

Katedra i Klinika Endokrynologii, Diabetologii i Leczenia Izotopami



**UNIwersytet Medyczny**  
IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

Beata Polowczyk-Kawałko

**Ocena stężenia rozpuszczalnego delta-podobnego  
homologu typu 1 (sDlk-1) u pacjentów z akromegalią.**

Rozprawa na stopień doktora w dziedzinie nauk medycznych

Promotor:

**Prof. dr hab. n. med. Marek Bolanowski**

Wrocław 2023

*Składam serdeczne podziękowania mojemu Promotorowi, Panu Profesorowi Markowi Bolanowskiemu za życzliwość, wszechstronne wsparcie, nieograniczone pokłady cierpliwości i cenne uwagi podczas realizowania pracy doktorskiej.*

*Pragnę również podziękować kolegom i koleżankom z Klinik Endokrynologii, Diabetologii i Leczenia Izotopami we Wrocławiu, w szczególności dr n. med. Marcinowi Kałużnemu, dr n.med. Magdalenie Stefanowicz-Rutkowskiej oraz dr n.med. Joannie Syryckiej za bezinteresowną pomoc i życzliwość.*

*Dziękuję moim Rodzicom.*

*Pracę dedykuję mojemu mężowi Wiktorowi*

## Wykaz skrótów stosowanych w pracy

ADAM17	dezintegryna i metaloproteaza 17 (z ang. a disintegrin and metalloprotease 17)
Apo I	apolipoproteina I
Apo E	apolipoproteina E
BAT	brązowa tkanka tłuszczowa (z ang. Brown Adipose Tissue)
BMI	wskaźnik masy ciała (z ang. Body Mass Index)
DIO-3	dejodynaza jodotyroniny typu III (z ang. type III Iodothyronine deiodinase)
DLK-1	delta podobny homolog typu pierwszego
sDLK-1	rozpuszczalny delta podobny homolog typu pierwszego
DXA	dwuwiązkowa absorpcjometria rentgenowska (z ang. dual-Energy x-ray absorptiometry)
FM	masa tłuszczowa (z ang. Fat Mass)
%FAT	procentowa zawartość tkanki tłuszczowej
HDL	lipoproteina wysokiej gęstości (z ang. High Density Lipoprotein)
HDL-c	cholesterol HDL
HOMA-IR	wskaźnik HOMA (z ang. Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance)
EGF	naskórkowy czynnik wzrostu (z ang. Epidermal Growth Factor)
FA1	antygen płodowy typu pierwszego (z ang. Fetal Antigen 1)
FFA	wolne kwasy tłuszczowe (z ang. Free Fatty Acids)
GH	hormon wzrostu (z ang. Growth Hormone)
GHBP	białko wiążące hormon wzrostu (z ang. Growth Hormone Binding Protein)
GHD	niedobór hormonu wzrostu (z ang. Growth Hormone Deficiency)
GHR	receptor dla hormonu wzrostu (z ang. Growth Hormone Receptor)
GHRH	somatoliberyna, hormon uwalniający hormon wzrostu (z ang. Growth Hormone Releasing Hormone)
GLUT	białko transportujące glukozę (z ang. glucose transporters)
HSL	lipaza hormonowrażliwa (z ang. hormone-sensitive lipase)
IFG	nieprawidłowa glukoza na czczo (z ang. Impaired Fasting Glucose)
IGF-1	insulinopodobny czynnik wzrostu 1 (z ang. Insulin-like Growth Factor 1)
IGT	nieprawidłowa tolerancja glukozy (z ang. Impaired Glucose Tolerance)
IMAT	śródmięśniowa tkanka tłuszczowa (z ang. Intramuscular Adipose Tissue)
LDL	lipoproteina niskiej gęstości (z ang. Low Density Lipoprotein)
LDL-c	cholesterol LDL

LM	beztłuszczowa masa ciała (z ang. Lean Mass)
Lp A	lipoproteina A
MR	badanie tomografii rezonansu magnetycznego (z ang. Magnetic Resonance)
NOTCH	receptor szlaku sygnałowego NOTCH (z ang. Neurogenic Locus Notch Homolog Protein)
OGTT	doustny test obciążenia glukozą (z ang. Oral Glucose Tolerance Test)
PET/CT	pozytonowa tomografia emisyjna/ tomografia komputerowa (z ang. Positron Emission Tomography Scan/ a Computed Tomography Scan)
PPAR	receptory aktywowane przez proliferatory peroksysomów (z ang. Peroxisome Proliferator Activated Receptors)
RNA	kwas rybonukleinowy (z ang. Ribonucleic Acid)
mRNA	matrycowe RNA (z ang. messenger RNA)
SSA	analogi somatostatyny (z ang. Somatostatin Analogs)
SSTR	receptor somatostatyny (z ang. Somatostatin Receptor)
TACE	enzym konwertujący czynnik martwicy nowotworu alfa (z ang. Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ -Converting Enzyme)
TC	cholesterol całkowity (z ang. Total Cholesterol)
TG	trójglicerydy
TK	badanie tomografii komputerowej
UCP-1	termogenina- białko rozprzegające (z ang. Uncoupling Protein 1)
WAT	biała tkanka tłuszczowa (z ang. White Adipose Tissue)
WHO	Światowa Organizacja Zdrowia (z ang. World Health Organisation)
VAT	trzewna tkanka tłuszczowa (z ang. Visceral Adipose Tissue)

## Wykaz tabel i rycin

Rycina 1. Powikłania metaboliczne w akromegalii.....	13
Rycina 2. Powikłania sercowo-naczyniowe w akromegalii. ....	14
Rycina 3. Powikłania narządowe w akromegalii.....	15
Rycina 4. Choroby współistniejące w grupie badanej.....	29
Rycina 5. Choroby współistniejące w grupie kontrolnej.....	30
Rycina 6. Porównanie stężenia sDlk-1 u pacjentów z cukrzycą w grupie badanej i grupie kontrolnej.	38
Rycina 7. Porównanie stężenia sDlk-1 u pacjentów z hipercholesterolemią w grupie badanej i grupie kontrolnej. ....	40
Rycina 8. Porównanie stężenia sDlk-1 u pacjentów z otyłością w grupie badanej i grupie kontrolnej.	42
Rycina 9. Analiza korelacji pomiędzy stężeniem sDlk-1 a % tkanki tłuszczowej w grupie badanej. ..	44
Rycina 10. Analiza korelacji pomiędzy stężeniem sDlk-1 a % tkanki tłuszczowej w grupie kontrolnej. ....	46
Rycina 11. Analiza korelacji pomiędzy stężeniem sDlk-1 a masą tkanki tłuszczowej w grupie kontrolnej. ....	47
Tabela 1 Charakterystyka obu badanych grup (N=122).....	28
Tabela 2. Choroby współistniejące w grupie badanej (N=83) i grupie kontrolnej (N=39).....	29
Tabela 3. Charakterystyka grupy z aktywną akromegalią (N=16).....	31
Tabela 4. Charakterystyka grupy kontrolowanej analogami somatostatyny (N=46). ....	32
Tabela 5. Charakterystyka grupy z akromegalią kontrolowaną po zabiegu operacyjnym (N=21). ....	32
Tabela 6. Porównanie sDlk-1 w grupie badanej i grupie kontrolnej. ....	36
Tabela 7. Porównanie stężenia sDlk-1 u pacjentów z akromegalią na różnych etapach choroby.....	36
Tabela 8. Stężenia sDlk-1 u pacjentów z akromegalią stosujących analogi somatostatyny w porównaniu do pacjentów nie stosujących tego leczenia (N=83). ....	37
Tabela 9. Stężenie sDlk-1 u pacjentów z cukrzycą. ....	37
Tabela 10. Stężenie sDlk-1 u pacjentów w stanie przedcukrzycowym. ....	38
Tabela 11. Stężenie sDlk-1 u pacjentów z insulinoopornością. ....	39
Tabela 12. Stężenie sDlk-1 u pacjentów z hipercholesterolemią. ....	39
Tabela 13. Stężenie sDlk-1 u pacjentów z dyslipidemią aterogenną. ....	40
Tabela 14. Stężenie sDlk-1 u pacjentów z nadwagą. ....	41
Tabela 15. Stężenie sDlk-1 u pacjentów z otyłością. ....	41
Tabela 16. Analiza korelacji pomiędzy stężeniem sDlk-1 w grupie badanej (N=83).....	43
Tabela 17. Analiza korelacji pomiędzy stężeniem sDlk-1 w grupie kontrolnej (N=39).....	45

## Spis treści

Wykaz skrótów stosowanych w pracy .....	4
Wykaz tabel i rycin .....	6
<b>1. Wstęp.....</b>	<b>9</b>
<b>1.1 Akromegalia .....</b>	<b>9</b>
<b>1.2. Charakterystyka hormonu wzrostu i insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 .....</b>	<b>9</b>
<b>1.3. Fizjologiczne działanie hormonu wzrostu na tkanki.....</b>	<b>11</b>
<b>1.4. Zaburzenia w akromegalii .....</b>	<b>12</b>
<b>1.5. Analogi somatostatyny .....</b>	<b>15</b>
<b>1.6. Tkanka tłuszczowa .....</b>	<b>16</b>
<b>1.6.1. Biała tkanka tłuszczowa .....</b>	<b>16</b>
<b>1.6.2. Brunatna tkanka tłuszczowa.....</b>	<b>17</b>
<b>1.6.3. Metabolizm tkanki tłuszczowej a hormon wzrostu .....</b>	<b>17</b>
<b>1.6.4. Biała tkanka tłuszczowa a hormon wzrostu .....</b>	<b>19</b>
<b>1.6.5. Tkanka tłuszczowa brunatna a hormon wzrostu.....</b>	<b>20</b>
<b>1.7. Delta-podobny homolog typu 1 (Dlk-1) oraz rozpuszczalna forma delta-podobnego homologue typu 1 (sDlk-1) .....</b>	<b>21</b>
<b>1.7.1. Struktura Dlk-1 .....</b>	<b>21</b>
<b>1.7.2. Znaczenie biologiczne Dlk-1.....</b>	<b>22</b>
<b>1.7.3. Wpływ Dlk-1 na tkankę tłuszczową .....</b>	<b>23</b>
<b>1.7.4. Czynniki wpływające na stężenie sDlk-1 .....</b>	<b>24</b>
<b>1.7.5. Dlk-1 w aspekcie nowotworów.....</b>	<b>25</b>
<b>1.7.6. Tkanka tłuszczowa a Dlk-1 .....</b>	<b>26</b>
<b>2. Założenia i cele pracy.....</b>	<b>27</b>
<b>3. Materiał i metody .....</b>	<b>28</b>
<b>3.1. Materiał .....</b>	<b>28</b>
<b>3.1.1. Charakterystyka grupy z akromegalią .....</b>	<b>30</b>
<b>3.2. Metody .....</b>	<b>34</b>
<b>3.2.1. Pomiary antropometryczne.....</b>	<b>34</b>
<b>3.2.2. Oznaczenia laboratoryjne .....</b>	<b>34</b>
<b>3.3. Analiza statystyczna .....</b>	<b>35</b>
<b>4. Wyniki.....</b>	<b>36</b>
<b>4.1. Stężenie sDlk-1 w grupie badanej i grupie kontrolnej.....</b>	<b>36</b>
<b>4.2. Stężenie sDlk-1 w grupach z akromegalią na różnych etapach aktywności choroby.....</b>	<b>36</b>

<b>4.3. Stężenie sDlk-1 w grupie pacjentów z akromegalią stosujących analogi somatostatyny w porównaniu do grupy nie stosującej takiego leczenia.....</b>	<b>37</b>
<b>4.4. Porównanie pacjentów w grupie badanej i grupie kontrolnej w zależności od istniejących zaburzeń towarzyszących. ....</b>	<b>37</b>
4.4.1. Cukrzyca .....	37
4.4.2. Stan przedcukrzycowy.....	38
4.4.3. Insulinooporność .....	39
4.4.4. Hipercholesterolemia .....	39
4.4.5. Dyslipidemia aterogenna .....	40
4.4.6. Nadwaga.....	41
4.4.7. Otyłość.....	41
<b>4.5. Analiza korelacji.....</b>	<b>43</b>
4.5.1. Analiza korelacji pomiędzy stężeniem sDlk-1 a wybranymi parametrami w grupie badanej.....	43
4.5.2. Analiza korelacji pomiędzy stężeniem sDlk-1 a wybranymi parametrami w grupie kontrolnej .....	45
<b>5. Dyskusja.....</b>	<b>48</b>
5.1. Stężenie sDlk-1 w całej grupie pacjentów z akromegalią .....	48
5.2. Stężenie sDlk-1 w poszczególnych podgrupach pacjentów z akromegalią.....	50
5.2.1. Stężenie sDlk-1 u pacjentów z akromegalią, którzy byli leczeni analogami somatostatyny .....	51
5.2.2. Stężenie sDlk-1 u pacjentów z zaburzeniami gospodarki węglowodanowej (pacjenci z cukrzycą, stanem przedcukrzycowym) w grupie badanej w porównaniu do grupy kontrolnej .....	52
5.2.3. Stężenie sDlk-1 u pacjentów z zaburzeniami gospodarki lipidowej (hipercholesterolemia, dyslipidemia aterogenna) w grupie badanej w porównaniu do grupy kontrolnej .....	54
5.2.4. Stężenie sDlk-1 u pacjentów z zaburzeniami masy ciała (nadwaga, otyłość) u pacjentów w grupie badanej w porównaniu do grupy kontrolnej .....	56
5.3. Ograniczenia badania.....	60
<b>6. Wnioski .....</b>	<b>61</b>
<b>7. Streszczenie.....</b>	<b>62</b>
<b>8. Summary.....</b>	<b>64</b>
<b>9. Piśmiennictwo.....</b>	<b>66</b>



# 1. Wstęp

## 1.1 Akromegalia

Akromegalia jest rzadką chorobą ogólnoustrojową związaną z nadmiernym wydzielaniem hormonu wzrostu (GH) po zakończeniu okresu wzrastania [1]. Choć choroba znana jest od czasów antycznych, termin ten po raz pierwszy został użyty przez francuskiego neurologa Pierre Marie w 1886 roku. Opracowany pod koniec XIX wieku opis przypadku pacjenta z akromegalią stanowił jedno z pionierskich osiągnięć rodzącej się w tym okresie endokrynologii [2].

Aktualnie szacuje się, że akromegalia występuje z częstością około 70 przypadków na 1 milion mieszkańców. Rocznie stwierdza się od 3 do 4 nowych zachorowań na 1 milion, z podobną częstością u obu płci [3]. Dominującym źródłem nadmiaru hormonu wzrostu są gruczolaki przysadki autonomicznie wydzielające GH (> 95%). Sporadycznie (< 5%) przyczyną choroby mogą być syntezujące GHRH (somatoliberynę) guzy neuroendokryjne (przeważnie płuc lub trzustki), w wyjątkowych przypadkach - nowotwory neuroendokryjne produkujące GH [4].

Aby lepiej zrozumieć patologiczny wpływ nadmiernej sekrecji hormonu wzrostu na tkanki organizmu, warto prześledzić jego działanie w stanie fizjologii. Hormon wzrostu jest bowiem kluczowym regulatorem metabolizmu tłuszczów, węglowodanów oraz białek i ma znaczący wpływ na skład masy ciała.

## 1.2. Charakterystyka hormonu wzrostu i insulinopodobnego czynnika wzrostu-1

Pierwsze publikacje dotyczące wpływu hormonu wzrostu na metabolizm tkankowy ukazały się w latach pięćdziesiątych XX wieku [5]. Od tego czasu nasza wiedza na temat fizjologii GH oraz jego mediatora – insulinopodobnego czynnika wzrostu 1 (IGF-1) jest dużo lepiej usystematyzowana.

Hormon wzrostu (GH), nazywany również somatotropiną, jest polipeptydem zbudowanym z 191 reszt aminokwasowych, syntezowanym w obrębie komórek somatotropowych przedniego płata przysadki. Pulsacyjna sekrecja hormonu wzrostu

uwarunkowana jest dwoma czynnikami podwzgórzowymi. GHRH (hormon uwalniający hormon wzrostu) to podstawowy bodziec stymulujący wydzielanie GH, podczas gdy somatostatyna działa antagonistycznie hamując jego wydzielanie [6]. Ghrelina stanowi trzeci element tego układu wykazujący wyraźny wpływ stymulujący sekrecję GH. Jest to hormon, którego głównym źródłem jest przewód pokarmowy, choć fizjologicznie odnajdziemy ją również w podwzgórzu [7]. Pomędzy wydzielaniem wszystkich wyżej wymienionych hormonów istnieje pętla ujemnego sprzężenia zwrotnego [8].

W krążeniu systemowym GH występuje albo w formie wolnej, albo związanej z białkiem wiążącym hormon wzrostu (GHBP). Jest ono rozpuszczalnym polipeptydem, który u ludzi powstaje w wyniku proteolitycznego rozszczepienia zewnątrzkomórkowej domeny receptora hormonu wzrostu związanego z błoną komórkową (jest więc skróconą formą receptora dla hormonu wzrostu). Białko wiążące hormon wzrostu zachowuje zdolność sprzęgania GH z wysokim powinowactwem. Chroni GH przed przedwczesnym rozkładem i ma potencjał modulowania różnorodnych jego działań albo poprzez wydłużenie okresu półtrwania hormonu w krążeniu (sekwestracja GH z dala od jego receptora komórkowego), albo poprzez potencjalną dimeryzację z receptorem pełnej długości, działając jako dominujący-negatywny regulator sygnalizacji receptora [9]. Wysunięto hipotezę, że enzym konwertujący czynnik martwicy nowotworu- $\alpha$  (TACE/ADAM-17), który jest transbłonową metaloproteazą, odpowiada za proteolizę domeny zewnątrzkomórkowej receptora dla hormonu wzrostu (GHR) [10].

Hormon wzrostu działa na tkanki bezpośrednio, jak i za pośrednictwem IGF-1, który jest mediatorem anabolicznej i mitogennej aktywności GH. GH indukuje wytwarzanie IGF-1 w wątrobie (około 75-80% IGF-1) i reguluje parakrynną produkcję IGF-1 w wielu innych tkankach obwodowych. Przypuszcza się, że IGF-1 może również działać autokrynnie jako onkogen [11].

IGF-1 należy do rodziny insulinopodobnych czynników wzrostu i swoją nazwę zawdzięcza bliskiej homologii strukturalnej do proinsuliny - prekursorowej postaci insuliny (po raz pierwszy został wyizolowany z ludzkiej surowicy w 1976 r. przez Rinderknechta i Humbela) [12]. IGF-1 jest polipeptydem składającym się z 70 aminokwasów i poprzez strukturalne podobieństwo do insuliny zachowuje możliwość wiązania się (z niskim powinowactwem) z receptorem insulinowym [13].

W krążeniu jak i w tkankach obwodowych występuje w kompleksie z białkiem wiążącym IGF (IGFBP), te powiązania modułują jego biodostępność. U człowieka prawie 80% krążącego IGF-1 jest przenoszone przez IGFBP-3, trójskładnikowy kompleks składający się z jednej cząsteczki IGF-1, jednej cząsteczki IGFBP-3 i jednej cząsteczki białka zwanego podjednostką nietrwałą w kwasie. Jego stężenie jest regulowany głównie przez GH, ale także w pewnym stopniu przez IGF-1. Pomiędzy sekrecją GH jak i IGF-1 istnieje pętla sprzężenia zwrotnego [14].

IGF-1 nie jest produkowany pulsacyjnie, jego stężenie zależy od podstawowego, średniego, dobowego wydzielania GH. Biorąc dodatkowo pod uwagę długi okres półtrwania IGF-1, czyni to IGF-1 dobrym parametrem oceniającym aktywność somatotropową przysadki [15].

### **1.3. Fizjologiczne działanie hormonu wzrostu na tkanki**

Sekrecja hormonu wzrostu jest ściśle regulowana za pośrednictwem mechanizmów sprzężenia zwrotnego w odpowiedzi na stres, ćwiczenia, odżywianie oraz sen [16].

Jak już wspomniano wcześniej GH charakteryzują dwa mechanizmy działania. Bezpośrednio GH wiąże się z komórkami docelowymi i w ten sposób stymuluje odpowiedź lub GH działa pośrednio stymulując sekrecję insulinopodobnego czynnika wzrostu. Oba czynniki mają wpływ na rozwój i metabolizm tkanek obwodowych. Całokształt funkcji osi somatotropowej charakteryzuje więc połączony efekt działania GH jak i IGF-1.

W większości przypadków wynikiem wpływu GH na tkanki i narządy jest ich wzrost. Dobrym przykładem jest tu rozwój chrząstek i kości szczególnie widoczny u osób w wieku młodzieńczym. Aktywacja szlaków sygnałowych prowadzi do zwiększonego metabolizmu oraz replikacji i podziałów komórkowych, a także hamowania apoptozy, co przedłuża żywotność komórek. Najogólniej rzecz ujmując, komórki wchodzą w stan anabolizmu. Następuje zwiększony pobór aminokwasów, zintensyfikowana synteza białek i ich zmniejszony katabolizm. Źródłem energii do przemian metabolicznych stają się wolne kwasy tłuszczowe uzyskiwane w procesie lipolizy stymulowanej przez GH. GH hamuje dodatkowo zdolność insuliny do wychwytu glukozy w tkankach obwodowych i powoduje zwiększenie tempa glukoneogenezy w wątrobie, co prowadzi do ogólnego stanu hiperglikemii. Rezultatem netto wszystkich wymienionych procesów jest pobudzenie wzrostu tkanki i stworzenie środowiska hiperglikemicznego organizmu [17].

## 1.4. Zaburzenia w akromegalii

Podstawą rozpoznania czynnej akromegalii jest stwierdzenie autonomicznego- nie podlegającego sprzężeniu zwrotnemu- wydzielania hormonu wzrostu (GH) z jednoczesnym podwyższonym stężeniem IGF-1 (odpowiednio dla płci i wieku), którym towarzyszą objawy kliniczne. Warunkiem rozpoznania akromegalii, jest wystąpienie tych zaburzeń po zakończeniu procesu wzrastania [18].

