

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Agnieszka Adamek

Rola insulinopodobnego czynnika wzrostu 1
i związanych z nim białek w progresji
przewlekłego zapalenia wątroby typu C

Poznań 2013

Tytuł angielski

The role of insulin-like growth factor 1 and related proteins in the progression of chronic hepatitis C

Recenzja wydawnicza

prof. dr hab. n. med. Aldona Kasprzak

Korekta wydawnicza

Janina S. Rogalińska

Skład, łamanie i projekt okładki

Bartłomiej Wąsiel

© Copyright by Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu,
Poznań 2013

© Copyright by Agnieszka Adamek, Poznań 2013

*Praca finansowana i wykonywana w ramach projektu badawczego
Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego Nr NN 401 009437*

ISBN 978-83-7597-208-5

WYDAWNICTWO NAUKOWE UNIWERSYTETU MEDYCZNEGO
IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU
ul. Bukowska 70, 60-812 Poznań
www.wydawnictwo.ump.edu.pl

Ark. wyd. 13,7. Ark. druk. 16,1.

Format B5. Zam. 105/13.

Druk ukończono w czerwcu 2013 r.

Spis treści

Objaśnienia skrótów stosowanych w tekście	5
1. Wstęp	9
1.1. Wirus C zapalenia wątroby	9
1.2. Rola białek wirusa HCV (C, NS3 i NS5) w kancerogenezie wątrobowej	13
1.3. Budowa genu IGF-1	15
1.4. Izoformy IGF-1	17
1.5. Rola izoform IGF-1	19
1.6. Gen IGF-1 a inne czynniki białkowe	19
1.7. Budowa i funkcja IGF-ów	20
1.8. Surowicze stężenia białek z rodziny IGF	24
1.9. Stężenia białek z rodziny IGF w zakażeniu HCV i nowotworach wątroby ..	28
1.10. Tkankowa ekspresja białek z rodziny IGF w chorobach wątroby i w karcynogenezie	31
2. Założenia i cele pracy	33
3. Materiał i metody	34
3.1. Pacjenci	34
3.1.1. Badania biochemiczne	36
3.1.2. Badania metodą ELISA	36
3.2. Materiał tkankowy	37
3.2.1. Biopsja wątroby u pacjentów z zakażeniem HCV i ocena histopatologiczna	37
3.2.2. Badania z zastosowaniem techniki <i>real-time</i> RT-PCR	39
3.2.3. Badania mikroskopowe	41
3.2.4. Półilościowa ocena ekspresji białek	43
3.2.5. Archiwizacja komputerowa obrazów z immunocytochemiczną /fluorescencyjną ekspresją białek	44
3.2.6. Analiza ilościowa reakcji immunocytochemicznej z zastosowaniem metody wizualizacji przestrzennej	45
3.3. Metody statystyczne	47
3.4. Zagadnienia etyczne	48
4. Wyniki	49
4.1. Charakterystyka kliniczna grupy badanej (pacjenci z przewlekłym zakażeniem HCV)	49
4.2. Ocena nasilenia zmian zapalnych (<i>grading</i>) i stopnia zaawansowania włóknienia (<i>staging</i>) w skali numerycznej	56
4.3. Surowicze stężenia badanych składników z rodziny IGF	57
4.4. Ekspresja tkankowa białek z rodziny IGF	62
4.5. Analiza porównawcza ekspresji białek systemu IGF w wątrobie pacjentów zakażonych HCV i w kontroli	70

4.6.	Analiza surowiczych stężeń białek osi IGF w zależności od nasilenia zmian zapalnych (<i>grading</i>) i zaawansowania włóknienia (<i>staging</i>) w wątrobie	71
4.7.	Korelacje surowiczych stężeń białek z rodziny IGF z danymi klinicznymi.	73
4.8.	Wzajemne korelacje pomiędzy surowiczymi stężeniami białek z rodziny IGF.	86
4.9.	Korelacje tkankowej ekspresji białek osi IGF z danymi klinicznymi.	86
4.10.	Ekspresja białek HCV (C, NS3 i NS5A) w wątrobie pacjentów z przewlekłym zakażeniem HCV	90
4.11.	Korelacje ekspresji białek wirusa HCV (C, NS3 i NS5) z danymi klinicznymi.	92
4.12.	Wątrobowa ekspresja białek systemu IGF (IGF-1, IGFBP-3 oraz IGF-1R) a białka HCV (C, NS3 i NS5A) u pacjentów z przewlekłym zakażeniem HCV	94
4.13.	Ekspresja izoform mRNA <i>IGF-1</i> w wątrobie.	95
4.14.	Ekspresja transkryptów klasy I i II w zależności od użytego promotora P1 lub P2.	95
4.15.	Ekspresja izoform splicingowych mRNA: IGF-1A, IGF-1B i IGF-1C– udział procentowy	96
4.16.	Porównanie ilościowe mRNA IGF-1 u chorych przewlekle zakażonych HCV i w kontroli	97
4.17.	Ekspresja mRNA receptora IGF-1R	99
4.18.	Ekspresja mRNA czynnika transkrypcyjnego SP1	100
4.19.	Korelacje pomiędzy ekspresją izoform mRNA IGF-1, mRNA IGF-1R i mRNA SP1 a danymi klinicznymi	100
	4.19.1. Izoformy mRNA IGF-1 a dane kliniczne	100
	4.19.2. Ekspresja transkryptów IGF-1R i SP1 a dane kliniczne.	102
4.20.	Izoformy mRNA IGF-1, mRNA IGF-1R i mRNA SP1 a surowicze stężenie IGF-1.	102
4.21.	Izoformy mRNA IGF-1, mRNA IGF-1R i mRNA SP1 a surowicze stężenie pozostałych białek z rodziny IGF	104
4.22.	Izoformy mRNA IGF-1 i mRNA IGF-1R a białka wirusa HCV.	104
4.23.	Wzajemne korelacje pomiędzy ekspresją mRNA izoform IGF-1, mRNA IGF-1R i mRNA SP1	105
5.	Dyskusja	107
5.1.	Stężenia białek z rodziny IGF w surowicy a wskaźniki funkcji wątroby	109
5.2.	Składniki osi IGF a udział estrogenów w chorobach wątroby	125
5.3.	Ekspresja tkankowa białek z rodziny IGF	128
5.4.	Alternatywny splicing IGF-1 w wątrobie pacjentów z zakażeniem HCV	135
6.	Wnioski.	146
7.	Streszczenie	147
8.	Summary	153
9.	Piśmiennictwo	159
10.	Aneks	185

Objaśnienia skrótów stosowanych w tekście

aa	(<i>amino acids</i>) – aminokwasy
ABC	(<i>avidin-biotin peroxidase complex</i>) – kompleks awidyna-biotynyłowana peroksydaza
AFP	(<i>alpha-fetoprotein</i>) – alfa-fetoproteina
AKT	(<i>serine/threonine-specific protein kinase</i>) – kinaza serynowo-treoninowa
ALT	(<i>alanine aminotransferase</i>) – aminotransferaza alaninowa
AST	(<i>aspartate aminotransferase</i>) – aminotransferaza asparaginianowa
ALS	(<i>acid-labile subunit</i>) – podjednostka kwasolabilna
AP-1	(<i>mitogenic and stress-activated transcription factor activating protein-1</i>) – białkowy czynnik transkrypcyjny aktywowany przez mitogen i stres
ARF	(<i>tumor suppressor transcribed from an alternate reading frame of the INK4a/ARF locus</i>) – supresor guza pochodzący z transkrypcji z alternatywnej ramki odczytu miejsca INK4a/ARF
BSA	(<i>bovine serum albumin</i>) – albumina surowicy wołowej
CA	(<i>cytosine/adenine</i>) – cytozyna, adenina
C protein	(<i>capsid, core HCV protein</i>) – białko C (rdzeniowe) wirusa HCV
cDNA	(<i>complementary DNA</i>) – komplementarny DNA
C/EBP	(<i>CCAAT-enhancer binding protein</i>) – czynnik transkrypcyjny
CRE	(<i>cAMP (cyclic adenosine 5'-monophosphate) response element</i>) – fragment odpowiadający na cykliczny adenozynomonofosforan
DAB	(<i>3,3'-diaminobenzidine</i>) – 3,3'-diaminobenzydyna
DAPI	(<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>) – 4',6-diamidyno-2-fenylindol
EGF	(<i>epidermal growth factor</i>) – naskórkowy czynnik wzrostu
ELISA	(<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>) – enzymatyczny odczyn immunoabsorbcyjny; odczyn immunoenzymatyczny
ERK	(<i>extracellular signal-regulated kinase</i>) – kinaza regulowana sygnałem zewnątrzkomórkowym
FBS	(<i>fetal bovine serum</i>) – płodowa wołowa surowica
FGF	(<i>fibroblast growth factor</i>) – czynnik wzrostu fibroblastów

FITC	(<i>fluorescein isothiocyanate</i>) – izotiocyanian fluoresceiny
GAPDH	(<i>glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>) – dehydrogenaza aldehydu-3-fosfoglicerynowego
GH	(<i>growth hormone</i>) – hormon wzrostu
GHR	(<i>growth hormone receptor</i>) – receptor hormonu wzrostu
GGTP	(<i>gamma-glutamyl transpeptidase</i>) – gamma-glutamylotranspeptydaza
Grb2	(<i>growth factor receptor-binding protein 2</i>) – białko wiążące GH-R
HBV-DNA	(<i>hepatitis B virus deoxyribonucleic acid</i>) – DNA wirusa HBV
HCC	(<i>hepatocellular carcinoma</i>) – pierwotny rak wątrobowokomórkowy
HCV-RNA	(<i>hepatitis C ribonucleic acid</i>) – RNA wirusa HCV
HIV	(<i>human immunodeficiency virus</i>) – ludzki wirus niedoboru odporności
HIV-1 LTR	(<i>human immunodeficiency virus type 1 long-terminal repeat</i>) – długie końcowe powtórzenie wirusa HIV-1
HMBS	(<i>hydroxymethylbilane synthase</i>) – syntaza hydroksymetylbilanu
HNF 1 α	(<i>hepatocyte nuclear factor 1α</i>) – jądrowy czynnik hepatocytów 1 α
hnRNP K	(<i>heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K</i>) – heterogenna jądrowa rybonukleoproteina K
HOMA-IR	(<i>homeostatic model assesment – insulin resistance</i>) – wskaźnik insulinooporności
IGF	(<i>insulin-like growth factor</i>) – insulinopodobny czynnik wzrostu
IGFBP	(<i>insulin-like growth factor binding protein</i>) – białko wiążące insulinopodobnego czynnika wzrostu
IGF-R	(<i>insulin-like growth factor receptor</i>) – receptor insulinopodobnego czynnika wzrostu
IGFBP-rPs	(<i>IGFBP-related proteins</i>) – białka spokrewnione z białkami wiążącymi IGF
IL	(<i>interleukin</i>) – interleukina
IR	(<i>insulin receptor</i>) – receptor insuliny
IRBP	(<i>insulin-responsive binding protein</i>) – białko wiążące odpowiedź na insulinę
IRS	(<i>insulin receptor substrate</i>) – substrat dla receptora insuliny
JNK	(<i>c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase</i>) – kinaza białkowa c-Jun na końcu N aktywowana przez stres
LAP	(<i>liver enriched activating protein</i>)
LTR	(<i>long terminal repeat</i>) – powtarzalna sekwencja końcowa

LZIP	(<i>leucine zipper transcription factor</i>) – czynnik transkrypcyjny z „zamkiem” leucynowym
MAPK	(<i>mitogen-activated protein kinase</i>) – kinaza białkowa aktywowana przez mitogen
Mdm2	(<i>murine double minute 2</i>) – protoonkogen na małym, podwójnym chromosomie mysim
MPR	(<i>mannose-6-phosphate receptor</i>) – receptor mannozo-6-fosforanu
mRNA	(<i>messenger RNA</i>) – informacyjny RNA
mTOR	(<i>mammalian target of rapamycin</i>)
NF- κ B	(<i>nuclear factor-kappa B</i>) – czynnik jądrowy kappa B
NS3, NS5A etc.	(<i>nonstructural proteins 3, 5A, etc.</i>) – białka niestrukturalne HCV
PBS	(<i>phosphate buffered saline</i>) – sól fizjologiczna buforowana fosforanami
PCNA	(<i>proliferating cell nuclear antigen</i>) – jądrowy antygen proliferujących komórek
PCR	(<i>polymerase chain reaction</i>) – łańcuchowa reakcja polimerazy
PDGF	(<i>platelet-derived growth factor</i>) – płytkowy czynnik wzrostu
PKA/C	(<i>protein kinase A/C</i>) – kinaza białkowa A/C
PI-3K	(<i>phosphatidylinositol 3-kinase</i>) – kinaza 3-fosfatydylinozytolu
Real time RT-PCR	(<i>real time reverse transcription polymerase chain reaction</i>) – reakcja odwrotnej transkrypcji z następującą po niej reakcją łańcuchowej polimerazy (PCR) z w czasie rzeczywistym
SP1	(<i>specificity protein 1</i>) – czynnik transkrypcyjny SP1
SVR	(<i>sustained viral response</i>) – trwała odpowiedź wirusologiczna
SV40	(<i>simian virus 40</i>) – małpi wirus 40
STATs	(<i>signal transducers and activators of transcription family proteins</i>) – rodzina transduktorów sygnału i aktywatorów transkrypcji
TGF	(<i>transforming growth factor</i>) – transformujący czynnik wzrostu
TNF- α	(<i>tumor necrosis factor α</i>) – czynnik martwicy nowotworów α
TNFR1	(<i>tumor necrosis factor α type 1 receptor</i>) – receptor typu 1 TNF- α
VEGF	(<i>vascular endothelial growth factor</i>) – naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu
WZW	wirusowe zapalenie wątroby

1. Wstęp

1.1. Wirus C zapalenia wątroby

Wirus C zapalenia wątroby

Wirus C zapalenia wątroby (HCV) został wykryty w 1989 roku i sklasyfikowany do rodziny *Flaviviridae* [Choo i wsp., 1989]. Genom wirusa stanowi pojedyncza nici RNA zawierająca około 9600 nukleotydów. Na końcach 5' i 3' znajdują się krótkie regiony niekodujące (*untranslated regions*, UTR), a pomiędzy nimi długa otwarta ramka odczytu (*open reading frame*, ORF), kodująca wirusowe białka. Od końca 5' nici RNA kodowane są białka strukturalne – białko rdzeniowe C (*core*), dwa białka otoczkowe E1 i E2 (*envelope*) oraz białko p7 o nieznanym roli. Przy końcu 3' kodowanych jest siedem białek niestrukturalnych, tj. NS1, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A i NS5B (Rycina 1). Najbardziej konserwatywnym białkiem wśród różnych podtypów wirusa jest białko rdzeniowe [Major i Feinstone, 1997]. Synteza białek HCV ma miejsce w siateczce śródplazmatycznej (*endoplasmatic reticulum*, ER) zainfekowanej komórki [Santolini i wsp., 1994]. Genom HCV nie jest transportowany do jądra zainfekowanej komórki. Po procesie syntezy i dojrzewania białka niestrukturalne wraz z wirusowym RNA tworzą związany z błonami kompleks, który stanowi okołojądrową błonową sieć [Egger i wsp., 2002]. Wątroba produkuje około 10^{12} cząstek wirusa na dobę, a pojedyncza komórka wątrobowa około 50 cząstek na dobę [przegląd tematu: Bartenschlager i Lohman, 2000].

Zarys epidemiologii zakażenia HCV

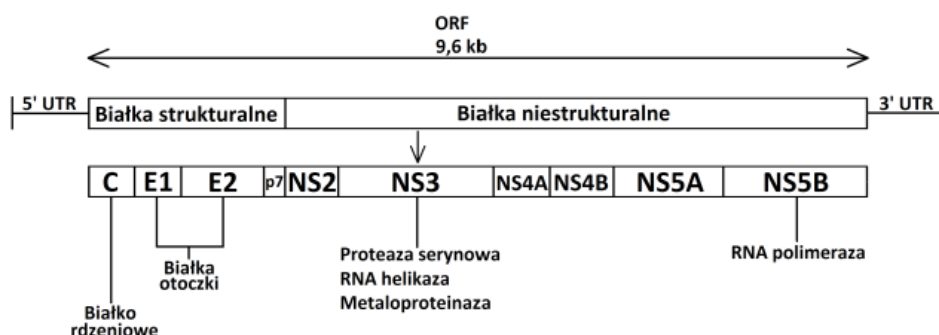
Zakażenie HCV jest szeroko rozpowszechnione na świecie. Szacuje się, iż dotyczy około 2,35% populacji, co stanowi około 160 mln osób [Lavanchy 2011]. W większości krajów częstość zakażeń populacji to około 1–2%, jednakże wciąż pozostają obszary na świecie, gdzie liczba zakażonych HCV jest niezwykle wysoka. Najwyższe odsetki populacji zakażonych HCV znane są w Egipcie – 15%, w Pakistanie – 4,7% i na Tajwanie – 4,4% [Negro i Alberti, 2011]. W Europie częstość zakażeń HCV jest stosunkowo niska i waha się od 0,5% w krajach północnoeuropejskich do >3% w Grecji, Włoszech i Rosji [Cornberg i wsp., 2011]. Niestety świadomość zakażenia HCV u mieszkańców Europy jest wciąż niska, tylko około 10–40% spośród osób zakażonych jest zdiagnozowanych [Merkinaitė i wsp., 2008]. W Polsce rejestracja zakażeń HCV prowadzona jest przez Państwowy Zakład Higieny od 1997 roku i wykazuje coroczny niewielki wzrost zapadalności. Według ostatnich badań epidemiologicznych szacuje się, iż około 1,9%

Polaków jest zakażonych HCV [Flisiak i wsp., 2011a]. W Polsce wyższa częstość zakażeń notowana jest u mężczyzn (2,3%) niż u kobiet (1,7%) [Bielawski i wsp., 2000]. Płeć męska jest niezależnym czynnikiem ryzyka obecności przeciwciał anty-HCV (*odds ratio*, OR, iloraz szans: 1,7) [Flisiak i wsp., 2011b].

Wyróżnia się 6 głównych genotypów HCV (oznaczonych cyframi 1–6) i szereg podtypów (oznaczonych literami) [Simmonds i wsp., 2005]. Obserwuje się zróżnicowanie geograficzne ich występowania. Najczęstszym na świecie jest genotyp 1, kolejno genotyp 3. Częstość występowania genotypu 2 i 4 jest zależna od kraju pochodzenia badanych. Występowanie genotypów 5 czy 6 jest rzadkie [Cornberg i wsp., 2011]. W ostatnio przeprowadzonych w Polsce badaniach odsetek zakażonych genotypem 1 wynosi 80%. Kolejno stwierdza się częstość genotypów 3 i 4 (12,7% i 5%). Niezwykle rzadko wykryto zakażenie genotypem 2 (0,1%) oraz 6 (0,04%) [Panasiuk i wsp., 2012].

Drogi zakażenia

Do zakażenia HCV dochodzi na drodze parenteralnej, w większości w obrębie jednostek służby zdrowia. Szacuje się, iż około 40–70% zakażeń to zakażenia szpitalne [Esteban i wsp., 2008]. Najczęściej źródłem zakażenia w przeszłości, tj. przed 1992 rokiem, była transfuzja krwi. Obecnie są to iniekcje, pobieranie krwi, drobne zabiegi stomatologiczne czy chirurgiczne. Do czynników ryzyka należą również: narkomania dożylna, wykonywanie tatuaży, kolczykowanie ciała czy zabiegi kosmetyczno-fryzjerskie. W dużym populacyjnym badaniu (17930 osób) wykazano, iż w Polsce niezależnymi czynnikami dla nabycia zakażenia HCV są w wywiadzie więcej niż 3 hospitalizacje w ciągu życia (OR: 1,8), przetoczenie krwi przed 1992 rokiem (OR: 2,9) oraz narkomania dożylna (OR: 6,2) [Flisiak i wsp., 2011b]. W badaniach pochodzących z ośrodka poznańskiego wykazano,



Rycina 1. Organizacja genomu wirusa HCV. Genom wirusa stanowi pojedyncza otwarta ramka odczytu (ORF) zbudowana z 9600 nukleotydów. Na końcach 5' i 3' RNA znajdują się rejony niekodujące (UTR), istotne w procesach translacji i replikacji wirusowego RNA. ORF podlega translacji i powstaje duża pojedyncza poliproteina, z której za pomocą komórkowych i wirusowych proteaz wycinane są mniejsze aktywne białka strukturalne (C, E1 i E2) oraz niestrukturalne (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B).

iż 90% pacjentów zakażonych HCV było przynajmniej raz hospitalizowanych, w tym 68% było operowanych. U 97% chorych czynników ryzyka zakażenia było kilka [Wojtacha i Juszczyk, 2003].

Klinika zakażenia HCV

Ostre zakażenie HCV ma najczęściej przebieg bezobjawowy (50–90%). W Europie tylko za około 10% ostrych zapaleń wątroby jest odpowiedzialny wirus HCV [Esteban i wsp., 2008]. Jedynie około 20–30% pacjentów z ostrym wirusowym zapaleniem wątroby (WZW) typu C prezentuje objawy kliniczne (m.in. złe samopoczucie, osłabienie, brak apetytu czy żółtaczkę) w okresie od 3 do 12 tygodni od momentu zakażenia [Alter i Seeff, 2000; Thimme i wsp., 2001]. W badaniach laboratoryjnych podwyższoną aktywność ALT stwierdza się już w okresie 2–8 tygodni od ekspozycji. HCV-RNA w surowicy można wykryć nawet po 1–2 tygodniach od ekspozycji, po czym w ciągu kolejnych kilku tygodni stężenie jego wzrasta osiągając poziom wirerii od 10^5 do 10^7 IU/ml [Farci i wsp., 1991; Thimme i wsp., 2001]. Ostre zapalenie wątroby typu C rzadko przebiega z ostrą niewydolnością wątroby [Farci i wsp., 1996]. Wśród pacjentów z ostrym zapaleniem wątroby około 20–67% (przeciętnie 26%) dokona spontanicznej eliminacji HCV-RNA w ciągu pierwszych 3 miesięcy od rozpoczęcia choroby [Santantonio i wsp., 2008]. Badania retrospektywne wskazują, iż 55–85% osób, które rozwinęły ostre WZW typu C stanie się przewlekle zakażonymi wirusem HCV [Strader i Seeff, 1996; Seeff i Hoofnagle, 2002]. Przewlekle WZW typu C ma przeważnie przebieg bezobjawowy. Często pierwszymi objawami zakażenia HCV są objawy kliniczne marskości wątroby, tj. pajączki naczyniowe, rumień dłoniowy czy wodobrzusze i obrzęki. Ryzyko rozwoju marskości u chorych przewlekle zakażonych HCV waha się w granicach 5–25% w okresie 25–30 lat [Liang i wsp., 2000; Seeff 2002]. Przyspieszony rozwój marskości występuje u osób w starszym wieku, chorujących na cukrzycę, otyłych, w stanie immunosupresji czy u osób nadużywających alkohol. Uwzględniając te dodatkowe okoliczności, należy stwierdzić, że rozwój marskości może dotyczyć aż do 40% pacjentów przewlekle zakażonych HCV [Afdhal 2004]. U pacjentów z marskością wątroby na tle zakażenia HCV dochodzi do występowania dekomensacji marskości wątroby (30% w ciągu 10 lat) [Fattovich i wsp., 1997]. Rocznie około 4% osób z marskością wątroby umiera z powodu komplikacji [Thompson i wsp., 2007]. U 1–5% pacjentów z marskością wątroby w ciągu roku dochodzi do rozwoju pierwotnego raka wątroby (*hepatocellular carcinoma*, HCC) [Fattovich i wsp., 1997; Thompson i wsp., 2007]. Szanse przeżycia dla pacjentów ze zdiagnozowanym HCC to tylko 33% w ciągu roku od rozpoznania nowotworu [Bartosch i wsp., 2009; Yang i Roberts; 2010]. Pierwotny rak wątroby stał się więc istotnym problemem klinicznym i stanowi trzecią wiodącą przyczynę śmierci z powodu nowotworów na świecie. Szacuje się, iż w kolejnych latach nastąpi wzrost liczby przypadków HCC, związanych również z innymi niż HCV czy HBV czynnikami ryzyka, takimi jak starszy wiek, otyłość i cukrzyca [Venook i wsp., 2010].

Przewlekłe zakażenie HCV może również prowadzić (u 1–2% zakażonych) do rozwoju licznych manifestacji pozawątrobowych tego zakażenia, tj. do krioglobulinemii, autoimmunologicznego zapalenia wątroby, błoniasto-rozplemowego zapalenia nerek, porfirii skórnej późnej, liszaja płaskiego, zespołu Sjogrena, autoimmunologicznego zapalenia tarczycy czy chłoniaka nieziarniczego [Chen i Morgan, 2006]. Zakażenie HCV jest również czynnikiem predysponującym do wystąpienia zaburzeń typu metabolicznego, tj. stłuszczenia wątroby, insulinooporności, cukrzycy typu 2 czy dyslipidemii [Mason i wsp., 1999; Laurans i wsp., 2009].

Diagnostyka zakażenia HCV

Diagnostyka zakażenia HCV opiera się na badaniach serologicznych oraz wirusologicznych. Obecność przeciwciał anti-HCV wykrywana jest metodą immunoenzymatyczną z wysoką swoistością testów sięgającą rzędu 99% [Colin i wsp., 2001]. Ich wykrycie jest już możliwe w ciągu 1–3 miesięcy od ekspozycji i dotyczy prawie wszystkich chorych przewlekłe zakażonych HCV [Chen i Morgan, 2006]. Wykrycie HCV-RNA w surowicy lub innym materiale (wątroba, mononukleary krwi obwodowej) metodą *real-time* RT-PCR jest dowodem na replikację wirusa u badanego. Oznaczanie ilościowe HCV-RNA w surowicy ma znaczenie w monitorowaniu terapii przeciwwirusowej. U wszystkich zakażonych HCV oznacza się genotyp wirusa. Ma to również znaczenie prognostyczne przed planowaną terapią przeciwwirusową [EASL, 2011].

Określenie stopnia zaawansowania zmian w wątrobie

Biopsja wątroby jest pomocna w określeniu stopnia uszkodzenia wątroby. Ocena histopatologiczna (możliwe różne skale, np. METAVIR, Ishaka, HAI) biopunktu wskazuje na nasilenie aktywności zapalnej (*grading*) i stopień zaawansowania włóknienia (*staging*) czy też na samą marskość wątroby. Również pozwala na dodatkową ocenę ważnych czynników wpływających na progresję choroby, tj. na ocenę stopnia stłuszczenia i kumulację żelaza w hepatocytach [Ghany i wsp., 2009].

W ostatnich latach nastąpił rozwój alternatywnych, nieinwazyjnych metod oceny stopnia włóknienia w wątrobie. Należą do nich FibroTest (analiza komputerowa wyników badań biochemicznych) oraz metoda elastograficzna – FibroScan. Wykonanie każdego z tych badań jest porównywalne z wynikiem biopsji wątroby w zakresie określenia stopnia włóknienia w wątrobie. Obie te nieinwazyjne metody pozwalają na zidentyfikowanie pacjentów z łagodnym włóknieniem czy marskością wątroby. Trudniejsze jest określenie za ich pomocą umiarkowanego stopnia włóknienia [Poynard i wsp., 2010].

Terapia przewlekłego zakażenia HCV

Celem terapii jest uzyskanie trwałej odpowiedzi wirusologicznej, to jest negatywnych wyników HCV-RNA w surowicy po zakończeniu leczenia przeciwwirusowego. Aktualnie standardem jest stosowanie pegylowanego interferonu alfa

i rybawiryny. Wyniki leczenia są zależne od genotypu, tj. dla genotypu 1 i 4 ok. 50% skuteczności, zaś dla pozostałych genotypów ok. 80% i powyżej. Od 2011 roku w terapii zakażonych genotypem 1 stosowane są także inhibitory proteazy serynowej NS3/4A (telaprevir) i NS3 (boceprevir) [EASL 2011].

Diagnostyka zmian nowotworowych u pacjentów z marskością wątroby na tle zakażenia HCV

Ze względu na wysokie ryzyko rozwoju raka wątrobowo-komórkowego pacjenci z marskością wątroby powinni podlegać badaniom przesiewowym co 6 miesięcy. Wśród powszechnie dostępnych zaleca się wykonywanie badania ultrasonograficznego wątroby oraz oznaczanie stężenia AFP [EASL 2011]. Niestety czułość tych metod wciąż pozostaje zbyt niska. W ostatnich latach zaproponowano dodatkowe markery dla wykrywania HCC, tj. des-gamma karboksyprotrombinę (*des-γ carboxyprothrombin*, DCP) oraz związaną z lecytyną izoformę AFP (*lectin-bound AFP*, AFP-L3%). Wyniki wielośrodkowych badań wykazały, iż AFP jest jednak bardziej czułym markerem niż DCP czy AFP-L3% dla wykrywania wczesnych i bardzo wczesnych stadiów HCC [Marrero i wsp., 2009]. Obiecujące są wyniki badań nad oznaczaniem osteopontyny (*osteopontin*, OPN) jako markera wczesnej karcynogenezy. Jej stężenia są podwyższone u pacjentów z HCC oraz przerzutami do wątroby. Dotychczasowe badania wykazały, iż oznaczanie stężenia OPN u osób z marskością wątroby jest bardziej czułym parametrem niż AFP w badaniach przesiewowych w kierunku zmian ogniskowych w wątrobie. Wzrost stężenia OPN wyprzedza o około 1 rok diagnostykę HCC możliwą innymi metodami [Shang i wsp., 2012].

1.2. Rola białek wirusa HCV (C, NS3 i NS5) w kancerogenezie wątrobowej

Genom HCV nie ulega integracji z genomem gospodarza. Główną rolę w nowotworzeniu w przebiegu zakażenia HCV przypisuje się białkom wirusa HCV, głównie białkom C, NS3 i NS5A. Działają one na dwóch drogach. Pierwsza to interakcje białek wirusa HCV z czynnikami wpływającymi na regulację proliferacji komórek i apoptozy, zaś druga to fizyczne czy funkcjonalne interakcje z produktami genów supresorowych [przegląd tematu: Kasprzak i Adamek, 2008].

Białko C

Obecność wirusowego białka C wykazano w obrębie siateczki śródplazmatycznej (ER), organelli komórkowych (aparat Golgiego, mitochondria) oraz w cytozolu (w tym w kroplach lipidowych). Rzadziej lokalizowano je w okolicy okołojądrowej [Kim i wsp., 1999]. Ostatecznie potwierdzono także jądrową lokalizację białka C [Liu i wsp., 1997; Yasui i wsp., 1998; Suzuki i wsp., 2005; Kasprzak i wsp., 2007]. Lokalizacja jądrowa ma odgrywać kluczową rolę w wątrobowej onkogenezie. W badaniach *in vitro* wykazano, iż białko C w tej lokalizacji może wpływać na komórkowe

protoonkogeny [Ray i wsp., 1995]. Wykazuje ono również wpływ pośredni poprzez heterogenną jądrową rybonukleoproteinę K (hnRNP K), czynnik transkrypcyjny LZIP, białko 14-3-3, białko p21/WAF1, RNA helikazę CAP-Rf100 i NF- κ B [Kasprzak i Adamek, 2008]. Białko C może aktywować kinazę Raf-1, wpływając na drogę przekazywania sygnału kontrolującego wzrost komórki [Aoki i wsp., 2000].

Białko C łączy się także z białkami cytoplazmatycznymi biorącymi udział w kontroli cyklu komórkowego, tj. receptor I TNF- α (TNFRI), przez co aktywuje kinazę JNK (*c-jun N-terminal kinase*) [Park i wsp., 2001]. Stymuluje ono proliferację komórkową poprzez bezpośredni wpływ na aktywację ekspresji kinaz ERK i MAPK, a także poprzez indukcję ekspresji fosfatazy MAPK [Erhardt i wsp., 2002]. Rozpoczęcie aktywacji kaskady MAPK/ERK jest drogą sygnałową proliferacji hepatocytów, niezależną od ścieżek naskórkowego i transformacyjnego czynnika wzrostu α (EGF i TGF- α) [Hayashi i wsp., 2000]. Białko C aktywuje, ale również działa supresyjnie, na wiele wirusowych i komórkowych promotorów. Aktywuje ono promotor genu *c-Myc*, wczesny promotor *SV40*, zaś wpływa hamująco na promotory *c-Fos*, *p53*, genu IGF- β , β -aktyny, wirusa HBV i HIV-1 LTR. Aktywuje także promotor genu TGF- β oraz wpływa na jego ekspresję [Kasprzak i Adamek, 2008]. Białko C wpływa również za pośrednictwem „strażnika genomu” – białka *p53* zarówno poprzez bezpośrednie połączenie się z tym białkiem, jak i poprzez zahamowanie transkrypcji promotorów genu *p53* oraz potranslacyjne modyfikacje białka [Kao i wsp., 2004].

Białko NS3

Na poziomie subkomórkowym występowanie białka NS3 opisywano głównie w obrębie cytoplazmy i jądra hepatocytów [Muramatsu i wsp., 1997], ale również w mitochondriach tych komórek [Kasprzak i wsp., 2005]. Obecne w cytoplazmie białko NS3, poprzez zahamowanie translokacji cAMP-zależnej kinazy białkowej K (PKA) do jądra komórkowego, blokuje bądź redukuje fosforylację histonów, przez co wpływa na cykl komórkowy [Borowski i wsp., 1997]. Białko NS3 może wpływać na wzrost komórki zaburzając aktywację MAPK, ekspresję *c-jun*, aktywację JNK i innych mitogennych czynników transkrypcyjnych. Tworzy kompleksy z dzikim typem *p53* (*wild type p53*) oraz hamuje aktywność promotora *p21/WAF1*, przez co wpływa regulująco na cykl komórkowy [Kasprzak i Adamek, 2008]. Tworząc kompleks z *p53* hamuje apoptozę wywołaną aktynomocyną D [Fujita i wsp., 1996]. Białko NS3 aktywuje także wątrobowe komórki gwiazdźdźiste do wydzielania prokolagenu I i III oraz hamuje fibrolityczną funkcję metaloproteinaz. Wzmaga sekrecję TGF- β . Prowadzi to do bezpośredniego wpływu białka NS3 na procesy zapalne i włóknienie w wątrobie [Bataller i wsp., 2004].

Białko NS5A

Białko NS5A zlokalizowane jest głównie w cytoplazmie (ER, aparat Golgiego, krople lipidowe). Wspólna lokalizacja NS5A i apolipoproteiny A w aparacie Gol-

giego wskazuje na udział tego białka w metabolizmie lipidów i tłumaczy nasilenie stłuszczenia wątroby w zakażeniu HCV [Shi i wsp., 2002]. Białko NS5A wpływa na ekspresję i regulację szeregu genów. Kontroluje cykl komórkowy poprzez interakcje z p21, p53 i cyklinami, a także przez tłumienie transkrypcji genu p21/WAF1. Zatrzymuje apoptozę wywołaną p53. Wywiera również efekt anty-apoptotyczny poprzez aktywację drogi NF- κ B [Kasprzak i Adamek, 2008]. W rozwoju HCC podkreśla się interakcję NS5A z β -kateniną. Białko NS5A bezpośrednio wiąże się z kinazą 3-fosfoinozytolu (PI3K) wywołując zahamowanie kinazy AKT, co z kolei wiąże się ze stabilizacją β -kateniny w komórkach. Obecności poliproteiny HCV w komórkach towarzyszy 2–3-krotny wzrost transkrypcji zależnej od β -kateniny [Street i wsp., 2005].

Podsumowując, należy stwierdzić, że wszystkie trzy białka HCV współdziałają lub hamują białka związane z cyklem komórkowym i apoptozą (p53, p21/WAF/cip1) oraz czynnikami transkrypcyjnymi (NF- κ B, AP-1). Zaburzają także przekaz sygnału w komórce przy udziale białek TGF- β /TGF- β RI, co prowadzi do włóknienia i rozwoju marskości wątroby. Białka wirusa HCV bezpośrednio lub pośrednio wpływają na drogi sygnałowe, tj. Ras-ERK, aktywacji NF- κ B, JNK i MAPK/ERK. Wynikiem tych działań jest promocja proliferacji komórek, zaburzenia apoptozy, wzrost mutacji genowych, nasilenie stłuszczenia i włóknienia w wątrobie, a przez to zwiększona możliwość transformacji nowotworowej i progresja WZW typu C w kierunku HCC.

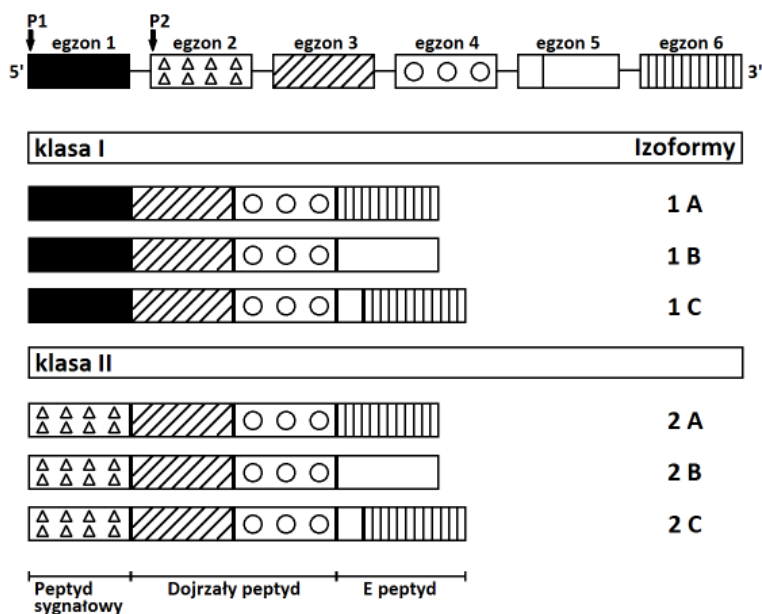
1.3. Budowa genu IGF-1

Gen IGF-1, kodujący ludzkie białko IGF-1, w genomie człowieka występuje w pojedynczej kopii. Zlokalizowany jest na chromosomie 12 (12 q22–24.1) i obejmuje obszar ponad 80 kbp chromosomalnego DNA [Rotwein 1986; Zhu i wsp., 1999]. Pomimo prostej budowy białka IGF-1, organizacja genu IGF-1 oraz regulacja jego ekspresji u człowieka jest złożona [Obrepałska-Stęplowska i wsp., 2005] (Rycina 2).

W strukturze genu można wyróżnić 6 stosunkowo krótkich egzonów, podzielonych 5 bardzo długimi intronami [Adamo 1995; Mittanck i wsp., 1997; Zhu i wsp., 1999; Kaytor i wsp., 2001a i b].

Dojrzałą cząsteczkę białka IGF-1 kodują tylko egzony 3 i 4, zaś egzony 5 i 6 podlegające alternatywnemu *splicingowi* kodują peptyd E, obecny w cząsteczce prekursorowej hormonu wraz z przylegającym doń rejonem 3'UTR [Rotwein i wsp., 1986]. U szczurów i myszy organizacja genu jest podobna [Rotwein 1999]. Egzony 1 i 2 są alternatywnymi egzonami liderowymi, które ulegają rozszczepieniu do egzonu 3, dając klasę transkryptów, odpowiednio 1 i 2.

U ssaków transkrypcja genu IGF-1 jest kontrolowana przez dwa promotory, nazywane P1 i P2, znajdujące się odpowiednio w 1 i 2 egzonie [Adamo 1995; Mittanck i wsp., 1997; Wang i Chard, 1999; Wang i wsp., 2000]. Inicjacja trans-



Rycina 2. Schemat struktury ludzkiego genu IGF-1 oraz różne izoformy *splicingowe*. Gen IGF-1 zawiera 6 egzonów. Transkrypcja rozpoczyna się z promotora P1, zlokalizowanego w egzonie 1, lub z promotora 2 (w egzonie 2). Pozwala to na wyodrębnienie dwóch klas transkryptów – klasy I (P1) i klasy II (P2). Egzony 3 i 4 są wspólne dla wszystkich wariantów. Izofорма A zawiera egzon 6, B egzon 5, zaś w skład izoformy C wchodzi fragment egzonu 5 i egzon 6.

krypcji z różnych miejsc promotora, alternatywny *splicing* premRNA oraz obecność wielu miejsc poliadenylacji w egzonie 6 są przyczyną powstania złożonych transkryptów IGF-1. Kodują one białka prekursorowe IGF-1, które ulegają po-translacyjnym modyfikacjom przed złożeniem w aktywny IGF-1.

Przyczyną występowania wielu miejsc inicjacji transkrypcji genu IGF-1 u człowieka i u różnych gatunków zwierząt jest prawdopodobnie brak w promotorze P1 genu typowych dla promotorów genowych sekwencji, takich jak TATA-box, CCAAT-box czy też sekwencji bogatych w GC [Pell i wsp., 1993; Adamo 1995; Pao i wsp., 1995; Mittanck i wsp., 1997; Wang i wsp., 1997; Zhu i wsp., 1999; Wang i wsp., 2000].

Najbardziej zachowawczym regionem genu i istotnym dla funkcjonowania promotora 1 genu IGF-1 jest region 5'UTR w egzonie 1. U człowieka rejon promotorowy P1 zawiera 322 nukleotydy (+1 do +322) w rejonie 5' UTR egzonu 1 oraz 1630 nukleotydowy obszar regulatorowy (-1630 do -1). Rejon 5'UTR wykazuje znaczną homologię sekwencji DNA z analogicznym fragmentem genu IGF-1 szczura i kurczęcia [Kajimoto i Rotwein, 1991; Hall i wsp., 1992]. Prawdopodobnie zaangażowany jest w kontrolę translacji mRNA IGF-1 [Mittanck i wsp., 1997]. Istnieją rozbieżności w danych, dotyczące tego, jak długi fragment promotora P1 jest wystarczający dla maksymalnej aktywności P1 ludzkiego genu IGF-1 [Wang

i wsp., 2000]. Zdaniem wielu badaczy z promotora P1 inicjowana jest większość transkryptów [Zarilli i wsp., 1994; Yakar i wsp., 1999; Kaytor i wsp., 2001a]. Promotor ten ma odpowiadać za powstawanie 60–65% transkryptów w komórkach wątrobowych szczura i jest aktywny w różnych typach komórek i tkanek [Mittanck i wsp., 1997]. Transkrypty z P1 genu IGF-1 wykazano we wszystkich tkankach szczura [Adamo 1995; Wang i wsp., 1997; Yakar i wsp., 1999; Wang i wsp., 2000], a ich regulację przez czynniki inne niż GH [Wang i wsp., 2000]. Te zaś powstające z promotora P2 występują tylko w kilku tkankach, głównie w wątrobie i nerce oraz kodują endokrynową formę IGF-1, pozostającą pod kontrolą GH [Wang i wsp., 1997; Wang i wsp., 2000]. Promotor P2 genu IGF-1 jest słabiej poznany niż P1. Staje się aktywny w komórkach wątroby w późniejszych etapach ontogenezy wraz z początkiem reagowania organizmu na GH [Pell i wsp., 1993; Wang i wsp., 1997; Wang i wsp., 2000]. Ostatecznie odpowiada za kontrolę produkcji 35–40% mRNA IGF-1 w wątrobie dorosłych szczurów [Mittanck i wsp., 1997].

1.4. Izoformy IGF-1

Alternatywny splicing premRNA IGF-1 w komórkach ludzkich

Cztery z sześciu egzonów ludzkiego genu IGF-1 ulegają alternatywnemu *splicingowi* [Tan i wsp., 2002]. Powstają w ten sposób najpierw różne mRNA IGF-1, a następnie odmienne białka prekursorowe IGF-1. Egzony 1 i 2 kodują peptydy sygnałowe, które usuwane są z prekursorów białkowych w procesie ich dojrzewania. Ekspresja premRNA IGF-1 zachodzi z różnych miejsc inicjacji transkrypcji zlokalizowanych odpowiednio w obrębie egzonu 1 (promotor P1) oraz egzonu 2 (promotor P2). W dojrzałej cząsteczce IGF-1 zawarte są aminokwasy kodowane przez egzon 3 i 4. [Jansen i wsp., 1983; Tobin i wsp., 1990; Yang i wsp., 1995]. Jansen i wsp. podali sekwencję nukleotydową ludzkiego wątrobowego cDNA kodującego całkowity IGF-1 w komórkach człowieka i wskazali, że jest on produkowany jako prekursor [Jansen i wsp., 1983]. Wyjaśniły to kolejne prace badawcze. Dwa różne cDNA oraz dwa różne mRNA z identycznymi końcami 5' w wątrobie ludzkiej scharakteryzował Rotwein [Rotwein i wsp., 1986]. Dawały one ekspresję dwóch różnych prekursorów białkowych IGF-1 – jednego zbudowanego z 153, drugiego z 195 aminokwasów (aa) [Rotwein i wsp., 1986]. Już te wczesne badania sugerowały tkankowo-specyficzną regulację biosyntezy i dojrzewania RNA. Tobin i wsp. opisali prekursorowe mRNA IGF-1 w komórkach guzowych T61 (*transplantable T61 human breast cancer xenograft*) i ludzkiej wątroby, które było w 83% identyczne ze szczurzym wariantem prekursora IGF-1. W genomie człowieka zmapowano go pomiędzy egzonem 1 i 2 genu IGF-1 (analogiczny ze szczurzym egzonem 1a). Białkowy prekursor składał się z 137aa, w tym 32-aminokwasowego peptydu sygnałowego, 70-aminokwasowego IGF-1 oraz 35-aminokwasowego karboksylowego końca (E peptyd) [Tobin i wsp., 1990]. mRNA tego IGF-1 wykazano w wątrobie ludzkiej, we wspomnianych komórkach guzowych T61 oraz w linii komórkowej

raka jajnika, NIH OVCAR3 [Tobin i wsp., 1990]. Kolejne badania wykazały, że egzony 3 i 4 kodują dojrzały peptyd IGF-1 i są niezmiennie. Alternatywne egzony 5 i 6 kodują różne domeny E, których funkcja nie jest dokładnie poznana, poza częścią domeny E kodowanej przez egzon 5, zawierającej amidowany peptyd promujący wzrost (*amidated growth-promoting peptide*) [Lund i wsp., 1991; Siegfried i wsp., 1992]. Następne prace z zastosowaniem RT-PCR na RNA z ludzkiej wątroby ujawniły, że transkrypt IGF-1, który ulega alternatywnemu *splicingowi* zawiera egzony 3 i 4, 49 bp egzonu 5 i egzon 6 (egzon 4-5-6) [Chew i wsp., 1995]. Wykazano go także w ludzkich hodowanych komórkach raka wątrobowo-komórkowego HepG2 i obserwowano regulację hormonalną tego transkryptu (wzrost ekspresji po podaniu GH). Transkrypt z egzonu 4-5-6 odpowiadał za wytworzenie prepro-IGF-1 o długości 158aa z 24-aminokwasową sekwencją E-peptydu (zwanego Ec) [Chew i wsp., 1995]. Wykazana sekwencja aminokwasowa Ec peptydu była w 78% homologiczna ze szczurzym peptydem Eb [Chew i wsp., 1995].

Alternatywny splicing IGF-1 w komórkach szczura

Alternatywny *splicing* u szczura dotyczący egzonów 5 i 6 odpowiedzialny jest za wystąpienie w prepeptydach IGF-1 alternatywnych końców karboksylowych [Zarrilli i wsp., 1994; Zhu i wsp., 1999; Barton 2006]. W wyniku różnych miejsc startu transkrypcji z dwóch promotorów P1 i P2 powstają transkrypty ze zróżnicowanymi miejscami translacji w obrębie sekwencji 5', należącymi do różnych ramek odczytu, a następnie powstają prekursor białek mające na końcu aminowym peptydy sygnałne różnej długości [Zarilli i wsp., 1994; Pao i wsp., 1995]. Opisano także, że dzięki wielu miejscom poliadenylacji występuje duże zróżnicowanie długości powstających transkryptów. W tkankach szczura znajdowano IGF-1 mRNA wielkości od 1,2 do 7,5 kbp [Zarilli i wsp., 1994; Zhu i wsp., 1999]. Długość transkryptów może również wpływać na wydajność translacji – transkrypty krótsze wiążą się preferencyjnie z polisomami, a dłuższe słabiej, co może wynikać z obecności kodonu terminacji w pobliżu miejsc inicjacji translacji [Zarilli i wsp., 1994]. Obecność różnych transkryptów świadczy o tkankowo-specyficznym auto- i/lub parakrynowym działaniu i odrębnej regulacji obu promotorów genu. Uważa się również, że obecność różnych transkryptów wynika ze zróżnicowanej odpowiedzi na czynniki środowiskowe, w tym dietę i sposób odżywiania się [Pell i wsp., 1993; Zhang i wsp., 1997; Yu i Rohan, 2000].

Jak wynika z większości badań nad izoformami IGF-1, w większości tkanek ssaków ekspresja genu IGF-1 polega na powstawaniu wielu rodzajów mRNA tego peptydu, różniących się zarówno sekwencją kodującą, jak i długością, które kodują zarówno krążące, jak i tkankowo-specyficzne izoformy białka IGF-1 [Adamo 1995; Barton 2006]. Dominuje transkrypt określany jako IGF-1Ea (IGF-1A), kolejnym jest IGF-1Eb (IGF-1B) oraz IGF-1Ec (IGF-1C).

Prekursor białkowy IGF-1 występuje w dwóch podstawowych izoformach: IGF-1A (zawierającej 153aa) oraz IGF-1B (zawierającej 195aa), różniących się

końcem cząsteczki, na których występuje tzw. peptyd E o bliżej nieznannej funkcji. Prekursory te przetwarzane są w identyczne dojrzałe cząsteczki IGF-1 [Barton, 2006]. Dojrzałe cząsteczki IGF-1 i IGF-2, podobnie jak proinsulina, zbudowane są z domen B, C, i A (koniec aminowy) oraz dodatkowej domeny D na końcu karboksylowym, która nie jest obecna w proinsulinie [Daughaday i Rotwein, 1989].

1.5. Rola izoform IGF-1

Rola występowania wielu izoform różnych peptydów nie jest do końca jasna, choć wiele genów człowieka podlega alternatywnemu *splicingowi* [Graveley 2001]. Należy doń gen IGF-1 [Lund i wsp., 1991; Adamo 1995; Barton 2006].

Izoformy transkryptów i białek IGF-1 pełnią różne funkcje fizjologiczne w zależności od tkanki, np. w tkance mięśniowej szkieletowej wiele izoform IGF-1 odgrywa krytyczną rolę w rozwoju, regeneracji i utrzymaniu masy mięśnia [Hameed i wsp., 2004; Matheny i wsp., 2010]. Badania wskazują, że różne izoformy transkryptów IGF-1 w przypadku uszkodzenia mięśnia szkieletowego produkowane są w różnym czasie [Matheny i wsp., 2010]. mRNA izoformy IGF-1Eb koreluje z markerami komórek satelitarnych mięśnia oraz z proliferacją mioblastów, natomiast ekspresja mRNA izoformy IGF-1Ea jest związana z różnicowaniem tych komórek do dojrzałych włókien mięśniowych [Matheny i wsp., 2010].

Badania Tan i wsp. w modelu *in vitro* wykazały jądrową (i silną jąderkową) lokalizację izoformy IGF-1, powstającej z eksonu 5. Izoformy powstające z egzonu 1 i 2 były zlokalizowane w cytoplazmie komórek, co sugeruje ich rolę jako funkcjonalnych peptydów w sekrecyjnej ścieżce sygnałowej. Jądrowa i jąderkowa lokalizacja była także obserwowana w przypadku, gdy dojrzała domena była usuwana z chimer lub gdy same peptydy sygnałowe były usuwane [Tan i wsp., 2002]. Autorzy konkludują, że za taką lokalizację izoformy IGF-1 (domeny Eb) odpowiada obecność końcowych 4 aminokwasów (motyw R/K-R/K-X-R/K), znajdujących w wielu sygnałach jądrowej lokalizacji (*nuclear localization signals*), charakterystycznych również dla innych czynników wzrostowych [Tan i wsp., 2002]. Rola jąderkowej lokalizacji nie została przez tych autorów wyjaśniona. Nie wykluczają oni związku jąderkowej lokalizacji domeny Eb IGF-1 z regulowaniem szlaku p53-Mdm2-ARF w onkogenezie [Weber i wsp., 2000; Tan i wsp., 2002].

Badania innych autorów sugerują rolę różnych *splicingowych* form IGF-1 jako czynników prognostycznych w wielu typach nowotworów człowieka [Górecki i wsp., 2007; Armakolas i wsp., 2010; Koczorowska i wsp., 2011; Kasprzak i wsp., 2013].

1.6. Gen IGF-1 a inne czynniki białkowe

W obrębie sekwencji regulatorowych 5'UTR obu promotorów genu IGF-1 u szczura (lepiej zbadanego niż u człowieka) stwierdzono występowanie wielu miejsc potencjalnego, specyficznego przyłączania się czynników transkrypcyj-

nych, które mogą regulować jego ekspresję, m.in. AP1, HNF 1 α [Umayahara i wsp., 1999; Kaytor i wsp., 2001b], FP1 [Wang i wsp., 1997], białek z rodziny C/EBP/LAP [Umayahara i wsp., 1999; Kaytor i wsp., 2001b], białek HS3A-HS3F, GRE, Inr, SP1, miejsce wiązania białek IRBP [Pao i wsp., 1995; Zhu i wsp., 1999; Kaytor i wsp., 2001a], GATA A i GATA B [Wang i wsp., 2000] i CRE.

U człowieka w rejonie regulatorowym genu IGF-1 stwierdzono występowanie podobnych miejsc wiązania czynników białkowych [Pao i wsp., 1995; Mittanck i wsp., 1997; Umayahara i wsp., 1999; Wang i Chard, 1999]. Wykazano, że część miejsc wiązania czynników białkowych ma znaczenie dla ekspresji genu IGF-1 oraz jego regulacji. I tak, np. obniżoną zdolność oddziaływania niektórych czynników jądrowych na rejonu genu IGF-1 stwierdzono w wątrobie szczurów z cukrzycą [Pao i wsp., 1995; Kaytor i wsp., 2001b].

1.7. Budowa i funkcja IGF-ów

IGF-y tworzą heterogenną grupę białek o właściwościach insulino-podobnych oraz promujących wzrost wielu tkanek organizmu. Białko IGF-1 zostało zidentyfikowane w 1957 roku przez Salmona i Daughadaya. Nazwano je surowiczym czynnikiem sulfatacyjnym. Wykazano bowiem, że czynniki zawarte w surowicy ludzkiej stymulują wbudowywanie ³⁵S w chrząstkę szczura *in vitro* [Salmon i Daughaday, 1957]. Kolejno określono szerszy zakres aktywności biologicznej tych czynników, m.in. udział w stymulacji syntezy DNA, RNA i białek w hodowlach tkankowych. Ze względu na silne pośrednictwo czynnika sulfatacyjnego w działaniu GH, Daughaday nazwał je somatomedyną. Kolejne badania wykazały, że są trzy somatomedyny: A, B i C.

W końcu lat 70. XX wieku wyizolowano i oczyszczono z surowicy ludzkiej dwa strukturalnie bardzo podobne polipeptydy o m.cz. 7,5 kDa. Zostały one zsekwencjonowane i opisane. Ze względu na strukturalne podobieństwo do proinsuliny i zdolność do naśladowania niektórych efektów biologicznych insuliny, zostały nazwane insulinopodobnymi czynnikami wzrostu, IGF-1 i IGF-2 [Rinderknecht i Humbel, 1976a i b; Rinderknecht i Humbel, 1978]. Mimo strukturalnego podobieństwa do insuliny właściwości IGF-ów wskazują na ich odmienną funkcję biologiczną. Pod koniec lat 70. XX wieku ustalono, że somatomedyna C jest identyczna z IGF-1, somatomedyna A to dezamidowana forma IGF-1, natomiast somatomedyna B okazała się artefaktem [Rinderknecht i Humbel, 1978].

Ludzkie IGF-y są jednołańcuchowymi peptydami zbudowanymi z 70 i 67 reszt aa, zawierającymi trzy wewnątrzcząsteczkowe mostki –S-S. Wykazują one wzajemnie 62% homologii sekwencji aminokwasowej, a także 43% (IGF-1) i 41% (IGF-2) homologii z cząsteczką ludzkiej proinsuliny [Daughaday i Rotwein, 1989; LeRoith 2000; Schneider i wsp., 2002]. W cząsteczce dojrzałych peptydów można wyróżnić 4 domeny: B, C i A (zaczynając od końca aminowego) oraz dodatkowej domeny D na końcu karboksylowym, która nie jest obecna w proinsulinie [Daughaday i Rotwein, 1989; LeRoith 1997]. W rejonie C-końcowym cząstecz-

ki prekursorowej IGF-1 występuje zmienny peptyd E (24 aa), wycinany podczas dojrzewania prepeptydów [Chew i wsp., 1995].

IGF-y krążą w krwioobiegach w stężeniach nanomolarnych i w większości związane są z jednym z sześciu białek wiążących (IGFBP), które modulują ich aktywność biologiczną [LeRoith 1997; Daughaday 2000; Schneider i wsp., 2002].

IGF-1

Białko to jest zachowane ewolucyjnie i wraz z IGF-2 należy do tej samej rodziny co insulina i relaksyna, wykazując podobną budowę strukturalną [Daughaday i Rotwein, 1989; Pao i wsp., 1995; LeRoith 1997]. Jest małym białkiem sekrecyjnym o m.cz. 7649 Da [Mittanck i wsp., 1997; Wang i Chard, 1999], zbudowanym z pojedynczego łańcucha polipeptydowego, zawierającego 70 aminokwasów, połączonych wiązaniami disiarczkowymi [Zarrilli i wsp., 1994; LeRoith 1997]. Prekursor IGF-1 występuje w dwóch izoformach: IGF-1A (153 aa) oraz IGF-1B (195 aa) [Barton 2006].

IGF-1 wywiera wpływ na drogi sygnałowe w komórkach poprzez łączenie się z różnymi powierzchniowymi receptorami: IGF-1R, IGF-2R, receptorem insulinowym (IR) i receptorem hybrydowym, zbudowanym w połowie z części receptora IGF-1R, zaś w drugiej połowie IR (IGF-1R/IR) [Soos i wsp., 1990; przegląd tematu: Rojek i Niedziela, 2007; Belfiore i wsp., 2009; Siddle 2011; Kasprzak i Adamek, 2012].

IGF-2

Białko IGF-2 zbudowane jest z 67 aminokwasów i wykazuje 65% homologii z IGF-1 [O'Dell i Day, 1998]. Ludzki gen kodujący IGF-2 znajduje się na krótkim ramieniu chromosomu 11 (11p15.5) i składa się on z dziewięciu egzonów. Pierwsze sześć to egzony niekodujące. Kontrola ekspresji zachodzi z czterech promotorów (P1-P4). U dorosłych transkrypcja rozpoczyna się z promotora P1. W wieku płodowym, a także w nowotworach występuje transkrypcja z promotorów P3 i P4 [Zhang i wsp., 1996; Lee i wsp., 2001]. Aktywność genu IGF-2 jest regulowana poprzez piętnowanie genów (tzw. *imprinting* genomowy) [Khandwala i wsp., 2000]. W okresie embrionalnym obserwuje się wyższą ekspresję tego hormonu [O'Dell i wsp., 1998], jest on wówczas istotnym czynnikiem modulującym wzrost i różnicowanie mięśni [Khandwala i wsp., 2000]. IGF-2 wykazuje działanie mitogenne na różne komórki, odgrywając istotną rolę w karcynogenezie. Swoją rolę na komórki wywiera poprzez wiązanie się głównie z receptorem typu I IGF (IGF-1R), ale również z *cation-independent mannose-6-phosphate receptor* (IGF-IIR/MPR) [Szebenyi i Rotwein, 1994; Frasca i wsp., 1999]. IGF-2 łączy się również z wysokim powinowactwem z izoformą A receptora insulinowego (IR-A). Nasila więc głównie efekt mitogeny, a nie metaboliczny. Więcej IR-A wykazano w tkankach płodu i niektórych nowotworach, co potwierdza pośrednio udział IGF-2 w embriogenezie i karcynogenezie [Frasca i wsp., 1999].

Białka wiążące IGF-y

We krwi IGF-y (w odróżnieniu od insuliny) łączą się w kompleksy z 6 specyficznymi białkami nośnikowymi – IGFBP 1–6 [Zarilli i wsp., 1994; LeRoith 1997; Murphy 1998; Wang i Chard, 1999; Yakar i wsp., 1999; Schneider i wsp., 2002]. Masa cząsteczkowa IGFBP waha się od 17 do 43 kDa [Murphy 1998; Schneider i wsp., 2002], a podobieństwo ich sekwencji wynosi 47–60%.

Cechą wspólną rodziny IGFBP jest obecność w ich cząsteczkach trzech, odrębnych strukturalnie domen, z których 1 i 3, bogate w cysteiny, znajdujące się przy obu końcach cząsteczki, są zachowawcze i podobne we wszystkich sześciu podgrupach. Środkowa domena natomiast jest inna w każdej z grup i (za wyjątkiem IGFBP-4) nie zawiera cystein. Sekwencje fragmentów białek IGFBP-1 i -3 kodowanych przez egzon 1 są najbardziej (w 28%) podobne, natomiast najniższe homologie stwierdzono dla egzonu 2. Porównania sekwencji egzonu 4 pomiędzy IGFBP-1 i 2 dowiodły aż 50% ich podobieństwa, podczas gdy analogiczne przyrównanie do IGFBP-3 ukazuje odpowiednio 25% i 30% [Rinderknecht i Hummel, 1978].

Geny IGFBP wykazują podobną organizację i składają się z 4 egzonów, kodujących domeny zachowawcze, C- i N-końcową. Ważną rolę w interakcji z IGF odgrywa szczególnie rejon N-końcowy białek [Rechler 1993; Kelley i wsp., 1996]. W obrębie każdej domeny mogą występować funkcjonalne motywy lub subdomeny, które decydują o zróżnicowanej funkcji białek wiążących IGF [Hwa i wsp., 1999].

Najbardziej do siebie podobne są IGFBP-3 i 5 [Murphy 1998]. Ponadto stwierdzono występowanie białek strukturalnie podobnych do IGFBP, nazwanych białkami spokrewnionymi z białkami wiążącymi IGF (*IGFBP-related proteins*, IGFBP-rPs) [Murphy 1998; Schneider i wsp., 2002].

Większość IGF-ów obecnych we krwi i środowisku pozakomórkowym występuje w postaci dużych kompleksów (125–150 kDa), których stężenie zależne jest od GH. U człowieka w okresie płodowym dominują dwuskładnikowe kompleksy IGF/IGFBP, wielkości około 50 kDa. Najczęściej wiążącą proteiną jest wtedy IGFBP-2. W okresie dorastania i wieku dojrzałym IGFBP-3 pełni w tych kompleksach funkcję podjednostki wiążącej IGF-y (podjednostka β). Pozostałymi składnikami kompleksów są: kwasolabilna podjednostka α (*Acid-labile subunit*, ALS) o m.cz. 84–86 kDa i jeden z IGF-ów (podjednostka γ) [LeRoith 1997; LeRoith i Butler, 1999; Wang i Chard, 1999; Pollak 2008]. Większość glikoproteiny ALS w surowicy występuje w formie niezwiązanej [Khosravi i wsp., 1997].

Potrójne kompleksy IGF-1-IGFBP-3-ALS nie mogą przenikać przez ściany naczyń krwionośnych i wiązać się z receptorem insulinowym. Dopiero podwójne kompleksy i wolne IGF-y uwolnione z kompleksów opuszczają układ krążenia i wnikają do tkanek docelowych przy udziale innych białek wiążących [LeRoith 1997; LeRoith i Butler, 1999; Wang i Chard, 1999]. Cały mechanizm działania i biodostępności wolnego IGF-u dla tkanek docelowych związany jest z przesu-

nięciem IGF-1 z kompleksu 150 kDa do 50 kDa, a następnie z proteolizą IGFBP (przez proteazy), uwalniającą IGF do krwioobiegu [Firth i Baxter, 2002].

Okolo 75% IGF-1 występuje w kompleksie utworzonym przez białko IGFBP-3 oraz kwasolabilną podjednostkę ALS [Baxter 2000]. Ten potrójny kompleks o m. cz. 150 kDa stanowi rezerwuuar bioaktywnego IGF-u, którego czas półtrwania wynosi ponad 12 godzin, podwójnego 30–90 minut, a wolnego IGF-1 tylko 10 minut [LeRoith 1997; Murphy 1998; Wang i Chard, 1999; Schneider i wsp., 2002]. Głównym regulatorem syntezy podjednostki ALS *in vivo* oraz stymulatorem ekspresji genowej IGF-1 i wielu IGFBP jest hormon wzrostu [Etherton i Baumnan, 1998]. Dotychczas jednak tylko w promotorze genu ALS udało się zidentyfikować element wrażliwy na GH [Boisclair i wsp., 1996]. U myszy element ten nazwano ALSGAS1 ze względu na podobieństwo do sekwencji GAS interferonu gamma [Schindler i Darnell, 1995]. Element ten jest zachowawczy w genomie człowieka i innych gatunków [Rhoads i wsp., 2000]. Wpływ GH na transkrypcję genu ALS zachodzi poprzez białka STAT 5a i 5b, ulegające translokacji do jądra komórkowego i wiążące się z elementem ALSGAS1.

Potrójny kompleks z IGF oraz ALS formuje także IGFBP-5 i stanowi on ok. 10% puli całkowitego potrójnego kompleksu w surowicy [Twigg i Baxter, 1998; Twigg i wsp., 1998]. W płynach ustrojowych występuje także podwójny kompleks o m.c. 50 kDa utworzony przez IGF-1 i pozostałe białka wiążące (IGFBP-1, -2, -3, -4 oraz -6). Przechodzi on szybko do przestrzeni międzykomórkowej [Lee 1998].

Receptor IGF-1 typu I Receptor IGF-1 (IGF-1R) jest zbudowany z dwóch podjednostek α i β (odpowiednio 706 i 626 aa). Białko to o masie 225 kDa jest glikoproteiną zlokalizowaną w błonie komórkowej. Funkcją zewnątrzkomórkowych podjednostek α jest wiązanie liganda, zaś przezbłonowe podjednostki β wykazują aktywność kinazy tyrozynowej [LeRoith 2000; LeRoith i wsp., 2001]. Gen IGF-1R zlokalizowany jest na chromosomie 15 i zawiera aż 15 egzonów. Strukturalnie IGF-1R zbliżony jest do receptora insulinowego (IR) (60% homologii) [LeRoith 2000]. IGF-1 i insulina mogą łączyć się z każdym z receptorów, zarówno z IGF-1R jak i IR [Steele-Perkins i wsp., 1988]. Receptor IGF-1R ma najwyższe powinowactwo do IGF-1, a kilkukrotnie niższe do IGF-2 [Stewart i Rotwein, 1996]. Ekspresja IGF-1R jest regulowana przez hormony steroidowe i czynniki wzrostu (IGF-1, PDGF, EGF, FGF) [Yu i Rohan, 2000]. Zwiększoną ekspresję IGF-1R stwierdzono w płodowej i regenerującej się wątrobie szczura [Caro i wsp., 1988]. Wzrost ekspresji IGF-1R obserwowano w raku prostaty, piersi, płuc [przegląd tematu: Maki 2010]. Usunięcie genu kodującego IGF-1R lub hamowanie jego ekspresji hamuje transformację komórki *in vitro* [Baserga 1995]. Wszystkie myszy z mutacją genu IGF-1R umierały przy urodzeniu i prezentowały wyraźny niedobór wzrostu (45% wielkości zdrowych myszy) [Liu i wsp., 1993]. Ogromne znaczenie w regulacji procesów komórkowych ma droga sygnałowa IGF-1/IGF-1R. Połączenie IGF-1 z receptorem IGF-1R stymuluje proliferację komórkową i hamuje

apoptozę. Aktywacja kinazy tyrozynowej uruchamia katalizę fosforylacji wielu komórkowych protein, m.in. białka IRS i SHC. Prowadzi to do aktywacji ścieżki sygnałowej Ras-Raf-MEKs-ERK oraz MAPK, która wywiera efekt mitogenowy poprzez stymulację cykliny D1 i protoonkogenów (c-FOS, c-JUN). Aktywacja białek IRS 1–4 uruchamia ścieżkę PI3K/Akt i poprzez Bad/Bcl-2 hamuje apoptozę, zaś poprzez mTOR/S6K prowadzi do produkcji białek [przegląd tematu: Kasprzak i Adamek, 2012]. Zahamowanie ekspresji IGF-1R poprzez leki czy monoklonalne przeciwciała jest obecnie tematem licznych poszukiwań badawczych i prób klinicznych w terapii nowotworów [Maki 2010].

1.8. Surowicze stężenia białek z rodziny IGF

IGF-1

Stężenie IGF-1 w surowicy jest prawie 1000-krotnie wyższe od insuliny. Zależy ono od wielu czynników, między innymi od wieku i płci. Stężenie IGF-1 jest niskie zaraz po urodzeniu i wzrasta systematycznie w dzieciństwie, osiągając najwyższe wartości przed- i w okresie dojrzewania płciowego. U dziewcząt najwyższe stężenie IGF-1 występuje w wieku ok. 14,5 lat (ok. 410 µg/l), zaś u chłopców stwierdza się je rok później (382 µg/l) [Juul i wsp., 1994]. Najwyższa różnica stężeń zależna od płci (o ok. 70 µg/l wyższa u dziewcząt) występuje w wieku 11–13 lat, zaś po 20 r.ż. obserwuje się odwrócenie różnic i wyższe stężenia IGF-1 występują u mężczyzn, przy czym średnia różnica w obrębie płci zmniejsza się i wynosi 6–26 µg/l. Najniższe różnice w stężeniu IGF-1 u obu płci obserwowano w 4. i 5. dekadzie życia [Brabant i wsp., 2003]. Inni autorzy opisują zmniejszanie się stężenia IGF-1 niezależnie od płci [Aimaretti i wsp., 2008; Rosario 2010]. Ten systematyczny spadek stężenia IGF-1 z wiekiem u kobiet to 13% redukcji na dekadę, zaś u mężczyzn 11% [Andreassen i wsp., 2009]. Znaczne obniżanie się stężenia IGF-1 następuje po około 25. r.ż., po czym jego powolny spadek obserwuje się do 80. r.ż. [Juul i wsp., 1994]. Stężenie wolnego IGF-1 stanowi około 1% całkowitego IGF-1, a zmienność jego stężenia w zależności od wieku jest podobna do zmian całkowitego IGF-1 [Yu i wsp., 1999].

Zmiany stężenia IGF-1 są zależne od stężenia hormonu wzrostu [LeRoith 1997; Yakar i wsp., 1999; Daughaday 2000]. Niezależnie od GH na surowicze stężenie IGF-1 wpływa stopień odżywienia. W dzieciństwie i w okresie osiągnięcia dojrzałości płciowej nie stwierdzono korelacji pomiędzy stężeniem IGF-1 a BMI [Juul i wsp., 1994]. U osób z niedowagą (BMI < 21) i nadwagą (BMI > 29) obserwuje się obniżenie stężenia IGF-1 [Holmes i wsp., 2002]. W przypadkach otyłości i otyłości olbrzymiej przybiera coraz niższe wartości. Analiza odchylenia standardowego stężenia IGF-1 (*standard deviation score*, SDS) wykazała, iż zmiany stężenia zależne od masy ciała obserwowano niezależnie od płci. Najwyższe wartości SDS IGF-1 notowane są w grupie kobiet z BMI od 27,5 do 30, zaś u mężczyzn z BMI od 22,5 do 25 [Schneider i wsp., 2006].

Wykazano także rasowe różnice w surowiczym stężeniu IGF-1 u mężczyzn w wieku od 40. do 75. r.ż. Odpowiednio u rasy kaukaskiej, azjatyckiej i afroamerykanów średnie stężenia IGF wynosiły 224 ng/ml, 208 ng/ml i 205 ng/ml [Platz i wsp., 1999].

U kobiet stwierdzono negatywną korelację pomiędzy stężeniem IGF-1 i stężeniem insuliny [Lecomte i wsp., 1998]. Niskie stężenia IGF-1 są ściśle związane ze wzrastającym ryzykiem rozwoju nietolerancji glukozy i cukrzycy typu 2 [Sandhu i wsp., 2002]. U chorych na cukrzycę stężenie IGF-1 obniża się [Sesti i wsp., 2005] i odwrotnie koreluje ze stężeniem glikozylowanej hemoglobiny (HbA_{1c}) [Livingstone i Ferns, 2003]. Insulinoterapia w cukrzycy powoduje zmniejszenie wrotnych stężeń insuliny. Te zmniejszone stężenia insuliny mogą prowadzić do niewystarczającej produkcji IGF-1 w wątrobie. U chorych z cukrzycą również wzrasta stężenie IGFBP-1 [Livingstone i Ferns, 2003]. U szczurów z indukowaną cukrzycą stwierdzono obniżanie się stężenia krążącego IGF-1 oraz wątrobowego mRNA IGF-1 i znaczny wzrost (powyżej 400%) IGFBP-1 mRNA w wątrobie. Wartości te powracały do normy po leczeniu insuliną [Pao i wsp., 1995]. IGF-1 wzmacnia wychwytywanie glukozy do tkanek obwodowych. Jest to efekt insulinopodobny, który może zachodzić za pośrednictwem IGF-1R lub IR [LeRoith i wsp., 2001].

Stężenia IGF-1 i IGFBP-3 są stałe w ciągu dnia, choć głównym czynnikiem wpływającym na produkcję i wydzielanie obu tych białek jest GH, wydzielany na drodze pulsacyjnej [Blum i wsp., 1993]. Wraz z wiekiem dominującą rolę w stabilizacji stężenia krążącego IGF-1 odgrywa odżywienie, funkcja wątroby, poziomy hormonów płciowych oraz insulina. Oznaczanie stężenia IGF-1 jest badaniem powtarzalnym. Niewielkie różnice wyników ($\leq 20\%$) stwierdzono u 99% osób zdrowych, którym powtórzono badanie po upływie 12 tygodni [Rosario 2010].

IGF-2

Prawidłowe stężenie IGF-2 w surowicy u osób dorosłych wynosi ok. 700 ng/ml. Po urodzeniu stężenie IGF-2 jest niskie, wzrasta z wiekiem do okresu dojrzewania. Nie obserwowano w tym okresie zmian surowiczych stężeń podobnych do stężeń IGF-1. Następnie stężenie IGF-2 utrzymuje się na niezmiennym poziomie do końca życia. Różnica w obrębie płci jest niewielka (tylko 2%) [Yu i wsp., 1999]. U nieleczonych osób z niedoborem hormonu wzrostu stężenia IGF-2 są niższe i osiągają wartości około 200 ng/ml, zaś w przypadkach guzów wydzielających GH stężenia te pozostają w wartościach prawidłowych [Daughaday i Rotwein, 1989]. Stężenie IGF-2 również nie ulega istotnej zmianie w trakcie terapii estrogenami [Rooman i wsp., 2002].

Białka wiążące IGF (IGFBP)

Podstawową rolę białek nośnikowych IGFBP (zwłaszcza IGFBP-3) jest lokalna modulacja działania IGF-ów oraz przedłużanie czasu półtrwania i transport

IGF-ów (zwłaszcza IGFBP-3) [Daughaday i Rotwein, 1989; LeRoith 1997; Murphy 1998; Wang i Chard 1999; LeRoith i wsp., 2001]. Mogą one wpływać niezależnie od IGF-ów na proliferację i migrację komórek [Murphy 1998; Shoba i wsp., 1999; LeRoith i wsp., 2001].

Surowicze stężenie IGFBP-3, podobnie do IGF-1, zmienia się wraz z wiekiem, stopniowo wzrastając do okresu dojrzewania, a następnie obniża się. Nieco wyższe stężenia IGFBP-3 notuje się u kobiet [Raslan i wsp., 2007], przy czym średnie stężenia IGFBP-3 nie różnią się u kobiet przed i po menopauzie. Istotną różnicę w stężeniu tych białek stwierdzono tylko pomiędzy 3. i 4. dekadą życia [Shin i wsp., 2008]. Stężenie IGFBP-3 nie koreluje również z BMI [Colakoğlu i wsp., 2007]. Wykazano związek pomiędzy niższymi surowiczymi stężeniami IGF-1 i zmniejszonym surowiczym wskaźnikiem IGF-1/IGFBP-3 oraz wyższymi surowiczymi stężeniami IGFBP-3 a stłuszczeniem wątroby (pacjenci bez wirusowych chorób wątroby, nowotworów złośliwych, marskości wątroby czy spożywania nadmiernej ilości alkoholu) [Völzke i wsp., 2009]. Średnie stężenia IGFBP-3 są podobne u rasy kaukaskiej i azjatyckiej, zaś u afroamerykanów o ok. 13% niższe. Najwyższą wartość surowiczego wskaźnika IGF-1/IGFBP-3 stwierdzono u rasy kaukaskiej, zaś najniższą u Azjatów [Platz i wsp., 1999].

