGT ¹	-331.4 (-1603.2; 940.4); 0.607	GGT ²	501.8 (325.7; 677.9); <0.001
			log(GGT)*GGT ²	265.4 (166.0; 364.7); <0.001

ASAT, aspartate aminotransferase; ALAT, alanine aminotransferase; CI, confidence interval; GGT, γ -glutamyltranspeptidase; IGF-1, insulin-like growth factor 1; IGFBP-3, insulin-like growth factor binding protein 3. The exposition variable was power-transformed before use in the regression models. All models were adjusted for age, sex and serum creatinine.

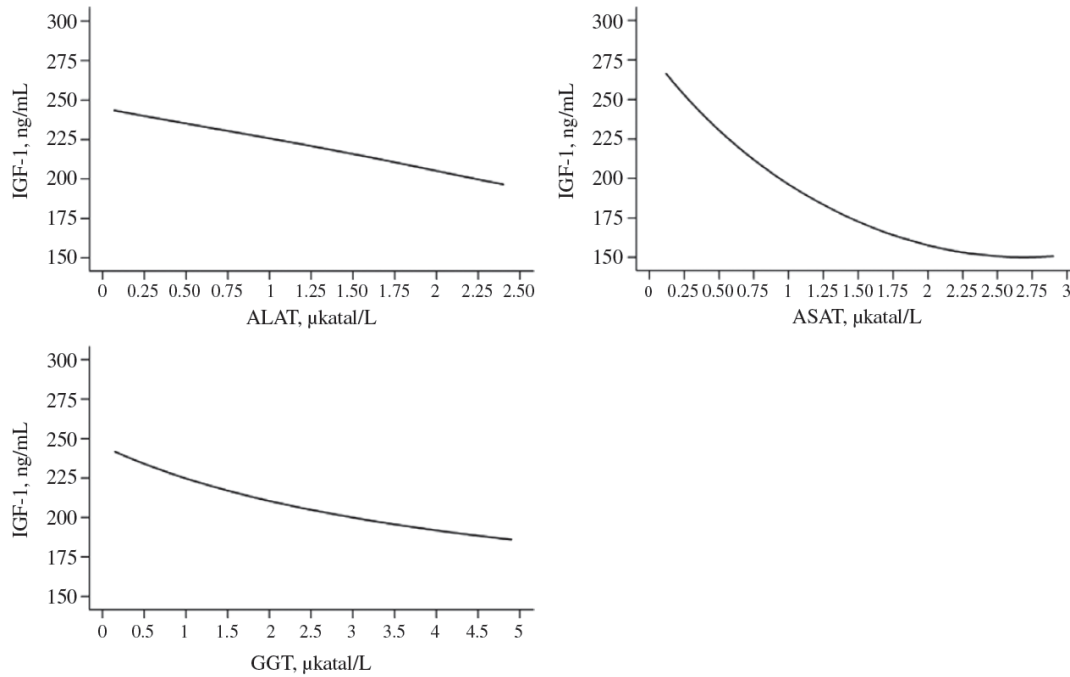


Figure 1 Significant associations between the activities of transaminases and IGF-1 concentration in the pooled population of patients and controls.

First of all, we used ALAT, ASAT and GGT to characterize liver cell damage and found no homogeneous correlation between elevated serum transaminase activities and IGF-I and IGFBP-3 levels.

This is in line with the results of Völzke et al., who did not report any clear association between liver impairment and IGFBP-3 levels. Whereas they found

an clear association between IGF-I and hepatic steatosis and the metabolic syndrome [28]. However, because we assembled a cohort of patients who already had elevated serum transaminases activities, there were difficulties in distinguishing severely sick patients from patients in a mild or moderate stage of the disease. The level of transaminases alone may not predict the severity of liver diseases. It may be that