Następstwem niekontrolowanego wydzielania GH jest zwiększenie syntezy IGF-1 w wątrobie oraz tkankach obwodowych, co wzmaga procesy anaboliczne i stymuluje podziały komórkowe w przypadku większości tkanek organizmu. Długotrwała ekspozycja na nadmiar tych hormonów powoduje zmiany strukturalne większości tkanek, redystrybucją tkanki tłuszczowej i lipolizę, zatrzymywaniem w organizmie sodu oraz wody. Suma tych efektów wpływa na zmianą składu ciała i wzrost beztłuszczowej masy ciała [19]

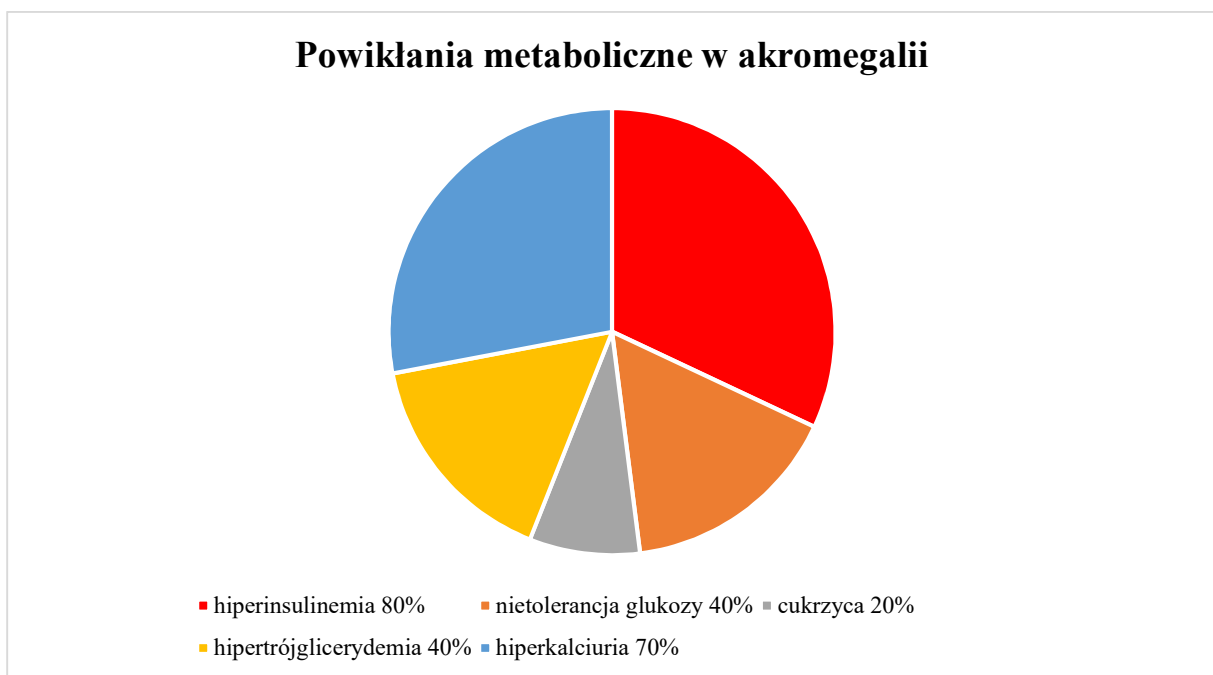
Nadmiar hormonu wzrostu prowadzi do zmiany wyglądu zewnętrznego. Pacjenci obserwują pogrubienie rysów twarzy, rozrost tkanek miękkich z ich obrzmieniem, powiększenie twarzoczaszki oraz rąk i stóp, a także powiększenie narządów wewnętrznych. Anaboliczny efekt hormonu wzrostu na większość tkanek prowadzi do ich hipertrofii i rozwoju powikłań narządowych oraz układowych [20].

Jedyny wyjątek stanowi w akromegalii tkanka tłuszczowa, na którą hormon wzrostu działa bezpośrednio katabolicznie dostarczając źródeł energii do wzrostu pozostałym tkankom- proces ten zostanie dokładnie opisany niżej. Charakterystyczna dla akromegalii redystrybucja tkanki tłuszczowej, stanowi nietypowy i ciekawy model w porównaniu do wzorca populacyjnego. Niektóre badania wykazały, że pacjenci z czynną akromegalią mają niższy odsetek trzewnej i podskórnej tkanki tłuszczowej, ze zwiększonym ektopowym rozmieszczeniem tkanki tłuszczowej między włóknami mięśniowymi, co wiąże się z większą beztłuszczową masą ciała. U wyleczonych pacjentów obserwowano cofanie się tych zmian [21].

Dodatkowo mimo obserwowanej zmniejszonej (trzewnej) masy tłuszczowej, stwierdzamy insulinooporność. Wynika ona z antagonistycznego działania GH wobec insuliny oraz stymulowanego przez GH wzrostu wolnych kwasów tłuszczowych. Następstwem nadmiernego wydzielania GH jest rozwój zróżnicowanych powikłań metabolicznych, które pogarszają jakość życia i wpływają na zwiększoną śmiertelność [22].

Powikłania metaboliczne obserwowane w akromegalii to głównie:

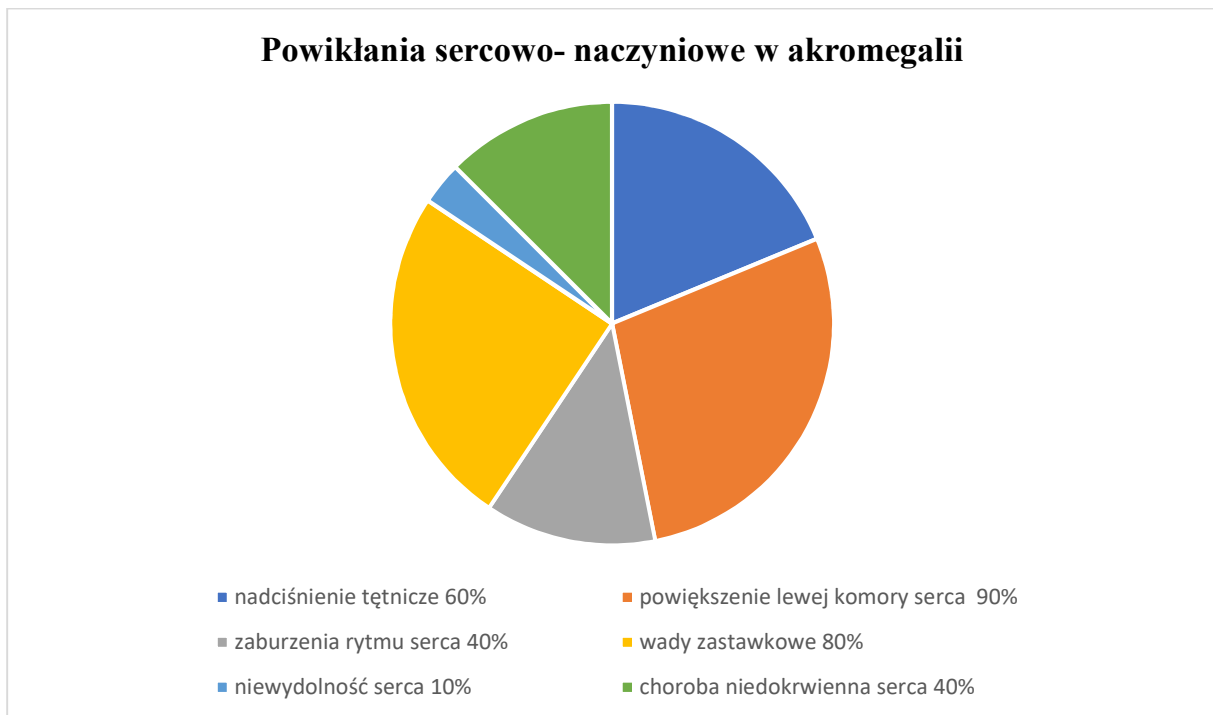
- hiperinsulinemia (do 80%),
- nietolerancja glukozy (do 40%),
- cukrzyca (do 20%),
- hipertriglicydemia (33-40%)
- hiperkalciuria (do 70%),
- hipogonadyzm (do 50%),
- hipertyreoz (do 15%) [23].



*Rycina 1. Powikłania metaboliczne w akromegalii.*

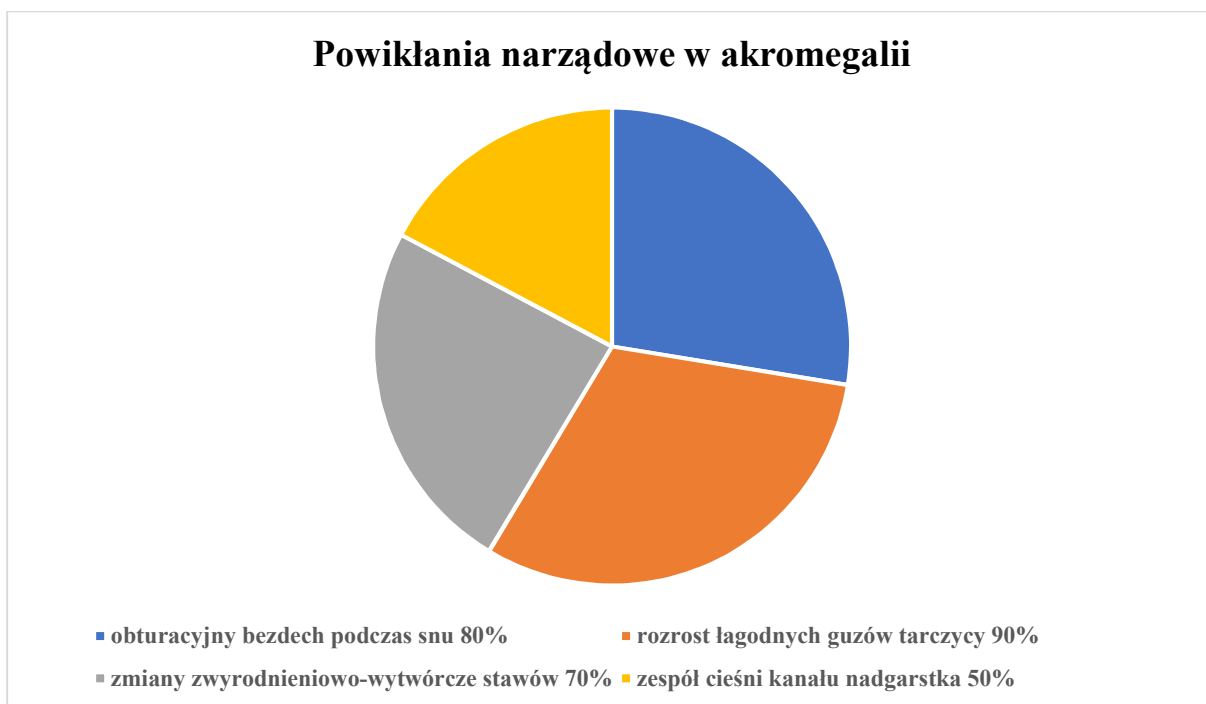
Wśród powikłań narządowych obserwowanych w akromegalii należy wymienić:

- nadciśnienie tętnicze (60%),
- powiększenie lewej komory serca (do 90%),
- zaburzenia rytmu serca (do 40%),
- wady zastawkowe (do 80%),
- niewydolność serca (do 10%),
- chorobę niedokrwienną serca (do 40%),
- obturacyjny bezdech podczas snu (do 80%),
- rozrost łagodnych guzów tarczycy (do 90%),
- zmiany zwyrodnieniowo-wytwórcze stawów (do 70%)
- zespół cieśni kanału nadgarstka (do 50%) [24].



Rycina 2. Powikłania sercowo-naczyniowe w akromegalii.

Efekt sumaryczny długotrwałego i nie podlegającego regulacji nadmiaru GH prowadzi do wzrostu częstości incydentów sercowo-naczyniowych oraz występowania zmian rozrostowych i związanych z nimi powikłań. Następuje pogorszenie jakości życia i zwiększenie śmiertelności [25].



Rycina 3. Powikłania narządowe w akromegalii.

## 1.5. Analogi somatostatyny

Nadrzędnym celem leczenia akromegalii jest uzyskanie trwałej remisji czyli radykalne usunięcie guza somatotropowego. Chirurgia staje się więc terapią pierwszego wyboru. Niestety duża liczba makrogruczolaków przysadki i ich zaawansowanie miejscowe (ok. 80% przypadków) wiąże się z ryzykiem obniżonej radykalności zabiegu i pozostawieniem guza resztkowego. Skutkuje to brakiem normalizacji poziomu IGF-1 oraz GH - co świadczy o aktywności choroby - i stanowi wskazanie do zastosowania farmakoterapii uzupełniającej [26].

Gruczolaki wydzielające GH wykazują ekspresję dwóch typów receptorów dla somatostatyny. W przeważającej ilości jest to podtyp drugi receptora SSTR2 i w mniejszym stopniu podtyp piąty SSTR5. Lekami z wyboru w przypadku akromegalii z guzem resztkowym stają się więc analogi somatostatyny. Leki te poprzez połączenie z receptorem dla somatostatyny (SSTR) zmniejszają sekrecję hormonu wzrostu oraz w niektórych przypadkach redukują rozmiar guza resztkowego. Kryterium kontroli choroby w przypadku stosowania tych leków jest uzyskanie wartości IGF-1 w normach dla płci i wieku oraz obniżenie stężenia GH poniżej 1  $\mu\text{g/L}$  [27].

W terapii akromegalii dostępne są analogii somatostatyny I i II generacji. Do pierwszej grupy należy Oktreotyd LAR® oraz Lanreotyd Autogel®, analogi o długim okresie półtrwania o wysokim powinowactwie do receptorów SSTR2. Pazyreotyd jest analogiem somatostatyny II generacji o szerszym spektrum powinowactwa do SSTR. Charakteryzuje się on wiązaniem z receptorami SSTR1-3 i największym powinowactwem do receptora SSTR5. Pazyreotyd jest lekiem drugiego wyboru, przy braku skuteczności leczenia w przypadku analogów somatostatyny I generacji [28-30].

## **1.6. Tkanka tłuszczowa**

Tkanka tłuszczowa jest tkanką heterogenną zbudowaną z różnego typu adipocytów oraz biologicznie aktywnej macierzy zewnątrzkomórkowej. W zależności od umiejscowienia wykazuje dobrze udokumentowane różnice pod względem pochodzenia komórkowego, zdolności metabolizmu glukozy i lipidów, możliwości termogenezy, a także właściwości endokrynych, w których pośredniczą adipokiny.

### **1.6.1. Biała tkanka tłuszczowa**

Biała tkanka tłuszczowa (WAT ang. white adipose tissue) dominuje w składzie masy tłuszczowej ciała i stanowi rezerwę energetyczną organizmu akumulując nadmiar triglicerydów pochodzących z pożywienia. Umożliwia ona pozyskanie energii za pośrednictwem wolnych kwasów tłuszczowych i glicerolu. Podstawową składową tkanki tłuszczowej są adipocyty, fizjologicznie gromadzące nadmiar triglicerydów w formie lipidów. Prawidłowa ekspansja tkanki tłuszczowej zapobiega zjawisku lipotoksyczności czyli gromadzeniu lipidów ekotopowo np. w mięśniach szkieletowych, nerkach czy też mięśniu serca [31].

Biała tkanka tłuszczowa poza funkcją biologicznego rezerwuaru energii pełni również funkcję endokrynną - syntezuje hormony (np. leptynę) oraz cytokiny (np. adiponektynę), które wpływają na regulację metabolizmu i wykazują właściwości immunomodulujące [32].

Biała tkanka tłuszczowa w warunkach fizjologicznych zlokalizowana jest podskórną (stanowi około 80% masy tłuszczowej zdrowego osobnika) oraz wewnątrztrzewnowo i w śródpiersiu. Nadmiar trzewnej WAT dodatnio koreluje ze wzrostem insulinooporności oraz ryzykiem sercowo-naczyniowym, wykazuje ponadto aktywność lipolityczną z uwalnianiem prozapalnych cytokin. Odmiennie, zwiększenie rezerwarów tkanki tłuszczowej podskórnej poprawia profil lipidów osoczowych oraz jest podstawowym źródłem leptyny i adiponektyny.



Nadmierne gromadzenie tkanki tłuszczowej ektopowo - mięśnie szkieletowe, mięsień sercowy, wątroba i nerki - świadczy o lipotoksyczności i ma potwierdzony związek ze wzrostem ryzyka sercowo-naczyniowego oraz obwodowej insulinooporności [33, 34].

### **1.6.2. Brunatna tkanka tłuszczowa**

Brunatna tkanka tłuszczowa (BAT ang. brown adipose tissue) odpowiada za procesy energetyczne związane z termogenezą i jest tkanką efektorową dla podstawowego i indukowanego wydatkowania energii. BAT charakteryzujące się bogatą zawartością mitochondriów i wysoką ekspresją UCP-1 (białka specyficznego dla tej tkanki, zlokalizowanego w mitochondriach) [35]. Brunatna tkanka tłuszczowa powoduje rozproszenie energii w postaci ciepła i podobnie jak WAT jest zdolna do produkcji cytokin - przykład stanowi neuregulina 4 (NRG4), która hamuje lipogenezę w wątrobie [36]. BAT w okresie niemowlęcym kumuluje się w przeważającej ilości w obszarze międzyłopatkowym, z czasem dochodzi do jej zaniku. U dorosłych na podstawie pozytonowej tomografii emisyjnej (PET/CT) z fluorodeoksyglukozą ustalono jej obecność w okolicy nadobojczykowej, na szyi, w okolicy okołoaortalnej, przykręgosłupowej i nadnerczowej [37].

### **1.6.3. Metabolizm tkanki tłuszczowej a hormon wzrostu**

Jednym z ważnych procesów zachodzących w obrębie tkanki tłuszczowej jest deponowanie i uwalnianie trójglicerydów. Procesy te zachodzą pod wpływem wielu hormonów, wśród których warto wymienić insulinę oraz hormon wzrostu. Maurice Raben był jednym z pierwszych naukowców, który wyekstrahował z ludzkiej przysadki i przetestował hormon wzrostu (GH). Badacz ten zauważył, że obserwowany wzrost poziomu wolnych kwasów tłuszczowych w surowicy po leczeniu GH „był prawdopodobnie najbardziej wyraźną odpowiedzią na GH ze wszystkich dotychczas opisanych” [38].

Przemiany tkanki tłuszczowej warunkowane hormonem wzrostu mają charakter kataboliczny i dotyczą przede wszystkim białej tkanki tłuszczowej [39]. GH odpowiada za lipolizę czyli rozkład magazynowanych trójglicerydów do glicerolu i wolnych kwasów tłuszczowych (FFA). Dodatkowo ogranicza wychwyt tych ostatnich przez adipocyty. GH dostarcza FFA w sytuacji metabolicznego zapotrzebowania, są one źródłem energii oraz substratem w dalszych przemianach lipidów [40, 41].

GH wpływa na dwa szlaki metabolizmu triglicerydów w obrębie tkanki tłuszczowej. Ścieżkę związano z inaktywacją PPAR $\gamma$  (peroxisome proliferator activated receptors - jeden z podtypów receptorów jądrowych regulujący metabolizm lipidów) oraz drogę aktywowaną przez HSL (hormone-sensitive lipase - neutralna wewnątrzkomórkowa lipaza zdolna do hydrolizowania lipidów) [42, 43]. Warto w tym miejscu wspomnieć, że bezpośrednie działanie lipolityczne zachodzi jedynie w kontekście hormonu wzrostu i nie dotyczy samego IGF-1. W tym aspekcie IGF-1 wykazuje - podobnie jak insulina - aktywność antagonistyczną polegającą na blokowaniu szlaku wpływów HSL. Przypuszcza się jednak, że IGF-1 może pełnić pośrednią rolę w lipolizie. Polega ona prawdopodobnie na determinowaniu szlaków sygnałowych aktywowanych przez GH, co warunkuje wystąpienie odpowiedzi lipolitycznej. Może się to odbywać również poprzez wpływ na strukturę i funkcję tkanki tłuszczowej (na przykład ekspresję adipokin, procesy starzenia i zwłóknienia) [44]. Ten przykład pokazuje wielofunkcyjność hormonu wzrostu i uświadamia, jak odpowiedź komórkowa na GH może być zmodyfikowana, aby spełnić warunki fizjologiczne i potrzeby rozwojowe organizmu.

Mimo fundamentalnego znaczenia fizjologicznego, nadmierna podaż wolnych kwasów tłuszczowych może doprowadzić do zjawiska tzw. lipotoksyczności. Przejawia się ona uszkodzeniem błon komórkowych, zaburzeniami homeostazy kwasowo-zasadowej komórek i powstawaniem szkodliwych, bioaktywnych lipidów. Nadmiar FFA i triglicerydów w osoczu przyczynia się do rozwoju insulinooporności mięśni szkieletowych, ektopowego gromadzenia lipidów oraz pogorszenia tolerancji glukozy. Zbyt intensywna indukcja katabolizmu lipidów może zmniejszać więc insulinowrażliwość i pogłębiać związane z tym zjawiskiem zaburzenia metaboliczne [45].

GH hamuje ponadto bezpośrednio zależny i niezależny od insuliny wychwyty glukozy przez adipocyty. Dzieje się tak najprawdopodobniej poprzez wpływ na receptory GLUT (szeroka grupa białek błonowych ułatwiających transport glukozy przez błonę komórkową), co udowadnia antagonistyczne działanie GH wobec insuliny. Badania *in vitro* potwierdziły obniżoną ekspresję receptora GLUT-1 w linii komórkowej pochodzącej z tkanki tłuszczowej, która została poddana działaniu hormonu wzrostu. Podobne wnioski nasuwają wyniki badań przeprowadzone na szczurach, które leczono przeciwciałem anty GH – pod wpływem terapii zaobserwowano zwiększoną ekspresję błonową receptorów GLUT-1 i GLUT-4 [46, 47].

Podsumowując, w warunkach fizjologicznych hormon wzrostu utrzymuje równowagę pomiędzy estryfikacją kwasów tłuszczowych, a lipolizą triglicerydów, co przekłada się na regulację metabolizmu całego organizmu oraz homeostazę glukozy.

Wpływ GH na tkankę tłuszczową nie kończy się jedynie na lipolizie. Ciekawe obserwacje uzyskano w trakcie badania *in vitro* z wykorzystaniem hodowli komórek pierwotnych adipocytów. Stwierdzono, że efekt działania GH polegał na zwiększeniu puli komórek prekursorowych adipocytów, z jednoczesnym zahamowaniem ich dojrzewania. Wynik sumaryczny tego działania polegał na redukcji masy tkanki tłuszczowej [48].

Hormon wzrostu moduluje funkcję endokrynną oraz wydzielanie cytokin przez tkankę tłuszczową. GH obniża poziom leptyny w surowicy. Ponadto ma wpływ na stężenie krążącej adiponektyny. Powyższe obserwacje potwierdzono na przykładzie pacjentów z nadmiarem hormonu wzrostu chorujących na akromegalię, jak i pacjentów z niedoborem hormonu wzrostu [49, 50].

#### **1.6.4. Biała tkanka tłuszczowa a hormon wzrostu**

Fizjologiczne i kliniczne znaczenie lipolitycznego wpływu GH na tkankę tłuszczową badano u dorosłych pacjentów z niedoborem hormonu wzrostu (GHD). Długotrwałe leczenie GH u pacjentów z niedoczynnością osi somatotropowej indukowało lipolizę i prowadziło do redukcji masy tłuszczowej trzewnej oraz poprawy wyrównania metabolicznego. Co ciekawe udokumentowano, że w przypadku ograniczonej dostępności glukozy, to właśnie GH odgrywał główną rolę w mobilizacji substratu energetycznego z tkanki tłuszczowej w procesie lipolizy [51].

U pacjentów z potwierdzoną czynną akromegalią obserwujemy redukcję całkowitej masy tkanki tłuszczowej. Nadmiar hormonu wzrostu wywołuje efekt lipolityczny we wszystkich obszarach WAT z przewagą tkanki tłuszczowej trzewnej w porównaniu do tkanki podskórnej (na tę ostatnią zachowuje minimalny wpływ) [52]. Zmianom tym towarzyszy zwiększona beztłuszczowa masa ciała i wzrost wolnych kwasów tłuszczowych. Potwierdzono tę obserwację na podstawie badań obrazowych. W rezonansie magnetycznym (MR) całego ciała (total body) u pacjentów z ustalonym rozpoznaniem akromegalii i insulinoopornością wykazano niższą niż przewidywana masę trzewnej tkanki tłuszczowej (VAT ang. visceral adipose tissue) przy zwiększonej śródmięśniowej redystrybucji tkanki tłuszczowej (IMAT - intramuscular adipose tissue). Powyższe wyniki sugerują, że akromegalia, mimo wysokiego ryzyka sercowo-naczyniowego i insulinooporności, wiąże się z obniżoną masą VAT, co jest nietypowe zważywszy na fakt, że w populacji ogólnej redukcja otyłości centralnej koreluje ze spadkiem insulinooporności i ryzyka sercowo-naczyniowego [53]. Dodatkowo uzyskanie remisji akromegalii w wyniku zastosowanego leczenia (obniżenie wydzielania/stężenia GH)

istotnie statystycznie wpływa na zwiększenie masy tkanki tłuszczowej trzewnej, podskórnej oraz wątrobowej [54].