Stężenie IGFBP-6 znacząco wzrasta od urodzenia do okresu dojrzewania, zaś w dalszych okresach życia zmiany stężenia tego białka są minimalne. U mężczyzn notowano wyższe stężenia IGFBP-6 niż u kobiet. Obserwowano również istotną różnicę stężeń tego białka pomiędzy surowicą a osoczem ($175,4 \pm 56,7$ vs. $141,8 \pm 56,8$ ng/ml). Przyczyna tego zjawiska nie została wyjaśniona [Raslan i wsp., 2007].

IGF-y w życiu płodowym

U człowieka w życiu płodowym surowicze stężenie IGF-1 jest niskie i najprawdopodobniej niezależne od stężenia i działania GH. Utrzymuje się tak do ostatniego tygodnia ciąży. Nieznane są mechanizmy kontrolujące tę GH-niezależną syntezę i wydzielanie IGF-1 w życiu płodowym [Zarrilli i wsp., 1994; Daughaday 2000]. W okresie tym największe znaczenie ma także synteza IGF-1 przez inne niż wątroba tkanki [Yakar i wsp., 1999]. Podczas rozwoju embrionalnego produkowany jest także IGF-2 [LeRoith 1997]. Białka IGFBP-1 i -2 są głównymi białkami wiążącymi obecnymi w życiu płodowym u ludzi [Wang i Chard, 1999].

IGF-1 a wątroba

W okresie postnatalnym wątroba jest głównym źródłem krążącego IGF-1 i białko to wytwarzane jest głównie pod wpływem hormonu wzrostu. Na wydzielanie IGF-1 wpływ mają także m.in. wiek [LeRoith 1997], płeć [LeRoith 1997; Daughaday 2000], dieta i odżywianie [Pell i wsp., 1993; LeRoith 1997; Yakar i wsp., 1999]. Z hormonów znaczenie mają przede wszystkim: insulina i hormon przytarczyc [LeRoith 1997], hormony płciowe [Zarrilli i wsp., 1994; Kaytor i wsp., 2001a i b], czynniki sygnałne pośredniczące w odpowiedzi na GH [Shoba i wsp., 1999] oraz

lokalne czynniki komórkowe [Zhu i wsp., 1999]. Stężenie IGF-1 obniża się u chorych na cukrzycę z niedoboru insuliny, a regulacja syntezy IGF-1 w tym przypadku jest tkankowo-specyficzna [Zarrilli i wsp., 1994]. W ciąży IGF-1 tylko nieznacznie wzrasta (wysokie stężenie estrogenów, które obniżają sekrecję IGF-1) [Daughaday 2000].

Choć największą ilość IGF-1 stwierdzono w komórkach wątroby (50–100 więcej niż w innych tkankach), to badania na poziomie RNA wykazały, że w tkance tłuszczowej ilość transkryptu dorównuje wątrobie [Zarrilli i wsp., 1994]. IGF-1 produkowany w wątrobie wykazuje głównie działanie endokrynowe, a IGF-1 syntetyzowany przez inne tkanki działa w sposób para- i/lub autokrynowy. Co ciekawe, choć prawidłowa wątroba to narząd z najwyższym poziomem ekspresji IGF-1, posiada ona prawie niewykrywalne poziomy mRNA receptora IGF typu I (IGF-1R). Taki wzór ekspresji może być tłumaczony negatywną regulacją IGF-1R w odpowiedzi na lokalnie produkowany IGF-1. W przeciwieństwie do hepatocytów, wskazuje się na obecność IGF-1R na komórkach niemięszzowych wątroby (komórki Browicza-Kupffera, miofibroblasty i komórki gwiaździste wątroby) [Scharf i wsp., 2001].

Badania z zastosowaniem hybrydyzacji *in situ* u szczura wykazały, że transkrypty IGF-1, IGFBP-3 oraz ALS nie są produkowane w wątrobie przez te same komórki [Chin i wsp., 1994]. W hepatocytach obecne były transkrypty ALS i IGF-1, a mRNA IGFBP-3 wyłącznie w komórkach zatok wątrobowych. W hepatocytach wykazano koekspresję mRNA ALS i transkryptów receptora GH (GHR), co sugeruje, że GH bezpośrednio reguluje genową ekspresję ALS. Większy spadek mRNA ALS (90%) w porównaniu z mRNA IGFBP-3 (50%) po hipofizektomii wskazuje na dodatkową rolę IGFBP-3 niż budowanie potrójnego kompleksu z IGF-1 i ALS [Chin i wsp., 1994].

IGF-1 wywiera mitogenne działanie poprzez nasilenie ekspresji cykliny D1 i regulację ekspresji niektórych protoonkogenów (*c-FOS*, *c-JUN*). Ponadto działa antyapoptotycznie oraz moduluje odpowiedź immunologiczną organizmu poprzez regulację produkcji cytokin (IL-3 i IL-14), które biorą udział w regulacji wzrostu komórki [Le Roith i wsp., 2001]. Wykazano również, że krótkie peptydy będące produktami proteolitycznego cięcia prekursorów IGF-1 mogą mieć działanie promujące wzrost prawidłowych i złośliwych komórek nabłonka oskrzelowego, a proponowaną funkcją innych, krótszych ich form jest działanie podobne do neurotransmiterów [Zarrilli i wsp., 1994]. Jak wykazują badania IGF-1 reguluje ekspresję ponad 50 genów związanych z mitogenezą i różnicowaniem komórek. Swe mitogenne działanie wywiera jednak głównie poprzez zwiększanie syntezy DNA i stymulację ekspresji cykliny D1, która przyspiesza przejście cyklu komórkowego z fazy G1 do S [Le Roith i wsp., 2001].

Dla receptora IGF-1 (IGF-1R) opisano także mechanizm alternatywnego *splicingu* i powstawanie dwóch zróżnicowanych mRNA, które różnią się tylko trzema nukleotydami (CAG). Na modelu chemicznym wykazano, że receptor pozba-

wiony tych trzech nukleotydów (CAG-) około dwa razy silniej stymuluje IGF-1 w swoich działaniach mitogennych. Większą ekspresję obu izoform transkryptów opisywano w licznych nowotworach u ludzi i zwierząt. Obniżenie regulacji dojrzałego receptora prowadziło do masywnej apoptozy komórek nowotworowych [Baserga i wsp., 2003].

1.9. Stężenia białek z rodziny IGF w zakażeniu HCV i nowotworach wątroby

IGF-1

Stężenie IGF-1 u pacjentów zakażonych HCV jest niższe niż u pacjentów zakażonych HBV czy w zdrowej kontroli [Su i wsp., 2010; Adamek i wsp., 2012]. Obniża się ono wraz ze stopniem zaawansowania włóknienia w przewlekłym zapaleniu wątroby typu C, osiągając najniższe wartości w stopniu czwartym włóknienia [Lorenzo-Zúñiga i wsp., 2007; Adamek i wsp., 2012; Himoto i wsp., 2013]. Nie stwierdzono różnic w stężeniach IGF-1 w zależności od genotypu wirusa HCV [Lorenzo-Zúñiga i wsp., 2007; Himoto i wsp., 2013]. Po skutecznym leczeniu przeciwwirusowym stężenie IGF-1 znamienne wzrastało u wszystkich chorych, którzy uzyskali SVR (*sustained viral response*), niezależnie od genotypu [Lorenzo-Zúñiga i wsp., 2007]. Inni, w małych grupach chorych z przewlekłym zapaleniem wątroby typu C (n = 12) i B (n = 5), wykazali podwyższone stężenia IGF-1 i obniżone poziomy IGFBP-3 w stosunku do kontroli [Okan i wsp., 2000]. W rozwiniętej marskości wątroby obserwowano obniżone stężenia IGF-1 w porównaniu do zdrowych osobników [Vyzantiadis i wsp., 2003; Wu i wsp., 2004; Colakoğlu i wsp., 2007; Raslan i wsp., 2007]. Stężenie IGF-1 obniżało się wraz ze stopniem klinicznego zaawansowania marskości wątroby (*Child-Pugh score*) osiągając znacząco niskie wartości w stadium C [Wu i wsp., 2004; Brabant i Wallaschofski, 2007; Colakoğlu i wsp., 2007]. Podobne zmiany stężeń IGF-1 w zależności od stopnia klinicznego marskości wątroby opisano także u dzieci [Dehghani i wsp., 2012]. Wartości IGF-1 < 30 ng/ml były negatywnym czynnikiem rokowniczym u chorych z marskością wątroby. Pacjenci z tak niskimi wartościami IGF-1 umierali w ciągu pół roku [Wu i wsp., 2004]. U chorych z marskością wątroby stężenie IGF-1 pozytywnie korelowało ze stężeniem albumin, zaś negatywnie ze stężeniem kreatyniny i wielkością śledziony [Colakoğlu i wsp., 2007]. Inni autorzy u chorych przewlekle zakażonych HCV opisali pozytywną korelację pomiędzy stężeniem IGF-1 a aktywnością aminotransferaz oraz negatywną z HOMA-IR [Helaly i wsp., 2011], bądź negatywną z aktywnością AST, a pozytywną z wartością wskaźnika protrombinowego [Raslan i wsp., 2007] czy negatywną z BMI [Adamek i wsp., 2012]. U pacjentów z marskością wątroby celowe wydaje się być równoczesne z AFP oznaczanie stężenia IGF-1. Mazziotti i wsp. w kilkuletniej obserwacji wykazali zmniejszanie się stężenia IGF-1 u chorych, u których doszło do rozwoju pierwotnego raka wątroby. Dramatyczna redukcja surowiczego stężenia IGF-1

następowała ok. 9 miesięcy przed rozwojem HCC [Mazziotti i wsp., 2002]. Oznaczenie stężeń IGF-1 wraz z VEGF (*vascular endothelial growth factor*) ma znaczenie rokownicze, pozwalając na ocenę czasu przeżycia u pacjentów z HCC [Kaseb i wsp., 2011]. Stężenia IGF-1 u chorych z HCC są znacząco niższe niż w grupie pacjentów z przewlekłym zapaleniem wątroby czy marskością wątroby oraz kontroli [Stuver i wsp., 2000; Mazziotti i wsp., 2002; Rehem i El-Shikh, 2011]. Badania surowiczych stężeń IGF-1 w HCC (w tym 53 pacjentów HBV+ i/lub HCV+; 20 bez tła wirusowego) oraz w przerzutowych rakach wątroby wykazały znacznie obniżone stężenia IGF-1 w obu typach guzów wątroby w porównaniu z kontrolą. Obniżenie IGF-1 było większe w przypadku wirusowego tła HCC niż u niezakażonych pacjentów z HCC. Zdaniem autorów obniżenie IGF-1 ma wynikać ze znacznego uszkodzenia miększu wątroby, ale tylko w przypadku przerzutowych raków wątroby, a nie tłumaczy spadku IGF-1 w większości przypadków HCC [Stuver i wsp., 2000]. Podobnie w badaniach Su i wsp. wykazano niższe stężenia IGF-1 u chorych z HCC na tle zakażenia HCV i/lub HBV niż u niezakażonych. Niższe stężenia IGF-1 obserwowano w grupie HCV+ niż w grupie HBV+ [Su i wsp., 2010]. Gwałtowny i znaczący wzrost stężeń IGF-1 notuje się u chorych po przeszczepie wątroby z powodu marskości tego narządu (30 ± 7 ng/ml vs. 256 ± 30 ng/ml, $p < 0,001$) [Weber i wsp., 2002].

Obniżone surowicze stężenie IGF-1 zanotowano także w stłuszczeniu wątroby, bez etiologii wirusowej, niezależnie od ilości spożywanego alkoholu [Völzke i wsp., 2009]. Obniżenie się, choć bez cech istotności statystycznej, stężenia IGF-1 obserwowano wraz ze wzrostem stłuszczenia wątroby także w przewlekłym zakażeniu HCV [Himoto i wsp., 2013].

IGF-2

U chorych z marskością wątroby stwierdza się istotne obniżenie stężenia IGF-2 w stosunku do osób zdrowych. Również, podobnie do stężeń IGF-1, w miarę postępu zaawansowania marskości (skala *Child-Pugh*) obserwuje się systematyczne obniżanie stężeń IGF-2, ze znamionymi różnicami stężeń pomiędzy poszczególnymi kategoriami klinicznymi. Najniższe stężenia IGF-2 występują u chorych z nieleczącym się wodobrzuszem i wydłużeniem APTT (kategoria C). Bardzo niskie wartości IGF-2 (< 200 ng/ml) opisano jako złe czynniki rokownicze. Pacjenci z takimi wartościami stężeń IGF-2 umierali w ciągu pół roku z powodu niewydolności wątroby lub krwawienia z żyłaków przełyku [Wu i wsp., 2004]. Po udanym przeszczepie wątroby notowano znamionny wzrost stężenia IGF-2 prawie u wszystkich pacjentów [Weber i wsp., 2002]. Nie wszyscy autorzy uznają IGF-2 za idealny marker diagnostyczny HCC [Ranke i wsp., 2003].

IGFBP-3

W przewlekłym zapaleniu wątroby typu C opisano znaczące obniżenie się stężenia IGFBP-3 w porównaniu do osób zdrowych ($3576,8 \pm 743,5$ vs. $4675,1 \pm 1274,2$

ng/ml, $p < 0,001$) [Raslan i wsp., 2007]. Ten sam zespół badaczy w późniejszym doniesieniu takiej różnicy pomiędzy badanymi grupami (przewlekle zakażeni HCV vs. zdrowi) nie obserwował [Raslan i wsp., 2010]. Ostatnio opisano zmniejszenie się stężenia IGFBP-3 wraz ze wzrostem stopnia włóknienia chorych przewlekle zakażonych HCV. Istotne różnice stwierdzono pomiędzy chorymi z łagodnym włóknieniem a chorymi z marskością wątroby, jednakże tych drugich było zaledwie pięciu [Himoto i wsp., 2013].

W marskości wątroby stwierdza się znacząco niższe stężenie IGFBP-3 w porównaniu z osobami zdrowymi [Mattera i wsp., 2003; Wu i wsp., 2004; Rehem i El-Shikh, 2011; Aleem i wsp., 2012], jak również w porównaniu z osobami z przewlekłym WZW typu C [Raslan i wsp., 2007; Raslan i wsp., 2010]. Nie stwierdzono istotnej różnicy stężeń IGFBP-3 u chorych z marskością wątroby w zależności od jej etiologii (alkohol vs. HBV vs. HCV) [Colakoğlu i wsp., 2007]. Stężenie IGFBP-3 zmniejsza się także wraz ze stopniem zaawansowania marskości. Znamiennej różnicę stężenia tego białka obserwuje się pomiędzy grupami chorych bez i z cechami dekompensacji marskości wątroby. Te dane wskazują, iż stężenie tego parametru jest potencjalnym wskaźnikiem progresji zmian w wątrobie [Wu i wsp., 2004; Colakoğlu i wsp., 2007; Rehem i El-Shikh, 2011; Aleem i wsp., 2012]. Obserwowano istotną wysoką ujemną korelację pomiędzy stężeniem IGFBP-3 a aktywnością AST ($r = -0,619$), zaś istotną wysoką pozytywną z wartością wskaźnika protrombinowego [Raslan i wsp., 2007; Rehem i El-Shikh, 2011] i stężeniem albumin [Raslan i wsp., 2007; Colakoğlu i wsp., 2007; Rehem i El-Shikh, 2011]. Istotną ujemną korelację IGFBP-3 opisano także ze stężeniem bilirubiny oraz wielkością śledziony [Colakoğlu i wsp., 2007; Rehem i El-Shikh, 2011]. Bardzo wysoką pozytywną korelację ($r = 0,905$) obserwowano pomiędzy stężeniami IGFBP-3 a IGF-1 u chorych z marskością wątroby [Rehem i El-Shikh, 2011]. W sześciomiesięcznej obserwacji pacjenci z marskością wątroby, u których stężenie IGFBP-3 było niższe niż 6 ng/ml zmarli z powodu niewydolności wątroby i/lub krwawienia w tym okresie [Wu i wsp., 2004]. Stężenie IGFBP-3, podobnie do IGF-1, gwałtownie normalizowało się u pacjentów po udanym przeszczepie wątroby [Weber i wsp., 2002].

U chorych z HCC stężenie IGFBP-3 znamienne obniża się w stosunku do notowanego u chorych z marskością wątroby [Mattera i wsp., 2003; Rehem i El-Shikh, 2011; Aleem i wsp., 2012]. Jest ono niskie szczególnie w przypadkach zaburzeń odżywiania, znacznego uszkodzenia funkcji wątroby oraz obniżonego wydzielania GH u chorych z HCC [Ranke i wsp., 2003].

Nie obserwowano zmian stężenia IGFBP-3 w zależności od stopnia stłuszczenia wątroby w zakażeniu HCV [Himoto i wsp., 2013]. Natomiast u pacjentów przewlekle zakażonych HCV wskaźnik IGF-1/IGFBP-3 zmniejszał się wraz ze wzrostem stopnia zaawansowania włóknienia oraz negatywnie korelował ze wskaźnikiem HOMA-IR [Himoto i wsp., 2013]. Zwiększony surowiczy wskaźnik IGF-1/IGFBP-3 opisano natomiast u pacjentów z HCC w porównaniu z pacjentami z marskością wątroby i w podobnym stopniu niewydolności wątroby [Mattera i wsp., 2003].

IGFBP-6

U pacjentów z przewlekłym zakażeniem HBV czy HCV, IGFBP-6 był nieco niższy niż w przypadkach HCC. Jednakże nie jest to marker pozwalający na stwierdzenie obecności HCC. Dopiero kombinacja stężenia AFP, L-selektyny, IGFBP-6 i receptora interleukiny 6 (IL-6R) może stanowić, zdaniem niektórych badaczy, wysokiej jakości wskaźnik nowotworzenia [Sun i wsp., 2008].

1.10. Tkankowa ekspresja białek z rodziny IGF w chorobach wątroby i w karcynogenezie

W tkankach wszystkich badanych HCC *in vivo* wykazano spadek ekspresji IGF-1, a w 32% badanych HCC – wzrost ekspresji IGF-2 [Huynh i wsp., 2002; Tovar i wsp., 2010]. Obserwowano przy tym spadek tkankowej ekspresji IGFBP-3 w HCC w porównaniu z prawidłową tkanką (u 71,5% obniżenie ekspresji, u 28,5% ekspresja niewykrywalna) [Huynh i wsp., 2002]. Yumoto i wsp. wykryli transkrypty IGFBP-3 tylko w 10% pierwotnych guzów wątroby, zaś Luo i wsp. zanotowali około 80% obniżenie ekspresji IGFBP-3 w tkance guzów w stosunku do kontroli [Luo i wsp., 2005; Yumoto i wsp., 2005]. Utrata autokrynowej/parakrynowej funkcji osi IGFBP-3 może skutkować nasileniem wzrostu guza [Huynh i wsp., 2002]. Gong i wsp. zanotowali istotne obniżenie ekspresji mRNA IGFBP-3 u chorych z HCC w porównaniu z marskością wątroby i osobami zdrowymi [Gong i wsp., 2000]. Obniżona pięciokrotnie ekspresja mRNA IGFBP-3 w guzach HCC u osób zakażonych HCV korelowała z mniejszą wielkością guza, mniejszą inwazją naczyniową oraz niższym ryzykiem wczesnych nawrotów [Tovar i wsp., 2010].

Obserwacje na poziomie mRNA w HCC u ludzi potwierdziły obniżenie mRNA obu IGF-ów w porównaniu z prawidłową tkanką, ale większe obniżenie dotyczyło mRNA IGF-1 w porównaniu z transkryptem IGF-2 [Cariani i wsp., 1988; Su i wsp., 1989; Ng i wsp., 1998; Luo i wsp., 2005]. Obniżenie ekspresji mRNA IGF-1 obserwowano również w liniach komórkowych (HepG2, Huh-7, PCL/PRF/5, Hep3B) oraz w ludzkim *hepatoma* [Su i wsp., 1989]. U pacjentów z przewlekłym zapaleniem wątroby typu C nie stwierdzono istotnych różnic w ekspresji mRNA IGF-1 w stosunku do zdrowych [Stefano i wsp., 2006].

Ekspresję receptora IGF-1 (IGF-1R) wykryto w 85% biopłatów od chorych z przewlekłym zapaleniem wątroby typu C. Wzrost ekspresji związany był ze wzrostem włóknienia u tych chorych. Nie stwierdzono różnic w ekspresji IGF-1R u pacjentów przed i po leczeniu przeciwwirusowym, niezależnie od efektów terapii [Stefano i wsp., 2006]. Wzrost ekspresji IGF-1R był obserwowany w ludzkiej marskiej wątrobie, w raku wątrobowokomórkowym i liniach komórkowych ludzkiego *hepatoma* w porównaniu ze zdrową wątrobą [Caro i wsp., 1988; Scharf i wsp., 1998]. Inni opisali obniżoną ekspresję IGF-1R w HCC w porównaniu z otaczającą zdrową tkanką. Jednakże po znormalizowaniu (α -tubulina) okazało

się, iż różnica w ekspresji w obu tkankach (HCC i zdrowa wątroba) nie była istotna [Huynh i wsp., 2002]. U osób zakażonych HCV ekspresja IGF-1R w guzach HCC nie różniła się w porównaniu z kontrolą [Tovar i wsp., 2010]. W badaniach ekspresji tkankowej IGF-1R wykazano jego większą błonową lokalizację na komórkach linii raka wątrobowo-komórkowego (HepG2) w porównaniu z komórkami linii prawidłowych ludzkich hepatocytów (*Chang liver cell lines*) [Zhang i wsp., 2006]. Zwiększona ekspresja IGF-1R w badanych liniach komórkowych ma świadczyć o złośliwym fenotypie tych komórek [Blakesley i wsp., 1997]. Podawanie monoklonalnych przeciwciał anti-IGF-1R (alphaIR3) w zależności od dawki wywierało hamujący wpływ na proliferację komórkową i indukcję apoptozy w linii komórkowej HepG2 [Zhang i wsp., 2006].

Wzrost ekspresji mRNA IGF-1R był obserwowany u wszystkich chorych przewlekle zakażonych HCV przed leczeniem przeciwwirusowym. Spadek ekspresji mRNA IGF-1R był znamienny u chorych, którzy odpowiedzieli na terapię przeciwwirusową – uzyskali SVR [Stefano i wsp., 2006].

2. Założenia i cele pracy

Przewlekłe zakażenie HCV stanowi główny czynnik ryzyka rozwoju HCC. Jak dotychczas informacje na temat roli białek z rodziny IGF w procesie nowotworzenia w przewlekłym zakażeniu HCV są skąpe. Pojedyncze prace opisały tylko surowicze stężenia IGF-1 i IGFBP-3 u chorych przewlekłe zakażonych HCV, zaś ekspresję tkankową białek z rodziny IGF opisywano w marskości wątroby i HCC. Słabo poznana jest rola receptora typu I IGF (IGF-1R) w progresji chorób wątroby, a dane z piśmiennictwa dotyczące tkankowej ekspresji są niespójne. Również słabo poznane są mechanizmy biochemiczne alternatywnego *splicingu* genu IGF-1, w tym wyboru promotora (P1 czy P2) do inicjowania transkrypcji i produkcji białek prekursorowych. Nie wiadomo czy zakażenie HCV (wraz z produktami genomu wirusa) może wywoływać zmiany w regulacji ekspresji genu IGF-1 w wątrobie, mające swe odbicie na poziomie mRNA.

W codziennej praktyce lekarskiej notuje się wzrost liczby przypadków HCC u przewlekłe zakażonych HCV w ostatnich latach. Prognozuje się, iż liczba chorych z HCC będzie gwałtownie wzrastać w kolejnych latach. Większa świadomość społeczeństwa i prowadzone akcje promocyjne/działania informacyjne odnośnie do zakażenia HCV prowadzą do zwiększenia wykrywalności pacjentów z przewlekłym zakażeniem HCV, co naturalną drogą doprowadza do zwiększonej liczby pacjentów wymagających specjalistycznej opieki i dodatkowych badań, w związku z możliwym nowotworzeniem w wątrobie. Stało się to motywem poszukiwania nowych czynników ryzyka rozwoju nowotworu wątroby na tle zakażenia HCV. Dotychczasowe metody badań skriningowych nie pozwalają w pełni na szybkie rozpoznanie toczącego się procesu nowotworowego.

W związku z powyższym postanowiono dokonać:

1. Analizy surowiczych stężeń białek z rodziny IGF, tj. IGF-1, IGFBP-3 oraz dwóch dotychczas nieopisywanych białek, tj. IGF-1R i IGFBP-6 u chorych z przewlekłym zakażeniem HCV.
2. Analizy ekspresji komórkowej białek z rodziny IGF, tj. IGF-1, IGF-1R i IGFBP-3 oraz ekspresji białek wirusa HCV (C, NS3 i NS5A) w biopunktatach wątroby od chorych z przewlekłym zapaleniem wątroby typu C.
3. Określenia za pomocą metod molekularnych poziomu tkankowej ekspresji izoform mRNA genu IGF-1, ekspresji mRNA IGF-1R oraz czynnika transkrypcyjnego SP1 (który ma przyłączać się do miejsc regulatorowych w promotorze 1 genu IGF-1) w przewlekłym zakażeniu HCV.
4. Odniesienie wyników badań nad genową ekspresją wybranych składników osi IGF do wybranych danych klinicznych i histopatologicznych w przewlekłym zakażeniu HCV.

3. Materiał i metody

3.1. Pacjenci

Grupa badana

Grupę badaną stanowiło ogółem 150 pacjentów z przewlekłym zapaleniem wątroby i/lub marskością tego narządu na tle przewlekłego zakażenia wirusem C zapalenia wątroby (HCV) diagnozowanych i leczonych w Klinice Chorób Zakaźnych Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu (ul. Szwajcarska 3, Poznań). Jednostka ta działa na bazie Oddziału Zakaźnego Wielospecjalistycznego Szpitala Miejskiego im. J. Strusia z Zakładem Opiekuńczo-Lecznym SP ZOZ w Poznaniu.

U wszystkich pacjentów badania przeprowadzano w ramach kwalifikacji do leczenia przeciwwirusowego, bezpośrednio przed jego rozpoczęciem lub w ramach diagnostyki/leczenia marskości wątroby. Materiał zebrano w 2010 r. (n = 132). Do badania włączono również materiał archiwalny z 2007 r., pochodzący od chorych z wysoce prawdopodobnym lub udokumentowanym długotrwałym (≥ 20 lat) zakażeniem HCV (n = 18).

U każdego z pacjentów zbierano szczegółowy wywiad odnośnie do prawdopodobnej drogi zakażenia wirusem HCV. Spośród wielu czynników ryzyka zakażenia HCV w badanej grupie znalazły się transfuzje krwi, zabiegi operacyjne i pobyty szpitalne, drobne zabiegi z naruszeniem ciągłości skóry lub błon śluzowych, krwiodawstwo, kolczykowanie różnych okolic ciała oraz wykonywanie tatuaży i pobieranie narkotyków dożylnych. U wielu chorych czynników ryzyka nabycia zakażenia HCV było kilka i trudno jednoznacznie określić prawdopodobny czas trwania zakażenia HCV w tych przypadkach. W badaniu podmiotowym zwracano także uwagę na współistniejące choroby lub zakażenia. Najczęściej przewlekłemu zapaleniu wątroby towarzyszyło nadciśnienie tętnicze (n = 29). Żaden z badanych pacjentów nie chorował na cukrzycę. Wszyscy zaprzeczali aktualnemu nadużywaniu spożywania alkoholu. W badanej grupie nie było pacjentów z przewlekłą niewydolnością nerek ani czynną chorobą nowotworową. W całej badanej grupie nie było chorego współzakażonego wirusem HBV czy HIV. W badaniu podmiotowym zwracano również uwagę na dolegliwości pacjenta. U większości chorych z przewlekłym zakażeniem HCV nie występowały objawy kliniczne, zaś tylko pojedynczy chorzy zgłaszali okresowo występujące dolegliwości dyspeptyczne, bóle stawowe czy ogólne osłabienie.

Żaden z pacjentów włączonych do badania nie był uprzednio leczony przeciwwirusowo zarówno monoterapią (interferon alfa), jak i terapią skojarzoną (interferon/pegylowany interferon i rybawiryna).

Grupę badaną z zakażeniem HCV podzielono na 3 podgrupy zgodnie z załączonym opisem i tabelą (zob. Aneks):

1. **Podgrupa A** (n = 37, wiek 18–63 lat) – pacjenci z przewlekłym zakażeniem HCV, u których wykonano badania w surowicy krwi oraz badania w biopunktatach wątroby (immunocytochemiczne i z wykorzystaniem techniki *real-time* RT-PCR).

Byli to pacjenci z przewlekłym zapaleniem wątroby typu C hospitalizowani w Klinice w 2010 r., przyjęci w celu diagnostyki zakażenia HCV, w tym wykonania biopsji wątroby, w ramach kwalifikacji do leczenia przeciwwirusowego. W wywiadach u tych chorych zarówno w momencie zbierania materiału, jak i uprzednio nie było żadnych chorób przewlekłych wymagających przewlekłej terapii.

2. **Podgrupa B** (n = 18, wiek 19–65 lat) – pacjenci z przewlekłym zakażeniem HCV, u których wykonano badania w surowicy krwi oraz z zastosowaniem technik immunocytochemicznych w biopunktatach wątroby.

Stanowili podgrupę chorych z przewlekłym zapaleniem wątroby typu C z klinicznie zaawansowanym stadium choroby i/lub marskością wątroby z udokumentowanym lub wysoce prawdopodobnym długotrwałym (powyżej 20 lat) czasem zakażenia HCV. Byli to pacjenci hospitalizowani w Klinice w 2007 r., przyjęci wówczas w celu diagnostyki zakażenia HCV, w tym wykonania biopsji wątroby, w ramach kwalifikacji do leczenia przeciwwirusowego.

3. **Podgrupa C** (n = 95, wiek 19–84 lat) – pacjenci, u których dla celów obecnej pracy wykorzystano surowicę krwi.

Grupę tę stanowili pacjenci z przewlekłym zapaleniem wątroby typu C i/lub marskością wątroby w przebiegu zakażenia HCV hospitalizowani w Klinice w 2010 r. w celu rozpoczęcia leczenia przeciwwirusowego lub z innych przyczyn (ze względu na stopień zaawansowania choroby wątroby lub choroby współistniejące nie podlegali kwalifikacji do powyższego leczenia). Pacjenci byli wcześniej zdiagnozowani, w tym z uprzednio wykonaną biopsją wątroby. Dysponowano wynikami badania histopatologicznego biopunktatów wątroby tej podgrupy chorych.

Materiał badawczy		Podgrupa pacjentów z WZW typu C		
		A	B	C
Surowica krwi		+	+	+
Biopunktaty wątroby	materiał utrwalony w zbuforowanej formalinie, zatopiony w parafinie	+	+	-
	część materiału zanurzona w RNAlater® i zamrożona w -80°C	+	-	-

Grupa kontrolna

Kontrolę surowiczą stanowiło 30 surowic pochodzących od zdrowych dawców krwi (wiek 19–51 lat). U wszystkich dawców wykluczono zakażenie HCV (anty-HCV ujemne, HCV-RNA ujemny), zakażenie HBV (HBs Ag ujemny, HBV-DNA ujemny) i HIV (anty-HIV/HIV Ag ujemny, HIV-RNA ujemny). Surowice otrzymano z Regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Poznaniu (ul. Marcelesińska 44, Poznań).

Kontrolę tkankową opisano w dalszej części pracy (str. 38).

Podstawowe dane kliniczne wszystkich chorych z przewlekłym WZW typu C i kontroli wraz z panelem wykonanych badań przedstawiono w aneksie.

3.1.1. Badania biochemiczne

Badanie morfologii krwi obwodowej wykonywano na analizatorze SYSMEX XS oraz SYSMEX XT z zastosowaniem odczynników i kontroli firmy SYSMEX (*Japan*).

Szeroki panel badań biochemicznych (aktywność aminotransferaz alaninowej (ALT) i asparaginianowej (AST), gammaglutamylotranspeptydazy (GGTP), stężenie całkowitego cholesterolu, stężenie białka ogólnego z elektroforezą, stężenie glukozy) wykonano przy użyciu analizatora MURA 200 firmy POINTE SCIENTIFIC (*Italy*) używając odczynników i kalibratorów tej firmy.

Określenia stężenia alfafetoproteiny (AFP) dokonano metodą chemiluminescencyjną na analizatorze ARCHITECT i 2000 z zastosowaniem testu ARCHITECT AFP (ABBOTT, *Sligo, Ireland*).

Stężenia insuliny i 17- β -estradiolu oznaczano również metodą chemiluminescencyjną przy użyciu testów ARCHITECT Insulin (ABBOTT, *Wiesbaden, Germany*) oraz ARCHITECT Estradiol (ABBOTT, *Longford, Ireland*) również na analizatorze ARCHITECT i 2000.

Wskaźnik insulinooporności HOMA-IR (*Homeostasis Model for Assessment of Insulin Resistance*) wyliczano według wzoru: $HOMA-IR = \text{stężenie glukozy na czczo (mg/dl)} \times \text{stężenie insuliny na czczo } (\mu\text{U/ml}) / 405$ [Matthews i wsp., 1985].

3.1.2. Badania metodą ELISA

Oznaczenie stężeń poszczególnych białek z rodziny IGF u pacjentów z przewlekłym zakażeniem HCV oraz w grupie kontrolnej wykonano metodą ELISA z zastosowaniem odpowiednich komercyjnie dostępnych zestawów, dla IGF-1: IDS IGF-I ELISA kit (IDS Ltd, Immunodiagnostic Systems Limited, Boldon, UK); dla IGF-1R: IGF1R (Human) ELISA Kit (Abnova, *Taipei City, Taiwan*); dla IGFBP-3: DIAsource IGFBP3-EASIA Kit (DIAsource ImmunoAssays S.A., *Nivelles, Belgium*) oraz dla IGFBP-6: RayBio® Human IGF-BP-6 ELISA Kit (*Norcross, GA, USA*). Badania wykonywano zgodnie z procedurą opisaną w każdym z wyżej wymienionych oznaczeń.

Badania biochemiczne, serologiczne, metodą ELISA – oznaczanie stężeń IGF-1R, IGFBP-3 i IGFBP-6 wykonano w Laboratorium Oddziału Zakaźnego Wie-

lospecjalistycznego Szpitala Miejskiego im. J. Strusia z Zakładem Opiekunczo-Lecznicznym SP ZOZ w Poznaniu. Oznaczenia stężeń IGF-1 w surowicy dokonano w Pracowni Endokrynologii Molekularnej Kliniki Endokrynologii i Reumatologii Dziecięcej UM w Poznaniu (ul. Szpitalna 27/33, Poznań).

Badania potwierdzające zakażenie wirusem HCV

Obecność przeciwciał anti-HCV wykrywano metodą chemiluminescencyjną z zastosowaniem testu ARCHITECT Anti-HCV (ABBOTT, Wiesbaden, Germany) na analizatorze ARCHITECT i 2000 firmy ABBOTT.

Potwierdzenia zakażenia HCV dokonywano oznaczając obecność HCV-RNA w surowicy krwi metodą PCR. Dla oznaczenia HCV-RNA zastosowano test GeneProof HEPATITIS C VIRUS HCV (GeneProof a.s., Brno, Czech Republic) z czułością metody 50 IU/ml. U wszystkich chorych oznaczono genotyp wirusa HCV (VERSANT HCV GENOTYPE 2.0 ASSAY, LiPA). Badania molekularne zostały wykonane w Zakładzie Diagnostyki Medycznej w Poznaniu (ul. Dobra 38, Poznań).

3.2. Materiał tkankowy

3.2.1. Biopsja wątroby u pacjentów z zakażeniem HCV i ocena histopatologiczna

Biopsję wątroby wykonano sposobem Menghiniego [Menghini 1958] w modyfikacji Juszczyka [Juszczyk 1973]. Na godzinę przed nakłuciem podawano domięśniowo 10 mg diazepamu. Biopsję wykonywano w ułożeniu chorego na wznak, w linii pachowej środkowej, w miejscu największego stłumienia wątrobowego podczas głębokiego wydechu. Uprzednio znieczulano kanał wkłucia igły 2% lignokainą. Nakłucia dokonywano igłami Hepafix Luer Lock firmy Braun o średnicy 1,4 mm. Pobrany wycinek w przypadku pacjentów z grupy A dzielono, odcinając jego końcowy około 0,5 cm fragment, który następnie zanurzano w roztworze RNAlater® (Applied Biosystems) i zamrażano w temperaturze -80°C. Pozostałą część wycinka od pacjentów z grupy A utrwalano w 10% roztworze zbuforowanej formaliny i przekazywano do Zakładu Patomorfologii Wielospecjalistycznego Szpitala Miejskiego im. J. Strusia. W przypadku pacjentów z grupy B dysponowano archiwalnymi bloczkami parafinowymi z biopsji wątroby wykonanej uprzednio (2007 r.).

W grupie C dysponowano jedynie wynikami opisów badania histopatologicznego.

Oceny histopatologicznej bioptatów wątroby dokonywano w Zakładzie Patomorfologii Wielospecjalistycznego Szpitala Miejskiego im. J. Strusia. Preparaty barwiono hematoksyliną i eozyną oraz srebrzono wg standardowych metod. Do oceny aktywności zapalnej i stopnia zaawansowania włóknienia użyto powszechnie stosowanej skali punktowej wg METAVIR [Bedossa i Poynard, 1996]. W ramach

tej pracy do oceny stłuszczenia wątroby zastosowano skalę punktową, w której w stopniu 0 nie stwierdzano stłuszczenia, zaś w stopniu 1 i 2 odpowiednio < 30% i 30–70% hepatocytów wykazywało cechy stłuszczenia [Kasprzak i wsp., 2007].

W obrazach mikroskopowo-światlnych wszystkie biopaty były reprezentatywne, gdyż zawierały co najmniej 6 przestrzeni bramno-żółciowych.

W całej grupie badanej biopsję wątroby (w trakcie zbierania materiału w 2010 r. lub uprzednio) miało wykonanych 118 pacjentów z przewlekłym zapaleniem wątroby typu C, w tym w grupie A 37/37 (2010 r.), w grupie B 18/18 (2007 r.), zaś w grupie C 63/95 (różny okres czasu przed 2010 r.). U pozostałych 32 pacjentów z grupy C biopsji wątroby nie wykonywano ze względu na obecność przeciwwskazań (dokonana marskość wątroby z/bez nadciśnienia wrotnego, zaburzenia krzepnięcia), genotyp 3, problemy techniczne lub brak zgody pacjenta. Biopsji wątroby nie wykonywano u wszystkich chorych zakażonych genotypem 3, gdyż według kryteriów włączenia leczenia przeciwwirusowego u takich chorych ocena biopunktatu wątrobowego nie jest wymagana. W przypadkach dokonanej marskości wątroby z jej klinicznymi objawami (pajęczki naczyniowe, rumień dłoniowy, w badaniu palpacyjnym wzmożona spoistość) lub cechami dekompensacji tego narządu (wodobrzusze, obrzęki kończyn dolnych, obecność płynu w jamie opłucnej) dla celów analizy statystycznej oceniono stopień włóknienia (*staging*) jako 4, bez oceny stopnia aktywności zapalnej (*grading*).

Do zasadniczych badań w obecnej pracy dysponowano materiałem tkankowym (błoczki parafinowe) pacjentów z przewlekłym WZW typu C podgrupy A i B.

Kontrolę tkankową negatywną (n = 16) stanowił: (1) materiał tkankowy archiwalny pochodzący z wątrób przeznaczonych do przeszczepu narządu (pobrane okołoperacyjnie, bez morfologicznych cech patologii) (n = 4, wiek 60–67 lat); (2) fragment morfologicznie prawidłowej wątroby wokół wycinanej zmiany ogniskowej w wątrobie (n = 8, wiek 20–72 lata), (3) biopat wątroby u osoby niezakażonej HCV (diagnostyka podwyższonej aktywności aminotransferaz bez zdiagnozowanej przyczyny w Klinice Chorób Zakaźnych UM w Poznaniu) (n = 1, wiek 35 lat); (4) fragmenty zdrowej wątroby zebrane w tkankowym panelu z HCC (*Tissue Microarray Panel, Cybrdi Inc., Maryland*) (USA) (n = 3, wiek 42–66 lat). Materiał tkankowy archiwalny (1 i 2) uzyskano z Katedry i Kliniki Chirurgii Ogólnej, Chirurgii Onkologii Gastroenterologicznej i Chirurgii Plastycznej UM w Poznaniu (ul. Przybyszewskiego 49, Poznań).

Kontrola tkankowa pozytywna (n = 61). Stanowiły ją archiwalne błoczki parafinowe z zatopionym materiałem tkankowym guza wątroby z potwierdzonym klinicznie i badaniem histopatologicznym pierwotnym rakiem wątroby (HCC) (n = 4, wiek 20–75 lat). Tylko u jednego z tych badanych pacjentów potwierdzono zakażenie HCV. Błoczki parafinowe uzyskano z Wielkopolskiego Centrum Onkologii w Poznaniu (ul. Garbary 15, Poznań).

Pozostałą część kontroli stanowił komercyjnie dostępny tkankowy panel z potwierdzonym histopatologicznie oraz immunocytochemicznie (antygen PCNA

dotadni) HCC (*Tissue Microarray Panel, Cybrdi Inc., Maryland*) (n = 57). W tych przypadkach status serologiczny czy wirusologiczny dotyczący zakażenia HCV był nieznan. Wraz z opisem rozpoznania histopatologicznego podano stopień złośliwości histologicznej (*grade*) oraz podstawowe dane kliniczne (wiek i płeć pacjenta).

3.2.2. Badania z zastosowaniem techniki *real-time* RT-PCR

Z podzielonych i roztartych w ciekłym azocie fragmentów biopsatów wątroby (umieszczonych uprzednio w RNAlater i zamrożonych) izolowano RNA za pomocą zestawu RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit (QIAGEN, *Germany*) zgodnie z instrukcjami producenta. W trakcie procedury śladowe zanieczyszczenia DNA są usuwane poprzez DNazy. Ostatecznie całkowity RNA był umieszczany w wodzie wolnej od RNaz.

Kolejno sprawdzono jakość RNA za pomocą elektroforezy na żelu agarozowo-formaldehydowym. Oznaczenia ilościowego RNA dokonano za pomocą spektrofotometrii.

Każdą próbkę RNA poddano dodatkowemu trawieniu DNazą za pomocą zestawu RNase-Free DNase Set (QIAGEN) w celu uniknięcia zanieczyszczenia genomowym DNA. Następnie 1 µg RNA z każdej próby poddawano reakcji odwrotnej transkrypcji z użyciem zestawu QuantiTect Reverse Transcription Kit (QIAGEN) i otrzymywano cDNA.

Analizę ekspresji genów przeprowadzono metodą RT-PCR z użyciem następujących specyficznych starterów dla poszczególnych izoform i wybranych genów referencyjnych:

Zastosowanie	Długość startera (par zasad)	Sekwencje 5' → 3'
Klasa I (P1) IGF-1	102	5'-CAGCAGTCTTCCAACCCA (F) 5'-CACAGCGCCAGGTAGAAGAGATGC (R)
Class II (P2) IGF-1	101	5'-CACCTACAGTGAAGATGCACACC (F) 5'-CGTCTCCGGTCCAGCCGTGGC (R)
IGF-1A	144	5'-TCGTGGATGAGTGCTGCTTCCG (F) 5'-TCAAATGACTTCTTCTGGGTCTTG (R)
IGF-1B	140	5'-ATCTACCAACAAGAACACG (F) 5'-TACTTCCAATCTCCCTCC (R)
IGF-1C	126	5'-ACCAACAAGAACACGAAGTC (F) 5'-CATGTCACTCTTCACTCCTC (R)
IGF-1R	258	5'-GGGAATGGAGTGCTGTATG (F) 5'-CACAGAAGCTTCGTTGAGAA (R)
SP-1	85	5'-CCCAACCCAAGCCGGTC (F) 5'-CCCCGAGCCCCCTTCC (R)
GAPDH (gen referencyjny)	60	5'-AAGGTCGGAGTCAACGGATTT (F) 5'-ACCAGAGTTAAAAGCAGCCCTG (R)
HMBS (gen referencyjny)	113	5'-TGCAACGGCGGAAGAAAA (F) 5'-ACGAGGCTTCAATGTTGCC (R)

Reakcje przeprowadzano w ostatecznej objętości 10 μ l. Każda z prób zawierała 15 ng/ μ l cDNA oraz mieszaninę odczynników wchodzących w skład zestawu SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems, UK), każdy z pary starterów w stężeniu 0,25 mM. Reakcję przeprowadzano z użyciem automatycznego fluorometru (Rotor-Gene 6000, Corbett Research). Kolejne etapy reakcji polegały na denaturacji wstępnej, denaturacji, przyłączaniu starterów oraz elongacji. Warunki przeprowadzania reakcji przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Etapy i warunki reakcji RT-PCR dla poszczególnych izoform genu IGF-1 i genów referencyjnych

Analizowany gen	Etapy reakcji PCR								liczba cykli etapy 2–4
	1		2		3		4		
	denaturacja wstępna		denaturacja		przyłączanie starterów		elongacja		
	°C	sek	°C	sek	°C	sek	°C	sek	
P1	95	600	95	10	61	15	72	15	40
P2	95	600	95	10	67	15	72	15	45
IGF-1A	95	600	95	15	60	35	72	15	40
IGF-1B	95	600	95	10	56	15	72	15	45
IGF-1C	95	600	95	10	58	15	72	20	50
SP1	95	600	95	10	65	15	72	12	40
IGF-1R	95	600	95	10	60	15	72	40	40
GAPDH	95	600	95	10	56	15	72	15	35
HMBS	95	600	95	10	53	15	72	25	35

Wyjściowa ilość produktu obliczana była w odniesieniu do krzywej standardowej. Możliwe to było dzięki jednoczasowej amplifikacji serii rozcieńczeń odpowiedniego produktu PCR, dla którego znano wyjściową liczbę kopii. Ocena obecności właściwego produktu wyznaczano poprzez określenie punktu topnienia dla określonego produktu PCR.

Poziom ekspresji badanych izoform mRNA genu IGF-1 (IGF-1A, IGF-1B, IGF-1C, P1, P2) genu SP1 i IGF-1R wyznaczano poprzez normalizację liczby kopii w próbach w stosunku do genów o stałym poziomie ekspresji, tzw. wewnętrznych genów referencyjnych (*housekeeping gene*). Za geny referencyjne w przeprowadzonej normalizacji przyjęto gen GAPDH (dehydrogenazy aldehydu-3-fosfoglicerynowego) i gen HMBS (syntazy hydroksymetylbilanu). Gen HMBS jest specyficzny dla wątroby zgodnie z danymi z piśmiennictwa [Cicinnati i wsp., 2008].

Badania z zastosowaniem techniki RT-PCR zostały przeprowadzone dzięki współpracy z Zakładem Wirusologii Molekularnej Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu (kierownik: prof. dr hab. Anna Goździcka-Józefiak).

3.2.3. Badania mikroskopowe

Materiał tkankowy (bioptaty wątroby z grupy A i B oraz pozytywna i negatywna kontrola tkankowa) został utrwalony w roztworze zbuforowanej 10% formaliny, następnie zatopiony w parafinie i skrojony na skrawki o grubości 5 μm , umieszczone na szkiełkach podstawowych SuperFrost/Plus.

Panel tkankowy z fragmentami HCC od indywidualnych pacjentów również zawierał utrwalone w formalinie, zatopione w parafinie skrawki tkankowe guzów wątroby i zdrowej wątroby (kontrola negatywna) o średnicy 1,5 mm, umieszczone na szkiełku z przeznaczeniem do badań immunocytochemicznych.

Skrawki parafinowe z materiałem tkankowym zostały poddane badaniom immunocytochemicznym z wykorzystaniem następujących przeciwciał:

Przeciwciało	Wykrywany antygen	Typ przeciwciała, rozcieńczenie, producent
Anti-human IGF-1	Ludzkie białko IGF-1	Monoklonalne, mysie anty-ludzkie, 1:500 <i>R&D Systems, Inc.; clone: 56408</i>
Anti-human IGFBP-3	Ludzkie białko IGFBP-3	Monoklonalne, mysie anty-ludzkie, 1:100 <i>R&D Systems, Inc.; clone: 84728</i>
Anti-human IGF-1R	Ludzkie białko IGF-1R	Monoklonalne, mysie anty-ludzkie, 1:100 <i>R&D Systems, Inc.; clone: 33255</i>
Anti-human IGF-1R	Ludzkie białko IGF-1R	Monoklonalne, kozie anty-ludzkie, 1:100 <i>R&D Systems, Inc.</i>
Anti-hepatitis C (NS3)	Wirusowe białko niestrukturalne NS3	Monoklonalne, mysie; 1:50 <i>NOVOCASTRA Lab.; clone: MMM33</i>
Anti-hepatitis C Virus	Wirusowe białko niestrukturalne NS5A	Monoklonalne, mysie; 1:50 <i>CHEMICON International, Inc.</i>
Anti-hepatitis C virus	Wirusowe białko rdzeniowe (HCV core antigen)	Monoklonalne mysie; 1:50 <i>CHEMICON International Inc., epitope: aa 70-90</i>

Dla badań porównawczych na wykrywanie IGF-1 oraz IGF-1R reakcje immunocytochemiczne przeprowadzono również na komórkach hodowanych dwóch linii komórkowych, tj. wątroby płodowej (WRL68) oraz ludzkiego pierwotnego raka wątroby (HepG2).

Wyniki reakcji immunocytochemicznych na hodowanych komórkach nie podlegały ocenie ilościowej, a jedynie jakościowej ocenie lokalizacji antygenów.

Technika immunocytochemiczna (strept)awidyna-biotynyłowana peroksydaza (ABC)

Rekcję immunocytochemiczną ABC wg Hsu i wsp. [Hsu i wsp., 1981] przeprowadzono zgodnie z poniższymi etapami:

1. Odparafinowanie i nawodnienie preparatów w ksylenie i szeregu alkoholi o malejącym stężeniu (2 x 100%, 90%, 85%, 80%, 70%)
2. Płukanie w wodzie bieżącej – 10 min.
3. Blokowanie aktywności endogennej peroksydazy za pomocą 1% H_2O_2 w wodzie destylowanej – 30 min.

4. Płukanie w wodzie bieżącej – 10 min.
5. Płukanie w wodzie destylowanej – 10 min.
6. Inkubacja w normalnej surowicy koziej (1:20, Dako) – 30 min.
7. Inkubacja ze swoistymi przeciwciałami – 18 godz./ 4°C, a następnie przez jedną godzinę w temp. pokojowej.
8. Płukanie w roztworze soli fizjologicznej zbuforowanej fosforanami (PBS) – 3 x 3 min.
9. Inkubacja w roztworze zawierającym dekstran skoniugowany z peroksydazą i wtórne przeciwciała kozie przeciwko immunoglobulinom króliczym i mysim (Dako REAL EnVision/HRP, Rabbit/Mouse, Dako) – 20 min.
10. Płukanie w PBS-ie – 3 x 3 min.
11. Inkubacja z 3-3'diaminobenzzydynam (Dako REAL DAB, Dako) – 5–7 min.
12. Płukanie w wodzie bieżącej – 10 min.
13. Płukanie w wodzie destylowanej – 10 min.
14. Odwodnienie w szeregu alkoholi o wzrastającym stężeniu (70%, 80%, 85%, 90%, 2 x 100%) i w ksylenie.
15. Zamknięcie preparatów za pomocą histofluidu (Marienfeld) i szkiełek nakrywkowych.

Większość preparatów podbarwiano przez 2 minuty hematoksyliną, następnie płukano w wodzie bieżącej i destylowanej (po 10 minut), jako etap poprzedzający odwodnienie preparatów.

Przeprowadzano również wewnętrzne kontrole negatywne, zastępując specyficzne przeciwciała przez surowice odpowiedniego gatunku w roztworze PBS z dodatkiem 0,1% albumin bydlęcych (BSA) i 15 mM azydku sodu.

Przeciwciała, takie jak: anty-IGFBP-3, anty-IGF-1R, anty-NS3, anty-NS5A, i anty-C, wymagały dodatkowego odsłaniania determinant antygenowych za pomocą wysokiej temperatury. Procedura polegała na zastosowaniu po etapach odparafinowania i nawodnienia dodatkowego etapu gotowania preparatów w 10 mM buforze cytrynianowym w kuchence mikrofalowej o mocy 700 W przez 15 minut. Następnie preparaty płukano w PBS-ie i od punktu 3 prowadzono reakcję według powyżej opisanej standardowej procedury.

Technika ImmunoMax

W przypadku wykrywania IGF-1R, białek niestrukturalnych HCV, tj. NS3 i NS5A oraz białka rdzeniowego C HCV zastosowano technikę *ImmunoMax*. W tym celu do amplifikacji barwnego produktu reakcji immunocytochemicznej stosowano biotynylowaną tyraminę (*PerkinElmer Life Sciences, Inc, MA, USA*). Reakcję przeprowadzono według etapów klasycznej techniki ABC do punktu 9, a następnie wykonano:

10. Płukanie w roztworze PBS/Tween – 3 x 3 min.
11. Inkubację z biotynylowaną tyraminą (1:50) – 10 min.

12. Inkubację w roztworze Dako REAL EnVision/HRP, Rabbit/Mouse – 20 min.
13. Płukanie w PBS-ie – 3 x 3 min.
14. Inkubację z 3-3'diaminobenzzydynam (DAB, Dako) – 5–7 min.
15. Płukanie w wodzie destylowanej – 5 min.
16. Odwodnienie w alkoholach o wzrastającym stężeniu (2 x 95%, 2 x 100%) i w ksylenie (2 x).
17. Zamknięcie preparatów za pomocą histofluidu i szkiełek nakrywkowych.

Technika immunofluorescencyjna

Metodę immunofluorescencyjną zastosowano dla wykrycia ekspresji: IGF-1 oraz IGF-1R w komórkach hodowanych płodowej wątroby WRL68 oraz komórek HepG2. Hodowlę komórek prowadzono w standardowych warunkach w temperaturze 37°C i przy 5% stężeniu CO₂ używając medium EMEM (*Minimum Essential Medium Eagle*) z dodatkiem 10% FBS, L-Glutaminy oraz antybiotyków (streptomycyna, penicilina). Reakcję immunofluorescencyjną przeprowadzono według poniższych etapów:

1. Usunięcie medium i odczepienie komórek od dna butelki hodowlanej za pomocą trypsyny – 10 min. /temp. 37°C.
2. Przeniesienie komórek na szkiełka podstawowe na drodze wirowania w Cytopspinie – 1000 rpm/10 min.
3. Utrwalenie komórek w 4% paraformaldehydzie – 15 min./temp. pokojowa.
4. Inkubacja w 3% BSA – 45 min./temp. pokojowa.
5. Inkubacja ze swoistym przeciwciałem – 1 h/temp. pokojowa.
6. Płukanie w PBS-ie – 3 x 3 min.
7. Inkubacja z drugim przeciwciałem znakowanym fluorochromem – 1 h/temp. pokojowa/ciemność.
8. Płukanie w PBS-ie – 3 x 3 min.
9. Zamknięcie preparatów za pomocą balsamu zawierającego DAPI i szkiełek nakrywkowych.

Przeprowadzono również kontrole negatywne, zastępując specyficzne przeciwciała z etapu 5 czystym PBS-em.

Dokumentację fotograficzną wyników fluorescencji przeprowadzono z użyciem mikroskopu fluorescencyjnego *AxioVision, Carl Zeiss*. Była to ocena wyłącznie jakościowa dla zbadania wzoru ekspresji danego białka (błonowa, cytoplazmatyczna, jądrowa).

3.2.4. Półilościowa ocena ekspresji białek

Dotyczyła nasilenia reakcji immunocytochemicznej białka rdzeniowego HCV (białko kapsydowe, C), NS3 oraz NS5A w grupie A i B (n = 55).

Zastosowano skalę punktową IRS (*Immunoreactive score*) [Remmele i Stegner, 1987] (Tabela 2).

Tabela 2. Skala IRS (0–12 punktów) [Remmele i Stegner, 1987]

A: liczba komórek immunopozytywnych	B: intensywność reakcji
0 – brak komórek z pozytywną reakcją 1 – do 10% komórek z pozytywną reakcją 2 – 11 do 50% komórek z pozytywną reakcją 3 – 51 do 80% komórek z pozytywną reakcją 4 – >80% komórek z pozytywną reakcją	0 – brak reakcji barwnej 1 – słabo nasiloną reakcją barwną 2 – średnio nasiloną reakcją barwną 3 – intensywną reakcją barwną

Iloczyn A x B

Oceniano liczbę komórek z pozytywną reakcją (A) oraz nasilenie reakcji (B) w dziesięciu polach widzenia mikroskopu świetlnego (Olympus BH-2) w powiększeniu 400-krotnym. Wartość końcową uzyskanej reakcji stanowił iloczyn A x B. Jako końcowy wynik brano pod uwagę średnią wartość ekspresji z 10 pól widzenia. Wartość iloczynu 1–2 oznaczała słabe nasilenie reakcji, 3–4 – średnie, natomiast 6–12 – intensywną reakcję immunocytochemiczną.

3.2.5. Archiwizacja komputerowa obrazów z immunocytochemiczną /fluorescencyjną ekspresją białek

Preparaty mikroskopowe oceniano przy pomocy mikroskopu optycznego *Olympus BH-2* z zastosowaniem wbudowanej kamery cyfrowej i połączonej z komputerem. Najpierw rejestrowano i archiwizowano kolorowe obrazy mikroskopowe w powiększeniu obiektywu 40 x (co najmniej 10 pól z każdego preparatu histologicznego danego pacjenta) o wielkości 2560 x 1920 pikseli przy użyciu programu komputerowego *LUCIA Image 5.0*, zapisując je w formacie jpg. na dysku twardym komputera.

Archiwizacja komputerowa obrazów mikroskopowych dotyczyła trzech białek z rodziny IGF: IGF-1, IGF1BP-3 i IGF-1R oraz dwóch białek HCV, tj. białka rdzeniowego (core, C) i NS5A.

W przypadku negatywnej reakcji immunocytochemicznej na dane białko nie wykonywano dokumentacji fotograficznej, a w analizie statystycznej w takich przypadkach ujmowano wartości zerowe.

Dokumentację fotograficzną wyników fluorescencji przeprowadzono z użyciem mikroskopu fluorescencyjnego *AxioVision, Carl Zeiss* i, jak wspomniano, służyła ona do archiwizacji danych i jakościowej analizy uzyskanych obrazów mikroskopowych.

Badania immunocytochemiczne, rejestrację oraz archiwizację obrazów mikroskopowych przeprowadzono w Katedrze i Zakładzie Histologii i Embriologii Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu (kierownik: prof. dr hab. med. Maciej Zabel).

3.2.6. Analiza ilościowa reakcji immunocytochemicznej z zastosowaniem metody wizualizacji przestrzennej

Do analizy ilościowej z zastosowaniem metody wizualizacji przestrzennej ostatecznie zakwalifikowano około 4000 obrazów z pozytywną reakcją immunocytochemiczną. Wśród tych obrazów mikroskopowych, 1230 obejmowało obszar mięszu wątroby z cytoplazmatyczną reakcją na IGF-1, około 1000 obrazów dotyczyło reakcji błonowo-cytoplazmatycznej na wykrywanie receptora typu I IGF-1 (IGF-1R) oraz 1050 obrazów wykonano w poszczególnych grupach pacjentów na wykrywanie cytoplazmatycznej ekspresji IGFBP-3.

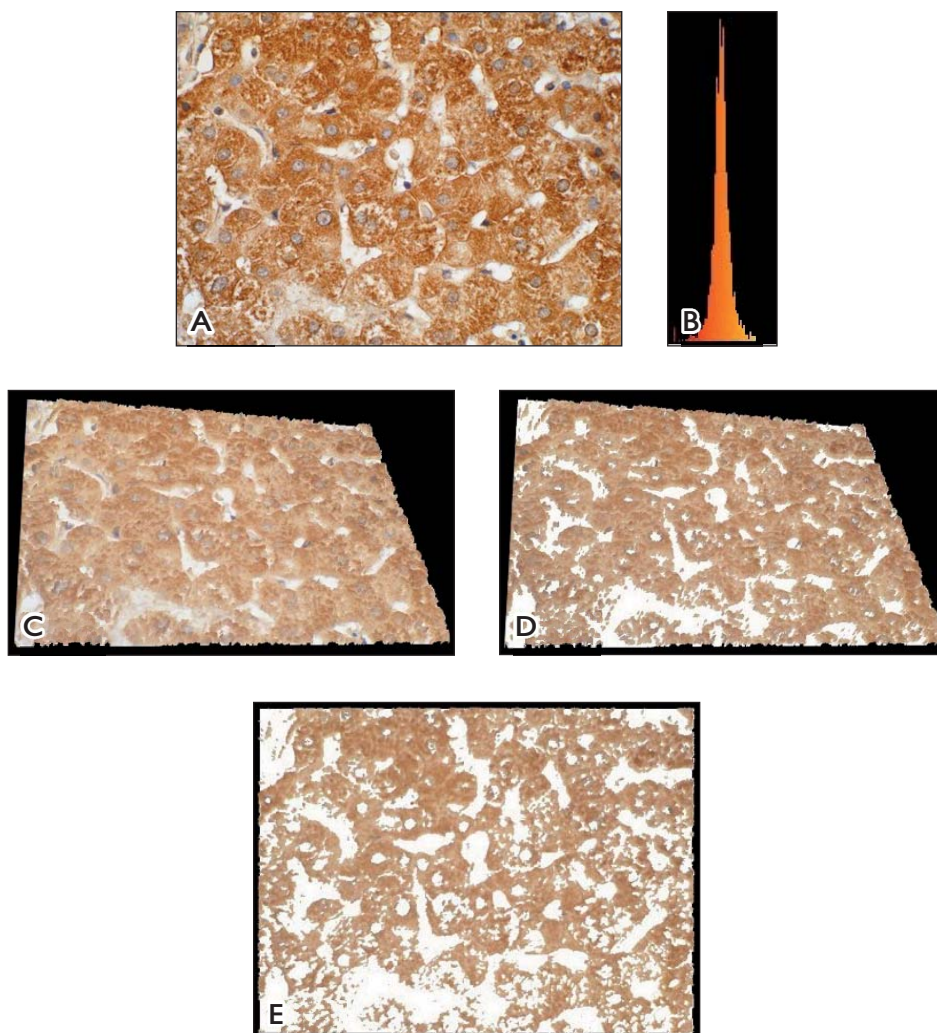
Pozytywną reakcję na białka HCV: core (białko C) oraz NS5A zarchiwizowano na około 600 obrazach mikroskopowych.

Obrazy o wielkości 2560 x 1920 pikseli wykonane oryginalnie w programie *LUCIA Image 5.0* zostały skonwertowane do wielkości 640 x 480 pikseli do dalszej „obróbki”.

Analiza morfometryczna została wykonana dzięki współpracy z Zakładem Bioinformatyki i Biologii Obliczeniowej Katedry Patomorfologii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu (kierownik: prof. dr hab. med. Elżbieta Kaczmarek) z zastosowaniem metody opartej na wizualizacji przestrzennej immunocytochemicznej ekspresji antygenów uwidocznionej na obrazach mikroskopowych. Technika ta została oryginalnie opracowana i wdrożona do programu komputerowego A4D zaprogramowanego w języku C++ przez Strzelczyka [Kaczmarek i Strzelczyk, 2005]. Zastosowanie metodyki wizualizacji przestrzennej do obrazów mikroskopowych spowodowało zmianę płaskiego obrazu na trójwymiarowy z wykorzystaniem jego jasności jako trzeciej współrzędnej (współrzędnej przestrzennej). Na utworzonych w ten sposób obrazach przestrzennych usunięto elementy zbędne i artefakty do poziomu tła. W tym celu zastosowano trzy filtry: filtr jasności, filtr barwny oraz filtr nasycenia, który pozwala usunąć szare tło z obrazów kolorowych. Filtry te nie zmieniają zawartości oryginalnego obrazu. Dodatkowo za pomocą filtru wygładzającego mediany zostały usunięte szумы wprowadzone przez niedoskonałość przetwornika kamery CCD używanej do rejestracji obrazów mikroskopowych.

W programie A4D obliczono w kolejności:

- średnie pole powierzchni obszaru mięszu wątroby na zarejestrowanym obrazie (w pikselach i μm^2) u każdego pacjenta i całej grupy pacjentów,
- średnie pole reakcji immunocytochemicznej konkretnego antygenu przypadające na pole powierzchni mięszu wątroby (w pikselach i μm^2) u każdego pacjenta i całej grupy pacjentów,
- średnie pole reakcji immunocytochemicznej konkretnego antygenu przypadające na pole powierzchni mięszu wątroby u każdego pacjenta i całej grupy pacjentów, przeliczano i określano także w procentach (% reakcji) (Rycina 1).



Rycina 3. Okna robocze programu A4D. Segmentacja progowa barwnej reakcji immunocytochemicznej (brązowy kolor) na przykładzie ekspresji IGF-1 w mięszu wątroby u pacjenta z przewlekłym zakażeniem HCV (pacjent nr 48) [Kasprzak i wsp., 2011].

A – obraz uzyskany w mikroskopie świetlnym połączonym z kamerą cyfrową. Powiększenie obiektywu 40 x. Technika ABC, podbarwienie jąder komórkowych hematoksylina; B – histogram barw składających się na odcienie brązowego koloru IGF-1; C – „uprzestrzennienie” płaskiego obrazu mikroskopowego (A); D – wyodrębnienie (segmentacja) reakcji immunocytochemicznej na wykrywanie IGF-1 z przestrzennego obrazu (C); E – projekcja „uprzestrzennionej” reakcji na płaszczyznę jako ostateczny wynik automatycznej segmentacji obrazu immunocytochemicznego IGF-1 do pomiaru jego powierzchni oraz udziału procentowego w polu widzenia mięszu wątroby.

Wyniki uzyskane za pomocą programu wizualizacji przestrzennej A4D porównano z wynikami progowania kolorów w przestrzeni HSI uzyskanymi programem *ImageJ* (*public domain, NHI, Bethesda, MD*) zastosowanym do tych samych zdjęć. W tym celu zainstalowano do wersji podstawowej programu *ImageJ* wtyczkę *Color Thresholder*, dostępną na stronie internetowej <http://rsb.info.nih.gov/ij>. Błąd metody pomiaru ekspresji reakcji immunocytochemicznej szacowano na podstawie wartości błędu standardowego różnic między pomiarami wykonanymi na tych samych 250 obrazach mikroskopowych, ale dwoma różnymi technikami (A4D i *ImageJ*). Błąd standardowy średniej wartości pomiarów wynosi 97 pikseli, co stanowi 0,97% wartości średniego pola powierzchni ekspresji reakcji wyznaczonego metodą wizualizacji przestrzennej. Przyjmuje się, że błąd metody nie przekracza 1%.

Wyniki uzyskane w obu programach analizy obrazów (*LUCIA Image 5.0* oraz A4D) eksportowano do formatu programu Microsoft Excel, który jest kompatybilny z programem Statistica PL v. 9, w celu przeprowadzenia analizy statystycznej.

W rozdziale „Wyniki” tej pracy przedstawiono wartości średniej ekspresji immunocytochemicznej danego białka systemu IGF oraz białek HCV (C i NS5A) wyrażone w % reakcji na pole powierzchni mięższu wątroby.

3.3. Metody statystyczne

Obliczenia statystyczne wykonano dzięki współpracy z Zakładem Bioinformatyki i Biologii Obliczeniowej Katedry Patomorfologii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu (kierownik: prof. dr hab. med. Elżbieta Kaczmarek).

W pierwszym etapie analizy statystycznej weryfikowano zgodność wszystkich uzyskanych wyników z rozkładem Gaussa przy pomocy testu Shapiro-Wilka. Następnie obliczono parametry statystyki opisowej (średnią arytmetyczną, odchylenie standardowe, medianę oraz wartość minimalną i maksymalną). Wyniki porównywano w podgrupach A, B, C oddzielnie oraz sumarycznie w całej grupie badanej (A+B+C) lub A+B z kontrolą „surowiczą”. Dane ekspresji tkankowej (% reakcji na pole powierzchni) porównywano z danymi uzyskanymi w panelu HCC i tkankach z raków wątroby (kontrola pozytywna) lub z prawidłowymi wątroбами (kontrola negatywna) (zmiennie niepowiązane) z zastosowaniem testu Manna-Whitney'a (test nieparametryczny dla zmiennych niepowiązanych dla dwóch grup). W przypadku zmiennych powiązanych zastosowano test Wilcoxon. Zastosowano również test Kruskala-Wallisa i gdy występowały różnice – dodatkowo test wielokrotnych porównań (test Dunna). Dla porównania ekspresji białek HCV wyrażonych w skali IRS zastosowano test Friedmana i kolejno test Dunna. Do porównania procentowego udziału izoform mRNA IGF-1 zasto-

sowano test różnic między dwoma wskaźnikami struktury. Korelację Pearsona i rang Spearmana zastosowano do skojarzenia wartości zmiennych. Analizowano również wpływ wieku na siłę korelacji pomiędzy badanymi markerami systemu IGF-1 i/lub białek HCV a wybranymi danymi klinicznymi. W tym celu wystandaryzowano przede wszystkim wartości surowiczych stężeń IGF-1 ze względu na wiek i obliczano poziomy korelacji między danymi klinicznymi i wystandaryzowanymi wartościami poziomu surowiczego tego białka. Standaryzacja polegała na tym, że wyniki zmiennych przekształcono wg następującego wzoru:

$$X_i = \frac{x_i - \bar{x}}{SDx_i} \cdot w_i$$

X_i = wartość badanej zmiennej dla pacjenta

gdzie wartości ważone w_i obliczano jako wystandaryzowaną wartość wieku pacjenta na podstawie wzoru:

$$w_i = \frac{w_i - \bar{w}_i}{SDw_i}$$

w_i = wiek pacjenta

Wyniki uznano za istotne statystycznie na poziomie istotności $p < 0,05$.
Analizę statystyczną przeprowadzono przy pomocy programu Statistica PL v. 9.

3.4. Zagadnienia etyczne

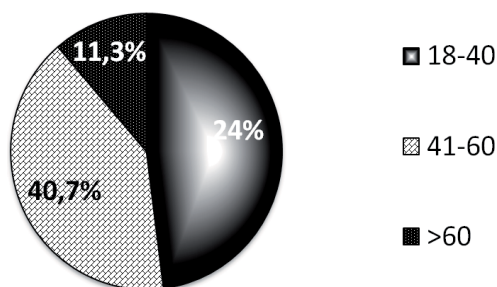
Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym w Poznaniu (nr 22/09) z dnia 8 stycznia 2009 roku.

4. Wyniki

4.1. Charakterystyka kliniczna grupy badanej (pacjenci z przewlekłym zakażeniem HCV)

Dane epidemiologiczne, wyniki badań biochemicznych i wirusologicznych tej grupy pacjentów przedstawia tabela 3.

Wśród 150 pacjentów z przewlekłym zapaleniem wątroby typu C (grupa A+B+C) było 86 mężczyzn i 64 kobiety w wieku od 18 do 84 lat. Średnia wieku pacjentów wynosiła $41,49 \pm 15,61$ lat, i nie różniła się w grupie mężczyzn i kobiet ($40,97 \pm 15,34$ vs. $42,19 \pm 16,06$; $p = 0,731$). Ponad połowa badanej grupy była w wieku powyżej 40. r.ż. (Rycina 4).



Rycina 4. Odsetek chorych w zależności od wieku w całej grupie badanej (A+B+C).

Średnia wartość wskaźnika masy ciała (BMI) mieściła się w granicach normy, choć w grupie zarówno mężczyzn jak i kobiet stwierdzano nadwagę, a u 10 pacjentów otyłość ($BMI > 30$). Zanotowano istotną różnicę w wartości wskaźnika BMI ze względu na płeć (mężczyźni vs. kobiety, $25,90 \pm 3,76$ vs. $23,25 \pm 3,33$; $p < 0,001$) i to zarówno w całej grupie, jak i w podgrupach A i C (Tabela 5).

W przeprowadzonych badaniach aktywności ALT i AST wykazano podwyższone średnie aktywności obu tych enzymów. Średnie aktywności ALT, AST i GGTP w grupie zakażonych HCV odpowiednio około 2-krotnie, 1,5-krotnie i 2-krotnie przewyższały wartości referencyjne dla tych badanych enzymów. Istotną różnicę w aktywności aminotransferaz w stosunku do płci zanotowano tylko dla ALT (mężczyźni vs. kobiety odpowiednio $87,63 \pm 62,33$ U/l vs. $67,91 \pm 49,65$ U/l; $p = 0,021$). Podobnie znamienne wyższe wartości aktywności GGTP zanotowano w grupie mężczyzn w stosunku do kobiet ($77,49 \pm 86,77$ U/l vs. $60,82 \pm 66,61$ U/l; $p = 0,015$). Wartości pozostałych podstawowych parametrów biochemicznych nie różniły się w obu płciach tej grupy pacjentów (Tabela 3 i 5).

Wśród pacjentów z przewlekłym zapaleniem wątroby typu C w pojedynczych przypadkach obserwowano hiperglikemię na czczo. U żadnego z pacjentów uprzednio, jak i w chwili badania nie rozpoznano cukrzycy. Do stanu przedcukrzycowego należy jednak insulinooporność, obserwowana w badanej grupie. W celu określenia wskaźnika insulinooporności HOMA-IR w badanej grupie oznaczono stężenia insuliny na czczo, której średnie stężenia mieściły się w granicach referencyjnych, jednakże były znamienne wyższe w stosunku do oznaczeń wykonanych w surowicach pochodzących od zdrowych dawców krwi ($19,43 \pm 32,09 \mu\text{U/ml}$ vs. $18,49 \pm 11,45 \mu\text{U/ml}$; $p = 0,046$). Średnia wartość wskaźnika HOMA-IR dla całej grupy badanej wynosiła $5,16 \pm 8,42$ i była ponad 2-krotnie wyższa od wartości referencyjnych (Tabela 3).

Średnia wartość surowiczego stężenia AFP w całej grupie badanej była podwyższona i wynosiła $16,35 \pm 51,69 \text{ ng/ml}$. Znacząco wysokie wartości AFP ($> 100 \text{ ng/ml}$) zanotowano u 5 chorych z podgrupy C. Troje z nich w trakcie około 2-letniego okresu obserwacji zmarło z powodu objawów dekompensacji marskości wątroby z towarzyszącą chorobą nowotworową (stwierdzono guzy wątroby w badaniach obrazowych). Wysokie wartości stężenia AFP w granicach 55–99 ng/ml zanotowano ponadto u kolejnych 5 chorych (u 4 z podgrupy C i u jednego z podgrupy B), u których dokonał się proces marskości wątroby.

Tabela 3. Analiza danych klinicznych i laboratoryjnych pacjentów z przewlekłym zapaleniem wątroby typu C z podziałem na poszczególne badane grupy

Cecha statystyczna	Zakres norm	Podgrupa	n	Średnia	Mediana	Min.	Maks.	SD
Wiek (lata)		A	37	35,97	30,00	18,00	63,00	13,51
		B	18	41,72	44,00	19,00	65,00	16,22
		C	95	43,59	48,00	19,00	84,00	15,88
		A+B+C	150	41,49	42,50	18,00	84,00	15,61
BMI	18,5–24,99	A	37	24,09	23,90	17,80	37,61	3,91
		B	13	24,59	24,29	19,80	32,05	3,98
		C	90	25,10	25,06	17,84	35,14	3,74
		A+B+C	140	24,79	24,49	17,80	37,61	3,81
ALT (U/l)	0–38,0	A	37	82,00	59,00	18,00	292,00	63,24
		B	18	66,78	43,50	22,00	169,00	43,20
		C	94	80,41	65,54	10,44	281,00	58,38
		A+B+C	149	79,16	63,00	10,44	292,00	57,88
AST (U/l)	0–35,0	A	37	56,52	45,50	15,70	182,00	38,87
		B	18	59,89	48,00	18,00	145,00	40,63
		C	93	63,72	52,60	14,10	253,80	45,09
		A+B+C	148	61,45	50,25	14,10	253,80	42,93
GGTP (U/l)	8,0–35,0	A	23	51,81	42,20	11,90	128,00	35,50
		B	17	60,15	51,00	6,00	140,00	41,20
		C	79	78,15	47,50	9,00	678,00	92,55
		A+B+C	119	70,49	49,00	6,00	678,00	79,05

cd. tabeli 3.