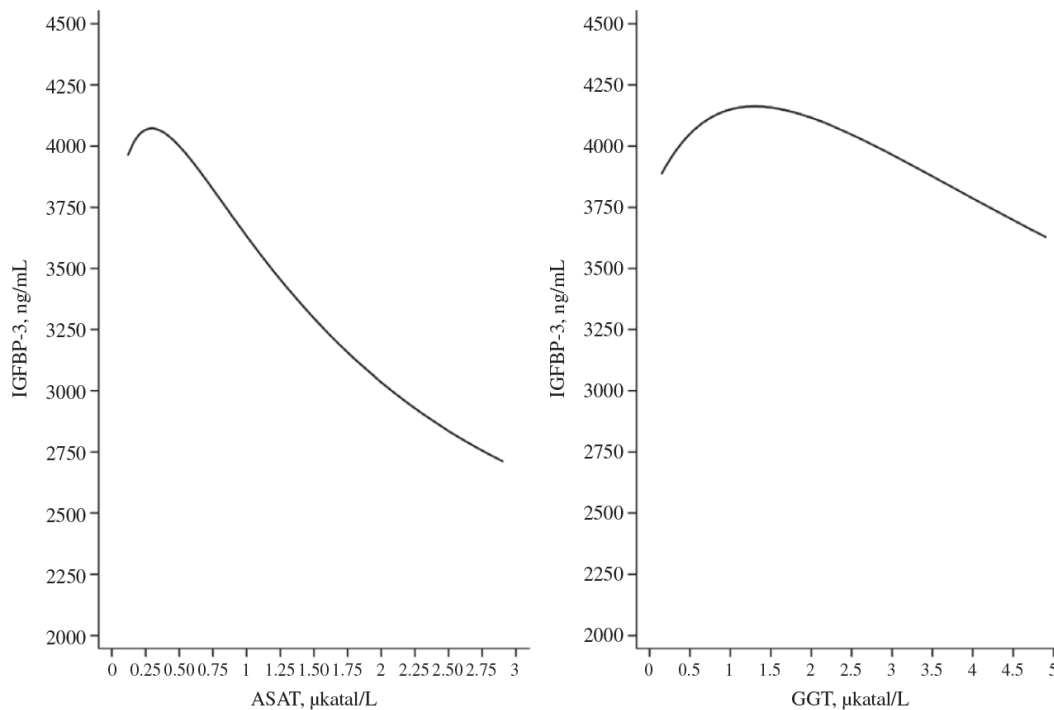


Figure 2 Significant associations between the activities of transaminases and IGFBP-3 concentration in the pooled population of patients and controls.

only a certain degree of severity of liver disease must be achieved to detect a change in the levels of IGF-I and IGFBP-3. This is in line with Scharf et al., who detected no differences in IGF-I and IGFBP-3 levels between healthy individuals and patients with non-cirrhotic liver disease, whereas there were considerable differences between healthy individuals and patients who had already reached the cirrhotic stage [3].

With these results in mind, we selected a subgroup of 40 patients out of our pool of 127 hospitalized patients and accomplished a procedure of specific liver diagnostics with them. Those 40 individuals were classified into three different stages of liver impairment based on the Child-Pugh-Score and accordingly we were able to describe the severity of liver disease from a different approach.

Patients with compensated liver cirrhosis (Child-Pugh-Scores A or B) exhibited higher IGF-I levels compared with patients who had already developed decompensate state of the disease (Child-Pugh-Score C). With these results, we demonstrated that there is a significant correlation between total Child-Pugh-Score and IGF-I levels, which is in agreement with results of former studies [2 – 4, 6, 7, 9, 10, 18, 25, 27]. For example, Assy et al. [6, 9] showed that low serum IGF-I levels correlate with the degree of liver failure. He found that baseline IGF-I was significantly lower in patients than in healthy controls, whereas no differences were noted within the patient groups. However, in addition to basal IGF-I levels, Assy et al. extended their findings by documenting the response of IGF-I and IGFBP-3 on exogenous GH stimulation and stated that in advanced cirrhosis the response to GH is considerably reduced.

The main aim of most of these studies [5 – 8] was to be able to predict the outcome of patients by using IGF-I levels and Child-Pugh-score to predict survival rate of patients in different stages of the disease [9]. Neither IGF-I nor the Child Score alone had a very precise prediction on the outcome of a patient [6, 9]. The combination of those two tools managed to predict the chances of survival correctly in 93 % of cases. Even though the majority of studies are in line with our findings, there is a small group of researchers who failed to show a significant correlation between the extent of liver cell damage and IGF-I [34]. A possible reason for this finding could be owing to the small group of randomly selected patients. For example, people with renal disease were not excluded from this study and no patient follow-up took place.

Most previous studies [4 – 6, 8, 9] also found significant alterations in serum IGFBP-3 levels. We observed only an apparent but not significant negative correlation between IGFBP-3 levels and increase in Child-Pugh-Score. One reason for this result, that no significant relation between IGFBP-3 levels and Child-Pugh-Score was found, could be the low number of observed patients. Another reason could be patients' conditions, suggesting that nutritional status, age, infections, fasting periods and stress influence IGFBP-3 secretion as well as IGF-I. Our study did not distinguish those categories and used individuals with positive criteria for liver cirrhosis irrespective of their actual condition.