Obserwacje, że GH ma największy wpływ na białą tkankę tłuszczową trzewną posłużyły w badaniach nad otyłością. Mekala i wsp.. podjęli próbę odpowiedzi na pytanie czy aktywacja receptora GH (GHR) za pomocą egzogenego GH okaże się przydatne w leczeniu otyłości? Metaanaliza badań u dorosłych osób otyłych poddanych leczeniu hormonem wzrostu wykazała umiarkowane, ale statystycznie istotne zmniejszenie masy tkanki tłuszczowej, w szczególności tłuszczu trzewnego, wraz z korzystniejszym profilem lipidowym i wzrostem beztłuszczowej masy ciała w porównaniu z placebo. Niestety, jak można się domyślać wiązało się to z pogłębieniem insulinooporności i pogorszeniem tolerancji glukozy [55].

Podsumowując wyniki licznych badań przeprowadzonych na zdrowych ochotnikach, pacjentach z niedoborem hormonu wzrostu oraz chorych na akromegalię, można skonstatować, że hormon wzrostu ma silne działanie lipolityczne szczególnie w zakresie tkanki tłuszczowej trzewnej, które dominuje na czczo lub w stanie głodzenia i stanowi fizjologiczny mechanizm dostarczania energii.

#### **1.6.5. Tkanka tłuszczowa brunatna a hormon wzrostu**

Przypuszcza się, że GH ma wpływ na brunatną tkankę tłuszczową, jednak brakuje badań klinicznych in vivo potwierdzających tę tezę. Jedyne doniesienia w tym temacie pochodzą z obserwacji nad populacją myszy. U gryzoni z niedoborem GH stwierdzono zwiększoną masę brunatnej tkanki tłuszczowej ze zwiększoną ekspresją UCP-1 RNA. Badania dotyczące wpływu nadmiaru GH na BAT są niejednoznaczne i wymagają pogłębienia tematu [56].

## **1.7. Delta-podobny homolog typu 1 (Dlk-1) oraz rozpuszczalna forma delta-podobnego homologu typu 1 (sDlk-1)**

### **1.7.1. Struktura Dlk-1**

Delta-podobny homolog typu 1(Dlk-1) jest białkiem transbłonowym z rodziny czynników wzrostowych. Jest glikoproteiną o masie molekularnej 26,2-31,8 kDa. Posiada szkielet polipeptydowy zbudowany z 225-262 reszt aminokwasowych, który zawiera 6 elementów podobnych do naskórkowego czynnika wzrostu (EGF), dlatego został zaliczony do rodziny tych białek [57]. Dlk-1 po raz pierwszy sklonowano z komórek nowotworu neuroendokrynnego przysadki, a także z mysich preadipocytów, przez co nosi również nazwę czynnika typu 1 preadipocytów (PREF-1). Gen Dlk-1 u człowieka znajduje się na chromosomie 14 i podlega imprintingowi matczynemu co oznacza, że jego aktywny allel pochodzi od ojca [58].

W organizmie człowieka jest identyfikowany jako forma transbłonowa (Dlk-1) lub forma rozpuszczalna (sDlk-1). W pierwszym przypadku Dlk-1 składa się z domeny zewnątrzkomórkowej, krótkiego łącznika, domeny śródbłonowej oraz domeny wewnątrzkomórkowej. Zachowuje przy tym homologie z białkami z rodziny Delta-NOTCH i jest ligandem dla szlaków sygnałowych tych receptorów. NOTCH, jak powszechnie wiadomo, jest wysoce konserwatywnym systemem sygnalizacji komórkowej obecnym u większości zwierząt. Rozpatrując oddziaływania międzykomórkowe, decydującym o dalszym losie komórki w czasie jej różnicowania jest połączenie liganda delta z receptorem NOTCH. Tak więc szlaki sygnałowe NOTCH odgrywają ważną rolę w regulacji rozwoju embrionalnego, a jego dysregulacja jest widoczna w wielu nowotworach. Dlk-1 działa poprzez NOTCH-1, ale także niezależnie od niego [59, 60].

sDlk-1 został po raz pierwszy zidentyfikowany w płynie owodniowym, dlatego znany jest też pod nazwą płodowego antygeny typu 1 (FA1). Forma rozpuszczalna - sDlk-1 - powstaje za pośrednictwem działania enzymu konwertującego czynnik martwicy nowotworów alfa, który jest dezintegryną metyloproteazy domeny 17(TACE/ADAM-17). Enzym ten odpowiada za proteolityczne odłączenie domeny zewnątrzkomórkowej czynnika błonowego. Dlk-1 wykazuje wysoką ekspresję w niektórych tkankach embrionalnych, w których stwierdzono również bogatą sygnalizację NOTCH. Jest czynnikiem utrzymującym komórki zdolne do

proliferaacji w formie niezróżnicowanej, co może budzić skojarzenia z podtrzymywaniem właściwości komórek macierzystych. W istocie dysponujemy licznymi wynikami badań *in vitro* oraz *in vivo*, które charakteryzują Dlk-1 jako markera komórek zdolnych do proliferacji i różnicowania [61-63].

U osób dorosłych, ekspresja Dlk-1 jest ograniczona do wybranych tkanek. Należy jednak podkreślić, że jego rozpuszczalna forma trafia do krążenia i innych płynów ustrojowych (mocz, płyn owodniowy), dzięki czemu może mieć wpływ na efekty biologiczne zachodzące w innych tkankach. Eliminacja sDlk-1 z krążenia zachodzi głównie przez nerki i stężenie tego czynnika jest podwyższone w ich niewydolności [64].

### **1.7.2. Znaczenie biologiczne Dlk-1**

Znaczenie biologiczne Dlk-1 zostało najlepiej zaprezentowane na modelach myszy z nadekspresją lub niedoborem Dlk-1. Obecność tego czynnika potwierdzono podczas rozwoju embrionalnego. Występował w komórkach: łożyska, wątroby, tkanki tłuszczowej, mięśni szkieletowych, płuc oraz przysadki. Przypuszcza się, że Dlk-1 bierze istotny udział w dojrzewaniu i różnicowaniu tkanek. Myszy pozbawione ekspresji genu Dlk-1 charakteryzują się zwiększoną śmiertelnością okołoporodową, opóźnionym wzrastaniem, zwiększoną otyłością, zaburzeniami rozwojowymi powiek, żeber oraz płuc, a także nieprawidłowościami rozwojowymi przysadki. U dorosłych osobników ekspresja tego białka jest znacznie mniejsza i ogranicza się do narządów zbudowanych z tkanki neuroendokrynej takiej jak przysadka, nadnercza, trzustka, jądra, czy jajniki [65, 66].

U dorosłego człowieka na podstawie badań immunohistochemicznych zidentyfikowano Dlk-1 w tkance kory nadnerczy strefy kłębuszkowej, komórkach wydzielania wewnętrznego beta trzustki, komórkach Leydiga jąder oraz tekalnych jajnika. U ludzi ekspresja Dlk-1 jest największa w okresie embrionalnym, maleje w trakcie rozwoju płodowego, po narodzeniu zaś ogranicza się jedynie do wybranych tkanek o charakterze endokrynnym [67]. Za przykład może tu posłużyć przysadka. W życiu płodowym Dlk-1 występuje we wszystkich jej komórkach neuronalnych i gruczołowych, ale wraz z rozwojem tkanek Dlk-1 systematycznie zanika. W obrębie dojrzałej przysadki, w warunkach fizjologicznych, ekspresja Dlk-1 jest ograniczona jedynie do komórek somatotropowych obszaru aparatu Golgiego. Wspólne występowanie hormonu wzrostu oraz Dlk-1 w obrębie komórek przedniego płata przysadki, choć dotyczy różnych przedziałów wewnątrzkomórkowych, rodzi pytanie o ich współzależności w aspekcie sekrecji oraz efektów działania [68, 69].

Pytania dotyczące wzajemnych zależności jest tym bardziej uzasadnione, że podobne biologiczne przemiany wpływają na zmiany stężeń GH oraz sDlk-1. Forma sDlk-1 wykrywalna w surowicy i płynach ustrojowych jest w istocie domeną zewnątrzkomórkową białka transbłonowego Dlk-1 i powstaje poprzez enzymatyczne działanie TACE/ADAM17. Ten sam enzym pośredniczy w uwalnianiu białka wiążącego GH, które jest rozpuszczalną formą receptora dla tego hormonu. Istnieją też uzasadnione przypuszczenia, że GH wpływa bezpośrednio na sam enzym stymulując uwalnianie ektodomeny [10, 70].

### **1.7.3. Wpływ Dlk-1 na tkankę tłuszczową**

Najlepiej poznaną funkcją Dlk-1 jest jego wpływ na tkankę tłuszczową. Delta-podobny homolog typu 1 hamuje adipogenezę poprzez zapobieganie różnicowaniu preadipocytów w dojrzałe adipocyty. Efektem jego działania jest zarówno ograniczenie proliferacji jak i dojrzewania komórek tłuszczowych. Przy czym Dlk-1 w formie związanej z błoną komórkową ogranicza proliferację preadipocytów, zaś jego forma rozpuszczalna hamuje ich różnicowanie [71, 72]. Zachowując podwójny wpływ regulujący funkcję adipocytów, Dlk-1 staje się ważnym czynnikiem wpływającym na homeostazę komórek prekursorowych i ekspansję tkanki tłuszczowej. Efekt ten zanika zupełnie w dojrzałych adipocytach i w ich obrębie Dlk-1 jest niewykrywalny. Dokładna rola szlaku NOTCH w powstawaniu i różnicowaniu tkanki tłuszczowej pozostaje niejasna. Potwierdzono, że zwiększona ekspresja Dlk-1 korelowała z redukcją receptorów NOTCH1, odwrotnie zaś - konstytutywna ekspresja NOTCH1 skutkowała obniżeniem poziomu Dlk-1 mRNA i zapobiegała różnicowaniu adipocytów. W związku z tym zaproponowano, że „odpowiednia równowaga sygnalizacji NOTCH jest krytyczna dla procesu adipogenezy” oraz że Dlk-1 najprawdopodobniej odgrywa istotną rolę w kontroli nad właściwym poziomem sygnalizacji NOTCH, dla komórek, które ulegają adipogenezie [73].

Kilka badań klinicznych potwierdziło wpływ Dlk-1 na adipogenezę. Obserwacje wykazały, że nadekspresja Dlk-1 w obrębie preadipocytów hamuje różnicowanie niedojrzałych komórek w adipocyty. Odwrotna sytuacja zaś miała miejsce, gdy aktywność Dlk-1 była zmniejszona, następowało różnicowanie komórek do fazy dojrzałych adipocytów [74, 75]. Moon i wsp. opisali myszy pozbawione ekspresji Dlk-1. Wśród osobników stwierdzono nadmierne nagromadzenie tkanki tłuszczowej, ale także zahamowanie wzrastania i nieprawidłowości w budowie szkieletu. Odwrotnie zaś u myszy z nadekspresją Dlk-1

obserwowano redukcję masy tłuszczowej (w tym tkanki brunatnej), rozpoznano lipodystrofię ze wzrostem insulinooporności oraz dyslipidemię [76].

W literaturze opisano ponadto przypadek rodziny, której członkowie wykazywali delecję ojcowskiego allelu genu *Dlk-1*, co objawiało się fenotypowo niewykrywalnym w surowicy stężeniem *sDlk-1*, zwiększoną masą tłuszczową i otyłością, przedwczesnym dojrzewaniem płciowym, niskorosłością oraz małymi dłońmi i makrocefalią [77].

Wpływ *Dlk-1/sDlk-1* na tkankę tłuszczową przypomina model zmian zachodzący w obrębie tkanki tłuszczowej obserwowany u pacjentów z akromegalią. Dotyczy to zahamowania różnicowania preadipocytów w dojrzałe adipocyty. Hipotezę tę potwierdzają badania przeprowadzane *in vitro*, na liniach komórkowych mysich adipocytów. Niskie wartości *Dlk-1* obserwowano w trakcie różnicowania tkanki tłuszczowej, efekt ten odwracała podaż hormonu wzrostu. Stwierdzono ponadto, że *Dlk-1* hamuje różnicowanie tkanki tłuszczowej równie efektywnie co hormon wzrostu [43, 78].

#### **1.7.4. Czynniki wpływające na stężenie *sDlk-1***

W literaturze opisano kilka przypadków *in vitro* potwierdzających dodatnią korelację stężenia delta-podobnego homologu typu 1 (*Dlk-1*) ze stężeniem hormonu wzrostu. Sze i wsp. wykazali, że zmiany w stężeniu GH wpływają na poziom rozpuszczalnego *sDlk-1*. Wyszunęli ponadto hipotezę, że GH może regulować produkcję i/lub przemianę *Dlk-1*, prawdopodobnie poprzez zwiększenie wydalania jego domeny zewnątrzkomórkowej *sDlk-1* za pośrednictwem enzymu ADAM17 [79]. Dodatkowo, Friedrichsen i wsp. potwierdzili, że GH indukował ekspresję *Dlk-1* w wysepkach trzustkowych beta linii komórkowych szczura [80]. W badaniu *in vitro* na komórkach gryzoni GH zwiększał ekspresję *Dlk-1* w preadipocytach hamując tym samym dojrzewanie komórek [43].

Podczas substytucji GH u pacjentów z niedoborem hormonu wzrostu zauważono wzrost ekspresji *sDlk-1*, spadek zaś nastąpił u kilku pacjentów z akromegalią w trakcie terapii oktreotydem [81]. Ten ostatni fenomen pozostaje jednak niejednoznaczny. Może wynikać zarówno z bezpośredniego działania analogów somatostatyny na ekspresję *sDlk-1* jak i pośredniego działania obniżonego stężenia GH. Hagen i wsp. wykluczyli wspólny szlak wydzielania GH i *sDlk-1* mimo bliskości występowania obu czynników w obszarze komórek somatotropowych przysadki. Zauważyli oni ponadto inny model dobowy stężeń obu białek w surowicy. W przypadku GH obserwujemy pulsę wydzielania hormonu w rytmie dobowym,



sDlk-1 zachowuje stałe 24-h stężenie w surowicy z niewielkim, nie wykazującym znaczenia, wzrostem w godzinach porannych [81]. Ansell i wsp. na podstawie przeprowadzonych badań *in vitro* wysunęli hipotezę istnienia pętli sprzężenia zwrotnego pomiędzy sekrecją GH a ekspresją Dlk-1. Zjawisko to miałyby zachodzić za pośrednictwem Pit-1 (przysadkowego czynnika transkrypcji) odpowiedzialnego za różnicowanie somatotropów, które według badaczy pozostają w formie niedojrzałej właśnie pod wpływem działania Dlk-1 [69]. Abdallah i wsp. w swoich badaniach *in vivo* przeprowadzonych na modelach myszy zauważyli odwrotną zależność między stężeniem GH a sDlk-1 i wysunęli hipotezę, że hormon wzrostu reguluje stężenie krążącego sDlk-1. Wykluczono przy tym wpływ samego sDlk-1 na sekrecję GH, ponieważ nie wykryto istotnych zmian w zakresie osi somatotropowej pod wpływem wysokich stężeń sDlk-1 w osoczu myszy [78].

#### **1.7.5. Dlk-1 w aspekcie nowotworów**

Dlk-1 wykazuje zwiększoną ekspresję w tkankach embrionalnych i niedojrzałych komórkach. U dorosłych jego aktywność jest niska w większości zdrowych tkanek. Odkryto niedawno, że Dlk-1 może być markerem wybranych nowotworów. Potwierdzono wysoką ekspresję Dlk-1 w komórkach raka kory nadnerczy. Ciekawą obserwacją jest fakt, że w gruczolakach kory nadnerczy (czyli w zmianach łagodnych), nie obserwujemy tego fenomenu [82, 83]. Dlk-1 stwierdza się z dużą częstością w raku wątrobowokomórkowym, raku okrężnicy, trzustki oraz piersi [84]. Ostatnio wykazano, że wyższa ekspresja Dlk-1 prognozuje gorsze wyniki kliniczne w raku wątrobowokomórkowym [85]. Stężenie sDlk-1 w osoczu jest podwyższone pięciokrotnie w neurofibromatozie oraz raku drobnokomórkowym płuc. Pojawiło się także kilka prac potwierdzających obecność Dlk-1 w komórkach nowotworów pochodzenia neuroendokrynnego takich jak feochromocytoma czy insulinoma [84, 86, 93].

Dlk-1 jest wysoce aktywny w guzach somatotropowych przysadki, czynnik ten zidentyfikowano ponadto w niektórych guzach typu prolaktynoma. Pozostałe nowotwory przedniego płata nie wykazują aktywności tego białka. Nie stwierdzono korelacji między stopniem ekspresji Dlk-1, a wielkością guza czy płcią pacjenta. W przypadku somatotropinoma występuje jednak korelacja między stosunkiem GH-mRNA a Dlk-1-mRNA. Znaczenie Dlk-1 w rozwoju guzów przysadki pozostaje niejednoznaczne [87].

### **1.7.6. Tkanka tłuszczowa a Dlk-1**

Dlk-1 uważany jest za ważny represor różnicowania preadipocytów. Obie formy transbłonowa jak i rozpuszczalna współdziałają hamując różnicowanie komórek macierzystych tkanki tłuszczowej, co czyni Dlk-1 głównym regulatorem homeostazy preadipocytów i ich ekspansji. Białko Dlk-1 jest jednym z produktów klastera genów Dlk-1-Dio3. Najnowsze publikacje powiązały zaburzenia imprintingu w obrębie klastera tych genów z ekspansją tkanki tłuszczowej i jednostkami chorobowymi takimi jak otyłość i insulinooporność [88].

Lepsze zrozumienie komórkowych i molekularnych podstaw wzrostu tkanki tłuszczowej w stanach fizjologicznych i patofizjologicznych, może zapewnić środki do opracowania strategii terapeutycznych w zapobieganiu i leczeniu otyłości.

## 2. Założenia i cele pracy

sDlk-1 hamuje różnicowanie adipocytów i może pośredniczyć w antyadipogennym działaniu GH. Jak wiadomo nadmiar GH w akromegalii prowadzi do zmniejszenia masy tłuszczowej i jej charakterystycznej redystrybucji, co przyczynia się do rozwoju insulinooporności. Oba zjawiska podlegają odwróceniu po uzyskaniu remisji choroby.

Pojedyncze prace implikują związek wydzielania GH i sDlk-1 oraz ich wpływ na dystrybucję tkanki tłuszczowej. Literatura dotycząca klinicznego zastosowania oznaczeń sDlk-1 w surowicy jest wciąż niewielka, a funkcja fizjologiczna sDlk-1 u ludzi pozostaje w dużej mierze nieznana i wymaga pogłębionych badań.

Dlk-1 w organizmie człowieka występuje w dwóch izoformach transbłonowej i rozpuszczalnej, ta ostatnia jest przedmiotem niniejszych badań. Modelem stałego i nieograniczonego działania GH w warunkach *in vivo* jest akromegalia.

Ustalenie związku pomiędzy sDlk-1 a GH jest kluczem do lepszego zrozumienia przemian w zakresie tkanki tłuszczowej promowanych przez GH. Wnioski z przeprowadzonych badań zaś mogą okazać się pomocne w badaniach nad otyłością.

Celem pracy jest analiza stężenia rozpuszczalnej formy sDlk-1 u pacjentów z akromegalią będących na różnych etapach choroby i jej leczenia. Jednocześnie zbadany zostanie związek sDlk-1 ze wskaźnikami gospodarki węglowodanowej i lipidowej.

### Cele pracy:

1. Ocena stężenia sDlk-1 w krążeniu obwodowym osób chorujących na akromegalię w porównaniu do osób w grupie kontrolnej.
2. Ocena stężenia sDlk-1 na różnych etapach akromegalii.
3. Analiza potencjalnego związku stężenia sDlk-1 z gospodarką węglowodanową i lipidową w akromegalii.
4. Analiza zależności stężenia sDlk-1 z wykładnikami zawartości tkanki tłuszczowej oraz beztłuszczowej masy ciała ocenianych metodą DXA.
5. Ocena wpływu stosowania analogów somatostatyny na stężenie sDlk-1 w krążeniu osób z akromegalią.

### 3. Materiał i metody

#### 3.1. Materiał

Badanie zostało przeprowadzone u 122 chorych hospitalizowanych w Klinice Endokrynologii, Diabetologii i Leczenia Izotopami we Wrocławiu w latach 2017-2019. Do grupy badanej zakwalifikowano 83 pacjentów chorych na akromegalię (54 kobiety i 29 mężczyzn w wieku od 25 do 82 lat). Grupę kontrolną (GK) stanowiło 39 osób bez zaburzeń osi somatotropowej, u których nie stwierdzono potencjalnych chorób, które mogłyby wpływać na stężenie sDlk-1, z wyjątkiem zaburzeń gospodarki węglowodanowej i lipidowej (28 kobiet i 11 mężczyzn w wieku od 21 do 79 lat (Tabela 1).