Cecha statystyczna	Zakres norm	Podgrupa	n	Średnia	Mediana	Min.	Maks.	SD
Cholesterol (mg/dl)	0–200	A	28	186,79	188,80	128,55	251,89	35,28
		B	17	172,12	167,00	102,00	274,00	42,17
		C	89	175,45	173,60	97,70	280,60	42,32
		A+B+C	134	177,39	177,00	97,70	280,60	40,94
Białko całkowite (g/dl)	6,2–8,5	A	37	7,17	7,21	6,02	8,68	0,63
		B	17	7,31	7,50	6,20	9,60	0,80
		C	93	7,48	7,42	6,22	9,10	0,64
		A+B+C	147	7,38	7,40	6,02	9,60	0,67
Albuminy (g/dl)	3,4–5,4	A	37	3,84	3,85	2,98	4,65	0,40
		B	17	3,94	3,83	2,79	5,66	0,57
		C	91	3,98	4,02	2,62	4,98	0,48
		A+B+C	145	3,94	3,96	2,62	5,66	0,47
Gamma-globuliny (g/dl)	0,7–1,4	A	37	1,41	1,33	0,84	2,26	0,36
		B	17	1,50	1,54	0,96	1,87	0,24
		C	91	1,48	1,40	0,78	3,53	0,42
		A+B+C	145	1,46	1,43	0,78	3,53	0,39
Płytki krwi (G/l)	130–440	A	37	229,59	217,00	115,00	432,00	68,24
		B	17	203,47	205,00	102,00	328,00	72,39
		C	95	186,64	190,00	43,00	459,00	75,41
		A+B+C	149	199,23	199,00	43,00	459,00	75,14
Glukoza we krwi (mg/dl)	70,0–105,0	A	28	93,85	94,60	72,63	129,81	13,22
		B	17	90,18	89,00	73,00	105,00	8,32
		C	89	99,83	99,26	67,20	149,00	15,11
		A+B+C	134	97,35	96,85	67,20	149,00	14,43
Insulina w surowicy (μU/ml)	6–20	A	37	12,79	8,90	3,20	74,50	12,28
		B	18	14,10	10,00	3,30	43,80	10,08
		C	92	23,14	9,75	2,70	255,40	39,19
		A+B+C	147	19,43	9,70	2,70	255,40	32,09
HOMA-IR	< 2,5	A	29	3,36	2,18	0,64	20,59	3,71
		B	17	3,19	2,41	0,695	9,19	2,23
		C	85	6,16	2,47	0,056	60,11	10,06
		A+B+C	131	5,16	2,42	0,06	60,11	8,42
Estradiol w surowicy (pg/ml)	Zależnie od płci i wieku	A	37	45,73	32,00	10,00	179,00	35,31
		B	18	75,06	39,00	11,00	299,00	87,61
		C	94	53,22	41,00	10,00	313,00	50,05
		A+B+C	149	54,00	40,00	10,00	313,00	53,20
AFP (ng/ml)	0–10	A	37	5,02	3,01	1,30	38,44	6,23
		B	17	9,14	6,02	1,63	67,04	15,21
		C	92	22,29	5,16	1,00	350,00	64,06
		A+B+C	146	16,38	4,80	1,00	350,00	51,69
HCV RNA (IU/ml)		A	37	982030,81	47000,00	1220,00	21500000,00	3530735,40
		B	18	656675,00	97350,00	4090,00	5050000,00	1314884,89
		C	90	1382817,08	236000,00	560,00	19400000,00	3057465,40
		A+B+C	145	1190405,70	182000,00	560,00	21500000,00	3027899,90

Objaśnienia: n – liczba osób w podgrupie; min. – minimum; maks. – maksimum; SD – odchylenie standardowe.

Średnie stężenie AFP mieszczące się w granicach normy zanotowano w stopniu 1 aktywności zapalnej oraz w stopniu 1 i 2 włóknienia. Wysokie wartości (wielokrotnie przekraczające normę) stężenia AFP związane były z najwyższym stopniem włóknienia (*staging* 4) (Tabela 4).

U chorych przewlekle zakażonych HCV stężenie AFP systematycznie wzrastało wraz ze wzrostem zarówno aktywności zapalnej, jak i zaawansowania włóknienia. Proporcjonalny wzrost stężenia AFP wraz ze wzrostem zaawansowania włóknienia wątroby (*staging*) był bardzo spektakularny. Największą różnicę stężeń AFP obserwowano pomiędzy grupą z najniższym stopniem włóknienia (*staging* 1) a grupą z marskością wątroby (*staging* 4) ($p < 0,001$) (Rycina 5).

W przypadku analizy stężenia AFP i parametru *grading* testem wielokrotnych porównań dowiedziono, że wzrost stężenia AFP w stopniu 2 i 3 aktywności zapalnej wykazywał istotną różnicę w stosunku do stężenia w stopniu 1, ale także różnił się istotnie pomiędzy G2 i G3 (Tabela 4).

Wartość HCV-RNA w surowicy pacjentów mieściła się w granicach od $5,6 \times 10^2$ do $2,15 \times 10^7$ IU/ml, zaś średnia wynosiła $1,19 \times 10^6 \pm 3,02 \times 10^6$ IU/ml. Dominującym genotypem wśród badanych zakażonych HCV był genotyp 1, który stwierdzono w 86,67%. W pojedynczych przypadkach wykryto zakażenie genotypem 3 ($n = 9$) oraz 4 ($n = 7$).

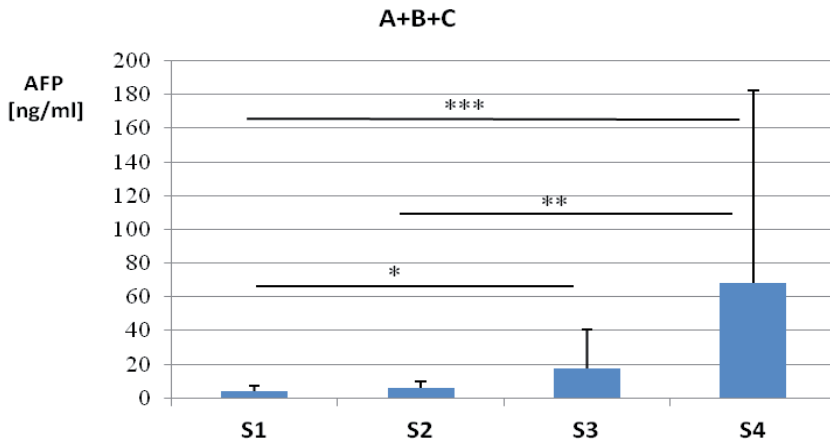
Stężenia insuliny u pacjentów zakażonych HCV (A+B+C) były istotnie wyższe w porównaniu z kontrolą ($19,43 \pm 32,09$ μ U/ml vs. $18,49 \pm 11,45$ μ U/ml; $p < 0,05$).

Średnie stężenie estradiolu w całej badanej grupie pacjentów zakażonych HCV nie różniło się w stosunku do kontroli ($54,00 \pm 53,20$ pg/ml vs. $54,76 \pm 58,67$ pg/ml; $p > 0,05$), podobnie w grupie samych mężczyzn zakażonych HCV ($39,13 \pm 12,45$ pg/ml vs. $40,42 \pm 7,67$ pg/ml; $p > 0,05$). Nie stwierdzono różnic w stężeniach estradiolu w zależności od płci u wszystkich pacjentów, jak i w każ-

Tabela 4. Stężenie AFP (średnia \pm SD) u chorych przewlekle zakażonych HCV (grupa A+B+C) w zależności od stopnia aktywności zapalnej (*grading*) i zaawansowania włóknienia (*staging*)

	Punkty skali	n	AFP (ng/ml)
<i>Grading</i> (G)*	1	42	$3,60 \pm 1,76$
	2	61	$6,58 \pm 8,91^*$
	3	12	$9,98 \pm 9,38^*, ***$
<i>Staging</i> (S)*	0	4	$3,77 \pm 2,38$
	1	69	$4,19 \pm 3,37$
	2	28	$6,04 \pm 3,73$
	3	8	$17,86 \pm 22,93^*$
	4	20	$68,48 \pm 114,09^{**}, ***$

Objaśnienia: n – liczba osób, SD – odchylenie standardowe; * – parametry ocenione w skali półilościowej (p. Materiał i metody); *G1 vs. G2 i G2 vs. G3, $p < 0,05$; ***G1 vs. G3, $p < 0,001$; *S1 vs. S3, $p < 0,05$; ***S1 vs. S4, $p < 0,001$; **S2 vs. S4, $p < 0,01$; wartości S0 z pozostałymi wartościami *staging* nie porównano ze względu na zbyt niską liczebność pacjentów z S0.



Rycina 5. Surowicze stężenia AFP w zależności od stopnia zaawansowania włóknienia (*staging*) w grupie badanej (A+B+C). * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$.

dej z podgrup (Tabela 5). Wraz ze wzrostem aktywności zapalnej (*grading*, G) stężenie estradiolu zmniejszało się. Istotnie wyższe stężenie stwierdzono w G1 (G1 vs. G2, $65,74 \pm 62,73$ pg/ml vs. $50,57 \pm 55,00$ pg/ml; $p < 0,05$). Najniższe stężenie estradiolu ($38,92 \pm 30,51$ pg/ml) zanotowano w najwyższym stopniu aktywności zapalnej (G3). Nie stwierdzono istotnych różnic w stężeniach estradiolu w zależności od stopnia zaawansowania włóknienia. W grupie zakażonych HCV mężczyzn nie obserwowano różnic stężenia estradiolu w zależności od *grading* i *staging* ($p > 0,05$).

Tabela 5. Analiza danych kliniczno-laboratoryjnych u pacjentów przewlekle zakażonych HCV z podziałem na poszczególne podgrupy w zależności od płci

Cecha statystyczna	Podgrupa	Płeć	n	Średnia \pm SD	p
Wiek	A	K	19	$34,95 \pm 15,07$	0,461
		M	18	$37,06 \pm 11,98$	
	B	K	8	$39,63 \pm 14,48$	0,633
		M	10	$43,40 \pm 18,08$	
	C	K	37	$46,46 \pm 15,79$	0,234
		M	58	$41,76 \pm 15,80$	
	A+B+C	K	64	$42,19 \pm 16,06$	0,731
		M	86	$40,97 \pm 15,34$	
BMI	A	K	19	$22,39 \pm 3,19$	0,002
		M	18	$25,88 \pm 3,87$	
	B	K	6	$23,80 \pm 3,97$	0,628
		M	7	$25,27 \pm 4,17$	
	C	K	34	$23,64 \pm 3,30$	0,005
		M	56	$25,99 \pm 3,74$	
	A+B+C	K	59	$23,25 \pm 3,33$	<0,001
		M	81	$25,90 \pm 3,76$	

cd. tabeli 5.

Cecha statystyczna	Podgrupa	Płeć	n	Średnia \pm SD	p
ALT (U/l)	A	K	19	58,49 \pm 40,03	0,008
		M	18	106,83 \pm 74,18	
	B	K	8	61,00 \pm 46,82	0,696
		M	10	71,40 \pm 42,03	
	C	K	37	74,25 \pm 54,67	0,327
		M	57	84,41 \pm 60,80	
	A+B+C	K	64	67,91 \pm 49,65	0,021
		M	85	87,63 \pm 62,33	
AST (U/l)	A	K	19	45,54 \pm 33,32	0,024
		M	18	68,11 \pm 41,8	
	B	K	8	58,75 \pm 50,50	0,573
		M	10	60,80 \pm 33,65	
	C	K	37	62,84 \pm 46,24	0,897
		M	56	64,29 \pm 44,73	
	A+B+C	K	64	57,19 \pm 43,38	0,117
		M	84	64,70 \pm 42,55	
GGTP (U/l)	A	K	11	40,78 \pm 28,50	0,211
		M	12	61,93 \pm 39,35	
	B	K	8	43,45 \pm 26,19	0,236
		M	9	75,00 \pm 47,62	
	C	K	31	72,41 \pm 80,31	0,095
		M	48	81,85 \pm 100,30	
	A+B+C	K	50	60,82 \pm 66,61	0,015
		M	69	77,49 \pm 86,77	
Cholesterol (mg/dl)	A	K	16	190,66 \pm 30,53	0,568
		M	12	181,62 \pm 41,63	
	B	K	8	184,75 \pm 54,33	0,743
		M	9	160,89 \pm 25,93	
	C	K	33	180,07 \pm 43,02	0,459
		M	56	172,72 \pm 42,05	
	A+B+C	K	57	183,70 \pm 41,21	0,147
		M	77	172,73 \pm 40,38	
Białko całkowite (g/dl)	A	K	19	7,3 \pm 0,66	0,178
		M	18	7,03 \pm 0,59	
	B	K	8	7,23 \pm 0,42	0,963
		M	9	7,38 \pm 1,05	
	C	K	37	7,43 \pm 0,73	0,366
		M	56	7,52 \pm 0,58	
	A+B+C	K	64	7,36 \pm 0,67	0,708
		M	83	7,39 \pm 0,67	
Albuminy (g/dl)	A	K	19	3,98 \pm 0,33	0,092
		M	18	3,69 \pm 0,43	
	B	K	8	3,82 \pm 0,13	0,423
		M	9	4,04 \pm 0,78	
	C	K	36	3,91 \pm 0,51	0,426
		M	55	4,02 \pm 0,46	
	A+B+C	K	63	3,92 \pm 0,42	0,775
		M	82	3,95 \pm 0,51	

cd. tabeli 5.

Cecha statystyczna	Podgrupa	Płeć	n	Średnia \pm SD	p
Gamma-globuliny (g/dl)	A	K	19	1,45 \pm 0,42	0,916
		M	18	1,37 \pm 0,27	
	B	K	8	1,51 \pm 0,20	0,815
		M	9	1,49 \pm 0,28	
	C	K	36	1,50 \pm 0,49	0,619
		M	55	1,46 \pm 0,37	
A+B+C	K	63	1,49 \pm 0,44	0,544	
	M	82	1,44 \pm 0,34		
Płytki krwi (G/l)	A	K	19	245,37 \pm 65,37	0,080
		M	18	212,94 \pm 69,04	
	B	K	8	209,25 \pm 79,37	0,673
		M	9	198,33 \pm 70,04	
	C	K	37	197,70 \pm 89,90	0,511
		M	58	179,59 \pm 64,37	
A+B+C	K	64	213,30 \pm 83,63	0,073	
	M	85	188,64 \pm 66,61		
Glukoza we krwi (mg/dl)	A	K	16	96,45 \pm 10,04	0,110
		M	12	90,39 \pm 16,40	
	B	K	8	89,75 \pm 9,22	0,815
		M	9	90,56 \pm 7,97	
	C	K	34	99,24 \pm 15,29	0,753
		M	55	100,19 \pm 15,13	
A+B+C	K	58	97,16 \pm 13,52	0,893	
	M	76	97,50 \pm 15,17		
Insulina w surowicy (μ U/ml)	A	K	19	16,09 \pm 16,17	0,210
		M	18	9,31 \pm 4,21	
	B	K	8	11,93 \pm 7,68	0,633
		M	10	15,84 \pm 11,77	
	C	K	35	20,76 \pm 36,61	0,309
		M	57	24,61 \pm 40,94	
A+B+C	K	62	18,19 \pm 29,01	0,537	
	M	85	20,33 \pm 34,30		
HOMA-IR	A	K	16	4,29 \pm 4,78	0,232
		M	12	2,22 \pm 0,99	
	B	K	8	2,71 \pm 1,85	0,481
		M	9	3,62 \pm 2,56	
	C	K	32	5,66 \pm 9,51	0,479
		M	53	6,47 \pm 10,45	
A+B+C	K	56	4,85 \pm 7,67	0,586	
	M	74	5,39 \pm 8,98		
Estradiol w surowicy (pg/ml)	A	K	19	58,26 \pm 44,88	0,126
		M	18	32,50 \pm 12,10	
	B	K	8	123,50 \pm 117,18	0,146
		M	10	36,30 \pm 7,93	
	C	K	36	71,67 \pm 76,40	0,991
		M	58	41,78 \pm 12,45	
A+B+C	K	63	74,21 \pm 76,33	0,161	
	M	86	39,20 \pm 12,45		

cd. tabeli 5.

Cecha statystyczna	Podgrupa	Płeć	n	Średnia ± SD	p
AFP (ng/ml)	A	K	19	5,57 ± 8,35	0,461
		M	18	4,45 ± 2,75	
	B	K	8	5,88 ± 3,39	0,888
		M	9	12,05 ± 20,80	
	C	K	36	24,24 ± 62,56	0,218
		M	56	21,04 ± 65,54	
A+B+C	K	63	16,28 ± 48,13	0,687	
	M	83	16,46 ± 54,52		
HCV RNA (IU/ml)	A	K	19	417262,63 ± 781658,56	0,499
		M	18	1578175,00 ± 5001906,84	
	B	K	8	420420,00 ± 565400,46	0,515
		M	10	845679,00 ± 1711080,82	
	C	K	35	1836897,06 ± 3991066,43	0,548
		M	55	1093857,09 ± 2271394,83	
	A+B+C	K	62	1219076,56 ± 3098084,94	0,939
		M	83	1168988,92 ± 2993168,27	

Objaśnienia: n – liczba osób w danej podgrupie; SD – odchylenie standardowe; p – poziom istotności.

4.2. Ocena nasilenia zmian zapalnych (*grading*) i stopnia zaawansowania włóknienia (*staging*) w skali numerycznej

W grupie badanej (A+B+C) w ocenie histopatologicznej u 88,98% (105/118) pacjentów dominowała minimalna i łagodna aktywność zapalna (*grading* 1 i 2). Umiarkowaną aktywność zapalną stwierdzono tylko w 11,02% (13/118) badanych biopunktatów.

Stopień zaawansowania włóknienia w skali numerycznej najczęściej oceniano jako 1. To minimalne włóknienie (*staging* 1) dotyczyło 60,17% (71/118) pacjentów. Łagodne włóknienie (*staging* 2) stwierdzono u 24,58% (29/118). W badanej grupie stosunkowo rzadko opisywano zaawansowane włóknienie (*staging* 3 i 4), gdyż tylko w 11,86% (14/118) przypadków. U pojedynczych pacjentów (4/118) nie stwierdzono widocznych morfologicznie wykładników włóknienia w wątrobie. Szczegółową analizę opisywanych zmian histopatologicznych w biopunktach wątroby z podziałem na poszczególne podgrupy przedstawiono w tabeli 6.

W podgrupie C u 18/95 (19%) pacjentów rozpoznano klinicznie marskość wątroby, co stanowiło ponad połowę grupy pacjentów, w której nie wykonano biopsji wątroby.

Ogółem liczba pacjentów z marskością wątroby w przeprowadzonych badaniach wynosiła 24, co stanowi 16% całej grupy badanej.

Stłuszczenie hepatocytów w biopunktatach wątroby nie było częstym zjawiskiem. Obserwowano je tylko u 1/3 chorych (39/118), przy czym u 70% (27/39) było to stłuszczenie oceniane na 1 punkt w skali numerycznej (<30% hepatocytów) (Tabela 6).

Tabela 6. Liczba pacjentów poszczególnych podgrup z przewlekłym zakażeniem HCV demonstrująca określony stopień nasilenia zmian zapalnych (*grading*), zaawansowania włóknienia (*staging*) oraz stłuszczenia wątroby

Podgrupa	n	Grading			
		0	1	2	3
A	37	0	16	18	3
B	18	0	8	4	6
C	63	0	19	40	4
A+B+C	118	0	43	62	13

		Staging				
		0	1	2	3	4
A	37	1	22	10	3	1
B	18	0	10	1	3	4
C	63	3	39	18	2	1
A+B+C	118	4	71	29	8	6

		Stłuszczenie		
		0	1	2
A	37	23	10	4
B	18	6	8	4
C	63	50	9	4
A+B+C	118	79	27	12

Objaśnienia: *grading* (0–3 pkt), *staging* (0–4 pkt) oraz *stłuszczenie wątroby* (0–2 pkt) przedstawiono w półilościowych skalach numerycznych (p. Materiał i metody).

4.3. Surowicze stężenia badanych składników z rodziny IGF

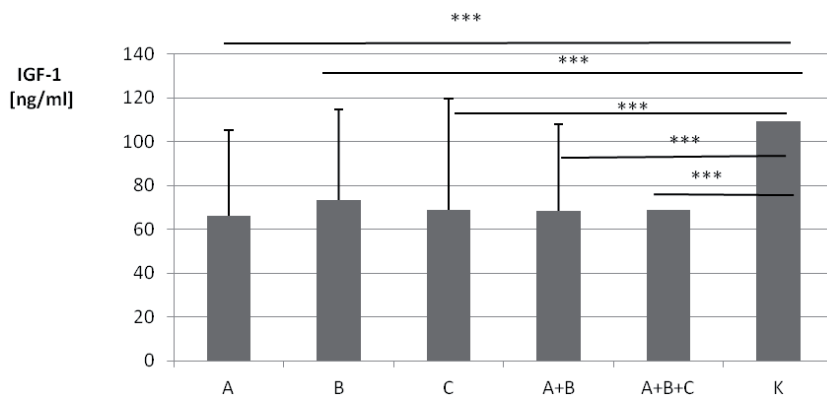
IGF-1

Wartości oznaczonych surowiczych stężeń IGF-1 w całej grupie pacjentów przewlekle zakażonych HCV (A+B+C) były obniżone w stosunku do kontroli (A+B+C vs. K odpowiednio $68,68 \pm 46,62$ ng/ml vs. $109,45 \pm 47,06$ ng/ml; $p < 0,001$). Znaczącą różnicę stężeń stwierdzono pomiędzy wszystkimi podgrupami chorych a kontrolą (Tabela 7, Rycina 6).

Najwyższe średnie stężenie IGF-1 zanotowano w grupie B. Nie stwierdzono istotnych różnic w stężeniach IGF-1 pomiędzy pacjentami badanych podgrup z WZW typu C (Rycina 6).

Istotną różnicę stężeń IGF-1 w zależności od płci zaobserwowano tylko w podgrupie A. Wyższe stężenia IGF-1 obserwowano u kobiet w porównaniu z mężczyznami ($p < 0,05$). Nie stwierdzono takich różnic w pozostałych podgrupach (B i C), jak również w całym badanym materiale (A+B+C) (Tabela 8).

Istotnie niższe stężenie IGF-1 ($66,32 \pm 44,97$ ng/ml, liczba pacjentów $n = 127$) uzyskano u pacjentów z genotypem 1 w porównaniu z grupą chorych z genotypem 4a/4c/4d ($93,36 \pm 46,95$ ng/ml; $n = 14$) ($p < 0,05$). W obrębie pacjentów zakażonych genotypem 1 istotnie wyższe stężenie IGF-1 zanotowa-



Rycina 6. Surowicze stężenia IGF-1 (średnia \pm SD) w badanych podgrupach chorych z przewlekłym zakażeniem HCV i w kontroli; *** – $p < 0,001$.

Tabela 7. Porównanie surowiczych stężeń IGF-1 (średnia \pm SD) u pacjentów z przewlekłym zakażeniem HCV w poszczególnych podgrupach i w kontroli

Podgrupa	IGF-1 (ng/ml)				p
	Grupa badana		Grupa kontrolna		
	n	Średnia \pm SD	n	Średnia \pm SD	
A	37	66,18 \pm 38,99	30	109,45 \pm 47,06	< 0,001
B	18	73,46 \pm 41,05			0,013
A+B	55	68,56 \pm 39,44			< 0,001
C	87	68,75 \pm 50,85			< 0,001
A+B+C	142	68,68 \pm 46,62			< 0,001

Objaśnienia: n – liczba osób w danej podgrupie; SD – odchylenie standardowe; p – poziom istotności.

Tabela 8. Surowicze stężenie IGF-1 (średnia \pm SD) w zależności od płci u chorych z przewlekłym zakażeniem HCV i w kontroli

	Podgrupa badana	Kobiety		Mężczyźni		p
		n	Średnia \pm SD	n	Średnia \pm SD	
IGF-1 (ng/ml)	A	19	80,85 \pm 42,02	18	50,7 \pm 29,21	0,022
	B	8	75,46 \pm 29,61	10	71,86 \pm 49,95	0,696
	C	35	66,33 \pm 39,82	52	70,37 \pm 57,42	0,664
	A+B+C	62	71,96 \pm 39,37	80	66,13 \pm 51,64	0,113
	K	6	111,27 \pm 24,43	24	108,99 \pm 51,59	0,402

Objaśnienia: n – liczba osób w danej podgrupie; SD – odchylenie standardowe; p – poziom istotności.

no u pacjentów zakażonych genotypem 1a lub mieszanym 1a+1b (n = 10) niż u zakażonych genotypem 1b (n = 117) ($74,95 \pm 22,00$ ng/ml vs. $65,59 \pm 47,45$ ng/ml, $p < 0,05$).

8 pacjentów z podgrupy C, u których stężenie IGF-1 wynosiło <12 ng/ml, zmarło w ciągu około roku od czasu zebrania materiału w obrazie dekomensacji marskości wątroby czy choroby nowotworowej (zmiany ogniskowe w wątrobie bez i/lub z potwierdzonym HCC) (pacjenci nr 57, 87, 89, 92, 103, 126, 148, 149).

IGF-1R

Uzyskane wyniki surowiczych stężeń receptora typu I IGF-1 (IGF-1R) w grupie pacjentów z przewlekłym zakażeniem HCV nie różniły się zarówno w poszczególnych podgrupach (A, B, C) jak i w całej grupie (A+B+C) w stosunku do kontroli (Tabela 9).

Tabela 9. Surowicze stężenia IGF-1R (średnia \pm SD) u pacjentów z przewlekłym zakażeniem HCV w poszczególnych podgrupach i ich porównanie z kontrolą

Podgrupa	IGF-1R (pg/ml)				p
	Grupa badana		Grupa kontrolna		
	n		n		
A	37	$5044,38 \pm 3686,22$	30	$5299,11 \pm 3455,29$	0,356
B	17	$5205,20 \pm 4555,15$			0,307
C	88	$5220,56 \pm 3689,42$			0,866
A+B+C	142	$5172,81 \pm 3772,07$			0,553

Objaśnienia: n – liczba osób w danej podgrupie; SD – odchylenie standardowe; p – poziom istotności.

Nie stwierdzono także różnic w stężeniach IGF-1R u wszystkich chorych zakażonych HCV w zależności od płci (Tabela 10).

Tabela 10. Surowicze stężenie IGF-1R (średnia \pm SD) w zależności od płci u chorych z przewlekłym zakażeniem HCV i w kontroli

	Podgrupa badana	Kobiety		Mężczyźni		p
		n		n		
IGF-1R (pg/ml)	A	19	$5033,22 \pm 4017,16$	18	$5056,14 \pm 3418,76$	0,799
	B	7	$3270,9 \pm 1057,32$	10	$6559,22 \pm 5585,28$	0,193
	C	37	$4209,11 \pm 2356,13$	51	$5954,35 \pm 4287,34$	0,108
	A+B+C	63	$4353,41 \pm 2881,49$	79	$5826,26 \pm 4259,83$	0,071
	K	6	$6210,47 \pm 4355,67$	24	$5071,26 \pm 3264,66$	0,527

Objaśnienia: n – liczba osób w danej podgrupie; SD – odchylenie standardowe; p – poziom istotności.

IGFBP-3

Niższe stężenie IGFBP-3 u chorych zakażonych HCV w stosunku do kontroli zanotowano w podgrupach B i C (B vs. K, $812,47 \pm 108,61$ ng/ml vs. $913,48 \pm 94,97$ ng/ml, $p < 0,05$ oraz C vs. K $836,78 \pm 65,54$ ng/ml vs. $913,48 \pm 94,97$ ng/ml, $p < 0,05$). W podgrupie A oraz łącznie u wszystkich badanych chorych takiego obniżenia nie zanotowano (Tabela 11).

Tabela 11. Surowicze stężenia IGFBP-3 (średnia \pm SD) u pacjentów z przewlekłym zakażeniem HCV w poszczególnych podgrupach i ich porównanie z kontrolą

Podgrupa	IGFBP-3 (ng/ml)				p
	Grupa badana		Grupa kontrolna		
	n		n		
A	37	$919,72 \pm 120,61$	15	$913,48 \pm 94,97$	0,842
B	18	$812,47 \pm 108,61$			0,012
C	16	$836,78 \pm 65,54$			0,027
A+B+C	71	$873,84 \pm 116,88$			0,128

Objaśnienia: n – liczba osób w danej podgrupie; SD – odchylenie standardowe; p – poziom istotności.

Znamiennie wyższe stężenia IGFBP-3 zanotowano u mężczyzn jedynie w grupie kontrolnej ($p = 0,012$) (Tabela 12).

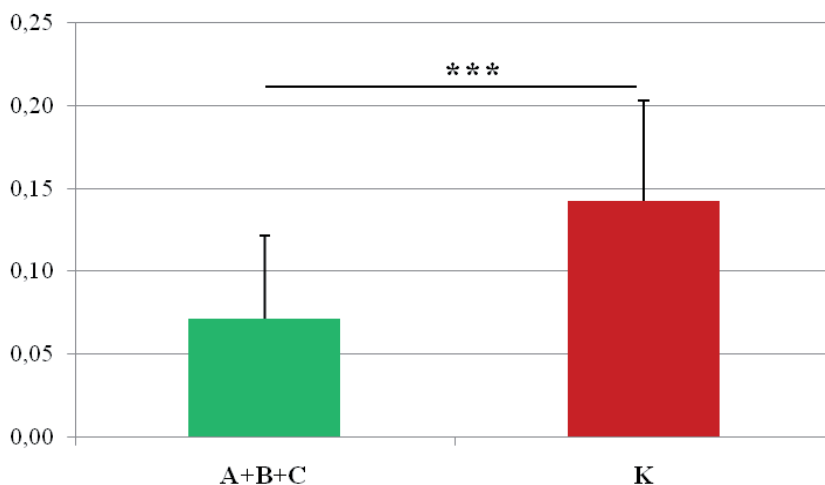
Tabela 12. Surowicze stężenie IGFBP-3 (średnia \pm SD) w zależności od płci u chorych z przewlekłym zakażeniem HCV i w kontroli

Parametr	Podgrupa badana	Kobiety		Mężczyźni		p
		n		n		
IGFBP-3 (ng/ml)	A	19	$919,97 \pm 134,62$	18	$920,35 \pm 107,78$	0,916
	B	8	$845,62 \pm 102,25$	10	$785,95 \pm 111,31$	0,237
	C	6	$835,15 \pm 46,08$	10	$837,77 \pm 77,32$	0,635
	A+B+C	33	$886,04 \pm 119,82$	38	$863,25 \pm 114,81$	0,547
	K	6	$844,74 \pm 82,60$	9	$959,31 \pm 74,93$	0,012

Objaśnienia: n – liczba osób w danej podgrupie; SD – odchylenie standardowe; p – poziom istotności.

Surowiczy wskaźnik IGF-1/IGFBP-3

U pacjentów z przewlekłym zapaleniem wątroby typu C (podgrupa A, B, C, A+B) oraz całej badanej grupy (A+B+C) stwierdzono niższą wartość surowiczego wskaźnika IGF-1/IGFBP-3 w stosunku do kontroli (A+B+C vs. K, $0,07 \pm 0,05$ vs. $0,14 \pm 0,06$; $p < 0,001$) (Rycina 7).



Rycina 7. Surowiczy wskaźnik IGF-1/IGFBP-3 u pacjentów z przewlekłym zakażeniem HCV i w grupie kontrolnej; *** – $p < 0,001$.

IGFBP-6

Stężenie IGFBP-6 u chorych z przewlekłym zakażeniem HCV nie różniło się zarówno pomiędzy całą grupą jak i poszczególnymi badanymi podgrupami a kontrolą (Tabela 13).

Różnice stężeń zależne od płci stwierdzono w podgrupach A i C oraz w grupie A+B+C. W tych wszystkich podgrupach stężenie IGFBP-6 było wyższe u mężczyzn niż u kobiet (Tabela 14).

Porównując stężenia obu badanych białek osi IGF (IGF-1 i IGFBP-3) wykazano istotnie wyższe stężenia IGFBP-3 w porównaniu z IGF-1 we wszystkich badanych podgrupach pacjentów z WZW typu C oraz w grupie kontrolnej (Tabela 15).

Tabela 13. Porównanie surowiczych stężeń IGFBP-6 (średnia \pm SD) u pacjentów z przewlekłym zakażeniem HCV w poszczególnych podgrupach i ich porównanie z kontrolą

Podgrupa	IGFBP-6 (pg/ml)				p
	Grupa badana		Grupa kontrolna		
	n	średnia \pm SD	n	średnia \pm SD	
A	37	1007,32 \pm 206,83	30	1063,79 \pm 433,22	0,9693
B	17	1079,23 \pm 364,14			0,8571
C	81	1112,06 \pm 327,52			0,2366
A+B+C	135	1079,22 \pm 305,69			0,4657

Objaśnienia: n – liczba osób w danej podgrupie; SD – odchylenie standardowe; p – poziom istotności.

Tabela 14. Surowicze stężenia IGFBP-6 (średnia \pm SD) w zależności od płci u chorych z przewlekłym zakażeniem HCV i w kontroli

Parametr	Podgrupa badana	Kobiety		Mężczyźni		p
		n		n		
IGFBP-6 (pg/ml)	A	19	920,85 \pm 180,76	18	1098,59 \pm 197,03	0,006
	B	7	947,81 \pm 233,47	10	1171,22 \pm 420,19	0,088
	C	32	983,88 \pm 329,92	49	1195,77 \pm 300,63	0,002
	A+B+C	58	958,88 \pm 275,87	77	1168,30 \pm 297,16	< 0,001
	K	6	896,32 \pm 259,19	23	1107,48 \pm 462,55	0,212

Objaśnienia: n – liczba osób w danej podgrupie; SD – odchylenie standardowe; p – poziom istotności.

Tabela 15. Różnice pomiędzy surowiczymi stężeniami IGF-1 a IGFBP-3 u chorych przewlekle zakażonych HCV i w kontroli

Podgrupa badana	n	IGF-1 (ng/ml)	IGFBP-3 (ng/ml)	p
A	37	66,18 \pm 38,99	919,72 \pm 120,61	< 0,001
B	18	73,46 \pm 41,05	812,47 \pm 108,61	< 0,001
C	16	68,75 \pm 50,85	836,78 \pm 65,54	< 0,001
A+B+C	71	68,68 \pm 46,62	873,84 \pm 116,88	< 0,001
Kontrola	15	109,45 \pm 47,06	913,48 \pm 94,97	< 0,001

Objaśnienia: n – liczba pacjentów w podgrupie; p – poziom istotności.

4.4. Ekspresja tkankowa białek z rodziny IGF

IGF-1

Immunocytochemiczna analiza ekspresji IGF-1 w wątrobie pacjentów z zakażeniem HCV dotyczyła w sumie 52 pacjentów (podgrupa A i B), 10 fragmentów wątroby kontrolnej oraz 61 pierwotnych guzów wątroby (HCC). W przypadku grupy kontrolnej oraz HCC wykrywalność IGF-1 w wątrobie wynosiła 100%. Fragmenty kontrolnej wątroby cechowały się z reguły intensywną reakcją immunocytochemiczną na IGF-1, obejmującą większość komórek wątrobowych w zraziku narządu. Przeważała cytoplazmatyczna lokalizacja białka w hepatocytach (Fotografia 1A).

U pacjentów z WZW typu C komórkową ekspresję tego białka wykazano u wszystkich, z wyjątkiem jednego chorego (98% częstość występowania). Przeważał homogeny wzór ekspresji tego białka. Komórkowa lokalizacja IGF-1 dotyczyła przede wszystkim cytoplazmy hepatocytów oraz cholangiocytów (Fotografia 1B i C), ale białko to wykazywały także pojedyncze komórki nacieków zapalnych (głównie limfocyty) w przestrzeniach wrotnych (Fotografia 1B). Intensywność reakcji oraz odsetek komórek immunopozytywnych w miąższu wątroby były zróżnicowane w zależności od pacjenta z zakażeniem HCV. Pozytywna re-

akcja dotyczyła również hepatocytów z cechami stłuszczenia (Fotografia 1D). Nie obserwowano reakcji jądrowej na to białko. Obecność cytoplazmatycznej ekspresji IGF-1 potwierdzono również na hodowanych komórkach płodowej wątroby (WRL68) oraz w komórkach ludzkiego pierwotnego raka wątroby (HepG2), co uwidoczniło na obrazach z mikroskopu fluorescencyjnego (Fotografia 1E).

W materiale tkankowym HCC ekspresja IGF-1 była wyjątkowo zróżnicowana pod względem intensywności reakcji immunocytochemicznej – od pojedynczych komórek o słabym nasileniu, do intensywnie zabarwionych neoplastycznych komórek wątroby. Produkt reakcji dominował w cytoplazmie. Rozmieszczony był równomiernie wokół patologicznie zmienionych jąder komórkowych (Fotografia 1F). Obecność jądrowej ekspresji IGF-1 obserwowano w nielicznych komórkach HCC i u pojedynczych chorych.

Analiza ilościowa z zastosowaniem techniki wizualizacji przestrzennej wykazała najwyższą ekspresję IGF-1 w kontroli tkankowej, stopniowo niższą w guzach wątroby (HCC), kolejno w podgrupie B oraz A (Tabela 16, Rycina 8).

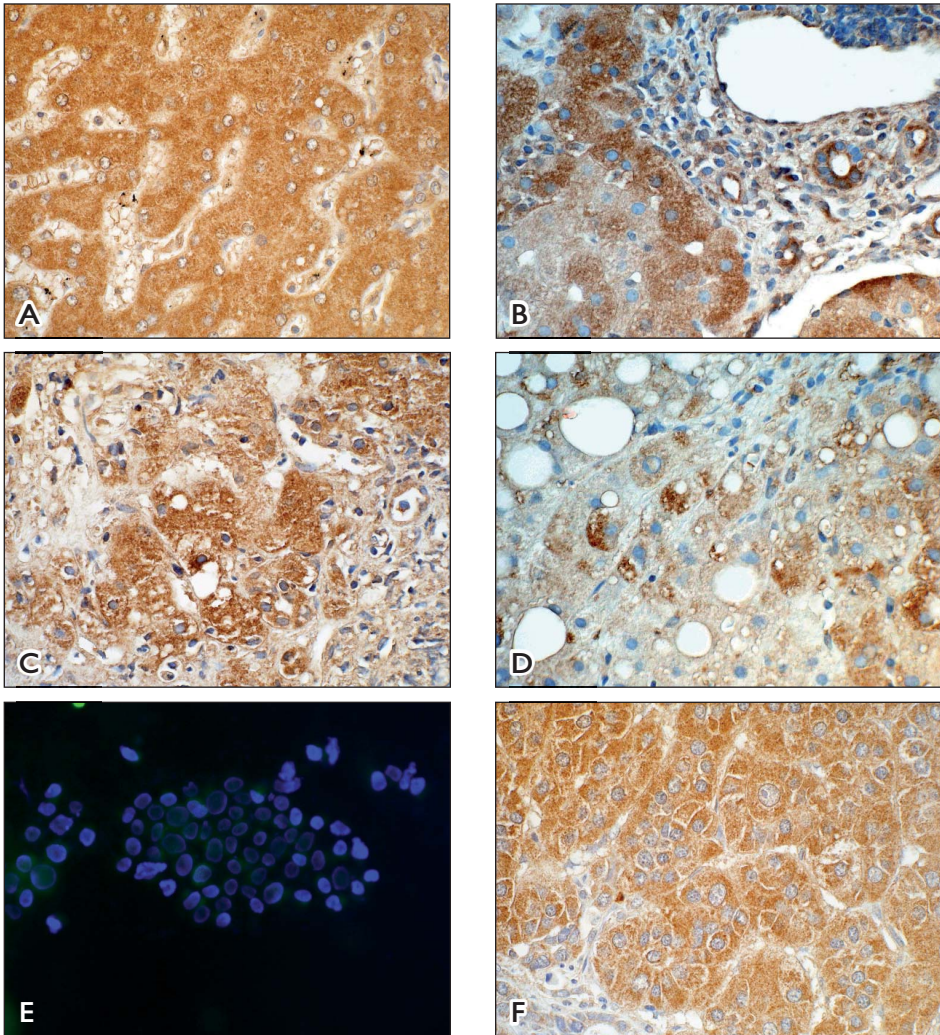
Tabela 16. Porównanie tkankowej ekspresji badanych białek: IGF-1, IGF-1R i IGFBP-3 (% reakcji na pole miąższu wątroby) u chorych z przewlekłym zakażeniem HCV, w guzach wątroby (HCC) oraz w kontroli tkankowej

	Podgrupa badana	n	Średnia	Mediana	Min.	Maks.	SD
IGF-1	A	34	19,81	8,92	0,00	77,23	21,60
	B	18	26,74	22,91	0,060	70,51	22,04
	A+B	52	22,21	14,45	0,00	77,23	21,79
	HCC	61	31,80	31,05	8,98	68,67	14,25
	Kontrola tkankowa	10	40,81	44,90	2,34	62,54	18,53
IGF-1R	A	31	9,86	1,65	0,06	50,03	15,55
	HCC	60	11,22	4,30	0,00	90,21	19,66
	Kontrola tkankowa	8	16,89	5,48	0,48	55,70	21,53
IGFBP-3	A	34	15,10	8,88	0,00	54,18	17,54
	HCC	60	1,78	0,00	0,00	36,95	6,16
	Kontrola tkankowa	11	3,78	0,82	0,00	24,06	7,40

Objaśnienia: min. – wartość minimalna; maks. – wartość maksymalna; SD – odchylenie standardowe.

Jak pokazano graficznie na rycinie 8, ekspresja IGF-1 w podgrupie A oraz w podgrupie A+B była znamienne obniżona w porównaniu z kontrolą ($p = 0,022$; $p = 0,015$, odpowiednio). Podobnie niższą ekspresję IGF-1 obserwowano w komórkach HCC w porównaniu z kontrolą ($p = 0,053$, na granicy istotności).

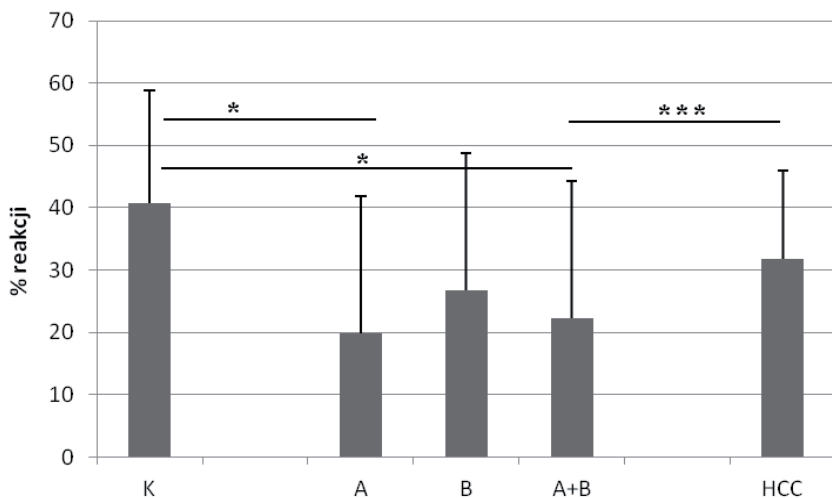
W obrębie wszystkich badanych grup nie stwierdzono różnic w ekspresji IGF-1 w zależności od płci (Tabela 17).



Fotografia 1. Immunocytochemiczna lokalizacja IGF-1. Cytoplazmatyczna ekspresja obecna we wszystkich hepatocytach wątroby kontrolnej (A). Rozsiana, głównie cytoplazmatyczna ekspresja tego białka u pacjentów z przewlekłym zakażeniem HCV: lokalizacja w hepatocytach (B-D); w nabłonku przewodów żółciowych międzyzrądkowych (B); w pojedynczych komórkach nacieków zapalnych (B, C). Słabiej nasiloną reakcją immunocytochemiczną w obrębie hepatocytów ze stłuszczeniem (D). Ekspresja IGF-1 (kolor zielony) w cytoplazmie komórek hodowanych pierwotnego raka wątroby HepG2 (E) oraz u pacjenta z HCC (F).

A – wątroba kontrolna z panelu tkankowego (pacjent W11, nr 191); B – pacjent P49 (nr 49); C – pacjent P44 (nr 44); D – pacjent P42 (nr 42); E – komórki hodowane HepG2; F – pierwotny rak wątroby (pacjent M13, nr 209).

Technika ABC. Podbarwienie hematoksyliną. Optyka Nomarskiego. Pow. obiektywu x 40 (A-D, F). Technika immunofluorescencyjna. Barwienie FITC; jądra komórkowe podbarwione DAPI. Pow. obiektywu x 20 (E).



Rycina 8. Tkankowa ekspresja IGF-1 u pacjentów z WZW typu C (podgrupa A, B, A+B), w kontroli tkankowej (K) i w pierwotnym raku wątroby (HCC); * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$. p testu pomiędzy K i HCC – 0,053 (na granicy istotności).

Tabela 17. Ekspresja tkankowa białek IGF-1, IGF-1R i IGFBP-3 wyrażona w % reakcji na pole mięszu wątroby (średnia \pm SD) u chorych z przewlekłym zakażeniem HCV, w guzach wątroby oraz kontroli tkankowej w zależności od płci

	Podgrupa badana	Kobiety		Mężczyźni		p
		n		n		
IGF-1	A	17	17,43 \pm 23,90	17	22,18 \pm 19,47	0,140
	B	8	30,63 \pm 28,25	10	23,64 \pm 16,51	0,762
	HCC	13	28,17 \pm 13,92	48	32,78 \pm	0,252
	Kontrola tkankowa	5	39,92 \pm 15,16	5	41,69 \pm 23,25	_*
IGF-1R	A	16	8,89 \pm 14,53	15	10,89 \pm 17,02	0,922
	HCC	12	9,12 \pm 11,24	48	11,75 \pm 21,31	0,749
	Kontrola tkankowa	4	17,00 \pm 20,08	4	16,78 \pm 26,05	_*
IGFBP-3	A	18	18,88 \pm 18,15	16	10,85 \pm 16,34	0,135
	HCC	13	1,53 \pm 3,25	47	1,85 \pm 6,78	0,424
	Kontrola tkankowa	6	0,61 \pm 0,75	5	7,60 \pm 10,14	_*

Objaśnienia: n – liczba osób; SD – odchylenie standardowe; *_* – za małą liczebność jednej z porównywanych podgrup do wnioskowania statystycznego.

IGF-1R

Immunocytochemiczna analiza ekspresji IGF-1R w wątrobie pacjentów z zakażeniem HCV dotyczyła w sumie 31 pacjentów (podgrupa A). Zbadano tę ekspresję także w 8 fragmentach wątroby kontrolnej oraz w 60 pierwotnych guzach wątro-

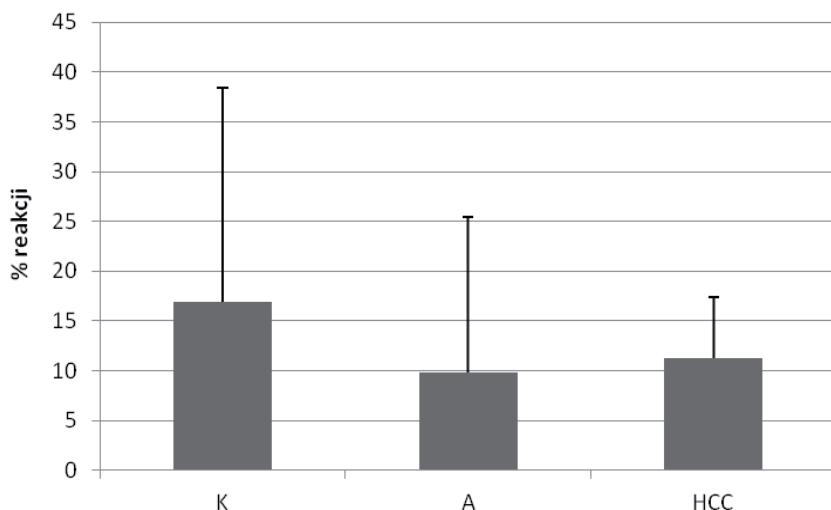
by (HCC). Zarówno w grupie kontrolnej, jak i u pacjentów z przewlekłym zakażeniem HCV, ekspresję receptora typu I IGF-1 w wątrobie wykazano u wszystkich pacjentów (100% częstość występowania). Obecność tego przedstawiciela rodziny IGF w HCC wykazano u 59/60 pacjentów (98% chorych).

We fragmentach wątroby kontrolnej ekspresja IGF-1R widoczna była głównie w cytoplazmie i błonach komórkowych hepatocytów i cholangiocytów (Fotografia 2A). Przeważała reakcja homogenna, rozsiana, zróżnicowana pod względem intensywności i liczby immunopozytywnych komórek w zależności od pacjenta.

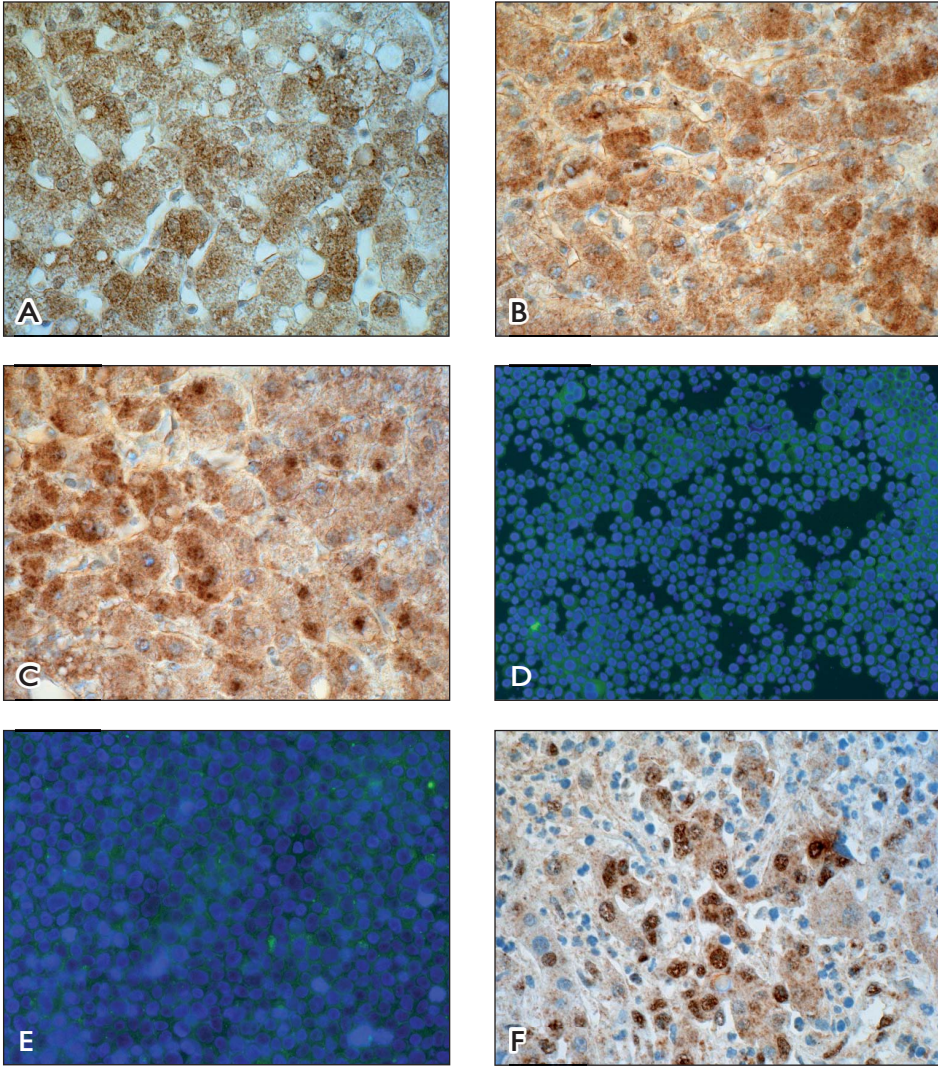
U pacjentów z WZW typu C komórkowa lokalizacja IGF-1R dotyczyła zarówno cytoplazmy, jak i błon komórkowych hepatocytów (Fotografia 2B), a jąder komórkowych jedynie u nielicznych pacjentów (Fotografia 2C). Intensywność reakcji oraz odsetek komórek immunopozytywnych w miąższu wątroby, podobnie jak w przypadku IGF-1, były bardzo zróżnicowane w zależności od pacjenta z zakażeniem HCV. Cytoplazmatyczno-błonową ekspresję IGF-1R wykazano także w hodowanych komórkach płodowej wątroby (WRL68), jak i pierwotnego raka wątroby (HepG2) na poziomie mikroskopu fluorescencyjnego (Fotografia 2D i E).

W komórkach HCC ekspresja IGF-1R dotyczyła cytoplazmy i jąder zmienionych nowotworowo komórek miąższu wątroby (Fotografia 2F).

Ilościowa analiza komórkowej ekspresji IGF-1R wykazała niższą średnią wartość ekspresji w podgrupie badanej A zarówno w stosunku do kontroli, jak i HCC, jednakże nie były to różnice statystycznie istotne (Rycina 9). Nie stwierdzono także istotnych różnic w zależności od płci (Tabela 17).



Rycina 9. Tkankowa ekspresja IGF-1R w wątrobie kontrolnej (K), u chorych z przewlekłym zakażeniem HCV (podgrupa A) oraz w pierwotnym raku wątroby (HCC).



Fotografia 2. Immunocytochemiczna lokalizacja IGF-1R. Cytoplazmatyczna i błonowa lokalizacja tego białka w wątrobie kontrolnej (A) oraz u pacjentów z przewlekłym zakażeniem HCV (B, C). Pozytywna ekspresja dotyczyła cytoplazmy, błon komórkowych (B) i pojedynczych jąder hepatocytów (C). Cytoplazmatyczno-błonowa lokalizacja w komórkach hodowanej wątroby płodowej WRL68 (D), pierwotnego raka wątroby HepG2 (kolor zielony) (E) oraz jądrowo-cytoplazmatyczna u pacjenta z HCC (F).

A – wątroba kontrolna z archiwalnego materiału tkankowego (pacjent W16 nr169); B – pacjent P25 (nr 25); C – pacjent P27 (nr 27); D – komórki hodowane wątroby płodowej WRL68; E – komórki hodowane HepG2; F – pierwotny rak wątroby (pacjent M51 nr 247).

Technika ABC-ImmunoMax. Podbarwienie hematoksyliną. Optyka Nomarskiego. Pow. obiektywu x40 (A-C, F). Technika immunofluorescencyjna. Barwienie FITC; jądra komórkowe podbarwione DAPI. Pow. obiektywu x20 (D, E).

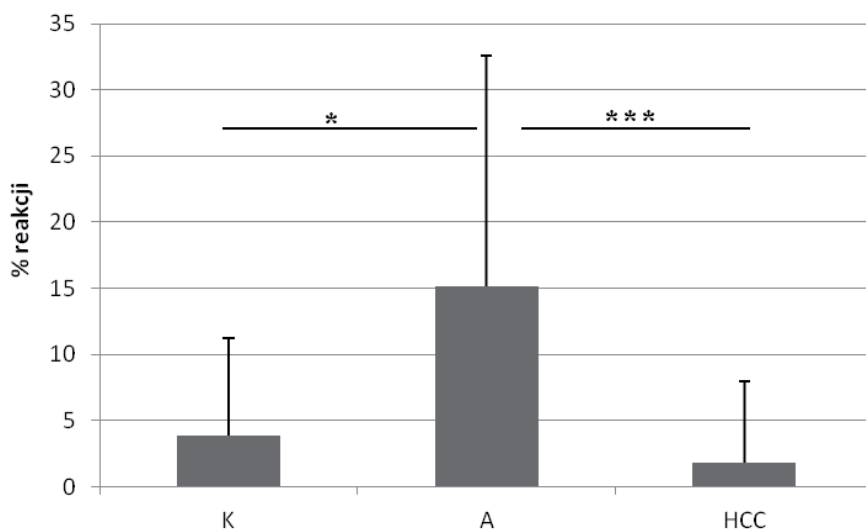
IGFBP-3

We fragmentach wątroby, analizowanych immunocytochemicznie pod kątem ekspresji IGFBP-3, białko to wykryto u 33/34 (97%) pacjentów zakażonych HCV, 8/11 pacjentów kontrolnych (73%) oraz jedynie u 31/60 (52%) pacjentów z HCC.

Biorąc pod uwagę lokalizację komórkową tego białka, ekspresja ta różniła się pomiędzy grupami. W wątrobie kontrolnej dominowała ekspresja w komórkach zatok wątrobowych (komórki Browicza-Kupffera) (Fotografia 3A), w HCV zakażonej wątrobie oprócz immunopozytywnych komórek zatok wątrobowych, ekspresję IGFBP-3 obserwowano również w cytoplazmie hepatocytów (Fotografia 3B i C). U niektórych pacjentów silniejszą ekspresję IGFBP-3 notowano na jednym z biegunów hepatocyta i w okolicy okołojądrowej (Fotografia 3D).

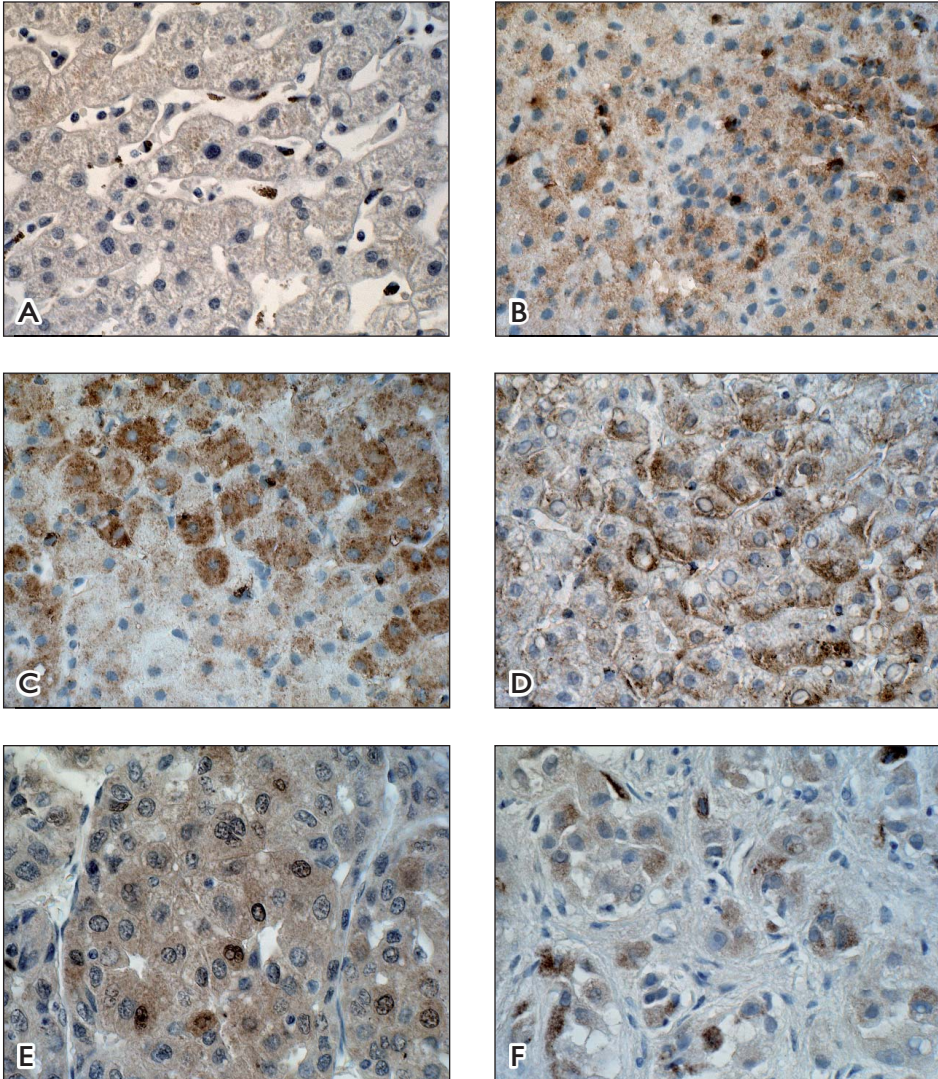
W komórkach HCC dominowała cytoplazmatyczna lokalizacja IGFBP-3, choć białko to uwidoczniono również w pojedynczych jądrach komórkowych (Fotografia 3E i F).

Analiza ilościowa ekspresji IGFBP-3 wykazała istotną różnicę w ekspresji tego białka pomiędzy pacjentami zakażonymi HCV a kontrolą tkankową, a także pomiędzy pacjentami zakażonymi HCV a guzami wątroby. Największą ekspresję tkankową IGFBP-3 wykazano w wątrobie pacjentów z WZW typu C (Rycina 10).



Rycina 10. Tkankowa ekspresja IGFBP-3 w kontroli tkankowej (K), u chorych z przewlekłym zakażeniem HCV (podgrupa A) oraz w pierwotnym raku wątroby (HCC); * – $p < 0,05$; *** – $p < 0,001$.

W żadnej z badanych podgrup z zakażeniem HCV nie stwierdzono różnic w ekspresji IGFBP-3 w zależności od płci (Tabela 17).



Fotografia 3. Immunocytochemiczna lokalizacja IGFBP-3. Ekspresja białka w komórkach zatok wątrobowych w wątrobie kontrolnej (A) oraz u pacjentów z przewlekłym zakażeniem HCV (B-D). U pacjentów z zakażeniem HCV obserwowano głównie cytoplazmatyczną ekspresję białka w komórkach zatok wątrobowych (B) i hepatocytach (B-D). Niekiedy intensywniejsza reakcja obecna była na jednym biegunie komórki wątrobowej (D).

Cytoplazmatyczna oraz jądrowa lokalizacja IGFBP-3 w komórkach neoplastycznych HCC (E, F). A – wątroba kontrolna z archiwalnego materiału tkankowego (pacjent W1 nr 181); B – pacjent P30 (nr 30); C – pacjent P32 (nr 32); D – pacjent P10 (nr 10); E – archiwalny materiał tkankowy z HCC (pacjent O4 nr 257); F – archiwalny materiał tkankowy z HCC (pacjent O3 nr 256).

Technika ABC-ImmunoMax. Podbarwienie hematoksyliną. Optyka Nomarskiego. Pow. obiektywu x40 (A-F).

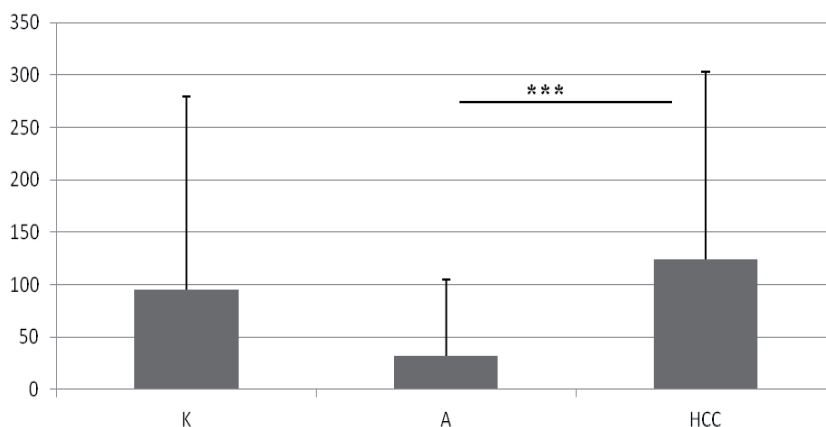
Tkankowy wskaźnik IGF-1/IGFBP-3

W wątrobie pacjentów z WZW typu C (podgrupa A), HCC oraz kontroli tkankowej obliczono również wątrobowy wskaźnik IGF-1/IGFBP-3 (Tabela 18). Znamienne niższy wątrobowy wskaźnik wykazano u pacjentów podgrupy A, ale jedynie w porównaniu do wartości tkankowego indeksu uzyskanego w HCC (Rycina 11). Wykazano również istotnie wyższy tkankowy ($32,20 \pm 73,00$) w porównaniu z surowiczym ($0,07 \pm 0,04$) wskaźnik IGF-1/IGFBP-3 ($p < 0,001$) w podgrupie A.

Tabela 18. Wartości wątrobowego wskaźnika IGF-1/IGFBP-3 u chorych z przewlekłym zakażeniem HCV, HCC i kontroli tkankowej

Podgrupa	n	Średnia	Min.	Maks.	SD
A	32	32,20	0,00	313,00	73,00
HCC	28	124,20	1,02	853,76	179,24
Kontrola tkankowa	6	95,92	0,10	472,86	185,52

Objaśnienia: n – liczba osób, SD – odchylenie standardowe.



Rycina 11. Wątrobowy wskaźnik IGF-1/IGFBP-3 w badanych podgrupach pacjentów; *** – $p < 0,001$.

4.5. Analiza porównawcza ekspresji białek systemu IGF w wątrobie pacjentów zakażonych HCV i w kontroli

U chorych przewlekle zakażonych HCV, porównując ekspresję tkankową (wyrażoną w % reakcji) wszystkich trzech białek z rodziny IGF (IGF-1, IGFBP-3 i IGF-1R) wykazano istotnie większą ekspresję IGF-1 w porównaniu z ekspresją IGF-1R, jednak bez istotnych różnic w porównaniu z IGFBP-3. Podobnie w kontroli tkankowej wykazano większą ekspresję IGF-1 niż IGF-1R, choć w tej grupie ekspresja IGF-1 była również istotnie wyższa niż IGFBP-3 (Tabela 19).

Tabela 19. Analiza porównawcza tkankowej ekspresji IGF-1, IGFBP-3 i IGF-1R (średni % reakcji ± SD) u chorych przewlekle zakażonych HCV i w kontroli

Podgrupa badana	IGF-1		IGFBP-3		p1	IGF-1R		p2
	n		n			n		
A	34	19,81 ± 21,60	34	15,0 ± 17,54	0,256	31	9,89 ± 15,55	0,028
Kontrola	10	40,81 ± 18,53	11	3,78 ± 7,40	0,015	8	16,89 ± 21,53	0,028

Objaśnienia: n – liczba osób; SD – odchylenie standardowe; p1 – poziom istotności pomiędzy IGF-1 i IGFBP-3; p2 – poziom istotności pomiędzy IGF-1 i IGF-1R.

W podgrupie A, w której zbadano ekspresję tkankową wszystkich trzech białek IGF (IGF-1, IGFBP-3 oraz IGF-1R) nie wykazano znamienych różnic w ekspresji białek w różnie zaawansowanych zmianach histopatologicznych (*grading* i *staging*) (Tabela 20).

Tabela 20. Porównanie tkankowej ekspresji składników rodziny IGF (IGF-1, IGF-1R, IGFBP-3) (średni % reakcji ± SD) w zależności od nasilenia zmian zapalnych (*grading*) i stopnia zaawansowania włóknienia (*staging*) u chorych z przewlekłym zakażeniem HCV (podgrupa A)

Grading (G)*		IGF-1	IGFBP-3	IGF-1R
	1		23,39 ± 21,50	16,03 ± 19,11
2		19,58 ± 22,93	15,85 ± 16,90	9,40 ± 16,11
3		—*	—*	—*
Staging (S)*	0	—*	—*	—*
	1		15,38 ± 18,67	12,38 ± 17,85
	2		19,75 ± 17,09	5,19 ± 10,44
	3		—*	—*
	4		—*	—*

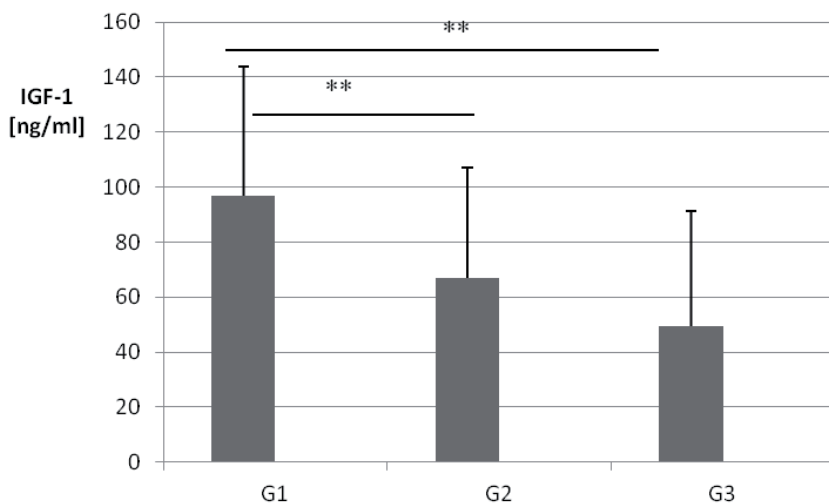
Objaśnienia: —* – parametry ocenione w półilościowej skali numerycznej (p. Materiał i metody), nie było pacjentów z punktacją G0 w tej podgrupie; G3 notowano u 3 pacjentów; —* – zbyt mała liczebność grupy do wnioskowania statystycznego; punktacja S0 (1 pacjent), S3 (3 pacjentów), S4 (1 pacjent), nie pozwoliła na wnioskowanie statystyczne; pozostałe wartości IGF-1, IGF-BP-3 i IGF-1R nie różniły się istotnie w G1 vs. G2 oraz S1 vs. S2 (p > 0,05).

4.6. Analiza surowiczych stężeń białek osi IGF w zależności od nasilenia zmian zapalnych (*grading*) i zaawansowania włóknienia (*staging*) w wątrobie

IGF-1

Wśród pacjentów z przewlekłym zapaleniem wątroby typu C stężenie IGF-1 zmniejszało się wraz ze wzrostem aktywności zapalnej w biopunktatach wątroby (Tabela 21). Istotne różnice zanotowano w podgrupach A i B, choć dla różnych stopni aktywności zapalnej, odpowiednio w podgrupie A dla G1 vs. G2 (84,28 ± 36,00 vs. 56,56 ± 37,43) zaś w podgrupie B dla G1 vs. G3 (103,38 ± 34,67 vs.

37,41 ± 19,69). Różnice w surowiczych stężeniach IGF-1 w całej grupie pacjentów z przewlekłym zakażeniem HCV w zależności od stopnia aktywności zapalnej przedstawiono na rycinie 12 i w tabeli 21.



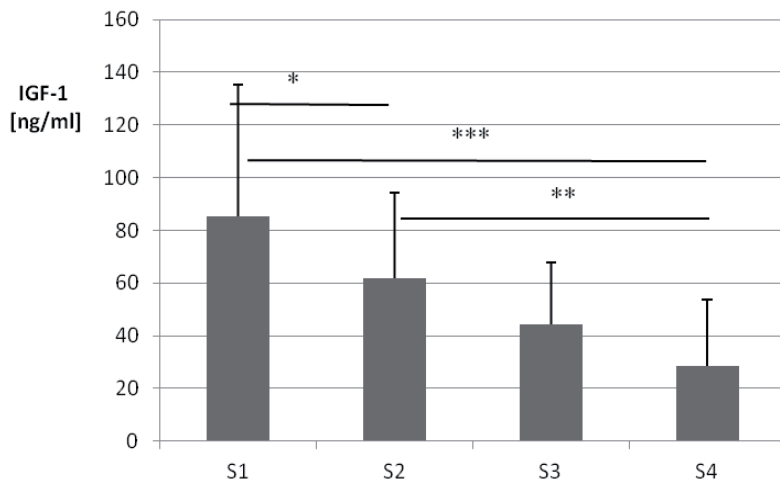
Rycina 12. Surowicze stężenia IGF-1 u pacjentów z przewlekłym zakażeniem HCV (grupa A+B+C) w zależności od *grading*. ** – $p < 0,01$.

Tabela 21. Porównanie surowiczych stężeń składników rodziny IGF (IGF-1, IGF-1R, IGFBP-3, IGFBP-6) w zależności od nasilenia zmian zapalnych (*grading*) i stopnia zaawansowania włóknienia (*staging*) u chorych z przewlekłym zakażeniem HCV (grupa A+B+C)

		IGF-1 (ng/ml)	IGFBP-3 (ng/ml)	IGFBP-6 (pg/ml)	IGF-1R (pg/ml)
<i>Grading</i> (G)*	1	96,69 ± 47,12	855,79 ± 111,16	997,56 ± 228,70	6122,17 ± 4681,04
	2	67,01 ± 40,29**	902,25 ± 104,08	1053,98 ± 256,38	5155,29 ± 3652,23
	3	49,65 ± 41,85***	893,17 ± 191,99	1231,22 ± 424,49	3247,14 ± 326,13
<i>Staging</i> (S)*	0	126,09 ± 24,77	733,09	1057,97 ± 413,65	5327,34 ± 2460,57
	1	85,29 ± 49,99	858,40 ± 106,48	1054,74 ± 253,05	5756,04 ± 4376,76
	2	61,85 ± 32,29*	931,14 ± 120,91	1080,78 ± 316,15	4932,86 ± 3466,42
	3	44,15 ± 23,83	945,29 ± 171,21	906,16 ± 94,99	4098,72 ± 2735,39
	4	28,69 ± 25,01**,*	842,25 ± 105,61	1226,95 ± 437,36	4182,35 ± 1810,57

Objaśnienia: * – parametry ocenione w półilościowej skali numerycznej (*p. Materiał i metody*), nie było pacjentów z punktacją G0 w całej badanej grupie; punktację S0 notowano u 4 pacjentów, stąd ze względu na niską liczebność wyniki te nie podlegały wnioskowaniu statystycznemu; ** – $p = 0,005$ w G1 vs. G2; *** $p = 0,001$ pomiędzy G1 vs. G3 (test wielokrotnych porównań); * – $p = 0,04$ w S1 vs. S2 (test Manna-Whitney'a); ** – $p = 0,01$ dla S2 vs. S4; *** – $p < 0,001$ w S1 vs. S4 (test wielokrotnych porównań); różnice w stężeniach pozostałych białek (IGFBP-3, IGFBP-6 i IGF-1R) w zależności od parametru G1-G3 oraz S1-S4 – nieistotne statystycznie.

Wykazano istotne różnice stężeń IGF-1 w grupie chorych z przewlekłym zakażeniem HCV (A+B+C) i różnym stopniem zaawansowania włóknienia. Stężenie IGF-1 obniżało się wraz ze stopniem zaawansowania włóknienia ocenianym w biopunktatach wątroby (Tabela 21, Rycina 13). Istotne różnice stężeń IGF-1 wykazano u pacjentów z S1 vs. S2, S1 vs. S4 oraz S2 vs. S4 ($p < 0,05$ we wszystkich przypadkach).



Rycina 13. Surowicze stężenia IGF-1 u pacjentów z przewlekłym zakażeniem HCV (grupa A+B+C) w zależności od *staging*. * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$.

Po standaryzacji stężenia IGF-1 względem wieku w sumarycznym porównaniu grupy pacjentów zakażonych HCV bez cech marskości (*staging* 1 i 2 i 3) i z marskością wątroby (*staging* 4) stężenie IGF-1 było znacząco niższe w grupie marskości ($p = 0,008$).

Wartości surowiczych stężeń IGF-1R, IGFBP-3 i IGFBP-6 nie różniły się istotnie w zależności od stopnia aktywności zapalnej i stopnia zaawansowania włóknienia w biopunktatach wątroby (Tabela 21).