Remarkable differences in liver transaminase levels and IGF-I and IGFBP-3 between patients and controls were demonstrated. Associations were first determined for the study population and then for the pooled population of cases and controls.

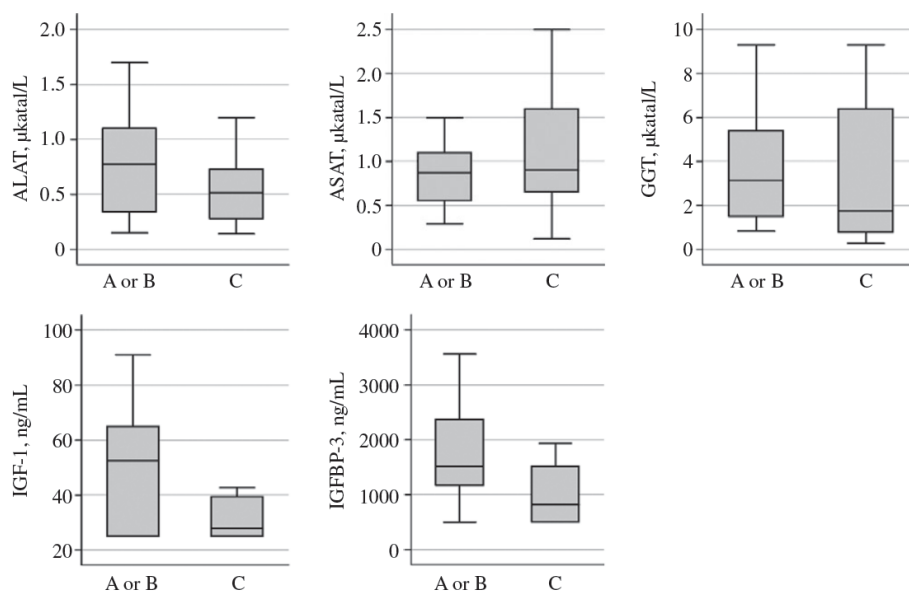


Figure 3 Box plots for ALAT, ASAT, GGT, IGF-1 and IGFBP-3 levels of patients with a Child Pugh Score of A or B in comparison with patients with a Child Pugh Score of C.

In comparison to the individuals from the control group with ALAT, ASAT and GGT levels within the normal range and normal IGF-I and IGFBP-3 levels, patients with elevated ASAT and GGT levels had significantly lower IGF-I and IGFBP-3 levels. Interestingly, elevated ALAT levels did not lead to significant lower IGFBP-3 levels, whereas IGF-I still remained significantly low. This comparison supports our initial hypothesis, and we were finally able to show a negative correlation between elevated transaminase levels and low IGF-I and IGFBP-3 levels. At this time of the study we cannot say why we were not able to detect a negative correlation between elevated ALAT activity and IGFBP-3 levels. Again, the small group of patients (n = 40) with detailed information (lifestyle, abdominal ultrasound, Child-Pugh classification) could be one reason. Another reason, of course, could be that we used ultrasonographic diagnosis of liver cirrhosis and not a histological proof by liver biopsy. Otherwise, there are already sufficient studies which demonstrate that ultrasound analysis is a reliable non-invasive test for the diagnosis of liver cirrhosis [35, 36]. The advantage of our study is that we are able to compare the patients' results with a well-defined control group. There are only a few studies that have directly focused on the relationship between transaminases activities and IGF-I and IGFBP-3 levels [1, 10, 28]. Of those we can corroborate the results.

Conclusions

Our data show that serum IGF-I and IGFBP-3 levels are significantly lower in patients with liver disease than in healthy individuals. We detected negative associations between activities of ASAT, ALAT, GGT and IGF-I levels and negative associations between activities of ASAT and GGT and IGFBP-3 levels. There was also a relation between Child-Pugh-Score and IGF-I levels. In the diagnostics of diseases of the somatotrophic pituitary axis, liver function should be included to interpret the parameters IGF-I and IGFBP-3. If there is evidence of liver disease, transaminases and Child-Pugh-Score in the evaluation of IGF-I and IGFBP-3 may be helpful. Further studies for clarification of pathophysiological correlations are needed.