Tabela 1 Charakterystyka obu badanych grup (N=122)

Parametry	Grupa z akromegalią				Grupa kontrolna				p
	Średnia	±SD	Min	Max	Średnia	±SD	Min	Max	
wiek (lata)	57,53	±13,58	25,0	82,0	50,82	±15,82	21,0	81,0	<0,05
GH (µg/l)	5,1	±14,15	0,05	95,8	0,96	±1,2	0,05	5,54	<0,01
IGF-1 (ng/ml)	217,66	±169,5	65,9	1000,0	132,73	±56,87	55,9	364,0	<0,001
masa ciała (kg)	83,94	±16,57	52,0	150,0	71,72	±15,56	30,0	101,0	<0,001
wzrost (cm)	168,48	±10,15	151,0	193,0	168,04	±8,61	153,0	189,0	NS
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	29,56	±4,98	19,27	52,0	25,68	±4,3	18,2	37,55	<0,0001
masa tłuszczowa (FM) (kg)	27,94	±9,6	10,06	68,06	25,6	±8,11	12,09	43,33	NS
masa beztłuszczowa (LM) (kg)	52,41	±11,47	31,2	81,03	46,02	±9,53	32,43	66,24	<0,01
% tkanki tłuszczowej	33,62	±7,5	18,2	51,7	34,53	±7,26	22,3	47,4	NS

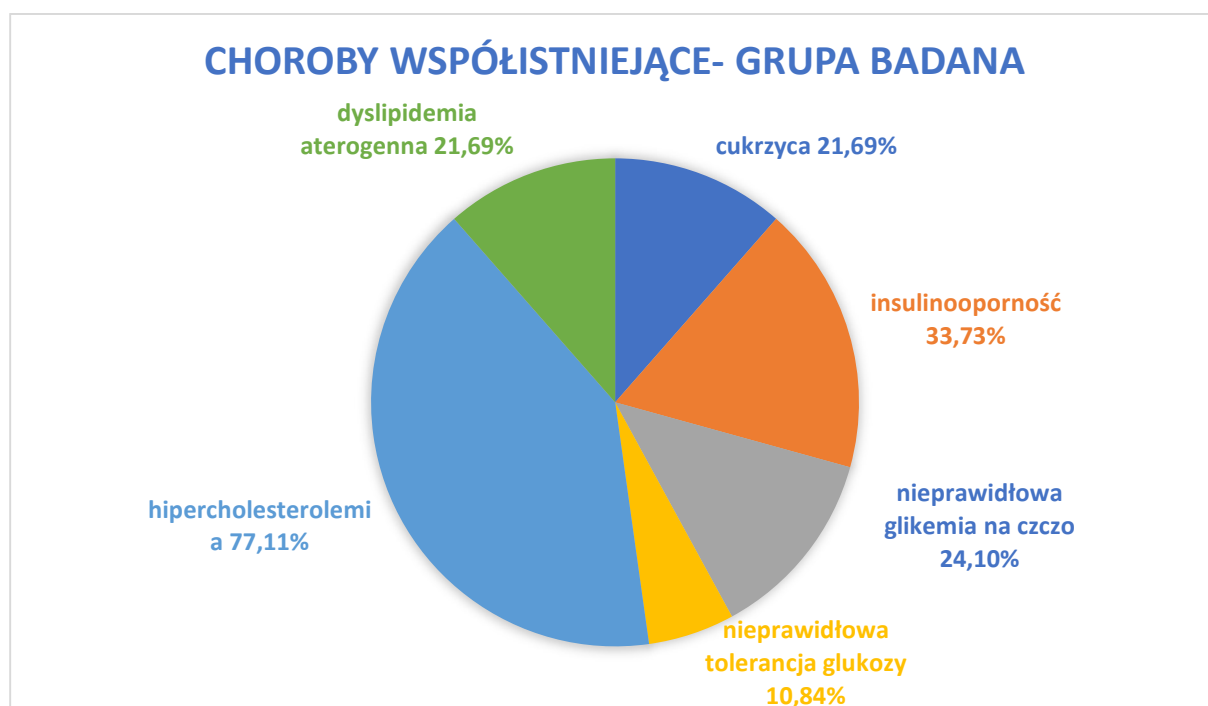
Podstawową charakterystykę obu grup włączonych do badania przedstawiono w tabeli 1. W grupie badanej stwierdzono istotnie statystycznie większe spodziewane stężenie GH, IGF-1, masę ciała z przewagą beztłuszczowej masy ciała.

W aspekcie chorób współistniejących, w grupie badanej stwierdzono istotnie statystycznie większe stężenie glukozy na czczo. Grupy nie różniły się istotnie pod względem występowania zaburzeń lipidowych, insulinooporności, nieprawidłowej tolerancji glukozy (Tabela 2). O rozpoznaniu insulinooporności decydowała wartość współczynnika HOMA-IR > 2,1; wartość tę ustalono na podstawie wyznaczonego wskaźnika dla populacji polskiej [90].

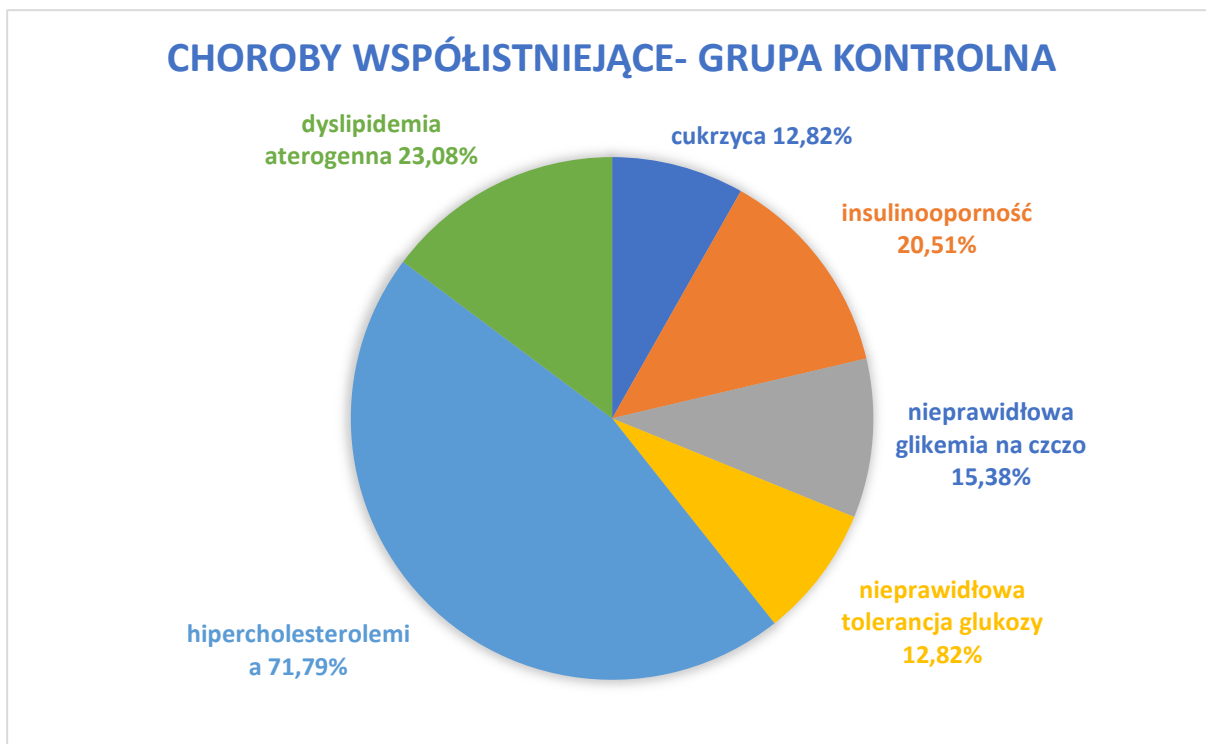
O rozpoznaniu hipercholesterolemii decydowało spełnienie któregokolwiek z kryteriów: stężenie cholesterolu całkowitego > 190 mg/dl i/lub stężenie cholesterolu frakcji LDL > 115 mg/dl. Rozpoznanie dyslipidemii aterogennej ustalono na podstawie jednego z kryteriów: stężenie HDL < 40 mg/dl i/lub stężenie triglicerydów > 150 mg/dl.

Tabela 2. Choroby współistniejące w grupie badanej (N=83) i grupie kontrolnej (N=39).

	grupa badana		grupa kontrolna		
	n	%	n	%	p
cukrzyca	18	21,69	5	12,82	NS
insulinooporność	28	33,73	8	20,51	NS
nieprawidłowa glikemia na czczo	19	24,10	6	15,38	<0,01
nieprawidłowa tolerancja glukozy	9	10,84	5	12,82	NS
hipercholesterolemia	64	77,11	28	71,79	NS
dyslipidemia aterogenna	18	21,69	9	23,08	NS
leczenie statynami	35	42,17	11	28,20	NS



Rycina 4. Choroby współistniejące w grupie badanej.



Rycina 5. Choroby współistniejące w grupie kontrolnej.

### 3.1.1. Charakterystyka grupy z akromegalią

Na podstawie obrazu klinicznego, wyników stężeń hormonu wzrostu (GH) oraz insulinopodobnego czynnika wzrostu typu 1 (IGF-1) pacjentów z akromegalią stanowiącą grupę badaną podzielono na trzy podgrupy:

**AA** - pacjentów z aktywną chorobą (akromegalia aktywna – AA) 16 osób (11 kobiet i 5 mężczyzn), co stanowiło 19,3% osób w tej grupie (Tabela 3).

**AK** - pacjentów z chorobą kontrolowaną za pomocą farmakoterapii (akromegalia kontrolowana - AK) 46 pacjentów (26 kobiet i 20 mężczyzn), co stanowiło 55,4% osób w tej grupie (Tabela 4).

**AW** - pacjentów z akromegalią kontrolowaną po zabiegu operacyjnym (akromegalia kontrolowana po zabiegu ) 21 osoby (16 kobiet i 5 mężczyzn), co stanowiło 25,3% osób z tej grupy (Tabela 5).

**AS** - W grupie badanej wyodrębniono dodatkowo pacjentów w trakcie terapii analogami somatostatyny 52 osoby (29 kobiet i 23 mężczyzn), co stanowiło 62,7% pacjentów grupy

badanej. Grupa składała się z 46 pacjentów z akromegalią kontrolowaną (26 kobiet i 20 mężczyzn) oraz 6 pacjentów (3 kobiety i 3 mężczyzn) z grupy akromegalii aktywnej.

Kwalifikacja do poszczególnych podgrup odbyła się na podstawie wytycznych Polskiego Towarzystwa Endokrynologicznego [1] oraz Endocrine Society Clinical Practice Guideline [89].

Do podgrupy AA zaliczono pacjentów z IGF-1 przekraczającym o ponad 30% górną granicę normy i/lub GH przekraczającym 1 ng/ml ( $\mu\text{g/L}$ ) w teście doustnego obciążenia 75 g glukozy (Tabela 3).

Tabela 3. Charakterystyka grupy z aktywną akromegalią (N=16).

	Średnia	$\pm$ SD	Min	Max
wiek (lata)	55,25	$\pm$ 14,83	25,0	77,0
masa ciała (kg)	79,5	$\pm$ 14,94	52,0	103,0
wzrost (cm)	166,38	$\pm$ 10,58	152,0	187,0
BMI ( $\text{kg/m}^2$ )	28,67	$\pm$ 4,4	19,33	34,5
GH ( $\mu\text{g/L}$ )	21,32	$\pm$ 27,19	1,22	95,8
IGF-1 (ng/ml)	501,63	$\pm$ 202,32	256,0	1000,0
masa tłuszczowa (FM) (kg)	24,6	$\pm$ 9,84	10,06	39,21
masa beztłuszczowa (LM) (kg)	51,89	$\pm$ 11,95	31,2	74,04
% tkanki tłuszczowej	31,24	$\pm$ 6,88	18,6	38,8

Do podgrupy AK zostali zakwalifikowani pacjenci z prawidłowym IGF-1 (wartości nie przekraczały o 30% górnej granicy normy w odniesieniu do płci i wieku) w trakcie farmakoterapii analogami somatostatyny. W leczeniu stosowano analogi somatostatyny I generacji o przedłużonym działaniu: oktreotyd w dawce 20-40 mg domięśniowo co 28 dni lub lanreotyd 120 mg podskórnie co 28-42 dni albo analog somatostatyny II generacji: pazyreotyd w dawce 40-60 mg domięśniowo co 28 dni (Tabela 4).

Tabela 4. Charakterystyka grupy kontrolowanej analogami somatostatyny (N=46).

	Średnia	±SD	Min	Max
wiek (lata)	59,02	±13,72	34,0	82,0
masa ciała (kg)	86,26	±13,86	54,0	106,0
wzrost (cm)	169,93	±10,21	151,0	192,0
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	29,91	±3,94	19,27	38,67
GH (µg/L)	1,43	±1,23	0,17	5,60
IGF-1 (ng/ml)	151,01	±48,62	65,9	328,0
masa tłuszczowa (FM) (kg)	28,52	±7,9	13,36	48,66
masa beztłuszczowa (LM) (kg)	53,81	±10,75	31,9	80,7
% tkanki tłuszczowej	33,91	±7,49	19,0	51,7

Do podgrupy AW zaliczono pacjentów z prawidłowym stężeniem IGF-1 (maksymalnie poniżej 30% górnej granicy normy w odniesieniu do płci i wieku), GH poniżej 1 ng/ml (µg/L) w teście doustnego obciążenia 75 g glukozy lub GH < 2,5 ng/ml w seryjnych pomiarach u pacjentów z cukrzycą, którzy przebyli skuteczny zabieg resekcji gruczolaka somatotropowego przysadki (Tabela 5).

Tabela 5. Charakterystyka grupy z akromegalią kontrolowaną po zabiegu operacyjnym (N=21).

	Średnia	±SD	Min	Max
wiek (lata)	56,0	±12,47	38,0	75,0
masa ciała (kg)	82,24	±22,26	53,0	150,0
wzrost (cm)	166,9	±9,63	155,0	193,0
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	29,47	±7,16	19,7	52,0
GH (µg/L)	0,77	±1,31	0,05	6,22
IGF-1 (ng/ml)	147,3	±42,96	88,0	262,0
masa tłuszczowa (FM) (kg)	29,24	±12,38	12,29	68,06
masa beztłuszczowa (LM) (kg)	49,75	±12,65	31,9	81,03
% tkanki tłuszczowej	34,81	±7,91	18,2	49,0

Wśród chorych na akromegalię 73 osoby przebyły zabieg operacyjny resekcji gruczolaka przysadki (88%), 11 osób zostało poddanych radioterapii (13%).

W celu przeprowadzenia analizy statystycznej wykonano trzy różne podziały uczestników badania.



W pierwszej analizie oceniono zależności i różnice stężenia sDlk-1 w dwóch grupach: w grupie badanej oraz grupie kontrolnej. Następnie oceniano zależności i różnice stężenia sDlk-1 w trzech podgrupach pacjentów z grupy badanej: akromegalii aktywnej, akromegalii kontrolowanej analogami somatostatyny oraz akromegalii kontrolowanej po zabiegu operacyjnym. Trzecia analiza dotyczyła stężenia sDlk-1 u pacjentów w trakcie leczenia analogami somatostatyny względem pacjentów nie poddanych takiemu leczeniu.

W celu przeprowadzenia dodatkowych analiz zarówno grupę badaną jak i grupę kontrolną podzielono na:

- Pacjentów z cukrzycą: o przynależności do grupy decydowało już postawione rozpoznanie cukrzycy lub u osób do tej pory nie zdiagnozowanych - spełnienie kryteriów rozpoznania cukrzycy wg WHO.
- Pacjentów ze stanem przedcukrzycowym: o przynależności do grupy decydowała nieprawidłowa glikemia na czczo glukoza  $> 100$  mg/dl i  $< 126$  mg/dl lub glikemia w 2h OGTT  $> 140$  mg/dl i  $< 200$  mg/dl.
- Pacjentów z insulinoopornością: o przynależności do grupy decydowała wartość współczynnika HOMA-IR  $> 2,1$  wartość tę ustalono na podstawie wyznaczonego wskaźnika dla populacji polskiej z prawidłową masą ciała i prawidłową tolerancją glukozy [90].
- Pacjentów z zaburzeniami lipidowymi:
  - Hipercholesterolemia: o przynależności do grupy decydowało spełnienie któregokolwiek z kryteriów: stężenie cholesterolu całkowitego  $> 190$  mg/dl i/lub stężenie cholesterolu frakcji LDL  $> 115$  mg/dl
  - Dyslipidemia aterogenna: o przynależności do grupy decydowało spełnienie jednego z kryteriów: stężenie HDL  $< 40$  mg/dl i/lub stężenie triglicerydów  $> 150$  mg/dl
- Pacjentów z nadwagą: o przynależności do grupy decydowała wartość BMI  $\geq 25$  kg/m<sup>2</sup>, ale  $\leq 30$  kg/m<sup>2</sup>
- Pacjentów z otyłością: o przynależności do grupy decydowała wartość BMI  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup>

## 3.2. Metody

### 3.2.1. Pomiary antropometryczne

- Masę ciała (kg) oraz wzrost (cm) zmierzono przy użyciu atestowanej wagi ze wzrostomierzem firmy Zalimp Warszawa typ WB 150 o dokładności pomiaru 0,1 kg i 1 cm. Na podstawie wyników obliczono wskaźnik BMI zgodnie ze wzorem:  $BMI = \frac{\text{masa ciała (kg)}}{\text{wzrost (m}^2\text{)}}$
- Analiza składu ciała za pomocą dwuenergetycznej absorpcjometrii rentgenowskiej (DXA):
  - procentowana zawartość tkanki tłuszczowej (% fat);
  - fat mass (FM) wskaźnik określający bezwzględną masę tkanki tłuszczowej;
  - lean mass (LM) wskaźnik określający beztłuszczową masę ciała pomniejszoną o masę kostną,

Pomiarów dokonano na aparacie Hologic Discovery QDR Series (Hologic Incorp. USA, wersja oprogramowania APEX 4.5.2.1, system Windows 7 professional).

### 3.2.2. Oznaczenia laboratoryjne

Krew na badania laboratoryjne u każdego pacjenta została pobrana rano, na czczo, w spoczynku z żyły łokciowej.

- Badania biochemiczne obejmujące lipidogram (trójglicerydy, cholesterol całkowity, HDL, LDL) i glukozę wykonano za pomocą testów komercyjnych ARCHITECT c4100, Abbott Diagnostics.
- Badania hormonalne stężeń GH, IGF-1 oraz oznaczenie insuliny na czczo wykonano przy użyciu metody immunochemiluminescencji za pomocą komercyjnych testów IMMULITE 2000, Siemens Healthcare Diagnostics.
- Pomiary stężeń Dkk-1 wykonano przy użyciu testu immunoenzymatycznego ELISA typu „sandwich”, zgodnie z zaleceniami producenta zestawu BioVendor (Laboratori Medicina a.s., Czech Republic) w Laboratorium Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego we Wrocławiu

w Pracowni Endokrynologii Molekularnej przy Katedrze i Klinice Endokrynologii, Diabetologii i Leczenia Izotopami Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu.

Ocena insulinooporności:

- Oznaczono wskaźnik HOMA-IR według wzoru:  $\text{insulina na czczo } (\mu\text{U/ml}) \times \text{glukoza na czczo } (\text{mg/dl}) / 405$ ;

### **3.3. Analiza statystyczna**

Dla wszystkich badanych parametrów obliczono średnią i odchylenie standardowe (średnia  $\pm$  SD). Dane jakościowe przedstawiono jako wskaźniki struktury (%). Ocenę normalności rozkładu otrzymanych wyników wykonano na podstawie testu Shapiro-Wilka. W ocenie istotności statystycznych różnic między dwiema grupami zastosowano test t-Studenta. Jeśli zmienne nie spełniały kryteriów normalności przeprowadzono test U Manna-Whitneya. Podobnie, zastosowano analizę wariancji (ANOVA) i test Kruskala-Wallisa do porównania zmiennych między 3 zdefiniowanymi grupami. Jeśli wyniki były istotne statystycznie, w celu zidentyfikowania grup, które się różniły zastosowano testy post-hoc. Do analizy zmiennych jakościowych zastosowano test  $\chi^2$ . W ocenie korelacji pomiędzy poszczególnymi parametrami zastosowano test korelacji rang Spearmana. Poziom istotności wszystkich analiz statystycznych ustalono na poziomie  $\alpha = 0,05$ . Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą programu Statistica 13.0 PL dla systemu Windows.

## 4. Wyniki

### 4.1. Stężenie sDlk-1 w grupie badanej i grupie kontrolnej.

Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w stężeniu sDlk-1 w surowicy pomiędzy grupą badaną i grupą kontrolną (Tabela 6).

Tabela 6. Porównanie sDlk-1 w grupie badanej i grupie kontrolnej.

	Grupa z akromegalii (n=83)			Grupa kontrolna (n=39)			p
	Średnia; ± SD	Min	Max	Średnia; ± SD	Min	Max	
sDlk-1 (pg/ml)	15 389,72 ± 8371,97	4 492,48	33 772,0	18 397,81 ± 9 311,12	798,88	33 772,0	NS

### 4.2. Stężenie sDlk-1 w grupach z akromegalią na różnych etapach aktywności choroby.

Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w stężeniu sDlk-1 w surowicy pomiędzy pacjentami z akromegalią aktywną, kontrolowaną i wyleczoną (Tabela 7).

Tabela 7. Porównanie stężenia sDlk-1 u pacjentów z akromegalią na różnych etapach choroby.

	stężenia białka sDlk-1 (pg/ml)		
	N	Średnia ± SD	p
Akromegalia aktywna	16	16 681,73 ± 10 479	NS
Akromegalia AW	21	13 309,71 ± 6 597	
Akromegalia AS	46	15 889,9 ± 8 301	

### 4.3. Stężenie sDlk-1 w grupie pacjentów z akromegalią stosujących analogi somatostatyny w porównaniu do grupy nie stosującej takiego leczenia.

Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w stężeniu sDlk-1 w surowicy pomiędzy pacjentami z akromegalią w trakcie leczenia analogami somatostatyny a pacjentami z akromegalią nie stosujących takiego leczenia (Tabela 8).

Tabela 8. Stężenia sDlk-1 u pacjentów z akromegalią stosujących analogi somatostatyny w porównaniu do pacjentów nie stosujących tego leczenia (N=83).

sDlk-1		
Średnia (grupa leczona analogami somatostatyny) ± SD	Średnia (grupa nie stosująca leczenia analogami somatostatyny) ± SD	<i>p</i>
16 276,13 ± 8 536	15 105,0 ± 8 195	NS

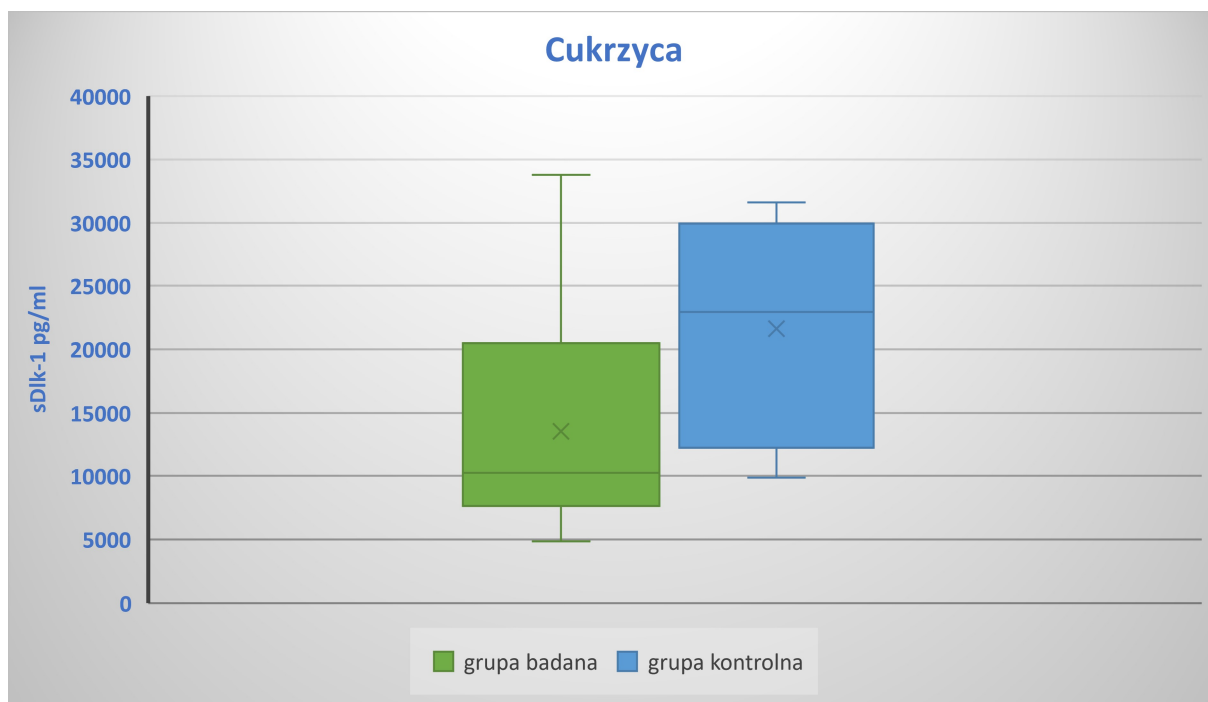
### 4.4. Porównanie pacjentów w grupie badanej i grupie kontrolnej w zależności od istniejących zaburzeń towarzyszących.