4.7. Korelacje surowiczych stężeń białek z rodziny IGF z danymi klinicznymi

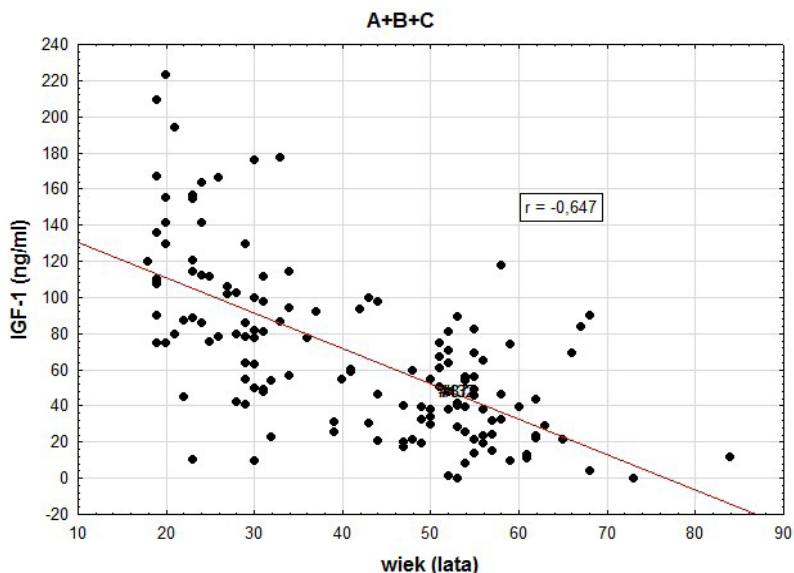
IGF-1

Stężenie IGF-1 u chorych przewlekle zakażonych HCV (grupa A+B+C) zmniejszało się znacząco wraz z wiekiem ($r = -0,647$) (Tabela 22, Rycina 14) oraz słabiej wraz ze wzrostem masy ciała ($r = -0,285$). Podobne znaczące ujemne korelacje zanotowano we wszystkich badanych podgrupach, tj. w podgrupie A (dla wieku $r = -0,621$, dla BMI $r = -0,338$), podgrupie B (dla wieku $r = -0,790$, dla BMI $r = -0,648$) oraz podgrupie C (dla wieku $r = -0,662$, dla BMI $r = -0,225$) (Tabela 22).

Tabela 22. Współczynniki korelacji Spearmana (r) pomiędzy surowiczym stężeniem IGF-1 i wybranymi danymi klinicznymi u pacjentów z przewlekłym zakażeniem HCV

	IGF-1 w surowicy (ng/ml)			
	Podgrupa badana			
	A	B	C	A+B+C
Wiek (lata)	-0,621	-0,790	-0,662	-0,647
BMI	-0,338	-0,648	-0,225	-0,285
Stężenie (%)	-0,296	-0,225	-0,098	-0,195
ALT (U/l)	-0,339	-0,595	-0,183	-0,254
AST (U/l)	-0,306	-0,680	-0,399	-0,415
AFP (ng/ml)	-0,630	-0,679	-0,466	-0,493
Grading	-0,482	-0,747	-0,205	-0,384
Staging	-0,311	-0,497	-0,603	-0,509
HCV RNA (IU/ml)	-0,332	0,096	0,322	0,106
Białko całk. (g/dl)	0,056	0,354	-0,023	0,047
Albuminy (g/dl)	0,127	0,434	0,290	0,269
Gamma-globuliny (g/dl)	-0,049	-0,078	-0,450	-0,288
Płytki krwi (G/l)	0,315	0,634	0,449	0,423
Cholesterol (mg/dl)	0,167	0,180	-0,011	0,026
GGTP (U/l)	-0,619	-0,716	-0,365	-0,448
Glukoza we krwi (mg/dl)	-0,037	-0,475	-0,194	-0,184
HOMA-IR	0,101	-0,319	-0,362	-0,295
Insulina w surowicy (μU/ml)	0,026	-0,333	-0,321	-0,264
Estradiol w surowicy (pg/ml)	0,376	-0,139	0,100	0,156

Objaśnienia: wyboldowaną czcionką zaznaczono wartości współczynnika r, dla których $p < 0,05$.



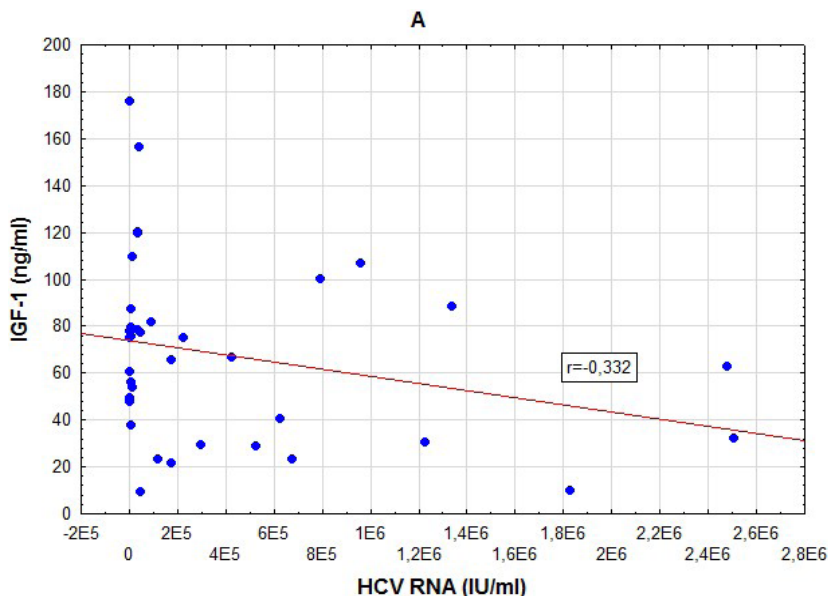
Rycina 14. Korelacja stężenia IGF-1 z wiekiem u chorych z przewlekłym zakażeniem HCV (grupa A+B+C).

Oprócz różnic w stężeniu IGF-1 w zależności od *grading* oraz *staging* (Tabela 21), w całej badanej grupie (A+B+C) potwierdzono negatywne korelacje Spearmana surowiczego stężenia IGF-1 z nasileniem zmian zapalnych oraz stopniem zaawansowania włóknienia (współczynniki korelacji Spearmana odpowiednio $r = -0,384$ i $r = -0,509$; $p < 0,05$ w obu przypadkach).

W poszczególnych podgrupach badanych chorych nie zawsze stwierdzano znaczące korelacje z oboma parametrami. W podgrupie A taką ujemną korelację stwierdzono tylko ze stopniem aktywności zapalnej ($r = -0,482$; $p < 0,05$). W podgrupie B obserwowano wysokie korelacje zarówno z *grading*, jak i *staging* (odpowiednio $r = -0,747$ i $r = -0,497$), zaś w podgrupie C tylko dla *staging* ($r = -0,603$) ($p < 0,05$ we wszystkich przypadkach) (Tabela 22).

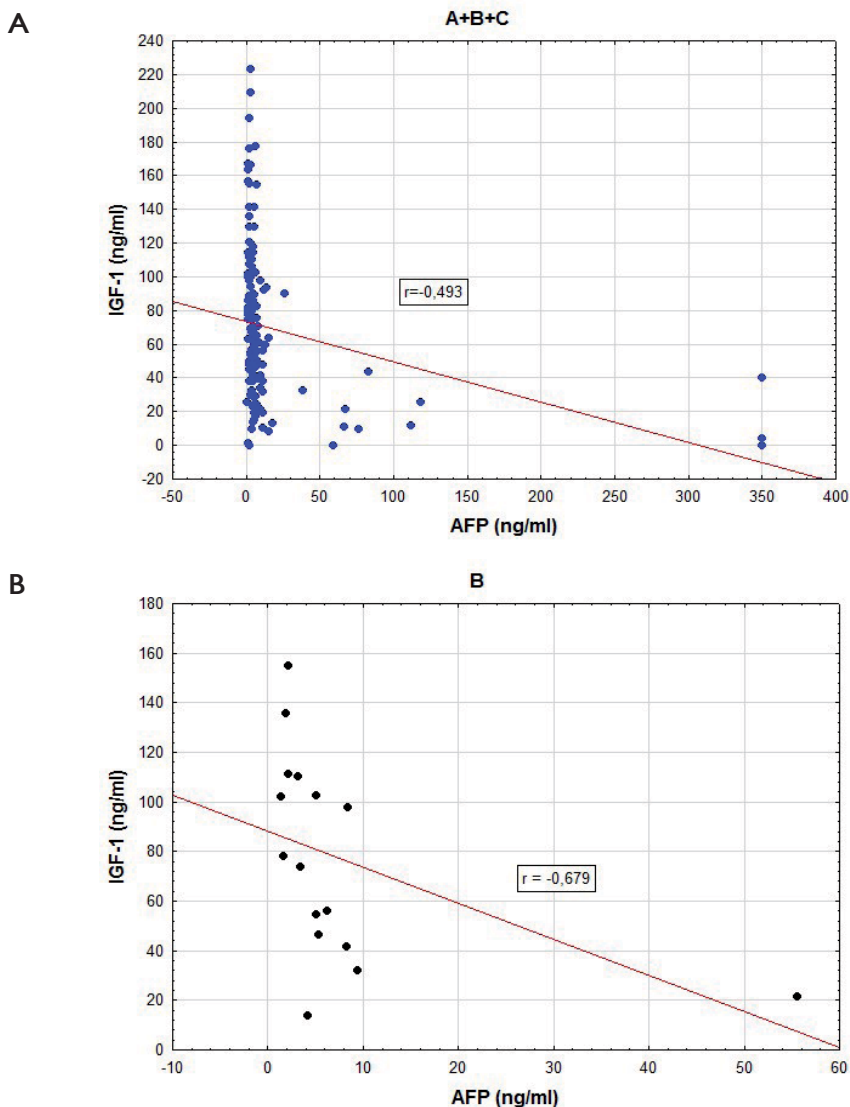
Stłuszczenie wątroby wyrażone różnym % stłuszczenia hepatocytów dotyczyło w badanym materiale 1/3 pacjentów, którym wykonano biopsję wątroby. Stężenie IGF-1 w całej badanej grupie bardzo słabo korelowało ze stłuszczeniem wątroby ($r = -0,195$; $p < 0,05$). Co ciekawe, w poszczególnych badanych podgrupach A, B i C nie stwierdzano takich korelacji (Tabela 22).

Ładunek wirusa wyrażony jako liczba kopii HCV-RNA w surowicy nie różnił się we wszystkich badanych podgrupach. W całej grupie (A+B+C) nie stwierdzono zależności pomiędzy stężeniem IGF-1 w surowicy a ładunkiem wirusa. Takiej zależności nie obserwowano także w podgrupie B. Bardzo słabą ujemną korelację stężenia IGF-1 z ilością HCV-RNA stwierdzono jedynie w podgrupie A ($r = -0,332$; $p < 0,05$) (Rycina 15).



Rycina 15. Słaba negatywna korelacja rang Spearmana pomiędzy surowiczymi stężeniami IGF-1 oraz HCV-RNA u pacjentów z podgrupy A.

Stężenie IGF-1 obniżało się wraz ze wzrostem stężenia AFP w całej grupie badanej (A+B+C) ($r = -0,493$; $p < 0,05$) (Rycina 16A). Obserwowano także liniową korelację Pearsona między wartościami IGF-1 i AFP w surowicy krwi pacjentów z grupy badanej ($r = -0,337$; $p < 0,05$). Najwyższy współczynnik korelacji Spearmana uzyskano u pacjentów długotrwałe zakażonych HCV (podgrupa B), tj. $r = -0,679$ ($p < 0,05$) (Rycina 16B), kolejno w podgrupie A ($r = -0,630$) i w podgrupie C ($r = -0,466$) ($p < 0,05$ w obu przypadkach).



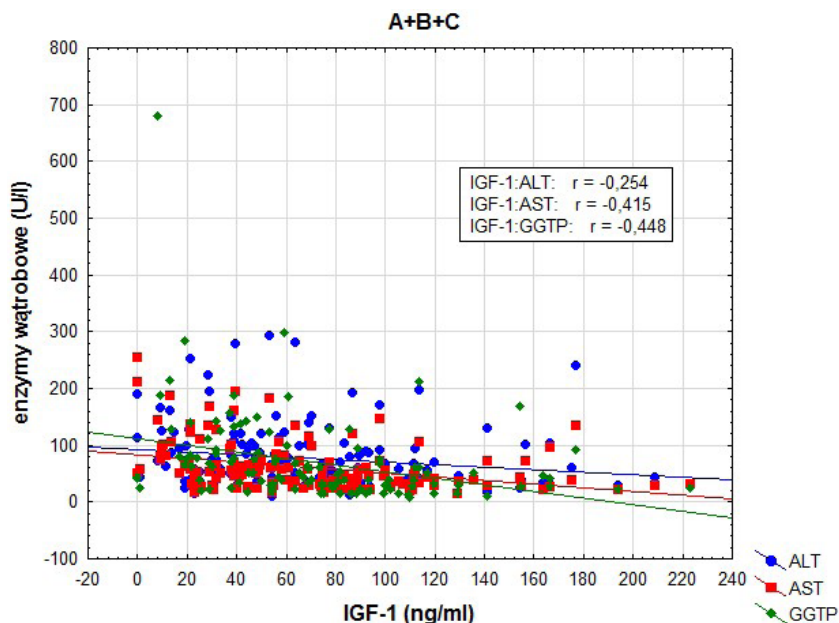
Rycina 16. Negatywna korelacja Spearmana pomiędzy stężeniem IGF-1 i AFP w całej grupie badanej (A) oraz u pacjentów z długotrwałym zakażeniem HCV (B) ($p < 0,05$ w obu przypadkach).

Po standaryzacji stężenia IGF-1 względem wieku w całej grupie badanej (A+B+C) obserwowano zdecydowanie niższą, ale nadal istotną statystycznie korelację liniową Pearsona pomiędzy IGF-1 a AFP ($r = -0,174$; $p < 0,05$). Wyższy współczynnik korelacji Pearsona ($r = -0,421$; $p < 0,05$) oraz ujemną istotną statystycznie korelację Spearmana przy $r = -0,322$ ($p < 0,05$) uzyskano biorąc pod uwagę pacjentów ze stężeniem surowiczym AFP ≥ 5 ng/ml.

Po standaryzacji surowiczego stężenia IGF-1 względem wieku u kobiet i mężczyzn grupy A+B+C, słabą ujemną korelację Pearsona pomiędzy IGF-1 a AFP stwierdzono u kobiet przewlekle zakażonych HCV ($r = -0,363$; $p < 0,05$). U mężczyzn takiej zależności nie obserwowano ($r = -0,083$; $p > 0,05$).

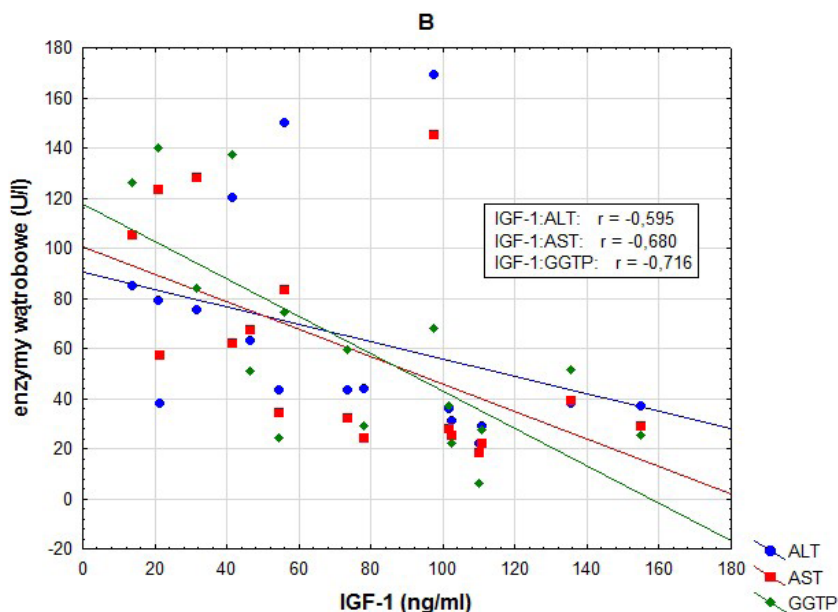
U chorych przewlekle zakażonych HCV (grupa A+B+C) stężenie IGF-1 obniżało się również wraz ze wzrostem aktywności aminotransferaz ALT i AST. W całej grupie badanej współczynnik korelacji Spearmana dla ALT był bardzo niski i wynosił $r = -0,254$, zaś dla AST wyższy – $r = -0,415$ ($p < 0,05$ w obu przypadkach) (Rycina 17). Natomiast po standaryzacji względem wieku współczynniki te zmniejszyły się do odpowiednio $r = 0,079$ i $r = -0,055$. Wówczas nie udało się potwierdzić istotnej statystycznie negatywnej korelacji pomiędzy IGF-1 i aktywnością aminotransferaz w całej badanej grupie (A+B+C).

Wysokie ujemne korelacje pomiędzy stężeniem IGF-1 a aktywnością ALT i AST stwierdzono w grupie długotrwale zakażonych wirusem HCV (podgrupa B), (IGF-1:ALT $r = -0,595$; IGF-1:AST $r = -0,680$) ($p < 0,05$ w obu przypadkach)



Rycina 17. Korelacje rang Spearmana między surowiczym stężeniem IGF-1 i aktywnością ALT, AST i GGTP w całej grupie badanej (grupa A+B+C).

(Rycina 18). W podgrupie A wykazano korelację tylko dla ALT ($r = -0,339$), zaś w podgrupie C tylko dla AST ($r = -0,399$) ($p < 0,05$ w obu przypadkach) (Tabela 22).



Rycina 18. Negatywne korelacje Spearmana pomiędzy stężeniem IGF-1 i aktywnością enzymów wątrobowych: ALT, AST i GGTP w podgrupie B.

Po standaryzacji surowiczego stężenia IGF-1 względem wieku, w podgrupie B utrzymał się nadal dość wysoki współczynnik negatywnej korelacji Spearmana pomiędzy surowiczym stężeniem IGF-1 a aktywnością ALT ($r = -0,495$; $p < 0,05$).

W całym badanym materiale (A+B+C), jak również w każdej z badanych podgrup (A, B i C), stwierdzano podwyższoną aktywność GGTP. Im wyższa była ta aktywność, tym stężenie IGF-1 w surowicy było niższe ($r = -0,448$; $p < 0,05$) (Rycina 17). Szczególnie wysoką negatywną korelację tych parametrów obserwowano w podgrupie B ($r = -0,716$; $p < 0,05$) (Rycina 18), wysoką w podgrupie A ($r = -0,619$; $p < 0,05$), zaś przeciętną w podgrupie C ($r = -0,365$; $p < 0,05$) (Tabela 22).

Po standaryzacji IGF-1 względem wieku, współczynnik korelacji Spearmana dla relacji IGF-1:GGTP w podgrupie B wynosił jednak jedynie $r = -0,147$ i nie była to istotna statystycznie zależność ($p > 0,05$).

Wyrazem zdolności hepatocytów do syntezy białek ustrojowych jest produkcja albumin. U badanych w obecnej pracy pacjentów z zakażeniem HCV średnie stężenia albumin mieściły się w granicach normy. Jednakże u tych chorych

(grupa A+B+C) obserwowano słabą pozytywną korelację pomiędzy stężeniem albumin i IGF-1 ($r = 0,269$; $p < 0,05$). Innymi słowy wraz ze spadkiem syntezy albumin przez wątrobę z zakażeniem HCV obniżało się także surowicze stężenie IGF-1. Podobny współczynnik korelacji pomiędzy badanymi markerami wątrobowymi obserwowano w podgrupie C ($r = 0,290$; $p < 0,05$). Po standaryzacji stężenia IGF-1 względem wieku uzyskano jeszcze niższe współczynniki korelacji: Spearmana ($r = 0,058$; $p > 0,05$), a Pearsona ($r = 0,108$; $p > 0,05$).

Stężenie gammaglobulin u chorych przewlekle zakażonych HCV było nieznacznie podwyższone. Jego wzrostowi towarzyszyło obniżenie stężenia IGF-1 (w grupie A+B+C $r = -0,288$; w podgrupie C $r = -0,450$; $p < 0,05$ w obu przypadkach) (Tabela 22). Po standaryzacji stężenia IGF-1 względem wieku w całej grupie (A+B+C), współczynnik korelacji Spearmana obniżył się znacznie i wynosił $r = -0,151$; $p > 0,05$. Jednak nadal w całej badanej grupie notowano słabą, ale istotną statystycznie liniową korelację Pearsona pomiędzy IGF-1 i stężeniem gammaglobulin ($r = -0,379$; $p < 0,05$).

Średnia liczba płytek krwi u badanych chorych kształtowała się w granicach normy, mimo to w każdej z badanych podgrup znajdowali się pacjenci z małopłytkowością. Wraz z niższymi wartościami liczby trombocytów obserwowano niższe stężenia IGF-1. W całej badanej grupie, jak również w podgrupie C zależność ta była przeciętna (odpowiednio $r = 0,423$ i $r = 0,449$, $p < 0,05$ w obu przypadkach), ale w podgrupie B wysoka ($r = 0,634$, $p < 0,05$) (Tabela 22). Korelacja ta utrzymywała się na poziomie istotności statystycznej po standaryzacji IGF-1 względem wieku w grupie badanej (A+B+C) ($r = 0,238$; $p < 0,05$), aczkolwiek była bardzo słaba.

Słabe negatywne korelacje stwierdzono pomiędzy stężeniem IGF-1 a stężeniem glukozy i insuliny oraz wskaźnikiem HOMA-IR w całej badanej grupie (odpowiednio: $r = -0,184$, $r = -0,264$, $r = -0,295$; $p < 0,05$ we wszystkich przypadkach). Przeciętne negatywne korelacje IGF-1: insulina ($r = -0,321$; $p < 0,05$) oraz IGF-1:HOMA-IR ($r = -0,362$; $p < 0,05$) zanotowano tylko w podgrupie C (Tabela 22). Po standaryzacji IGF-1 względem wieku wartości współczynnika Spearmana dla powyższych korelacji były jeszcze niższe (odpowiednio: $r = -0,005$; $-0,070$; $-0,024$; $p > 0,05$ we wszystkich przypadkach). Z nieco wyższych wartości współczynników korelacji Pearsona niż Spearmana dla badanych zależności w całej badanej grupie (A+B+C), tj. dla IGF-1:glukoza ($r = -0,029$), IGF-1:HOMA-IR ($r = -0,253$), statystycznie istotna utrzymała się bardzo słaba negatywna zależność jedynie pomiędzy stężeniem IGF-1 a stężeniem insuliny w surowicy ($r = -0,270$; $p < 0,05$).

Stężenie estradiolu słabo pozytywnie korelowało ze stężeniem IGF-1 tylko w podgrupie A ($r = 0,376$; $p < 0,05$) (Tabela 22). U zakażonych HCV mężczyzn stwierdzono bardzo słabą negatywną korelację stężenia estradiolu ze stężeniem IGF-1 ($r = -0,247$; $p < 0,05$).

Wszystkie korelacje surowiczego stężenia IGF-1 z danymi klinicznymi w badanych grupach pacjentów przedstawiono w tabeli 22.

IGF-1R

U pacjentów przewlekle zakażonych HCV surowicze stężenie IGF-1R nie wykazywało różnic zarówno pomiędzy badanymi podgrupami, jak i całą badaną grupą (A+B+C) i kontrolą. Wraz ze starszym wiekiem pacjentów stężenie IGF-1R zmniejszało się. Istotnie statystycznie, ale słabe negatywne korelacje pomiędzy stężeniem IGF-1R a wiekiem zanotowano w całej badanej grupie (A+B+C). Współczynnik korelacji Spearmana dla tej grupy wynosił $r = -0,222$; $p < 0,05$. Istotnych korelacji z wiekiem nie obserwowano w pozostałych podgrupach badanych pacjentów.

Istotna zależność pomiędzy stężeniem IGF-1R a wiekiem w grupie badanej (A+B+C) była zdecydowanie słabsza niż w przypadku samego IGF-1, stąd też w przypadku IGF-1R nie wykonywano standaryzacji tego parametru względem wieku dla korelacji z danymi klinicznymi.

Wśród badanych korelacji pomiędzy stężeniem IGF-1R a danymi kliniczno-laboratoryjnymi, znamiennej wysoką wprost proporcjonalną zależność wykazano ze stężeniem albumin ($r = 0,677$; $p < 0,05$) u pacjentów z długotrwałym zakażeniem HCV (podgrupa B) (Tabela 23).

Tabela 23. Współczynniki korelacji Spearmana (r) pomiędzy surowiczym stężeniem IGF-1R i wybranymi danymi klinicznymi u pacjentów z przewlekłym zakażeniem HCV

	IGF-1R (ng/ml)			
	Podgrupa badana			
	A	B	C	A+B+C
Wiek (lata)	-0,243	-0,480	-0,179	-0,222
BMI	0,018	-0,189	-0,001	0,000
Stuszczenie (%)	0,061	-0,015	-0,162	-0,107
ALT (U/l)	0,071	-0,411	-0,105	-0,084
AST (U/l)	0,000	-0,373	-0,062	-0,078
AFP (ng/ml)	-0,211	-0,479	-0,103	-0,165
Grading	-0,107	-0,198	0,059	-0,063
Staging	0,104	-0,456	-0,093	-0,073
HCV RNA (IU/ml)	-0,181	0,194	0,166	0,089
Białko całk. (g/dl)	0,121	0,418	0,014	0,130
Albuminy (g/dl)	0,005	0,677	-0,035	0,085
Gamma-globuliny (g/dl)	0,180	0,118	0,030	0,089
Płytki krwi (G/l)	-0,223	0,456	-0,011	-0,021
Cholesterol (mg/dl)	-0,011	0,346	-0,178	-0,083
GGTP (U/l)	-0,085	-0,271	0,224	0,121
Glukoza we krwi (mg/dl)	-0,008	0,068	-0,090	0,002
HOMA-1R	0,325	-0,265	-0,115	-0,049
Insulina w surowicy (μ U/ml)	0,280	-0,355	-0,045	-0,014
Estradiol w surowicy (pg/ml)	-0,069	-0,290	0,022	-0,036

Objaśnienia: **wyboldowaną czcionką** zaznaczono wartości współczynnika r , dla których $p < 0,05$.

IGFBP-3

Jedynie u pacjentów z podgrupy badanej C stwierdzono wysoką negatywną korelację pomiędzy surowiczym stężeniem IGFBP-3 i stężeniem białka całkowitego ($r = -0,636$; $p < 0,05$).

Nie było innych istotnych korelacji pomiędzy pozostałymi parametrami laboratoryjnymi i histologicznymi zarówno u wszystkich chorych (A+B+C), jak i w poszczególnych podgrupach (Tabela 24).

Tabela 24. Współczynniki korelacji Spearmana (r) pomiędzy surowiczym stężeniem IGFBP-3 i wybranymi danymi klinicznymi u pacjentów z przewlekłym zakażeniem HCV

	IGFBP-3 (ng/ml)			
	Podgrupa badana			
	A	B	C	A+B+C
Wiek (lata)	0,210	0,062	-0,177	-0,035
BMI	-0,084	0,187	0,409	0,050
Stężenie (%)	0,163	0,082	0,866	0,018
ALT (U/l)	-0,006	0,208	0,244	0,073
AST (U/l)	0,088	0,296	0,325	0,094
AFP (ng/ml)	0,107	0,426	0,072	-0,322
Grading	0,204	0,048	0,775	0,078
Staging	0,318	0,285	-0,044	0,046
HCV RNA (IU/ml)	-0,054	0,250	0,113	0,060
Białko całkowite (g/dl)	0,097	0,230	-0,636	-0,066
Albuminy (g/dl)	0,131	0,007	-0,465	0,023
Gamma-globuliny (g/dl)	-0,064	-0,049	0,095	-0,113
Płytki krwi (G/l)	-0,264	-0,115	-0,193	-0,021
Cholesterol (mg/dl)	0,192	0,217	-0,188	0,206
GGTP (U/l)	0,406	0,039	-0,286	0,119
Glukoza we krwi (mg/dl)	0,205	0,364	-0,148	0,162
HOMA-IR	-0,035	0,196	-0,347	-0,045
Insulina w surowicy (μ U/ml)	0,010	0,150	-0,444	-0,100
Estradiol w surowicy (pg/ml)	-0,201	0,282	-0,016	-0,106

Objaśnienia: **wyboldowaną czcionką** zaznaczono wartości współczynnika r , dla których $p < 0,05$.

Surowiczy wskaźnik IGF-1/IGFBP-3

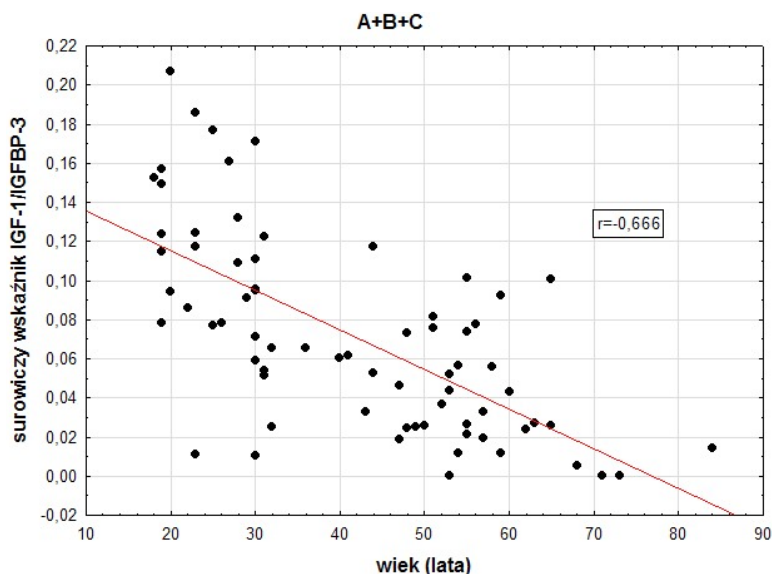
Wykazano szereg istotnych i to wysokich korelacji pomiędzy wartością surowiczego wskaźnika IGF-1/IGFBP-3 a danymi klinicznymi i zmianami histologicznymi u pacjentów całej grupy badanej (A+B+C) oraz w badanych podgrupach z przewlekłym zakażeniem HCV (Tabela 25).

Szczególnie wysokie współczynniki korelacji Spearmana uzyskano pomiędzy wartością surowiczego wskaźnika IGF-1/IGFBP-3 a wiekiem pacjenta, stężeniem AFP, aktywnością zapalną (*grading*) oraz włóknieniem wątroby u chorych z WZW typu C i to zarówno w całej grupie, jak i podgrupach pacjentów z zakażeniem HCV (Tabela 25, Rycina 19 i 20).

Tabela 25. Współczynniki korelacji Spearmana (r) pomiędzy surowiczym wskaźnikiem IGF-1/IGFBP-3 i wybranymi danymi klinicznymi u pacjentów z przewlekłym zakażeniem HCV

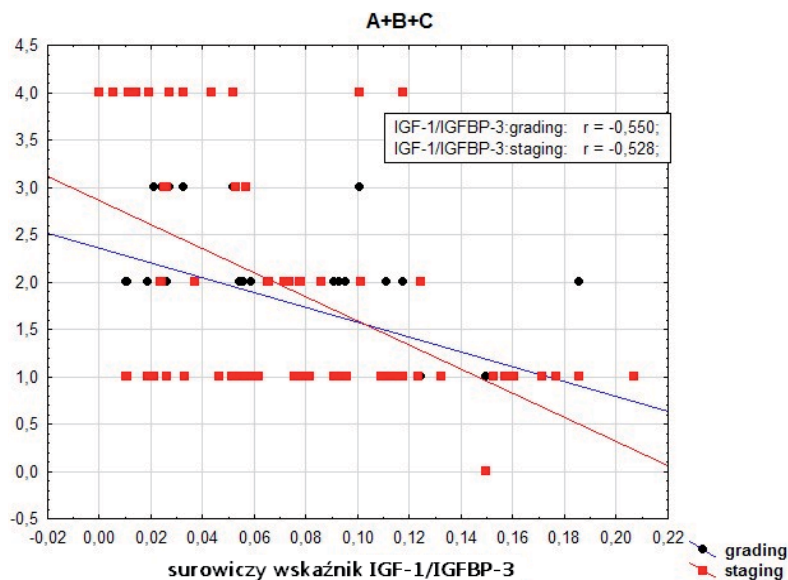
	Surowiczy wskaźnik IGF-1/IGFBP-3			
	Podgrupa badana			
	A	B	C	A+B+C
Wiek (lata)	-0,600	-0,716	-0,643	-0,666
BMI	-0,316	-0,500	-0,332	-0,424
Stężenie (%)	-0,306	-0,293	-0,866	-0,236
ALT (U/l)	-0,301	-0,581	-0,219	-0,419
AST (U/l)	-0,292	-0,657	-0,629	-0,526
AFP (ng/ml)	-0,626	-0,674	-0,511	-0,590
Grading	-0,520	-0,736	-0,258	-0,550
Staging	-0,348	-0,459	-0,776	-0,528
HCV RNA (IU/ml)	-0,307	0,044	0,790	-0,063
Białko całk. (g/dl)	-0,056	0,315	-0,141	0,088
Albuminy (g/dl)	0,094	0,439	0,608	0,325
Gamma-globuliny (g/dl)	-0,024	-0,059	-0,681	-0,186
Płytki krwi (G/l)	0,378	0,574	0,437	0,527
Cholesterol (mg/dl)	0,094	0,112	0,453	0,180
GGTP (U/l)	-0,701	-0,701	-0,243	-0,625
Glukoza we krwi (mg/dl)	-0,145	-0,558	-0,095	-0,266
HOMA-IR	0,117	-0,321	-0,201	-0,296
Insulina w surowicy (μU/ml)	0,044	-0,300	-0,251	-0,286
Estradiol w surowicy (pg/ml)	0,372	-0,190	-0,095	0,153

Objaśnienia: wyboldowaną czcionką zaznaczono wartości współczynnika r, dla których $p < 0,05$.

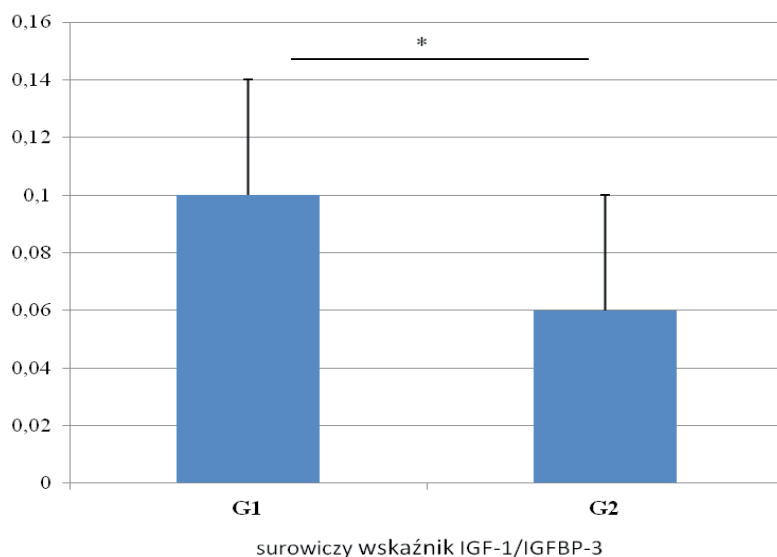


Rycina 19. Korelacje porządku rang Spearmana pomiędzy wartością surowiczego wskaźnika IGF-1/IGFBP-3 oraz wiekiem grupy badanej (A+B+C).

W całej grupie badanej (A+B+C) wykazano negatywne korelacje tego wskaźnika m.in. z wiekiem i BMI, aktywnością obu aminotransferaz oraz GGTP. W całej grupie pacjentów ujemną korelację stwierdzono także pomiędzy surowiczym wskaźnikiem IGF-1/IGFBP-3 a *grading* i *staging* ($r = -0,550$; $r = -0,528$; $p < 0,05$) (Rycina 20).



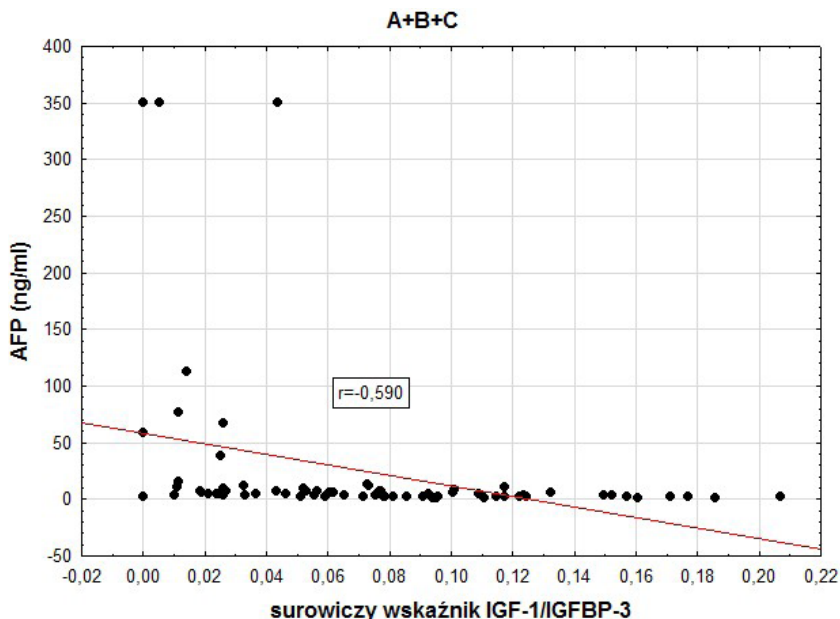
Rycina 20. Korelacje porządku rang Spearmana pomiędzy wartością surowiczego wskaźnika IGF-1/IGFBP-3 oraz *grading* i *staging* u pacjentów z przewlekłym zakażeniem HCV (grupa A+B+C).



Rycina 21. Surowiczy wskaźnik IGF-1/IGFBP-3 w zależności od aktywności zapalnej u chorych z przewlekłym zakażeniem HCV (grupa A+B+C); * - $p < 0,05$.

Testem Kruskala-Wallisa potwierdzono istotnie niższą wartość tego wskaźnika w bardziej nasilonych zmianach zapalnych wątroby (G2) (Rycina 21).

Prócz istotnej korelacji wskaźnika IGF-1/IGFBP-3 ze zmianami histologicznymi w wątrobie, w całej badanej grupie (oraz dodatkowo w podgrupie A i B) była także bardzo wysoka negatywna korelacja tego parametru ze stężeniem AFP ($r = -0,590$; $p < 0,05$) (Rycina 22).



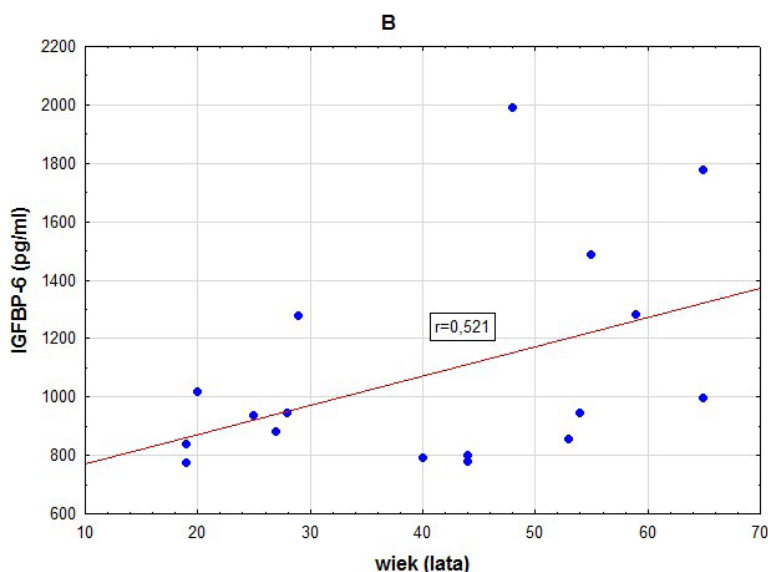
Rycina 22. Korelacje porządku rang Spearmana pomiędzy wartością surowiczego wskaźnika IGF-1/IGFBP-3 i stężeniem AFP u pacjentów z przewlekłym zakażeniem HCV (grupa A+B+C).

W grupie zakażonych HCV mężczyzn ($n = 86$) stwierdzono ujemną przeciętną korelację wskaźnika IGF-1/IGFBP-3 ze stężeniem estradiolu ($r = -0,399$; $p < 0,05$).

IGFBP-6

Silną i to pozytywną zależność pomiędzy stężeniem IGFBP-6 i wiekiem pacjenta wykazano w podgrupie B ($r = 0,521$; $p < 0,05$) (Rycina 23). Natomiast bardzo słabe pozytywne korelacje stężenia IGFBP-6 z BMI notowano w całej badanej grupie pacjentów (A+B+C) ($r = 0,263$) oraz w podgrupie C ($r = 0,231$) ($p < 0,05$ w obu przypadkach) (Tabela 26).

W poszczególnych grupach wykazano przeciętne korelacje pomiędzy stężeniem IGFBP-6 a danymi klinicznymi, tj. w podgrupie A ujemną ze stężeniem białka całkowitego ($r = -0,350$; $p < 0,05$), w podgrupie C – dodatnią ze stężeniem estradiolu ($r = 0,303$; $p < 0,05$) (Tabela 26). Dodatnią korelację IGFBP-6 ze stężeniem estradiolu stwierdzono także w grupie zakażonych HCV mężczyzn ($r = 0,289$; $p < 0,05$).



Rycina 23. Pozytywna korelacja rang Spearmana pomiędzy stężeniem IGFBP-6 i wiekiem chorych w podgrupie B.

Tabela 26. Współczynniki korelacji Spearmana (r) pomiędzy surowiczym stężeniem IGFBP-6 i wybranymi danymi klinicznymi we wszystkich badanych podgrupach

	IGFBP-6 (ng/ml)			
	Podgrupa badana			
	A	B	C	A+B+C
Wiek (lata)	0,158	0,521	0,020	0,130
BMI	0,213	0,434	0,231	0,263
Stężenie (%)	0,042	0,328	-0,135	0,006
ALT (U/l)	0,083	0,140	-0,059	-0,012
AST (U/l)	0,113	0,092	0,059	-0,079
AFP (ng/ml)	-0,061	-0,166	-0,038	-0,019
Grading	0,113	0,401	-0,003	0,169
Staging	0,036	-0,001	0,100	0,071
HCV RNA (IU/ml)	0,068	-0,114	0,035	0,087
Białko całk. (g/dl)	-0,350	-0,222	0,194	0,061
Albuminy (g/dl)	-0,091	-0,300	0,036	-0,014
Gamma-globuliny (g/dl)	-0,297	0,162	0,121	0,030
Płytki krwi (G/l)	-0,205	0,109	-0,042	-0,077
Cholesterol (mg/dl)	-0,040	0,243	-0,052	-0,009
GGTP (U/l)	0,204	0,331	0,040	0,094
Glukoza we krwi (mg/dl)	-0,180	0,004	0,079	0,107
HOMA-IR	-0,183	0,294	-0,044	0,006
Insulina w surowicy (μU/ml)	-0,247	0,296	-0,007	-0,004
Estradiol w surowicy (pg/ml)	-0,014	-0,448	0,303	0,131

Objaśnienia: wyboldowaną czcionką zaznaczono wartości współczynnika r, dla których $p < 0,05$.

4.8. Wzajemne korelacje pomiędzy surowiczymi stężeniami białek z rodziny IGF

Nie stwierdzono istotnych wzajemnych korelacji pomiędzy surowiczymi stężeniami IGF-1 a pozostałymi białkami osi IGF (IGF-1R, IGFBP-3 i IGFBP-6) zarówno w całej grupie badanej, jak i w każdej z badanych podgrup. Podobnie nie wykazano znamiennej zależności pomiędzy stężeniem obu białek wiążących (IGFBP-3 i IGFBP-6) ani w całej grupie (A+B+C), ani w poszczególnych podgrupach (Tabela 27).

Tabela 27. Współczynniki korelacji Spearmana (r) pomiędzy surowiczymi stężeniami białek systemu IGF (IGF-1, IGF-1R, IGFBP-3 i IGFBP-6) we wszystkich badanych podgrupach pacjentów z WZW typu C

Białka z rodziny IGF	IGF-1 w surowicy (ng/ml)			
	A	B	C	A+B+C
IGF-1R (pg/ml)	0,232	0,257	0,034	0,113
IGFBP-3 (ng/ml)	-0,171	-0,276	0,042	-0,081
IGFBP-6 (pg/ml)	-0,121	-0,287	-0,118	-0,145
IGFBP-3 vs. IGFBP-6	0,141	-0,355	0,174	0,054

Objaśnienia: wartości współczynnika korelacji Spearmana we wszystkich przypadkach nieistotne statystycznie ($p > 0,05$).

4.9. Korelacje tkankowej ekspresji białek osi IGF z danymi klinicznymi

IGF-1

W całym badanym materiale tkankowym (podgrupa A i B) ekspresja IGF-1 w wątrobie była obniżona w porównaniu z kontrolą. Podobnie jak w przypadku surowiczego stężenia IGF-1 w WZW typu C, wątrobowa ekspresja IGF-1 obniżała się wraz ze wzrostem zaawansowania włóknienia (*staging*) w wątrobie, choć współczynnik korelacji Spearmana był bardzo słaby ($r = -0,280$; $p < 0,05$). Słabą negatywną korelację wykazano także pomiędzy tkankową ekspresją IGF-1 i wskaźnikiem HOMA-IR ($r = -0,307$; $p < 0,05$).

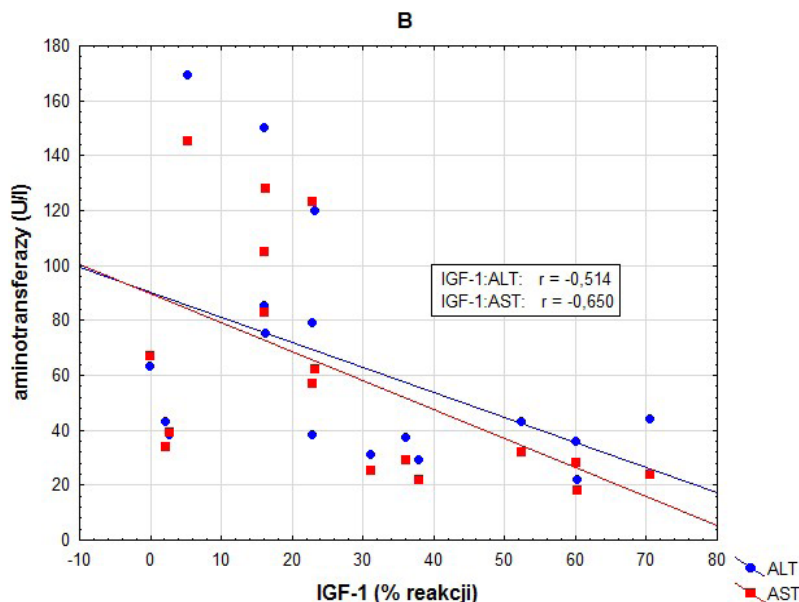
U pacjentów z długotrwałym zakażeniem HCV (podgrupa B) wykazano wysokie negatywne korelacje pomiędzy wątrobową ekspresją IGF-1 i aktywnością obu aminotransferaz (IGF-1:ALT $r = -0,514$; IGF-1:AST $r = -0,650$; $p < 0,05$ w obu przypadkach) (Rycina 24) oraz stężeniem AFP (IGF-1:AFP $r = -0,495$; $p < 0,05$). Nie obserwowano natomiast istotnych zależności pomiędzy tkankową ekspresją IGF-1 a nasileniem zmian zapalnych oraz zaawansowania włóknienia w wątrobie w tej podgrupie pacjentów (Tabela 28). Wzrost ekspresji IGF-1 u pacjentów długotrwanie zakażonych HCV wiązał się także ze wzrostem stężenia całkowitego cholesterolu ($r = 0,563$; $p < 0,05$).

W podgrupie A stwierdzono jedyną istotną i to słabą ujemną korelację pomiędzy tkankową ekspresją IGF-1 a ładunkiem wirusa HCV ($r = -0,360$; $p < 0,05$) (Tabela 28, Rycina 25). Nie obserwowano istotnych korelacji pomiędzy ekspresją wątrobową IGF-1 a pozostałymi danymi klinicznymi (biochemicznymi i histologicznymi).

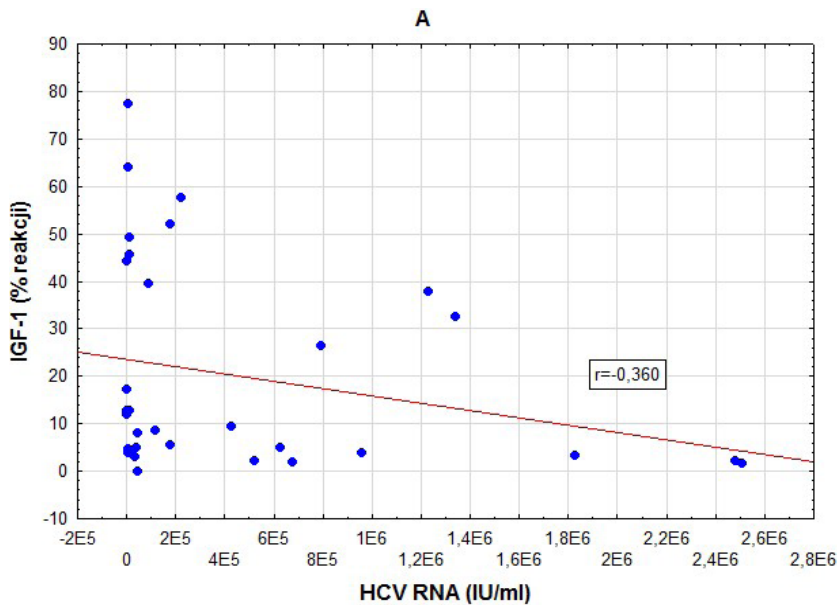
Tabela 28. Współczynniki korelacji porządku rang Spearmana pomiędzy wątrobową ekspresją IGF-1 (% reakcji na pole mięszu wątroby), danymi kliniczno-laboratoryjnymi i histologicznymi u chorych zakażonych HCV w badanych podgrupach

IGF-1 (% reakcji)	A	B	A+B
Wiek (lata)	0,058	-0,282	-0,048
BMI	0,183	-0,198	0,115
Stłuszczenie (%)	-0,160	0,340	0,083
ALT (U/l)	0,134	-0,514	-0,073
AST (U/l)	0,038	-0,650	-0,186
AFP (ng/ml)	-0,081	-0,495	-0,160
Grading	-0,299	-0,282	-0,224
Staging	-0,268	-0,455	-0,280
HCV RNA (IU/ml)	-0,360	0,172	-0,165
Białko całk. (g/dl)	-0,102	0,092	-0,050
Albuminy (g/dl)	-0,212	0,177	-0,126
Gamma-globuliny (g/dl)	-0,008	-0,260	-0,016
Płytki krwi (G/l)	0,197	0,429	0,199
Cholesterol (mg/dl)	0,136	0,563	0,254
GGTP (U/l)	-0,213	-0,309	-0,263
Glukoza we krwi (mg/dl)	-0,070	-0,465	-0,216
HOMA-IR	-0,353	-0,233	-0,307
Insulina w surowicy (μU/ml)	-0,246	-0,245	-0,223
Estradiol w surowicy (pg/ml)	-0,109	-0,248	-0,148

Objaśnienia: wyboldowaną czcionką zaznaczono wartości współczynnika r , dla których $p < 0,05$.



Rycina 24. Negatywne korelacje porządku rang Spearmana pomiędzy tkankową ekspresją IGF-1 i aktywnością aminotransferaz ALT i AST u chorych z zakażeniem HCV (podgrupa B) ($p < 0,05$).



Rycina 25. Słaba negatywna korelacja rang Spearmana pomiędzy tkankową ekspresją IGF-1 i ładunkiem wirusa HCV u chorych z zakażeniem HCV (podgrupa A) ($p < 0,05$).

W żadnej z badanych podgrup pacjentów oraz w całej badanej pod tym kątem grupie (A+B) nie wykazano (tak jak to miało miejsce w przypadku surowiczych stężeń IGF-1) istotnych korelacji tkankowej ekspresji IGF-1 z wiekiem pacjenta ($p > 0,05$ we wszystkich przypadkach).

Nie wykazano korelacji tkankowej ekspresji IGF-1 (% reakcji) z surowiczym stężeniem IGF-1 (podgrupa A: $r = 0,251$; podgrupa B: $r = 0,348$; grupa A+B: $r = 0,257$; $p > 0,05$ we wszystkich przypadkach).

IGF-1R

Ekspresja tkankowa IGF-1R była badana tylko w podgrupie A. Była ona niższa w porównaniu z kontrolą tkankową, jednak nie były to różnice statystycznie istotne ($9,86 \pm 15,55$ vs. $16,89 \pm 21,53$; $p > 0,05$) (Tabela 16). Nie uzyskano również istotnych statystycznie korelacji ekspresji IGF-1R z tkankową ekspresją IGF-1 ($r = -0,196$; $p > 0,05$). Natomiast wzrostowi ekspresji tkankowej IGF-1R towarzyszył wzrost stężenia glukozy we krwi ($r = 0,425$; $p < 0,05$). Nie wykazano znamienych korelacji z pozostałymi danymi klinicznymi i laboratoryjnymi oraz histologicznymi u pacjentów przewlekle zakażonych HCV (Tabela 29). Nie wykazano korelacji tkankowej ekspresji IGF-1R z surowiczym stężeniem IGF-1R ($r = 0,097$; $p > 0,05$).

IGFBP-3

Ekspresja IGFBP-3 w wątrobie była badana również jedynie u chorych z podgrupy A. Była ona znamienne wyższa ($15,10 \pm 17,54$) niż w kontrolnej wątrobie

(3,78 ± 7,40) jak i HCC (1,78 ± 6,16) (Tabela 16). Istotną i to ujemną korelację Spearmana wykazano jedynie z BMI pacjentów ($r = -0,479$; $p < 0,05$).

Nie wykazano znamiennej korelacji z pozostałymi danymi klinicznymi i laboratoryjnymi oraz histologicznymi u pacjentów przewlekle zakażonych HCV (Tabela 29). Nie wykazano istotnej korelacji tkankowej ekspresji IGFBP-3 z surowym stężeniem IGFBP-3 ($r = 0,333$; $p > 0,05$).

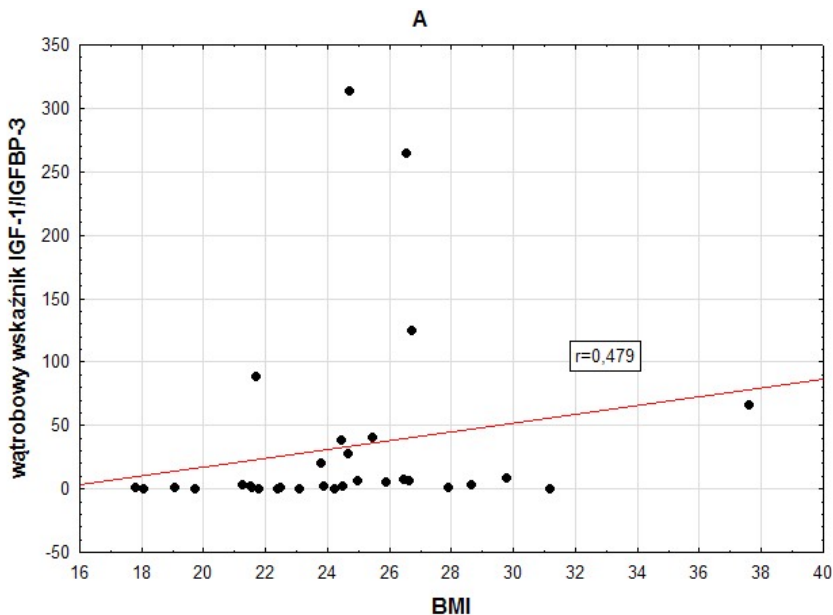
Tabela 29. Współczynniki korelacji porządku rang Spearmana pomiędzy ekspresją IGF-1, IGF-1R i IGFBP-3 (% reakcji na pole mięzszy wątroby) oraz wskaźnikiem IGF-1/IGFBP-3 a danymi kliniczno-laboratoryjnymi i histologicznymi w wątrobie pacjentów z podgrupy A

Cecha statystyczna	IGF-1	IGF-1R	IGFBP-3	IGF-1/IGFBP-3
Wiek (lata)	0,058	0,101	-0,173	0,313
BMI	0,183	0,192	-0,433	0,479
Stężenie (%)	-0,160	0,156	-0,200	0,242
ALT (U/l)	0,134	0,124	-0,056	0,099
AST (U/l)	0,038	0,171	-0,092	0,055
AFP (ng/ml)	-0,081	0,108	0,012	0,019
Grading	-0,299	0,007	-0,093	-0,059
Staging	-0,268	-0,013	0,062	-0,158
HCV RNA (IU/ml)	-0,360	-0,222	-0,092	0,004
Białko całk. (g/dl)	-0,102	0,199	-0,092	-0,011
Albuminy (g/dl)	-0,212	0,008	0,011	-0,178
Gamma-globuliny (g/dl)	-0,008	0,172	-0,074	0,015
Płytki krwi (G/l)	0,197	0,253	-0,075	0,153
Cholesterol (mg/dl)	0,136	0,018	0,099	0,060
GGTP (U/l)	-0,213	0,157	0,010	-0,078
Glukoza we krwi (mg/dl)	-0,070	0,425	0,035	0,048
HOMA-IR	-0,353	0,137	-0,111	-0,050
Insulina w surowicy (μ U/ml)	-0,246	0,010	-0,070	0,034
Estradiol w surowicy (pg/ml)	-0,109	-0,036	0,192	-0,269

Objaśnienia: wyboldowaną czcionką zaznaczono wartości współczynnika r , dla których $p < 0,05$.

Wątrobowy wskaźnik IGF-1/IGFBP-3

U pacjentów z przewlekłym zakażeniem HCV (podgrupa A) stwierdzono pozytywną korelację pomiędzy wątrobowym wskaźnikiem ekspresji IGF-1/IGFBP-3 a BMI ($r = 0,479$; $p < 0,05$) (Rycina 26). Pozostałe współczynniki korelacji Spearmana były za niskie, aby uzyskać znamienne statystycznie współzależności cech (Tabela 29).



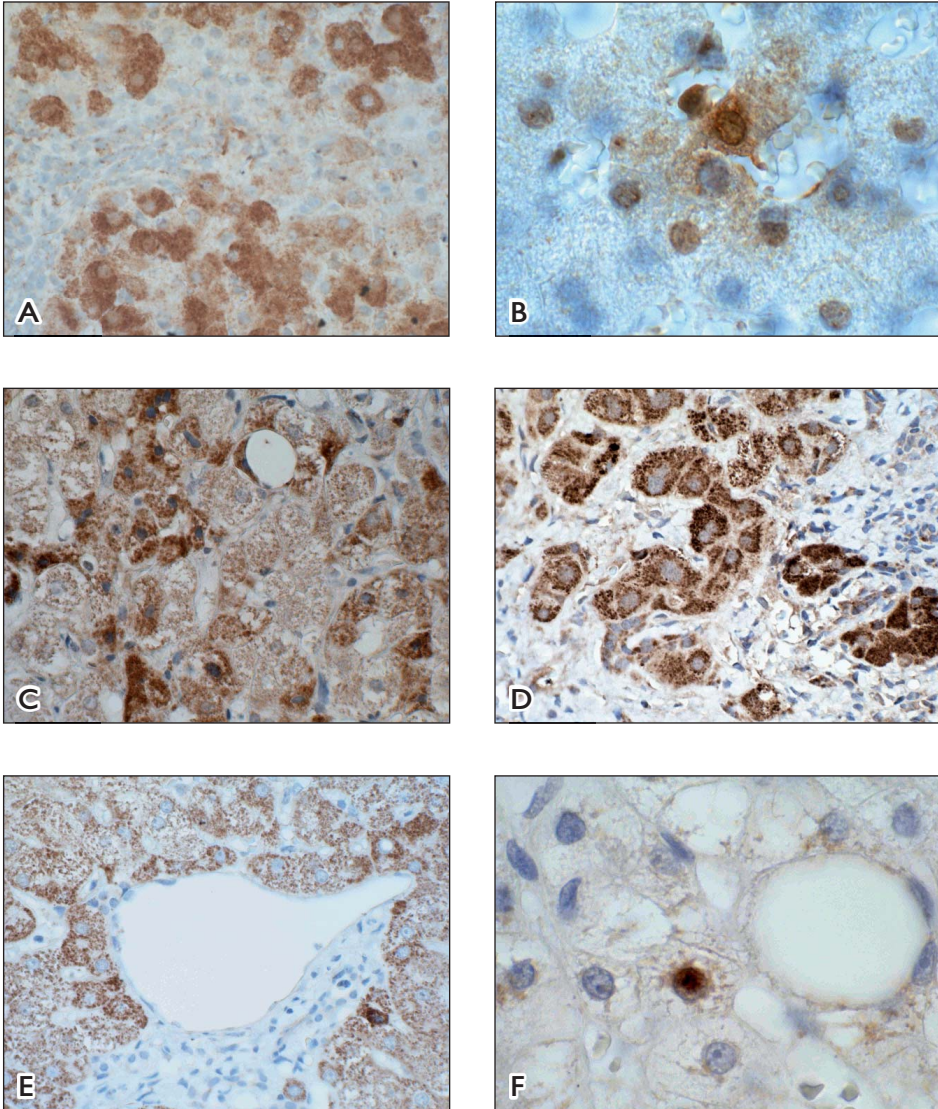
Rycina 26. Pozytywna korelacja porządku rang Spearmana pomiędzy wątrobowym wskaźnikiem IGF-1/IGFBP-3 a BMI u pacjentów z przewlekłym zakażeniem HCV (podgrupa A) ($p < 0,05$).

4.10. Ekspresja białek HCV (C, NS3 i NS5A) w wątrobie pacjentów z przewlekłym zakażeniem HCV

Tkankową ekspresję białek osi IGF odniesiono do komórkowej ekspresji 3 potencjalnie onkogennych białek HCV, tj. białka rdzeniowego (*core*, białko C) i dwóch białek niestrukturalnych: NS3 i NS5A. Tkankową ekspresję białek HCV zanalizowano u pacjentów podgrupy A i B. Lokalizacja komórkowa wszystkich białek HCV dominowała w cytoplazmie hepatocytów. Obserwowano w większości ziarnisty wzór reakcji. Pozytywna reakcja immunocytochemiczna na białko C oprócz cytoplazmy widoczna była także w pojedynczych jądrach hepatocytów (Fotografia 4A i B). Ekspresja białka NS3 również dotyczyła cytoplazmy licznych hepatocytów (w tym komórek ze zwyrodnieniem tłuszczowym) (Fotografia 4C), niekiedy o niezwykle silnym odczynie barwnym (Fotografia 4D). Białko NS5A oprócz cytoplazmy występowało również w pojedynczych jądrach hepatocytów (Fotografia 4E i F).

Analiza ekspresji z zastosowaniem 12-punktowej skali IRS wykazała przewagę białka NS3 ($10,47 \pm 2,61$) nad pozostałymi białkami: C ($8,26 \pm 3,94$) oraz NS5A ($6,23 \pm 2,53$) i wykazano większą ekspresję białka C w porównaniu z NS5A w całej badanej grupie (A+B) (Tabela 30).

Analiza z zastosowaniem morfometrycznej metody wizualizacji przestrzennej ujawniła ilościowo więcej białka C ($63,91 \pm 18,15$) w porównaniu z ekspresją białka NS5A ($36,07 \pm 18,25$). Należy dodać, iż analiza ta dotyczyła wyłącznie podgrupy A (Tabela 31).



Fotografia 4. Immunocytochemiczna lokalizacja białek HCV w wątrobie pacjentów z przewlekłym zakażeniem HCV. Cytoplazmatyczna (A) i jądrowa (B) ekspresja białka C w hepatocytach. Ekspresja białka NS3 głównie w cytoplazmie komórek wątrobowych (C, D). Lokalizacja białka NS5A w cytoplazmie (E) oraz nielicznych jądrach komórek wątrobowych (F).

Fragmety wątroby z zakażeniem HCV: (A) – pacjent P35 (nr 35); B – pacjent P41 (nr 41); C – pacjent P40 (nr 40); D – pacjent P44 (nr 44); E – pacjent P46 (nr 46); F – pacjent P41 (nr 41).

Technika ABC-ImmunoMax. Podbarwienie hematoksyliną. Optyka Nomarskiego. Pow. obiektywu x40 (A, C-E), x100 (B, F).

Tabela 30. Ekspresja białek wirusowych HCV (C, NS3 i NS5A) w biopunktatach wątroby chorych z przewlekłym zakażeniem HCV oceniona w półilościowej skali numerycznej IRS wg Remmele i Stegner (p. Materiał i metody)

Grupa	Białko wirusa HCV	n	Średnia	Mediana	Min.	Maks.	SD
A+B	Białko C	53	8,26	9,00	0,00	12,00	3,94
	NS3	53	10,47* ^{***}	12,00	0,00	12,00	2,61
	NS5A	52	6,23	6,00	0,00	12,00	2,53

Objaśnienia: min. – minimum, maks. – maksimum; SD – odchylenie standardowe; * – $p < 0,05$ pomiędzy ekspresją białka C i NS3; *** – $p < 0,001$ między ekspresją białka C i NS5A oraz białka NS3 vs. NS5A.

Tabela 31. Ekspresja białek wirusowych HCV (C, NS3 i NS5A) w biopunktatach wątroby chorych z przewlekłym zakażeniem HCV (podgrupa A) oceniona z zastosowaniem metody wizualizacji przestrzennej (p. Materiał i metody)

Grupa	Białko wirusa HCV	n	Średnia	Mediana	Min.	Maks.	SD
A	Białko C (% reakcji)	21	63,91* ^{***}	64,13	24,49	92,45	18,15
	Białko NS5A (% reakcji)	34	36,07	30,38	12,39	72,11	18,25

Objaśnienia: min. – minimum, maks. – maksimum; SD – odchylenie standardowe; *** – $p < 0,001$.

4.11. Korelacje ekspresji białek wirusa HCV (C, NS3 i NS5) z danymi klinicznymi

Białko C

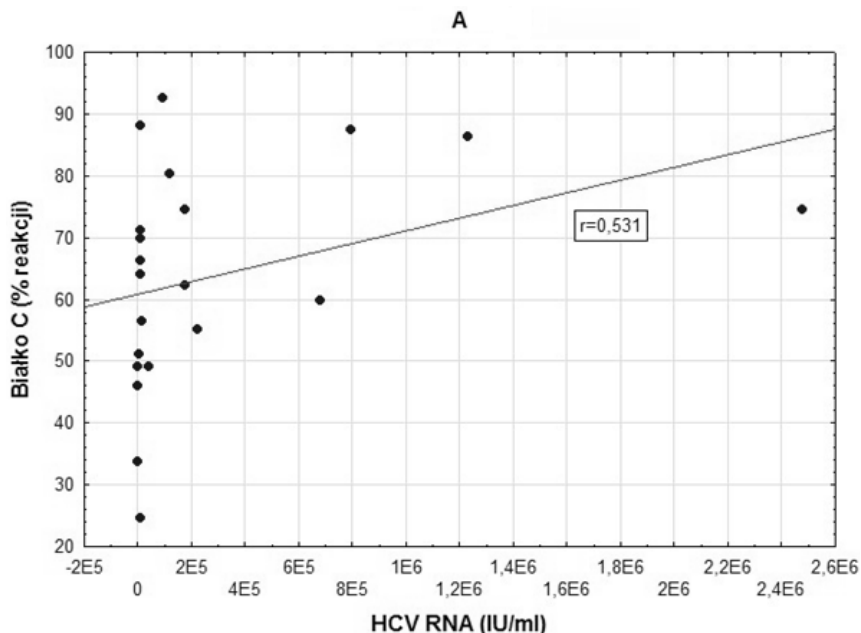
U pacjentów przewlekle zakażonych HCV z podgrupy A, ekspresja białka C wysoko pozytywnie korelowała z ładunkiem wirusa HCV ($r = 0,531$; $p < 0,05$) (Tabela 32, Rycina 27). Ponadto ekspresja tego białka negatywnie korelowała ze stężeniem całkowitego cholesterolu oraz z aktywnością GGTP (odpowiednio współczynniki korelacji Spearmana $r = -0,570$ i $r = -0,626$; $p < 0,05$ w obu przypadkach). Wykazano również negatywną korelację pomiędzy ekspresją białka rdzeniowego HCV a stopniem zaawansowania włóknienia (*staging*) u tych chorych ($r = -0,621$; $p < 0,05$) (Tabela 32).

W całej grupie badanej (A+B) negatywne korelacje białka C stwierdzono dodatkowo z *grading* i stłuszczeniem wątroby. Korelacje te były przeciętne lub słabe, współczynniki korelacji wynosiły z *grading* $r = -0,286$, ze *staging* $r = -0,454$ ($p < 0,05$ w obu przypadkach), a pomiędzy ekspresją białka C i stłuszczeniem $r = -0,307$ ($p < 0,05$). Słabą pozytywną korelację odnotowano również pomiędzy ekspresją białka C a liczbą płytek krwi ($r = 0,378$; $p < 0,05$).

Tabela 32. Współczynniki korelacji porządku rang Spearmana pomiędzy wątrobową ekspresją białka C, NS3 i NS5A (% reakcji na pole mięszu wątroby i w skali IRS), danymi kliniczno-laboratoryjnymi i histologicznymi u pacjentów z WZW typu C (podgrupa A)

Cecha statystyczna	Białko C		NS3	NS5A	
	%reakcji	skala IRS	skala IRS	%reakcji	skala IRS
Stężenie (%)	-0,160	-0,285	-0,314	-0,280	-0,281
ALT (U/l)	-0,291	-0,113	-0,286	0,085	0,081
AST (U/l)	-0,291	-0,113	-0,352	0,206	0,133
AFP (ng/ml)	-0,225	-0,091	-0,238	0,023	0,036
Grading	0,241	-0,271	-0,494	0,177	0,082
Staging	-0,114	-0,621	-0,526	0,096	0,157
HCV RNA (IU/ml)	0,531	0,059	-0,295	-0,128	-0,159
Białko całk. (g/dl)	0,111	-0,275	-0,045	0,029	0,335
Albuminy (g/dl)	0,090	-0,212	0,271	-0,100	0,365
Gamma-globuliny (g/dl)	0,020	-0,190	-0,286	0,064	0,161
Płytki krwi (G/l)	0,081	0,393	0,566	-0,021	-0,136
Cholesterol (mg/dl)	-0,570	0,049	0,109	0,058	0,058
GGTP (U/l)	-0,626	-0,344	-0,559	0,085	0,087
Glukoza we krwi (mg/dl)	-0,135	-0,247	-0,194	0,121	0,138
HOMA-IR	-0,135	-0,022	-0,109	-0,001	-0,086

Objaśnienia: wyboldowaną czcionką zaznaczono wartości współczynnika r , dla których $p < 0,05$.



Rycina 27. Korelacja Spearmana pomiędzy wątrobową ekspresją białka rdzeniowego HCV i stężeniem HCV-RNA u pacjentów z przewlekłym zakażeniem HCV (podgrupa A).

Białko NS3

Białko NS3 oceniano wyłącznie w skali IRS w dwóch podgrupach pacjentów, tj. A i B. W podgrupie A stwierdzono szereg korelacji pomiędzy ekspresją NS3 i danymi klinicznymi. Wysokie negatywne korelacje obserwowano z aktywnością zapalną (*grading*) i zaawansowaniem włóknienia (odpowiednio $r = -0,494$ i $r = -0,526$; $p < 0,05$ w obu przypadkach). Wysoką pozytywną korelację wykazano także z liczbą płytek krwi ($r = 0,566$; $p < 0,05$), zaś wysoką negatywną z aktywnością GGTP ($r = -0,559$; $p < 0,05$) (Tabela 32).

W całym badanym materiale tkankowym (grupa A+B) korelacja ze stopniem zaawansowania włóknienia (*staging*) była bardzo słaba ($r = -0,284$; $p < 0,05$).

Białko NS5A

Ekspresja białka NS5A w podgrupie A była słabo pozytywnie skorelowana jedynie ze stężeniem albumin w surowicy krwi ($r = 0,365$; $p < 0,05$) (Tabela 32). W podgrupie B wykazano dwie negatywne korelacje tego białka z danymi klinicznymi, a mianowicie ze stężeniem białka całkowitego ($r = -0,484$) oraz poziomem glukozy we krwi ($r = -0,535$) ($p < 0,05$ w obu przypadkach).

W całym zbadanym materiale (grupa A+B) słaba negatywna zależność występowała pomiędzy ekspresją białka a stłuszczeniem wątroby ($r = -0,342$; $p < 0,05$).

4.12. Wątrobowa ekspresja białek systemu IGF (IGF-1, IGFBP-3 oraz IGF-1R) a białka HCV (C, NS3 i NS5A) u pacjentów z przewlekłym zakażeniem HCV

Tkankowa ekspresja wszystkich trzech białek z rodziny IGF, tj. IGF-1, IGFBP-3 oraz IGF-1R dotyczyła wyłącznie pacjentów z podgrupy A, a ekspresję białka IGF-1 zbadano dodatkowo również w biopunktatach wątroby chorych z podgrupy B. Stąd też można było skorelować dane dotyczące ekspresji IGF-1 i białek wirusowych w podgrupie A, B oraz łącznie A+B, a IGFBP-3 i IGF-1R z białkami HCV jedynie w podgrupie A (Tabela 33).

I tak, u pacjentów z długotrwałym zakażeniem HCV (podgrupa B) wykazano wprost proporcjonalną wysoką korelację pomiędzy tkankową ekspresją IGF-1 oraz białka rdzeniowego HCV (białko C) ocenianego w półilościowej skali IRS ($r = 0,540$; $p < 0,05$) (Tabela 33). Nie potwierdzono takiej zależności w wątrobie pacjentów z podgrupy A ($r = 0,075$) ani w łącznej grupie A+B ($r = -0,009$) ($p > 0,05$ w obu przypadkach).

Nie wykazano znamienych zależności pomiędzy ekspresją pozostałych białek z rodziny IGF (IGFBP-3, IGF-1R) z białkami wirusowymi badanymi w materiale tkankowym (Tabela 33).

Tabela 33. Współczynniki korelacji porządku rang Spearmana pomiędzy wątrobową ekspresją białek z rodziny IGF (IGF-1, IGFBP-3 i IGF-1R) a białkami C, NS3 i NS5A u chorych z przewlekłym zakażeniem HCV (podgrupy A i B oraz A+B)

			Białko C		NS3	NS5A	
			% reakcji	skala IRS	skala IRS	% reakcji	Skala IRS
IGF-1	%reakcji	A	0,151	0,075	0,144	0,049	-0,249
		B	nb	0,540	0,210	nb	0,353
		A+B	nb	-0,009	0,111	nb	-0,035
IGFBP-3		A	-0,287	-0,072	0,087	-0,026	-0,035
IGF-1R		A	-0,406	0,109	0,016	0,246	0,342

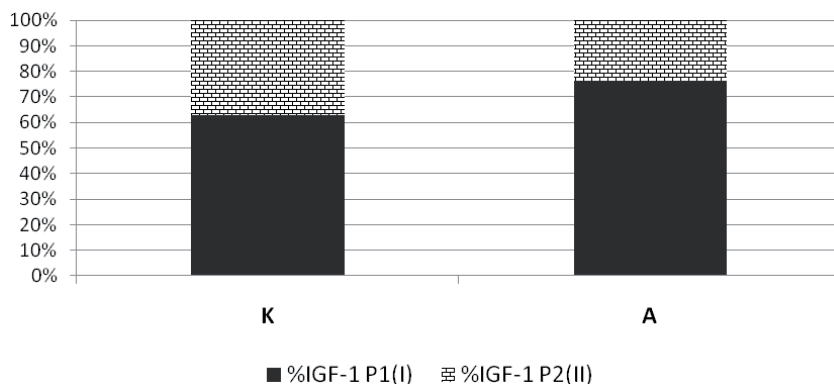
Objaśnienia: *wyboldowaną czcionką zaznaczono wartości współczynnika r, dla których p < 0,05; nb – nie badano.*

4.13. Ekspresja izoform mRNA IGF-1 w wątrobie

Analizę ekspresji izoform IGF-1 w komórkach wątroby przeprowadzono na poziomie mRNA z zastosowaniem ilościowej metody *real-time* RT-PCR. W badanym materiale pacjentów z podgrupy A oraz kontroli tkankowej zidentyfikowane zostały wszystkie możliwe izoformy mRNA IGF-1, uwzględniając zarówno alternatywne egzony 1 i 2 (w zależności od użytego promotora P1 lub P2), jak i alternatywne izoformy *splicingowe*: IGF-1A, IGF-1B i IGF-1C.