References

- De Palo EF, Bassanello M, Lancerin F, Spinella P, Gatti R, D'Amico D, et al. GH/IGF system, cirrhosis and liver transplantation. *Clin Chim Acta* 2001;310:31 – 7.
- Wu YL, Ye J, Zhang S, Zhong J, Xi RP. Clinical significance of serum IGF-I, IGF-II and IGFBP-3 in liver cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2004;10:2740 – 3.
- Scharf JG, Schmitz F, Frystyk J, Skjaerbaek C, Moesus H, Blum WF, et al. Insulin-like growth factor-I serum concentrations and patterns of insulin-like growth factor binding proteins in patients with chronic liver disease. *J Hepatol* 1996;25: 689 – 99.
- Donaghy A, Ross R, Gimson A, Hughes SC, Holly J, Williams R. Growth hormone, insulinlike growth factor-1, and insulinlike growth factor binding proteins 1 and 3 in chronic liver disease. *Hepatology* 1995;21:680–8.
- Moller S, Becker U, Juul A, Skakkebaek NE, Christensen E. Prognostic value of insulinlike growth factor I and its binding

- protein in patients with alcohol-induced liver disease. *EMALD group. Hepatology* 1996;23:1073–8.
- Assy N, Hochberg Z, Amit T, Shen-Orr Z, Enat R, Baruch Y. Growth hormone-stimulated insulin-like growth factor (IGF) I and IGF-binding protein-3 in liver cirrhosis. *J Hepatol* 1997;27:796 – 802.
- Conchillo M, Prieto J, Quiroga J. [Insulin-like growth factor I (IGF-I) and liver cirrhosis]. *Rev Esp Enferm Dig* 2007;99:156 – 64.
- Assy N, Hochberg Z, Enat R, Baruch Y. Prognostic value of generation of growth hormone-stimulated insulin-like growth factor-I (IGF-I) and its binding protein-3 in patients with compensated and decompensated liver cirrhosis. *Dig Dis Sci* 1998;43:1317 – 21.
- Assy N, Pruzansky Y, Gaitini D, Shen Orr Z, Hochberg Z, Baruch Y. Growth hormone-stimulated IGF-I generation in cirrhosis reflects hepatocellular dysfunction. *J Hepatol* 2008;49:34 – 42.
- Moller S, Juul A, Becker U, Flyvbjerg A, Skakkebaek NE, Henriksen JH. Concentrations, release, and disposal of insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins (IGFBP), IGF-I, and growth hormone in different vascular beds in patients with cirrhosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:1148 – 57.
- Mathews LS, Norstedt G, Palmeter RD. Regulation of insulin-like growth factor I gene expression by growth hormone. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:9343 – 7.
- Friedrich N, Alte D, Volzke H, Spilcke-Liss E, Ludemann J, Lerch MM, et al. Reference ranges of serum IGF-I and IGFBP-3 levels in a general adult population: results of the Study of Health in Pomerania (SHIP). *Growth Horm IGF Res* 2008;18:228 – 37.
- Borofsky ND, Vogelman JH, Krajcik RA, Orentreich N. Utility of insulin-like growth factor-I as a biomarker in epidemiologic studies. *Clin Chem* 2002;48:2248 – 51.
- Mendenhall CL, Chernauek SD, Ray MB, Gartside PS, Roselle GA, Grossman CJ, et al. The interactions of insulin-like growth factor I (IGF-I) with protein-calorie malnutrition in patients with alcoholic liver disease: V.A. Cooperative Study on Alcoholic Hepatitis VI. *Alcohol Alcohol* 1989;24:319 – 29.
- Lепеніс J, Wu Z, Stewart PM, Strasburger CJ, Quinkler M. IGF-I, IGFBP-3 and ALS in adult patients with chronic kidney disease. *Growth Horm IGF Res* 2010;20:93 – 100.
- Mirpuri E, Garcia-Trevijano ER, Castilla-Cortazar I, Berasain C, Quiroga J, Rodriguez-Ortigosa C, et al. Altered liver gene expression in CCl4-cirrhotic rats is partially normalized by insulin-like growth factor-I. *Int J Biochem Cell Biol* 2002;34:242 – 52.
- Brabant G, Wallaschofski H. Normal levels of serum IGF-I: determinants and validity of current reference ranges. *Pituitary* 2007;10:129 – 33.
- Nedic O, Nikolic JA, Hajdukovic-Dragojlovic L, Todorovic V, Masnikosa R. Alterations of IGF-binding proteins in patients with alcoholic liver cirrhosis. *Alcohol* 2000;21:223 – 9.
- Blomsma MC, de Knecht RJ, Dullaart RP, Jansen PL. Insulin-like growth factor-I in liver cirrhosis. *J Hepatol* 1997;27:1133 – 8.
- Colakoglu O, Taskiran B, Colakoglu G, Kizildag S, Ari Ozcan F, Unsal B. Serum insulin like growth factor-I (IGF-I) and insulin like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) levels in liver cirrhosis. *Turk J Gastroenterol* 2007;18:245 – 9.
- Novosyadlyy R, Dargel R, Scharf JG. Expression of insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding proteins during thioacetamide-induced liver cirrhosis in rats. *Growth Horm IGF Res* 2005;15:313 – 23.
- Caregaro L, Alberino F, Angeli P, Gatta A. Insulin-like growth factor 1 (IGF-I) in liver cirrhosis: a marker of hepatocellular dysfunction? *J Hepatol* 1998;29:342.
- Okan A, Comlekci A, Akpınar H, Okan I, Yesil S, Tankurt E, et al. Serum concentrations of insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding protein-3 in patients with chronic hepatitis. *Scand J Gastroenterol* 2000;35:1212 – 5.
- Wallace JD, Abbott-Johnson WJ, Crawford DH, Barnard R, Potter JM, Cuneo RC. GH treatment in adults with chronic liver disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled, cross-over study. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:2751 – 9.