#### 4.4.1. Cukrzyca

Stwierdzono istotne statystycznie niższe stężeniem sDlk-1 u pacjentów z cukrzycą w grupie badanej w porównaniu do grupy kontrolnej (Tabela 9).

Tabela 9. Stężenie sDlk-1 u pacjentów z cukrzycą.

	Pacjenci z rozpoznaną cukrzycą		
	Średnia (grupa badana) ± SD	Średnia (grupa kontrolna) ± SD	<i>p</i>
sDlk-1 (pg/ml)	13 562,86 ± 7 853	21 617,27 ± 8 556	<0,05



Rycina 6. Porównanie stężenia sDlk-1 u pacjentów z cukrzycą w grupie badanej i grupie kontrolnej.

#### 4.4.2. Stan przedcukrzycowy

Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w stężeniu sDlk-1 w surowicy pomiędzy pacjentami w stanie przedcukrzycowym w grupie badanej względem grupy kontrolnej (*Tabela 10*).

Tabela 10. Stężenie sDlk-1 u pacjentów w stanie przedcukrzycowym.

	Stan przedcukrzycowy		
	Średnia (grupa badana) ± SD	Średnia (grupa kontrolna) ± SD	<i>p</i>
sDlk-1 (pg/ml)	15 896,33 ± 8 717	21 359,24 ± 9 130	NS

#### 4.4.3. Insulinooporność

Stwierdzono istotne statystycznie różnice w stężeniu sDlk-1 w surowicy pomiędzy pacjentami z rozpoznaną insulinoopornością w grupie badanej względem grupy kontrolnej (Tabela 11).

Tabela 11. Stężenie sDlk-1 u pacjentów z insulinoopornością.

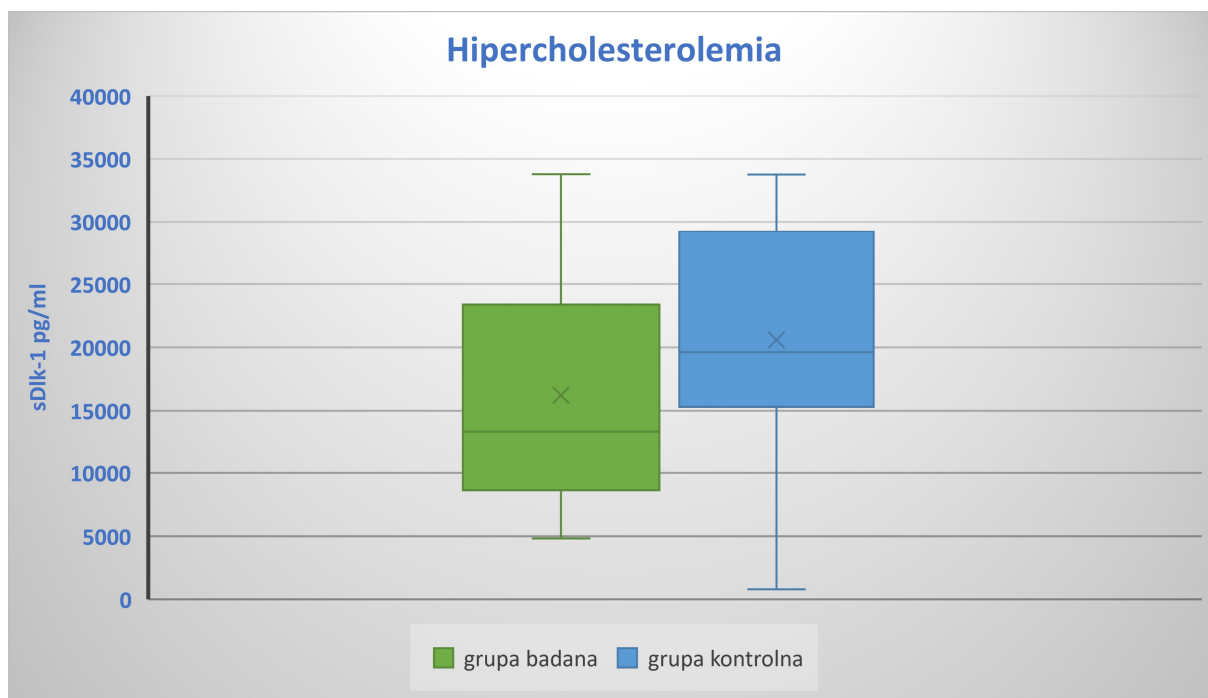
	Pacjenci z insulinoopornością		
	Średnia (grupa badana) ± SD	Średnia (grupa kontrolna) ± SD	<i>p</i>
sDlk-1 (pg/ml)	16 726,82 ± 8 635	21 182,38 ± 8 464	<0,05

#### 4.4.4. Hipercholesterolemia

Stwierdzono istotne statystycznie różnice pomiędzy stężeniem sDlk-1 u pacjentów z hipercholesterolemią w grupie badanej. Obecność hipercholesterolemii była związana z niższym stężeniem białka sDlk-1 w grupie badanej. (Tabela 12).

Tabela 12. Stężenie sDlk-1 u pacjentów z hipercholesterolemią.

	Pacjenci z hipercholesterolemią		
	Średnia (grupa badana) ± SD	Średnia (grupa kontrolna) ± SD	<i>p</i>
sDlk-1 (pg/ml)	16 206,19 ± 8 687	20 595,28 ± 8 640	<0,05



Rycina 7. Porównanie stężenia sDlk-1 u pacjentów z hipercholesterolemią w grupie badanej i grupie kontrolnej.

#### 4.4.5. Dyslipidemia aterogenna

Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w stężeniu sDlk-1 w surowicy pomiędzy pacjentami z rozpoznaną dyslipidemią aterogenną w grupie badanej względem grupy kontrolnej (Tabela 13).

Tabela 13. Stężenie sDlk-1 u pacjentów z dyslipidemią aterogenną.

	Dyslipidemia aterogenna		
	Średnia (grupa badana) ± SD	Średnia (grupa kontrolna) ± SD	<i>p</i>
sDlk-1 (pg/ml)	17 492,52 ± 8 607	18 455,89 ± 8 884	NS



#### 4.4.6. Nadwaga

Stwierdzono istotne statystycznie różnice pomiędzy stężeniem sDlk-1 u pacjentów z nadwagą w grupach. Obecność nadwagi była związana z niższym stężeniem białka sDlk-1 w grupie badanej (Tabela 14).

Tabela 14. Stężenie sDlk-1 u pacjentów z nadwagą.

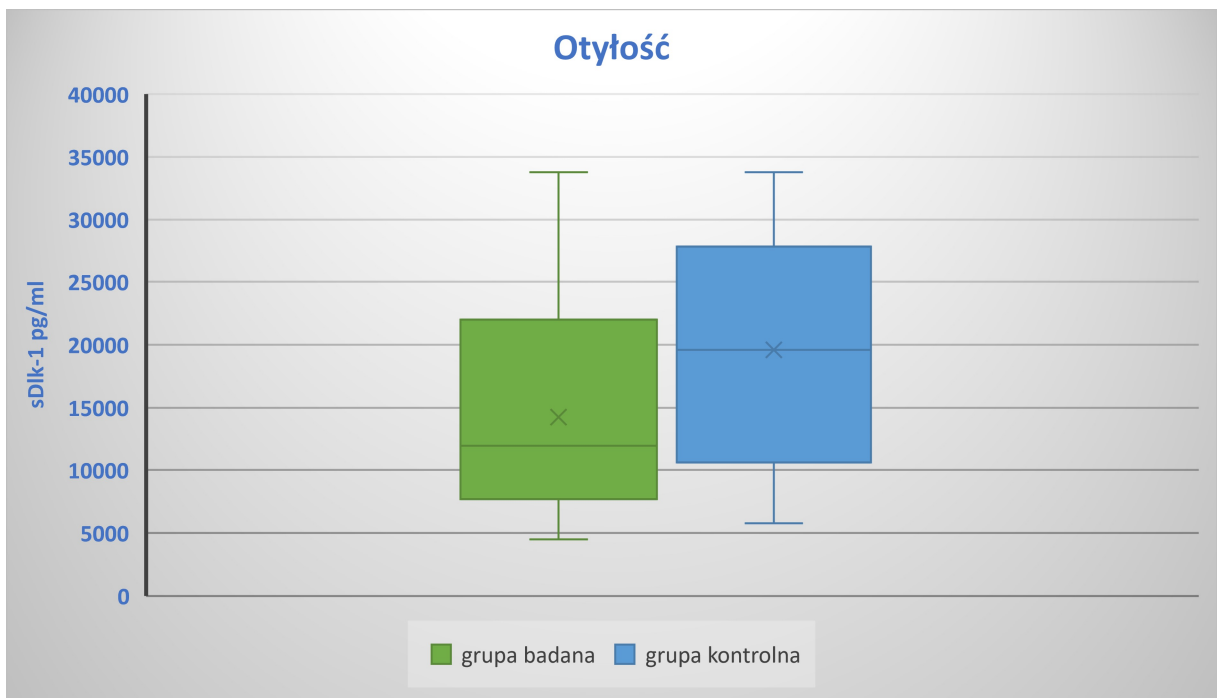
Zmienna	Nadwaga		
	Średnia (grupa badana) ± SD	Średnia (grupa kontrolna) ± SD	<i>p</i>
sDlk-1 (pg/ml)	14 248,45 ± 7 720	19 594,38 ± 9 063	<0,05

#### 4.4.7. Otyłość

Stwierdzono istotne statystycznie różnice pomiędzy stężeniem sDlk-1 u pacjentów z otyłością. Obecność otyłości była związana z niższym stężeniem białka sDlk-1 w grupie badanej (Tabela 15).

Tabela 15. Stężenie sDlk-1 u pacjentów z otyłością.

Zmienna	Otyłość		
	Średnia (grupa badana) ± SD	Średnia (grupa kontrolna) ± SD	<i>p</i>
sDlk-1 (pg/ml)	16 236,12±8 773	26 057,60±8 350	<0,05



Rycina 8. Porównanie stężenia sDlk-1 u pacjentów z otyłością w grupie badanej i grupie kontrolnej.

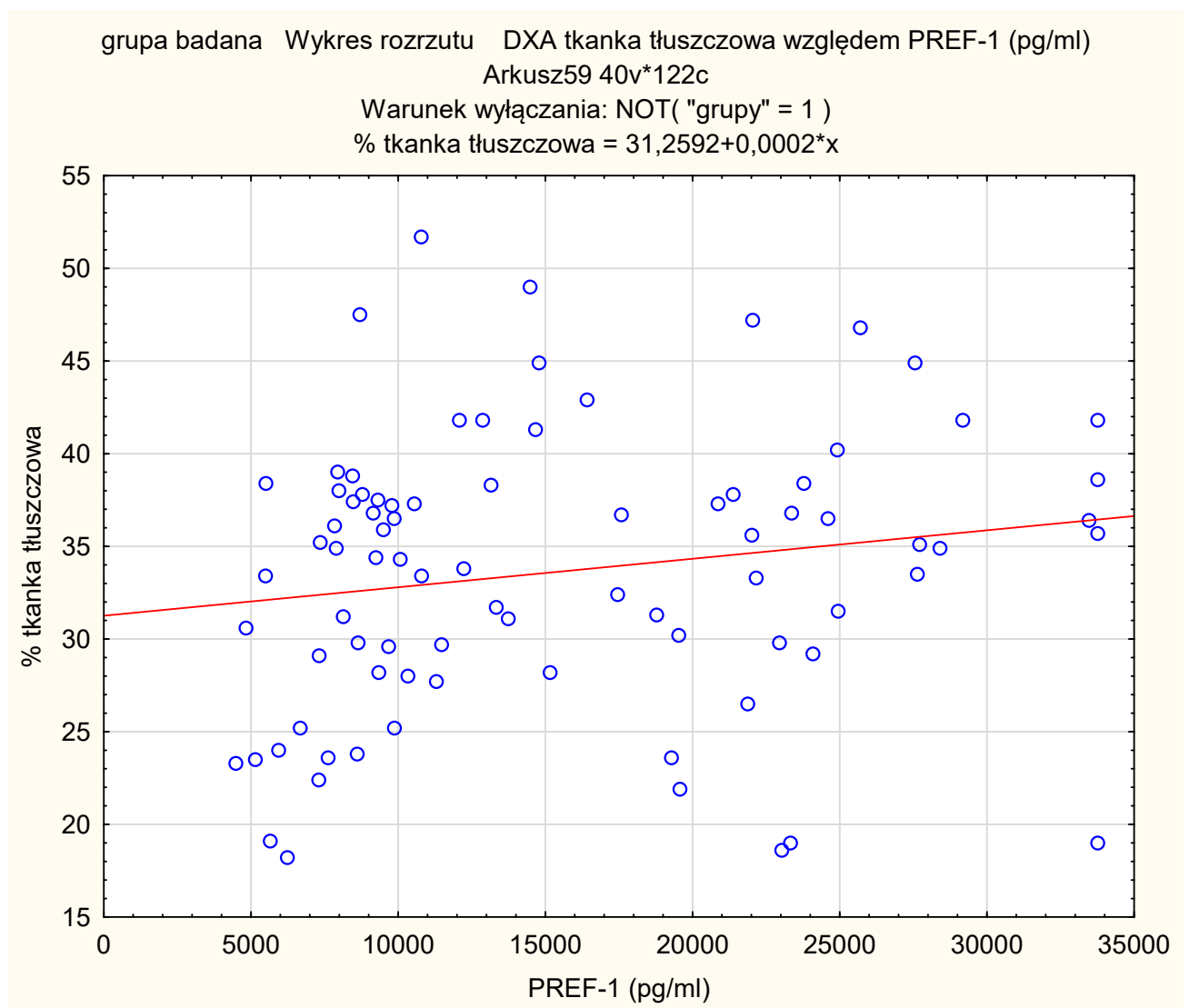
## 4.5. Analiza korelacji

### 4.5.1. Analiza korelacji pomiędzy stężeniem sDlk-1 a wybranymi parametrami w grupie badanej.

Stwierdzono istotną statystycznie dodatnią korelację pomiędzy stężeniem sDlk-1 a procentową zawartością tkanki tłuszczowej w badaniu DXA. Nie stwierdzono istotnej statystycznie korelacji pomiędzy stężeniem sDlk-1 w surowicy a stężeniem GH, IGF-1, masą tkanki tłuszczowej i beztłuszczową masą ciała w grupie badanej (Tabela 16).

Tabela 16. Analiza korelacji pomiędzy stężeniem sDlki-1 w grupie badanej (N=83).

Para zmiennych	Korelacja porządku rang Spearmana (	
	R	p
% tkanka tłuszczowa & sDlk-1 (pg/ml)	0,24	<0,05
masa tłuszczowa (FM) & sDlk-1 (pg/ml)	0,10	NS
masa beztłuszczowa (LM) & sDlk-1 (pg/ml)	-0,13	NS
BMI (kg/m <sup>2</sup> ) & sDlki-1 (pg/ml)	0,06	NS
sDlk-1 (pg/ml) & GH	-0,01	NS
sDlk-1 (pg/ml) & IGF-1 (ng/ml)	-0,03	NS



Rycina 9. Analiza korelacji pomiędzy stężeniem sDlk-1 a % tkanki tłuszczowej w grupie badanej.

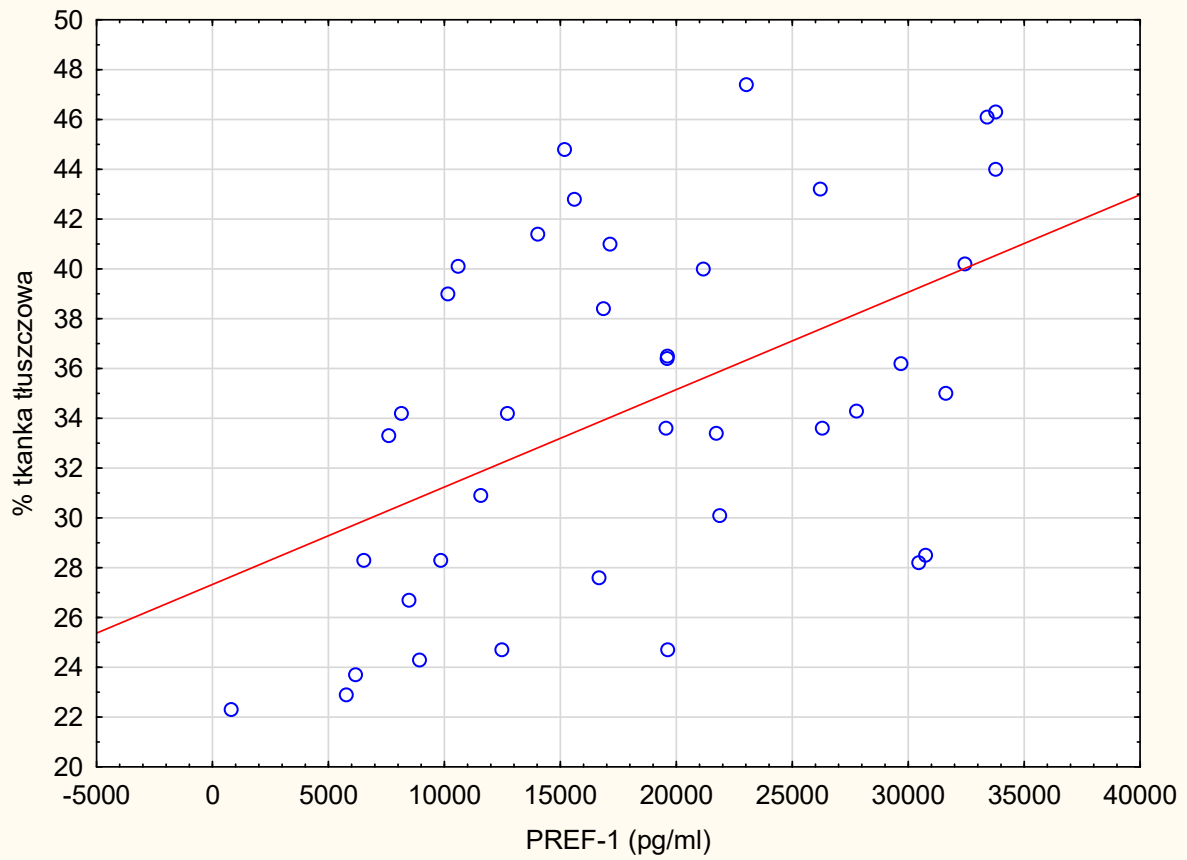
#### 4.5.2. Analiza korelacji pomiędzy stężeniem sDlk-1 a wybranymi parametrami w grupie kontrolnej

Stwierdzono istotną statystycznie dodatnią korelację pomiędzy stężeniem sDlk-1 a procentową zawartością tkanki tłuszczowej w badaniu DXA oraz pomiędzy stężeniem sDlk-1 a masą tkanki tłuszczowej (FM) w grupie kontrolnej. (Tabela 17).

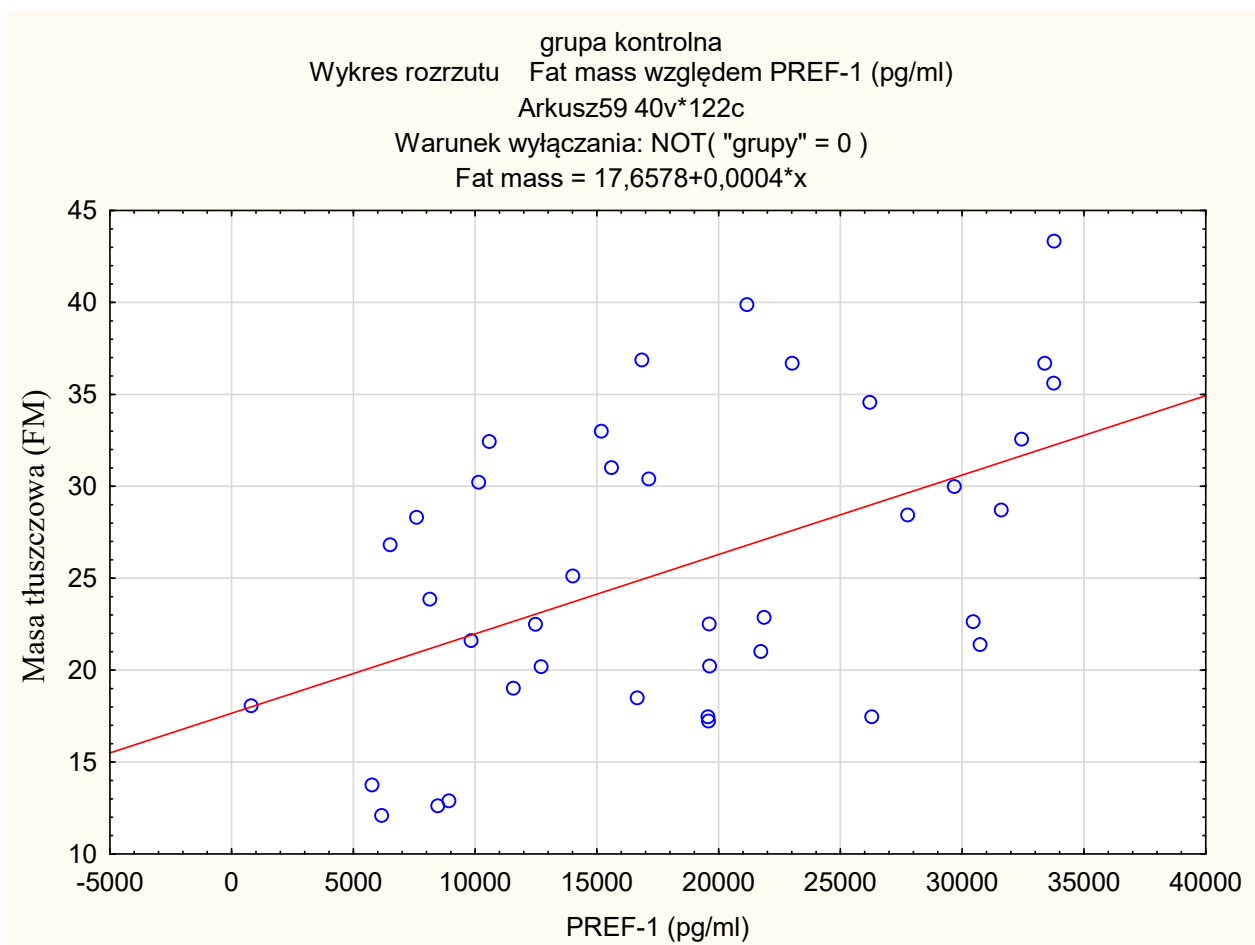
Tabela 17. Analiza korelacji pomiędzy stężeniem sDlk-1 w grupie kontrolnej (N=39).