4.14. Ekspresja transkryptów klasy I i II w zależności od użytego promotora P1 lub P2

Identyfikacja egzonów 1 czy 2 pozwoliła na zbadanie poziomu ekspresji mRNA IGF-1 z udziałem promotora 1 i 2. Transkrypcja z promotora pierwszego domino-



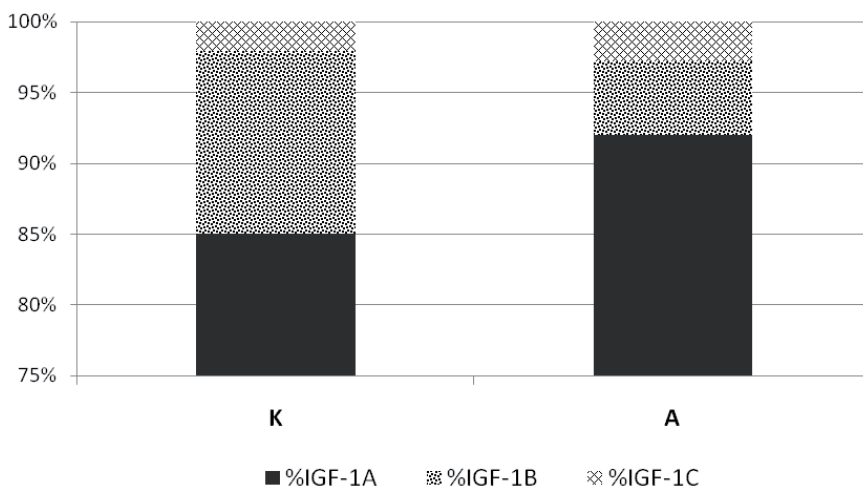
Rycina 28. Udział % badanych izoform mRNA klasy I i II IGF-1 (w zależności od użytego promotora P1 i P2) w odniesieniu do sumarycznej wartości mRNA obu promotorów IGF-1 (100%) u chorych zakażonych HCV (podgrupa A) i w kontroli.

wała zarówno u pacjentów zakażonych HCV, jak i w kontroli. W grupie badanej odsetkowy udział transkryptów klasy I (z promotora P1) i klasy II (z promotora P2) wynosił 76,4% i 23,6%, zaś w kontroli odpowiednio 62,7% i 37,3% (Rycina 28). W tym rozkładzie procentowym nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic dla P1 i P2 pomiędzy grupą badaną i kontrolą ($p > 0,05$).

W każdej z badanych grup wykazano natomiast istotnie większą ekspresję mRNA P1 w porównaniu z mRNA P2 ($p < 0,05$ w obu przypadkach).

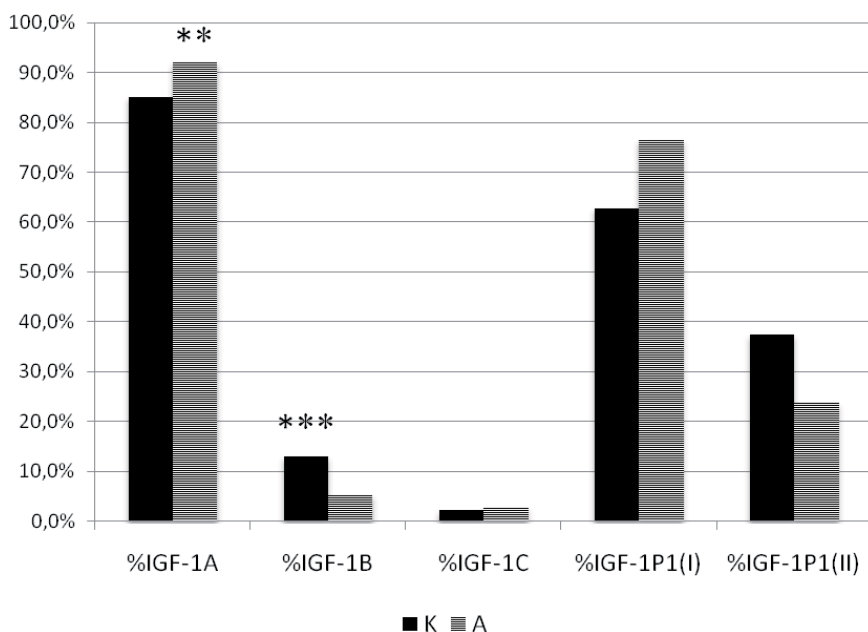
4.15. Ekspresja izoform splicingowych mRNA: IGF-1A, IGF-1B i IGF-1C – udział procentowy

U pacjentów z przewlekłym zakażeniem HCV dominowała ekspresja izoformy *splicingowej* mRNA IGF-1A, która stanowiła 92% wszystkich transkryptów. Ekspresje izoform mRNA IGF-1B i IGF-1C utrzymane były na niskim poziomie (5,2% i 2,8%, odpowiednio). Podobnie w grupie kontrolnej najwyższą ekspresję wykazywała izoforma IGF-1A (85,0%), kolejno IGF-1B (12,9%) i IGF-1C (2,1%) (Rycina 29).



Rycina 29. Udział % *splicingowych* izoform mRNA IGF-1 (IGF-1A, IGF-1B, IGF-1C) w odniesieniu do sumarycznej wartości mRNA wszystkich trzech izoform IGF-1 (100%) u chorych zakażonych HCV (grupa A) i w kontroli.

Istotne statystycznie różnice w odsetkowym udziale ekspresji izoform dotyczyły tylko izoform IGF-1A i IGF-1B. Ekspresja izoformy IGF-1A była istotnie wyższa u chorych zakażonych HCV w stosunku do kontroli (92% vs. 85%), zaś ekspresja izoformy B niższa niż w kontroli (5,2% vs. 12,9%). Nie wykazano istotnych różnic w odsetkowo wyrażonej ekspresji I i II klasy transkryptów (z promotora P1 i P2) w obu porównywanych grupach (Rycina 30).



Rycina 30. Porównanie % udziału izoform mRNA IGF-1 u chorych przewlekle zakażonych HCV (podgrupa A) i w kontroli; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$.

4.16. Porównanie ilościowe mRNA IGF-1 u chorych przewlekle zakażonych HCV i w kontroli

Szczegółowa analiza względnej ekspresji każdej z izoform mRNA IGF-1 znormalizowana względem genów referencyjnych, tj. GAPDH i HMBS, wykazała istotnie wyższą ekspresję izoform mRNA IGF-1A i IGF-1C, transkryptu klasy I (P1) oraz sumarycznego mRNA IGF-1 w grupie pacjentów zakażonych HCV w stosunku do kontroli (Tabela 34).

Tabela 34. Porównanie ilościowej ekspresji izoform mRNA IGF-1 oraz aktywności promotora I i II (średnia \pm SD) znormalizowanych względem genów referencyjnych w grupie chorych przewlekle zakażonych HCV (podgrupa A) oraz w kontroli

Izofорма mRNA IGF-1	Kontrola	Podgrupa A	p
IGF-1A	1,30 \pm 1,31*	5,28 \pm 9,94**	0,009
IGF-1B	0,18 \pm 0,18	0,28 \pm 0,40	0,486
IGF-1C	0,04 \pm 0,05	0,21 \pm 0,57	0,031
P1 (klasa I)	0,19 \pm 0,21*	0,45 \pm 0,45**	0,025
P2 (klasa II)	0,08 \pm 0,07	0,15 \pm 0,17	0,164
Całkowity IGF-1	1,52 \pm 1,52	5,77 \pm 10,85	0,014

Objaśnienia: p – poziom istotności; * – $p < 0,05$ pomiędzy ekspresją izoformy A i B, A i C, B i C oraz P1 i P2 w grupie kontrolnej; ** – $p < 0,01$ pomiędzy ekspresją izoformy A i B, A i C, B i C oraz P1 i P2 w grupie z WZW typu C.

W obrębie grupy badanej i kontroli również wykazano największą ekspresję mRNA izoformy A w porównaniu z B i C. Większa była ekspresja IGF-1A w porównaniu z IGF-1B i C, IGF-1B w porównaniu z IGF-1C, oraz ekspresja mRNA P1 w porównaniu z P2 ($p < 0,05$ we wszystkich przypadkach).

Istotnie wyższą ekspresję wszystkich izoform i klas mRNA IGF-1 oraz sumarycznego IGF-1 stwierdzono u kobiet (Tabela 35).

Tabela 35. Różnice w ekspresji izoform i klas mRNA IGF-1 (średnia \pm SD) w zależności od płci pacjentów z podgrupy A

Izoforma mRNA IGF-1	Kobiety	Mężczyźni	p
IGF-1A	7,88 \pm 13,83	2,97 \pm 3,32	0,027
IGF-1B	0,35 \pm 0,45	0,22 \pm 0,35	0,042
IGF-1C	0,35 \pm 0,82	0,08 \pm 0,06	0,046
P1 (klasa I)	0,63 \pm 0,59	0,28 \pm 0,17	0,003
P2 (klasa II)	0,20 \pm 0,15	0,11 \pm 0,18	0,006
Całkowity IGF-1	8,58 \pm 15,09	3,26 \pm 3,70	0,027

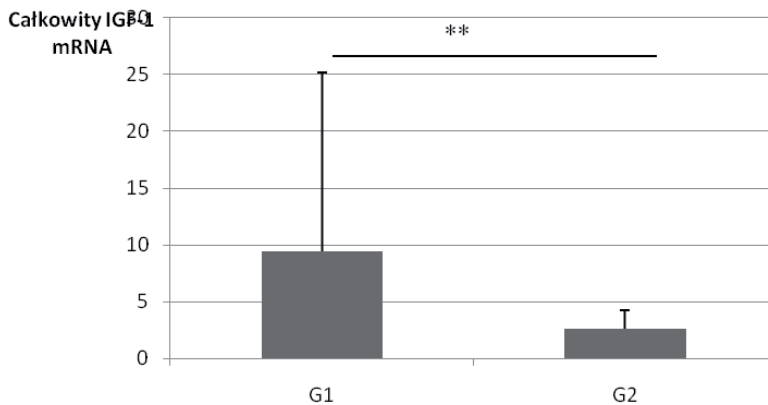
Objaśnienia: p – poziom istotności.

Porównując ekspresję mRNA różnych izoform i obu klas promotorów IGF-1 w zależności od ocenionych punktowo parametrów histologicznych (*grading* i *staging*), istotne różnice stwierdzono tylko w różnych stopniach aktywności zapalnej. W wątrobie z bardziej nasilonymi zmianami zapalnymi (G2) wykazano obniżenie ekspresji wszystkich postaci transkryptów IGF-1 badanych w pracy w porównaniu z G1, z wyjątkiem mRNA izoformy IGF-1C (Tabela 36, Rycina 31).

Tabela 36. Różnice w ekspresji mRNA izoform i klas IGF-1 (średnia \pm SD) w zależności od stopnia aktywności zapalnej (*grading*) oraz zaawansowania włóknienia (*staging*) u pacjentów z podgrupy A

Izoforma mRNA IGF-1	Grading* 1 (n = 15)	Grading 2 (n = 16)	Staging* 1 (n = 21)	Staging 2 (n = 8)
IGF-1A	8,67 \pm 14,34	2,42 \pm 1,45	6,55 \pm 12,47	3,01 \pm 1,77
	p = 0,008		p = 0,943	
IGF-1B	0,44 \pm 0,55	0,15 \pm 0,10	0,34 \pm 0,49	0,18 \pm 0,12
	p = 0,012		p = 0,720	
IGF-1C	0,36 \pm 0,84	0,08 \pm 0,06	0,27 \pm 0,72	0,09 \pm 0,07
	p = 0,093		p = 0,582	
P1 (klasa I)	0,63 \pm 0,61	0,33 \pm 0,20	0,50 \pm 0,55	0,41 \pm 0,23
	p = 0,037		p = 0,905	
P2 (klasa II)	0,25 \pm 0,22	0,09 \pm 0,06	0,19 \pm 0,20	0,11 \pm 0,07
	p = 0,009		p = 0,549	
Całkowity IGF-1	9,47 \pm 15,66	2,65 \pm 1,58	7,16 \pm 13,61	3,29 \pm 1,91
	p = 0,006		p = 0,830	

Objaśnienia: n – liczba pacjentów; * – parametry ocenione w skali półilościowej (p. Materiał i metody).



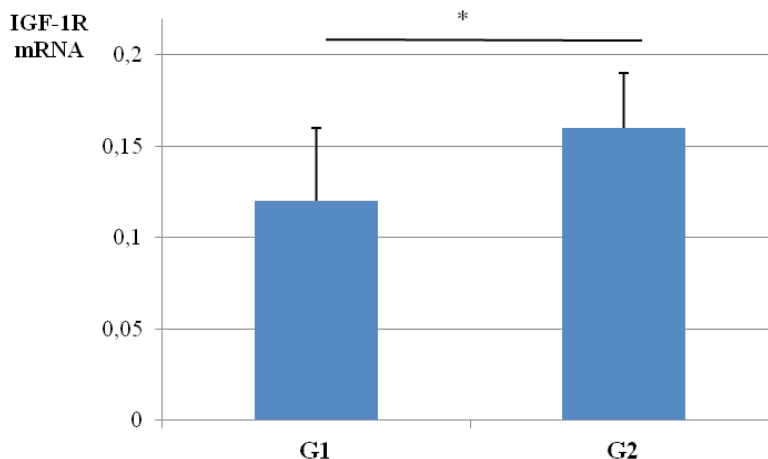
Rycina 31. Ekspresja mRNA IGF-1 w zależności od aktywności zapalnej w wątrobie pacjentów z przewlekłym zakażeniem HCV (podgrupa A); ** – $p < 0,01$.

Pomimo niższej ekspresji mRNA wszystkich izoform także w wątrobie z bardziej zaawansowanym włóknieniem, nie udało się wykazać różnic statystycznie istotnych dla badanych cech ($p > 0,05$ we wszystkich przypadkach) (Tabela 36).

4.17. Ekspresja mRNA receptora IGF-1R

W grupie przewlekle zakażonych HCV ekspresja transkryptu receptora IGF-1R była znamienne niższa w stosunku do kontroli ($0,14 \pm 0,04$ vs. $0,26 \pm 0,18$; $p < 0,05$). Nie obserwowano różnic w ekspresji IGF-1R w zależności od płci (Tabela 37).

Ekspresja mRNA IGF-1R była natomiast wyższa w wątrobie z nasileniem zmian zapalnych określonych jako *grading 2* w porównaniu z ekspresją uwidocznioną w mniej nasilonych zmianach zapalnych wątroby (G1) (Tabela 38, Rycina 32).



Rycina 32. Ekspresja mRNA IGF-1R w zależności od aktywności zapalnej w wątrobie pacjentów z przewlekłym zakażeniem HCV (podgrupa A); * – $p < 0,05$.

4.18. Ekspresja mRNA czynnika transkrypcyjnego SP1

Analiza ekspresji mRNA czynnika SP1, regulatora aktywności P1 i P2, z zastosowaniem metody *real-time* RT-PCR wykazała obniżenie jego poziomu u chorych przewlekle zakażonych HCV w stosunku do kontroli ($0,42 \pm 0,23$ vs. $5,51 \pm 12,8$) (Tabela 37). Nie stwierdzono różnic płciowych w ekspresji czynnika SP1 ani w zależności od stopnia nasilenia zmian histopatologicznych w wątrobie (Tabela 37 i 38).

Tabela 37. Porównanie ilościowej ekspresji izoform mRNA IGF-1R oraz czynnika transkrypcyjnego SP1 (średnia \pm SD) znormalizowanych względem genów referencyjnych w grupie chorych przewlekle zakażonych HCV (podgrupa A) i w kontroli oraz różnice w ekspresji mRNA IGF-1R i SP1 w podgrupie A w zależności od płci

Badany transkrypt	Kontrola (n = 7)	Podgrupa badana A (n = 32)	Podgrupa badana A	
			Kobiety (n = 15)	Mężczyźni (n = 17)
mRNA IGF-1R	$0,26 \pm 0,18$	$0,14 \pm 0,04$	$0,14 \pm 0,05$	$0,14 \pm 0,04$
	p = 0,016		p = 0,295	
mRNA SP1	$5,71 \pm 12,8$	$0,42 \pm 0,23$	$0,38 \pm 0,22$	$0,45 \pm 0,24$
	p < 0,001		p = 0,278	

Objaśnienia: n – liczba pacjentów; p – poziom istotności.

Tabela 38. Różnice w ekspresji mRNA receptora typu I IGF (IGF-1R) oraz czynnika transkrypcyjnego SP1 (średnia \pm SD) w zależności od stopnia aktywności zapalnej (*grading*) oraz zaawansowania włóknienia (*staging*) u pacjentów z podgrupy A.

Badany transkrypt	Grading* 1 (n = 13)	Grading 2 (n = 16)	Staging* 1 (n = 19)	Staging 2 (n = 8)
IGF-1R	$0,12 \pm 0,04$	$0,16 \pm 0,03$	$0,14 \pm 0,04$	$0,16 \pm 0,04$
	p = 0,025		p = 0,198	
SP1	$0,36 \pm 0,25$	$0,46 \pm 0,24$	$0,41 \pm 0,25$	$0,42 \pm 0,26$
	p = 0,215		p = 0,897	

Objaśnienia: n – liczba pacjentów; * – parametry ocenione w skali półilościowej (p. Materiał i metody).

4.19. Korelacje pomiędzy ekspresją izoform mRNA IGF-1, mRNA IGF-1R i mRNA SP1 a danymi klinicznymi

4.19.1. Izoformy mRNA IGF-1 a dane kliniczne

U pacjentów przewlekle zakażonych HCV ekspresja sumarycznego mRNA IGF-1 oraz wszystkich izoform bardzo silnie negatywnie korelowała z wiekiem pacjenta oraz wartością BMI (Tabela 39). Stwierdzono również negatywne korelacje wszystkich izoform ze stopniem stłuszczenia w wątrobie. Wysokie negatywne korelacje obserwowano z aktywnością ALT, a nieco mniejsze (również negatyw-

ne) z AST (Tabela 39). Ekspresja izoform IGF-1A, IGF-1B, P1 i P2 negatywnie korelowała ze stopniem aktywności zapalnej, przy czym najwyższy współczynnik korelacji stwierdzono dla mRNA klasy II (P2) ($r = -0,569$; $p < 0,05$).

Biorąc pod uwagę *staging*, jedyną istotną, choć dość słabą negatywną korelację z tym parametrem w wątrobie stwierdzono dla mRNA klasy II (P2) ($r = -0,364$; $p < 0,05$). Podobnie w przypadku ekspresji mRNA klasy II (P2) jako jedynej wykazano, dość słabą istotną negatywną zależność tej postaci izoformy ze stężeniem AFP ($r = -0,390$; $p < 0,05$). Z ładunkiem wirusa HCV słabo negatywnie korelowała również ekspresja transkryptu klasy II (P2) ($r = -0,388$; $p < 0,05$), podobnie niskie były korelacje HCV-RNA z mRNA IGF-1A i całkowitego mRNA IGF-1 (odpowiednio: $r = -0,357$; $r = -0,345$; $p < 0,05$ w obu przypadkach).

Wszystkie korelacje poszczególnych izoform i klas transkryptów IGF-1 z danymi klinicznymi przedstawiono w Tabeli 39.

Tabela 39. Wartości współczynnika korelacji Spearmana pomiędzy ekspresją mRNA izoform IGF-1 (IGF-1A, IGF-1B i IGF-1C), mRNA promotorów klasy I (P1) i II (P2) oraz sumarycznego mRNA IGF-1 z danymi klinicznymi

Cecha statystyczna	IGF-1A	IGF-1B	IGF-1C	P1	P2	Całk. IGF-1
Wiek (lata)	-0,582	-0,654	-0,532	-0,545	-0,644	-0,596
BMI	-0,468	-0,414	-0,489	-0,527	-0,452	-0,468
Grading	-0,446	-0,430	-0,285	-0,431	-0,569	-0,457
Staging	-0,182	-0,187	-0,160	-0,223	-0,346	-0,190
Stłuszczenie (%)	-0,412	-0,408	-0,454	-0,415	-0,571	-0,422
ALT (U/l)	-0,540	-0,577	-0,533	-0,538	-0,616	-0,550
AST (U/l)	-0,378	-0,400	-0,342	-0,434	-0,569	-0,392
AFP (ng/ml)	-0,168	-0,271	-0,240	-0,291	-0,390	-0,180
HCV RNA (IU/ml)	-0,357	-0,244	-0,096	-0,330	-0,388	-0,345
Białko całk. (g/dl)	0,324	0,375	0,366	0,302	0,251	0,319
Albuminy (g/dl)	0,303	0,349	0,222	0,293	0,381	0,295
Gamma-globuliny (g/dl)	0,039	0,045	0,174	-0,061	-0,164	0,044
Płytki krwi (G/l)	0,235	0,265	0,138	0,273	0,372	0,232
Cholesterol (mg/dl)	0,409	0,405	0,372	0,386	0,286	0,404
GGTP (U/l)	-0,284	-0,399	-0,367	-0,384	-0,603	-0,307
Glukoza we krwi (mg/dl)	-0,190	-0,112	-0,084	-0,083	-0,226	-0,201
HOMA-IR	-0,237	-0,140	-0,184	-0,067	-0,157	-0,234
Insulina w surowicy (μ U/ml)	-0,145	-0,079	-0,125	-0,020	-0,082	-0,135
Estradiol w surowicy (pg/ml)	0,238	0,271	0,223	0,311	0,372	0,250

Objaśnienia: **wyboldowaną czcionką** zaznaczono wartości współczynnika r , dla których $p < 0,05$.

4.19.2. Ekspresja transkryptów IGF-1R i SP1 a dane kliniczne

U pacjentów przewlekle zakażonych HCV zarówno ekspresja mRNA IGF-1R, jak i SP1 dodatkowo korelowały z wiekiem chorych (odpowiednio: $r = 0,372$ i $r = 0,453$; $p < 0,05$ w obu przypadkach). Ponadto stwierdzono dodatnie korelacje tkankowej ekspresji mRNA IGF-1R ze stopniem aktywności zapalnej (*grading*) ($r = 0,456$) i ładunkiem wirusowym (HCV-RNA) ($r = 0,403$) ($p < 0,05$ w obu przypadkach).

Ekspresja transkryptu SP1 była wprost proporcjonalna do aktywności GGTP ($r = 0,493$; $p < 0,05$). W stosunku do pozostałych danych klinicznych nie obserwowano innych istotnych korelacji (Tabela 40). Nie zanotowano istotnych korelacji pomiędzy ekspresją mRNA IGF-1R i SP1 oraz mRNA IGF-1 a stężeniem estradiolu również w grupie zakażonych HCV mężczyzn.

Tabela 40. Współczynniki korelacji porządku rang Spearmana pomiędzy ekspresją mRNA IGF-1R i SP-1 z danymi klinicznymi

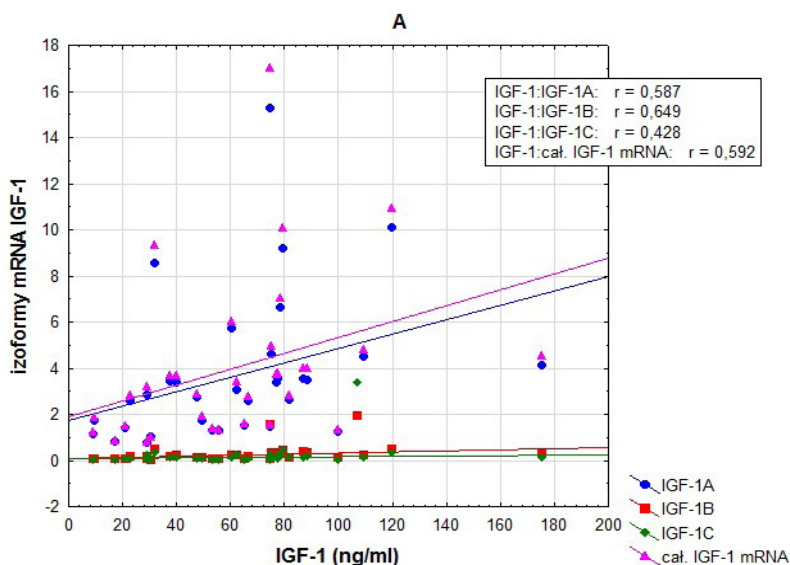
Cecha statystyczna	IGF-1R	SP-1
Wiek (lata)	0,372	0,453
BMI	0,060	0,280
<i>Grading</i>	0,456	0,324
<i>Staging</i>	0,264	0,260
Stłuszczenie (%)	0,125	0,349
ALT (U/l)	0,181	0,343
AST (U/l)	0,212	0,269
AFP (ng/ml)	0,311	0,341
HCV RNA (IU/ml)	0,403	0,146
Białko całk. (g/dl)	0,141	0,012
Albuminy (g/dl)	0,123	0,086
Gamma-globuliny (g/dl)	0,138	-0,045
Płytki krwi (G/l)	-0,099	0,063
Cholesterol (mg/dl)	0,048	-0,178
GGTP (U/l)	0,330	0,493
Glukoza we krwi (mg/dl)	0,152	0,019
HOMA-IR	-0,019	0,036
Insulina w surowicy (μ U/ml)	-0,045	0,102
Estradiol w surowicy (pg/ml)	-0,276	-0,334

Objaśnienia: *wyboldowaną czcionką zaznaczono wartości współczynnika r , dla których $p < 0,05$.*

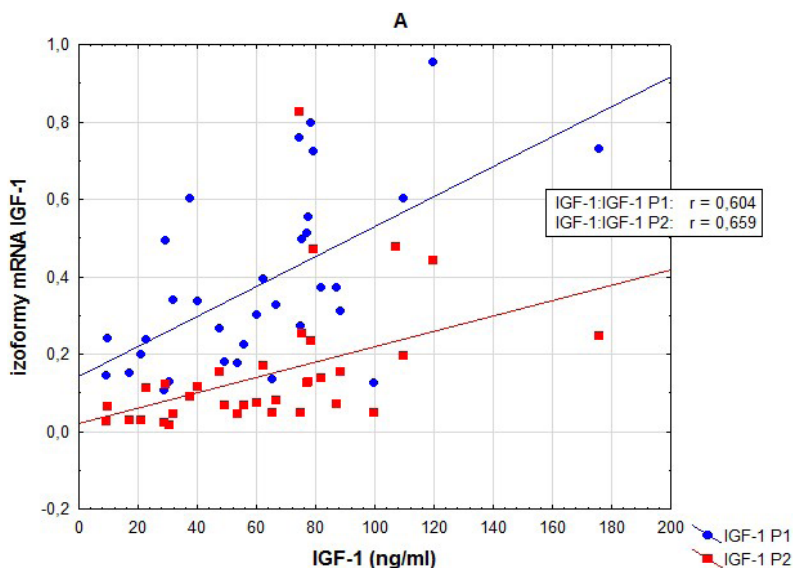
4.20. Izoformy mRNA IGF-1, mRNA IGF-1R i mRNA SP1 a surowicze stężenie IGF-1

W grupie badanej ekspresja wszystkich izoform mRNA IGF-1 (IGF-1A, IGF-1B i IGF-1C) oraz obu klas transkryptów I (P1) i II (P2) była wprost proporcjonalna do surowiczego stężenia IGF-1 (Rycina 33 i 34). Na uwagę zasługują wysokie współczynniki korelacji (r blisko 0,6 i powyżej) dotyczące zwłaszcza korelacji stę-

żenia IGF-1 w surowicy z ilością mRNA izoformy A i B i sumarycznego mRNA IGF-1 (Rycina 33) oraz pomiędzy stężeniem IGF-1 a mRNA obu promotorów (P1 i P2) IGF-1 (Rycina 34).

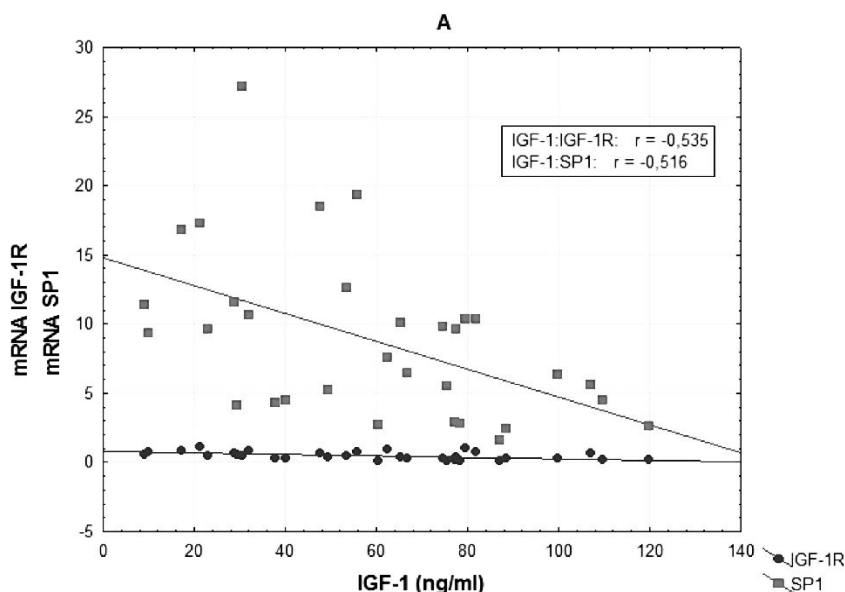


Rycina 33. Pozytywne korelacje porządku rang Spearmana pomiędzy mRNA izoform IGF-1 (IGF-1A, IGF-1B, IGF-1C) i sumarycznym mRNA IGF-1 w wątrobie a surowiczym stężeniem IGF-1 (podgrupa A).



Rycina 34. Pozytywne korelacje porządku rang Spearmana pomiędzy ekspresją mRNA klas transkryptów (P1 i P2) w wątrobie a surowiczym stężeniem IGF-1 (podgrupa A).

Natomiast w przypadku analizy wzajemnych zależności pomiędzy ekspresją transkryptów IGF-1R i SP1 z surowiczym stężeniem IGF-1, niższe stężenie IGF-1 w surowicy krwi współistniało z większą ekspresją mRNA IGF-1R oraz mRNA czynnika transkrypcyjnego SP1 (Rycina 35).



Rycina 35. Negatywne korelacje Spearmana pomiędzy ekspresją mRNA IGF-1R i mRNA SP1 a surowiczym stężeniem IGF-1.

4.21. Izoformy mRNA IGF-1, mRNA IGF-1R i mRNA SP1 a surowicze stężenie pozostałych białek z rodziny IGF

Nie stwierdzono żadnych istotnych korelacji pomiędzy ekspresją mRNA izoform IGF-1, mRNA IGF-1R oraz mRNA SP1 a oznaczonymi surowiczymi stężeniami IGF-1R, IGFBP-3 i IGFBP-6. Przykładowo współczynnik korelacji Spearmana między tkankową ekspresją mRNA IGF-1R a surowiczym stężeniem tego białka wynosił jedynie $r = -0,300$ ($p > 0,05$).

4.22. Izoformy mRNA IGF-1 i mRNA IGF-1R a białka wirusa HCV

Spśród badanych izoform mRNA IGF-1 oraz mRNA receptora IGF-1 (IGF-1R), jedyne pozytywne (i to dość słabe) korelacje ujawniono pomiędzy ekspresją mRNA klasy I (P1) IGF-1 i ekspresją białka NS5A ($r = 0,386$; $p < 0,05$) oraz ekspresją mRNA klasy II (P2) IGF-1 i ekspresją białka NS3 ($r = 0,371$; $p < 0,05$).

Ekspresja transkryptu IGF-1R w wątrobie pacjentów podgrupy A nie była skorelowana z żadnym z białek HCV ($r = -0,196$ dla korelacji z białkiem C; $r = -0,316$ z NS3 oraz $r = -0,158$ z NS5A; $p > 0,05$ we wszystkich przypadkach).

4.23. Wzajemne korelacje pomiędzy ekspresją mRNA izoform IGF-1, mRNA IGF-1R i mRNA SP1

Bardzo wysokie pozytywne korelacje stwierdzono pomiędzy wzajemną ekspresją izoform transkryptów IGF-1 (P1, P2, A, B i C) u pacjentów z WZW typu C (Tabela 41) i w kontroli (Tabela 42).

Tabela 41. Wzajemne korelacje Spearmana pomiędzy ekspresją izoform mRNA IGF-1, IGF-1R i SP1 w wątrobie pacjentów z przewlekłym zakażeniem HCV (podgrupa A)

Izoforma	IGF-1A	IGF-1B	IGF-1C	P1	P2	Całk. IGF-1	IGF-1R	SP1
IGF-1A		0,956	0,869	0,891	0,821	0,998	-0,397	-0,575
IGF-1B	0,956	-	0,868	0,854	0,813	0,961	-0,419	-0,621
IGF-1C	0,869	0,868	-	0,839	0,741	0,878	-0,152	-0,594
Klasa I (P1)	0,891	0,854	0,839	-	0,876	0,886	-0,290	-0,529
Klasa II (P2)	0,821	0,813	0,741	0,876	-	0,827	-0,294	-0,470
Całk. IGF-1	0,998	0,961	0,878	0,886	0,827	-	-0,397	-0,581
IGF-1R	-0,397	-0,419	-0,152	-0,290	-0,294	-0,397	-	0,735
SP1	-0,575	-0,621	-0,594	-0,529	-0,470	-0,581	0,735	-

Objaśnienia: wyboldowaną czcionką zaznaczono wartości współczynnika r , dla których $p < 0,05$.

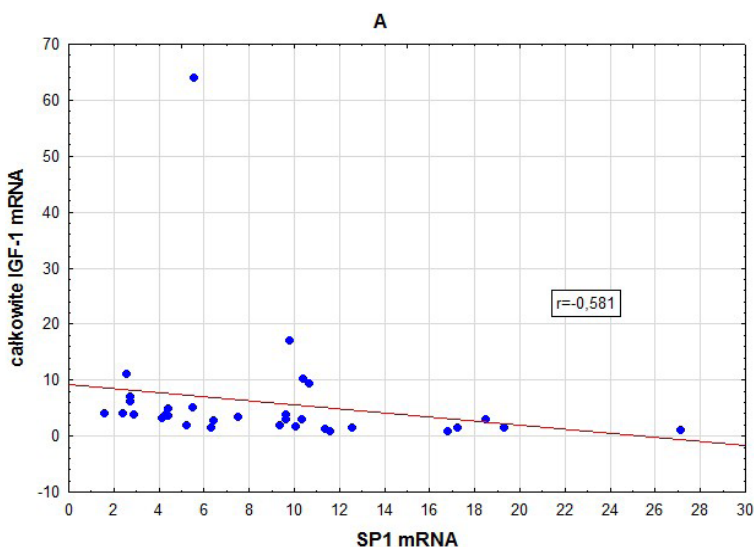
Tabela 42. Wzajemne korelacje Spearmana pomiędzy ekspresją izoform mRNA IGF-1, IGF-1R i SP1 w grupie kontrolnej (zdrowa wątroba)

Izoforma	IGF-1A	IGF-1B	IGF-1C	P1	P2	Całk. IGF-1	IGF-1R	SP1
IGF-1A		0,964		0,929	0,929		-0,214	-0,786
IGF-1B	0,964	-	0,964	0,964	0,893	0,964	-0,357	-0,857
IGF-1C		0,964	-	0,929	0,929		-0,214	-0,786
Klasa I (P1)	0,929	0,964	0,929	-	0,821	0,929	-0,500	-0,929
Klasa II (P2)	0,929	0,893	0,929	0,821	-	0,929	-0,036	-0,679
Całk. IGF-1		0,9641		0,929	0,929	-	-0,214	-0,786
IGF-1R	-0,214	-0,357	-0,214	-0,500	-0,036	-0,214	-	0,714
SP1	-0,786	-0,857	-0,786	-0,929	-0,679	-0,786	0,714	-

Objaśnienia: wyboldowaną czcionką zaznaczono wartości współczynnika r , dla których $p < 0,05$.

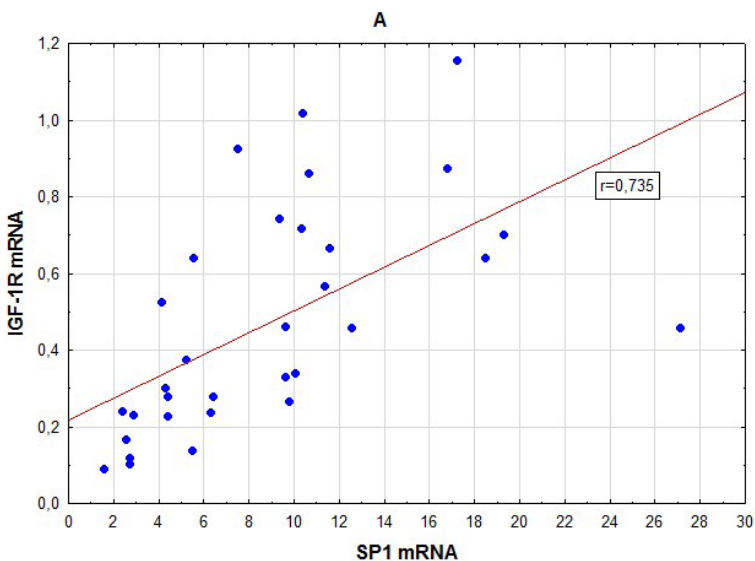
W przewlekłym zakażeniu HCV istotne negatywne korelacje zanotowano pomiędzy ekspresją mRNA IGF-1R i ilością mRNA izoformy IGF-1A ($r = -0,397$), IGF-1B ($r = -0,419$) i sumarycznej wartości ekspresji mRNA IGF-1 ($r = -0,397$) ($p < 0,05$ we wszystkich przypadkach).

Ekspresja mRNA czynnika transkrypcyjnego SP1 była wysoko negatywnie skorelowana z ekspresją wszystkich izoform IGF-1 (w tym z mRNA izoform klasy I i II promotorów genu *IGF-1*) (Tabela 41) i sumarycznym mRNA IGF-1 (Rycina 36). W kontroli (zdrowa wątroba) również potwierdzono negatywne korelacje pomiędzy ekspresją mRNA SP1 i mRNA izoform A, B i C genu IGF-1 oraz z mRNA P1 (Tabela 42).



Rycina 36. Negatywna korelacja Spearmana pomiędzy ekspresją mRNA SP1 a mRNA całkowitego IGF-1 u pacjentów z przewlekłym zakażeniem HCV (podgrupa A).

U pacjentów z WZW typu C wysoką pozytywną korelację stwierdzono natomiast pomiędzy ekspresją mRNA SP1 a mRNA IGF-1R ($r = 0,735$; $p < 0,05$) (Rycina 37). Nie udało się wykazać zależności statystycznie istotnej pomiędzy ekspresją transkryptu SP1 i mRNA IGF-1R w grupie kontrolnej, choć współczynnik korelacji pomiędzy badanymi parametrami był również bardzo wysoki (Tabela 42).



Rycina 37. Pozytywna korelacja Spearmana pomiędzy ekspresją transkryptu SP1 i mRNA IGF-1R u pacjentów z przewlekłym zakażeniem HCV (podgrupa A).

5. Dyskusja

Składniki systemu IGF pełnią ważną funkcję autokrynową, parakrynową i endokrynową w promocji wzrostu różnych tkanek i narządów. Syntetyzowanie obu IGF-ów zachodzi głównie w wątrobie, chociaż produkcja tych białek może odbywać się w każdej komórce organizmu człowieka [Obrepalska-Stęplowska i wsp., 2005; Wu i Zhu, 2011; Kasprzak i Adamek, 2012]. Sugerowana rola obu IGF-ów oraz receptorów IGF w rozwoju HCC wynika przede wszystkim z obserwacji silnego mitogennego działania tych czynników w warunkach *in vitro* [Scharf i wsp., 1998; Huynh i wsp., 2002]. Komórki hodowane raka wątroby produkują zarówno mRNA IGF-1 [Tsai i wsp., 1988], jak i IRS-1 (*Insulin receptor substrate-1*) [Sharf i wsp., 1998]. IRS-1 jest białkiem zaangażowanym w transdukcję sygnału za pośrednictwem receptora typu I IGF (IGF-1R). Nadekspresję tego białka w HCC w porównaniu z normalną nieguzową tkanką wykazały badania z lat 90. ubiegłego wieku [Nishiyama i Wands, 1992; Tanaka i wsp., 1997]. Podanie insuliny do fragmentów materiału biopsyjnego wątroby wykazało 2–3-krotny wzrost zawartości białka IRS oraz receptora insulinowego (IR) w HCV zakażonej wątrobie w porównaniu z materiałem HCV-negatywnym [Aytug i wsp., 2003].

Dane z piśmiennictwa dotyczące roli lokalnej ekspresji receptora IGF-1 są niespójne. W przednowotworowych zmianach ogniskowych w wątrobie i w komórkach już rozwiniętego HCC oraz w liniach komórkowych wykazano wzrost ekspresji IGF-1R [Scharf i wsp., 2001; Morali i wsp., 2005]. Inni badacze obserwowali niższe poziomy ekspresji IGF-1R u ok. 40% pacjentów z HCC w porównaniu z kontrolą [Huynh i wsp., 2002]. W badaniach ekspresji tkankowej IGF-1R w liniach komórkowych nadekspresja tego składnika osi IGF ma świadczyć o złośliwym fenotypie tych komórek. Podawanie monoklonalnych przeciwciał anti-IGF-1R (*alpha IR3*) w zależności od dawki wywierało hamujący wpływ na proliferację komórkową i/lub indukcję apoptozy w komórkach HepG2 [Zhang i wsp., 2006]. Molekularne mechanizmy nadmiernej produkcji IGF-1R w kancerogenezie wątrobowej wydają się być bardzo złożone [przegląd tematu: Alexia i wsp., 2004]. Wykazano również, iż mutacja, która odpowiada za nadprodukcję IGF-1R w niektórych HCC dotyczy genu p53 (*p53mt249*) [Lee i wsp., 2003]. Ta sama mutacja nasila transkrypcję IGF-2 z płodowego promotora P4 genu, co doodzi udziału również IGF-2 w kancerogenezie wątrobowej [Lee i wsp., 2000].

Rola systemu IGF w kancerogenezie wątrobowej związanej z przewlekłym zakażeniem HCV jest niejasna. Wyjaśnianie roli składników osi IGF może mieć implikacje terapeutyczne. Wykazano bowiem, że podanie selektywnych inhibitorów IGF-1R zmniejszało efekty indukowane przez IGF-1 i było związane ze

znaczącą redukcją wzrostu guza [Breuhahn i wsp., 2010]. Nieliczne prace badawcze wskazują na możliwość aktywowania promotorów genów IGF-2 i IGF-2R przez HBV i HCV [Kim i wsp., 1996; Nardone i wsp., 1996; Sohda i wsp. 1997]. Istnieją wyniki badań, które zwracają uwagę na rolę polimorfizmów promotora genu IGF-1 w kancerogenezie u ludzi. Polimorfizmy te mogą wpływać na zróżnicowaną ekspresję *IGF-1* w różnych tkankach. Jednym z dokładniej zbadanych polimorfizmów genu IGF-1 jest sekwencja składająca się z wielu powtórzeń cytozyna-adenina (CA), która obecna jest w rejonie regulatorowym 5' promotora genu IGF-1 [Rotwein i wsp., 1986]. Niedawne badania Weng i wsp. wykazały, iż obecność powtórzeń adenina-adenina (AA) lub adenina-guanina (AG) w genie IGF-2R oraz obecność powtórzeń AA w genie IGF-2 (+3580 AA *genotype*) są potencjalnymi protektorami przed WZW typu C [Weng i wsp., 2010]. Wyniki tych badań nie potwierdziły jednak żadnych korelacji pomiędzy występowaniem polimorfizmów genów osi IGF (IGF-1, IGF-2, IGF-1R, IGF-2R, IGFBP-3, insulina) a specyficznymi dla wątroby klinicznymi i histologicznymi markerami w surowicy krwi [Weng i wsp., 2010].

Wykazuje się również bezpośrednie interakcje białek HCV i składników systemu IGF oraz ich rolę w onkogenezie wątrobowej. Istnieją pojedyncze prace na ten temat oparte o wyniki w systemach *in vitro*. W linii komórek HepG2 wykazano, że białko rdzeniowe HCV (białko C) zwiększa endogenną ekspresję IGF-2, będąc pozytywnym regulatorem jego transkrypcji i może promować podziały komórkowe [Lee i wsp., 2001]. Najwięcej prac nad składnikami osi IGF pod kątem udziału w kancerogenezie poświęcono obu IGF-om (1 i 2), IGF-1R oraz IGFBP-3 [Brokaw i wsp., 2007; Su i wsp., 2010; Weng i wsp., 2010; Wu i Zhu, 2011].

W obecnej pracy założenia badawcze dotyczyły przede wszystkim IGF-1, receptora typu I (IGF-1R) oraz białka wiążącego IGFBP-3. Ponieważ nie ma danych dotyczących poziomu ekspresji wariantów (izoforn) IGF-1 w komórkach z czynną replikacją HCV, badanie to stanowiło cel o znaczeniu poznawczym. Połączenie badań nad ekspresją potencjalnie onkogennych białek HCV (C, NS3 i NS5A) oraz izoforn IGF-1 (białka i transkrypty) z zastosowaniem technik biologii molekularnej, zdaniem autorki, miało pozwolić na bliższe określenie zmian w ekspresji genowej IGF-1 i IGF-1R, które mają udział w progresji zapalenia wątroby i transformacji nowotworowej u pacjentów z przewlekłym zakażeniem HCV.

Aby zrealizować cel, oceniono surowicze stężenia białek z rodziny IGF (IGF-1, IGFBP-3 i IGFBP-6 oraz IGF-1R) u pacjentów z WZW typu C. U chorych, u których dysponowano materiałem tkankowym (biopsje wątroby) możliwe było poznanie ekspresji wybranych składników rodziny IGF oraz białek HCV z zastosowaniem kompleksowych technik badawczych. Nowatorskim i poznawczym aspektem pracy była ocena poziomu ekspresji mRNA różnych izoforn IGF-1 (alternatywny *splicing*), poziomu ekspresji mRNA IGF-1R oraz mRNA czynnika transkrypcyjnego SP-1 u pacjentów z przewlekłym uszkodzeniem wątroby na tle zakażenia HCV. Wszystkie badania wykonano przed włączeniem leczenia przeciwwirusowego.

5.1. Stężenia białek z rodziny IGF w surowicy a wskaźniki funkcji wątroby

IGF-1

Na wartość surowiczego stężenia IGF-1 wpływa wiele czynników (m.in. wiek, płeć, stopień odżywienia, czynniki genetyczne, hormony płciowe i choroby współistniejące). Zależność surowiczego stężenia tego białka od płci jest również definiowana [Brabant i Wallaschofski, 2007; Mattsson i wsp., 2008]. U osób zdrowych wykazywano systematyczny spadek stężenia IGF-1 z wiekiem, u kobiet 13% redukcji na dekadę, zaś u mężczyzn 11% [Andreassen i wsp., 2009]. Po znaczącym spadku stężenia IGF-1 po około 25. r.ż. obserwuje się systematyczne powolne obniżanie się jego wartości z wiekiem [Juul i wsp., 1994]. Inni autorzy opisują zmniejszanie się stężenia IGF-1 z wiekiem także niezależnie od płci [Aimaretti i wsp., 2008; Rosario 2010].

W całej grupie pacjentów z przewlekłym WZW typu C ocenianych w ramach tej pracy, stężenia IGF-1 znacząco obniżały się wraz z wiekiem (wysoki współczynnik korelacji $r = -0,647$). Jest to zgodne z obserwacjami innych autorów, którzy stwierdzali również negatywną korelację pomiędzy stężeniem IGF-1 i wiekiem pacjentów zakażonych HCV z/lub bez marskości wątroby [Wu i wsp., 2004; Colakoğlu i wsp., 2007; Raslan i wsp., 2010; Helaly i wsp., 2011; Rehem i El-Shikh, 2011; Aleem i wsp., 2012]. Aby zniwelować wpływ wieku na występowanie korelacji pomiędzy stężeniem IGF-1 i danymi klinicznymi badanych pacjentów, do szczegółowych analiz w obecnej pracy zastosowano wystandaryzowane wartości surowiczych stężeń IGF-1 względem wieku. Podobne podejście w interpretacji wyników badań znaleziono w nielicznych doniesieniach [Mattera i wsp., 2003; Wu i wsp., 2004; Mattsson i wsp., 2008]. W większości danych z piśmiennictwa przedstawione wyniki wskazują, iż w chorobach wątroby o różnej etiologii poziom surowiczego stężenia IGF-1 może być markerem funkcji narządu [Wu i wsp., 1988; Vyzantiadis i wsp., 2003; Mahdy i wsp., 2007]. Autorzy prac wskazują ponadto, iż w chorobach wątroby stężenie IGF-1 obniża się również niezależnie od wieku [Nikolić i wsp., 2000; Wu i wsp., 2004; Mahdy i wsp., 2007; Völzke i wsp., 2009; Raslan i wsp., 2010; Adamek i wsp., 2012; Aleem i wsp., 2012; Dehghani i wsp., 2012]. Wydaje się to prawdziwe również na podstawie uzyskanych wyników badań w tej pracy. W całej grupie badanej (oraz we wszystkich podgrupach) z przewlekłym WZW typu C, surowicze stężenia IGF-1 były istotnie niższe niż w kontroli. Ponadto w całej grupie badanej stężenie IGF-1 obniżało się wraz ze wzrostem aktywności zapalnej oraz stopniem zaawansowania włóknienia, osiągając najniższe wyniki u chorych z marskością wątroby. Po standaryzacji stężenia IGF-1 względem wieku potwierdzono istotnie niższe stężenia IGF-1 w grupie pacjentów z marskością w porównaniu z pacjentami bez cech marskości wątroby. Jest to zgodne z danymi innych autorów, którzy przeprowadzili podobną analizę uwzględniając wiek pacjentów [Wu i wsp., 2004]. Najwyższe negatywne

współczynniki korelacji IGF-1 z *grading* i *staging* zanotowano w grupie pacjentów z udokumentowanym długotrwałym zakażeniem HCV i bardziej zaawansowanymi zmianami histologicznymi w wątrobie (podgrupa B). Podobne zmiany stężeń IGF-1 w zależności od *staging*, a także stłuszczenia wątroby u pacjentów przewlekle zakażonych HCV opisali inni autorzy [Lorenzo-Zúñiga i wsp., 2007; Adamek i wsp., 2012; Himoto i wsp., 2013].

Badania obecne, uwzględniające płeć badanych chorych, jedynie u części z nich (podgrupa A) udokumentowały istotnie wyższe stężenie IGF-1 w grupie kobiet w porównaniu z mężczyznami. Podobne różnice płciowe, ale u pacjentów ze zdrową wątrobą opisał Yu i wsp. [Yu i wsp., 1999]. Natomiast inni autorzy (również w zdrowej populacji) takich różnic nie odnotowali [Mattsson i wsp., 2008; Rosario 2010]. Istnieją również doniesienia sugerujące nieco niższe stężenia IGF-1 w surowicy krwi u zdrowych kobiet w porównaniu z mężczyznami [Brabant i wsp., 2003; Brabant i Wallaschofski, 2007]. Niektórzy z autorów wykazują najmniejsze różnice płciowe w stężeniu IGF-1 pomiędzy 35. a 50. rokiem życia [Brabant i wsp., 2003]. Dyskutując ten wynik badań można dodać, iż średnia wieku całej podgrupy A wynosiła 36 ± 14 lat i nie było istotnej różnicy wieku pomiędzy kobietami i mężczyznami. Nie znaleziono danych dotyczących różnic w stężeniach IGF-1 w zależności od płci u chorych z przewlekłym zapaleniem wątroby typu C lub marskością wątroby. W badaniach niektórych autorów u pacjentów z rakiem wątrobowokomórkowym (HCC) nie notowano różnic w stężeniu IGF-1 u kobiet i mężczyzn [Kaseb i wsp., 2011]. Wynik dotyczący wyższego stężenia IGF-1 u kobiet w porównaniu z mężczyznami, uzyskany w obecnej pracy, należy interpretować więc ostrożnie, gdyż dotyczy on 19 kobiet i 18 mężczyzn z zakażeniem HCV (podgrupa A). Wydaje się zatem, że w całej grupie badanej w tym opracowaniu ($n = 150$; średnia wieku 41 ± 16 lat) nieobecność różnic płciowych w zakresie surowiczego stężenia IGF-1 potwierdza raczej dane uzyskane w populacji ponad 400 zdrowych dawców krwi z Niemiec (średnia wieku 45 ± 15 lat) opisanych przez Mattsson i wsp. [Mattsson i wsp., 2008]. Badania dotyczące roli płci w zmianach poziomów krążącego IGF-1 u osób z przewlekłymi chorobami wątroby powinny być kontynuowane.

Wpływ na stężenie IGF-1 ma stopień odżywienia i to niezależnie od wahań stężenia hormonu wzrostu. Obniżenie stężeń IGF-1 notuje się u pacjentów z BMI < 20 i > 29 kg/m² [Holmes i wsp., 2002; Touskova i wsp., 2012]. Analiza odchylenia standardowego (*standard deviation score*, SDS) stężenia IGF-1 wykazała, iż zmiany stężenia tego białka związane z masą ciała występują niezależnie od płci. Najwyższe wartości SDS IGF-1 odnotowano w grupie kobiet z BMI od 27,5 do 30,0, zaś u mężczyzn z BMI w granicach 22,5–25,0 [Schneider i wsp., 2006].

W całej badanej w tej pracy grupie pacjentów średnia wartość BMI oscylowała wokół górnej granicy wartości referencyjnych (tj. 25,0 kg/m²) i była istotnie wyższa u mężczyzn w porównaniu z kobietami. Wraz ze wzrostem BMI u wszystkich badanych chorych stężenie IGF-1 obniżało się. Najwyższy współczynnik korelacji

Spearmana pomiędzy stężeniem IGF-1 a BMI ($r = -0,621$) stwierdzono w grupie osób długotrwale zakażonych HCV (podgrupa B). Brakuje danych w piśmiennictwie na temat zależności pomiędzy IGF-1 a BMI u chorych z przewlekłym WZW typu C. Wcześniejsze badania własne autorki na grupie 30 pacjentów z zakażeniem HCV wykazały słabą negatywną korelację pomiędzy IGF-1 i BMI [Adamek i wsp., 2012]. Inni autorzy u pacjentów z bardziej zaawansowanymi zmianami w wątrobie, tj. marskości narządu o różnej etiologii (HCV+, HBV+, alkohol) takiej zależności nie odnotowali [Colakoğlu i wsp., 2007]. Wydaje się jednak ważne podkreślić wyniki jednej z najnowszych prac, które sugerują znaczący udział składników osi IGF (w tym IGF-1) produkowanych przez komórki podskórnej tkanki tłuszczowej i monocyty krwi obwodowej w rozwoju subklinicznej formy otyłości i cukrzycy typu 2. U otyłych pacjentów z cukrzycą typu 2 wykazano obniżoną lokalną ekspresję IGF-1, IGF-1R oraz IGFBP-3 (podskórna tkanka tłuszczowa), a wzrost ekspresji IGF-1R w monocytach krwi w porównaniu z kontrolą [Touskova i wsp., 2012]. Zarówno tkankowa ekspresja mRNA IGF-1 (tkanka tłuszczowa), jak i surowicze stężenie IGF-1 były negatywnie skorelowane z BMI w całej grupie badanych pacjentów (kontrola i pacjenci z otyłością z/lub bez cukrzycy) [Touskova i wsp., 2012].

W przewlekłym zakażeniu HCV dochodzi do niedoboru GH i oporności hepatocytów na ten hormon, co także może mieć istotny wpływ na wątrobową produkcję IGF-1 [Plöckinger i wsp., 2007]. W badanej w tej pracy grupie tylko 16% stanowili pacjenci z marskością wątroby. Ze względu na tak małą grupę nie przeprowadzono analizy stężeń IGF-1 w zależności od klinicznego stopnia zaawansowania marskości wątroby (skala *Child-Pugh*). Oznaczanie stężeń IGF-1 u pacjentów z marskością wątroby może mieć jednak znaczenie diagnostyczno-rokownicze. Niektóre z prac donoszą, iż najniższe stężenia notowano u pacjentów, którzy rozwinęli HCC i zmarli w kilkumiesięcznym okresie obserwacji [Wu i wsp., 2004].

Wśród zebranych w tej pracy chorych z WZW typu C wyjściowo nie było pacjentów z rozpoznanym HCC. Fakt ten nie pozwolił na ocenę porównawczą stężeń IGF-1 u chorych z zapaleniem wątroby, marskością wątroby na tle HCV i pierwotnym rakiem wątroby, jak przedstawiane jest to w innych opracowaniach [Mazziotti i wsp., 2002; Rehem i El-Shikh, 2011; Aleem i wsp., 2012]. Również w przeprowadzonej analizie nie było obserwacji długofalowej pozwalającej na określenie zmian stężeń IGF-1 w dłuższym czasie obserwacji. Roczny spadek stężenia IGF-1 $> 9,3 \mu\text{g/L}$ niektórzy z autorów uznają za czynnik rokowniczo zły, sugerujący w krótkim okresie rozwój HCC [Mazziotti i wsp., 2002]. Można dodać, że pacjenci analizowani w ramach obecnej pracy, u których stężenie IGF-1 wynosiło $< 12 \text{ ng/ml}$, zmarli w ciągu około roku od czasu zebrania materiału w obrazie dekomensacji marskości wątroby czy choroby nowotworowej (zmiany ogniskowe w wątrobie bez i/lub z potwierdzonym HCC).

Jedynie u 1/3 pacjentów badanych w tej pracy, którym wykonano biopsję wątroby obserwowano zróżnicowany stopień stłuszczenia wątroby. U większości

z tych pacjentów (70%) cechy zwyrodnienia tłuszczowego w wątrobie były nieduże i zajmowały niski odsetek komórek w biopunktacie (1 pkt w skali numerycznej). Choć udało się potwierdzić istotną statystycznie negatywną korelację stężenia ze stężeniem IGF-1 u pacjentów całej grupy badanej należy dodać, iż była ona bardzo słaba i wyniku tego nie można uogólniać. Trudno również odnieść tę obserwację do danych z piśmiennictwa. Himoto i wsp. opisali istotną różnicę stężeń IGF-1 pomiędzy osobami bez i ze stłuszczeniem wątroby określonym na 2 pkt. skali numerycznej. Jednakże liczba pacjentów z taką wartością stopnia stłuszczenia (2 pkt.), oceniana w cytowanej pracy, była mała (5 osób), co mogło wpływać na mało przekonujące wyniki analizy statystycznej [Himoto i wsp., 2013]. W dużym badaniu populacyjnym (osoby „zdrowe” tj. bez wirusowego zapalenia wątroby i rozrostów nowotworowych w przeszłości, bez cech marskości narządu) opisano obniżanie się stężeń IGF-1 (niezależne od konsumpcji alkoholu) wraz ze stłuszczeniem wątroby. Stopień stłuszczenia wątroby oceniano jedynie na podstawie badania USG (bez biopsji wątroby) [Völzke i wsp., 2009], stąd wyniki tej pracy również nie mogą być w pełni porównywane z obserwacjami autorki.

W całej grupie pacjentów analizowanych w tej pracy nie stwierdzono korelacji stężenia IGF-1 z HCV-RNA w surowicy, choć w badanych podgrupach (A i C) zanotowano słabe korelacje z ładunkiem wirusa. Współwystępowanie niższych stężeń surowiczego IGF-1 i wyższego HCV-RNA u pacjentów podgrupy A trudno uogólniać, gdyż była to słaba korelacja (współczynnik $r = -0,332$; $p < 0,05$).

U pacjentów z genotypem 1 (1b, 1a, 1a+1b), analizowanych w obecnej pracy, wykazano znamienne niższe stężenie IGF-1 w porównaniu z wartością stężenia IGF-1 w pozostałych genotypach HCV. Takich różnic nie obserwowali inni autorzy prac [Lorenzo-Zúñiga i wsp., 2007; Himoto i wsp., 2013].

HCC jest wzrastającym klinicznym problemem i trzecią spośród przyczyn śmierci z powodu nowotworów [Shang i wsp., 2012]. Pacjenci z ryzykiem HCC podlegają badaniom przesiewowym, opierających się na analizie USG jamy brzusznej i oznaczaniu AFP co 6 miesięcy [EASL 2011]. Jednakże czułość oznaczania AFP w surowicy nie jest zbyt wysoka. Podwyższone stężenia AFP stwierdza się w różnych przewlekłych chorobach wątroby, marskości tego narządu, a najwyższe wartości w przypadkach HCC [Rehem i El-Shikh, 2011]. W całej grupie badanych w tej pracy pacjentów średnie stężenie AFP było podwyższone. Wynikało to z podwyższonego stężenia AFP w podgrupie C, w której notowano największą liczbę przypadków marskości wątroby. Należy dodać, iż pacjenci którzy rozwinęli HCC pochodzili również z tej podgrupy. Stężenie IGF-1 wysoko negatywnie korelowało ze stężeniem AFP w całej badanej grupie, jak i w każdej z podgrup. Najwyższy współczynnik korelacji zanotowano w podgrupie B. Po standaryzacji IGF-1 względem wieku w całej badanej grupie nadal notowano ujemną korelację IGF-1 z AFP, ale współczynnik był niższy. Również po standaryzacji IGF-1 względem wieku istotną ujemną korelację IGF-1 z AFP obserwowano tylko w grupie kobiet. Takie ujemne korelacje, choć bez zależności od płci,

opisywali również inni badacze [Rehem i El-Shikh, 2011], w tym obserwację taką opublikowała autorka [Adamek i wsp., 2012]. Należy dodać, że są również wyniki badań przeprowadzonych u pacjentów zakażonych HCV z marskością wątroby czy z HCC, w których nie udało się udokumentować istotnych korelacji IGF-1 z AFP [Aleem i wsp., 2012].

Większość prac dotyczących zmian stężenia IGF-1 w surowicy u osób zakażonych HCV dotyczy pacjentów z marskością wątroby i/lub HCC. Autorzy tych prac nie stwierdzali istotnych korelacji pomiędzy aktywnością enzymów wątrobowych (ALT, AST czy GGTP) a stężeniem IGF-1 [Colakoğlu i wsp., 2007; Su i wsp., 2010; Rehem i El-Shikh, 2011; Dehghani i wsp., 2012; Himoto i wsp., 2013]. Być może wynika to z występowania niskich aktywności aminotransferaz w końcowych fazach zapalenia i w przebiegu marskości wątroby i HCC na jej tle. Natomiast u pacjentów z przewlekłym WZW typu C opisano negatywne korelacje IGF-1 z aktywnością AST [Raslan i wsp., 2007; Helaly i wsp., 2011] oraz ALT [Helaly i wsp., 2011]. Należy zaznaczyć, iż wszyscy analizowani w cytowanych badaniach pacjenci mieli podwyższoną aktywność aminotransferaz ALT i AST.

U badanych w tej pracy pacjentów z przewlekłym zakażeniem HCV średnia aktywność aminotransferaz była również podwyższona, ALT około 2-krotnie, zaś AST około 1,5-krotnie w stosunku do wartości referencyjnych. Podwyższona była również około 2-krotnie aktywność gamma-glutamylotranspeptydazy (GGTP, GGT). W całej badanej grupie stwierdzono istotne negatywne korelacje pomiędzy stężeniem IGF-1 a aktywnością ALT, AST i GGTP. Najwyższe wskaźniki korelacji uzyskano w grupie długotrwanie zakażonych HCV (podgrupa B). Po standaryzacji IGF-1 względem wieku utrzymywał się wysoki współczynnik korelacji między surowiczym stężeniem IGF-1 a aktywnością ALT właśnie w podgrupie B. Innymi słowy, stężenie IGF-1 u pacjentów z długotrwałym zakażeniem HCV korelowało ze stopniem nasilenia zmian martwiczo-zapalnych komórek wątrobowych, wyrażonym aktywnością aminotransferaz: alaninowej i asparaginianowej. Wyniki te są także zgodne z wcześniejszymi obserwacjami autorki [Adamek i wsp., 2012]. Silna negatywna korelacja surowiczego stężenia IGF-1 i GGTP w całej badanej grupie pacjentów w obecnych badaniach również wymaga komentarza. GGTP jest enzymem związanym z błonami komórkowymi, zwłaszcza komórek nabłonkowych i odpowiada za aktywny transport różnych molekuł. Badania eksperymentalne paradoksalnie wskazują na fakt, iż wewnątrzkomórkowy enzym może odpowiadać również za generowanie wolnych rodników tlenowych, zwłaszcza w obecności żelaza i innych metali [Lee i wsp., 2004]. Surowicza aktywność enzymu jest natomiast powszechnie stosowanym, czułym wskaźnikiem diagnostycznym w uszkodzeniu wątroby (głównie w chorobie alkoholowej i nowotworach wątroby). Jego aktywność wzrasta również w zapaleniach wirusowych wątroby (w tym w WZW typu C), a także w chorobach układu sercowo-naczyniowego [Silva i wsp., 2004; Everhart i Wright, 2012; Mościński i wsp., 2012]. Zwiększona aktywność tego enzymu wiąże się ze zwiększoną śmiertelnością w ogólnej popu-

lacji [Everhart i Wright, 2012]. Kompleksowe oznaczanie izoenzymu II GGTP (GGT-II) wraz z α -L-fukozydazą (AFU) oraz AFP zwiększa czułość i specyficzność wczesnego rozpoznawania HCC [Zhu i wsp., 2013]. Warto podkreślić, iż produkcję dojrzałej formy GGTP (heterodimer) potwierdzono również w hodowanych komórkach HCC, tj. HepG2. Dowiedziono przy tym, iż jest ona silniej glikozylowaną formą w porównaniu z obecną w prawidłowej wątrobie. Może to mieć również implikacje diagnostyczne w HCC [West i Hanigan, 2010].

Ostatnie lata przynoszą wyniki badań wskazujące na GGTP jako niezależny czynnik predykcyjny zarówno przebiegu klinicznego przewlekłego WZW typu C, jak i odpowiedzi na leczenie przeciwwirusowe [Everhart i Wright, 2012]. Wysoka aktywność GGTP stanowi jeden z niezależnych czynników braku odpowiedzi na terapię przeciwwirusową przewlekłego zakażenia HCV u pacjentów zakażonych genotypem 1 HCV [Jurczyk i wsp., 2011; Weich i wsp., 2011]. Z drugiej strony większość obserwacji wskazuje, iż niska aktywność GGTP lub niższy stosunek GGTP/ALT przed leczeniem stanowią czynniki dobrej odpowiedzi na leczenie WZW typu C [Amanzada i wsp., 2012; Bura i wsp., 2012]. Są jednak i prace, w których nie udało się potwierdzić roli niższych wartości GGTP w osiągnięciu SVR, a aktywność enzymu uznają za czynnik predykcyjny zaawansowania włóknienia wątroby [Güzelbulut i wsp., 2013]. Nie znaleziono w piśmiennictwie opisu dotyczącego zależności pomiędzy aktywnością GGTP w surowicy a stężeniem IGF-1. Na podstawie uzyskanego w tej pracy wysokiego współczynnika negatywnej korelacji dla obu parametrów, szczególnie w grupie z długotrwałym zakażeniem HCV (podgrupa B) ($r = -0,716$), można sądzić, iż wartości surowicznych stężeń IGF-1 także mogą okazać się pomocne w przewidywaniu odpowiedzi na leczenie przeciwwirusowe.

Wyrazem funkcji hepatocytów do syntezy białek ustrojowych jest produkcja albumin. W przebiegu marskości wątroby, niezależnie od etiologii, produkcja tych białek spada. U pacjentów z marskością wątroby, zarówno na tle zakażenia HCV jak i innych przyczyn, opisano pozytywne korelacje pomiędzy stężeniem IGF-1 a stężeniem albumin [Colakoğlu i wsp., 2007; Rehem i El-Shikh, 2011]. Zależności takich nie obserwowano u pacjentów z przewlekłym WZW typu C [Raslan i wsp., 2007].

W przeprowadzonych badaniach w ramach tej pracy wykazano słabą pozytywną korelację pomiędzy stężeniem IGF-1 i albumin, której nie potwierdzono jednak uwzględniając standaryzacją IGF-1 względem wieku. Nieobecność istotnej statystycznie korelacji mogła jednak wynikać z faktu, iż średnie stężenia albumin w badanej grupie oraz podgrupach pacjentów z zakażeniem HCV pozostawały w zakresie wartości referencyjnych.

W przeprowadzonych badaniach stwierdzono pozytywne korelacje stężenia IGF-1 z liczbą płytek krwi w całej badanej grupie oraz w podgrupach B i C, przy czym w podgrupie C była to korelacja wysoka. Potwierdzono tę korelację również uwzględniając standaryzacją IGF-1 względem wieku. Dane te również po-

kazują współistnienie obu parametrów (liczba płytek krwi, stężenie IGF-1), które świadczą o funkcji wątroby. Są to badania, w których nie obserwowano korelacji pomiędzy IGF-1 a liczbą trombocytów, a dotyczyły chorych z marskością wątroby [Colakoğlu i wsp., 2007].

Badania epidemiologiczne wskazują, iż cukrzyca typu 2 występuje częściej u pacjentów zakażonych HCV niż u niezakażonych (OR 1,68 w badaniach retrospektywnych i OR 1,67 w badaniach prospektywnych) [White i wsp., 2008]. Rozwój cukrzycy obserwowano częściej także u pacjentów z zakażeniem HCV w porównaniu z HBV [Hung i wsp., 2010]. Proces zapalny, włóknienie i stłuszczenie wątroby w przebiegu zakażenia HCV odgrywają rolę w produkcji glukozy i metabolizmie insuliny w wątrobie [Koike 2006; Noto i Raskin, 2006]. Głównym mechanizmem prowadzącym do rozwoju cukrzycy u chorych zakażonych HCV jest jednak insulinooporność, a nie deficyty w sekrecji insuliny [Lecube i wsp., 2006]. Mechanizm insulinooporności jest złożony, a jego molekularne mechanizmy nieznane. Podkreśla się udział samego wirusa HCV, indukowanego przezeń stłuszczenia wątroby i wzrostu TNF- α oraz rolę zwiększonej masy ciała i BMI w generowaniu tej patologii [Noto i Raskin, 2006]. Lecube i wsp. opisują dokładniej rolę cytokin prozapalnych (TNF- α , receptora I i II TNF- α i IL-6) w patogenezie insulinooporności [Lecube i wsp., 2006]. Na modelu zwierzęcym wykazano dwa podstawowe rodzaje insulinooporności: centralną i obwodową. Obwodowa związana jest z niedostatecznym działaniem insuliny na mięśnie (zmniejszone pobieraniem glukozy), a centralna z deficytem indukowanej insuliny supresji produkcji glukozy w wątrobie [Koike 2006]. Na myszach transgenicznym wykazano, iż białko rdzeniowe HCV wpływa na zaburzenie drogi sygnałowej insuliny w hepatocytach. Rezultatem jest m.in. obniżenie stopnia fosforylacji (zależnego od insuliny) dwóch białek, tj. IRS-1 i Akt, a nawet degradacja IRS-1 i IRS-2 poprzez drogę sygnałową SOCS3 (*suppressor of cytokine signaling 3*) [Koike 2006; przegląd tematu: Kawaguchi i wsp., 2011]. Około dwukrotne obniżenie stopnia fosforylacji IRS-1 obserwowali Aytug i wsp. po ekspozycji fragmentów wątroby z zakażeniem HCV na insulinę. Zdaniem tych autorów zakażenie HCV prowadzi do post-receptorowego defektu w wiązaniu się białka IRS z receptorem insuliny (IR), co daje zaburzenia drogi sygnałowej insuliny i w konsekwencji insulinooporność i rozwój cukrzycy typu 2 [Aytug i wsp., 2003]. Związek pomiędzy zaburzeniem równowagi pomiędzy izoformami IR-A i IR-B w rozwoju insulinooporności i powstawaniu cukrzycy typu 2 dyskutowany jest także w piśmiennictwie [Belfiore i wsp., 2009; Rojek i Niedziela, 2009].

W rozwoju insulinooporności podnosi się również rolę genotypów HCV. W genotypie 1b opisano substytucje aminokwasów w rejonie rdzeniowym HCV [Gln70 (His70) i/lub Met91], które uznano za czynniki predykcyjne szczególnie nasilonej insulinooporności [Akuta i wsp., 2009; Sumida i wsp., 2011]. Wykazano również związek insulinooporności z kinetyką HCV i surowiczym stężeniem białka rdzeniowego HCV u pacjentów z WZW typu C [Kawaguchi i wsp., 2011].

Jedna z najnowszych prac na dużej grupie pacjentów z zakażeniem HCV (bez marskości wątroby, bez cukrzycy) wykazała duże spektrum insulinooporności w całej grupie chorych. Jednak związek z HCV *per se* (genotyp HCV, ładunek HCV, długość zakażenia) z występowaniem tego zaburzenia nie był statystycznie istotny. Autorzy konkludują, iż dominującą rolę w patogenezie obwodowej insulinooporności wydają się mieć czynniki gospodarza (pozytywne korelacje z rasą romańską, zwiększonym BMI, zwiększonym stężeniem ferrytyny a negatywne z płcią męską i wyższym stężeniem HDL) [Mukhtar i wsp., 2013].

Insulinooporność i cukrzyca typu 2, niezależnie od zakażenia HCV, są czynnikami ryzyka rozwoju nowotworu [Hung i wsp., 2010; Su i wsp., 2010]. Występowanie insulinooporności wiąże się z gorszą odpowiedzią na leczenie przeciwwirusowe u pacjentów z zakażeniem HCV [Lecube i wsp., 2007; Eslam i wsp., 2011]. W zakażeniu HCV badano różne wskaźniki metabolizmu glukozy, jak i insulinooporności, w tym HOMA-IR [Hui i wsp., 2003; Tanaka i wsp., 2008]. U nosicieli HCV (bez otyłości, bez cukrzycy, nie nadużywających alkoholu, bez cech stłuszczenia wątroby, z normalnymi wartościami ALT) obecność samego zakażenia HCV (i białka rdzeniowego HCV) nie stanowiła niezależnego czynnika insulinooporności. Wartości HOMA-IR u tych pacjentów były skorelowane jedynie z obwodem talii oraz aktywnością GGTP [Tanaka i wsp., 2008]. Autorzy konkludują, iż insulinooporność jest wieloczynnikowa, jej rozwój zależy od współistnienia zapalenia wątroby i stłuszczenia/włóknienia, indukowanego zakażeniem HCV. Obecność insulinooporności wykazano już u pacjentów ze słabo zaawansowanym włóknieniem wątroby (*staging* 0 i 1), natomiast wartość HOMA-IR była niezależnym czynnikiem prognostycznym stopnia i szybkości powstawania włóknienia wątroby w zakażeniu HCV [Hui i wsp., 2003]. Związek HCV z insulinoopornością, wyrażoną podwyższonym wskaźnikiem HOMA-IR potwierdzają również nowsze prace [Helaly i wsp., 2011].

U pacjentów z zakażeniem HCV i rakiem wątroby obserwowano istotnie wyższe stężenia glukozy i insuliny oraz wartości HOMA-IR w porównaniu z pacjentami bez zmian nowotworowych, a jedynie z przewlekłym zapaleniem wątroby i zaawansowanym włóknieniem. Stężenie insuliny, wartości HOMA-IR, obecność cukrzycy i płeć męską uznano za niezależne czynniki rozwoju HCC na tle zakażenia HCV [Hung i wsp., 2010].

Wiele badań podnosi związek IGF-1 i receptora IGF-1 (IGF-1R) z rozwojem insulinooporności [Pollak 2007; Eslam i wsp., 2011]. Białko IGF-1 promuje działanie insuliny [Sandhu i wsp., 2002; Abbas i wsp., 2008]. Uznaje się je również za czynnik wzrostu dla komórek wysp trzustkowych, który poprzez wydłużanie życia komórek β może wywierać działanie anty-cukrzycowe. Pod względem funkcjonalnym IGF-1 wywołuje efekt insulino-podobny przeciwdziałając lipolizie (wzmaga lipogenezę), reguluje transportem i wykorzystaniem glukozy w mięśniach oraz hamuje proces glukoneogenezy w wątrobie [Clemmons 2004; van Haften i Twickler, 2004]. Podstawą do sugestii nad udziałem IGF-1 w wy-

woływaniu insulinooporności w zakażeniu HCV były badania nad wzajemnymi zależnościami pomiędzy produkcją tego białka a wartościami HOMA-IR, HOMA-S (*insulin sensitivity*) czy funkcją komórek β wysp trzustkowych (HOMA- β) [Helaly i wsp., 2011]. U pacjentów z zakażeniem HCV i bez cukrzycy opisano znamiennej negatywną korelację pomiędzy stężeniem IGF-1 a HOMA- β . Choć obserwowano także negatywne korelacje pomiędzy IGF-1 i HOMA-IR oraz insuliną nie osiągnęły one istotności statystycznej [Helaly i wsp., 2011]. Istotnej korelacji nie obserwowano również u pacjentów z HCC, pomimo znacząco wyższych wartości HOMA-IR w porównaniu z osobami zdrowymi [Su i wsp., 2010].