25. Santolaria F, Gonzalez-Gonzalez G, Gonzalez-Reimers E, Martinez-Riera A, Milena A, Rodriguez-Moreno F, et al. Effects of alcohol and liver cirrhosis on the GH-IGF-I axis. *Alcohol* 1995;30:703 – 8.
26. Hattori N, Kurahachi H, Ikekubo K, Ishihara T, Moridera K, Hino M, et al. Serum growth hormone-binding protein, insulin-like growth factor-I, and growth hormone in patients with liver cirrhosis. *Metabolism* 1992;41:377 – 81.
27. Vyzantiadis T, Theodoridou S, Giouleme O, Harsoulis P, Evgenidis N, Vyzantiadis A. Serum concentrations of insulin-like growth factor-I (IGF-I) in patients with liver cirrhosis. *Hepatology* 2003;50:814– 6.
28. Völzke H, Nauck M, Rettig R, Dorr M, Higham C, Brabant G, et al. Association between hepatic steatosis and serum IGF-I and IGFBP-3 levels in a population-based sample. *Eur J Endocrinol* 2009;161:705 – 13.
29. Conchillo M, de Knegt RJ, Payeras M, Quiroga J, Sangro B, Herrero JI, et al. Insulin-like growth factor I (IGF-I) replacement therapy increases albumin concentration in liver cirrhosis: results of a pilot randomized controlled clinical trial. *J Hepatol* 2005;43:630 – 6.
30. Mezey E. Insulin growth factor I and hypogonadism in cirrhosis. *Hepatology* 2000;31:783– 4.
31. Desmet VJ, Gerber M, Hoofnagle JH, Manns M, Scheuer PJ. Classification of chronic hepatitis: diagnosis, grading and staging. *Hepatology* 1994;19:1513– 20.
32. Friedrich N, Krebs A, Nauck M, Wallaschofski H. Age- and gender-specific reference ranges for serum insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF-binding protein-3 concentrations on the Immulite 2500: results of the Study of Health in Pomerania (SHIP). *Clin Chem Lab Med* 2010;48:115 – 20.
33. Royston P, Sauerbrei W. *Multivariable model-building: a pragmatic approach to regression analysis based on fractional polynomials for modelling continuous variables*. Hoboken, NJ: Wiley, 2008.
34. Kratzsch J, Blum WF, Schenker E, Keller E. Regulation of growth hormone (GH), insulin-like growth factor (IGF)I, IGF binding proteins -1, -2, -3 and GH binding protein during progression of liver cirrhosis. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1995;103:285 – 91.
35. Simonovsky V. The diagnosis of cirrhosis by high resolution ultrasound of the liver surface. *Br J Radiol* 1999;72:29 – 34.
36. Allan R, Thoires K, Phillips M. Accuracy of ultrasound to identify chronic liver disease. *World J Gastroenterol* 2010;16:3510 – 20.

7.2. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät, keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Greifswald, den 26.02.2014

Grit Wallek