Para zmiennych	Korelacja porządku rang Spearmana	
	R	p
masa beztłuszczowa (LM) & sDlk-1 (pg/ml)	-0,11	NS
masa tłuszczowa (FM) & sDlk-1 (pg/ml)	0,48	<0,01
% tkanka tłuszczowa & sDlk-1 (pg/ml)	0,53	<0,001

grupa kontrolna  
Wykres rozrzutu DXA tkanka tłuszczowa względem PREF-1 (pg/ml)  
Arkusz59 40v\*122c  
Warunek wyłączenia: NOT( "grupy" = 0 )  
DXA tkanka tłuszczowa = 27,3317+0,0004\*x



Rycina 10. Analiza korelacji pomiędzy stężeniem sDlk-1 a % tkanki tłuszczowej w grupie kontrolnej.



Rycina 11. Analiza korelacji pomiędzy stężeniem sDlk-1 a masą tkanki tłuszczowej w grupie kontrolnej.

## 5. Dyskusja

### 5.1. Stężenie sDlk-1 w całej grupie pacjentów z akromegalią

W pierwszej analizie oceniono zależności i różnice stężenia sDlk-1 w dwóch grupach: w grupie badanej oraz grupie kontrolnej. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w stężeniu sDlk-1 w surowicy pomiędzy grupą badaną i grupą kontrolną. Grupę badaną stanowili pacjenci z akromegalią na różnych etapach choroby. Obejmowali oni spektrum pacjentów z akromegalią aktywną, akromegalią kontrolowaną za pomocą farmakoterapii analogami somatostatyny oraz pacjentów z akromegalią po skutecznym zabiegu resekcji somatotropinoma. Grupa ta charakteryzowała się statystycznie większym stężeniem GH oraz IGF-1 w surowicy na czczo w porównaniu do grupy kontrolnej oraz spodziewaną większą beztłuszczową masą ciała. Uzyskane wyniki potwierdzają prawidłową kwalifikację pacjentów do wybranych grup.

Zgodnie z uzyskanymi wynikami sDlk-1 nie może służyć za marker obecności ani aktualnej aktywności guza przysadki typu somatotropinoma. Należy jednak podkreślić, że w badaniu oceniono stężenie rozpuszczalnej postaci Dlk-1 w surowicy, tak więc ilość form transbłonowych Dlk-1 w tkance resztkowej somatotropinoma i w komórkach przedniego płata przysadki pozostaje nieznana.

Do tej pory w literaturze ukazało się kilka publikacji sugerujących związek stężenia GH z sDlk-1, większość badań była jednak prowadzona *in vitro* lub *in vivo* na koloniach gryzoni [69, 78, 91]. Natomiast na podstawie badania zdrowych ochotników wykluczono wspólny szlak sekrecji GH i sDlk-1 [81].

Wśród nielicznej dostępnej literatury badającej istotę problemu u ludzi z zaburzeniami funkcji osi somatotropowej znajduje się praca Andersena i wsp. Oceniali oni stężenie sDlk-1 w surowicy pacjentów z niedoczynnością somatotropową przysadki poddanych leczeniu ludzkim rekombinowanym GH. Stężenie sDlk-1 były znacząco wyższe w porównaniu z grupą placebo podczas 3-miesięcznej terapii GH, co ciekawe wraz z upływem czasu leczenia (6, 9 i 12 miesięcy) wpływ ten stawał się coraz mniej wyraźny. Ograniczeniem wspomnianej pracy była niewątpliwie mała liczba uczestników (12 osób z niedoczynnością somatotropową przysadki) [81].



Sze i wsp. oceniali z kolei związek sDlk-1 i GH u pacjentów z akromegalią rozpoznaną *de novo* przed zabiegiem operacyjnym i po skutecznej interwencji neurochirurgicznej, obserwacje trwały 1-3 miesięcy. Po stwierdzeniu remisji choroby badacze zauważyli istotny statystycznie obniżenie stężenia sDlk-1 [79]. Nie uwzględniono jednak w pracy wielu zmiennych. Należy zauważyć, że przemiany metaboliczne po zabiegu neurochirurgicznym nie muszą wiązać się jedynie z wpływem samego GH, mogą również odzwierciedlać pooperacyjną niedoczynność przysadki, a także wpływ substytucji hormonalnej. Przykładem jest tu stosowanie zróżnicowanego schematu glikokortykosteroidoterapii w leczeniu zastępczym po operacji.

Biorąc pod uwagę powyższe obserwacje, w przypadku dwóch skrajnie różnych stanów klinicznych związanych z nieprawidłowościami osi somatotropowej, ostre zmiany (do 1 lub 3 miesięcy) w zakresie stężenia GH wpływały na istotne zmiany stężenia sDlk-1 w surowicy. Intrygującym pozostaje pytanie czy wynikało to z bezpośredniego czy pośredniego wpływu GH na przemiany Dlk-1. Być może obserwowane wahania sDlk-1 pod wpływem zmieniających się stężeń GH są związane zarówno z enzymatycznym uwalnianiem domeny zewnątrzkomórkowej Dlk-1 jak i jego ekspresją transbłonową w obrębie dostępnych puli komórkowych.

Interesującą obserwację w aspekcie przemian tkanki tłuszczowej i sDlk-1 poczynili Andries i wsp. W swoich obserwacjach klinicznych porównywali poziomy sDlk-1 u pacjentów w skrajnych stanach odżywienia. Stwierdzili oni, że zarówno u chorych z jadłowstrętem psychicznym jak i z otyłością III stopnia stężenia sDlk-1 nie przedstawiają istotnych statystycznie różnic. Co ciekawe sytuacja zmieniała się wraz z dynamiką przemian w zakresie składu masy ciała, przyrostowi i utracie wagi towarzyszyły odpowiednio wzrost i spadek sDlk-1 [92].

Potencjalnym wyjaśnieniem braku różnic pomiędzy pacjentami z akromegalią a grupą kontrolną w niniejszym opracowaniu może być więc fakt, że sDlk-1 oceniano u chorych z akromegalią w stanie stabilnych stężeń GH i IGF-1 w sytuacji, kiedy nastąpił stan swoistej równowagi, którym nie towarzyszyła dynamika zmian w aspekcie przemian metabolicznych czy też składu masy ciała. W przytoczonych powyżej przykładach z piśmiennictwa farmakologiczna i „pozabiegowa” zmienność poziomów GH skutkowałą odpowiednią zmianą stężenia krążącego sDlk-1.

Innym wytłumaczeniem braku różnic w stężeniu sDlk-1 w surowicy pomiędzy grupą badaną i grupą kontrolną może być fakt, że sDlk-1 jest eliminowany z krążenia przez nerki wraz z moczem. Zbyt szybka eliminacja sDlk-1 w akromegalii nie byłaby nieoczekiwanym zjawiskiem, biorąc pod uwagę, że jak powszechnie wiadomo, nadmiar GH i IGF-1 wpływa na zwiększoną filtracją kłębuszkową, co może skutkować obniżeniem puli krążącego białka w surowicy. Jensen i wsp. wykazali, że przypadku przewlekłej niewydolności nerek sDlk-1 w surowicy może być nawet 10-krotnie podwyższone [64].

## **5.2. Stężenie sDlk-1 w poszczególnych podgrupach pacjentów z akromegalią**

Oceniono stężenie sDlk-1 w surowicy na różnych etapach aktywności akromegalii: u pacjentów z chorobą aktywną, kontrolowaną za pośrednictwem analogów somatostatyny oraz u pacjentów z prawidłową kontrolą choroby po skutecznym zabiegu operacyjnym.

Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w zakresie stężenia sDlk-1 pomiędzy badanymi grupami chorych na akromegalię. Wysoki poziom GH u pacjentów z akromegalią aktywną, nie znalazł odzwierciedlenia w poziomie sDlk-1. Co więcej w akromegalii stężenie sDlk-1 nie koreluje ze stężeniami GH czy IGF-1.

Powyzsza obserwacja świadczy o tym, że stężenie sDlk-1 w krążeniu nie zależy bezpośrednio od wpływu nadmiernego wydzielania GH. Choć sDlk-1 hamuje różnicowanie adipocytów i może pośredniczyć w antyadipogennym działaniu GH, co potwierdzono *in vitro* [78]. Zjawiska tego nie da się wytłumaczyć jedynie na gruncie analizy hormonalnej. Tym bardziej, że wciąż pojawiają się nowe obserwacje kliniczne dotyczące sDlk-1, które przedstawiają sprzeczne wyniki [92-95].

Jak wiadomo nadmiar GH w akromegalii prowadzi do zmniejszenia masy tkanki tłuszczowej i rozwoju insulinooporności; oba zjawiska podlegają u większości pacjentów odwróceniu po uzyskaniu remisji choroby. Jest to proces dynamiczny, który z czasem ulega stabilizacji. Dlatego sDlk-1 może służyć nie tylko za wskaźnik składu ciała, stanu hormonalnego czy specyficznej choroby, ale może okazać się czynnikiem wiążącym aktualny stan metaboliczny ze zmianami masy tłuszczowej. To mogłoby wyjaśniać dlaczego stężenie sDlk-1 nie różni się pomiędzy poszczególnymi grupami pacjentów na różnych etapach aktywności choroby. Podlega jednak zmianom w okresie przechodzenia z jednego stanu

aktywności w drugi, jak ma to miejsce u pacjentów po resekcji somatotropinoma lub przy wahaniach masy ciała u osób bez zaburzeń osi somatotropowej [79, 81].

### **5.2.1. Stężenie sDlk-1 u pacjentów z akromegalią, którzy byli leczeni analogami somatostatyny**

Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w stężeniu sDlk-1 w surowicy pomiędzy pacjentami z akromegalią w trakcie leczenia analogami somatostatyny a pacjentami z akromegalią nie stosujących takiego leczenia, jak i w porównaniu do grupy kontrolnej. Powyższe wyniki mogą świadczyć o tym, że analogi somatostatyny nie mają wpływu na stężenie sDlk-1.

Analogi somatostatyny są ligandami receptorów znajdujących się na komórkach gruczolaków somatotropowych przysadki. Za ich pośrednictwem leki te zmniejszają sekrecję GH, co doprowadza do normalizacji stężenia IGF-1, a także wiąże się z redukcją objętości guza [27-28, 96].

Leczenie akromegalii analogami somatostatyny silnie wpływa na skład ciała. Od początku leczenia, aż do uzyskania remisji biochemicznej choroby, charakteryzuje się wzrostem masy tłuszczowej i spadkiem masy beztłuszczowej. Zmiany te są ściśle związane z normalizacją wydzielania IGF-1. Podsumowując, skuteczna redukcja IGF-I za pośrednictwem analogów somatostatyny, powodują istotne zmiany w składzie ciała u pacjentów z akromegalią. Dowiedziono ponadto, że obniżenie stężenia IGF-1 jest najważniejszym predyktorem przyrostu masy tłuszczowej i utraty masy beztłuszczowej [21, 97].

W literaturze opisano przykład 6 z 7 pacjentów z aktywną akromegalią, u których stwierdzono istotne obniżenie stężenia sDlk-1 po uzyskaniu remisji w leczenia analogiem somatostatyny I generacji (oktreotyd). Przyczyna tego efektu nie była jednoznaczna, mogła wynikać z remisji choroby podstawowej lub samego działania analogów somatostatyny I generacji. Jedyne pacjent, u którego nie obserwowano obniżenia stężenia sDlk-1, nie uzyskał kontroli choroby podstawowej podczas terapii oktreotydem [81].

Biorąc pod uwagę obecnie przedstawione wyniki, wydaje się mało prawdopodobnym, aby analogi somatostatyny bezpośrednio wpływały na obniżenie krążącego sDlk-1. Jak już wyjaśniano wcześniej, zmiany stężenia sDlk-1 w surowicy mogą być wynikiem dynamicznych

przemian w zakresie metabolizmu i składu masy ciała zachodzących pod wpływem normalizacji funkcji osi somatotropowej.

Znaczenie tych obserwacji może wykraczać poza zakres stanu patologicznego akromegalii. Potrzebne są dalsze prace w celu ustalenia roli sDlk-1 jako biomarkera związanego z funkcją preadipocytów i metabolizmem tkanki tłuszczowej u ludzi.

### **5.2.2. Stężenie sDlk-1 u pacjentów z zaburzeniami gospodarki węglowodanowej (pacjenci z cukrzycą, stanem przedcukrzycowym) w grupie badanej w porównaniu do grupy kontrolnej**

Stwierdzono istotnie statystycznie mniejsze stężenie sDlk-1 u pacjentów z cukrzycą oraz insulinoopornością w grupie kontrolnej w porównaniu do grupy badanej. Nie stwierdzono istotnej statystycznie korelacji pomiędzy sDlk-1 a stanem przedcukrzycowym u pacjentów w grupie badanej względem grupy kontrolnej.

Mechanizmy leżące u podłoża cukrzycy w akromegalii są tylko częściowo podobne do patofizjologii klasycznej cukrzycy typu 2. Pacjenci z akromegalią, w przeciwieństwie do cukrzyków bez akromegalii, mają na ogół obniżoną ilość trzewnej tkanki tłuszczowej, a insulinooporność jest głównie związana z nadmiarem hormonów GH/IGF-1 [98]. W rzeczywistości to nie całkowita ilość tkanki tłuszczowej a jej zaburzenia, odgrywają istotną rolę w rozwoju insulinooporności i upośledzeniu metabolizmu glukozy u pacjentów z akromegalią. Reyes-Vidal i wsp. wykazali, że wśród pacjentów z akromegalią (w porównaniu z osobami zdrowymi) istnieje zwiększona ilość śródmięśniowej tkanki tłuszczowej, pomimo zmniejszenia zawartości trzewnej i podskórnej tkanki tłuszczowej [21]. Ten stan lipotoksyczności, który jest wtórny do lipolitycznego działania GH, ma związek z rozwijającą się insulinoopornością u osób dotkniętych akromegalią. Tkanka tłuszczowa odgrywa kluczową rolę w antagonistycznym wpływie GH na działanie insuliny, objawia się to zmianami metabolizmu węglowodanów i lipidów [99].

Jak widać, odpowiednie różnicowanie i metabolizm tkanki tłuszczowej wpływają na jej zdolność do magazynowania lipidów oraz do ochrony pozostałych tkanek przed stłuszczeniem, a co za tym idzie rozwojem insulinooporności oraz zaburzeniami metabolizmu węglowodanów i wtórnie cukrzycy.

Klötting i wsp. wykazali, że powiększone, dysfunkcyjne adipocyty mają związek z wieloma cechami zespołu metabolicznego, w tym z insulinoopornością, podwyższonym stężeniem trójglicerydów i zwiększonym stopniem stłuszczenia wątroby, wszystkie te czynniki wpływają na wzrost ryzyka rozwoju cukrzycy typu 2 [100].

O'Connell i wsp. wykazali, że osoby z potwierdzoną otyłością trzewną oraz zespołem metabolicznym mają podwyższoną ekspresję transbłonowego Dlk-1 w obrębie tkanki tłuszczowej sieci większej w porównaniu z osobami nie wykazującymi zaburzonego profilu metabolicznego [101].

Kavalkova i wsp. oceniali sDlk-1 w surowicy kobiet otyłych bez dodatkowych obciążeń chorobowych i kobiet otyłych z cukrzycą typu 2 uzyskując wyniki potwierdzające dodatnią korelację sDlk-1 z poziomami insuliny, leptyny i glukozy oraz wskaźnikiem HOMA-IR [94].

W naszych badaniach model ten nie potwierdza się u osób z akromegalią. Obniżone sDlk-1 u pacjentów z cukrzycą typu 2 w grupie badanej może wskazywać na odmienny wzorzec różnicowania i metabolizmu tkanki tłuszczowej u pacjentów z akromegalią, objawiający się między innymi redukcją tkanki tłuszczowej trzewnej.

Należy ponadto pamiętać, że źródłem sDlk-1 w krążeniu są komórki  $\beta$  trzustki. Wang i wsp. potwierdzili, że ludzkie i szczurze komórki  $\beta$  trzustki wydzielają nie tylko insulinę, ale również sDlk-1, choć mechanizmy sekrecji pozostają od siebie niezależne. Długotrwała ekspozycja wysepek trzustkowych szczurzych na wysokie stężenie glukozy, zwiększała wydzielanie sDlk-1 i insuliny [80, 102].

Przewlekły nadmiar GH i IGF-1 w akromegalii zmienia funkcję komórek  $\beta$  wpływając na ich przeżywalność, replikację i syntezę hormonów, a także hamując sekrecję glukagonu [98]. Być może obniżone stężenie sDlk-1 u pacjentów z akromegalią jest świadectwem przewlekłego niekorzystnego działania GH/IGF-1 na funkcję endokrynną trzustki. González i wsp. dowiedli, że przy upośledzeniu funkcji komórek  $\beta$  nieprawidłowy metabolizm glukozy może się utrzymywać nawet po chirurgicznym wyleczeniu akromegalii [103]. Dodatkowo nie można wykluczyć, że wpływ terapii analogami somatostatyny odgrywa rolę w obniżonym stężeniu

sDlk-1, ponieważ leki te upośledzają wydzielanie insuliny poprzez oddziaływanie na komórki wysepek trzustkowych [27, 96, 104].

Według naszej najlepszej wiedzy i po przeanalizowaniu literatury, do tej pory nie opisano korelacji pomiędzy sDlk-1 a cukrzycą u osób z akromegalią. Obniżone stężenie sDlk-1 u pacjentów z cukrzycą w grupie badanej może więc potwierdzać odrębny i charakterystyczny dla akromegalii metabolizm tkanki tłuszczowej trzewnej. Nie możemy ponadto wykluczyć wpływu zaburzeń w obrębie komórek  $\beta$  trzustki zachodzących u pacjentów w efekcie nadmiernego działania GH i IGF-1.

Ten ostatni fenomen może mieć znaczenie w przyszłości przy planowaniu farmakoterapii pacjentów, którzy nie uzyskali remisji po zabiegu operacyjnym. Wiedza na temat upośledzonej funkcji komórek  $\beta$  wysp trzustkowych w przebiegu przewlekłej patologicznej nadaktywności osi GH/IGF-1 może nam umożliwić przewidywanie efektów terapii analogami somatostatyny lub/i agonistą receptora hormonu wzrostu w aspekcie wyrównania gospodarki węglowodanowej, a co za tym idzie ułatwić dobór odpowiedniego leczenia.

### **5.2.3. Stężenie sDlk-1 u pacjentów z zaburzeniami gospodarki lipidowej (hipercholesterolemia, dyslipidemia aterogenna) w grupie badanej w porównaniu do grupy kontrolnej**

Stwierdzono istotne statystycznie różnice pomiędzy stężeniem sDlk-1 u pacjentów z hipercholesterolemią pomiędzy głównymi grupami. Obecność hipercholesterolemii była związana z mniejszym stężeniem białka sDlk-1 w grupie badanej. Nie stwierdzono istotnej statystycznie korelacji pomiędzy sDlk-1 a dyslipidemią aterogenną w badanych grupach.

Zgodnie z obecnym stanem wiedzy, związek sDlk-1 z gospodarką lipidową pozostaje niejednoznaczny. Dysponujemy jedynie pośrednimi przesłankami, które przemawiają za potencjalnym negatywnym wpływem sDlk-1 na rozwój zaburzeń lipidowych. Dotyczy to głównie wpływu Dlk-1 na regulację masy tłuszczowej *in vivo*, co może sprzyjać dyslipidemii.

W badaniach na modelu zwierzęcym Sul i wsp. wykazali, że transgeniczne myszy z nadekspresją Dlk-1 prezentowały znaczną utratę tkanki tłuszczowej, hipertrójglicydemię, hipercholesterolemię, upośledzoną tolerancję glukozy i zmniejszoną wrażliwość na insulinę.

Zmniejszeniu masy tkanki tłuszczowej i wielkości adipocytów u myszy transgenicznych towarzyszył wzrost stężenia krążących wolnych kwasów tłuszczowych i trójglicerydów, zarówno na czczo, jak i po posiłku. Odzwierciedlało to fakt, że transgeniczne myszy Dlk-1 mają zmniejszoną zdolność magazynowania trójglicerydów w tkance tłuszczowej. W badaniach *in vivo* zahamowanie różnicowania preadipocytów przez Dlk-1, objawiało się zmniejszoną ekspresją dojrzałych markerów adipocytów w obrębie tkanki tłuszczowej, a w konsekwencji zmniejszeniem zdolności do magazynowania trójglicerydów i wydzielania adipokin takich jak leptyna i adiponektyna. Dodatkowo myszy z nadekspresją Dlk-1 były silnie odporne na insulinę, głównie z powodu zmniejszenia wychwytu glukozy stymulowanego insuliną w mięśniach szkieletowych i tkance tłuszczowej [76].

Andersen *in* wsp. potwierdzili, że sDlk-1 obniża poziom ekspresji adiponektyny *in vitro*. Jest to ważny fakt, ponieważ jest to adipokina, która bierze udział w regulacji metabolizmu tłuszczów i insulinowrażliwości, o bezpośrednim działaniu przeciwcukrzycowym, przeciwmiażdżycowym i przeciwzapalnym. Dowodzi to również, że sDlk-1 ma funkcję plejotropową i jest zaangażowany w wielu procesach rozwojowych i metabolicznych [105].

Badania dotyczące zależności sDlk-1 z zaburzeniami gospodarki lipidowej u ludzi są nieliczne i niejednoznaczne.

Cleaton *i* wsp. wykazali, że krążące sDlk-1 ciężarnych jest pochodzenia płodowego i wpływa na metabolizm matki między innymi poprzez wzrost utleniania kwasów tłuszczowych. Zauważyli oni u kobiet spadek stężenia cholesterolu całkowitego i cholesterolu HDL [106]. Demir *i* wsp. sugerowali obecność korelacji między HDL-C a sDlk-1 jako markerów zaburzeń metabolicznych i insulinooporności u kobiet ciężarnych [107].

W niniejszej pracy stwierdzono istotne statystycznie mniejsze stężenie sDlk-1 u pacjentów z hipercholesterolemią w grupie badanej względem grupy kontrolnej. Nie stwierdzono jednak bezpośredniej korelacji między stężeniem sDlk-1 a stężeniem cholesterolu całkowitego czy LDL-C w tej grupie. Nie znaleźliśmy do tej pory opracowań, do których można porównać powyższe wyniki.

Należy jednak pamiętać, że w akromegalii istotne z punktu widzenia przemian lipidowych są podwyższone poziomy krążących lipoprotein (Lp-A, Apo A-I i Apo E), które

biorą udział w transporcie trójglicerydów, cholesterolu i małych gęstych cząstek LDL. One sprzyjają rozwojowi uszkodzeń naczyń i miażdżycy, co może wiązać się z powikłaniami sercowo-naczyniowymi w tej grupie chorych.

Brak zależności w aspekcie dyslipidemii aterogennej w badanych grupach przemawia za tym, że krążący sDlk-1 jest słabym, jeżeli w ogóle, markerem tych zaburzeń. Jednak należy podkreślić, że do wysunięcia przekonujących wniosków wskazana jest kontynuacja badań w tej kwestii z uwzględnieniem modeli dynamicznych, o czym wspomiano wyżej.

#### **5.2.4. Stężenie sDlk-1 u pacjentów z zaburzeniami masy ciała (nadwaga, otyłość) u pacjentów w grupie badanej w porównaniu do grupy kontrolnej**

Stwierdzono istotne statystycznie różnice pomiędzy stężeniem sDlk-1 u pacjentów z nadwagą w grupie badanej. Obecność nadwagi była związana z niższym stężeniem białka sDlk-1 w grupie badanej. Stwierdzono istotne statystycznie różnice pomiędzy stężeniem sDlk-1 u pacjentów z otyłością w grupie badanej. Obecność otyłości była związana z niższym stężeniem białka sDlk-1 w grupie badanej.