W przeprowadzonych badaniach obecnej pracy w całej grupie chorych z zakażeniem HCV (bez cukrzycy) stwierdzono podwyższoną wartość wskaźnika HOMA-IR. Stężenia insuliny w grupie badanej były również istotnie wyższe w porównaniu z kontrolą. Wykazano słabą, ale istotną statystycznie negatywną korelację (współczynnik korelacji Spearmana $r = -0,295$; $p < 0,05$) pomiędzy IGF-1 a HOMA-IR. Bardzo niski współczynnik ujemnej korelacji ($r = -0,264$; $p < 0,05$), obserwowano między surowiczym stężeniem IGF-1 i insuliny. Badania obecne potwierdzają obserwacje tych autorów, którzy również wykazali zwiększone wartości HOMA-IR nawet u pacjentów ze słabo zaawansowanym włóknieniem wątroby w zakażeniu HCV [Hui i wsp., 2003]. Wyniki obecne są zgodne także z danymi z piśmiennictwa, w których wykazano, iż niższe surowicze stężenia IGF-1 mogą mieć związek z mechanizmami insulinooporności u pacjentów z zakażeniem HCV i rozwojem cukrzycy typu 2 u tych pacjentów, a co za tym idzie – ze zwiększonym ryzykiem rozwoju HCC [Clemmons 2004; McDonald i wsp., 2007; Helaly i wsp., 2011].

Wiele badań poświęcono roli zwiększonych surowiczych stężeń IGF-1, jakie stwierdzano u pacjentów z już rozwiniętym guzem lub w zmianach przednowotworowych u człowieka. Mechanizmy kancerogennego działania IGF-1 w tym kontekście tłumaczone są na wiele sposobów. W inicjowaniu zmian nowotworowych sugeruje się większy udział IGF-1 produkowanego przez tkanki obwodowe, komórki nowotworu lub mikrośrodowiska guza (działanie autokrynowe/parakrynowe, niezależne od GH) niż krążącego IGF-1, produkowanego głównie w wątrobie pod wpływem GH (działanie endokrynowe). Zwiększoną produkcję lokalną IGF-1 opisywano m.in. w komórkach nabłonka prostaty [Hellawell i wsp., 2002], w komórkach nabłonka gruczołu piersiowego, a także w komórkach podścieliska łącznotkankowego tych nowotworów [Chong i wsp., 2006; Chong i wsp., 2011]. Hipotezy dotyczące udziału IGF-1 w kancerogenezie zebrał Cohen i wsp. [Cohen i wsp., 2000]. Jedną z nich jest uznanie, iż podwyższony poziom IGF-1 może być wynikiem raczej obecności guza produkującego ten czynnik wzrostu, niż przyczyną rozwoju nowotworu („*the tumor as a source*”) [Cohen i wsp., 2000]. W kolejnej hipotezie podwyższone surowicze stężenie IGF-1 uznaje się jako czynnik ryzyka rozwoju raka („*IGF-1 as a marker*”). Hipoteza ta powstała na podstawie analiz epidemiologicznych i dotyczy głównie

raków „endokrynowo-zależnych” (raki piersi, prostaty, *endometrium*). Opisy takich zależności znaleziono również w odniesieniu do raków jelita grubego, płuc i pęcherza moczowego [LeRoith i Roberts, 2003; Samani i wsp., 2007; Maki 2010; Philippou i wsp., 2013]. Surowicze stężenie IGF-1 uznaje się więc za surogatowy marker tkankowego poziomu IGF-1 [Cohen i wsp., 2000]. Najwięcej sugestii co do roli podwyższonych stężeń surowiczych IGF-1 w rozwoju raka dotyczy raka prostaty. Opisane są w badaniach prospektywnych [Cohen 1998; Wolke i wsp., 1998] i w metaanalizach [Harman i wsp., 2000], w których wykazywano istotny związek pomiędzy zwiększonym poziomem krążącego IGF-1, efektem mitogennym i anty-apoptycznym IGF-1 a zwiększonym ryzykiem rozwoju raka prostaty [Khosravi i wsp., 2001; Chan i wsp., 2002; Stattin i wsp., 2004; przegląd tematu: Philippou i wsp., 2013]. IGF-1 nazwano nawet czynnikiem etiologicznym rozwoju raka prostaty [Stattin i wsp., 2004]. Są jednak i dane, które nie potwierdzają w ogóle takiego związku [Woodson i wsp., 2003] lub w przypadku rozwoju PSA-pozytywnego raka prostaty wykazują jedynie ograniczoną rolę krążącego IGF-1 we wczesnych fazach rozwoju raka prostaty. Są również dowody na to, iż raki prostaty, cechujące się wysokim stopniem złośliwości histologicznej, są bardziej autonomiczne i mniej wrażliwe na działania IGF w porównaniu z nowotworami o mniejszym złośliwym fenotypie [przegląd tematu: Philippou i wsp., 2013]. Uważa się także, iż IGF-1 pozostaje ważnym czynnikiem ryzyka raka prostaty szczególnie u młodych mężczyzn, u których zwiększone surowicze stężenie IGF-1 może prowadzić do rozwoju raka prostaty w późniejszym czasie [Rowlands i wsp., 2012]. Długotrwała ekspozycja komórek nabłonkowych prostaty na wysokie stężenia surowiczego IGF-1 zwiększa prawdopodobieństwo inicjowania hiperplazji w komórkowych prekursorach wewnątrz nabłonkowej neoplazji i w następstwie rozwój gruczolakoraków prostaty [LeRoith i Roberts, 2003]. W odniesieniu do raka piersi zauważono, iż zarówno u kobiet przed menopauzą [Hankinson i wsp., 1998], jak i u Afroamerykańskich kobiet po menopauzie, wyższe stężenie IGF-1 było czynnikiem ryzyka rozwoju również tego nowotworu [Agurs-Collins i wsp., 2000; przegląd tematu: Samani i wsp., 2007]. W metaanalizie obejmującej 17 badań, w tym około 10 tys. kobiet ze zdiagnozowanym rakiem piersi, wykazano, iż IGF1 był słabo dodatnio związany z ryzykiem raka piersi u kobiet przed menopauzą (test dla trendu, $p = 0,050$), zaś silnie dodatnio u kobiet po menopauzie (próba dla trendu $p = 0,0002$) [Endogenous Hormones and Breast Cancer Collaborative Group 2010]. Wyższe stężenia IGF-1 u kobiet z rakiem piersi wiązały się ze wzrostem śmiertelności w tej grupie [Duggan i wsp., 2013].

W przypadku raka jelita grubego również obserwowano podwyższone stężenia IGF-1 [Ma i wsp., 1999; Wu i wsp., 2002; Sourby i wsp., 2012]. Jednak zarówno wcześniejsze badania [Renehan i wsp., 2004], jak i niedawne badania prospektywne z zastosowaniem metaanalizy wskazują na jedynie umiarkowaną korelację między wysokimi surowiczymi stężeniami IGF-1 a rozwojem tego nowotworu [Rinaldi i wsp., 2010]. W badaniach polskich u chorych z rakiem jelita

grubego i gruczolakami jelita grubego nie wykazano istotnych różnic w stężeniu IGF-1 pomiędzy badanymi grupami, jak i w stosunku do kontroli [Kaczka i wsp., 2012]. Kolejna hipoteza dotycząca relacji IGF-1:nowotwór sugeruje rolę czynników wpływających na stan odżywienia organizmu (niezależnych od GH) („*nutrition*”), które mogą nakładać się na efekty IGF-1 [Cohen i wsp., 2000]. Jedną z hipotez zakładała również brak związku pomiędzy stężeniem IGF-1 a rozwojem nowotworu [„*null (laboratory or statistical) errors*”]. Takiej zależności nie odnotowano w przypadku raka płuc [Chen i wsp., 2009]. Analizując niekiedy rozbieżne wyniki badań co do roli surowicznych stężeń IGF-1 w kancerogenezie raka prostaty wykazano, iż badania prospektywne są bardziej zgodne w demonstrowaniu związku między wysokimi surowiczymi stężeniami IGF-1 i ryzykiem raka prostaty niż badania przekrojowe (*cross-sectional*), które generują większą zmienność danych [LeRoith i Roberts, 2003]. Ponadto ściślejszy związek IGF-1 z kancerogenezą wykazano, gdy brano pod uwagę tylko najwyższe surowicze stężenia IGF-1 (i najniższe IGFBP-3) uzyskane u pacjentów z danym rakiem (jelita grubego, piersi i prostaty) [„*IGF-I causes, and IGFBP-3 prevents, cancer (and GH is neutral)*”] [Cohen i wsp., 2000]. Podano również hipotezę, według której sam hormon wzrostu *via* IGF-1 pełni zasadniczą rolę w nasilaniu wzrostu już rozwiniętego nowotworu („*GH causes cancer through IGF-I*”). Dokładniejsze opisy tych zależności również można znaleźć w piśmiennictwie [Cohen i wsp., 2000; Ohlsson i wsp., 2009]. Choć dane kliniczne są kontrowersyjne, nie da się wykluczyć związku pomiędzy występowaniem raka jelita grubego oraz zmian hiperplastycznych prostaty u pacjentów z akromegalią [Cohen i wsp., 2000].

W przeciwieństwie do zacytowanych wcześniej obserwacji o roli wysokich stężeń IGF-1 jako czynników ryzyka rozwoju wielu nowotworów u człowieka, u pacjentów z pierwotnym rakiem wątroby oraz w zmianach przerzutowych w tym narządzie wykazano znacznie obniżone stężenia IGF-1 w porównaniu z kontrolą [przegląd tematu: Kasprzak i Adamek, 2012]. Takie zachowanie się surowicznych stężeń IGF-1 ma wynikać ze znacznego uszkodzenia mięszu wątroby, w którym zachodzi produkcja tego liganda [Stuver i wsp., 2000]. Na poziomie komórkowym w HCC wykazano również obniżoną ekspresję mRNA IGF-1 w porównaniu z prawidłową tkanką [Su i wsp., 1989; Scharf i wsp., 2001]. Autorzy badań komentują ten wynik obserwacją, iż tkankowa ekspresja mRNA receptora GH (GH-R) w HCC również jest niska. Stąd też nie ma wystarczającej stymulacji do produkcji IGF-1 *via* GH przez zmienione nowotworowo hepatocyty [Su i wsp., 1989; Scharf i wsp., 2001]. Wiele prac usiłowało rozstrzygnąć, czy w przypadku raka wątroby, IGF-1 spełnia rolę czynnika ryzyka niezależnie od spadku jego produkcji spowodowanego uszkodzeniem wątroby [Stuver i wsp., 2000]. Autorzy tej pracy dyskutują wyniki, które pokazują iż w HCC surowicze stężenie IGF-1 obniża się i to niezależnie od etiologii (wirusowe lub niewirusowe tło schorzenia), a w dużej mierze jest większe niż wynikałoby to ze stopnia uszkodzenia mięszu wątroby. Czułość i specyficzność dla IGF-1 jako czynnika HCC (*cutoff* ~100 ng/

ml) była określona w granicach 80–90% [Stuver i wsp., 2000]. Sugerowano obecność pętli sprzężenia zwrotnego uruchamianej w HCC (ale nie w przerzutach do wątroby), która regulowałaby surowicze stężenie IGF-1 na drodze endokrynowej i/lub parakrynowej [Stuver i wsp., 2000].

Na podstawie powyższych opublikowanych przez wielu autorów danych, rolę stężeń surowiczych IGF-1 w nowotworach należy rozpatrywać zawsze w kontekście wyżej cytowanych wątpliwości oraz wspólnie z oceną innych białek osi IGF (m.in. receptory IGF-1, białka wiążące IGF, zwłaszcza IGFBP-3, wskaźnik IGF-1/IGFBP-3).

Podsumowując tę część badań należy podkreślić, iż w grupie pacjentów z zakażeniem HCV (n = 150), badanych w tej pracy, zanotowano obniżone stężenia IGF-1 w porównaniu z kontrolą. Niższe stężenia tego czynnika wzrostu dotyczyły również pacjentów z genotypem 1 w porównaniu z pozostałymi genotypami HCV. Analiza korelacji stężenia IGF-1 z wynikami badań biochemicznych świadczącymi o funkcji wątroby wykazała, iż wraz z pogarszaniem się funkcji wątroby stężenie IGF-1 maleje. Poziomy krążącego IGF-1 dodatkowo obniżały się z wiekiem, były zależne od płci i BMI pacjenta. Niższe stężenia iGF-1 występowały w bardziej zaawansowanych zmianach histologicznych wątroby (*grading, staging*), a także występowała tendencja do negatywnej korelacji ze stłuszczeniem wątroby. Można poprzeć te z doniesień, które uznają, iż niskie stężenie IGF-1 u pacjentów z zakażeniem HCV jest czynnikiem złej prognozy, a sam IGF-1 jest wczesnym markerem rezerwy funkcjonalnej wątroby. Wraz z niższymi stężeniami IGF-1 w surowicy u pacjentów z zakażeniem HCV obserwowano wyższe wartości HOMA-IR, co sugerowałoby udział IGF-1 w rozwoju insulinooporności. Nie można jednak na podstawie obecnych badań wyjaśnić mechanizmów molekularnych w powstawaniu insulinooporności u pacjentów z zakażeniem HCV.

Chorych ze znacznie obniżonymi stężeniami IGF-1 pomimo braku wykładników nowotworzenia w rutynowych badaniach skriningowych (AFP i ultrasonografia jamy brzusznej) należy częściej monitorować w kierunku rozwoju HCC. Oznaczanie surowiczego stężenia IGF-1 może pomóc w codziennej praktyce lekarskiej w lepszej ocenie progresji zmian w wątrobie z zakażeniem HCV i być może przewidzieć efekty terapii przeciwwirusowej.

IGFBP-3

Białko IGFBP-3 wiąże IGF-1 i w kompleksie z ALS (*acid-labile subunit*) wydłuża jego czas półtrwania. Białko IGFBP-3 jest najpowszechniej występującym białkiem wiążącym i wiąże ponad 95% IGF-ów [LeRoith i wsp. 1997; Murphy i wsp. 1998; Wang i wsp., 1999]. Związanie ALS z podwójnym kompleksem zapobiega niespecyficznym metabolicznym efektom IGF-1, takim jak hipoglikemia. Określanie surowiczego stężenia tego białka (wzrost lub obniżanie się w stosunku do kontroli) również ma znaczenie praktyczne w ocenie ryzyka wielu nowotworów u ludzi, w tym HCC. Należy jednak pamiętać, iż badania na zdrowej populacji

(ponad 400 osób) wykazały obniżanie się stężenia IGFBP-3 z wiekiem, wyższe stężenia IGFBP-3 u kobiet w porównaniu z mężczyznami, a brak różnic w zależności od BMI [Mattsson i wsp., 2008].

W chorobach wątroby z reguły opisuje się obniżenie stężenia IGFBP-3. Ma to miejsce zarówno u chorych z przewlekłym zapaleniem wątroby typu C, jak i w marskości wątroby oraz u chorych z HCC [Okan i wsp., 2000; Mattera i wsp., 2003; Wu i wsp., 2004; Colakoğlu i wsp., 2007; Raslan i wsp., 2007; Raslan i wsp., 2010; Reh i El-Shikh, 2011; Aleem i wsp., 2012; Himoto i wsp., 2013]. Opisano istotne obniżanie się stężeń IGFBP-3 wraz ze wzrostem stopnia włóknienia [Himoto i wsp., 2013] oraz w miarę narastania stopnia klinicznego zaawansowania marskości wątroby [Wu i wsp., 2004; Colakoğlu i wsp., 2007, Aleem i wsp., 2012; Dehghani i wsp., 2012]. Za wartość graniczną w diagnozowaniu nowotworzenia u chorych z marskością wątroby uznano stężenie IGFBP-3 < 682,6 ng/ml [Aleem i wsp., 2012]. Nie stwierdzono różnic w stężeniu IGFBP-3 w różnych stopniach stłuszczenia wątroby w przebiegu zakażenia HCV [Himoto i wsp., 2013].

U badanych, w ramach tej pracy, pacjentów z przewlekłym zakażeniem HCV stwierdzono obniżone stężenie IGFBP-3 w stosunku do kontroli, ale tylko u części chorych (podgrupa B i C), co w części potwierdza wyniki uzyskane przez cytowanych autorów. Należy dodać, iż w obu podgrupach tych chorych było najwięcej pacjentów z bardziej zaawansowanymi zmianami histologicznymi, w tym większość pacjentów z marskością wątroby. Nie stwierdzono różnicy stężeń IGFBP-3 w zależności od *grading* i *staging* czy stłuszczenia wątroby. W badanej w tej pracy grupie chorych nie stwierdzono korelacji stężenia IGFBP-3 z wiekiem. U części chorych (podgrupa C) wysoką negatywną korelację obserwowano pomiędzy stężeniem IGFBP-3 i stężeniem białka całkowitego. W odróżnieniu od wyników badań innych autorów [Rehem i El-Shikh, 2011; Dehghani i wsp., 2012], w zebranej w tej pracy grupie chorych z zakażeniem HCV nie obserwowano znamiennych korelacji pomiędzy surowiczymi stężeniami obu składników osi IGF, tj. IGFBP-3 z IGF-1.

Oprócz negatywnych korelacji stężeń IGFBP-3 z wiekiem [Wu i wsp., 2004; Raslan i wsp., 2007; Mattsson i wsp., 2008; Raslan i wsp., 2010; Rehem i El-Shikh, 2011], w piśmiennictwie opisano także ujemne korelacje tego białka ze stężeniem bilirubiny [Colakoğlu i wsp., 2007; Rehem i El-Shikh, 2011; Dehghani i wsp., 2012], wielkością śledziony [Colakoğlu i wsp., 2007; Rehem i El-Shikh, 2011], aktywnością AST [Raslan i wsp., 2007], stężeniem kreatyniny i fosfatazy zasadowej [Rehem i El-Shikh, 2011] oraz stężeniem AFP [Aleem i wsp., 2012]. Pozytywne korelacje pomiędzy stężeniem IGFBP-3 dotyczyły stężenia albumin [Colakoğlu i wsp., 2007; Raslan i wsp., 2007; Rehem i El-Shikh, 2011] i wartości czasu protrombinowego [Raslan i wsp., 2007; Rehem i El-Shikh, 2011]. Zdaniem niektórych autorów obniżone stężenia IGFBP-3 u pacjentów z marskością wątroby nie są konsekwencją obniżonej genowej transkrypcji tego białka, a związane prawdopodobnie ze zmianami na poziomie translacyjnym i/lub potranslacyjnym

[Ross i wsp., 1996]. Inni z badaczy wskazują, że obniżonemu stężeniu IGFBP-3 w surowicy u pacjentów z marskością wątroby towarzyszy brak aktywności proteazowej tego białka [Moller i wsp., 1995; Ross i wsp., 1996].

Analiza genowej ekspresji z użyciem mikromacierzy cDNA zastosowana w 20 pierwotnych nowotworach wątroby, wśród 170 genów o obniżonej ekspresji w HCC, wykazała IGFBP-3 oraz ALS. Nie było wśród tej grupy genów innych składników systemu IGF [Okabe i wsp., 2001].

Surowiczy wskaźnik IGF-1/IGFBP-3

Jak przedstawiono wcześniej, stężenia IGF-1 u pacjentów badanych w tej pracy obniżały się wraz z progresją zmian histologicznych oraz wykładnikami tych zmian w testach biochemicznych, natomiast stężenie IGFBP-3 nie wykazywało tak wielu zależności z danymi klinicznymi. Stąd też badanie wskaźnika IGF-1/IGFBP-3 posłużyło do lepszej oceny statusu wolnego (niezwiązanego z IGFBP-3) czynnika wzrostu. Ponadto ocena równowagi pomiędzy IGF-1 i IGFBP-3, bardziej niż określenie samego IGF-1 czy IGFBP-3, może być kluczowa w determinacji ryzyka rozwoju złośliwego fenotypu komórek wątroby w drodze stymulowanego przez IGF-1 wzrostu czy apoptozy komórek hamowanej przez IGFBP-3. Założenie to jest zgodne z danymi z piśmiennictwa [Mattera i wsp., 2003; Himoto i wsp., 2013].

U chorych z przewlekłym zakażeniem HCV, badanych w tej pracy, wartość wskaźnika IGF-1/IGFBP-3 była istotnie niższa w stosunku do kontroli. Wysoką negatywną korelację wskaźnika z wiekiem zanotowano w całej grupie badanej. Może to być efekt systematycznego obniżania się stężenia IGF-1 z wiekiem. Podobne obserwacje poczyniono w dużej grupie ($n = 3977$) osób zdrowych, u których wartość wskaźnika IGF-1/IGFBP-3 również korelowała z wiekiem [Lam i wsp., 2010]. W całej badanej grupie notowano wysokie negatywne korelacje badanego wskaźnika także ze stężeniem AFP. Z reguły wysokie negatywne korelacje u badanych w tej pracy pacjentów (zarówno w całej grupie badanej, jak i w podgrupach) dotyczyły surowiczego indeksu IGF-1/IGFBP-3 oraz aktywności zapalnej (*grading*) i stopnia zaawansowania włóknienia (*staging*). Himoto i wsp. także przedstawili negatywną korelację wskaźnika IGF-1/IGFBP-3 ze *staging*, ale równocześnie z wartością HOMA-IR [Himoto i wsp., 2013]. W ogólnej populacji, przy ocenie czynników ryzyka chorób serca, również obserwowano negatywną korelację IGF-1/IGFBP-3 z HOMA-IR [Lam i wsp., 2010].

W badaniach przeprowadzonych w ramach tej pracy negatywna korelacja badanego wskaźnika z HOMA-IR była znamienna statystycznie, jednak dość słaba (współczynnik korelacji Spearmana $< -0,500$; $p < 0,05$).

Opisano zmniejszanie się wartości surowiczego wskaźnika IGF-1/IGFBP-3 wraz ze wzrostem stłuszczenia wątroby [Himoto i wsp., 2013], a także ze stężeniami trójglicerydów i całkowitego cholesterolu [Lam i wsp., 2010]. W badanej w tej pracy grupie chorych takich zależności nie obserwowano.

W rozwiniętym HCC wskaźnik IGF-1/IGFBP-3 był znamienne wyższy w porównaniu z marskością wątroby, co wykazali po raz pierwszy Mattera i wsp. [Mattera i wsp., 2003]. W obecnej pracy nie analizowano wartości surowiczego wskaźnika IGF-1/IGFBP-3 u chorych z HCC, więc trudno odnieść się do tych wyników badań. Bardzo wysoką pozytywną korelację IGF-1/IGFBP3 z ładunkiem wirusa ($r = 0,790$) zanotowano u części chorych (podgrupa C). Nie ma odniesienia do takiego wyniku badań w innych pracach. W całej badanej w tej pracy grupie chorych stwierdzono wysokie negatywne korelacje badanego wskaźnika z aktywnością aminotransferaz (głównie AST) oraz GGTP.

Wraz z postępem choroby w kierunku marskości wątroby u chorych zakażonych HCV notuje się wzrost stężenia gamma-globulin i obniżanie się stężenia albumin. Wartość wskaźnika IGF-1/IGFBP-3 u części badanych chorych (podgrupa C) obniżała się wraz ze spadkiem stężenia albumin i wzrostem stężenia gamma-globulin. Obniżenie liczby płytek jest cechą charakterystyczną procesu zapalnego przechodzącego w marskość, jak i samej marskości wątroby. Wysokie pozytywne korelacje obserwowano także pomiędzy IGF-1/IGFBP-3 a liczbą płytek w całej badanej grupie oraz w podgrupach A i B.

Podsumowując tę część wyników badań, na podstawie przeprowadzonych analiz można stwierdzić, iż wartość wskaźnika IGF-1/IGFBP-3 jest bardzo przydatnym parametrem pozwalającym na ocenę stopnia uszkodzenia wątroby w przewlekłym zakażeniu HCV. Dotychczas tylko jeden zespół, i to w ostatnim czasie, wykazał obniżenie wskaźnika IGF-1/IGFBP-3 w zależności od *staging* w zakażeniu HCV [Himoto i wsp., 2013]. Autorzy ci wykazali również istotny związek pomiędzy spadkiem wartości ocenianego wskaźnika i spadkiem stężenia Zn w surowicy krwi pacjentów z zakażeniem HCV, jednak współczynnik korelacji był stosunkowo niski [Himoto i wsp., 2013]. Autorzy konkludują, iż spadek surowiczego stężenia Zn, który odgrywa kluczową rolę w stabilizacji transkryptów IGF-1, może wpływać na supresję syntezy IGF-1 (a nie IGFBP-3) przez wątrobę i przyczyniać się do zaburzonej ścieżki sygnałowej i rozwoju insulinooporności u tych chorych [Himoto i wsp., 2013]. Na podstawie wyników badań autorki pracy nie można ustosunkować się do tych obserwacji. Podobnie nie można potwierdzić wysokich korelacji pomiędzy IGF-1/IGFBP-3 ze stłuszczeniem wątroby, prawdopodobnie z powodu małej liczby pacjentów z bardzo nasilonym zwyrodnieniem tłuszczowym w analizowanej grupie z zakażeniem HCV.

W piśmiennictwie opisano zwiększony surowiczy wskaźnik IGF-1/IGFBP-3 u pacjentów z HCC w porównaniu z pacjentami z marskością wątroby i z podobnym stopniem niewydolności wątroby [Mattera i wsp., 2003]. Nie mając do dyspozycji surowicy pacjentów z HCC, nie można odnieść się do tych obserwacji.

Dane epidemiologiczne wskazują, iż podwyższone stężenia IGF-1, obniżone IGFBP-3 i obniżony wskaźnik IGF-1/IGFBP-3 są związane ze wzrostem ryzyka rozwoju nowotworów, tj. piersi, prostaty, płuc czy jelita grubego [Luo i wsp., 2005]. W przypadku rozwoju HCC obserwuje się zjawisko odwrotne. Obniża się

stężenie IGF-1 [Wu i wsp., 2004] i stężenie IGFBP-3 [Aleem i wsp., 2012], natomiast wskaźnik IGF-1/IGFBP-3 wzrasta [Mattera i wsp., 2003].

Na podstawie przeprowadzonych badań tej części pracy nasuwa się wniosek, iż powtarzalne oznaczanie stężeń IGF-1 i IGFBP-3 może mieć znaczenie w badaniach przesiewowych w diagnostyce rozwoju HCC. Równoczesne ze stężeniem obu białek obliczanie surowiczego wskaźnika IGF-1/IGFBP-3 ma znaczenie w dokładniejszej ocenie progresji zmian histologicznych w wątrobie. Ze względu na wysoką korelację surowiczego wskaźnika z ładunkiem wirusa HCV i zaawansowaniem włóknienia w wątrobie (*staging*), wartość tego wskaźnika może służyć jako dodatkowy czynnik prognostyczny przed planowanym leczeniem przeciwwirusowym.

IGFBP-6

IGFBP-6 jest ważnym składnikiem rodziny białek wiążących IGF, ale jego rolę przypisuje się głównie zahamowaniu aktywności IGF-2. Bierze udział w regulacji procesów proliferacji komórkowej i zahamowania wzrostu. Zmiany stężenia i/lub struktury IGFBP-6 mogą wpływać na łączenie się IGF-2 z IGF-2R i w ten sposób regulować drogi sygnałowe PKC, przez co odgrywać rolę w rozwoju HCC u pacjentów zakażonych HCV [Ahmad i wsp., 2011]. Zastosowanie 75 niezależnych przeciwciał do oceny surowiczych markerów wczesnego wykrywania HCC, wśród 7 białek, które znacząco różnicowały pacjentów z HCC i pacjentów z przewlekłym zapaleniem wątroby (HBV i HCV) znalazło się właśnie białko wiążące IGFBP-6 [Sun i wsp., 2008]. Wykazano, iż u pacjentów z HCC stężenie IGFBP-6 było obniżone w porównaniu ze stężeniem tego białka w przewlekłym zakażeniu wirusowym wątroby ($p < 0,05$). Jednakże nie można uznać IGFBP-6 za samodzielny marker pozwalający na stwierdzenie obecności HCC. Dopiero kombinacja stężeń AFP, L-selektyny, IGFBP-6 i receptora dla interleukiny 6 (IL-6R), zdaniem autorki pracy, może tworzyć wysokiej jakości wskaźnik predykcyjny nowotworzenia [Sun i wsp., 2008].

Wśród badanych w obecnej pracy pacjentów wzrost stężenia IGFBP-6 wraz z wiekiem obserwowano tylko u części chorych (podgrupa B), zaś ze wzrostem BMI w całej badanej grupie. Nie ma możliwości odniesienia tych wyników do piśmiennictwa, gdyż nie znaleziono w nim opisów stężeń IGFBP-6 u zakażonych HCV czy w chorobach wątroby.

Warto jednak zaznaczyć, iż białko to odróżnia od innych białek wiążących IGF-y ok. 50-razy większa siła wiązania z IGF-2 w porównaniu z IGF-1 i obecność miejsc O-glikozylacji w cząsteczce białka. Podobne z IGF-1 są miejsca syntezy IGFBP-6, gdyż poza wątrobą są to m.in. płuca, skóra, mięśnie szkieletowe oraz wyspy Langerhansa w trzustce [Rechler i Clemmons, 1998].

IGF-1R

IGF-1R jest głównym miejscem przyłączenia IGF-1. Na poziom jego ekspresji wpływają hormony sterydowe i czynniki wzrostu [Sepp-Lorenzino 1998; Yu

i Rohan, 2000]. W piśmiennictwie nie ma prac poświęconych badaniom nad surowiczymi stężeniami IGF-1R w chorobach wątroby o różnej (w tym wirusowej) etiologii.

U wszystkich badanych w tej pracy pacjentów stężenie IGF-1R zmniejszało się wraz z wiekiem. Nie zanotowano jednak istotnych różnic w surowiczym stężeniu IGF-1R pomiędzy pacjentami z przewlekłym WZW typu C i kontrolą. Nie obserwowano także zmian w stężeniu IGF-1R w zależności od płci, *grading* czy *staging*. Wysoką pozytywną korelację IGF-1R zanotowano ze stężeniem albumin u pacjentów z długotrwałym zakażeniem HCV (podgrupa B). Surowicze stężenie IGF-1R nie było natomiast zależne od stężenia samego IGF-1.

Większość badań dotyczących kancerogenezy wątrobowej skupia się na określaniu tkankowej ekspresji IGF-1R, co będzie omówione w dalszej części dyskusji.

5.2. Składniki osi IGF a udział estrogenów w chorobach wątroby

Zależność funkcjonalną składników osi IGF od hormonów płciowych, w tym estrogenów i ich receptorów w kontekście kancerogenezy podejmują liczne prace [przegląd tematu: Dupont i Le Roith, 2001; Leung i wsp., 2004; Alvaro i wsp., 2006]. W liniach nowotworowych raka piersi z pozytywną ekspresją receptora estrogenowego nadprodukcja IGF-1R powodowała nasiloną proliferację komórkową w mechanizmie niezależnym od estrogenu [Guvakova i Surmacz, 1997]. Estradiol potęguje efekty IGF-1 w zwiększaniu ekspresji cyklin: D1 i E oraz fosforylacji białka RB (*retinoblastoma*). Oba białka (estradiol i IGF-1) w różny sposób regulują także ekspresję cyklinozależnych kinaz, p21 i p27 w komórkach hodowanych raka piersi MCF-7 [Dupont i Le Roith, 2001]. Generalnie uważa się, że estradiol wzmacnia efekty drogi sygnałowej IGF-1/IGF-1R poprzez indukowanie ekspresji IRS-1 (*insulin receptor substrate 1*), substratu dla IGF-1R [Dupont i Le Roith, 2001]. 17 β -estradiol i IGF-1 stymulowały proliferację komórek HuH-28 (linia komórkowa wewnątrzwątrobowego *cholangiocarcinoma*) podobnie jak MCF-7, a w przypadku dwóch innych linii komórkowych tego raka dróg żółciowych (TFK-1 i Mz-ChA-1), jeszcze silniej w porównaniu z komórkami raka piersi [Alvaro i wsp., 2006].

Estrogeny wpływają również na ekspresję i funkcjonowanie hormonu wzrostu i jego receptora. Regulują sekrecję GH pośrednio poprzez modulujący wpływ także na IGF-1 [Leung i wsp., 2004; Meinhardt i Ho, 2006].

Bazując na klinicznych obserwacjach wykazano, iż przewlekłe zakażenie HCV podlega szybszej progresji w ogólnej populacji mężczyzn oraz kobiet po menopauzie. Niedawne badania Mekky i wsp. w mononuklearach krwi obwodowej (PBMC) od pacjentów z zakażeniem HCV, wykazały różnice płciowe w genetycznym profilu białka MxA, markera aktywacji ścieżki sygnałowej JAK/STAT, w którą zaangażowany jest IFN (więcej MxA u kobiet przed menopauzą w porównaniu z okresem pomenopauzalnym i grupą mężczyzn). Podanie estradiolu

przed leczeniem IFN obniżało ekspresję MxA we wszystkich grupach pacjentów, co miałyby świadczyć, że estrogen nie jest kluczowym hormonem w aktywacji drogi sygnałowej JAK/STAT [Makki i wsp., 2012]. Wcześniejsze prace wykazały, iż stłuszczenie wątroby charakterystyczne dla zakażenia HCV, prowadzi do wzrostu peroksydacji lipidów w hepatocytach i aktywacji komórek gwiaździstych (*Ito cells*). Komórki te odpowiadają na bodźce wywołane stanem zapalnym i produkują składniki macierzy pozakomórkowej [przegląd tematu: Shimizu 2003]. Dane kliniczne przemawiają również za tym, iż progresja włóknienia wątroby jest szybsza u kobiet zakażonych HCV w okresie pomenopauzalnym niż u kobiet przed menopauzą. Przyjmowanie terapii hormonozastępczej z estrogenem i progesteronem w tym czasie spowalnia progresję włóknienia [Di Martino i wsp., 2004]. Na modelu zwierzęcym wykazano, iż po terapii estradiolem (E2) uzyskuje się zahamowanie również stłuszczenia wątroby [Shimizu 2003]. Model hodowanych hepatocytów narażonych na oksydacyjny stres wskazuje, iż hamujący wpływ E2 na włóknienie wątroby zależy od hamowania funkcji białek AP1 i NF- κ B [Shimizu 2003]. Za najsilniejszy fizjologiczny estrogen (endogeny antyoksydant) hamujący włóknienie wątroby, a przez to opóźniający rozwój HCC uznano 17 β -estradiol [Shimizu i wsp., 1998]. Autorzy tych badań konkludują, iż egzogeny oraz endogeny estradiol może hamować proces hepatokancerogenezy. Receptory estrogenowe mają mieć wpływ na zahamowanie złośliwej transformacji preneoplastycznych zmian w komórkach wątroby, a androgeny i ich receptory są zaangażowane w sam proces nowotworzenia wątrobowego [Shimizu i wsp., 1998]. W eksperymentalnych badaniach hamowania włóknienia wątroby u szczurów wykazano, iż jest ono zależne od dawki podawanego estradiolu. U samców szczura podawaniu estradiolu towarzyszyła zmniejszona produkcja kolagenu typu I i III (na poziomie białka i mRNA prokolagenu) w wątrobie, oraz tkankowego inhibitora metaloproteinaz (*tissue inhibitor of metalloproteinase-1*, *TIMP-1*) oraz jednego z produktów peroksydacji lipidów, aldehydu malonowego [Yasuda i wsp., 1999]. Inne badania w modelu włóknienia wątroby wywołanym CCl₄ u samic szczurzych wykazały, iż 17 β -estradiol hamuje aktywność aminotransferaz (ALT, AST), obniża poziom kwasu hialuronowego i kolagenu typu IV w surowicy oraz zmniejsza ilość kolagenu w wątrobie. Sam estradiol oraz jego metabolity (w sposób zależny od dawki) hamowały proliferację komórek gwiaździstych wątroby i syntezę kolagenu [Liu i wsp., 2004].

U zdrowych kobiet po menopauzie wykazano, iż doustna terapia estrogenami, niezależnie od formuły, znacząco obniża surowicze poziomy IGFBP-3 i ALS. Obniżenie to było zależne od dawki i drogi podawania estrogenów. U kobiet z niedoborem GH oraz hipogonademią również obniżały się stężenia IGFBP-3 oraz ALS. Równoległe do tych zmian spadały surowicze poziomy samego IGF-1 [Kam i wsp., 2000]. Badania te wskazują na rolę estrogenów w obniżaniu surowiczych stężeń IGFBP-3 oraz samego IGF-1 i to niezależnie od GH. Sugeruje się przy tym, iż redukcja surowiczych stężeń IGFBP-3 po podaniu różnych preparatów estro-

genów jest wtórna do obniżania IGF-1 i ALS [Kam i wsp., 2000]. Inne badania u nieleczonych przeciwwirusowo mężczyzn z marskością wątroby (76% na tle zakażenia HCV; w wieku 40–69 lat) wykazały średnie stężenie estradiolu w granicach $28,0 \pm 12,7$ pg/ml. Ryzyko rozwoju HCC u tych chorych wzrastało wraz ze wzrostem stosunku stężeń testosteronu do estradiolu u tych chorych. Autorzy konkludują, iż podwyższone surowicze stężenia testosteronu razem z obniżonym stężeniem estradiolu promują rozwój HCC u pacjentów z marskością wątroby [Tanaka i wsp., 2000].

Wykazuje się również rolę receptorów estrogenowych (ER), obecnych w większej ilości u mężczyzn w porównaniu z kobietami w patogenezie przewlekłych chorób wątroby [Shimizu i wsp., 2001; Shimizu 2003]. Obniżoną ekspresję ER obserwowano u kobiet po menopauzie oraz u obu płci w marskości wątroby [Shimizu 2003]. Grupa Shimizu i wsp. u pacjentów z HCC na tle zakażenia HCV wykazała niski wątrobowy poziom ER. Prócz obniżonego ER, dodatkowymi niezależnymi czynnikami prognostycznymi HCC u zakażonych HCV był wiek powyżej 49 lat, płeć męska i podwyższony poziom aldehydu malonowego w wątrobie [Shimizu i wsp., 2001].

U badanych w tej pracy pacjentów z zakażeniem HCV oceniono stężenia estradiolu w surowicy w grupie mężczyzn (średnia $39,20 \pm 12,45$ pg/ml) i kobiet ($74,21 \pm 76,33$ pg/ml). Nie różniły się one istotnie. Wynik ten wymaga komentarza. Dla celów obecnej pracy nie wyodrębniono grupy kobiet przed i po menopauzie oraz z przyczyn obiektywnych nie analizowano stężenia estradiolu w zależności od fazy cyklu miesiączkowego. Stąd też komentarz w dyskusji dotyczyć będzie zależności pomiędzy stężeniami estradiolu i składników osi IGF-1 przeprowadzonych w grupie mężczyzn z zakażeniem HCV ($n = 86$). Stężenie estradiolu u pacjentów płci męskiej z zakażeniem HCV nie różniło się istotnie w porównaniu z uzyskanym u zdrowych krwiodawców (średnia $39,20 \pm 12,45$ vs. $40,42 \pm 7,67$; $p > 0,05$). Analiza korelacji Spearmana wykazała jedynie słabe, choć istotne negatywne zależności pomiędzy stężeniem estradiolu i IGF-1 w surowicy krwi ($r = -0,247$; $p < 0,05$), a wyższy współczynnik negatywnej korelacji dotyczył wartości wskaźnika IGF-1/IGFBP-3 i stężenia estradiolu ($r = -0,399$; $p < 0,05$). Obserwowano również bardzo słabą pozytywną korelację pomiędzy stężeniem estradiolu i IGFBP-6 w tej grupie pacjentów z zakażeniem HCV ($r = 0,289$; $p < 0,05$). Badania obecne nie potwierdziły istotnych różnic stężeń estradiolu u pacjentów płci męskiej z różnie nasiloną aktywnością zapalną wątroby (*grading*) ani w zależności od zaawansowania włóknienia wątrobowego (*staging*). Wyniki te są zgodne z uzyskanymi wcześniej przez autorkę [Adamek i wsp. 2012]. Inne prace wykazały 50% obniżenie surowiczego stężenia, jak i wątrobowej ekspresji mRNA IGF-1 w zależności od dawki estrogenów podawanych zarówno *in vivo* (szczury po owariektomii), jak i w szczurzej linii *hepatoma* (Fe33) [Krattenmacher i wsp., 1994]. Nieliczne badania *in vitro* na zakażonych HCV liniach komórkowych HCV J6/JFH1 i Huh-7.5 wykazały hamujący wpływ 17β -estradiolu

(ale nie progesteronu) na produkcję wirionów HCV [Hayashida i wsp., 2010]. Podawanie estradiolu nie wpływało na wejście HCV do komórki, replikację HCV RNA i syntezę białek wirusowych. Zahamowanie produkcji było zależne od dawki E2. Mechanizm hamowania tworzenia cząstek wirusa przez E2 zakładał udział receptora estrogenowego α (ER α) [Hayashida i wsp., 2010].

Uzyskane wyniki wymagają jednak kontynuacji na grupie pacjentów z bardziej zaawansowanymi zmianami histologicznymi, porównania grupy kobiet przed- i po menopauzie, oceny stężeń androgenów i/lub poziomu ekspresji receptorów estrogenowych dla zbadania mechanizmów interakcji składników osi IGF i hormonów płciowych w nowotworzeniu na tle zakażenia HCV.

5.3. Ekspresja tkankowa białek z rodziny IGF

IGF-1

IGF-1 jest mitogenem regulującym proliferację komórkową. Zmiany w poziomie tkankowej ekspresji IGF-1 mogą odgrywać istotną rolę w procesie transformacji nowotworowej komórek. Obniżoną ekspresję IGF-1 (białko i mRNA) w porównaniu z kontrolą i/lub otaczającą prawidłową tkanką wykazano w komórkach HCC [Su i wsp., 1989; Huynh i wsp., 2002; Luo i wsp., 2005; Morali i wsp., 2005]. Obserwacje te potwierdzono również na liniach komórek wątrobowych o złośliwym fenotypie (HepG2, Huh-7, PCL/PRF/5, Hep 3B) oraz w ludzkim *hepatoma in vivo* [Su i wsp., 1989].

W przeprowadzonych w tej pracy badaniach, komórkową ekspresję IGF-1 wykazano u 98% pacjentów, a jej lokalizacja dotyczyła głównie cytoplazmy hepatocytów oraz cholangiocytów. Lokalizacja cytoplazmatyczna jest zgodna z udziałem IGF-1 w sekrecyjnych szlakach tych komórek.

U badanych chorych z przewlekłym WZW typu C obserwowano obniżoną ekspresję białka IGF-1 w stosunku do kontroli. Ekspresja ta obniżała się wraz ze wzrostem zaawansowania włóknienia (*staging*) w wątrobie. W badaniach Stefano i wsp. u pacjentów z przewlekłym zapaleniem wątroby typu C nie stwierdzono różnic w ekspresji mRNA IGF-1 w porównaniu ze zdrową wątrobą, ale kontrolę stanowił tylko jeden prawidłowy narząd. Nie obserwowano w tej grupie znaczących korelacji ekspresji mRNA IGF-1 ze zmianami histopatologicznymi [Stefano i wsp., 2006].

Badania obecne wykazały obniżoną w stosunku do kontroli wątrobową ekspresję IGF-1 także w badanych tkankach z HCC (p na granicy istotności). Jest to zgodne z opisami z piśmiennictwa [Clemmons 1997; Huynh i wsp., 2002; Luo i wsp., 2005, Morali i wsp., 2005]. U pacjentów z długotrwałym zakażeniem HCV (podgrupa B) wykazano wysokie negatywne korelacje pomiędzy wątrobową ekspresją IGF-1 i aktywnością obu aminotransferaz (ALT i AST) oraz stężeniem AFP, co zostało udokumentowane także we wcześniejszych pracach autorki

[Kasprzak i wsp., 2011]. Niższa ekspresja IGF-1 w wątrobie pacjentów z podgrupy A wiązała się także ze wzrostem ładunku wirusa (HCV-RNA) (słaba korelacja). W całej grupie badanej nie udało się wykazać istotnych korelacji pomiędzy tkankową ekspresją IGF-1 (wykrytą metodą immunocytochemiczną i ocenioną morfometrycznie) z surowiczym stężeniem tego czynnika wzrostu. Najwyższy współczynnik korelacji Spearmana uzyskano w podgrupie B ($r = 0,348$), jednak nie był on statystycznie istotny ($p > 0,05$).

Podsumowując, wyniki obecne mogą świadczyć o zachowaniu wątrobowej ekspresji dojrzałej formy białka IGF-1 u chorych z zakażeniem HCV (choć obniżonej ilościowo w stosunku do kontroli) i potwierdzić powszechnie przyjęte źródło krążącego IGF-1. Brak znamiennych korelacji między wątrobową ekspresją i surowiczym stężeniem IGF-1 może sugerować udział zakażenia HCV w powstającym zaburzeniu wzajemnych korelacji. Potwierdzenie produkcji IGF-1 przez wątrobę (zdrową i/lub zmienioną zapalnie) oceniono również na poziomie mRNA IGF-1, co będzie omówione w dalszej części dyskusji.

IGF-1R

Receptor typu I IGF (IGF-1R) kontroluje proliferację, różnicowanie i wzrost komórek. Wzrost ekspresji IGF-1R na hepatocytach może stymulować te komórki do regeneracji w odpowiedzi na ich uszkodzenie w przebiegu chorób wątroby, w tym spowodowanych zakażeniem HCV. Na modelu mysim wykazano, iż wzrost ekspresji IGF-1R wiązał się z regeneracją wątroby po częściowej hepatektomii [Desbois-Mouthon i wsp., 2006]. Podobnie we fragmentach ludzkiej wątroby przeznaczonej do przeszczepu wykazano wzrost ekspresji mRNA IGF-1R [Stefano i wsp., 2006]. U chorych z przewlekłym zapaleniem wątroby typu C ekspresję IGF-1R wykryto w 85% przypadków i była ona także większa w porównaniu z kontrolą [Stefano i wsp., 2006].

W przeprowadzonych w tej pracy badaniach ekspresję IGF-1R wykazano u 100% pacjentów z przewlekłym WZW typu C i kontroli oraz w 98% przypadków HCC. W badanych w tej pracy fragmentach wątroby i to niezależnie od grupy (kontrola vs. WZW typu C oraz HCC) IGF-1R zlokalizowano głównie w cytoplazmie i błonach hepatocytów i cholangiocytołów. Obserwowano także jądrową lokalizację badanego białka u niektórych pacjentów. Z zastosowaniem komercyjnie dostępnych przeciwciał, cytoplazmatyczno-błonową ekspresję IGF-1R wykazano również na poziomie mikroskopu fluorescencyjnego. Inni autorzy także opisali ekspresję IGF-1R w cytoplazmie hepatocytów, cytoplazmie i błonach komórek nabłonka dróg żółciowych, w komórkach Browicza-Kupffera oraz w mniejszym stopniu w limfocytach naciekających przestrzenie wrotne [Stefano i wsp., 2006]. Podobnie Sedlaczek i wsp. opisali cytoplazmatyczny i błonowy wzór komórkowej ekspresji IGF-1R w hepatocytach pacjentów z marskością wątroby na tle zakażenia wirusowego (HBV i HCV) oraz w kontroli [Sedlaczek i wsp., 2003]. Komórki immunopozytywne były rozproszone i dotyczyły wszystkich badanych fragmen-

tów wątroby, bez uprzywilejowanych miejsc występowania w obrębie zrazika wątrobowego. Błonowy wzór ekspresji jest typowy dla receptora zbudowanego z podjednostek zewnątrzkomórkowych i pełnionej funkcji wiązania z ligandem. Cytoplazmatyczna reakcja w przypadku IGF-1R w wielu hepatocytach, obserwowana przez autorkę obecnej pracy i potwierdzona w piśmiennictwie u pacjentów z wirusowym zakażeniem wątroby [Sedlaczek i wsp., 2003], może sugerować wykrywanie głównie domeny transbłonowej białka i jej części obecnej w cytoplazmie. Jądrowa lokalizacja IGF-1R może świadczyć o translokacji tego białka (lub fragmentu białka) do jądra komórkowego i potencjalnym wpływie na ekspresję genową czynników transkrypcyjnych istotnych w procesie kancerogenezy na tle zakażenia HCV. Należy dodać, że jądrową ekspresję obserwowano zarówno u pacjentów z WZW typu C, jak i w HCC badanych w obecnej pracy.

W przewlekłym WZW typu C, marskości wątroby, w HCC i liniach komórkowych ludzkiego *hepatoma* obserwowano wzrost ekspresji IGF-1R w porównaniu ze zdrową wątrobą [Caro i wsp., 1988; Scharf i wsp., 1998; Stefano i wsp., 2006]. Inni opisali obniżoną ekspresję IGF-1R w komórkach HCC w porównaniu z otaczającą niezmienną morfologicznie wątrobą, ale po standaryzacji danych różnica w ekspresji w obu tkankach nie była istotna [Huynh i wsp. 2002].

Ekspresja tkankowa IGF-1R u badanych w tej pracy chorych z przewlekłym WZW C była niższa w porównaniu do kontroli, jak i HCC, jednak różnice te nie były istotne statystycznie. Poza dodatnią korelacją ze stężeniem glukozy nie wykazano innych znamienych zależności ekspresji IGF-1R z danymi klinicznymi i zmianami histologicznymi u pacjentów przewlekle zakażonych HCV. Potwierdzają to obserwacje innych autorów, którzy także nie obserwowali korelacji ekspresji IGF-1R ze zmianami histopatologicznymi pacjentów przewlekle zakażonych HCV [Stefano i wsp., 2006]. Nie obserwowano istotnych statystycznie korelacji pomiędzy tkankową ekspresją IGF-1R a jego surowiczym stężeniem u badanej grupy pacjentów z WZW typu C.

Odnosnie do ekspresji receptora IGF, należy pamiętać, iż do tej samej rodziny co IGF-1R należą receptor insulinowy (IR), IGF-2R oraz receptory hybrydowe zbudowane zarówno z IR, jak i IGF-1R [Belfiore i wsp., 2009; Rojek i Niedziela, 2009]. Szczególne podobieństwa strukturalne pomiędzy wszystkimi typami receptorów dotyczą rejonów wiążących ligandy [przegląd tematu: Siddle 2011]. Różne ligandy mogą działać przez ten sam receptor i *vice versa*, ten sam ligand, np. IGF-1 może wiązać się z różnymi receptorami. IGF-1 wiążąc się (słabsza siła wiązania) z IR, dodatkowo może ujawniać swoją aktywność mitotyczną. Powszechnie wiadomo, iż tak jak wiele innych receptorów tyrozynowych, IR i IGF-1R i 2 regulują ekspresję genów odpowiedzialnych za wzrost komórki, co zostało opisane we wstępie pracy.

Receptor insulinowy tworzą dwie izoformy: IR-A i IR-B, funkcjonalnie różniące się wyższą siłą wiązania IGF-2 z izoformą A [Belfiore i wsp., 2009]. W dojrzałej wątrobie wykazuje się głównie aktywność izoformy IR-B, za pomocą której uwy-

datniają się przede wszystkim efekty metaboliczne insuliny. Izoforma A receptora insulinowego wiąże się z aktywnością mitotyczną i wykazać ją można głównie w tkankach obwodowych [Belfiore i wsp., 2009]. Hodowane komórki pierwotnego raka wątroby HepG2 w ~80% dają ekspresję IR-A i demonstrują płodowy fenotyp ze wzrostem syntezy AFP, jednak pod wpływem deksametazonu mogą zmienić tę ekspresję na korzyść ~80% produkcji IR-B [Kosaki i Webster, 1993]. Względny wzrost ilości IR-A i insulinooporności pojawiają się z także wiekiem. Wzrost ekspresji IR-A może nasilać także drogi sygnałowe *via* receptory hybrydowe IR-A/IGF-1R [Pandini i wsp., 2002]. W komórkach pierwotnego raka prostaty oprócz ekspresji IGF-1R wykazano znacząco wyższą ekspresję IR w porównaniu z łagodnymi zmianami komórek nabłonka gruczołu [Cox i wsp., 2009].

Zaburzenia *splicingu* IR wykazywano w wielu nowotworach u człowieka, ze wzrostem stosunku IR-A/IR-B [przegląd tematu: Belfiore i wsp., 2009]. Temat ten wykracza poza zainteresowania i cele obecnej pracy. Przykładowo jednak należy podać, iż zmienioną ekspresję IR i jego podjednostek odnotowano m.in. w raku piersi, tarczycy, jelita grubego, płuc, nowotworach trofoblastu i *leiomyosarcoma* [Belfiore i wsp., 2009].

Znaczenie receptorów hybrydowych (HR) w patologii podnoszone jest od początku lat 80. ubiegłego wieku [Kasuga i wsp., 1983; Soos i Siddle, 1989]. Fizjologiczna rola HR nie jest dobrze poznana. Wydaje się, iż wiążą one silniej IGF-1 niż insulinę [Belfiore i wsp., 2009]. W zależności od izoformy IR (A lub B) również hybrydowe receptory noszą nazwę HR-A lub HR-B. Zarówno IGF-1, jak i insulina mogą aktywować autofosforylację IR i podjednostki β IGF-1R [Belfiore i wsp., 2009]. Biologiczna funkcja HR poznawana jest również w modelu traktowania komórek hodowanych HepG2 glukozaminą. Aminocukier ten (składnik kwasu hialuronowego) indukuje uszkodzenie IGF-1R oraz IR-mediowanej ścieżki sygnałowej, w części zależne od zmian w aktywacji HR. Efekt hamujący działanie glukozaminy na HR miało zastosowanie kombinacji insuliny z IGF-1 [Sakai i Clemmons, 2003].

Nadekspresję HR wykazano w licznych nowotworach u człowieka (raki piersi, tarczycy, prostaty, *myosarcoma* czy *osteosarcoma*). Współistnienie IR-A, IR-B i HR z IGF-1R zostało zademonstrowane także w HPV-pozytywnych komórkach raka szyjki macicy [Serrano i wsp., 2008].

Odnosząc się do badań innych autorów nad rolą wszystkich receptorów zaangażowanych w drogi sygnałowe osi IGF, wydaje się słuszne, by je kontynuować także u pacjentów z zakażeniem HCV, u których mechanizmy prowadzące do raka wątroby są wciąż słabo poznane. Poznanie roli IR i HR u pacjentów zakażonych HCV mogłoby pozwolić na lepsze zrozumienie czynników promujących rozwój raka w warunkach aktywnej replikacji HCV, hiperinsulinemii, zmian w zakresie hormonów płciowych, otyłości czy innych analizowanych w tej pracy wykładników uszkodzenia wątroby. Pomogłoby to również lepiej scharakteryzować czynniki odpowiedzialne za oporność na terapię antywirusową (lub przeciwnowotworową) i monitorować efekty leczenia.

W ostatnich latach opublikowano wiele prac wskazujących na udział IGF-1R w transformacji i proliferacji komórek nowotworowych w wielu typach ludzkich nowotworów (prostaty, piersi, jelita grubego), jak również w przypadkach przerzutów nowotworowych [przegląd tematu: Arcaro 2013]. W związku z powyższym IGF-1R stał się obiecującym celem dla nowych preparatów terapeutycznych w kombinacji z lekami dotychczas stosowanymi. Aktualnie prowadzony jest szereg badań klinicznych nad przeciwciałami neutralizującymi IGF-1R czy małe cząsteczkowymi inhibitorami aktywności kinazy tyrozynowej IGF-1R [przegląd tematu: Wu i Zhu, 2011]. Cixutumumab, ludzkie monoklonalne IgG1 przeciwciało anti-IGF-1R, w połączeniu z temsirolimumem we wstępnych badaniach klinicznych u pacjentek z przerzutami raka piersi opornymi na dotychczasowe terapie nie wykazało obiektywnej poprawy, ale u 4 pacjentek nie obserwowano progresji choroby przez co najmniej 4 miesiące [Ma i wsp., 2013]. Ganitumab (ludzka immunoglobulina IgG1 hamująca IGF-1R) w połączeniu z gemcitabiną w badaniach II fazy poprawia wskaźnik przeżycia u pacjentów z przerzutami raka trzustki [Kindler i wsp., 2012]. Doustnie biodostępny OSI-906 selektywny inhibitor kinazy IGF-1R/IR w ksenograficznym modelu ludzkiego raka jelita grubego w połączeniu z irinotecanem zahamował wzrost guza. Dodatkowo nie obserwowano utraty masy ciała w porównaniu z kontrolą [Flanigan i wsp., 2010]. W ostatnim okresie rozpoczęto także badania nad zastosowaniem przeciwciał monoklonalnych anti-IGF-1R w terapii HCC [Wu i Zhu, 2011]. Kombinacja leczenia mysimi anti-IGF-1R w połączeniu z doxorubicyną wzmogła redukcję proliferacji komórkowej i apoptozę na liniach komórkowych ludzkiego HCC (SMMC-7221 i Bel-7402) [Yue i wsp., 2012]. U myszy, z wywołanym podaniem linii komórkowych Huh-7 HCC, terapia monoklonalnymi przeciwciałami anti-IGF-1R obniżyła komórkową proliferację i przeżywalność komórek guza. Nie obserwowano jednak wpływu na wzrost apoptozy, gdyż wiązałoby się to z toksycznością zwiększonej dawki leku [Tovar i wsp., 2010]. Dotychczas nie ma opublikowanych prac dotyczących leczenia HCC przeciwciałami anti-IGF-1R u ludzi. Jedynym lekiem dotychczas zarejestrowanym i stosowanym w przypadkach zaawansowanego raka wątrobowo-komórkowego jest sorafenib, inhibitor wielu kinaz tyrozynowych, tj. RAF (kaskada RAF/MEK/ERK), VEGFR2 i VEGFR3 (*receptor tyrosine kinases vascular endothelial growth factor receptor 2 and 3*), PDGFR (*platelet-derived growth factor receptor*), FLT3, Ret, and c-KIT [Liu i wsp., 2006].

IGFBP-3

Epidemiologiczne i eksperymentalne dane wskazują na rolę IGFBP-3 jako czynnika przeciwnowotworowego [Ali i wsp., 2003]. IGFBP-3 wewnątrzkomórkowo wpływa na regulację apoptozy poprzez modulację wskaźnika Bcl-2/Bax [Butt i wsp., 2000] oraz p53 [Williams i wsp., 2000]. Wiązanie IGFBP-3 z IGF-1 zapobiega interakcjom ligand-receptor i stąd IGFBP-3 może modulować zarówno poziom krążącego IGF-1, jak i tego czynnika wzrostu w środowisku międzykomórkowym,

powiększając liczbę IGF-1-zależnych efektów [Kostecka i Blahovec, 1999]. Uważa się ponadto, że utrata autokrynowego/parakrynowego działania IGFBP-3 może prowadzić do rozwoju i wzrostu masy HCC [Huynh i wsp., 2002]. Są również wyniki badań uznające, że efekty hamujące wzrost guza przez IGFBP-3 są niezależne od wiązania się z IGF-1 [Clemmons 1997]. Ekspresja IGFBP-3 może służyć za czynnik prognostyczny u chorych z chorobami wątroby, w tym z zakażeniem HCV.

W przeprowadzonych w tej pracy badaniach nad ekspresją tkankową IGFBP-3 potwierdzono ją u 97% badanych pacjentów z przewlekłym WZW typu C, zaś w kontroli i HCC odpowiednio u 73% i 52% pacjentów. Lokalizacja komórkowa białka IGFBP-3 w wątrobie pacjentów z zakażeniem HCV dotyczyła zarówno cytoplazmy hepatocytów, jak i komórek zatok wątrobowych. Immunopozytywne na IGFBP-3 komórki zatok wątrobowych (głównie komórki Kupffera) z cytoplazmatycznym wzorem ekspresji opisano także u pacjentów z marskością wątroby na tle wirusowego zapalenia wątroby [Sedlaczek i wsp., 2003]. Cytoplazmatyczna lokalizacja IGFBP-3 potwierdza wydzielniczą funkcję komórek. Jedynie w przypadku HCC, zbadanych w tej pracy, obok cytoplazmatycznej obserwowano także jądrową ekspresję IGFBP-3 w komórkach neoplastycznych. W prawidłowej wątrobie ekspresja IGFBP-3 obecna była głównie w komórkach zatok (komórki Browicza-Kupffera i śródbłonek naczyń), zgodnie z obserwacjami innych autorów poczynionych w wątrobie ludzkiej [Arany i wsp., 1994; Sedlaczek i wsp., 2003] i szczurzej [Scharf i wsp., 1995]. Jądrową lokalizację IGFBP-3 popierają badania na ludzkich keratynocytach, w których taki wzór ekspresji wykazywały wyłącznie dzielące się komórki [Wraight i wsp., 1998]. Późniejsze badania tego zespołu potwierdziły produkcję mRNA IGFBP-3 w proliferujących keratynocytach, a co interesujące, nadekspresja tego białka hamowała podziały komórkowe [Edmondson i wsp., 2005]. Mechanizm potencjalnego wpływu IGFBP-3 na funkcje jądra komórkowego został opisany dzięki wykazaniu sekwencji lokalizacji jądrowej (*nuclear localization sequence*, NLS) na końcu karboksylowym cząsteczki białka. Ścieżka sygnałowa dla transportu IGFBP-3 (a także IGFBP-5) mediowana jest przez czynnik transportu jądrowego, białko importynę β z udziałem energii z hydrolizy ATP i GTP [Schedlich i wsp., 2000].

Ekspresja IGFBP-3 w grupie badanej (podgrupa A) była znamienne wyższa zarówno w porównaniu z kontrolą, jak i HCC. Należy dodać, iż tylko u jednego z chorych tej grupy rozpoznano marskość wątroby, która predysponuje do wystąpienia HCC. Ekspresja IGFBP-3 korelowała istotnie jedynie z BMI pacjentów. Nie obserwowano istotnych statystycznie korelacji między tkankową ekspresją IGFBP-3 i surowiczym stężeniem tego białka u pacjentów z przewlekłym WZW typu C.

W piśmiennictwie nie ma danych dotyczących ekspresji komórkowej IGFBP-3 (badanej metodami immunocytochemicznymi czy na poziomie RNA metodą RT-PCR) u chorych z przewlekłym zapaleniem wątroby typu C.

Opisywano natomiast obniżoną ekspresję mRNA IGFBP-3 w marskości wątroby w porównaniu ze zdrową wątrobą, a także w HCC w stosunku do marsko-

ści wątroby i kontrolnej tkanki [Luo i wsp., 2005; Gong i wsp., 2007]. Z zastosowaniem *Western blotting* Huynh i wsp. wykryli niską ekspresję IGFBP-3 w ok. 70% HCC, a w blisko 30% była ona nieobecna [Huynh i wsp., 2002]. Obniżenie ekspresji IGFBP-3 stwierdza się zarówno we wczesnych, jak i zaawansowanych stadiach HCC u zakażonych HCV [Villanueva i wsp., 2008]. Ponadto istotnym jest wielokrotność obniżenia ekspresji mRNA IGFBP-3 w HCC. Wykazano, iż jej pięciokrotne obniżenie wiąże się z mniejszą wielkością guza, mniejszą inwazją naczyniową oraz niższym ryzykiem wczesnego nawrotu [Tovar i wsp., 2010]. Inne badania pozwoliły wykazać mRNA IGFBP-3 tylko w 10% badanych raków [Yumoto i wsp., 2005].

Tkankowy wskaźnik IGF-1/IGFBP-3

Dla pełniejszego zobrazowania roli osi IGF u pacjentów z przewlekłym WZW typu C, HCC oraz kontroli tkankowej obliczono również wątrobowy wskaźnik IGF-1/IGFBP-3. Istotne obniżenie tego wskaźnika u pacjentów z zakażeniem HCV obserwowano tylko w porównaniu z HCC. Jedyną istotną korelację badanego wskaźnika stwierdzono z BMI. Na podstawie przeprowadzonej analizy wydaje się, iż większe znaczenie diagnostyczno-prognostyczne ma określanie surowiczego, a nie tkankowego wskaźnika IGF-1/IGFBP-3. Tym bardziej, że powtarzalna analiza tkankowego wskaźnika IGF-1/IGFBP-3 nie zawsze jest możliwa ze względów praktycznych (konieczność wykonywania biopsji wątroby).

Badania nad immunocytochemiczną lokalizacją i tkankową ekspresją IGF-1, IGFBP-3 i IGF-1R można podsumować wnioskiem, iż zwiększona tkankowa ekspresja IGFBP-3 i niższy wątrobowy wskaźnik IGF-1/IGFBP-3 u pacjentów z zakażeniem HCV w porównaniu z grupami kontrolnymi sugeruje hepatoprotekcyjną rolę IGFBP-3 w przebiegu przewlekłego zakażenia HCV.

Ekspresja tkankowa IGF-ów a białka HCV

Spośród trzech białek HCV (C, NS5A, NS3) badanych na poziomie tkanki największa ekspresja dotyczyła białka niestrukturalnego NS3, kolejno białka C i NS5A. Dominowała cytoplazmatyczna lokalizacja białek, choć u pojedynczych chorych obserwowano nieliczne immunopoztywne jądra komórkowe (białko C i NS5A). Taki wzór ekspresji białek HCV jest zgodny z danymi z piśmiennictwa [Yasui i wsp., 1998; Suzuki i wsp. 2005; Kasprzak i wsp., 2007]. Nie można wykluczyć wpływu jądrowej lokalizacji na ekspresję czynników transkrypcyjnych, kluczowych w progresji WZW typu C do HCC [przegląd tematu: Kasprzak i Adamek, 2008].

Ekspresja białek HCV u badanych w tej pracy pacjentów pozytywnie korelowała z ładunkiem HCV (białko C), a negatywnie z histologicznymi wykładnikami uszkodzenia wątroby: *grading*, *staging* oraz parametrami biochemicznymi: liczbą płytek krwi i aktywnością GGTP (białko NS3).

W obecnej pracy celowa wydawała się także analiza korelacji wszystkich białek HCV z różnymi składnikami osi IGF (na poziomie białka i mRNA). I tak, ba-

danie wzajemnych korelacji pomiędzy ekspresją białek HCV a ekspresją dojrzałego białka IGF-1 wykazało statystycznie znamienne współlistnienie zmniejszonej ekspresji IGF-1 ze zmniejszoną ekspresją białka C u pacjentów z długotrwałym zakażeniem HCV (podgrupa B). Uzyskane dane są zgodne z pracami opublikowanymi wcześniej [Kasprzak i wsp., 2007; Kasprzak i wsp., 2011].

Nowością obecnych badań jest wykazanie pozytywnych (choć dość słabych) korelacji między ekspresją mRNA promotora P1 *IGF-1* a ekspresją białka NS5A, a mRNA P2 z ekspresją białka NS3. Możliwy wydaje się modulujący wpływ obu białek nie-strukturalnych (NS3 oraz NS5A) na aktywność promotorów genu IGF-1 (P1 i P2), jednak wymagałoby to poparcia z zastosowaniem modelu eksperymentalnego.

Nie ma w piśmiennictwie danych odnośnie do interakcji HCV:IGF-1 na poziomie molekularnym. W jednym z badań na hodowanych komórkach raka wątroby HepG2 wykazano, że białko C zwiększa endogenną ekspresję nie IGF-1, a IGF-2, będąc pozytywnym regulatorem jego transkrypcji, co w efekcie może promować podziały komórkowe [Lee i wsp., 2001].

5.4. Alternatywny splicing IGF-1 w wątrobie pacjentów z zakażeniem HCV

Analiza ekspresji różnych izoform mRNA IGF-1 (P1, P2, IGF-1A, IGF-1B, IGF-1C)

Zainteresowanie dotyczące roli zróżnicowanej transkrypcji genu *IGF-1*, ekspresji różnych izoform (wariantów) mRNA IGF-1, a zwłaszcza potranslacyjnych E-peptydów (w tym identyfikacji potencjalnego E-peptydowego szlaku sygnałowego) systematycznie rośnie na podstawie przeprowadzonych badań *in vivo* i *in vitro* [Dłużniewska i wsp., 2005; Mills i wsp., 2007; Quesada i wsp., 2009; Armakolas i wsp., 2010; Barton i wsp., 2010; Philippou i wsp., 2011].

Alternatywny *splicing IGF-1* najdokładniej scharakteryzowano w tkance mięśniowej szkieletowej i komórkach hodowanych tej tkanki [Yang i wsp., 1996; Mills i wsp., 2007; Pfeffer i wsp., 2009; Barton i wsp., 2010; Matheny i wsp., 2010] i nerwowej [Dłużniewska i wsp., 2005; Quesada i wsp., 2009], nowotworach i liniach komórek nowotworowych [Brokaw i wsp., 2007; Armakolas i wsp., 2010; Koczorowska i wsp., 2011; Philippou i wsp., 2009, 2011; Kasprzak i wsp., 2013]. Sugeruje się, że izoformy *IGF-1*, jak również propeptydy oraz peptydy z końca karboksylowego cząsteczki białka (Ea, Eb, Ec) mogą spełniać inne funkcje w komórce niż dojrzały peptyd [Phillipou i wsp., 2009]. Wskazuje się również na rolę subkomórkowej lokalizacji różnych izoform mRNA IGF-1, w tym jądrowej (i jąderkowej) lokalizacji izoformy i pro-peptydu IGF-1B [Tan i wsp., 2002; Koczorowska 2012]. Nie jest jednak jasne, w jaki sposób izoformy IGF-1 czy powstające z nich pro-peptydy mogą wpływać na funkcje jądra komórkowego. Być może lokalizacja ta świadczy o udziale tych białek i/lub izoform IGF-1 w procesach regulacyjnych, niezależnie od sygnalizacyjnej roli IGF-1.

W mięśni szkieletowym królika, poddanym zmiennej fizycznej aktywności (od 2 godzin do 6 dni), z zastosowaniem techniki RT-PCR wykazano znaczące poziomy ekspresji izoformy IGF-1Eb (odpowiednik Ec u człowieka). Bardzo mało lub nie było wcale tej izoformy w mięśni spoczynkowym [Yang i wsp., 1996]. Badania z wykorzystaniem *real-time* RT-PCR u tego samego zwierzęcia wykazały 9 razy większą ekspresję obu izoform IGF-1 (A i B) w mięśniach okoruchowych w porównaniu z mięśniami kończyn [Feng i van Bartheld, 2011].

Chociaż wątroba jest głównym narządem produkującym i wydzielającym IGF-1, nadal brakuje wiedzy na temat roli lokalnej ekspresji poszczególnych izoform mRNA i prekursorów białkowych w fizjologii i patologii tego narządu u człowieka. Gatto i wsp. badając izoformy *IGF-1* w hepatocytach i cholangiocytych wątroby szczura z zastosowaniem *real-time* RT-PCR wykazali zróżnicowany wpływ uszkodzenia wątroby (ligacja przewodu żółciowego) na produkcję mRNA IGF-1 w hepatocytach i cholangiocytych [Gatto i wsp., 2008]. Uszkodzenie wątroby i dróg żółciowych wpływało głównie na modulowanie lokalnej syntezy mRNA IGF-1, a nie krążącego IGF-1. Wątrobowa izoforma była bardziej skuteczna w protekcji cholangiocytych przeciwko toksycznym czynnikom w porównaniu z izoformą krążącą. Należy dodać, iż autorzy dysponowali inaczej skonstruowanymi starterami do badania izoform IGF-1 niż w obecnej pracy, dodatkowo był to model szczurzy. Tym niemniej konkluzja autorów tej pracy, iż prócz tkanki mięśniowej i nerwowej także w komórkach wątroby lokalnie działająca izoforma transkryptu IGF-1 jest ważna w modulowaniu odpowiedzi na uszkodzenie tego narządu, wydaje się wiążąca [Gatto i wsp., 2008].

U pacjentów zebranych w ramach obecnej pracy (podgrupa A) zbadano wątrobową ekspresję mRNA podstawowych izoform IGF-1, tj. IGF-1A, IGF-1B, IGF-1C oraz mRNA obu promotorów *IGF-1* (P1 i P2). Wyniki tej części obecnej pracy są nowatorskie. Po raz pierwszy w wątrobie pacjentów z aktywną replikacją HCV podjęto próbę analizy ilościowej oraz jakościowej oceny profilu splicingowego genu IGF-1.

Wyniki dotyczące ekspresji mRNA obu promotorów genu można podsumować następująco: mRNA izoform P1 i P2 wykazano u wszystkich pacjentów z zakażeniem HCV oraz w HCV-negatywnej kontroli, odsetkowy wzór ekspresji mRNA promotora 1 i 2 był podobny w zakażeniu HCV i kontroli, z przewagą ilościową mRNA P1 nad P2 w każdej z badanych grup. Może to potwierdzać dominujący udział P1 w powstawaniu 60–65% transkryptów *IGF-1* (klasa I), jak to wykazano pierwotnie w wątrobie u szczura [Mittanck i wsp., 1997]. U człowieka mechanizm preferencyjnego wyboru promotora P1 w procesie transkrypcji genu nie został dokładnie poznany i opisany. Należy przypomnieć, iż budowa promotorów P1 i P2 genu IGF-1 jest zbliżona u człowieka i innych ssaków, a także gryzoni i są one usytuowane w obrębie 1 i 2 egzonu [Adamo 1995; Mittanck i wsp., 1997]. W badaniach na modelu mysim z *knockout* P2 genu IGF-1 wykazano normalny rozwój i postnatalny wzrost oraz prawidłowe stężenie krążącego IGF-1

u tych zwierząt. Było to możliwe dzięki kompensacyjnemu mechanizmowi nasilenia aktywności promotora 1 (P1) w transkrypcji [Temmerman i wsp., 2010]. Autorzy tego doniesienia dowodzą, że sekrecja IGF-1 do krążenia jest regulowana i utrzymywana na odpowiednim poziomie poprzez mechanizm sprzężenia zwrotnego [Temmerman i wsp., 2010].

Procentowy udział produkowanego mRNA P2 w wątrobie (24% u osób z zakażeniem HCV i 37% w zdrowej wątrobie, $p > 0,05$ między nimi) również potwierdza dane uzyskane w badaniach na wątrobie szczura, w której to klasa II mRNA IGF-1 stanowiła 25% całkowitej puli transkryptów [Adamo i wsp., 1991].

Odsetkowy wzór pozostałych izoform IGF-1 (A, B i C) u pacjentów z WZW typu C, jak i w wątrobie niezakażonej, ujawnił w przewodzie ekspresję mRNA izoformy A nad IGF-1B i IGF-1C. Porównanie grup między sobą wykazało istotnie wyższy procentowy udział IGF-1A w wątrobie pacjentów z WZW typu C (92%) w porównaniu z kontrolą (85%), a istotnie mniejszy udział mRNA izoformy B (5%) w porównaniu z prawidłową wątrobą (13%).

Wyniki procentowego udziału ekspresji wszystkich badanych w tej pracy izoform IGF-1 trudno skomentować na podstawie innych wyników badań w chorobach wątroby czy analiz w odniesieniu do zdrowej wątroby u ludzi. Podobną analizę (z zastosowaniem identycznych starterów) odnaleziono w pracy Koczorowskiej i wsp. w badaniach na HPV-pozytywnych i negatywnych tkankach ludzkiego raka szyjki macicy [Koczorowska i wsp., 2011; Koczorowska 2012]. Wykazano w nich istotną przewagę procentowego udziału izoformy IGF-1B nad pozostałymi izoformami w komórkach nowotworowych w porównaniu z innymi stadiami nowotworzenia w tym typie raka. Autorzy sugerują, że z tej postaci transkryptu powstaje peptyd (Eb) o silnie mitogennych właściwościach, które opisano w piśmiennictwie przedmiotu [Siegfried i wsp., 1992]. Ponadto Koczorowska i wsp. biorą pod uwagę rolę wczesnych białek wirusowych HPV (E2 oraz E6 i E7) w mechanizmach *splicingu* genu IGF-1 [Koczorowska i wsp., 2011].

Dokładna analiza ilościowa (względne wartości ekspresji mRNA izoform znormalizowane przez geny referencyjne) wzajemnej ekspresji mRNA badanych w tej pracy izoform mRNA IGF-1 u pacjentów z zakażeniem HCV, jak i w grupie kontrolnej wykazała również ilościową przewagę izoformy A nad pozostałymi wariantami transkryptów genu IGF-1.

Przewagę ekspresji izoformy IGF-1A nad IGF-1B w takich narządach, jak: macica, jajniki, wątroba i nerki u myszy, podkreślając narządowo-specyficzną regulację w czasie rozwoju, wykazali Ohtsuk i wsp. [Ohtsuki i wsp., 2005]. Dominację izoformy IGF-1A wśród innych transkryptów w samej wątrobie również podają inne dane z piśmiennictwa [Adamo 1995; Barton 2006].