Stwierdzono istotną statystycznie korelację pomiędzy stężeniem sDlk-1 a procentową zawartością tkanki tłuszczowej zarówno w grupie badanej jak i grupie kontrolnej. Dodatkowo w grupie kontrolnej stwierdzono istotną statystycznie dodatnią korelację między sDlk1 a masą tkanki tłuszczowej. Korelacji tej nie stwierdzono w grupie badanej.

Otyłość jest wynikiem dwóch procesów: hipertrofii pojedynczych komórek tłuszczowych w wyniku akumulacji lipidów oraz zwiększonej liczby adipocytów, które powstają z prekursorowych mezenchymalnych komórek macierzystych tkanki tłuszczowej pod wpływem odpowiednich sygnałów żywieniowych i hormonalnych [108]. Różnicowanie i metabolizm tkanki tłuszczowej jest niezwykle istotny, ponieważ wpływa na jej zdolność do magazynowania lipidów oraz do ochrony pozostałych tkanek przed stłuszczeniem i rozwojem insulinooporności. Kilka badań wykazało, że jednym z głównych efektów sDlk-1 na ludzkie monocyty i linie komórkowe adipocytów *in vitro* jest zwiększenie ekspresji niektórych cytokin prozapalnych [91].



Przez lata badania nad związkiem Dlk-1/sDlk-1 z otyłością koncentrowały się na modelach tkanki tłuszczowej myszy lub ich komórkach badanych *in vitro*. W tych modelach wysoki poziom sDlk-1 skutkował zmniejszoną masą tłuszczową w sposób zależny od stężenia sDlk-1. Odwrotnie zaś myszy pozbawione genu Dlk-1 wykazywały zwiększony przyrost masy ciała w wyniku wzrostu masy tkanki tłuszczowej, charakteryzowały się ponadto powiększoną tłuszczoną wątrobą, podwyższonym poziomem trójglicerydów, cholesterolu i wolnych kwasów tłuszczowych w surowicy [59, 61, 76]

Co więcej przeprowadzone poprzednio badania na koloniach myszy pozwalały wysunąć hipotezę że Dlk-1 hamuje przerost adipocytów w otyłości. Chacón i wsp. zaprzeczyli tym twierdzeniom. Oceniali oni tkankę tłuszczową myszy, u których zastosowano dietę bogatotłuszczową, w oparciu o kolonie myszy z ekspresją sDlk-1 i bez tej ekspresji (Dlk-1/- versus Dlk-1+/+). U myszy pozbawionych Dlk-1 przyrost procentowy tkanki tłuszczowej oraz objętość adipocytów były mniejsze niż u myszy Dlk-1+/+. Co więcej, u organizmów pozbawionych Dlk-1 nie rozwijała się insulinooporność, mimo stosowania diety bogatotłuszczowej [91].

Podobne obserwacje poczynili Cleaton i wsp. W przeciwieństwie do poprzednich modeli nadekspresja Dlk-1 u transgenicznym myszy nie powodowała redukcji odsetka tkanki tłuszczowej nawet w warunkach metabolicznego stresu. To zaskakujące odkrycie podważyło dogmat, że normalną funkcją Dlk-1 jest negatywna regulacja adipogenezy. Co ciekawe odkryli oni ponadto, że myszy z nadekspresją Dlk-1 miały podwyższoną produkcję przysadkowego hormonu wzrostu z powodu lokalnego defektu sprzężenia zwrotnego IGF-1 [106].

Badań oceniających korelację pomiędzy sDlk-1 a otyłością u ludzi jest niewiele i przedstawiają odmienne wyniki. Rozbieżności mogą wynikać z różnic w doborze populacji, obciążen chorobowych uczestników badań, występującej otyłości lub stopnia zaburzeń metabolicznych.

Jensen i wsp. zauważyli dodatnią korelację pomiędzy stężeniem sDlk-1 a zwiększoną masą tkanki tłuszczowej trzewnej u zdrowych mężczyzn bez obciążen otyłością czy cukrzycą. Powyższa obserwacja wyklucza hipotezę, że sDlk-1 działa zawsze jako inhibitor adipogenezy *in vivo*. Dodatkowo potwierdzono odwrotną zależność pomiędzy stężeniem sDlk-1, a insulinoopornością. sDlk-1 korelował dodatnio z wskaźnikiem HOMA-IR. Zależności te

pozostawały bez związku z wiekiem, poziomem BMI czy procentową zawartością tkanki tłuszczowej [109].

Kavalkova i wsp. oceniali wyjściowe stężenia sDlk-1 w surowicy osób otyłych, bez dodatkowych obciążeń chorobowych, stwierdzono jedynie nieistotną tendencję do wyższych poziomów sDlk-1 w grupie badanej w porównaniu z grupą kontrolną [94].

O'Connell i wsp. dowiedli, że ekspresja Dlk-1 w obrębie tkanki tłuszczowej sieci większej była niższa i tkanka ta prezentowała korzystniejszy profil cytokin prozapalnych u osób otyłych, u których nie stwierdzono zaburzeń metabolicznych pod postacią cukrzycy, insulinooporności, hipertrójglicydemii czy lipotoksyczności [101]. Większa ekspresja Dlk-1 u osób z niekorzystnym profilem metabolicznym mogłyby ograniczać różnicowanie preadipocytów, zmuszając dojrzałe komórki tłuszczowe do pobierania dalszych lipidów i zwiększania rozmiaru. Odkrycia te potwierdzają rolę Dlk-1 jako inhibitora różnicowania preadipocytów.

Witzmann i wsp. obserwowali podwyższone poziomy sDlk-1 u osób uzależnionych od alkoholu niezależnie od płci. Stwierdzili ponadto ujemną korelację procentową masą tkanki tłuszczowej, co powiązali z hamującym wpływem sDlk-1 na jej ekspansję. Występowała również istotna korelacja pomiędzy sDlk-1 a stężeniem wolnych kwasów tłuszczowych w osoczu [95].

W obecnym badaniu stwierdziliśmy istotną statystycznie, dodatnią korelację pomiędzy stężeniem sDlki-1, a procentową masą tkanki tłuszczowej w obu grupach badanej i kontrolnej, z uwzględnieniem istnienia takiej korelacji również w obrębie masy tłuszczowej całego ciała (*total body*) w grupie kontrolnej. Przy czym osoby z nadwagą i otyłością cechowały się istotnym statystycznie mniejszym stężeniem sDlk-1 w grupie badanej w porównaniu do grupy kontrolnej.

Przeprowadzone przez nas badania potwierdzają, że *in vivo* sDlk-1 koreluje dodatnio z masą tkanki tłuszczowej. Podobne wnioski obserwowano w pojedynczych badaniach przeprowadzonych na pacjentach z otyłością [109]. Wyniki te mogą w pierwszej chwili wydawać się sprzeczne z opublikowanymi wcześniej danymi dotyczącymi badania sDlk-1 na koloniach myszy. Powołując się na dostępne publikacje, można by spodziewać się w tym

przypadku odwrotnej korelacji pomiędzy sDlk-1 a zawartością tkanki tłuszczowej. Pamiętajmy jednak, że nie należy stosować prostego przełożenia pomiędzy modelami. Dobry przykład stanowi tu leptyna. Myszy otyłe wykazują się niskim lub nieoznaczalnym poziomem leptyny, podczas gdy u ludzi sytuacja przedstawia się odwrotnie [32, 34].

Ponadto, jak wspomniano już wcześniej, dodatnia korelacja pomiędzy sDlk-1 i zawartością tkanki tłuszczowej może potwierdzać rolę sDlk-1 jako inhibitora różnicowania preadipocytów, poprzez „zmuszanie” dojrzałych adipocytów do dalszego pobierania lipidów i zwiększania swojego rozmiaru, co w następstwie prowadzi do ekspansji tkanki tłuszczowej.

Istotnie mniejsze stężenia sDlk-1 w grupie badanej u osób otyłych i z nadwagą są najprawdopodobniej związane z odmiennym profilem metabolicznym i strukturalnym pacjentów chorujących na akromegalię.

Powyższe obserwacje dowodzą, że model „otyłości”, w akromegalii różni się od wzorca populacyjnego. Na podwyższony wskaźnik masy ciała (BMI) w tej grupie chorych składa się bowiem wyższa beztłuszczowa masa ciała, z charakterystyczną redystrybucją tkanki tłuszczowej (redukcja VAT) i lipotoksycznością. Odzwierciedleniem tego stanu jest między innymi obserwowana w akromegalii redukcja wydzielania leptyny. Jak wykazano wcześniej, oba markery dodatnio korelują ze sobą [91].

Powyższe obserwacje sugerują, że Dlk-1 nie pełni wyłącznie funkcji inhibitora adipogenezy. Powinien być traktowany jako czynnik posiadający związek z otyłością i wpływający na parametry gospodarki węglowodanowej. Być może w przyszłości stanie się on prognostykiem ryzyka rozwoju powikłań farmakoterapii akromegalii, a wyniki badań uda się ekstrapolować na inne populacje pacjentów, dzięki czemu zyskamy również marker cukrzycy typu 2 w otyłości.

### 5.3. Ograniczenia badania

Podstawowym ograniczeniem badania jest mała liczebność populacji. Akromegalia należy do rzadkich chorób, rocznie stwierdza się od 3 do 4 nowych zachorowań na 1 milion, z podobną częstością u obu płci. Choć grupa badana jest stosunkowo wysoka, jak na częstość występowania tego schorzenia, taka ilość pacjentów może nie wykazać słabszych korelacji i różnic między podgrupami oraz może wiązać się z obniżoną mocą statystyczną.

Kolejnym ograniczeniem wynikającym z metodyki jest oznaczenie jedynie rozpuszczalnej formy Dlk-1 w osoczu, bez oceny formy transbłonowej w poszczególnych tkankach. Złożoność mechanizmów regulujących uwalnianie sDlk-1 nakazuje interpretację uzyskanych wyników z należytą pokorą.

Ograniczeniem obecnego badania może być również istotna statystycznie różnica wieku między grupą badaną i grupą kontrolną. Jak do tej pory doniesienia literaturowe dotyczące związku sDlk1 z wiekiem osób po okresie pokwitania pozostają sprzeczne [64, 81, 91]. W obecnym badaniu nie stwierdzono korelacji stężeń sDlk-1 z wiekiem.

## 6. Wnioski

1. Stężenie sDlk-1 w surowicy nie może służyć za marker diagnostyczny obecności ani aktualnej aktywności somatotropinoma.
2. Stężenie sDlk-1 w akromegalii nie zależy bezpośrednio od nasilenia sekrecji GH ani stężenia IGF-1 i nie ma związku z aktywnością choroby.
3. Analogi somatostatyny nie wpływają bezpośrednio na stężenie sDlk-1 w terapii przewlekłej, mimo uzyskania remisji choroby.
4. Obniżone stężenie sDlk-1 u pacjentów z akromegalią i rozpoznaną cukrzycą może być markerem potwierdzającym zaburzenia w obrębie komórek  $\beta$  trzustki.
5. Nie ma bezpośredniej korelacji pomiędzy stężeniem sDlk-1 a gospodarką lipidową w akromegalii. sDlk-1 nie jest markerem dyslipidemii aterogennej w tej chorobie i nie może służyć za marker ryzyka sercowo-naczyniowego.
6. Istnieje związek sDlk-1 z ekspansją tkanki tłuszczowej u pacjentów z akromegalią i w populacji ogólnej.

## 7. Streszczenie

### **Wstęp:**

Rozprawa doktorska dotyczy oceny rozpuszczalnego delta-podobnego homologu typu 1 (sDlk-1) u osób chorujących na akromegalię. Na modelach zwierzęcych oraz w warunkach *in vitro* białko to przyjmuje rolę mediatora przemian tkanki tłuszczowej i postuluje się jego związek z wydzielaniem i działaniem hormonu wzrostu. sDlk-1 w organizmie dorosłego człowieka występuje w dwóch izoformach: transbłonowej i rozpuszczalnej, ta ostatnia obecna jest w krążeniu obwodowym. Ekspresja formy transbłonowej sprowadza się do wybranych tkanek, potwierdzono jej obecność między innymi w komórkach somatotropinowych przysadki oraz komórkach  $\beta$ -trzustki. Praca podejmuje temat zastosowania delta-podobnego homologu typu 1 jako biomarkera akromegalii, a także przemian tkanki tłuszczowej i powiązanych z nią procesów metabolicznych u osób chorujących na akromegalię.

### **Cel pracy:**

Głównym celem pracy była ocena związku pomiędzy poziomem stężenia delta-podobnego homologu typu 1 u osób z rozpoznaną akromegalią, a aktywnością choroby oraz ocena korelacji pomiędzy sDlk-1 a zawartością tkanki tłuszczowej i wybranymi zaburzeniami metabolicznymi w akromegalii.

### **Material i metody:**

Oceniono stężenie rozpuszczalnego delta-podobnego analogu typ 1 u osób z akromegalią na różnych etapach aktywności choroby, w tym u pacjentów stosujących przewlekłą terapię analogami somatostatyny. Dokonano analizy związku stężenia delta-podobnego homologu typu 1 u osób z zaburzeniami gospodarki węglowodanowej i lipidowej. Oceniano ponadto korelację pomiędzy stężeniem sDlk-1, a tkanką tłuszczową.

### **Wyniki:**

Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w stężeniu sDlk-1 w surowicy pomiędzy grupą chorych na akromegalię a grupą kontrolną. Podobnie nie stwierdzono istotnej statystycznie korelacji pomiędzy stężeniem sDlk-1 na różnych etapach aktywności choroby czyli u pacjentów z aktywną akromegalią, akromegalią kontrolowaną farmakologicznie oraz pacjentów wyleczonych, a także pacjentami w trakcie leczenia analogami somatostatyny w

porównaniu do pacjentów nie stosujących takiego leczenia. Stwierdzono istotne statystycznie mniejsze stężenie sDlk-1 u pacjentów z cukrzycą, hipercholesterolemią, nadwagą i otyłością w grupie pacjentów chorujących na akromegalię w porównaniu do grupy kontrolnej. Stwierdzono istotną statystycznie dodatnią korelację pomiędzy stężeniem sDlk-1 a procentową zawartością tkanki tłuszczowej w badaniu DXA u pacjentów z akromegalią. Nie stwierdzono istotnej statystycznie korelacji pomiędzy stężeniem sDlk-1 w surowicy a stężeniem GH, IGF-1, masą tkanki tłuszczowej i beztłuszczową masą ciała w tej grupie.

### **Wnioski:**

Stężenie sDlk-1 w surowicy nie może służyć za marker diagnostyczny obecności ani aktualnej aktywności somatotropinoma. Ponadto stężenie sDlk-1 w akromegalii nie zależy bezpośrednio od nasilenia sekrecji GH ani stężenia IGF-1 i nie ma związku z aktywnością choroby. Analogi somatostatyny nie wpływają bezpośrednio na stężenie sDlk-1 w terapii przewlekłej, mimo uzyskania remisji choroby.

Ciekawym i po raz pierwszy opisanym odkryciem było stwierdzenie istotnego statystycznie mniejszego stężenia sDlk-1 u osób z akromegalią chorujących na cukrzycę. Obniżone stężenie sDlk-1 u pacjentów z akromegalią i rozpoznaną cukrzycą może być markerem potwierdzającym zaburzenia w obrębie komórek  $\beta$  trzustki.

Nie stwierdzono bezpośredniej korelacji pomiędzy stężeniem sDlk-1 a gospodarką lipidową w akromegalii. sDlk-1 nie jest markerem dyslipidemii aterogennej w tej chorobie i nie może służyć za marker ryzyka sercowo- naczyniowego.

Stwierdzono związek sDlk-1 z ekspansją tkanki tłuszczowej u pacjentów z akromegalią i w populacji ogólnej.

Powyższe obserwacje sugerują, że Dlk-1 nie pełni wyłącznie funkcji inhibitora adipogenezy. Powinien być traktowany również jako czynnik wpływający na parametry gospodarki węglowodanowej. Być może w przyszłości stanie się on prognostykiem ryzyka rozwoju powikłań metabolicznych akromegalii, a wyniki badań uda się ekstrapolować na inne populacje pacjentów.

## 8. Summary

### **Background:**

This dissertation concerns the evaluation of a soluble delta-like homologue of type 1 (sDlk-1) in patients with acromegaly. In animal models and in in vitro conditions, this protein assumes a role as a mediator of adipose tissue metabolism and is postulated to have association with the secretion and action of growth hormone. sDlk-1 in the adult human body occurs in two isoforms: trans-membrane and soluble, the latter is present in the peripheral circulation. Expression of the transmembrane form is reduced to selected tissues; its presence has been confirmed, among others, in cells of the somatotropin cells of the pituitary gland and  $\beta$ -cells of the pancreas. The study addresses the use of delta-like type 1 homologue as a biomarker of acromegaly, as well as the adipose tissue metabolism and related metabolic processes in subjects suffering from acromegaly.

### **Objective:**

The main purpose of this study was to evaluate the relationship between the levels of delta-like type 1 homologue in subjects diagnosed with acromegaly and disease activity, and to assess the correlation between sDlk-1 and body fat and selected metabolic disorders in acromegaly.

### **Material and Methods:**

The levels of soluble delta-like analogue type 1 were assessed in subjects with acromegaly at different stages of disease activity, including patients on chronic therapy with somatostatin analogs. The association of delta-like type 1 homolog in subjects with carbohydrate and lipid metabolism disorders was analyzed. In addition, the correlation between sDlk-1 levels and adipose tissue was evaluated.

### **Results:**

There were no statistically significant differences in serum sDlk-1 levels between the acromegaly group and the control group. Similarly, there was no statistically significant correlation between sDlk-1 levels at different stages of disease activity that is, in patients with active acromegaly, pharmacologically controlled acromegaly and cured patients, as well as patients under treatment with somatostatin analogs compared to patients not receiving such treatment. Statistically significant lower levels of sDlk-1 were found in patients with diabetes, hypercholesterolemia, overweight and obesity in the acromegaly patients compared to the



control group. A statistically significant positive correlation was found between sDlk-1 levels and percent body fat on DXA in patients with acromegaly. No statistically significant correlation was found between serum sDlk-1 concentration and GH, IGF-1 concentrations, body fat mass and lean body mass in this group.

### **Conclusions:**

Serum sDlk-1 levels cannot serve as a diagnostic marker for the presence or current activity of somatotropinoma. Moreover, the concentration of sDlk-1 in acromegaly does not directly depend on the severity of GH secretion and IGF-1 concentration and is not related to the activity of the disease. Somatostatin analogs do not directly affect sDlk-1 levels in chronic therapy, despite the achievement of disease remission.

An interesting and first reported finding was the achievement of a statistically significant lower sDlk-1 levels in acromegalic patients with diabetes. Reduced sDlk-1 levels in patients with acromegaly and diagnosed diabetes may be a marker confirming pancreatic  $\beta$ -cell disorders.

No direct correlation was found between sDlk-1 levels and lipid metabolism in acromegaly. sDlk-1 is not a marker of atherogenic dyslipidemia in this disease and cannot serve as a marker of cardiovascular risk.

An association of sDlk-1 with adipose tissue expansion in patients with acromegaly and in the general population was found.

The above observations suggest that Dlk-1 does not function solely as an inhibitor of adipogenesis. It should also be considered as a factor affecting parameters of carbohydrate metabolism. Perhaps in the future it will become a predictor of the risk of developing metabolic complications of acromegaly, and the results of the study can be extrapolated to other patient populations.

## 9. Piśmiennictwo

- [1] Bolanowski M, Ruchała M, Zgliczyński W, Kos-Kudła B, Hubalewska-Dydejczyk A, Lewiński A. Diagnostics and treatment of acromegaly - updated recommendations of the Polish Society of Endocrinology. *Endokrynol Pol.* 2019; 70: 2-18. doi: 10.5603/EP.a2018.0093
- [2] de Herder, WW. The history of acromegaly. *Neuroendocrinology* 2016; 103(1): 7–17. doi/10.1159/000371808
- [3] Hoskuldsdottir GT, Fjalldal SB, Sigurjonsdottir HA. The incidence and prevalence of acromegaly, a nationwide study from 1955 through 2013. *Pituitary* 2015;18(6):803-7. doi: 10.1007/s11102-015-0655-4.
- [4] Melmed S. Medical progress: Acromegaly. *N Engl J Med.* 2006;355(24):2558-73. doi: 10.1056/NEJMra062453.
- [5] Szego CM, White A. The influence of purified growth hormone on fasting metabolism. *J Clin Endocrinol Metab.* 1948;8(7):594. PMID: 18869616.
- [6] Müller EE, Locatelli V, Cocchi D. Neuroendocrine control of growth hormone secretion. *Physiol Rev.* 1999;79(2):511-607. doi: 10.1152/physrev.1999.79.2.511. PMID: 10221989.
- [7] Khatib N, Gaidhane S, Gaidhane AM, Khatib M, Simkhada P, Gode D, Zahiruddin QS. Ghrelin: ghrelin as a regulatory peptide in growth hormone secretion. *J Clin Diagn Res.* 2014;8(8):MC13-7. doi: 10.7860/JCDR/2014/9863.4767.
- [8] Tannenbaum GS, Ling N. The interrelationship of growth hormone (GH)-releasing factor and somatostatin in generation of the ultradian rhythm of GH secretion. *Endocrinology.* 1984;115(5):1952-7. doi: 10.1210/endo-115-5-1952. PMID: 6149116.
- [9] Baumann G, Shaw M, Amburn K, Jan T, Davila N, Mercado M, Stolar M, MacCart J. Heterogeneity of circulating growth hormone. *Nucl Med Biol.* 1994;21(3):369-79. doi: 10.1016/0969-8051(94)90060-4. PMID: 9234302.
- [10] Zhang Y, Jiang J, Black RA, Baumann G, Frank SJ. Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme (TACE) is a growth hormone binding protein (GHBP) sheddase: the metalloprotease TACE/ADAM-17 is critical for (PMA-induced) GH receptor proteolysis and GHBP generation. *Endocrinology.* 2000;141(12):4342-8. doi: 10.1210/endo.141.12.7858. PMID: 11108241.