Dokładna analiza ilościowa potwierdziła wyższą ekspresję mRNA izoformy A i C u pacjentów z zakażeniem HCV w porównaniu z kontrolą, a nie potwierdziła przewagi ilościowej izoformy IGF-1B w kontroli w porównaniu z wątrobą z zakażeniem HCV, jak wykazywał to wzór procentowego udziału izoform. Inny-

mi słowy ekspresja mRNA izoformy B była zbliżona w grupie chorych z przewlekłym WZW typu C i w kontroli.

Przewagę (aż 10-krotną) ekspresji mRNA IGF-1A nad IGF-1B i to zarówno w warunkach *in vivo* (wątroba ludzka), jak i w hodowli (komórki *hepatoma*, komórki makrofago-podobne i fibroblasty) z zastosowaniem techniki RT-PCR wykazał także zespół Nagaoka [Nagoka i wsp., 1991]. Koczorowska i wsp. wykazali ilościowo wyższą ekspresję całkowitego IGF-1 w stadiach przedrakowych szyjki macicy, a aktywności obu promotorów genu w stadium neoplazji wewnątrzna-błonkowej [Koczorowska 2012]. Brokaw i wsp. badali ekspresję mRNA IGF-1A i IGF-1B z zastosowaniem *real-time* RT-PCR w dużej liczbie grupie pacjentów z rakiem jajnika. Wykazali istotny związek pomiędzy wyższą ekspresją izoformy IGF-1A oraz wysokim stężeniem wolnego białka IGF-1 a progresją tego nowotworu [Brokaw i wsp., 2007].

Rola izoformy A *IGF-1* nie jest jasna. Sądzi się, iż peptyd Ea może działać zarówno mitogenicznie [Tian i wsp., 1999], jak i hamująco na wzrost komórek nowotworowych [Chen i wsp., 2007]. Badania Pfeffer i wsp. w liniach hodowlanych komórek mięśniowych z transfekcją cDNA kodujących mysie IGF-1A, IGF-1B i dojrzały IGF-1 wykazały, iż E-peptydy (EA i EB) nie są niezbędne w procesie sekrecji IGF-1, ale zwiększają pobieranie dojrzałego IGF-1 (*cell entry*) przez komórki [Pfeffer i wsp., 2009].

Jak wspomniano, ekspresja transkryptów A i C *IGF-1*, a także mRNA promotorów 1 i 2 była istotnie wyższa w wątrobie zakażonej HCV w porównaniu z kontrolą. Wynik ten jest zaskakujący wobec faktu obniżonej wartości surowiczych stężeń IGF-1 u pacjentów zakażonych HCV w porównaniu z kontrolą (zdrowi krwiodawcy). Należy przypomnieć, iż materiał tkankowy z wątroby bez zakażenia HCV (kontrola tkankowa) do analizy *real-time* RT-PCR stanowiła mało liczebna grupa (n = 7). U niektórych autorów prac materiał kontrolny do badań molekularnych stanowiło 12 fragmentów „zdrowej” wątroby [Luo i wsp., 2005], a nawet 1 narząd [Stefano i wsp., 2006]. Powtórzenie badań na liczniejszej grupie prawidłowej wątroby jest niezwykle trudne, a wyniki badań *in vitro* nie zawsze można odnieść do zależności obserwowanych *in vivo*. Wyższa ekspresja mRNA izoform IGF-1 w wątrobie z zakażeniem HCV niż w kontroli świadczyć może o wpływie HCV na ilościowe i jakościowe zmiany w proliferacji *splicingowym* tego genu u człowieka. Nie można wykluczyć wpływu konkretnie białek niestrukturalnych NS3 i NS5A (pozytywna korelacja z mRNA P1 i P2 IGF-1 obserwowana w pracy) na przedłużanie okresu półtrwania niektórych izoform mRNA *IGF-1*. Prawdopodobnym mechanizmem jest również kompensacyjny wzrost produkcji mRNA *IGF-1* (zwłaszcza izoformy A IGF-1) pod wpływem lokalnie działających innych czynników wzrostu, cytokin prozapalnych, zwiększonej regeneracji narządu indukowanej procesem zapalnym w wątrobie. Podobny mechanizm wzrostu produkcji obu typów transkryptów *IGF-1* w mięśniu szkieletowym królika pod wpływem rozciągania i elektrycznej stymulacji obserwowali McKoy i wsp.

[McKoy i wsp., 1999]. Na zróżnicowanie okresu półtrwania mRNA IGF-1 może mieć wpływ długość fragmentu 3'UT genu IGF-1, co wskazuje na postranslacyjne mechanizmy kontroli syntezy IGF-1, opisywane w piśmiennictwie [Hepler i wsp., 1990; Oberbauer 2013]. Za powstawanie różnych transkryptów mRNA odpowiadają 4 miejsca poliadenylacji we fragmencie 3'UTR egzonu 6. Wykazano, iż dłuższe transkrypty mają krótszy okres półtrwania, a transkrypty klasy II (P2) cechują się większą stabilnością w porównaniu z transkryptami P1 [przegląd tematu: Oberbauer 2013]. Opisano również wpływ wielu białek wiążących RNA (RBPs), w tym rodziny białek Hu i hnRNP na modulowanie stabilności mRNA i procesy translacji wielu białek, w tym insuliny i IGF-ów [przegląd tematu: Lee i Gorospe, 2010]. Nie da się wykluczyć wpływu produktów genomu HCV na stabilizację mRNA IGF-1, jednak można by to potwierdzić jedynie w badaniach eksperymentalnych.

W bardziej nasilonym uszkodzeniu narządu ekspresja mRNA izoform IGF-1 u pacjentów analizowanych w obecnej pracy była istotnie niższa. Porównując ekspresję IGF-1 u pacjentów z różnym nasileniem zmian histologicznych, wykazano różnice w tworzeniu poszczególnych transkryptów IGF-1 w zależności od nasilenia zmian zapalnych (*grading*). Istotnie niższą produkcję izoform: A, B, P1, P2 i sumarycznego mRNA IGF-1 zanotowano w bardziej nasilonych zmianach zapalnych (G2) w porównaniu z mniej nasiloną aktywnością zapalną (G1). W przypadku różnie zaawansowanego włóknienia wątroby, te zależności nie były już tak spektakularne, bo choć obserwowano niższą ekspresję wszystkich izoform IGF-1 i mRNA całkowitego IGF-1 w bardziej zaawansowanym stadium włóknienia wątroby (*staging 2*), nie były to różnice statystycznie istotne w porównaniu ze *staging 1* ($p > 0,05$). Nie było więc również istotnego wzrostu ekspresji żadnej z izoform wraz ze wzrostem histologicznych wykładników marskości wątroby (*staging 4*). Należy jednak zaznaczyć w tym miejscu, że w grupie badanej (podgrupa A) jedynie trzech pacjentów miało wykładniki *staging 3*, a tylko jeden *staging 4*. Badania nad profilem ekspresji izoform mRNA w bardziej zaawansowanych stadiach przewlekłego WZW typu C (marskość i rak wątroby) powinny być kontynuowane. Należy zauważyć również, iż surowicze stężenie IGF-1 jest odzwierciedleniem wytwarzania dojrzałego białka IGF-1 (z egzonu 3 i 4), a nie wszystkich możliwych peptydów pochodzących z alternatywnego *splicingu* IGF-1. W grupie pacjentów z zakażeniem HCV analizowanych w tej pracy wykazano pozytywną korelację między produkcją różnych transkryptów IGF-1 a surowiczym stężeniem białka IGF-1.

W obrębie całej grupy pacjentów z zakażeniem HCV zebranych w obecnej pracy wykazano także różnice płciowe dotyczące ekspresji różnych form *splicingowych* IGF-1, z ilościową przewagą wszystkich izoform mRNA IGF-1 u kobiet w porównaniu z mężczyznami z zakażeniem HCV.

Praktycznie nie ma odniesienia w dostępnym piśmiennictwie do roli izoform w progresji chorób wątroby na tle zakażenia HCV. Pod tym względem obecne

wyniki badań są pionierskie. Inne nieliczne doniesienia nad ekspresją izoform mRNA IGF-1 dotyczą przede wszystkim nowotworów u człowieka [Michell i wsp., 1997; Brokaw i wsp., 2007; Armakolas i wsp., 2010; Koczorowska i wsp., 2011; Koczorowska 2012; Kasprzak i wsp., 2013].

Analiza możliwości wykrywania różnych wariantów mRNA *IGF-1* wymaga komentarza. W obecnej pracy udokumentowano obecność wszystkich mRNA izoform, tj. IGF-1A, IGF-1B, IGF-1C, klasy I (P1) i klasy II (P2) z zastosowaniem odpowiednio skonstruowanych starterów w wątrobie pacjentów z przewlekłym WZW typu C oraz wątrobie kontrolnej. Nie dysponowano materiałem tkankowym do przeprowadzenia porównawczych badań w raku wątrobowokomórkowym. Podobnie Koczorowska i wsp. we wszystkich badanych tkankach (w tym z raka macicy) wykazali transkrypty wymienianych izoform [Koczorowska i wsp., 2011]. W przypadku wątroby prace wielu autorów dotyczą głównie wykrywania mRNA IGF-1 w tkankach nowotworowych, w tym w *hepatoma* oraz HCC związanym z zakażeniem HCV, najczęściej bez odniesienia do konkretnej izoformy [Su i wsp., 1989; Michell i wsp., 1997; Stefano i wsp., 2006; Tovar i wsp., 2010]. Niektórzy z badaczy, np. Su i wsp. stosując *Northern blotting* do pokazania ekspresji mRNA IGF-1 wykazali liczne, różnej wielkości transkrypty IGF-1 w komórkach *hepatoma*. Każdy fragment tkanki nowotworowej cechował się niższą ekspresją mRNA IGF-1 w porównaniu z tkanką niezmienną nowotworowo [Su i wsp., 1989]. Obniżoną ekspresję mRNA IGF-1 autorzy ci potwierdzili także w liniach komórek nowotworowych (HepG2, Huh-7, PLC/PRF/5 oraz Hep 3B) oraz w tkankach *hepatoma* [Su i wsp., 1989]. Dysregulację genów systemu IGF w HCC obserwowali również Tovar i wsp. wykazując w przypadku mRNA IGF-1 także znaczące obniżenie poziomu ekspresji transkrypty tego czynnika wzrostu w porównaniu z kontrolą [Tovar i wsp., 2010]. Autorzy ci nie badali jednak poszczególnych izoform *IGF-1*. Michell i wsp. potwierdzili obecność mRNA IGF-1 w całym badanym materiale raków jelita grubego i kontrolnej błonie śluzowej [Michell i wsp., 1997]. Stosując ilościową metodę *real-time* RT-PCR (podobnie jak w obecnych badaniach), Tovar i wsp. wykazali obniżenie ekspresji mRNA IGF-1 we wczesnych stadiach HCC na tle zakażenia HCV w porównaniu z kontrolą, jednak bez istotnych różnic pomiędzy początkowym i zaawansowanym stadium HCC u pacjentów. Autorzy konkludują, że mitotyczne właściwości IGF-1 nie muszą odgrywać kluczowej roli w progresji HCC, choć aktywację całej osi IGF (tj. nadekspresję IGF-2, obniżenie ekspresji IGFBP-3 oraz zmiany genetyczne w IGF-2R) obserwowali w 21% wczesnych HCC [Tovar i wsp., 2010]. Warto dodać, że autorzy ci wzięli pod uwagę pacjentów z bardziej zaawansowanymi zmianami w wątrobie (wczesne, zaawansowane HCC), a nie etap przewlekłego wirusowego zapalenia wątroby typu C (w większości bez cech marskości wątroby), jak w obecnej pracy. Natomiast Stefano i wsp. z zastosowaniem metody RT-PCR wykazali porównywalną ilość mRNA IGF-1 u pacjentów z przewlekłym WZW typu C i kontroli. Inna praca na hodowanych hepatocytach szczura również z zastoso-

waniem techniki RT-PCR wykazała 50-krotny wzrost ekspresji mRNA izoformy IGF-1B (odpowiednik izoformy C u człowieka) w komórkach otyłych zwierząt w porównaniu z hepatocytami szczupłych osobników. Nie potwierdzono jednak znamiennych różnic kiedy ilość transkryptu mierzono w świeżo izolowanych hepatocytach i tkance całej wątroby [Tenoutasse i wsp., 2003]. Natomiast grupa Armakolas i wsp. badając alternatywny *splicing* IGF-1 w tkankach raka prostaty oraz hodowanych komórkach raka prostaty (PC-3 i LNCaP) wykazała w nich nadekspresję IGF-1C (*mechano growth factor*, MGF), sugerując rolę tej izoformy IGF-1 w nasilaniu proliferacji komórkowej [Armakolas i wsp., 2010].

Kolejnym ciekawym wątkiem obecnych badań była analiza korelacji pomiędzy ekspresją poszczególnych wariantów mRNA IGF-1 a surowiczym stężeniem IGF-1 u pacjentów z zakażeniem HCV. Badania obecne wykazały wysoką pozytywną korelację pomiędzy surowiczym stężeniem IGF-1 a tkankową ekspresją obu transkryptów P1 i P2 oraz mRNA pozostałych izoform IGF-1A, IGF-1B i IGF-1C oraz sumarycznego IGF-1. Są to dosyć zaskakujące wyniki wskazujące, iż surowicze stężenie IGF-1 u tych pacjentów koreluje z ekspresją obu promotorów (P1 i P2) genu IGF-1. Ogólnie przyjęte dane podają, że za powstawanie krążącego IGF-1 odpowiedzialny jest głównie promotor 2 genu IGF-1, który podlega regulacji hormonalnej [Wang i wsp., 1997; Wang i wsp., 2000]. Badania obecne wydają się więc potwierdzać te dane z piśmiennictwa, które dokumentują porównywalnie mocną regulację hormonalną (*via* GH) obu promotorów i jednocześnie egzonów (1 i 2) genu IGF-1 [Bichell i wsp., 1992; O'Sullivan i wsp., 2002; Woelfle i wsp., 2003].

Wykazana w obecnej pracy ekspresja wszystkich transkryptów IGF-1 była, podobnie jak surowiczy poziom IGF-1, negatywnie skorelowana z wiekiem pacjenta, a także z BMI chorych. Niższą ekspresję ilościową mRNA izoform IGF-1 w bardziej nasilonych zmianach zapalnych w wątrobie z zakażeniem HCV (*grading* 2, G2) w porównaniu z G1 potwierdzono różnymi testami statystycznymi (test Manna-Whitneya, korelacja Spearmana). Dodatkowo wykazano negatywną zależność ekspresji wszystkich izoform mRNA IGF-1 ze stłuszczeniem wątroby. Wysokie współczynniki negatywnej korelacji notowano także pomiędzy wariantami mRNA IGF-1 i aktywnością ALT ($r = -0,550$). Wszystkie te wyniki świadczą o współlistnieniu bardziej nasilonych zmian w wątrobie z obniżaniem się produkcji wątrobowej IGF-1 i tworzeniem jej poszczególnych form *splicingowych*. Trudno natomiast ocenić, na ile ważna jest w tych współdziałaniach rola białek onkogennych HCV. Istotne pozytywne korelacje (jednak dość słabe) wykazano pomiędzy ekspresją mRNA promotora 1 (P1) i tkankową ekspresją białka NS5A oraz mRNA promotora 2 (P2) z ekspresją białka NS3. Nie udało się jednak wykazać żadnej istotnej korelacji między mRNA izoform IGF-1 i ekspresji tkankowej reprezentatywnego onkogenego białka HCV, czyli białka rdzeniowego C. Można więc sądzić, że na aktywność obu promotorów genu IGF-1 (P1 i P2) mogą wpływać głównie białka niestrukturalne HCV (NS3 i NS5A).

Ekspresja mRNA receptora typu I IGF (IGF-1R)

W obecnej pracy zbadano również poziom ekspresji tkankowej mRNA receptora typu I IGF (IGF-1R). Średnia ekspresja transkryptu IGF-1R okazała się niższa u pacjentów z zakażeniem HCV niż w kontroli. Była jednak pozytywnie skorelowana z aktywnością zapalną w wątrobie u pacjentów z zakażeniem HCV. W większym *grading* obserwowano znamienne wyższą ekspresję mRNA tego receptora. Nie było korelacji z zaawansowaniem włóknienia wątrobowego i biochemicznymi wskaźnikami progresji WZW typu C (np. stężeniem AFP). Ponadto badania obecne wykazały dość wysoką negatywną korelację pomiędzy ekspresją mRNA IGF-1R a surowiczym stężeniem IGF-1 u badanych pacjentów ($r = -0,535$). Innymi słowy niższe surowicze stężenie IGF-1 (będące cechą charakterystyczną badanych w tej pracy pacjentów z zakażeniem HCV) współistniało z większą wątrobową ekspresją mRNA receptora typu I IGF. Nie było natomiast istotnej statystycznie korelacji między tkankową ekspresją mRNA IGF-1R a surowiczym stężeniem IGF-1R u badanych pacjentów z WZW typu C. Takiej korelacji nie wykazała również Koczorowska w komórkach nabłonka szyjki macicy [Koczorowska 2012]. Biorąc pod uwagę poziomy ekspresji mRNA IGF-1 i jego receptora typu I (IGF-1R) wykazano, iż tkankowa ekspresja mRNA IGF-1R koreluje negatywnie z wartościami ekspresji transkryptów niektórych z izoform mRNA IGF-1 (tj. IGF-1A, IGF-1B oraz sumarycznego mRNA IGF-1). Obniżonej ekspresji mRNA IGF-1R w HCV-zakażonej wątrobie tkance towarzyszył więc wzrost przynajmniej części z badanych transkryptów IGF-1. Wynik ten można skomentować w następujący sposób. Wiadomo, iż chociaż prawidłowa wątroba to narząd z najwyższą ekspresją IGF-1, posiada ona prawie niewykrywalne poziomy mRNA IGF-1R. Taki wzór ekspresji może być tłumaczony negatywną regulacją IGF-1R w odpowiedzi na lokalnie produkowany IGF-1 [Sharf i wsp., 2001]. Wydaje się więc, że u pacjentów z niedużym zaawansowaniem zmian w wątrobie, jakie obserwowano w danym momencie czasowym u analizowanych pacjentów, produkcja mRNA IGF-1 kompensacyjnie wzrosła, a ekspresja mRNA IGF-1R była obniżona. Dopiero z progresją zmian histologicznych (i przy narastającym niedoborze GH, opisywanym w zakażeniu HCV) uzyskano mniejszą produkcję mRNA IGF-1, a więcej mRNA IGF-1R.

W pracach innych autorów, ale dopiero w zmianach neoplastycznych wykazywano obniżoną ekspresję IGF-1, a wzrost lokalnej produkcji IGF-1R. Wysznuwano hipotezę, że niewystarczająca ilość IGF-1 jest kompensowana wzrostem produkcji IGF-1R, dając większą dostępność receptora dla różnych ligandów [Koczorowska 2012].

Rola receptorów IGF w kancerogenezie wątrobowej jako czynników autokrynowej regulacji w utrzymywaniu transformowanego fenotypu komórek jest podnoszona również przez innych badaczy [Tsai i wsp., 1988; Zhang i wsp., 2006]. Wyniki badań są zróżnicowane i niekiedy niespójne. Z jednej strony istnieją prace wskazujące na wzrost ekspresji IGF-1R już w preneoplastycznych zmianach

ogniskowych w wątrobie, w samym HCC i liniach komórkowych ludzkiego *hepatoma* [Tsai i wsp., 1988; Scharf i wsp., 2001], z drugiej strony niepowodzeniem zakończyły się próby stymulacji mitogenezy przez podanie białka IGF-1 do hodowanych komórek HCC [Price i wsp., 2002]. Badania Price i wsp. przeprowadzone na modelu szczurzym *in vivo* oraz *in vitro* wykazały wyższą ekspresję mRNA IGF-1R w kontrolnej wątrobie w porównaniu z HCC, a dopiero współdziałanie dwóch białek: IGF-1 oraz HGF-SF (*hepatocyte growth factor-scatter factor*) stymulowało mitogenezę komórek wątrobowych u tych zwierząt [Price i wsp., 2002]. Obecność mRNA IGF-1R z zastosowaniem analizy *Northern blotting* wykazano w komórkach ludzkiego *hepatoma* (PLC), a nie w hodowli ludzkich hepatocytów [Scharf i wsp., 1998].

Badania ekspresji IGF-1R na poziomie mRNA u ludzi wykazują z reguły zwiększenie ilości transkryptu IGF-1R u pacjentów z marskością wątroby [Morali i wsp., 2005] oraz u pacjentów z przewlekłym zapaleniem wątroby typu C w porównaniu z wątrobą prawidłową [Stefano i wsp., 2006]. Tovar i wsp. nie obserwowali jednak istotnej różnicy w ekspresji mRNA IGF-1R w HCC i kontroli, choć w badaniach tych wykazano obniżenie ekspresji mRNA IGF-1, a u części pacjentów także znaczące obniżenie ekspresji mRNA receptora typu II IGF (IGF-2R) [Tovar i wsp., 2010]. Wśród pacjentów z WZW typu C, opisywanych przez Stefano i wsp., wzrost ekspresji genowej IGF-1R dotyczył także osób, które uzyskały trwałą odpowiedź na leczenie (SVR). W badaniu tym nie obserwowano korelacji ze zmianami histologicznymi oraz wynikami badań immunocytochemicznych [Stefano i wsp., 2006]. Obecne badania nie potwierdziły zależności pomiędzy ekspresją genową IGF-1R a tkankową ekspresją białek wirusowych HCV, choć słabą pozytywną korelację notowano między ekspresją mRNA IGF-1R i ładunkiem wirusa (HCV-RNA) ($r = 0,403$). Podwyższoną ekspresję IGF-1R obserwowano także w innych nowotworach u człowieka, m. in. w raku prostaty oraz raku piersi [Hellawell i wsp., 2002; Peiró i wsp., 2011]. Koczorowska również obserwowała prawie dwukrotny wzrost ekspresji mRNA receptora IGF (IGF-1R) w komórkach nowotworu szyjki macicy w porównaniu z kontrolą [Koczorowska 2012]. Nie można ustosunkować się do tych wyników badań, gdyż do badań molekularnych w obecnej pracy nie dysponowano tkankami z pierwotnego raka wątroby.

Podsumowując część badań dotyczącą analizy ekspresji izoform mRNA IGF-1 i mRNA IGF-1R należy przypomnieć, iż przekaz sygnału poprzez IGF-1R zależy od wielu czynników, w tym rodzaju komórek, fosforylacji podjednostek IGF-1R oraz typu białek sygnałowych [Samani i wsp., 2007; Wu i Zhu, 2011]. Działanie receptora IGF-1R następuje po przyłączeniu ligandu, głównie dojrzałego peptydu IGF-1. Oprócz dojrzałego białka IGF-1, na komórkę oddziaływać mogą także C-końcowe peptydy powstałe po proteolizie propeptyny IGF-1 i to niezależnie od wiązania z receptorem IGF-1 [Koczorowska 2012].

Wykazana w tej pracy większa ekspresja IGF-1 na poziomie mRNA (wszystkie izoformy), w porównaniu z białkiem w tkance czy stężeniem surowiczym IGF-1

u pacjentów z zakażeniem HCV w stosunku do kontroli, może potwierdzać złożone procesy ekspresji genowej IGF-1 oraz zależności RNA-białko. Obniżenie tej ekspresji u pacjentów z bardziej zaawansowanymi zmianami w HCV-zakażonej wątrobie, jak również pozytywna korelacja ekspresji mRNA z surowiczym stężeniem IGF-1 jest zdaniem autorki ważną informacją. Nie można pominąć również faktu, iż z przyczyn technicznych (niedostępność komercyjna przeciwciał) nie badano w tej pracy ekspresji innych propeptydów np. grupy E peptydów powstałych po obróbce translacyjnej z zastosowaniem technik immunocytochemicznych. W badaniach grupy Philippou i wsp. wykazano nadekspresję białka MGF w komórkach raka prostaty w porównaniu z kontrolą za pomocą przeciwciał, które autorzy sami scharakteryzowali i opublikowali [Philippou i wsp., 2009; Armakolas i wsp., 2010]. Wykazanie wszystkich izoform mRNA IGF-1 w wątrobie zakażonej HCV i w kontroli oraz ich wysokie wzajemne korelacje potwierdzają obecność wszystkich izoform mRNA IGF-1 w materiale, jakim dysponowała autorka pracy.

Badania powinny być jednak kontynuowane na tkankach wątroby zmienionej nowotworowo, aby dokładniej poznać wydajność transdukcji sygnałów w drodze sygnałowej IGF-1-IGF-1R w zakażeniu HCV.

Ekspresja mRNA czynnika transkrypcyjnego SP1

W alternatywnym *splicingu* genu IGF-1 biochemiczny mechanizm kontrolujący użycie promotorów 1 lub 2 genu jest słabo poznany [Pell i wsp., 1883; Adamo 1995; Mittanck i wsp., 1997; Wang i wsp., 2000]. W obrębie sekwencji regulacyjnych obu promotorów genu IGF-1 oraz ich sekwencji 5'UTR u szczura (lepiej zbadanego niż u człowieka) stwierdzono występowanie wielu miejsc specyficznego przyłączenia się czynników transkrypcyjnych, które mogą regulować jego ekspresję, m.in. SP1 (*specificity protein 1*) (inne wymieniono we Wstępie pracy). W obu promotorach *IGF-1* znajduje się wiele miejsc wiązania białka SP1, które wskazują na potencjalną rolę tego białka w regulacji transkrypcji genu IGF-1 [Wierstra 2008]. SP1 jest wszędobylskim czynnikiem transkrypcyjnym, który wykazuje zróżnicowaną siłę wiązania z parami GC, GT i CT [Wierstra 2008].

Analiza mRNA czynnika transkrypcyjnego SP1 w ramach obecnej pracy wykazała istotnie niższą ilość transkryptu u pacjentów z WZW typu C w porównaniu z kontrolą. Co intrygujące, wykazano istotne negatywne (a nie pozytywne, jak się spodziewano) korelacje między ekspresją mRNA tego białka a mRNA IGF-1, z ilością mRNA poszczególnych izoform (w tym mRNA obu promotorów P1 i P2) oraz z surowiczym stężeniem IGF-1 u pacjentów z WZW typu C. Wynik ten jest odmienny niż w innych badaniach, które pokazują podwyższony poziom ekspresji SP1 w materiale z neoplazją i rakiem szyjki macicy u HPV-pozytywnych kobiet w porównaniu z próbami wolnymi od zakażenia HPV oraz wykazują pozytywne korelacje ekspresji transkryptów SP1 i promotorów P1 i P2 genu IGF-1 zarówno u pacjentów ze zmianami przednowotworowymi,

jak i w HPV-negatywnej kontroli. Jedynie w samych rakach szyjki macicy nie potwierdzono istotnych statystycznie korelacji pomiędzy mRNA SP1 i mRNA P1 czy P2 [Koczorowska i wsp., 2011; Koczorowska 2012]. Autorzy konkludują, że kooperacja SP1:promotory *IGF-1* może odgrywać zasadniczą rolę we wczesnych okresach rozwoju nowotworu szyjki macicy [Koczorowska 2012]. Wykazanie negatywnej zależności pomiędzy ekspresją mRNA SP1 i mRNA P1 oraz P2 u badanych w tej pracy pacjentów sugeruje raczej hamowanie niż inicjowanie transkrypcji *IGF-1* (aktywność promotorów) w wątrobie z zakażeniem HCV. Sugestię tę potwierdza również negatywna korelacja ekspresji mRNA SP1 ze stężeniem *IGF-1* w surowicy krwi. Wysoką pozytywną zależność wykazano natomiast pomiędzy ekspresją mRNA SP1 i *IGF-1R* ($r = 0,735$) u pacjentów z zakażeniem HCV.

W piśmiennictwie dotyczącym chorób wątroby (w tym HCC) nie znaleziono odnośników do wyników obecnych badań. Nadekspresję *IGF-1R* obserwowano w 62% raków żołądka w porównaniu ze zdrową błoną śluzową i wykazano korelację pomiędzy większą ekspresją tkankową tego receptora *IGF* a występowaniem przerzutów tego nowotworu do węzłów chłonnych. Właśnie w tych przypadkach raka żołądka (guzy pierwotne z przerzutami do węzłów chłonnych) wykazano pozytywną korelację także pomiędzy ekspresją *IGF-1R* i SP1 [Jiang i wsp., 2004]. Próbując wyjaśnić te same zależności uzyskane w obecnej pracy, można przypuszczać, że pozytywna korelacja SP1 i *IGF-1R* może dotyczyć także HCC na tle zapalenia wątroby typu C. Pozytywna korelacja SP1:*IGF-1R* wraz z większą produkcją mRNA *IGF-1R* w bardziej nasilonych zmianach zapalnych u pacjentów zbadanych w tej pracy wynika z obecności (lub uaktywnienia) miejsc wiązania SP1 do innych promotorów genów, w tym *IGF-1R*. Nie da się wykluczyć udziału samego genomu HCV w zmianie miejsc wiązania czynnika transkrypcyjnego SP1 (do *IGF-1R* zamiast *IGF-1*). Opisano bowiem w piśmiennictwie możliwość wiązania SP1 w rejonach promotorowych innych genów, w tym kodujących białka wirusowe (np. białka E6/E7 w genomie HPV) o potencjale onkogennym [Koczorowska i wsp. 2011]. Brakuje takich badań odnośnie do HCV. Dla dokładnego poznania zależności pomiędzy wzajemną ekspresją SP1 oraz składników osi *IGF* (w tym *IGF-1R*) badania te powinny być kontynuowane. Lepsza znajomość zależności pomiędzy składnikami genomu HCV a białkami osi *IGF in vivo* może okazać się cenna w przewidywaniu postępu zmian histologicznych w wątrobie zakażonej onkogennym wirusem, a także w mało inwazyjnej ocenie stopnia uszkodzenia narządu, monitorowania efektów leczenia i ewentualnej terapii. Wyniki badań mogą posłużyć do opracowania programów skriningowych wczesniej i dokładniejszej diagnostyki w kierunku pierwotnego raka wątroby i przewidywania przerzutów HCC do innych narządów.

6. Wnioski

Surowicze stężenie IGF-1 może służyć jako marker stosowany w codziennej praktyce lekarskiej pozwalający na pełniejszą ocenę stopnia uszkodzenia wątroby u chorych zakażonych HCV.

Surowiczy wskaźnik IGF-1/IGFBP-3 jest dokładniejszym niż stężenie IGF-1 parametrem oceny progresji zmian histologicznych w wątrobie. Ze względu na wysoką korelację surowiczego wskaźnika z ładunkiem wirusa HCV i zaawansowaniem włóknienia w wątrobie (*staging*), wartość IGF-1/IGFBP-3 może służyć jako dodatkowy czynnik prognostyczny przed planowanym leczeniem przeciw-wirusowym.

Wytwarzanie wszystkich izoform mRNA IGF-1 (IGF-1A, IGF-1B, IGF-1C, P1 i P2) w wątrobie pacjentów z zakażeniem HCV i różnice w ilościowej ekspresji niektórych wariantów transkryptów w porównaniu z kontrolą sugeruje wpływ HCV na zmianę profilu splicingowego genu IGF-1.

Ze wzrostem aktywności zapalnej (*grading*) w wątrobie pacjentów z przewlekłym zakażeniem HCV łączy się zmniejszenie produkcji transkryptów IGF-1, zmiana profilu splicingowego IGF-1 oraz obniżenie surowiczego stężenia IGF-1.

Całość wyników pozwala na przedstawienie sekwencji zmian związanych z systemem IGF w wątrobie pacjentów z przewlekłym zakażeniem HCV. Wraz z histologiczną progresją zmian w wątrobie (większy *grading*, *staging*, stłuszczenie) obniża się produkcja mRNA izoform i mRNA całkowitego IGF-1, zmniejsza się stężenie IGF-1 w surowicy, a zwiększa się produkcja mRNA receptora typu I IGF-1 (IGF-1R). Z tymi zjawiskami koreluje wzrost ekspresji mRNA czynnika transkrypcyjnego SP1, który najsilniej związany jest z ekspresją mRNA IGF-1R u badanych chorych.

Wzrost ekspresji mRNA receptora typu I IGF-1 (IGF-1R) wraz ze stopniem uszkodzenia wątroby, negatywnie skorelowany ze stężeniem IGF-1 oraz poziomem ekspresji niektórych izoform mRNA, może mieć implikacje terapeutyczne.

7. Streszczenie

Zakażenie wirusem C zapalenia wątroby (HCV) dotyczy około 2,35% populacji świata, zaś w Polsce około 1,9%. Prowadzi ono najczęściej do przewlekłego zapalenia wątroby, które ma przeważnie przebieg bezobjawowy. U części pacjentów dochodzi do rozwoju marskości wątroby i raka wątrobowo-komórkowego (HCC) na jej tle. Brak szczepień ochronnych, wciąż mało skuteczne metody terapii przeciwwirusowej, trudności w uzyskaniu trwałej eradykacji wirusa z organizmu powodują, że zakażenie HCV stanowi duży problem zdrowotny. Badania epidemiologiczne wskazują, że HCC rozwija się zarówno u pacjentów z marskością wątroby na tle HCV, jak i bez oznak marskości. Przewlekłe zakażenie HCV stanowi główny czynnik ryzyka rozwoju HCC. Udział produktów genomu HCV w onkogenezie wątrobowej, głównie białek: C, NS3 i NS5A, jest dobrze udokumentowany, choć dokładne mechanizmy interakcji HCV i czynników transkrypcyjnych na poziomie molekularnym są wciąż przedmiotem badań. Wpływ na proliferację, różnicowanie i apoptozę hepatocytów mają również produkowane w wątrobie czynniki wzrostu, m.in. insulinopodobne czynniki wzrostu -1 i -2 (IGF-1 i IGF-2) i ich rodzina, w skład której wchodzi białka wiążące (IGFBP-1-6) oraz receptory (IGF-1R, IGF-2R, IR oraz receptory hybrydowe IGF-1R/IR). Większość efektów biologicznych obu IGF-ów zachodzi poprzez receptor typu I (IGF-1R), typowy receptor o właściwościach kinazy tyrozynowej. Na poziomie molekularnym udokumentowano rolę zarówno obu IGF-ów, jak i samego IGF-1R w promowaniu wzrostu i transformacji nowotworowej wielu narządów, w tym wątroby. Badania kliniczne w przewlekłych chorobach wątroby oceniały, jak dotąd, przede wszystkim surowicze stężenia IGF-ów i wyniki tych badań są niespójne. Mało prac dotyczy analizy bezpośrednich interakcji białek HCV i osi IGF.

Ludzki gen IGF-1 składa się z 6 egzonów i podlegają one alternatywnemu *splicingowi*. W rezultacie powstaje 6 izoform mRNA IGF-1, tj. 1A, 1B, 1C, 2A, 2B i 2C o tkankowo specyficznej ekspresji. Pionierskie opisy tworzenia izoform IGF-1 (mRNA i białek prekursorowych) dotyczą wątroby szczura. Fizjologiczna rola izoform IGF-1 u człowieka i innych ssaków poznana jest najlepiej w tkance mięśniowej. Aktualnie coraz więcej prac dotyczy występowania i charakterystyki izoform produkowanych w tkankach wielu nowotworów złośliwych. Praktycznie nie ma jednak doniesień na temat ekspresji różnych transkryptów (i białek prekursorowych IGF-1) w przewlekłym WZW typu C. W codziennej praktyce lekarskiej wzrost liczby przypadków HCC u przewlekle zakażonych HCV stał się motywem poszukiwania nowych markerów proliferacji nowotworowej w wątro-

bie. Dotychczasowe metody badań skriningowych nie pozwalają w pełni na szybkie rozpoznanie toczącego się procesu nowotworowego. Uzupełnienie wiedzy na temat funkcjonowania składników osi IGF jest ważne również z punktu widzenia terapeutycznego, gdyż podejmuje się próby terapii anty-IGF-1R.

Celem pracy była ocena surowiczych stężeń IGF-1, IGF-1R, dwóch białek wiążących IGF (IGFBP-3 i IGFBP-6) oraz tkankowej ekspresji białek (IGF-1, IGFBP-3 i IGF-1R) i białek onkogennych HCV (C, NS3 i NS5A) u pacjentów z przewlekłym zakażeniem HCV. Szczególnie interesującym i nowatorskim wydawało się wykazanie, czy zakażenie HCV (wraz z produktami genomu wirusa) może wywoływać zmiany w regulacji lokalnej ekspresji genu IGF-1 w wątrobie, mające swe odbicie na poziomie mRNA. Ze względu na słabo poznaną rolę IGF-1R w progresji chorób wątroby, nielicznych i niespójnych danych co do tkankowej ekspresji tego receptora w chorobach wątroby, postanowiono ocenić również ekspresję mRNA IGF-1R w wątrobie pacjentów z WZW typu C. Słabo poznane są mechanizmy biochemiczne alternatywnego *splicingu* genu IGF-1, w tym wyboru promotora (P1 czy P2) do inicjowania transkrypcji i produkcji białek prekursorowych. Zachęciło to do zbadania ekspresji tkankowej czynnika transkrypcyjnego SP1, który przyłącza się do miejsc regulatorowych w P1. Wyniki surowiczych stężeń rodziny IGF, immunocytochemicznego wykrywania białek oraz ekspresji genu IGF-1 na poziomie mRNA odniesiono do zmian histopatologicznych oraz wybranych danych klinicznych pacjentów z przewlekłym WZW typu C.

Badania przeprowadzono łącznie u 150 chorych z przewlekłym zakażeniem HCV, z których dodatkowo wyodrębniono 3 podgrupy pacjentów: A, B i C oraz w dwóch grupach kontrolnych: negatywnej (surowiczej, $n = 30$ i tkankowej, $n = 16$) i pozytywnej (archiwalny materiał tkankowy oraz panel tkanek z HCC skrojony na szkiełkach podstawowych, $n = 61$).

U wszystkich HCV+ pacjentów wykonano badania biochemiczne i metodą ELISA (IGF-1, IGFBP-3, IGFBP-6 i IGF-1R) oraz badania histopatologiczne. Dodatkowo w podgrupie A i B wykonano badania immunocytochemiczne (technika ABC-ImmunoMax), a badania molekularne (*real-time* RT-PCR) w materiale tkankowym bioptatu wątroby w podgrupie A. Nowością w tej pracy jest badanie surowiczych stężeń IGFBP-6 i IGF-1R, określenie surowiczego wskaźnika IGF-1/IGFBP-3, a także uwzględnienie w analizie statystycznej standaryzacji stężenia IGF-1 względem wieku u pacjentów z przewlekłym zakażeniem HCV. Do oceny morfometrycznej białek z rodziny IGF (IGF-1, IGF-1R oraz IGFBP-3) oraz białek wirusowych (C i NS5A) zastosowano nowoczesną metodę wizualizacji przestrzennej, pozwalającej na dokładną i powtarzalną ilościową ocenę ekspresji badanych białek.

Badania wykazały obniżone wartości surowiczych stężeń IGF-1 w całej grupie (i we wszystkich podgrupach) pacjentów przewlekłe zakażonych HCV w porównaniu z kontrolą. Znamienne niższe stężenia IGFBP-3 w stosunku do kontroli zanotowano tylko w podgrupach B i C. U wszystkich HCV+ chorych

stwierdzono niższą wartość surowiczego wskaźnika IGF-1/IGFBP-3 w porównaniu z kontrolą, zaś stężenia IGFBP-6 i IGF-1R były podobne w obu grupach. W całej badanej grupie i/lub w podgrupach obserwowano istotne różnice w stężeniach składników rodziny IGF w zależności od płci pacjenta (stężenie IGF-1 wyższe u kobiet niż u mężczyzn; stężenie IGFBP-6 wyższe u mężczyzn niż u kobiet).

Komórkową ekspresję IGF-1 obserwowano u 98% HCV+ pacjentów i dotyczyła ona przede wszystkim cytoplazmy hepatocytów oraz cholangiocytów. Znamienne wyższą ekspresję IGF-1 wykazano w kontroli tkankowej w porównaniu zarówno z WZW typu C ($p < 0,05$), jak i HCC (p na granicy istotności). Ekspresję IGF-1R wykazano u wszystkich pacjentów z WZW typu C. Obserwowano mieszany wzór ekspresji (cytoplazma, błony i pojedyncze jądra komórkowe). Pod względem ilościowym nie udało się wykazać istotnych różnic w ekspresji IGF-1R pomiędzy grupami. Białko IGFBP-3 wykazano u 97% pacjentów HCV+, głównie w komórkach zatok wątrobowych oraz w cytoplazmie hepatocytów. Jedynie w HCC obserwowano dodatkowo jądrowy wzór ekspresji IGFBP-3. Istotnie większą ekspresję IGFBP-3 wykazano w wątrobie pacjentów HCV+ w stosunku do kontroli oraz HCC. U pacjentów HCV+ wątrobowy wskaźnik IGF-1/IGFBP-3 był istotnie niższy w porównaniu z HCC, a zbliżony do kontroli.

Wśród pacjentów z przewlekłym WZW typu C tylko stężenie IGF-1 zmniejszało się wraz ze wzrostem aktywności zapalnej (*grading*, *G*) i zaawansowaniem włóknienia (*staging*, *S*). U wszystkich chorych HCV+ stwierdzono negatywne korelacje IGF-1 z wiekiem chorych oraz BMI. W całej badanej grupie obniżeniu stężenia IGF-1 towarzyszył wzrost stłuszczenia wątroby, stężenia AFP, aktywności enzymów wątrobowych (ALT, AST i GGTP), stężenia gamma globulin i HOMA-IR oraz obniżenie liczby płytek krwi i stężenia albumin. Po standaryzacji stężenia IGF-1 względem wieku, utrzymano na poziomie istotności większość wykazanych zależności, w tym stężenie IGF-1 było również istotnie niższe u pacjentów z marskością wątroby (S4) niż u pozostałych (S1, S2 i S3).

Stężenie IGF-1R również zmniejszało się wraz z wiekiem w całej badanej grupie, jednak współczynnik korelacji ($r = -0,222$; $p < 0,05$) był bardzo niski. U pacjentów długotrwanie zakażonych HCV (podgrupa B) notowano wysoką istotną pozytywną korelację pomiędzy stężeniem IGF-1R i stężeniem albumin. Dla stężenia IGFBP-3 zanotowano jedyną istotną (i to negatywną) korelację ze stężeniem białka całkowitego. W całej badanej grupie (oraz w podgrupach) szczególnie wysokie współczynniki negatywnych korelacji uzyskano pomiędzy surowiczym wskaźnikiem IGF-1/IGFBP-3 oraz: wiekiem pacjenta, BMI, stężeniem AFP, aktywnością enzymów wątrobowych (ALT, AST, GGTP), *grading* i *staging*. Stężenie IGFBP-6 było pozytywnie skorelowane z wiekiem pacjenta, ale wyłącznie u pacjentów z długotrwałym zakażeniem HCV (podgrupa B). Inne korelacje (z BMI, stężeniem białka całkowitego, estradiolu, z *grading*), choć statystycznie istotne, nie miały dużej siły oddziaływania (niskie współczynniki korelacji). Nie stwierdzono istotnych wza-

jemnych korelacji pomiędzy surowiczymi stężeniami IGF-1 a pozostałymi białkami osi IGF (IGF-1R, IGFBP-3 i IGFBP-6) u pacjentów z WZW typu C.

Wątrobowa ekspresja IGF-1 u chorych z długotrwałym zakażeniem HCV (podgrupa B) cechowała się wysoką negatywną korelacją z aktywnością ALT i AST oraz stężeniem AFP. Słabą negatywną korelację ($r = -0,360$) pomiędzy ekspresją IGF-1 i ładunkiem wirusa (HCV-RNA) wykazano tylko w podgrupie A. Nie uzyskano istotnych statystycznie korelacji między ekspresją IGF-1 i tkankową ekspresją IGF-1R. Wzrostowi ekspresji tkankowej IGF-1R (podgrupa A) towarzyszyło zwiększenie poziomu glukozy we krwi. Zarówno ekspresja wątrobowa IGFBP-3, jak i wartość wątrobowego wskaźnika IGF-1/IGFBP-3 korelowała z BMI pacjentów z podgrupy A.

Analiza tkankowej ekspresji białek HCV ujawniła ilościowo najwięcej białka NS3, kolejno białka C i NS5A. Odnotowano istotne korelacje pomiędzy ekspresją białka rdzeniowego C i danymi klinicznymi, m.in. pozytywną z ładunkiem wirusa HCV, a wysoką negatywną z zaawansowaniem włóknienia w wątrobie (*staging*) (podgrupa A). Ekspresja białka NS3, prócz zależności od *staging*, istotnie korelowała także z *grading*. Również ekspresja białka NS5A korelowała istotnie z danymi klinicznymi (stężenie białka całkowitego, glukozy, stłuszczenie wątroby), jednak zależności te były dość słabe.

W badanym materiale tkankowym pacjentów z podgrupy A oraz kontroli tkankowej zidentyfikowane zostały wszystkie możliwe izoformy mRNA IGF-1, uwzględniając zarówno alternatywne egzony 1 i 2 (w zależności od użytego promotora P1 lub P2), jak i alternatywne izoformy *splicingowe*: IGF-1A, IGF-1B i IGF-1C. W grupie badanej i kontroli przeważał udział transkryptów klasy I (mRNA P1). Nie stwierdzono istotnych różnic dla procentowego udziału P1 i P2 pomiędzy grupą badaną i kontrolą. W całym badanym materiale odsetkowo dominowała ekspresja izoformy *splicingowej* A, zaś ekspresje izoform mRNA B i C stanowiły niski odsetek. Procentowy udział ekspresji izoformy IGF-1A był istotnie wyższy, zaś izoformy B niższy u chorych zakażonych HCV w stosunku do kontroli. Szczegółowa analiza względnej ekspresji każdej z izoform mRNA IGF-1 (znormalizowana względem genów referencyjnych) wykazała istotnie wyższą ekspresję izoform mRNA IGF-1A i IGF-1C, transkryptu klasy I (P1) oraz sumarycznego mRNA IGF-1 w grupie pacjentów zakażonych HCV w stosunku do kontroli. Bardzo wysokie pozytywne korelacje stwierdzono pomiędzy wzajemną ekspresją izoform transkryptów IGF-1 (P1, P2, A, B i C) w badanej grupie pacjentów z zakażeniem HCV i wątrobie kontroli. Ekspresja wszystkich izoform mRNA IGF-1 (IGF-1A, IGF-1B i IGF-1C) oraz obu klas transkryptów I (P1) i II (P2) była wprost proporcjonalna do surowiczego stężenia IGF-1 u pacjentów z zakażeniem HCV.

W wątrobie z bardziej nasilonymi zmianami zapalnymi (G2) wykazano obniżenie ekspresji wszystkich rodzajów transkryptów IGF-1 w porównaniu z G1, z wyjątkiem mRNA izoformy IGF-1C.

Ekspresja mRNA receptora IGF-1R w zakażeniu HCV była znamienne niższa w stosunku do kontroli. Istotnie wyższa ekspresja mRNA receptora dotyczyła chorych z bardziej nasiloną aktywnością zapalną (G2) w porównaniu z G1. Analiza ekspresji mRNA czynnika SP1 wykazała obniżenie tej ekspresji u chorych przewlekle zakażonych HCV w stosunku do kontroli, ale bez różnic w zależności od danych kliniczno-histopatologicznych.

U pacjentów HCV+ ekspresja sumarycznego mRNA IGF-1 oraz wszystkich izoform silnie negatywnie korelowała z wiekiem pacjenta oraz wartością BMI, stłuszczeniem wątroby, aktywnością ALT i AST. Ekspresja izoform IGF-1A, IGF-1B, P1 i P2 dodatkowo wysoko negatywnie korelowała z *grading*, a dość słabo ze *staging* (wyłącznie transkrypt P2). Istotnie statystycznie, choć dość słabe korelacje dotyczyły także ładunku wirusa HCV z ekspresją mRNA IGF-1A, P1 oraz całkowitego mRNA IGF-1. Pozytywne korelacje z ładunkiem wirusa HCV oraz *grading* wykazano również w przypadku ekspresji mRNA IGF-1R. W całej badanej grupie z przewlekłym zakażeniem HCV wykazano istotną wprost proporcjonalną zależność pomiędzy surowiczym stężeniem IGF-1 a wątrobową produkcją wszystkich postaci izoform mRNA IGF-1. Natomiast w przypadku ekspresji mRNA IGF-1R i mRNA SP1 wykazano przeciwne zależności – niższe stężenie IGF-1 w surowicy krwi pacjentów z WZW typu C współistniało z większą ekspresją tych transkryptów. Ekspresja mRNA SP1 była wysoko negatywnie skorelowana ze wszystkimi izoformami IGF-1 (w tym z mRNA obu promotorów P1 i P2), zaś wysoko pozytywnie z ekspresją mRNA IGF-1R.

Na podstawie wyników pracy sformułowano następujące wnioski: (1) Surowicze stężenie IGF-1 może służyć jako marker stosowany w codziennej praktyce lekarskiej pozwalający na pełniejszą ocenę stopnia uszkodzenia wątroby u chorych zakażonych HCV; (2) Surowiczy wskaźnik IGF-1/IGFBP-3 jest dokładniejszym niż stężenie IGF-1 parametrem oceny progresji zmian histologicznych w wątrobie. Ze względu na wysoką korelację surowiczego wskaźnika z ładunkiem wirusa HCV i zaawansowaniem włóknienia w wątrobie (*staging*), wartość IGF-1/IGFBP-3 może służyć jako dodatkowy czynnik prognostyczny przed planowanym leczeniem przeciwwirusowym; (3) Wytwarzanie wszystkich izoform mRNA IGF-1 (IGF-1A, IGF-1B, IGF-1C, P1 i P2) w wątrobie pacjentów z zakażeniem HCV i różnice w ilościowej ekspresji niektórych wariantów transkryptów w porównaniu z kontrolą sugerują wpływ HCV na zmianę profilu splicingowego genu IGF-1; (4) Ze wzrostem aktywności zapalnej (*grading*) w wątrobie pacjentów z przewlekłym zakażeniem HCV łączy się zmniejszenie produkcji transkryptów IGF-1, zmiana profilu splicingowego IGF-1 oraz obniżenie surowiczego stężenia IGF-1; (5) Całość wyników pozwala na przedstawienie sekwencji zmian związanych z systemem IGF w wątrobie pacjentów z przewlekłym zakażeniem HCV. Wraz z histologiczną progresją zmian w wątrobie (większy *grading*, *staging*, stłuszczenie) obniża się produkcja mRNA izoform i mRNA całkowitego IGF-1, zmniejsza się stężenie IGF-1 w surowicy, a zwiększa się produkcja mRNA recep-

tora typu I IGF-1 (IGF-1R). Z tymi zjawiskami koreluje wzrost ekspresji mRNA czynnika transkrypcyjnego SP1, który najsilniej związany jest z ekspresją mRNA IGF-1R u badanych chorych; (6) Wzrost ekspresji mRNA receptora typu I IGF-1 (IGF-1R) wraz ze stopniem uszkodzenia wątroby, negatywnie skorelowany ze stężeniem IGF-1 oraz poziomem ekspresji niektórych izoform mRNA, może mieć implikacje terapeutyczne.

8. Summary

Infection with hepatitis C virus (HCV) affects about 2.35% of the world population and in Poland about 1.9% inhabitants. Most frequently it leads to chronic hepatitis with usually asymptomatic course. In a proportion of the patients the infection leads to development of liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC). Absence of protective vaccinations, still ineffective anti-viral therapies, difficulties in achieving stable eradication of the virus cause that HCV infection represents a serious health problem. Epidemiological studies indicate that HCC develops both in patients with liver cirrhosis induced by HCV and in patients with no signs of liver cirrhosis. Chronic HCV infection represents the principal risk factor for development of HCC. Involvement of HCV genome products in hepatic oncogenesis and of C, NS3 and NS5A proteins in particular has been well documented even if the detailed mechanisms of interaction between HCV and transcription factors on the molecular level remain to provide topic of studies. Hepatocyte proliferation, differentiation and apoptosis are affected also by growth factors produced in liver, i.e. insulin-like growth factors- 1 and -2 (IGF-1 and IGF-2) and their family including also binding proteins (IGFBP-1–6) and receptors (IGF-1R, IGF-2R, IR and hybrid receptors, IGF-1R/IR). Most of biological effects manifested by both IGFs develop due to interaction through the receptor type 1 (IGF-1R), the typical receptor with properties of tyrosine kinase. On the molecular level, roles of both IGFs and of IGF-1R were documented in promotion of growth and neoplastic transformation in many organs, including liver. Clinical studies in chronic liver diseases examined until now serum concentrations of IGFs but respective results are discordant. Also, few studies were devoted to direct interactions between HCV proteins and IGF axis.

Human IGF-1 gene consists of 6 exons and undergoes an alternate splicing. This results in 6 IGF-1 mRNA isoforms, i.e. 1A, 1B, 1C, 2A, 2B and 2C of a tissue-specific expression. Pioneer descriptions of IGF-1 isoform (mRNA and precursor proteins) production pertain rat liver. Physiological role of IGF-1 isoforms in humans and other mammals has been best recognised in muscular tissue. Currently, increasingly numerous studies are related to manifestation and characteristics of isoform produced in several malignant tumours. However, practically no such reports have been related to expression of various transcripts (and IGF-1 precursor proteins) in chronic type C hepatitis. In daily medical practice an increase in HCC number in chronically HCV infected patients prompted search for new markers of neoplastic transformation in the liver. The till now available methods of screening studies fail to fully and rapidly recognise the on-going neoplastic

process. The supplementation of our knowledge on functioning of IGF axis components is important also from the therapeutic point of view when attempts are undertaken of the therapy using anti-IGF-1R.

The study aimed at evaluation of serum concentrations of IGF-1, IGF-1R, the two IGF-binding proteins (IGFBP-3 and IGFBP-6) as well as tissue expression of the proteins (IGF-1, IGFBP-3 and IGF-1R) and of oncogenic HCV proteins (C, NS3 and NS5A) in patients with chronic HCV infection. It seemed particularly interesting and novel to demonstrate whether HCV infection (with products of the viral genome) may induce alterations in local control over IGF-1 gene expression in liver expressed at the level of mRNA. Due to the poorly recognised role of IGF-1R in progression of liver diseases, infrequent and discordant data related to tissue expression of the receptor in liver diseases it was decided also to examine expression of IGF-1R mRNA in livers of patients with chronic type C hepatitis. Biochemical mechanisms of IGF-1 gene alternate splicing have been poorly recognised, including the choice of P1 or P2 promoter for initiation of transcription and production of precursor proteins. This prompted to examine tissue expression of the transcription factor, SP1, which binds to controlling sites in P1. Results involving serum concentrations of IGF family, immunocytochemical detection of proteins and expression of IGF-1 gene expression at the level of mRNA were related to histopathological lesions and selected clinical data in patients with chronic type C hepatitis.

In total, the studies were conducted on 150 patients with chronic type C hepatitis. In addition three subgroups, A, B, C of the patients were distinguished and two control groups: the negative one (serous, $n = 30$ and tissue, $n = 16$) and the positive one (archival tissue material and a panel of HCC tissues, sectioned on microscope slides, $n = 61$).

In all HCV+ patients biochemical tests were performed and tests using ELISA technique (IGF-1, IGFBP-3, IGFBP-6 and IGF-1R) and histopathological examination was performed. In addition, in subgroups A and B immunocytochemical studies (ABC-Immunomax technique) and molecular studies (*real-time* RT-PCR) were performed in liver biopsies of patients in the subgroup A. The new element in the study involved examination of serum levels of IGFBP-6 and IGF-1R, determination of the serum index of IGF-1/IGFBP-3, and taking into account in statistical analysis of standardization of IGF-1 level according to age in patients with chronic HCV infection. Morphometric evaluation of IGF family proteins (IGF-1, IGF-1R and IGFBP-3) and of viral proteins (C and NS5A) employed a modern method of spatial visualization, allowing for an accurate and reproducible evaluation of expression manifested by studied proteins.

The studies have demonstrated lowered values of serum IGF-1 concentrations in the entire group (and in all the subgroups) of patients with chronic type C hepatitis, as compared to the control. As compared to the control, significantly lower concentrations of IGFBP-3 were detected only in subgroups B and C. In all

HCV+ patients values of IGF-1/IGFBP-3 serum index proved to be lower than in the control while concentrations of IGFBP-6 and IGF-1R were similar in the two groups. In the entire studied group and/or in subgroups significant differences were noted in concentrations of IGF family components in relations to gender of the patient (concentration of IGF-1 was higher in women than in men; concentration of IGFBP-6 was higher in men than in women).

Cellular expression of IGF-1 was noted in 98% HCV+ patients and it was manifested first of all in cytoplasm of hepatocytes and cholangiocytes. A significantly higher IGF-1 expression was detected in tissue control as compared to either chronic hepatitis type C patients ($p < 0.05$), or HCC patients (p at the threshold of significance). Expression of IGF-1R was demonstrated in all patients with chronic type C hepatitis. A mixed expression pattern was observed (cytoplasm, membranes and individual cell nuclei). Quantitatively, no significant differences could be established in expression of IGF-1R in individual groups. IGFBP-3 protein was demonstrated in 97% HCV+ patients, mainly in cells of hepatic sinusoids and in hepatocyte cytoplasm. Only in HCC in addition a nuclear pattern of IGFBP-3 expression was detected. A significantly higher expression of IGFBP-3 was demonstrated in livers of HCV+ patients, as compared to the control and HCC patients. In HCV+ patients the hepatic index of IGF-1/IGFBP-3 was significantly lower than in HCC patients and similar to the control.

Among patients with chronic type C hepatitis only concentration of IGF-1 was decreasing with an increase in inflammatory activity (*grading*, G) and with advancement of fibrosis (*staging*, in all groups). In all HCV+ patients IGF-1 manifested negative correlations with age of patients and BMI. In the entire studied group a decrease in IGF-1 concentrations was accompanied by an increase in fatty liver degeneration, AFP concentration, activities of liver enzymes (ALT, AST and GGTP), in concentrations of gamma globulins and HOMA-IR, and by a decrease in blood platelet level and albumin concentration. Following introduction of IGF-1 standardization according to age, most of demonstrated relationships remained significant including the fact that IGF-1 concentration was significantly lower in the group of cirrhosis (*staging* 4) than in remaining levels of *staging* (S1, S2 and S3).

Concentration of IGF-1R also decreased in parallel to age in the entire studied group but the respective correlation coefficient was very low ($r = -0.222$; $p < 0.05$). In patients infected for a long time with HCV (subgroup B) a high, significant positive correlation was detected between concentration of IGF-1R and concentration of albumins. Concentration of IGFBP-3 manifested only a single significant (negative) correlation with total protein concentration. In the entire studied group (as well as in subgroups) particularly high coefficients of negative correlations were found between the serum index of IGF-1/IGFBP-3 on one hand and patient's age, BMI, AFP concentration, activities of hepatic enzymes (ALT, AST, GGTP), *grading* and *staging*, on the other. Concentration of IGFBP-6 ma-

nifested positive correlation with patient's age but only in patients with prolonged HCV infection (subgroup B). The other correlations (with BMI, total protein concentration, level of oestradiol, with *grading*) even if statistically significant were far from pronounced (low correlation coefficients). No significant reciprocal correlations were demonstrated between serum concentrations of IGF-1 and the remaining IGF axis proteins (IGF-1R, IGFBP-3 and IGFBP-6) in patients with chronic type C hepatitis.

Hepatic expression of IGF-1 in patients with long-term HCV infection (subgroup B) manifested negative correlations with activities of ALT and AST and with concentration of AFP. A weak negative correlation ($r = -0,360$) between expression of IGF-1 and viral load (HCV-RNA) could be demonstrated only in subgroup A. No significant correlation could be disclosed between expression of IGF-1 and tissue expression of IGF-1R. An increase in tissue expression of IGF-1R (subgroup A) was accompanied by an increase in blood glucose level. Both hepatic expression of IGFBP-3, and value of the hepatic index of IGF-1/IGFBP-3 demonstrated correlation with BMI in patients of group A.

Analysis of HCV protein expression in tissues demonstrated the highest amounts of NS3 protein, followed by C protein and NS5A protein. Significant correlations were detected between expression of the core protein C and clinical variables, i.a. positive correlation with HCV viral load, and a high negative correlation with advancement of hepatic fibrosis (*staging*) (subgroup A). Expression of NS3 protein apart from the relationship with *staging*, manifested also a correlation with *grading*. Also the expression of NS5A protein showed significant correlations with clinical variables (total protein concentration, glucose concentration, steatosis) but the relationships were far from pronounced ones.

In the examined tissue material of subgroup A patients and in tissue controls all the possible isoforms of IGF-1 mRNA were identified, including both the alternate exons 1 and 2 (depending on the used promoter P1 or P2), and the alternative *splicing* forms: IGF-1A, IGF-1B and IGF-1C. In the studied group and in the control class I transcripts (mRNA P1) prevailed. No significant differences were disclosed for the proportion of P1 and P2 involvement in the studied and the control group. In the entire studied material % expression of the *splicing* isoform A prevailed while expressions of mRNA B and C isoforms were much lower. Percentage expression of the IGF-1A isoform was significantly higher while that of isoform B was lower in patients infected with HCV than in the control. A detailed analysis of relative expression manifested by every IGF-1 mRNA isoform (standardized against reference genes) demonstrated a significantly higher expression of IGF-1A and IGF-1C mRNA isoforms, transcript class I (P1) isoforms and a total IGF-1 mRNA in the group of patients infected with HCV as compared to the control. The very high positive correlations were detected between reciprocal expression of IGF-1 transcript isoforms (P1, P2, A, B and C) in the studied group of patients with HCV infection and in livers of control individuals.

Expression of all isoforms mRNA IGF-1 (IGF-1A, IGF-1B, IGF-1C) and both class of transcripts I (P1) and II (P2) was directly correlated with serum IGF-1 level in patients with chronic HCV infection.

Livers with the most pronounced inflammatory lesions (G2) demonstrated a lowered expression of all IGF-1 transcripts as compared to G1, with the exception of IGF-1C mRNA isoform.

Expression of IGF-1R receptor mRNA in HCV infection was significantly lower than in the control. The significantly higher expression of receptor mRNA was detected in patients with a more intense inflammatory activity (G2) as compared to G1. Analysis of mRNA expression for SP1 factor (a controller of P1 and P2 activities) demonstrated its lowered level in patients chronically infected with HCV as compared to the control, with no differences which would reflect clinical and histopathological data.

In HCV+ patients expression of the entire IGF-1 and all its isoforms mRNAs manifested a pronounced negative correlation with patient's age, BMI value, steatosis, ALT and AST activities. In addition, expression of IGF-1A, IGF-1B, P1 and P2 isoforms manifested a highly negative correlation with *grading*, a relatively weak correlation with *staging* (exclusively transcript P2). Statistically significant but relatively weak correlations linked HCV viral load with IGF-1A mRNA expression, P1 mRNA expression and total IGF-1 mRNA expression. Positive correlations with HCV viral load and with *grading* were demonstrated also in the case of IGF-1R mRNA expression. In the entire group with chronic HCV infection a significant direct relationship was disclosed between serum concentration of IGF-1 and hepatic production of all IGF-1 mRNA isoforms. On the other hand, in the case of IGF-1R mRNA and SP1 mRNA expressions inverse relationships were documented: the lower concentration of IGF-1 in serum of chronic hepatitis type C patients coexisted with higher expression of the transcripts.

Expression of SP1 mRNA showed a highly negative correlation with all IGF-1 isoforms (including mRNA for both promoters, P1 and P2) and a highly positive correlation with expression of IGF-1R mRNA.

The following conclusions were delineated: (1) Serum concentration of IGF-1 may be applied as the marker used in everyday medical practice and allowing to more comprehensive appraise the extent of liver damage in HCV infected patients; (2) Serum IGF-1/IGFBP-3 index represents a more accurate than IGF-1 parameter for evaluation of progress of histopathological alterations in liver. Due to the high correlation between the serum index and HCV load and advancements of fibrosis in liver (*staging*), value of IGF-1/IGFBP-3 may be used as an additional prognostic index before planned anti-viral treatment; (3) Production of all IGF-1 mRNA isoforms (IGF-1A, IGF-1B, IGF-1C, P1 and P2) in livers of HCV infected patients and differences in quantitative expression of some transcript variants as compared to the control suggests effect of HCV resulting in an altered *splicing* profile of IGF-1 gene; (4) Increase in inflammatory activity (*gra-*

ding) in livers of patients with chronic HCV infection is linked to a decreased production of IGF-1 transcripts, altered *splicing* profile of IGF-1 and a decrease in serum concentration of IGF-1; (5) All the results allow to present the sequence of IGF system-linked lesions in livers of the patients with chronic HCV infection. The histological progression of hepatic lesions (higher *grading*, *staging*, more pronounced fatty liver degeneration), is accompanied by a decrease in production of mRNA isoforms and mRNA for the total IGF-1, by a decrease in serum IGF-1 concentration and an increase in production of mRNA for the type I IGF-1 receptor (IGF-1R). The phenomena correlate with an increase in expression of mRNA for the SP1 transcription factor, most strongly linked to expression of mRNA for IGF-1R in studied patients; (6) Increased expression of mRNA for the type I IGF-1 receptor (IGF-1R) in parallel to degree of liver damage, negatively correlated with IGF-1 concentration and with expression levels of some mRNA isoforms, may carry therapeutic implications.

9. Piśmiennictwo

1. Abbas A, Grant PJ, Kearney MT. Role of IGF-1 in glucose regulation and cardiovascular disease. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2008;6:1135–1149.
2. Adamek A, Kasprzak A, Seraszek A, Mikoś H, Bura A, Mozer-Lisewska I. Alterations of insulin-like growth factor I (IGF-I) and estradiol serum levels in chronic hepatitis C. *Wspolczesna Onkol.* 2012;16:234–239.
3. Adamo ML. Regulation of insulin-like growth factor I gene expression. Implications for normal and pathological growth. *Diabetes Rev.* 1995;3:2–27.
4. Adamo ML, Ben-Hur H, Roberts CT Jr, LeRoith D. Regulation of start site usage in the leader exons of the rat insulin-like growth factor-I gene by development, fasting, and diabetes. *Mol Endocrinol.* 1991;5:1677–1686.
5. Afdhal NH. The natural history of hepatitis C. *Semin Liver Dis.* 2004;24:3–8.
6. Agurs-Collins T, Adams-Campbell LL, Kim KS, Cullen KJ. Insulin-like growth factor-I and breast cancer risk in postmenopausal African-American women. *Cancer Detect Prev.* 2000;24:199–206.
7. Ahmad W, Shabbiri K, Ijaz B, Asad S, Nazar N, Nazar S, Fouzia K, Kausar H, Gull S, Sawar MT, Shahid I, Hassan S. Serine 204 phosphorylation and O- β -GlcNAc interplay of IGFBP-6 as therapeutic indicator to regulate IGF-II functions in viral mediated hepatocellular carcinoma. *J Virol.* 2011;8:208–216.
8. Aimaretti G, Boschetti M, Corneli G, Gasco V, Valle D, Borsotti M, Rossi A, Barreca A, Fazuoli L, Ferone D, Ghig E, Minuto F. Normal age-dependent values of serum insulin growth factor-I: results from a healthy Italian population. *J Endocrinol Invest.* 2008;31:445–449.
9. Aleem E, Elshayeb A, Elhabachi N, Mansour AR, Gowily A, Hela A. Serum IGFBP-3 is more effective predictor than IGF-1 and IGF-2 for the development of hepatocellular carcinoma in patients with chronic HCV infection. *Oncol Lett.* 2012;3:704–712.
10. Alexia C, Fallot G, Lasfer M, Schweizer-Groyer G, Groyer A. An evaluation of the role of insulin-like growth factors (IGF) and of type-I IGF receptor signalling in hepatocarcinogenesis and in the resistance of hepatocellular cells against drug-induced apoptosis. *Biochem Pharmacol.* 2004;86:1003–1015.
11. Ali O, Cohen P, Lee KW. Epidemiology and biology of insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) as an anti-cancer molecule. *Horm Metab Res.* 2003;35:726–733.
12. Alter H.J, Seeff L.B. Recovery, persistence, and sequelae in hepatitis C virus infection: a perspective on long-term outcome. *Semin Liver Dis.* 2000;20:17–35.
13. Alvaro D, Barbaro B, Franchitto A, Onori P, Glaser SS, Alpini G, Francis H, Marucci L, Sterpetti P, Ginanni-Corradini S, Muda AO, Dostal DE, De Santis A, Attili AF,

- Benedetti A, Gaudio E. Estrogens and insulin-like growth factor-1 modulate neoplastic cell growth in human cholangiocarcinoma. *Am J Pathol.* 2006;169:877–888.
14. Akuta N, Suzuki F, Hirakawa M, Kawamura Y, Yatsuji H, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. Amino acid substitutions in hepatitis C virus core region of genotype 1b are the important predictor of severe insulin resistance in patients without cirrhosis and diabetes mellitus. *J Med Virol.* 2009;81:1032–1039.
 15. Amanzada A, Goralczyk AD, Schneider S, Moriconi F, Lindhorst A, Mihm S, Van Thiel DH, Ramadori G. High predictability of a sustained virological response (87%) in chronic hepatitis C virus genotype 1 infection treatment by combined IL28B genotype analysis and γ -glutamyltransferase/alanine aminotransferase ratio: a retrospective single-center study. *Digestion.* 2012;86:218–227.
 16. Andreassen M, Nielsen K, Raymond I, Kristensen L, Faber J. Characteristics and reference ranges of insulin-like growth factor-I measured with a commercially available immunoassay in 724 healthy adult Caucasians. *Scand J Clin Lab Invest.* 2009;69:880–885.
 17. Aoki H, Hayashi J, Moriyama M, Arkawa Y, Hino O. Hepatitis C virus core protein interacts with 14–3–3 protein and activates the kinase Raf-1. *J Virol.* 2000;74:1736–1741.
 18. Arany E, Afford S, Strain AJ, Winwood PJ, Arthur MJ, Hill DJ. Differential cellular synthesis of insulin-like growth factor binding protein-1 (IGFBP-1) and IGFBP-3 within human liver. *J Clin Endocrinol Metabol.* 1994;79:1871–1876.
 19. Arcaro A. Targeting the insulin-like growth factor-1 receptor in human cancer. *Front Pharmacol.* 2013;4:30. doi: 10.3389/fphar.2013.00030.
 20. Armakolas A, Philippou A, Panteleakou Z, Nezos A, Sourla A, Petraki C, Koutsilieris M. Preferential expression of IGF-IEc (MGF) transcript in cancerous tissues of human prostate: evidence for a novel and autonomous growth factor activity of MGF E peptide in human prostate cancer cells. *Prostate.* 2010;70:1233–1242.
 21. Aytug S, Reich D, Sapiro LE, Bernstein D, Begum N. Impaired IRS-1/PI3-kinase signaling in patients with HCV: A mechanism for increased prevalence of type 2 diabetes. *Hepatology.* 2003;38:1384–1392.
 22. Bartenschlager R, Lohman V. Replication of hepatitis C virus. *J Gen Virol.* 2000;81:1631–1648.
 23. Barton ER. The ABCs of IGF-I isoforms: impact on muscle hypertrophy and implications for repair. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2006;31:791–797.
 24. Barton ER, DeMeo J, Lei H. The insulin-like growth factor (IGF)-I E peptides are required for isoform-specific gene expression and muscle hypertrophy after local IGF-I production. *J Appl Physiol.* 2010;108:1069–1076.
 25. Bartosch B, Thimme R, Blum HE, Zoulim F. Hepatitis C virus-induced hepatocarcinogenesis. *J Hepatol.* 2009;51:810–820.
 26. Baserga R. The insulin-like growth factor I receptor: a key to tumor growth? *Cancer Res.* 1995;55:249–255.

27. Baserga R, Peruzzi F, Reiss K. The IGF-1 receptor in cancer biology. *Int J Cancer*. 2003;107:873–877.
28. Bataller R, Paik YH, Lindquist JN, Lemasters JJ, Brenner DA. Hepatitis C virus core and nonstructural proteins induce fibrogenic effects in hepatic stellate cells. *Gastroenterology*. 2004;126:246–258.
29. Baxter RC. Insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins: interactions with IGFs and intrinsic bioactivities. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2000;278:E967–E976.
30. Bedossa P, Poynard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology*. 1996;24:289–93.
31. Belfiore A, Frasca F, Pandini G, Sciacca L, Vigneri R. Insulin receptor isoforms and insulin receptor/insulin-like growth factor receptor hybrids in physiology and disease. *Endocrine Rev*. 2009;30:586–63.
32. Bichell DP, Kikuchi K, Rotweien P. Growth hormone rapidly activates insulin-like growth factor I gene transcription in vivo. *Mol Endocrinol*. 1992;6:1899–1908.
33. Bielawski K, Wlasiuk M, Truskolawska M, Falkiewicz B. HCV infection in Poland. *Arch Med Res*. 2000;31:532–535.
34. Blakesley VA, Stannard BS, Kalebic T, Helman LJ, LeRoith D. Role of the IGF-I receptor in mutagenesis and tumor promotion. *J Endocrinol*. 1997;152:339–344.
35. Blum WF, Albertsson-Wikland K, Rosberg S, Ranke MB. Serum levels of insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF binding protein 3 reflect spontaneous growth hormone secretion. *J Clin Endocrinol Metab*. 1993;76:1610–1616.
36. Boisclair YR, Seto D, Hsieh S, Hurst KR, Ooi GT. Organization and chromosomal localization of the gene encoding the mouse acid labile subunit of the insulin-like growth factor binding complex. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93:10028–10033.
37. Borowski P, Oehlmann K, Heiland M, Laufs R. Nonstructural protein 3 of hepatitis C virus block the distribution of the free catalytic subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase. *J Virol*. 1997;71:2838–2843.
38. Brabant G, von zur Muhlen A, Wurster Ch, Ranke M, Kratzsch J, Kiess W, Ketelslegers JM, Wilhelmssen L, Hulthen L, Saller B, Mattsson A, Wilde J, Schemer R, Kann P. Serum Insulin-like Growth factor I reference values for an automated chemiluminescence immunoassay system: results from a multicenter study. *Horm Res*. 2003;60:53–60.
39. Brabant G, Wallaschofski H. Normal levels of serum IGF-I: determinants and validity of current reference ranges. *Pituitary*. 2007;10:129–133.
40. Breuhahn K. Molecular mechanisms of progression in human hepatocarcinogenesis. *Pathologe*. 2010;Suppl 2:170–176.
41. Brokaw J, Katsaros D, Wiley A, Lu L, Su D, Sochirca O, de la Longrais IA, Mayne S, Risch H, Yu H. IGF-I in epithelial ovarian cancer and its role in disease. *Growth Factors*. 2007;25:346–354.
42. Bura M, Kowala-Piaskowska A, Adamek A, Bura A, Czajka A, Hryckiewicz K, Bereszyńska I, Mozer-Lisewska I. Results of antiviral treatment of patients with chronic hepatitis C: experience of Poznan centre. *Postepy Hig Med Dosw*. 2012;66:339–347.

43. Butt AJ, Firth SM, King MA, Baxter RC. Insulin-like growth factor-binding protein-3 modulates expression of Bax and Bcl-2 and potentiates p-53-independent radiation-induced apoptosis in human breast cancer cells. *J Biol Chem.* 2000;275:39174–39181.
44. Cariani E, Lasserre C, Seurin D, Hamelin B, Kemeny F, Franco D, Czech MP, Brechot C. Differential expression of insulin-like growth factor II mRNA in human primary liver cancers, benign liver tumors, and liver cirrhosis. *Cancer Res.* 1988;48:6844–6849.
45. Caro JF, Poulos J, Ittoop O, Pories WJ, Flickinger EG, Sinha MK. Insulin-like growth factor binding in hepatocytes from human liver, human hepatoma, and normal, regenerating, and fetal rat liver. *J Clin Invest.* 1988;81:976–981.
46. Chan JM, Stampfer MJ, Ma J, Gann P, Gaziano JM, Pollak M, Giovannucci E. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF binding protein-3 as predictors of advanced-stage prostate cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2002;94:1099–1106.
47. Chen B, Liu S, Xu W, Wang X, Zhao W, Wu J. IGF-I and IGFBP-3 and the risk of lung cancer: A meta-analysis based on nested case-control studies. *J Exp Clin Cancer Res.* 2009;28:89. doi:10.1186/1756-9966-28-89.
48. Chen MJ, Chiou PP, Lin P, Lin CM, Siri S, Peck K, Chen TT. Suppression of growth and cancer-induced angiogenesis of aggressive human breast cancer cells (MDA-MB-231) on the chorioallantoic membrane of developing chicken embryos by E-peptide of pro-IGF-I. *J Cell Biochem.* 2007;101:1316–1327.
49. Chen SL, Morgan TR. The natural history of hepatitis C virus (HCV) infection. *Int J Med Sci.* 2006;3:47–52.
50. Chew SL, Lavender P, Clark AJ, Ross RJ. An alternatively spliced human insulin-like growth factor-1 transcript with hepatic tissue expression that diverts away from mitogenic IBE1 peptide. *Endocrinology.* 1995;136:1939–1944.
51. Chin E, Zhou J, Dai J, Baxter RC, Bondy CA. Cellular localization and regulation of gene expression for components of the insulin-like growth factor ternary binding protein complex. *Endocrinology.* 1994;134:2498–2504.
52. Chong KY, Subramanian A, Mokbel K, Sharma AK. The prognostic significance of the insulin-like growth factor-1 ligand and receptor expression in breast cancer tissue. *J Surg Oncol.* 2011;104:228–235.
53. Chong YM, Colston K, Jiang WG, Sharma AK, Mikbel K. The relationship between the insulin-like growth factor-1 system and the oestrogen metabolising enzymes in breast cancer tissue and its adjacent non-cancerous tissue. *Breast Cancer Res Treat.* 2006;99:275–288.
54. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Oberby LR, Bradley SW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne nonA, nonB viral hepatitis genome. *Science.* 1989;244:362–364.
55. Cicinnati VR, Shen Q, Sotiropoulos GC, Radtke A, Gerken G, Beckebaum S. Validation of putative reference genes for gene expression studies in human hepatocellular carcinoma using real-time quantitative RT-PCR. *BMC Cancer.* 2008;8:350.

56. Clemmons DR. Insulin-like growth factor binding proteins and their role in controlling IGF actions. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1997;8:45–62.
57. Clemmons DR. Role of insulin-like growth factor in maintaining normal glucose homeostasis. *Horm Res.* 2004;62:77–82.
58. Cohen P. Serum insulin-like growth factor-I levels and prostate cancer-risk-interpreting the evidence. *J Natl Cancer Inst.* 1998;90:876–879.
59. Cohen P, Clemmons DR, Rosenfeld RG. Does the GH-IGF axis play a role in cancer pathogenesis? *Growth Horm&IGF Research.* 2000;10:297–305.
60. Colakoğlu O, Taskiran B, Colakoğlu G, Kizildag S, Ari Ozkan F, Unsal B. Serum insulin like growth factor-1 (IGF-1) and insulin growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) levels in liver cirrhosis. *Turk J Gastroenterol.* 2007;18:245–249.
61. Colin C, Lanoir D, Touzet S, Meyaud-Kraemer L, Bailly F, Trepo C. Sensitivity and specificity of third-generation hepatitis C virus antibody detection assays: an analysis of the literature. *J Viral Hepat.* 2001;8:87–95.
62. Cornberg M, Razavi HA, Alberti A, Bernasconi E, Buti M, Cooper C, Dalgard O, Dillion JF, Flisiak R, Fornis X, Frankova S, Goldis A, Goulis J, Halota W, Hunyady B, Lagging M, Largen A, Makara M, Manolakopoulos S, Marcellin P, Marinho RT, Pol S, Poynard T, Puoti M, Sagalova O, Sibbel S, Simon K, Wallace C, Young K, Yurdaydin C, Zuckerman E, Negro F, Zeuzem S. A systematic review of hepatitis C virus epidemiology in Europe, Canada and Israel. *Liver International.* 2011;31 (suppl. 2):30–60.
63. Cox ME, Gleave ME, Zakikhani M, Bell RH, Piura E, Vickers E, Cunnigham M, Larsson O, Fazli L, Pollak M. Insulin receptor expression by human prostate cancer. *Prostate.* 2009;69:33–40.
64. Daughaday WH. Growth hormone axis overview – somatomedin hypothesis. *Pediatr Nephrol.* 2000;14:537–540.
65. Daughaday WH, Rotwein P. Insulin-like growth factors I and II peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum and tissue concentrations. *Endocr Rev.* 1989;10:68–91.
66. Dehghani SM, Karamifar H, Hamzavi SS, Haghghat M, Malek-Hosseini SA. Serum insulinlike growth factor-1 and its binding protein-3 levels in children with cirrhosis waiting for liver transplant. *Exp Clin Transplant.* 2012;10:252–257.
67. Desbois-Mouthon C, Wendum D, Cadoret A, Rey C, Leneuve P, Blaise A, Housset C, Tronche F, Le Bouc Y, Holzenberger M. Hepatocyte proliferation during liver regeneration is impaired in mice with liver-specific IGF-1R knockout. *FASEB J.* 2006;20:773–775.
68. Di Martino V, Lebray P, Myers RP, Pannier E, Paradis V, Charlotte F, Moussalli J, Thabut D, Buffet C, Poynard T. Progression of liver fibrosis in women infected with hepatitis C: Long-term benefit of estrogen exposure. *Hepatology.* 2004;40: 1426–1433.
69. Dluzniewska B, Waldert C, Seitz C, Marberger M. Insulin-like growth factors and prostate cancer. *World J Urol.* 2001;19:225–233.

70. Duggan C, Wang CY, Neuhouser ML, Xiao L, Smith AW, Reding KW, Baumgartner RN, Baumgartner KB, Bernstein L, Ballard-Barbash R, McTiernan A. Associations of insulin-like growth factor and insulin-like growth factor binding protein-3 with mortality in women with breast cancer. *Int J Cancer*. 2013;132:1191–1200.
71. Dupont J, Le Roith D. Insulin-like growth factor 1 and oestradiol promote cell proliferation of MCF-7 breast cancer cells: new insights into their synergistic effects. *J Clin Pathol: Mol Pathol*. 2001;54:149–154.
72. Edmondson SR, Thumiger SP, Kaur P, Loh B, Koelmeyer R, Li A, Silha JV, Murphy LJ, Wraight CJ, Werther GA. Insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) localizes to and modulates proliferative epidermal keratinocytes in vivo. *Br J Dermatol*. 2005;152:225–230.
73. Egger D, Wolk B, Gosert R, Bianchi L, Blum HE, Moradpour D, Bienz K. Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J Virol*. 2002;76:5974–5984.
74. Endogenous Hormones and Breast Cancer Collaborative Group. Insulin-like growth factor 1 (IGF1), IGF binding protein 3 (IGFBP3), and breast cancer risk: pooled individual data analysis of 17 prospective studies. *Lancet Oncol*. 2010;11:530–542.
75. Erhardt A, Hassan M, Heintges T, Haussinger D. Hepatitis C virus core protein induces cell proliferation and activates ERK, JNK, and p38 MAP kinases together with the MAP kinase phosphatase MKP-1 in HepG2 tet-Off cell line. *Virology*. 2002;292:272–284.
76. Eslam M, Kawaguchi T, Del Campo JA, Sata M, Abo-Elneen Khattab M, Romero-Gomez M. Use of HOMA-IR in hepatitis C. *J Viral Hepat*. 2011;18:675–684.
77. Esteban JL, Sauleda S, Quer J. The changing epidemiology of hepatitis C virus infection in Europe. *J Hepatol*. 2008;48:148–162.
78. Etherton TD, Bauman DE. Biology of somatotropin in growth and lactation of domestic animals. *Physiological Rev*. 1998;78:745–761.
79. European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatitis C virus infection. *J Hepatol*. 2011;55:245–264.
80. Everhart JE, Wright EC. Association of γ -glutamyl transferase (GGT) activity with treatment and clinical outcomes in chronic hepatitis C (HCV). *Hepatology*. 2012;doi:10.1002/hep.26203
81. Farci P, Alter HJ, Wong D, Miller RH, Shih JW, Jett B, Purcell RH. A long-term study of hepatitis C virus replication in non-A, non-B hepatitis. *N Engl J Med*. 1991;325:98–104.
82. Farci P, Alter HJ, Shimoda A, Govindarajan S, Cheung LC, Melpolder JC, Sacher RA, Shih JW, Purcell RH. Hepatitis C virus-associated fulminant hepatic failure. *N Engl J Med*. 1996;335:631–634.
83. Fattovich G, Giustina G, Degos F, Tremolada F, Diodati G, Almasio P, Nevens F, Solinas A, Mura D, Brouwer JT, Thomas H, Japoum JN, Casarin C, Bonetti P, Fuschi P, Basho J, Tocco A, Bhalla A, Galassini R, Noventa F, Schalm SW, Realdi G. Morbidity

- and mortality in compensated cirrhosis type C: a retrospective follow-up study of 384 patients. *Gastroenterology*. 1997;112:463–472.
84. Feng CY, van Bartheld CS. Expression of insulin-like growth factor 1 isoforms in the rabbit oculomotor system. *Growth Horm IGF Res*. 2011;21:228–232.
 85. Firth SM, Baxter RC. Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins. *Endocr Rev*. 2002;23:824–854.
 86. Flanigan SA, Pitts TM, Eckhardt SG, Tentler JJ, Tan AC, Thorburn A, Leong S. The Insulin-like growth factor I receptor/insulin receptor tyrosine kinase inhibitor PQIP exhibits enhanced antitumor effects in combination with chemotherapy against colorectal cancer models. *Clin Cancer Res*. 2010;16:5436–5446.
 87. Flisiak R, Halota W, Horban A, Juszczak J, Pawłowska M, Simon K. Prevalence and risk factors of HCV infection in Poland. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2011a;23:1213–1217.
 88. Flisiak R, Halota W, Horban A, Juszczak J, Pawłowska M, Simon K. Prevalence of anti-HCV and HCV-RNA among health care workers and patients of multispecialistic hospitals in Poland. *J Hepatol*. 2011b;54(Suppl. 1):S456.
 89. 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*. 1999;19:3278–3288.
 90. Fujita T, Ishido S, Muramatsu S, Itoh M, Hotta H. Suppression of actinomycin D induced apoptosis by the NS3 protein of hepatitis C virus. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996;229:825–831.
 91. Gatto M, Drudi-Metalli V, Torrice A, Alpini G, Cantafora A, Blotta I, Alvaro D. Insulin-like growth factor-1 isoforms in rat hepatocytes and cholangiocytes and their involvement in protection against cholestatic injury. *Lab Invest*. 2008;88:986–994.
 92. Ghany MG, Strader DB, Thomas DL, Seeff LB. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: An update. *Hepatology*. 2009;49:1335–1374.
 93. Gong Y, Cui L, Minuk GY. The expression of insulin-like growth factor binding proteins in human hepatocellular carcinoma. *Mol Cell Biochem*. 2000;207:101–104.
 94. Górecki DC, Beręsewicz M, Zabłocka B. Neuroprotective effects of short peptides derived from the insulin-like growth factor 1. *Neurochem Int*. 2007;51:451–458.
 95. Graveley BR. Alternative splicing: increasing diversity in the proteomic world. *Trends Genet*. 2001;17:100–107.
 96. Guvakova MA, Surmacz E. Overexpressed IGF-I receptors reduce estrogen growth requirements, enhance survival, and promotes E-cadherin-mediated cell-cell adhesion in human breast cancer cells. *Exp Cell Res*. 1997;231:149–162.
 97. Güzelbulut F, Sezikli M, Cetinkaya ZA, Ozkara S, Gönen C, Ovünc AO. A lower serum gamma-glutamyltransferase level does not predict a sustained virological response in patients with chronic hepatitis C genotype 1. *Gut Liver*. 2013;7:74–81.
 98. Hall LJ, Kajimoto Y, Bichell DP, Kim SW, James PL, Counts D, Nixon LJ, Tobin G, Rotwein P. Functional analysis of the rat insulin-like growth factor I gene and identification of an IGF-I gene promoter. *DNA Cell Biol*. 1992;11:301–313.

99. Hameed M, Lange KH, Andersen JL, Schjerling P, Kjaer M, Harridge SD, Goldspink G. The effect of recombinant human growth hormone and resistance training on IGF-I mRNA expression in the muscles of elderly men. *J Physiol.* 2004;555:231–240.
100. Hankinson SE, Willett WC, Colditz GA, Hunter DJ, Michaud DS, Deroo B, Rosner B, Speizer FE, Pollak M. Circulating concentrations of insulin-like growth factor-I and risk of breast cancer. *Lancet.* 1998;351:1393–1396.
101. Harman SM, Metter EJ, Blackman MR, Landis PK, Carter HB. Serum levels of insulin-like growth factor I (IGF-I), IGF-II, IGF-binding protein-3, and prostate-specific antigen as predictors of clinical prostate cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000; 85:4258–4265.
102. Hayashi J, Aoki H, Kajino K, Moriyama M, Arakawa Y, Hino O. Hepatitis C virus core protein activates the MAPK/ERK cascade synergistically with tumor promoter TPA, but not with epidermal growth factor of transforming growth factor alpha. *Hepatology.* 2000;32:958–961.
103. Hayashida K, Shoji I, Deng L, Jiang DP, Ide YH, Hotta H. 17 β -estradiol inhibits the production of infectious particles of hepatitis C virus. *Microbiol Immunol.* 2010;54:684–690.
104. Helaly GF, Hussein NG, Refai W, Ibrahim M. Relation of serum insulin-like growth factor-1 (IGF-1) levels with hepatitis C virus infection and insulin resistance. *Transl Res.* 2011;158:155–162.
105. Hellowell GO, Turner GD, Davies DR, Poulosom R, Brewster SF, Macaulay VM. Expression of the type 1 insulin-like growth factor receptor is up-regulated in primary prostate cancer and commonly persists in metastatic disease. *Cancer Res.* 2002;62:2942–2950.
106. Hepler JE, Van Wyk JJ, Lund PK. Different half-lives of insulin-like growth factor I mRNAs that differ in length of 3'untranslated sequence. *Endocrinology.* 1990;127:1550–1552.
107. Himoto T, Tani J, Miyoshi H, Yoneyama H, Mori H, Inukai M, Masugata H, Goda F, Senda S, Haba R, Masaki T. The ratio of insulin-like growth factor-I/insulin-like growth factor-binding protein-3 in sera of patients with hepatitis C virus-related chronic liver disease as a predictive marker of insulin resistance. *Nutr Res.* 2013;33:27–33.
108. Holmes MD, Pollak MN, Hankinson SE. Lifestyle correlates of plasma insulin-like growth factor I and insulin-like growth factor binding protein 3 concentrations. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2002;11:862–867.
109. Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques. *J Histochem Cytochem.* 1981;29:577–580.
110. Hui JM, Sud A, Farrell GC, Bandara P, Byth K, Kench JG, McCaughan GW, George J. Insulin resistance is associated with chronic hepatitis C virus infection and fibrosis progression. *Gastroenterology.* 2003;125:1695–1704.

111. Hung CH, Wang JH, Hu TH, Chen CH, Chang KC, Yen YH, Kuo YH, Tsai MC, Lu SN, Lee CM. Insulin resistance is associated with hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C. *World J Gastroenterol.* 2010;16:2265–2271.
112. Huynh H, Chow P, Ooi L, Soo KC. A possible role for insulin-like growth factor-binding protein-3 autocrine/paracrine loops in controlling hepatocellular carcinoma cell proliferation. *Cell Growth Differ.* 2002;13:115–122.
113. Hwa V, Oh Y, Rosenfeld RG. The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily. *Endocr Rev.* 1999;20:761–787.
114. Jansen M, van Schaik FM, Ricker AT, Bullock B, Woods DE, Gabbay KH, Nussbaum AL, Sussenbach JS, Van den Brande JL. Sequence of cDNA encoding human insulin-like growth factor I precursor. *Nature.* 1983;306:609–611.
115. Jiang Y, Wang L, Gong W, Wie D, Le X, Yao J, Ajani J, Abbruzzese JL, Huang S, Xie K. A high expression level of insulin-like growth factor I receptor is associated with increased expression of transcriptional factor Sp1 and regional lymph node metastasis of human gastric cancer. *Clin Exp Metastasis.* 2004;21:755–764.
116. Jurczyk K, Laurans L, Karpińska E, Wawrzynowicz-Syczewska M, Parczewski M, Boroń-Kaczmarek A. Risk score based PEG Interferon alpha 2b and Ribavirin treatment response estimation model for genotype 1 chronic hepatitis C patients. *Adv Med Sci.* 2011;56:165–171.
117. Juszczyk J. Technika przezskórnej biopsji wątroby. *Pol Tyg Lek.* 1973;28:1987–1990.
118. Juul A, Bang P, Hertel NT, Main K, Dalgaard P, Jorgensen K, Muller J, Hall J, Skakkebaek NE. Serum insulin-like growth factor-I in 1030 healthy children, adolescents, and adults: relation to age, stage of puberty, testicular size, and body mass index. *J Clin Endocrinol Metabol.* 1994;78:744–752.
119. Kaczka A, Kumor A, Pietruczuk M, Małecka-Panas E. Ocena stężeń insuliny, insulinopodobnego czynnika wzrostu I, śródbłonkowego czynnika wzrostu naczyń i gastryny u chorych z polipami i rakiem jelita grubego. *Prz Gastroenterol.* 2012; 7 (4): 216–222.
120. Kaczmarek E, Strzelczyk R. From two to three-dimensional visualisation of structures in light and confocal microscopy – applications for biomedical studies. In: *Current issues on multidisciplinary microscopy research and education. FORMATEX microscopy book series no. Eds.: Mendez-Vilas A, Labajos-Broncano L, II Formatex Research Centre, Badajoz. 2005, 1st ed.,p.289–295.*
121. Kajimoto Y, Rotwein P. Structure of the chicken insulin-like growth factor 1 gene reveals conserved promoter elements. *J Biol Chem.* 1991;266:9724–9731.
122. Kam GYW, Leung Kc, Baxter RC, Ho KKY. Estrogens exert route- and dose-dependent effects on insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-3 and the acid-labile subunit of the IGF ternary complex. *J Clin Endocrinol Metabol.* 2000;85:1918–1922.
123. Kao CF, Chen Sy, Chen JY, Lee YHW. Modulation of p53 transcription regulatory activity and post-translational modification by hepatitis C virus core protein. *Oncogene.* 2004;23:2472–2483.

124. Kaseb AO, Morris JS, Hassan MM, Siddiqui AM, Lin E, Xiao L, Abdalla EK, Vauthey JN, Aloia TA, Krishnan S, Abbruzzese JL. Clinical and prognostic implications of plasma insulin-like growth factor-1 and vascular endothelial growth factor in patients with hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol.* 2011;29:3892–3899.
125. Kasprzak A, Adamek A. Role of hepatitis C virus proteins (C, NS3, NS5A) in hepatic oncogenesis. *Hepato Res.* 2008;38:1–26.
126. Kasprzak A, Adamek A. The insulin-like growth factor (IGF) signaling axis and hepatitis C virus-associated carcinogenesis (Review). *Int J Oncol.* 2012;41:1919–1931.
127. Kasprzak A, Adamek A, Biczysko W, Seidel J, Przybyszewska W, Olejniczak K, Juszczak J, Zabel M. Intracellular expression of the proliferative marker Ki-67 and viral proteins (NS3, NS5A and C) in chronic, long lasting hepatitis C virus (HCV) infection. *Folia Histochem Cytobiol.* 2007;45:357–366.
128. Kasprzak A, Adamek A, Przybyszewska W, Szaflarski W, Sterczyńska K, Seraszek A, Mozer-Lisewska I, Kaczmarek E, Biczysko W. Expression of IGF-1 and viral proteins (C, NS3, NS5A) in the livers of patients with chronic HCV infection. *Adv Clin Exp Med.* 2011;20:263–273.
129. Kasprzak A, Seidel J, Biczysko W, Wysocki J, Spachacz R, Zabel M. Intracellular localization of hepatitis C virus proteins (NS3 i C) in children with chronic hepatitis C. *Liver Int.* 2005;25:896–903.
130. Kasprzak A, Szaflarski W, Szmaja J, Andrzejewska M, Przybyszewska W, Kaczmarek E, Koczorowska M, Kościński T, Zabel M, Drews M. Differential expression of IGF-1 mRNA isoforms in colorectal carcinoma and normal colon tissue. *Int J Oncol.* 2013;42:305–316.
131. Kasuga M, Fujita-Yamaguchi Y, Blithe DL, White MF, Kahn CR. Characterization of the insulin receptor kinase purified from human placental membrane. *J Biol Chem.* 1983;258:10973–10980.
132. Kawaguchi T, Taniguchi E, Itou M, Sakata M, Sumie S, Sata M. Insulin resistance and chronic liver disease. *World J Hepatol.* 2011;3:99–107.
133. Kaytor EN, Zhu JL, Pao CI, Phillips LS. Insulin-responsive nuclear proteins facilitates Sp1 interactions with the insulin-growth factor I gene. *J Biol Chem.* 2001a;276:36896–36901.
134. Kaytor EN, Zhu JL, Pao CI, Phillips LS. Physiological concentration of insulin promote binding of nuclear proteins to the insulin-like growth factor I gene. *Endocrinology.* 2001b;142:1041–1049.
135. Kelley KM, Oh Y, Gargosky SE, Gucev Z, Matsumoto T, Hwa V, Ng L, Simpson DM, Rosenfeld RG. Insulin-like growth factor-binding proteins (IGFBPs) and their regulatory dynamics. *Int J Biochem Cell Biol.* 1996;28:619–637.
136. Khandwala HM, McCutcheon IE, Flyvbjerg A, Friend KE. The effects of insulin-like growth factors on tumorigenesis and neoplastic growth. *Endocr Rev.* 2000;21:215–244.
137. Khosravi MJ, Diamandi A, Mistry J, Krishna RG, Khare A. Acid-labile subunit of human insulin-like growth factor-binding protein complex: measurement, molecular, and clinical evaluation. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82:3944–3951.

138. Khosravi J, Diamandi A, Mistry J, Scorilas A. Insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF-binding protein-3 in benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86:694–699.
139. Kim JE, Song WK, Chung KM, Back SH, Jang SK. Subcellular localization of hepatitis C viral proteins in mammalian cells. *Arch Virol.* 1999;144:329–343.
140. Kim SO, Park JG, Lee YI. Increased expression of the insulin-like growth factor I (IGF-I) receptor gene in hepatocellular carcinoma cell lines: implications of the IGF-I receptor gene activation by hepatitis B virus X gene product. *Cancer Res.* 1996;56:3831–3836.
141. Kindler HL, Richards DA, Garbo LE, Garon EB, Stephenson JJ Jr, Rocha-Lima CM, Safran H, Chan D, Kocs DM, Galimi F, McGreivy J, Bray SL, Hei Y, Feigal EG, Loh E, Fuchs CS. A randomized, placebo-controlled phase 2 study of ganitumab (AMG 479) or conatumumab (AMG 655) in combination with gemcitabine in patients with metastatic pancreatic cancer. *Ann Oncol.* 2012;23:2834–2842.
142. Koczorowska M. Alternatywne składanie pre-mRNA genu IGF1 w komórkach nabłonka szyjki macicy, prawidłowych i nowotworowych, zakażonych ludzkim wirusem brodawczaka. Praca doktorska. Poznań. 2012.
143. Koczorowska MM, Kwasniewska A, Gozdzicka-Jozefiak A. IGF1 mRNA isoform expression in the cervix of HPV-positive woman with pre-cancerous and cancer lesions. *Exp Ther Med.* 2011;2:149–156.
144. Kosaki A, Webster NJ. Effect of dexamethasone on the alternative splicing of the insulin receptor mRNA and insulin action in HepG2 hepatoma cells. *J Biol Chem.* 1993;268:21990–21996.
145. Kostecka Z, Błahovec J. Insulin-like growth factor binding proteins and their functions (minireview). *Endocr Regul.* 1999;33:90–94.
146. Krattenmacher R, Knauth R, Parczyk K, Walker A, Hilgenfeldt U, Fritzscheier KH. Estrogen action on hepatic synthesis of angiotensinogen and IGF-I: direct and indirect effects. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1994;48:204–214.
147. Lam CSP, 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.* 2010;30:1479–1484.
148. Laurans Ł, Miroszniczenko I, Wawrzynowicz-Syczewska M. Zaburzenia metaboliczne u chorych przewlekle zakażonych wirusem zapalenia wątroby typu C. *Gastroenterol Pol.* 2009;16:315–322.
149. Lavanchy D. Evolving epidemiology of hepatitis C virus. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17:107–115.
150. Lecomte P, Lecureuil N, Lecureuil M, Lemonnier Y, Mariotte N, Valat C, Garrique MA. Sex differences in the control of sex-hormone-binding globulin in the elderly: role of insulin-like growth factor-I and insulin. *Eur J Endocrinol.* 1998;139:178–183.
151. Lecube A, Hernández C, Genescà J, Simó R. Proinflammatory cytokines, insulin resistance, and insulin secretion in chronic hepatitis C patients: a case control study. *Diabetes Care.* 2006;29:1096–1101.

152. Lecube A, Hernández C, Simó R, Esteban JI, Genesà J. Glucose abnormalities are an independent risk factor for nonresponse to antiviral treatment in chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol.* 2007;102:2189–2195.
153. Lee DH, Blomhoff R, Jacobs DR Jr. Is serum gamma glutamyltransferase a marker of oxidative stress? *Free Radic Res.* 2004;38:535–539.
154. Lee DY. Identification of insulin-like growth factor (IGF)-1 and IGF-binding protein in chylous ascites. *J Korean Med Sci.* 1998;13:17–20.
155. Lee EK, Gorospe M. Minireview: Posttranscriptional regulation of the insulin and insulin-like growth factor systems. *Endocrinology.* 2010;151:1403–1408.
156. Lee S, Park U, Lee YI. Hepatitis C virus core protein transactivates insulin-like growth factor II gene transcription through acting concurrently on Egr1 and Sp1 sites. *Virology.* 2001;283:167–177.
157. Lee YI, Han YJ, Lee SY, Lee YI, Park SK, Park YJ, Moon HB, Shin JH, Lee JH. Activation of insulin-like growth factor II signaling by mutant type p53. Physiological implications for potentiation of IGF-II signaling by p53 mutant 249. *Mol Cell Endocrinol.* 2003;203:51–63.
158. Lee YI, Lee S, Das GC, Park US, Park SM. Activation of the insulin-like growth factor II transcription by aflatoxin B1 induced p53 mutant 249 is caused by activation of transcription complexes; implications for a gain-of-function during formation of hepatocellular carcinoma. *Oncogene.* 2000;19:3717–3726.
159. LeRoith D. Insulin-like growth factors. *Seminars in Medicine of Beth Israel Deaconess Medical Center. N Engl J Med.* 1997;336:633–640.
160. LeRoith D. Insulin-like growth factor I receptor signaling – overlapping or redundant pathways. *Endocrinology.* 2000;141:1287–1288.
161. LeRoith D, Bondy C, Yakar S, Liu JL, Butler A. The somatomedin hypothesis: 2001. *Endocr Rev.* 2001;22:53–74.
162. LeRoith D, Butler AA. Insulin-like growth factors in pediatric health and disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84:4355–4361.
163. LeRoith D, Roberts CT Jr. The insulin-like growth factor system and cancer. *Cancer Lett.* 2003;195:127–137.
164. Leung KC, Johannsson G, Leong GM, Ho KK. Estrogen regulation of growth hormone action. *Endocr Rev.* 2004;25:693–721.
165. Liang TJ, Rehermann B, Seeff LB, Hoofnagle JH. Pathogenesis, natural history, treatment, and prevention of hepatitis C. *Ann Intern Med.* 2000;132:296–305.
166. 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.* 1993;75:59–72.
167. Liu L, Cao Y, Chen C, Zhang X, McNabola A, Wilkie D, Wilhelm S, Lynch M, Carter C. Sorafenib Blocks the RAF/MEK/ERK Pathway, Inhibits Tumor Angiogenesis, and Induces Tumor Cell Apoptosis in Hepatocellular Carcinoma Model PLC/PRF/5. *Cancer Res.* 2006;66:11851–11858.

168. Liu Q, Tackney C, Bhat RA, Prince AM, Zhang P. Regulated processing of hepatitis C virus core protein is linked to subcellular localization. *J Virol.* 1997;71:657–662.
169. Liu QH, Li DG, Huang X, Zong CH, Xu QF, Lu HM. Suppressive effects of 17 β -estradiol on hepatic fibrosis in CCl₄-induced rat model. *World J Gastroenterol.* 2004;10:1315–1320.
170. Livingstone C, Ferns G. Insulin-like growth factor-related proteins and diabetic complications. *Br J Diabetes Vasc Dis.* 2003;3:326–331.
171. Lorenzo-Zúñiga V, Bartoli R, Masnou H, Montoliu S, Morillas RM, Planas R. Serum concentrations of insulin-like growth factor-I (IGF-1) as a marker of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Dig Dis Sci.* 2007;52:3245–3250.
172. Lund PK, Hepler JE, Hoyt EC, Simmons JG. Physiological relevance of IGF-I mRNA heterogeneity. In: *Modern concepts of insulin-like growth factors.* Spencer EM (ed.). New York: Elsevier Science Publishing Co. 1991;pp.111–120.
173. Luo SM, Tan WM, Deng WX, Zhuang SM, Luo JW. Expression of albumin, IGF-1, IGFBP-3 in tumor tissues and adjacent non-tumor tissues of hepatocellular carcinoma patients with cirrhosis. *World J Gastroenterol.* 2005;11:4272–4276.
174. Ma J, Polak MN, Giovannucci E, Chan JM, Tao Y, Hennekens CH and Stampfer MJ: Prospective study of colorectal cancer risk in men and plasma levels of insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-binding protein-3. *J Natl Cancer Inst.* 1999;91: 620–625.
175. Ma CX, Suman VJ, Goetz M, Haluska P, Moynihan T, Nanda R, Olopade O, Pluard T, Guo Z, Chen HX, Erlichman C, Ellis MJ, Fleming GF. A phase I trial of the IGF-1R antibody Cixutumumab in combination with temsirolimus in patients with metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2013, Apr 19 [Epub ahead of print].
176. Major ME, Feinstone SM. The molecular virology of hepatitis C. *Hepatology.* 1997;25:1527–1538.
177. Maki R. Small is beautiful: insulin-like growth factors and their role in growth, development, and cancer. *J Clin Oncol.* 2010;28:4985–4995.
178. Marrero JA, Feng Z, Wang Y, Nguyen MH, Befeler AS, Roberts LR, Reddy KR, Harnois D, Llovet JM, Normolle D, Dalhgren J, Chia D, Lok AS, Wagner PD, Srivastava S, Schwartz M. α -fetoprotein, des- γ carboxyprothrombin, and lectin-bound α -fetoprotein in early hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology.* 2009;137:110–118.
179. Mason AL, Lau JY, Hoang N, Qian K, Alexander GJ, Xu L, Guo L, Jacob S, Regenstein FG, Zimmerman R, Everhart JE, Wasserfall C, Maclaren NK, Perrillo RP. Association of diabetes mellitus and chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology.* 1999;29:328–333.
180. Matheny RW Jr, Nindl BC, Adamo ML. Minireview: Mechano-Growth Factor: a putative product of IGF-I gene expression involved in tissue repair and regeneration. *Endocrinology.* 2010;151:865–875.
181. Mattered D, Capuano G, Colao A, Pivonello R, Manguso F, Puzziello A, D'Agostino L. Increased IGF-I:IGFBP-3 ratio in patients with hepatocellular carcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2003;59:699–706.

182. 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 concentration in man. *Diabetologia*. 1985;28:412–429.
183. Mattsson A, Svensson D, Schuett B, Osterziel KJ, Ranke MB. Multidimensional reference region for IGF-I, IGFBP-2 and IGFBP-3 concentration in serum healthy adults. *Growth Hormone & IGF Research*. 2008;18:506–516.
184. Mazziotti G, Sorvillo F, Morisco F, Carbone A, Rotondi M, Stornaiuolo G, Precone DF, Cioffi M, Gaeta GB, Caporaso N, Carella C. Serum insulin like growth factor I evaluation as a useful tool for predicting the risk of developing hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C virus-related cirrhosis. A prospective study. *Cancer*. 2002;95:2539–2545.
185. McDonald A, Williams RM, Regan FM, Semple RK, Dunger DB. IGF-I treatment of insulin resistance. *Eur J Endocrinol*. 2007;157:S51–S6.
186. McKoy G, Ashley W, Mander J, Yang SY, Williams N, Russell B, Goldspink G. Expression of insulin growth factor-1 splice variants and structural genes in rabbit skeletal muscle induced by stretch and stimulation. *J Physiol*. 1999; 516:583–592.
187. Meinhardt UJ, Ho KKY. Modulation of growth hormone action by sex steroids. *Clin Endocrinol*. 2006;65:413–422.
188. Mekky RY, Hamdi N, El-Akel W, Esmat G, Abdelaziz AI. Estrogen-related MxA transcriptional variation in hepatitis C-virus infected patients. *Transl Res*. 2012;159: 190–196.
189. Menghini G. One-second needle biopsy of the liver. *Gastroenterology*. 1958;35: 190–199.
190. Merkinaitė S, Lazarus J, Gore C. Addressing HCV infection in Europe: reported, estimated and undiagnosed cases. *Centr Eur J Public Health*. 2008;16:106–110.
191. Michell NP, Langman MJS, Eggo MC. Insulin-like growth factors and their binding protein in human colonocytes: preferential degradation of insulin-like growth factor binding protein 2 in colonic cancers. *British J Cancer*. 1997;76:60–66.
192. Mills P, Lafreniere JF, Benabdallah BF, El Fahimeel M, Tremblay JP. A new pro-migratory activity on human myogenic precursor cells for a synthetic peptide within the E domain of the mechano growth factor. *Exp Cell Res*. 2007;313:527–537.
193. Mittanck DW, Kim SW, Rotwein P. Essential promoter elements are located within the 5' untranslated region of human insulin-like growth factor-I exon I. *Mol Cell Endocrinol*. 1997;126:153–163.
194. 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;80:1148–1157.
195. Morali G, Shitrit AB, Eran M, Freier S, Reinus C, Braverman D. Hepatic production of insulin-like growth factors in normal and diseased liver. *Hepatogastroenterology*. 2005;52:1511–1515.

196. Mościński M, Bartoszek B, Szyguła-Jurkiewicz B. Gamma-glutamylotranspeptydaza – potencjalny czynnik ryzyka chorób sercowo-naczyniowych? *Folia Cardiologica Excerpta*. 2012;7:60–64.
197. Mukhtar NA, Bacchetti P, Ayala CE, Melgar J, Christensen S. Insulin sensitivity and variability in hepatitis C virus infection using direct measurement. *Dig Dis Sci*. 2013;58:1141–1148.
198. Muramatsu S, Ishido S, Fujita T, Itoh M, Hotta H. Nuclear localization of the NS3 protein of hepatitis c virus and factors affecting the localization. *J Virol*. 1997;71:4954–4961.
199. Murphy LJ. Insulin-like growth factor-binding proteins: functional diversity or redundancy? *J Mol Endocrinol*. 1998;21:97–107.
200. Nagaoka I, Someya A, Iwabuchi K, Yamashita T. Expression of insulin-like growth factor-IA and factor-IB mRNA in human liver, hepatoma cells, macrophage-like cells and fibroblast. *FEBS Lett*. 1991;280:79–83.
201. Nardone G, Romano M, Calabro A, Pedone PV, De Sio I, Persico M, Budillon G, Bruni CB, Riccio A, Zarilli R. Activation of fetal promoters of insulin-like growth factors II gene in hepatitis C virus-related chronic hepatitis, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 1996;23:1304–1312.
202. Negro F, Alberti A. The global health burden of hepatitis C virus infection. *Liver International*. 2011;3(suppl.2):1–3.
203. Ng IO, Lee J MF, Srivastava G, Ng M. Expression of insulin-like growth factor II mRNA in hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol*. 1998;13:152–157.
204. Nikolić JA, Todorovic V, Bozić M, Tosić L, Bulajić M, Alempijević T, Nedić O, Masnikosa R. Serum insulin-like growth factor(IGF)-II is more closely associated with liver dysfunction than is IGF-I in patients with cirrhosis. *Clin Chim Acta*. 2000;294:169–177.
205. Nishiyama M, Wands JR. Cloning and increased expression of an insulin receptor substrate-1-like gene in human hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun*. 1992;183:280–285.
206. Noto H, Raskin P. Hepatitis C infection and diabetes. *J Diabetes Complications*. 2006;20:113–120.
207. Oberbauer AM. The regulation of IGF-1 gene transcription and splicing during development and aging. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2013;4:39. doi: 10.3389/fendo.2013.00039
208. Obrępańska-Stęplowska A, Durzyński Ł, Goździcka-Józefiak A. Insulin-like growth factor and interacting proteins. *Postepy Biochem*. 2005;51:69–79.
209. O'Dell SD, Day IN. Insulin-like growth factor II (IGF-II). *Int. J Biochem Cell Biol*. 1998;30:767–771.
210. Ohlsson C, Mohan S, Sjögren K, Tivesten A, Isgaard J, Isaksson O, Jansson JO, Svensson J. The role of liver-derived insulin-like growth factor-I. *Endocrine Rev*. 2009;30:494–535.

211. Ohtsuki T, Otsuki M, Murakami Y, Maekawa T, Yamamoto T, Akasaka K, Takeuchi S, Takahashi S. Organ-specific and age-dependent expression of insulin-like growth factor-I (IGF-I) mRNA variants: IGF-IA and IB mRNAs in the mouse. *Zool Sci.* 2005;22:1011–1021.
212. Okabe H, Satoh S, Kato T, Kitahara O, Yanagawa R, Yamaoka Y, Tsunoda T, Furukawa Y, Nakamura Y. Genome-wide analysis of gene expression in human hepatocellular carcinomas using cDNA microarray: identification of genes involved in viral carcinogenesis and tumor progression. *Cancer Res.* 2001;61:2129–2137.
213. Okan A, Comlekci A, Akpınar H, Okan I, Yesil S, Tankurt E, Simsek I. Serum concentration of insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding protein-3 in patients with chronic hepatitis. *Scand J Gastroenterol.* 2000;35:1212–1215.
214. O'Sullivan DC, Szeszak TA, Pell JM. Regulation of IGF-I mRNA by GH: putative functions for class 1 and 2 message. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2002;283:E251–258.
215. Panasiuk A, Adamek A, Mozer-Lisewska I, Tyczyno M, Halota W, Stańczak J, Berak H, Wawrzynowicz-Syczewska M, Boroń-Kaczmarek A, Łapiński WT, Piekarska A, Tomasiewicz K, Jabłkowski M, Kryczka W, Stępień P, Garlicki AM, Kozłowska J, Wiercińska-Drapała A, Zasik E, Mazur W, Dobracka B, Simon K, Ryżko J, Pawłowska J, Dierżanowska-Fangrat K, Januszkiewicz-Lewandowska D, Flisiak R. Występowanie genotypów HCV w Polsce. *Przew Lek.* 2012;supl.5:57.
216. 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.* 2002;277:39684–39695.
217. Pao CI, Zhu J, Robertson DG, Lin KM, Farmer PK, Begovic S, Wu G, Phillips LS. Transcriptional regulation of the rat insulin-like growth factor-I gene involves metabolism-dependent binding of nuclear proteins to a downstream region. *J Biol Chem.* 1995;270:24917–24923.
218. Park KJ, Choi SH, Koh MS, Kim DJ, Yie SW, Lee SY, Hwang SB. Hepatitis C virus core protein potentiates c-Jun N-terminal kinase activation through a signaling complex involving TRADD and TRAF2. *Virus Res.* 2001;74:89–98.
219. Peiró G, Adrover E, Sánchez-Tejada L, Lerma E, Planelles M, Sánchez-Payá J, Aranda FI, Giner D, Gutiérrez-Aviñó FJ. Increased insulin-growth factor-1 receptor mRNA expression predicts poor survival in immunophenotypes of early breast carcinoma. *Mod Pathol.* 2011;24:201–208.
220. Pell JM, Saunders JC, Gilmour RS. Differential regulation of transcription initiation from insulin-like growth factor-I (IGF-I) leader exons and of tissue IGF-I expression in response to changed growth hormone and nutritional status in sheep. *Endocrinology.* 1993;132:1797–1807.
221. Pfeffer LA, Brisson BK, Lei H, Barton ER. The insulin-like growth factor (IGF)-I E-peptides modulate cell entry of the mature IGF-I protein. *Mol Biol Cell.* 2009;20:3810–3817.

222. Philippou A, Armakolas A, Koutsilieris M. Evidence for the possible biological significance of the igf-1 gene alternative splicing in prostate cancer. *Frontiers in Endocrinology*. 2013;4:doi: 10.3389/fendo.2013.00031.
223. Philippou A, Armakolas A, Pantelakou Z, Pissimissis N, Nezos A, Theos A, Kaparelou M, Armakolas N, Pneumaticos SG, Koutsilieris M. IGF1Ec expression in MG-63 human osteoblast-like osteosarcoma cells. *Anticancer Res*. 2011;31:4259–4265.
224. Philippou A, Papageorgiou E, Bogdanis G, Halapas A, Sourla A, Maridaki M, Pissimissis N, Koutsilieris M. Expression of IGF-I isoforms after exercise-induced muscle damage in humans: characterization of the MGF E peptide actions in vitro. In vivo. 2009;23:567–575.
225. Platz EA, Pollak MN, Rimm EB, Majeed N, Tao Y, Willett WC, Giovannucci E. Racial variation in insulin-like growth factor-1 and binding protein-3 concentrations in middle-aged men. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prevent*. 1999;8:1107–1110.
226. Plöckinger U, Krüger D, Bergk A, Wiedenmann B, Berg T. Hepatitis-C patients have reduced growth hormone (GH) secretion which improves during long-term therapy with pegylated interferon-alpha. *Am J Gastroenterol*. 2007;102:2724–2731.
227. Pollak M. Insulin, insulin-like growth factors, insulin resistance, and neoplasia. *Am J Clin Nutr*. 2007;86(suppl):820S-822S.
228. Pollak M. Insulin and insulin-like growth factor signalling in neoplasia. *Nat Rev Cancer*. 2008;8:915–928.
229. Poynard T, Ngo Y, Munteanu M, Thabut D, Massard J, Moussalli J, Varaud A, Benhamou Y, Ratzu V. Biomarkers of liver injury for hepatitis clinical trials: a meta-analysis of longitudinal studies. *Antiviral Therapy*. 2010;15:617–631.
230. Price JA, Kovach SJ, Johnson T, Koniaris LG, Cahill PA, Sitzmann JV, McKillop IH. Insulin-like growth factor I is a comitogen for hepatocytes growth factor in a rat model of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2002;36:1089–1097.
231. Quesada A, Micevych P, Handforth A. C-terminal mechano growth factor protects dopamine neurons: a novel peptide that induces heme oxygenase-1. *Exp Neurol*. 2009;220:255–266.
232. Ranke MB, Maier KP, Schweizer R, Stadler B, Schleicher S, Elmlinger MW, Flehmig B. Pilot study of elevated levels of insulin-like growth factor-binding protein-2 as indicators of hepatocellular carcinoma. *Horm Res*. 2003;60:174–180.
233. Raslan HM, Elhosary Y, Ezzat WM, Rasheed EA, Rasheed MA. The potential role of insulin-like growth factor 1, insulin-like growth factor binding protein 3 and bone mineral density in patients with chronic hepatitis C virus in Cairo, Egypt. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2010;104:429–432.
234. Raslan HM, Ezzat WM, Ahmed MM, Rasheed EA. Insulin growth factor-1 and insulin growth factor binding protein-3 in Egyptian patients with chronic hepatitis C. *Arch Med Sci*. 2007;3:46–51.
235. Ray RB, Lagging LM, Meyer K, Steele R, Ray R. Transcriptional regulation of cellular and viral promoters by the hepatitis C virus core protein. *Virus Res*. 1995;37:209–220.

236. Rechler MM. Insulin-like growth factor binding proteins. *Vitam Horm.* 1993;47:1–114.
237. Rechler MM, Clemmons DR. Regulatory actions of insulin-like growth factor-binding proteins. *Trends Endocrinol Metabol.* 1998;9:176–183.
238. Rehem RNAMA, El-Shikh WAHM. Serum IGF-1, IGF-2 and IGFBP-3 as parameters in the assessment of liver dysfunction in patients with hepatic cirrhosis and in the diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology.* 2011;58:949–954.
239. Remmele W, Stegner HE. Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue. *Pathologe.* 1987;8:138–140.
240. Renehan AG, Zwahlen M, Minder C, O'Dwyer ST, Shalet SM, Egger M. Insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF binding protein-3, and cancer risk: systematic review and meta-regression analysis. *Lancet.* 2004;363:1346–1353.
241. Rinaldi S, Cleveland R, Norat T, i wsp. Serum levels of IGF-I, IGFBP-3 and colorectal cancer risk: results from EPIC cohort, plus a meta-analysis of prospective studies. *In J Cancer.* 2010;126:1702–1715.
242. Rinderknecht W, Humbel RE. Polypeptides with nonsuppressible insulin-like and cell-growth promoting activities in human serum: isolation, chemical characterization and some biological properties of forms I and II. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1976a;73:2365–2369.
243. Rinderknecht W, Humbel RE. Amino-terminal sequences of two polypeptides from human serum with nosuppressible insulin-like and cell-growth-promoting activities: evidence for structural homology with insulin B chain. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1976b;73:4379–4381.
244. Rinderknecht W, Humbel RE. The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *J Biol Chem.* 1978;253:2769–2776.
245. Rhoads RP, Greenwood PL, Bell AW, Boisclair YR. Organization and regulation of the gene encoding the sheep acid labile subunit of the 150 kDa-binding protein complex. *Endocrinology.* 2000;141:1425–1433.
246. Rojek A, Niedziela M. Receptor insuliny i jego związek z różnymi formami insulinooporności. *Post Biol Komórki.* 2009;36:617–648.
247. Rooman RP, De Beeck LO, Martin M, Van Doorn J, Mohan S, Du Caju MV. IGF-I, IGF-II, „free” IGF-I and IGF-binding proteins-2 to -6 during high-dose oestrogen treatment in constitutionally tall girls. *Eur J Endocrinol.* 2002;146:823–829.
248. Rosario P. Normal values of serum IGF-1 in adults: results from a Brazilian population. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2010;54:477–481.
249. Ross RJM, Chew SL, D'Souza Li L, Yatemam M, Rodriguez-Arno J, Gimson A, Holly J, Camacho-Hubner C. Expression of IGF-I and IGF-binding protein genes in cirrhotic liver. *J Endocrinol.* 1996;149:209–216.
250. Rotwein P. Two insulin-like growth factor I messenger RNAs are expressed in human liver. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1986;83:77–81.

251. Rotwein P. In: Rosenfeld R, Roberts CJ (eds). *Molecular biology of IGF-1 and IGF-2*. Humana Totowa NJ. 1999;pp 19–35.
252. Rotwein P, Pollock KM, Didier DK, Krivi GG. Organization and sequence of the human insulin-like growth factor I gene. Alternative RNA processing produces two insulin-like growth factor I precursor peptides. *J Biol Chem*. 1986;261:4828–4832.
253. Rowlands MA, Holly JM, Gunnell D, Donovan J, Lane JA, Hamdy F, Neal DE, Oliver S, Smith GD, Martin RM. Circulating insulin-like growth factors and IGF-binding proteins in PSA-detected prostate cancer, the large case-control study ProtecT. *Cancer Res*. 2012;72:503–515.
254. Sakai K, Clemmons DR. Glucosamine induces resistance to insulin-like growth factor I (IGF-I) and insulin in Hep G2 cell cultures: biological significance of IGF-I/insulin hybrid receptors. *Endocrinology*. 2003;144:2388–2395.
255. Salmon WD Jr, Daughaday W. A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage in vitro. *J Lab Clin Med*. 1957;49:825–836.
256. Samani AA, Yakar S, LeRoith D, Brodt P. The role of the IGF system in cancer growth and metastasis. *Endocrine Rev*. 2007;28:20–47.
257. Sandhu MS, Heald AH, Gibson JM, Cruickshank JK, Dunger BD, Wareham NJ. Circulating concentrations of insulin like growth factor-I and development of glucose intolerance: a prospective observational study. *Lancet*. 2002;359:1740–1745.
258. Santantonio T, Wiegand J, Gerlach JT. Acute hepatitis C: Current status and remaining challenges. *J Hepatol*. 2008;49:625–633.
259. Santolini E, Migliaccio G, La-Monica N. Biosynthesis and biochemical properties of the hepatitis C virus core protein. *J Virol*. 1994;68:3631–3641.
260. Scharf JG, Dombrowski F, Ramadori G. The IGF axis and hepatocarcinogenesis. *Mol Pathol*. 2001;54:138–144.
261. Scharf JG, Ramadori G, Braulke T, Hartmann H. Cellular localization and hormonal regulation of biosynthesis of insulin-like growth factor binding proteins and of the acid-labile subunit within rat liver. *Prog Growth Factor Res*. 1995;6:175–180.
262. Scharf JG, Schmidt-Sandte W, Pahernik SA, Ramadori G, Braulke T, Hartmann H. Characterization of the insulin-like growth factor axis in a human hepatoma cell line (PLC). *Carcinogenesis*. 1998;19:2121–2128.
263. Schedlich LJ, Le Page SL, Firth SM, Briggs LJ, Jans DA, Baxter RC. Nuclear import of insulin-like growth factor-binding protein-3 and -5 is mediated by the importin beta subunit. *J Biol Chem*. 2000;275:23462–23470.
264. Schindler C, Darnell J. Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway. *Ann Rev Biochem*. 1995;64:621–651.
265. Schneider HJ, Saller B, Klotsche J, Marz W, Erwa W, Wittchen HU, Stalla GK. Opposite associations of age-dependent insulin-like growth factor-I standard deviation stores with nutritional state in normal weight and obese subjects. *Eur J Endocrinol*. 2006;154:699–706.
266. Schneider MR, Wolf E, Hoeflich A, Lahm H. IGF-binding protein-5: flexible player in the IGF system and effector on its own. *J Endocrinol*. 2002;172:423–440.

267. Sedlaczek N, Hasilik A, Neuhaus P, Schuppan D, Herbst H. Focal overexpression of insulin-like growth factor 2 by hepatocytes and cholangiocytes in viral liver cirrhosis. *Br J Cancer*. 2003;88:733–739.
268. Seeff LB. Natural history of chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2002;36(Suppl): S35-S46.
269. Seeff LB, Hoofnagle JH. National Institutes of Health Consensus Development Conference: management of hepatitis C: 2002. *Hepatology*. 2002;36(Suppl):S1-S2.
270. Sepp-Lorenzino L. Structure and function of the insulin-like growth factor I receptor. *Breast Cancer Res Treat*. 1998;47:235–253.
271. Serrano ML, Sánchez-Gómez M, Bravo MM, Yakar S, LeRoith D. Differential expression of IGF-I and insulin receptors isoforms in HPV positive and negative human cervical cancer cell lines. *Horm Metab Res*. 2008;40:661–667.
272. Sesti G, Sciacqua A, Cardellini M, Marini MA, Maio R, Vatrano M, Succurro E, Lauro R, Federici M, Perticone F. Plasma concentration of IGF-I is independently associated with insulin sensitivity in subjects with different degrees of glucose tolerance. *Diabetes Care*. 2005;28:120–125.
273. Shang S, Plymoth A, Ge S, Feng Z, Rosen HR, Sangrajang S, Hainaut P, Marrero JA, Beretta L. Identification of osteopontin as a novel marker for early hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2012;55:483–490.
274. Shi ST, Polyak SJ, Tu H, Taylor DR, Gretch DR, Lai MM. Hepatitis C virus NS5A co-localizes with the core protein on lipid droplets and interacts with apolipoproteins. *Virology*. 2002;292:198–210.
275. Shimizu I, Inoue H, Yano M, Shinomiya H, Tsuji Y, Tsutsui A, Okamura S, Shibata H, Ito S. Estrogen receptor levels and lipid peroxidation in hepatocellular carcinoma with hepatitis C virus infection. *Liver*. 2001;21:342–349.
276. Shimizu I, Yasuda M, Mizobuchi Y, Ma YR, Liu F, Shiba M, Horie T, Ito S. Suppressive effect of oestradiol on chemical hepatocarcinogenesis in rats. *Gut*. 1998;42: 112–119.
277. Shimizu I. Impact of oestrogens on the progression of liver disease. *Liver Int*. 2003;1:63–69.
278. Shin Sy, Lee JR, Noh GW, Kim HJ, Kang WJ, Kim SH, Chung JK. Analysis of serum levels of anti-mullerian hormone, inhibin B, insulin-like growth factor-I, insulin-like growth factor binding protein-3, and follicle-stimulating hormone with respect to age and menopausal status. *J Korean Med Sci*. 2008;23:104–110.
279. 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*. 1999;152:125–136.
280. Siddle K. Signaling by insulin and IGF receptors: supporting acts and new players. *J Mol Endocrinol*. 2011;47:R1-R10.
281. Siegfried JM, Kasprzyk PG, Treston AM, Mulshine JL, Quinn KA, Cuttitta F. A mitogenic peptide amine encoded within the E peptide domain of the insulin-like growth factor IB prohormone. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992;89:8107–8111.

282. Silva IS, Ferraz ML, Perez RM, Lanzoni VP, Figueiredo VM, Silva AE. Role of gamma-glutamyl transferase activity in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Gastroenterol Hepatol*. 2004;19:314–318.
283. Simmonds P, Bukh J, Combet C, Deleage G, Enomoto N, Feinstone S, Halfon P, Inchauspe G, Kuiken C, Maettens G, Mizokami M, Murphy DG, Okamoto H, Pawlotsky JM, Penin F, Sablon E, Shin-I T, Stuyver LJ, Thiel HJ, Viazov S, Weiner AJ, Widell A. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology*. 2005;42:962–973.
284. Sohda T, Kamimura S, Iwata K, Shijo H, Okumura M. Immunohistochemical evidence of insulin-like growth factor II in human small hepatocellular carcinoma with hepatitis C virus infection: relationship to fatty change in carcinoma cells. *J Gastroenterol Hepatol*. 1997;12:224–228.
285. Soos MA, Siddle K. Immunological relationships between receptors for insulin and insulin-like growth factor I. Evidence for structural heterogeneity of insulin-like growth factor I receptors involving hybrids with IRs. *Biochem J*. 1989;263:553–563.
286. Soos MA, Whittaker J, Lammers R, Ullrich A, Siddle K. Receptors for insulin-like growth factor-I can form hybrid dimers. Characterisation of hybrid receptors in transfected cells. *Biochem J*. 1990;270:383–390.
287. Soubry A, Il'yasova D, Sedjo R, Wang F, Byers T, Rosen C, Yashin A, Ukraintseva S, Haffner S, D'Agostino R Jr. Increase in circulating levels of IGF-1 and IGF-1/IGFBP-3 molar ratio over a decade is associated with colorectal adenomatous polyps. *Int J Cancer*. 2012;131:512–517.
288. Stattin P, Rinaldi S, Biessy C, Stenman UH, Hallmans G, Kaaks R. High levels of circulating insulin-growth factor-I increase prostate cancer risk, a prospective study in a population-based non-screened cohort. *J Clin Oncol*. 2004;22:3104–3112.
289. Steele-Perkins G, Turner J, Edman JC, Hari J, Pierce SB, Stover C, Rutter WJ, Roth RA. Expression and characterization of functional human insulin-like growth factor I receptor. *J Biol Chem*. 1988;263:11486–11492.
290. Stefano JT, Corrêa-Giannella ML, Ribeiro CMF, Alves VAF, Massarollo PCB, Machado MCC, Giannella-Neto D. Increased hepatic expression of insulin-like growth factor-I receptor in chronic hepatitis C. *World J Gastroenterol*. 2006;12:3821–3828.
291. Stewart CEH, Rotwein P. Growth, differentiation, and survival: multiple physiological functions for insulin-like growth factors. *Physiol Rev*. 1996; 76:1005–1026.
292. Strader DB, Seeff LB. The natural history of chronic hepatitis C infection. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 1996;8:324–328.
293. Street A, Macdonald A, McCornick C, Harris M. Hepatitis C virus NS5A-mediated activation of phosphoinositide 3-kinase results in stabilization of cellular β -catenin and stimulation of β -catenin-responsive transcription. *J Virol*. 2005;79:5006–5016.
294. Stuver SO, Kuper H, Tzonou A, Lagion P, Spanos E, Hsieh CC, Mantzorosc C, Trichopoulos D. Insulin-like growth factor 1 in hepatocellular carcinoma and metastatic liver cancer in men. *Int J Cancer*. 2000;87:118–121.

295. Su TS, Liu WY, Han SH, Jansen M, Yang-Fen TL, P'eng FK, Chou CK. Transcripts of the insulin growth factors I and II in human hepatoma. *Cancer Res.* 1989;49:1773–1777.
296. Su WW, Lee KT, Yeh YT, Soon MS, Wang CL, Yu ML, Wang SN. Association of circulating insulin-like growth factor 1 with hepatocellular carcinoma: One cross-sectional correlation study. *J Clin Lab Anal.* 2010;24:195–200.
297. Sumida Y, Kanemasa K, Hara T, Inada Y, Sakai K, Imai S, Yoshida N, Yasiu K, Itoh Y, Okanoue T, Yoshikawa T. Impact of amino acid substitutions in hepatitis C virus genotype 1b core region on liver steatosis and glucose tolerance in noncirrhotic patients without overt diabetes. *J Gastroenterol Hepatol.* 2011;26:836–842.
298. Sun H, Chua MS, Yang D, Tsalenko A, Peter BJ, So S. Antibody arrays identify potential diagnostic markers of hepatocellular carcinoma. *Biomarker Insights.* 2008;3:1–18.
299. Suzuki R, Sakamoto S, Tsutsumi T, Rikimaru A, Tanaka K, Shimoike T, Moriishi K, Iwasaki T, Mizumoto K, Matsuura Y, Miyamura T, Suzuki T. Molecular determinants for subcellular localization of hepatitis C virus core protein. *J Virol.* 2005;79:1271–1281.
300. Szebenyi G, Rotwein P. Insulin-like growth factors and their receptors in muscle development. *Adv Exp Med Biol.* 1991;293:289–295.
301. Tan DSW, Cook A, Chew SL. Nucleolar localization of an isoform of the IGF-I precursor. *BMC Cell Biol.* 2002;3:17.
302. Tanaka S, Mohr L, Schmidt EV, Sugimachi K, Wands JR. Biological effects of human insulin receptor substrate-1 overexpression in hepatocytes. *Hepatology.* 1997;26:598–604.
303. Tanaka N, Nagaya T, Komatsu M, Horiouchi A, Tsuruta G, Shirakawa H, Umemura T, Ichijo T, Matsumoto A, Yoshizawa K, Aoyama T, Kiyosawa K, Tanaka E. Insulin resistance and hepatitis C virus: a case control study of non-obese, non-alcoholic and non-steatotic hepatitis virus carriers with persistently normal serum aminotransferase. *Liver Int.* 2008;28:1104–1111.
304. Tanaka K, Sakai H, Hashizume M, Hirohata T. Serum testosterone:estradiol ratio and the development of hepatocellular carcinoma among male cirrhotic patients. *Cancer Res.* 2000;60:5106–5110.
305. Tenoutasse S, Van Vliet G, Ledru E, Deal C. IGF-1 transcript levels in whole liver tissue, in freshly isolated hepatocytes, and in cultured hepatocytes from lean and obese Zucker rats. *Horm Res.* 2003;59:135–141.
306. Thimme R, Oldach D, Chang KM, Steiger C, Ray SC, Chisari FV. Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. *J Exp Med.* 2001;194:1395–1406.
307. Thompson Coon J, Rogers G, Hewson P, Wright D, Anderson R, Cramp M, Jackson S, Ryder S, Price A, Stein K. Surveillance of cirrhosis for hepatocellular carcinoma: systematic review and economic analysis. *Health Technol Assess.* 2007;11:1–206.
308. Tian XC, Chen MJ, Pantic AG, Yang TJ, Chen TT. Recombinant E-peptides of pro-IGF-I have mitogenic activity. *Endocrinology.* 1999;140:3387–3390.

309. Tobin G, Yee D, Brünner N, Rotwein P. A novel human insulin-like growth factor I messenger RNA is expressed in normal and tumor cells. *Mol Endocrinol.* 1990;4:1914–1920.
310. 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;361:172–178.
311. Tovar V, Alsinet C, Villanueva A, Hoshida Y, Chiang DY, Sole M, Thung S, Moyano S, Toffanin S, Minquez B, Cabellos L, Peix J, Schwartz M, Mazzaferro V, Bruix J, Llovet JM. IGF activation in a molecular subclass of hepatocellular carcinoma and pre-clinical efficacy of IGF-1R blockage. *J Hepatol.* 2010;52:550–559.
312. Tsai TF, Yauk YK, Chou CK, Ting LP, Chang C, Hu CP, Han SH, Su TS. Evidence of autocrine regulation in human hepatoma cell lines. *Biochem Biophys Res Commun.* 1988;153:39–45.
313. Twigg SM, Kiefer MC, Zapf J, Baxter RC. Insulin-like growth factor-binding protein 5 complexes with the acid-labile subunit. Role of the carboxyl-terminal domain. *J Biol Chem.* 1998;273:28791–28798.
314. Twigg SM, Baxter RC. Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein 5 forms an alternative ternary complex with IGFs and the acid-labile subunit. *J Biol Chem.* 1998;273:6074–6079.
315. Umayahara Y, Billiard J, Ji C, Centrella M, McCarthy TL, Rotwein P. CCAAT/enhancer-binding protein delta is a critical regulator of insulin-like growth factor-I gene transcription in osteoblasts. *J Biol Chem.* 1999;274:10609–10617.
316. Van Haeften TW, Twickler TB. Insulin-like growth factors and pancreas beta cells. *Eur J Clin Invest.* 2004;34:249–255.
317. Venook AP, Papandreou C, Furuse J, de Guevara LL. The incidence and epidemiology of hepatocellular carcinoma: a global and regional perspective. *Oncologist.* 2010;15(suppl 5):5–13.
318. Villanueva A, Chiang DY, Newell P, Peix J, Thung S, Alsinet C, Tovar V, Roayaie S, Minguez B, Sole M, Battiston C, Van Laarhoven S, Fiel MI, Di Feo A, Hoshida Y, Yea S, Toffanin S, Ramos A, Martignetti JA, Mazzaferro V, Bruix J, Waxman S, Schwartz M, Meyerson M, Friedman SL, Llovet JM. Pivotal role of mTOR signaling in hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology.* 2008;135:1972–1983.
319. Völzke H, Nauck M, Rettig R, Dörr M, Higham C, Brabant G, Wallaschofski H. Association between hepatic steatosis and serum IGF1 and IGFBP-3 levels in a population-based sample. *Eur J Endocrinol.* 2009;161:705–713.
320. 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;50:814–816.
321. Wang HS, Chard T. IGFs and IGF-binding proteins in the regulation of human ovarian and endometrial function. *J Endocrinol.* 1999;161:1–13.

322. Wang L, Wang X, Adamo ML. Two putative GATA motifs in the proximal exon 1 promoter of rat insulin-like growth factor I gene regulate basal promoter activity. *Endocrinology*. 2000;141:1118–1126.
323. Wang X, Yang Y, Adamo ML. Characterization of the rat insulin-like growth factor I gene promoters and identification of a minimal exon 2 promoter. *Endocrinology*. 1997;138:1528–1536.
324. Weber JD, Kuo ML, Bothner B, DiGiammarino EL, Kriwacki RW, Roussel MF, Sherr CJ. Cooperative signals governing ARF-mdm2 interaction and nucleolar localization of the complex. *Mol Cell Biol*. 2000;20:2517–2528.
325. Weber MM, Auernhammer CJ, Lee PD, Engelhardt D, Zachoval R. Insulin-like growth factors and insulin-like growth factor binding proteins in adult patients with severe liver disease before and after orthotopic liver transplantation. *Horm Res*. 2002;57:105–112.
326. Weich V, Herrmann E, Chung TL, Sarrazin C, Hinrichsen H, Buggisch P, Gerlach T, Klinker H, Spengler U, Bergk A, Zeuzem S, Berg T. The determination of GGT is the most reliable predictor of nonresponsiveness to interferon-alpha based therapy in HCV type-1 infection. *J Gastroenterol*. 2011;46:1427–1436.
327. Weng CJ, Hsieh YH, Tsai CM, Chu YH, Ueng KC, Liu YF, Yeh YH, Su SC, Chen YC, Chen MK, Yang SF. Relationship of insulin-like growth factors system gene polymorphisms with susceptibility and pathological development of hepatocellular carcinoma. *Ann Surg Oncol*. 2010;17:1808–1815.
328. West MB, Hanigan MH. γ -Glutamyl transpeptidase is a heavily N-glycosylated heterodimer in HepG2 cells. *Arch Biochem Biophys*. 2010;504:177–181.
329. White DL, Ratzliff V, El-Serag HB. Hepatitis C and risk of diabetes: a systematic review and meta-analysis. *J Hepatol*. 2008;49:831–844.
330. Wierstra I. Sp1: emerging roles – beyond constitutive activation of TATA-less house-keeping genes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;372:1–13.
331. Williams AC, Collard TJ, Perks CM, Newcomb P, Moorghen M, Holly JM, Paraskeva C. Increased p53-dependent apoptosis by the insulin-like growth factor binding protein IGFBP-3 in human colonic adenoma-derived cells. *Cancer Res*. 2000;60:22–27.
332. Woelfle J, Billiard P, Rotweien P. Acute control of insulin-like growth factor-I gene transcription by growth hormone by growth hormone through Stat5b. *J Biol Chem*. 2003;278:22696–22702.
333. Wojtacha A, Juszczak J. Retrospektywna ocena czynników ryzyka zakażenia wirusem wirusem zapalenia wątroby typu C u pacjentów z przewlekłym zapaleniem wątroby typu C na podstawie anonimowej ankiety. *Przew Lek*. 2003;9:90–95.
334. Wolk A, Mantzoros CS, Andersson SO, Bergström R, Signorello LB, Lagiou P, Adami HO, Trichopoulos D. Insulin-like growth factor I and prostate cancer risk: a population-based, case-control study. *J Natl Cancer Inst*. 1998;90:911–915.
335. Woodson K, Tangrea JA, Pollak M, Copeland TD, Taylor PR, Virtamo J, Albanes D. Serum insulin-like growth factor I, tumor marker or etiologic factor? A prospective study of prostate cancer among Finnish men. *Cancer Res*. 2003;63:3991–3994.

336. Wraight CJ, Lepie IJ, White PJ, Hibbs AR, Werther GA. Intranuclear localization of insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) during cell division in human keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 1998;111:239–242.
337. Wu JC, Daughaday WH, Lee SD, Hsiao TS, Chou CK, Lin HD, Tsai YT, Chiang BN. Radioimmunoassay of serum IGF-I and IGF-II in patients with chronic liver diseases and hepatocellular carcinoma with or without hypoglycemia. *J Lab Clin Med.* 1988;112:589–594.
338. Wu J, Zhu AX. Targeting insulin-like growth factor axis in hepatocellular carcinoma. *J Hematol Oncol.* 2011;4:30.
339. Wu Y, Yakar S, Zhao L, Henninghausen L, LeRoith D. Circulating insulin-like growth factor-I levels regulate colon cancer growth and metastasis. *Cancer Res.* 2002;62:1030–1035.
340. 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;10:2740–2743.
341. Yakar S, Liu JL, Stannard B, Butler A, Accili D, Sauer B, LeRoith D. Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor I. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999;96:7324–7329.
342. Yang H, Adamo ML, Koval AP, McGuinness MC, Ben-Hur H, Yang Y, LeRoith D, Roberts CT Jr. Alternative leader sequences in insulin-like growth factor I mRNAs modulate translational efficiency and encode multiple signal peptides. *Mol Endocrinol.* 1995;9:1380–1395.
343. Yang JD, Roberts LR. Hepatocellular carcinoma: a global view. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2010;7:448–458.
344. Yang S, Alnageeb M, Simpson H, Goldspink G. Cloning and characterization of an IGF-1 isoform expressed in skeletal muscle subjected to stretch. *J Muscle Res Cell Motil.* 1996;17:487–495.
345. Yasuda M, Shimizu I, Shiba M, Ito S. Suppressive effects of estradiol on dimethylnitrosamine-induced fibrosis of the liver in rats. *Hepatology.* 1999;29:719–727.
346. Yasui K, Wakita T, Tsukijama-Kohara K, Funahashi SI, Ichikawa M, Kajita T, Moradpour D, Wands JR, Kohara M. The native form and maturation process of hepatitis C virus core protein. *J Virol.* 1998;72:6048–6055.
347. Yu H, Mistry J, Nicar MJ, Khosravi MJ, Diamandis A, van Doorn J, Juul A. Insulin-like growth factors (IGF-I, free IGF-I, and IGF-II) and insulin-like growth factor binding proteins (IGFBP-2, IGFBP-3, IGFBP-6, and ALS) in blood circulation. *J Clin Lab Anal.* 1999;13:166–172.
348. Yu H, Rohan T. Role of the insulin-like growth factor family in cancer development and progression. *J Natl Cancer Inst.* 2000;92:1472–1489.
349. Yue L, Wang Y, Wang H, Gao H, Liang J, Sui A, Xiang J, Zhou F, Xu C, Zhao W, Liang W, Yao R. Inhibition of hepatocellular carcinoma cell growth by an anti-insulin-like growth factor-I receptor monoclonal antibody. *Oncol Rep.* 2012;28:1453–60.
350. Yumoto E, Nakatsukasa H, Hanafusa T, Yumoto Y, Nouse K, Matsumoto E, Onishi T, Takuma Y, Tanaka H, Fujikawa T, Suzuki M, Uemura M, Shiratori Y. IGFBP-3

- expression in hepatocellular carcinoma involves abnormalities in TGF-beta and/or Rb signaling pathways. *Int J Oncol.* 2005;27:1223–1230.
351. Zarrilli R, Bruni CB, Riccio A. Multiple levels of control of insulin-like growth factor gene expression. *Mol Cell Endocrinol.* 1994;101:R1-R14.
352. Zhang J, Whitehead RE Jr, Underwood LE. Effect of fasting on insulin-like growth factor (IGF)-IA and IGF-IB messenger ribonucleic acids and prehormones in rat liver. *Endocrinology.* 1997;138:3112–3118.
353. Zhang L, Kashanchi F, Zhan Q, Zhan S, Brady JN, Fornace AJ, Seth P, Helman LJ. Regulation of insulin like growth factor II P3 promoter by p53: a potential mechanism for tumorigenesis. *Cancer Res.* 1996;56:1367–1373.
354. Zhang YC, Wang XP, Zhang LY, Song AL, Kuo ZM, Li XS. Effect of blocking IGF-I receptor on growth of human hepatocellular carcinoma cells. *World J Gastroenterol.* 2006;12:3977–3982.
355. Zhu JL, Pao CI, Hunter E Jr, Lin KW, Wu GJ, Phillips LS. Identification of core sequences involved in metabolism-dependent nuclear protein binding to the rat insulin-like growth factor I gene. *Endocrinology.* 1999;140:4761–4771.
356. Zhu J, Jiang F, Ni HB, Xiao MB, Chen BY, Ni WK, Lu CH, Ni RZ. Combined analysis of serum γ -glutamyl transferase isoenzyme II, α -fucosidase and α -fetoprotein detected using commercial kit in the diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Exp Ther Med.* 2013;5:89–94.

10. Aneks

Charakterystyka kliniczna badanych chorych z podziałem na podgrupy oraz kontroli surowiczej i tkankowej wraz z zakresem wykonywanych badań w każdym przypadku

Lp.	Pacjent	Wiek	Płeć	Grupa	Podgrupa badana	Badania biochemiczne	Badania ELISA				Badania ekspresji tkankowej					Badania molekularne	
							IGF-1	IGF-1R	IGFBP-3	IGFBP-6	IGF-1	IGF-1R	IGFBP-3	Białko C	NS3		NS5
1	P1	56	k	HCV	A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	P2	30	m	HCV	A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	P3	23	k	HCV	A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	P4	30	k	HCV	A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	P5	43	m	HCV	A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	P6	41	m	HCV	A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	P7	51	m	HCV	A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	P8	30	k	HCV	A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	P9	32	m	HCV	A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	P10	55	k	HCV	A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11	P11	19	k	HCV	A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12	P12	23	m	HCV	A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13	P13	28	k	HCV	A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
14	P14	52	k	HCV	A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15	P15	36	m	HCV	A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
16	P16	49	k	HCV	A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
17	P17	26	k	HCV	A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
18	P18	63	k	HCV	A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
19	P19	19	m	HCV	A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
20	P20	55	m	HCV	A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

149	P149	84	k	HCV	C	+	+	+	+	+	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
150	P150	53	m	HCV	C	+	+	+	+	+	+	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
151	K1	40	k	K sur		+	+	+	+	+	+	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
151	K2	36	k	K sur		+	+	+	+	+	+	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
153	K3	37	k	K sur		+	+	+	+	+	+	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
154	K4	32	k	K sur		+	+	+	+	+	+	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
155	K5	32	k	K sur		+	+	+	+	+	+	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
156	K6	36	k	K sur		+	+	+	+	+	+	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
157	K7	19	m	K sur		+	+	+	+	+	+	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
158	K8	33	m	K sur		+	+	+	+	+	+	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
159	K9	34	m	K sur		+	+	+	+	+	+	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
160	K10	24	m	K sur		+	+	+	+	+	+	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
161	K11	30	m	K sur		+	+	+	+	+	+	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
162	K12	49	m	K sur		+	+	+	+	+	+	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
163	K13	46	m	K sur		+	+	+	+	+	+	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
164	K14	29	m	K sur		+	+	+	+	+	+	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
165	K15	31	m	K sur		+	+	+	+	+	+	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
166	K16	36	m	K sur		+	+	+	+	nb	+	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
167	K17	19	m	K sur		+	+	+	+	nb	+	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
168	K18	51	m	K sur		+	+	+	+	nb	+	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
169	K19	24	m	K sur		+	+	+	+	nb	+	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
170	K20	32	m	K sur		+	+	+	+	nb	+	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
171	K21	37	m	K sur		+	+	+	+	nb	+	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
172	K22	34	m	K sur		+	+	+	+	nb	+	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
173	K23	27	m	K sur		+	+	+	+	nb	+	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
174	K24	49	m	K sur		+	+	+	+	nb	+	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
175	K25	21	m	K sur		+	+	+	+	nb	+	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
176	K26	39	m	K sur		+	+	+	+	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
177	K27	30	m	K sur		+	+	+	+	nb	+	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
178	K28	22	m	K sur		+	+	+	+	nb	+	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
179	K29	28	m	K sur		+	+	+	+	nb	+	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
180	K30	31	m	K sur.		+	+	+	+	nb	+	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb

245	M49	35	m	HCC		nb	nb	nb	nb	nb	+	+	+	nb	nb	nb	nb	nb
246	M50	98	k	HCC		nb	nb	nb	nb	nb	+	+	+	nb	nb	nb	nb	nb
247	M51	69	k	HCC		nb	nb	nb	nb	nb	+	+	+	nb	nb	nb	nb	nb
248	M52	58	m	HCC		nb	nb	nb	nb	nb	+	+	+	nb	nb	nb	nb	nb
249	M53	62	m	HCC		nb	nb	nb	nb	nb	+	+	+	nb	nb	nb	nb	nb
250	M54	53	m	HCC		nb	nb	nb	nb	nb	+	+	+	nb	nb	nb	nb	nb
251	M55	47	m	HCC		nb	nb	nb	nb	nb	+	+	+	nb	nb	nb	nb	nb
252	M56	55	m	HCC		nb	nb	nb	nb	nb	+	+	+	nb	nb	nb	nb	nb
253	M57	57	m	HCC		nb	nb	nb	nb	nb	+	+	+	nb	nb	nb	nb	nb
254	O1	31	m	HCC		nb	nb	nb	nb	nb	+	+	+	nb	nb	nb	nb	nb
255	O2	75	m	HCC		nb	nb	nb	nb	nb	+	+	nb	nb	nb	nb	nb	nb
256	O3	31	k	HCC		nb	nb	nb	nb	nb	+	nb	+	nb	nb	nb	nb	nb
257	O4	20	m	HCC		nb	nb	nb	nb	nb	+	+	+	nb	nb	nb	nb	nb

Objaśnienia: k – kobieta; m – mężczyzna; HCV – grupa zakażonych HCV; Ksur – kontrola surowicza; Ktk. – kontrola tkankowa negatywna; HCC – kontrola tkankowa pozytywna; + – badanie wykonane; nb – nie badano; * – zbyt mało materiału do badania lub materiał zdyskwalifikowany z przyczyn technicznych.