- [11] Vélez EJ, Unniappan S. A comparative update on the neuroendocrine regulation of growth hormone in vertebrates. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021;11:614981. doi: 10.3389/fendo.2020.614981. PMID: 33708174; PMCID: PMC7940767.
- [12] Rinderknecht E, 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 U S A*. 1976;73(7):2365-9. doi: 10.1073/pnas.73.7.2365. PMID: 1065887; PMCID: PMC430569.
- [13] Laron Z. Insulin-like growth factor 1 (IGF-1): a growth hormone. *Mol Pathol*. 2001;54(5):311-6. doi: 10.1136/mp.54.5.311. PMID: 11577173; PMCID: PMC1187088.
- [14] Hwa V, Oh Y, Rosenfeld RG. The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily. *Endocr Rev*. 1999;20(6):761-87. doi: 10.1210/edrv.20.6.0382. PMID: 10605625.
- [15] Al-Samerria S, Radovick S. The role of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) in the control of neuroendocrine regulation of growth. *Cells*. 2021;10(10):2664. doi: 10.3390/cells10102664. PMID: 34685644; PMCID: PMC8534318.
- [16] Sherlock M, Toogood AA. Aging and the growth hormone/insulin like growth factor-I axis. *Pituitary*. 2007;10(2):189-203. doi: 10.1007/s11102-007-0039-5. PMID: 17492509.
- [17] Møller N, Jørgensen JO. Effects of growth hormone on glucose, lipid, and protein metabolism in human subjects. *Endocr Rev*. 2009;30(2):152-77. doi: 10.1210/er.2008-0027. PMID: 19240267.
- [18] Bolanowski M, Ruchała M, Zgliczyński W, Kos-Kudła B, Bałdys-Waligórska A, Zieliński G, Bednarczyk T, Hubalewska-Dydejczyk A, Kamiński G, Marek B, Daroszewski J, Waśko R, Lewiński A. Acromegaly -a novel view of the patient. Polish proposals for diagnostic and therapeutic procedures in the light of recent reports. *Endokrynol Pol*. 2014;65(4):326-31. doi: 10.5603/EP.2014.0045. PMID: 25185857.
- [19] Waters MJ, Brooks AJ. Growth hormone and cell growth. *Endocr Dev*. 2012;23:86-95. doi: 10.1159/000341761.
- [20] Vilar L, Vilar CF, Lyra R, Lyra R, Naves LA. Acromegaly: clinical features at diagnosis. *Pituitary*. 2017;20(1):22-32. doi: 10.1007/s11102-016-0772-8. PMID: 27812777.
- [21] Reyes-Vidal CM, Mojahed H, Shen W, Jin Z, Arias-Mendoza F, Fernandez JC, Gallagher D, Bruce JN, Post KD, Freda PU. Adipose tissue redistribution and ectopic lipid deposition in

active acromegaly and effects of surgical treatment. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015;100(8):2946-55. doi: 10.1210/jc.2015-1917.

[22] Vila G, Jørgensen JOL, Luger A, Stalla GK. Insulin resistance in patients with acromegaly. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2019;10:509. doi: 10.3389/fendo.2019.00509. PMID: 31417493; PMCID: PMC6683662.

[23] Mercado M, Ramírez-Rentería C. Metabolic Complications of Acromegaly. *Front Horm Res.* 2018;49:20-28. doi: 10.1159/000486001. PMID: 29895013.

[24] Rolla M, Jawiarczyk-Przybyłowska A, Halupczok-Żyła J, Kałużny M, Konopka BM, Błoniecka I, Zieliński G, Bolanowski M. Complications and comorbidities of acromegaly - retrospective study in Polish center. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2021;12:642131. doi: 10.3389/fendo.2021.642131. PMID: 33796075; PMCID: PMC8009182.

[25] Mizera Ł, Elbaum M, Daroszewski J, Bolanowski M. Cardiovascular complications of acromegaly. *Acta Endocrinol (Buchar).* 2018;14(3):365-374. doi: 10.4183/aeb.2018.365. PMID: 31149285; PMCID: PMC6525769.

[26] Mathioudakis N, Salvatori R. Management options for persistent postoperative acromegaly. *Neurosurg Clin N Am.* 2012;23(4):621-38. doi: 10.1016/j.nec.2012.06.005. PMID: 23040748; PMCID: PMC6031123.

[27] Bevan JS, Atkin SL, Atkinson AB, Bouloux PM, Hanna F, Harris PE, James RA, McConnell M, Roberts GA, Scanlon MF, Stewart PM, Teasdale E, Turner HE, Wass JA, Wardlaw JM. Primary medical therapy for acromegaly: an open, prospective, multicenter study of the effects of subcutaneous and intramuscular slow-release octreotide on growth hormone, insulin-like growth factor-I, and tumor size. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(10):4554-63. doi: 10.1210/jc.2001-012012. PMID: 12364434.

[28] van der Hoek J, van der Lelij AJ, Feelders RA, de Herder WW, Uitterlinden P, Poon KW, Boerlin V, Lewis I, Krahnke T, Hofland LJ, Lamberts SW. The somatostatin analogue SOM230, compared with octreotide, induces differential effects in several metabolic pathways in acromegalic patients. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2005;63(2):176-84. doi: 10.1111/j.1365-2265.2005.02322.x. PMID: 16060911.

[29] Freda PU. Somatostatin analogs in acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(7):3013-8. doi: 10.1210/jcem.87.7.8665. PMID: 12107192.

- [30] Fleseriu M, Rusch E, Geer EB; ACCESS Study Investigators. Safety and tolerability of pasireotide long-acting release in acromegaly-results from the acromegaly, open-label, multicenter, safety monitoring program for treating patients who have a need to receive medical therapy (ACCESS) study. *Endocrine*. 2017;55(1):247-255. doi: 10.1007/s12020-016-1182-4. PMID: 27896545; PMCID: PMC5225222.
- [31] Lee MY, Wu Y, Fried SK. Adipose tissue heterogeneity: Implication of depot differences in adipose tissue for obesity complications. *Mol Aspects Med*. 2013;34(1):1-11, <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.10.001>.
- [32] Wang QA, Tao C, Gupta RK, Scherer PE. Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration. *Nat Med*. 2013;19(10):1338-44. doi: 10.1038/nm.3324. PMID: 23995282; PMCID: PMC4075943.
- [33] Chau YY, Bandiera R, Serrels A, Martínez-Estrada OM, Qing W, Lee M, Slight J, Thornburn A, Berry R, McHaffie S, Stimson RH, Walker BR, Chapuli RM, Schedl A, Hastie N. Visceral and subcutaneous fat have different origins and evidence supports a mesothelial source. *Nat Cell Biol*. 2014;16(4):367-75. doi: 10.1038/ncb2922. PMID: 24609269; PMCID: PMC4060514.
- [34] Giralt M, Villarroya F. White, brown, beige/brite: different adipose cells for different functions? *Endocrinology*. 2013;154(9):2992-3000. doi: 10.1210/en.2013-1403. PMID: 23782940.
- [35] Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev*. 2004;84(1):277-359. doi: 10.1152/physrev.00015.2003. PMID: 14715917.
- [36] Bartelt A, Bruns OT, Reimer R, Hohenberg H, Ittrich H, Peldschus K, Kaul MG, Tromsdorf UI, Weller H, Waurisch C, Eychmüller A, Gordts PL, Rinninger F, Bruegelmann K, Freund B, Nielsen P, Merkel M, Heeren J. Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance. *Nat Med*. 2011;17(2):200-5. doi: 10.1038/nm.2297. PMID: 21258337.
- [37] Au-Yong IT, Thorn N, Ganatra R, Perkins AC, Symonds ME. Brown adipose tissue and seasonal variation in humans. *Diabetes*. 2009;58(11):2583-7. doi: 10.2337/db09-0833. PMID: 19696186; PMCID: PMC2768171.
- [38] Hawco C, Houlden RL. Long term follow- up of one of the first patients to receive human growth hormone therapy. *AACE Clin Case Rep*. 2020;6(5):e262-e264. doi: 10.4158/ACCR-2020-0278. PMID: 32984534; PMCID: PMC7511101.

- [39] Vijayakumar A, Novosyadlyy R, Wu Y, Yakar S, LeRoith D. Biological effects of growth hormone on carbohydrate and lipid metabolism. *Growth Horm IGF Res.* 2010;20(1):1-7. doi: 10.1016/j.ghir.2009.09.002. PMID: 19800274; PMCID: PMC2815161.
- [40] Renaville R, Hammadi M, Portetelle D. Role of the somatotrophic axis in the mammalian metabolism. *Domest Anim Endocrinol.* 2002;23(1-2):351-60. doi: 10.1016/s0739-7240(02)00170-4. PMID: 12142251.
- [41] Vijayakumar A, Yakar S, Leroith D. The intricate role of growth hormone in metabolism. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2011;2:32. doi: 10.3389/fendo.2011.00032. PMID: 22654802; PMCID: PMC3356038.
- [42] Chen XL, Lee K, Hartzell DL, Dean RG, Hausman GJ, McGraw RA, Della-Fera MA, Baile CA. Adipocyte insensitivity to insulin in growth hormone-transgenic mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;283(4):933-7. doi: 10.1006/bbrc.2001.4882. PMID: 11350075.
- [43] Hansen LH, Madsen B, Teisner B, Nielsen JH, Billestrup N. Characterization of the inhibitory effect of growth hormone on primary preadipocyte differentiation. *Mol Endocrinol.* 1998;12(8):1140-9. doi: 10.1210/mend.12.8.0154. PMID: 9717840.
- [44] Boucher J, Softic S, El Ouaamari A, Krumpoch MT, Kleinridders A, Kulkarni RN, O'Neill BT, Kahn CR. Differential roles of insulin and IGF-1 receptors in adipose tissue development and function. *Diabetes.* 2016;65(8):2201-13. doi: 10.2337/db16-0212. PMID: 27207537; PMCID: PMC4955980.
- [45] Rizza RA, Mandarino LJ, Gerich JE. Effects of growth hormone on insulin action in man. Mechanisms of insulin resistance, impaired suppression of glucose production, and impaired stimulation of glucose utilization. *Diabetes.* 1982;663-9. doi: 10.2337/diab.31.8.663. PMID: 6761205.
- [46] Tai PK, Liao JF, Chen EH, Dietz J, Schwartz J, Carter-Su C. Differential regulation of two glucose transporters by chronic growth hormone treatment of cultured 3T3-F442A adipose cells. *J Biol Chem.* 1990;265(35):21828-34. PMID: 2254335.
- [47] Kilgour E, Baldwin SA, Flint DJ. Divergent regulation of rat adipocyte GLUT1 and GLUT4 glucose transporters by GH. *J Endocrinol.* 1995;145(1):27-33. doi: 10.1677/joe.0.1450027. PMID: 7798027.

- [48] Wabitsch M, Hauner H, Heinze E, Teller WM. The role of growth hormone/insulin-like growth factors in adipocyte differentiation. *Metabolism*. 1995;44(10 Suppl 4):45-9. doi: 10.1016/0026-0495(95)90220-1. PMID: 7476311.
- [49] Silha JV, Krsek M, Hana V, Marek J, Jezkova J, Weiss V, Murphy LJ. Perturbations in adiponectin, leptin and resistin levels in acromegaly: lack of correlation with insulin resistance. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2003;58(6):736-42. doi: 10.1046/j.1365-2265.2003.01789.x. PMID: 12780751.
- [50] Lanes R, Soros A, Gunczler P, Paoli M, Carrillo E, Villaroel O, Palacios A. Growth hormone deficiency, low levels of adiponectin, and unfavorable plasma lipid and lipoproteins. *J Pediatr*. 2006;149(3):324-9. doi: 10.1016/j.jpeds.2006.05.010. PMID: 16939741.
- [51] Ratku B, Sebestyén V, Erdei A, Nagy EV, Szabó Z, Somodi S. Effects of adult growth hormone deficiency and replacement therapy on the cardiometabolic risk profile. *Pituitary*. 2022;25(2):211-228. doi: 10.1007/s11102-022-01207-1. PMID: 35106704; PMCID: PMC8894188.
- [52] Berryman DE, List EO. Growth Hormone's Effect on Adipose Tissue: Quality versus Quantity. *Int J Mol Sci*. 2017;18(8):1621. doi: 10.3390/ijms18081621. PMID: 28933734; PMCID: PMC5578013.
- [53] Xie T, Ding H, Xia M, Zhang X, Sun W, Liu T, Gu Y, Sun C, Hu F. Dynamic changes in the distribution of facial and abdominal adipose tissue correlated with surgical treatment in acromegaly. *Endocrine*. 2018;62(3):552-559. doi: 10.1007/s12020-018-1742-x. PMID: 30203120.
- [54] Jang HN, Kim YH, Kim JH. Diabetes mellitus predicts weight gain after surgery in patients with acromegaly. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022;13:854931. doi: 10.3389/fendo.2022.854931. PMID: 35355553; PMCID: PMC8959539.
- [55] Mekala KC, Tritos NA. Effects of recombinant human growth hormone therapy in obesity in adults: a meta analysis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94(1):130-7. doi: 10.1210/jc.2008-1357. PMID: 18940879.
- [56] Olarescu NC, Bollerslev J. The impact of adipose tissue on insulin resistance in acromegaly. *Trends Endocrinol Metab*. 2016;27(4):226-237. doi: 10.1016/j.tem.2016.02.005. PMID: 26948712.

- [57] Nueda ML, Baladrón V, Sánchez-Solana B, Ballesteros MA, Laborda J. The EGF-like protein dlk1 inhibits notch signaling and potentiates adipogenesis of mesenchymal cells. *J Mol Biol.* 2007;367(5):1281-93. doi: 10.1016/j.jmb.2006.10.043. PMID: 17320900.
- [58] Kagami M, Matsuoka K, Nagai T, Yamanaka M, Kurosawa K, Suzumori N, Sekita Y, Miyado M, Matsubara K, Fuke T, Kato F, Fukami M, Ogata T. Paternal uniparental disomy 14 and related disorders: placental gene expression analyses and histological examinations. *Epigenetics.* 2012;1142-50. doi: 10.4161/epi.21937. PMID: 22917972; PMCID: PMC3469456.
- [59] Traustadottir GA, Kosmina R, Sheikh SP, Jensen CH, Andersen DC. Preadipocytes proliferate and differentiate under the guidance of Delta-like 1 homolog (DLK1). *Adipocyte.* 2013;2(4):272-5. doi: 10.4161/adip.24994. PMID: 24052905; PMCID: PMC3774705.
- [60] Mortensen SB, Jensen CH, Schneider M, Thomassen M, Kruse TA, Laborda J, Sheikh SP, Andersen DC. Membrane-tethered delta-like 1 homolog (DLK1) restricts adipose tissue size by inhibiting preadipocyte proliferation. *Diabetes.* 2012;61(11):2814-22. doi: 10.2337/db12-0176. PMID: 22891218; PMCID: PMC3478550.
- [61] Smas CM, Chen L, Sul HS. Cleavage of membrane-associated pref-1 generates a soluble inhibitor of adipocyte differentiation. *Mol Cell Biol.* 1997;17(2):977-88. doi: 10.1128/MCB.17.2.977. PMID: 9001251; PMCID: PMC231823.
- [62] Raghunandan R, Ruiz-Hidalgo M, Jia Y, Ettinger R, Rudikoff E, Riggins P, Farnsworth R, Tesfaye A, Laborda J, Bauer SR. Dlk1 influences differentiation and function of B lymphocytes. *Stem Cells Dev.* 2008;17(3):495-507. doi: 10.1089/scd.2007.0102. PMID: 18513163; PMCID: PMC3189718.
- [63] de Zegher F, Díaz M, Sebastiani G, Martín-Ancel A, Sánchez-Infantes D, López-Bermejo A, Ibáñez L. Abundance of circulating preadipocyte factor 1 in early life. *Diabetes Care.* 2012;35(4):848-9. doi: 10.2337/dc11-1990. PMID: 22338099; PMCID: PMC3308291.
- [64] Jensen CH, Krogh TN, Støving RK, Holmskov U, Teisner B. Fetal antigen 1 (FA1), a circulating member of the epidermal growth factor (EGF) superfamily: ELISA development, physiology and metabolism in relation to renal function. *Clin Chim Acta.* 1997;268(1-2):1-20. doi: 10.1016/s0009-8981(97)00152-6. PMID: 9495567.
- [65] Sul HS. Minireview: Pref-1: role in adipogenesis and mesenchymal cell fate. *Mol Endocrinol.* 2009;23(11):1717-25. doi: 10.1210/me.2009-0160. PMID: 19541743; PMCID: PMC2775937.



- [66] Nueda ML, González-Gómez MJ, Rodríguez-Cano MM, Monsalve EM, Díaz-Guerra MJM, Sánchez-Solana B, Laborda J, Baladrón V. DLK proteins modulate NOTCH signaling to influence a brown or white 3T3-L1 adipocyte fate. *Sci Rep.* 2018;8(1):16923. doi: 10.1038/s41598-018-35252-3. Erratum in: *Sci Rep.* 2018 Dec 7;8(1):17784. PMID: 30446682; PMCID: PMC6240076.
- [67] Floridon C, Jensen CH, Thorsen P, Nielsen O, Sunde L, Westergaard JG, Thomsen SG, Teisner B. Does fetal antigen 1 (FA1) identify cells with regenerative, endocrine and neuroendocrine potentials? A study of FA1 in embryonic, fetal, and placental tissue and in maternal circulation. *Differentiation.* 2000;66(1):49-59. doi: 10.1046/j.1432-0436.2000.066001049.x. PMID: 10997592.
- [68] Larsen JB, Jensen CH, Schrøder HD, Teisner B, Bjerre P, Hagen C. Fetal antigen 1 and growth hormone in pituitary somatotroph cells. *Lancet.* 1996;347(8995):191. doi: 10.1016/s0140-6736(96)90374-8. PMID: 8544560.
- [69] Ansell PJ, Zhou Y, Schjeide BM, Kerner A, Zhao J, Zhang X, Klibanski A. Regulation of growth hormone expression by Delta-like protein 1 (Dlk1). *Mol Cell Endocrinol.* 2007;271(1-2):55-63. doi: 10.1016/j.mce.2007.04.002. PMID: 17485162; PMCID: PMC1974851.
- [70] Wang Y, Sul HS. Ectodomain shedding of preadipocyte factor 1 (Pref-1) by tumor necrosis factor alpha converting enzyme (TACE) and inhibition of adipocyte differentiation. *Mol Cell Biol.* 2006;26(14):5421-35. doi: 10.1128/MCB.02437-05. PMID: 16809777; PMCID: PMC1592724.
- [71] Mei B, Zhao L, Chen L, Sul HS. Only the large soluble form of preadipocyte factor-1 (Pref-1), but not the small soluble and membrane forms, inhibits adipocyte differentiation: role of alternative splicing. *Biochem J.* 2002;364(Pt 1):137-44. doi: 10.1042/bj3640137. PMID: 11988086; PMCID: PMC1222555.
- [72] Traustadottir GA, Kosmina R, Sheikh SP, Jensen CH, Andersen DC. Preadipocytes proliferate and differentiate under the guidance of Delta-like 1 homolog (DLK1). *Adipocyte.* 2013;2(4):272-5. doi: 10.4161/adip.24994. PMID: 24052905; PMCID: PMC3774705.
- [73] Rodríguez-Cano MM, González-Gómez MJ, Sánchez-Solana B, Monsalve EM, Díaz-Guerra MM, Laborda J, Nueda ML, Baladrón V. NOTCH receptors and DLK proteins enhance brown adipogenesis in mesenchymal C3H10T1/2 cells. *Cells.* 2020;9(9):2032. doi: 10.3390/cells9092032. PMID: 32899774; PMCID: PMC7565505.

- [74] Zwierzina ME, Ejaz A, Bitsche M, Blumer MJ, Mitterberger MC, Mattesich M, Amann A, Kaiser A, Pechriggl EJ, Hörl S, Rostek U, Pierer G, Fritsch H, Zwerschke W. Characterization of DLK1(PREF1)+/CD34+ cells in vascular stroma of human white adipose tissue. *Stem Cell Res.* 2015;15(2):403-18. doi: 10.1016/j.scr.2015.08.004. PMID: 26342195.
- [75] Wang Y, Zhao L, Smas C, Sul HS. Pref-1 interacts with fibronectin to inhibit adipocyte differentiation. *Mol Cell Biol.* 2010;30(14):3480-92. doi: 10.1128/MCB.00057-10 PMID: 20457810; PMCID: PMC2897553.
- [76] Moon YS, Smas CM, Lee K, Villena JA, Kim KH, Yun EJ, Sul HS. Mice lacking paternally expressed Pref-1/Dlk1 display growth retardation and accelerated adiposity. *Mol Cell Biol.* 2002;22(15):5585-92. doi: 10.1128/MCB.22.15.5585-5592.2002. PMID: 12101250; PMCID: PMC133956.
- [77] Dauber A, Cunha-Silva M, Macedo DB, Brito VN, Abreu AP, Roberts SA, Montenegro LR, Andrew M, Kirby A, Weirauch MT, Labilloy G, Bessa DS, Carroll RS, Jacobs DC, Chappell PE, Mendonca BB, Haig D, Kaiser UB, Latronico AC. Paternally inherited DLK1 deletion associated with familial central precocious puberty. *J Clin Endocrinol Metab.* 2017;102(5):1557-1567. doi: 10.1210/jc.2016-3677. PMID: 28324015; PMCID: PMC5443333.
- [78] Abdallah BM, Ding M, Jensen CH, Ditzel N, Flyvbjerg A, Jensen TG, Dagnaes-Hansen F, Gasser JA, Kassem M. Dlk1/FA1 is a novel endocrine regulator of bone and fat mass and its serum level is modulated by growth hormone. *Endocrinology.* 2007;148(7):3111-21. doi: 10.1210/en.2007-0171. PMID: 17446189.
- [79] Sze L, Tschopp O, Neidert MC, Bernays RL, Ghirlanda C, Zwimpfer C, Wiesli P, Schmid C. Soluble delta-like 1 homolog decreases in patients with acromegaly following pituitary surgery: A potential mediator of adipogenesis suppression by growth hormone? *Growth Horm IGF Res.* 2019;45:20-24. doi: 10.1016/j.ghir.2019.02.002. Erratum in: *Growth Horm IGF Res.* 2020 Apr;51:77. PMID: 30818110.
- [80] Friedrichsen BN, Carlsson C, Møldrup A, Michelsen B, Jensen CH, Teisner B, Nielsen JH. Expression, biosynthesis and release of preadipocyte factor-1/ delta-like protein/fetal antigen-1 in pancreatic beta-cells: possible physiological implications. *J Endocrinol.* 2003;176(2):257-66. doi: 10.1677/joe.0.1760257. PMID: 12553874.

- [81] Andersen M, Jensen CH, Støving RK, Larsen JB, Schrøder HD, Teisner B, Hagen C. Fetal antigen 1 in healthy adults and patients with pituitary disease: relation to physiological, pathological, and pharmacological GH levels. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(11):5465-70. doi: 10.1210/jcem.86.11.7990. PMID: 11701723.
- [82] Hedlund GP, Carlsson HE, Shieck E, Nilsson I, Lundblad C, Arons S, Iversen AK, Looman C, Jensen HE, Hau J. Fetal antigen 1 (FA1) in the adult rat adrenal gland, ovary and pituitary gland. *In Vivo.* 2003;17(1):1-4. PMID: 12655782.
- [83] Hadjidemetriou I, Mariniello K, Ruiz-Babot G, Pittaway J, Mancini A, Mariannis D, Gomez-Sanchez CE, Parvanta L, Drake WM, Chung TT, Abdel-Aziz TE, DiMarco A, Palazzo FF, Wierman ME, Kiseljak-Vassiliades K, King PJ, Guasti L. DLK1/PREF1 marks a novel cell population in the human adrenal cortex. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2019;193:105422. doi: 10.1016/j.jsbmb.2019.105422. PMID: 31265901; PMCID: PMC6736711.
- [84] Pittaway JFH, Lipsos C, Mariniello K, Guasti L. The role of delta-like non-canonical Notch ligand 1 (DLK1) in cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2021;28(12):R271-R287. doi: 10.1530/ERC-21-0208. PMID: 34627131.
- [85] Li H, Cui ML, Chen TY, Xie HY, Cui Y, Tu H, Chen FH, Ge C, Li JJ. Serum DLK1 is a potential prognostic biomarker in patients with hepatocellular carcinoma. *Tumour Biol.* 2015;36(11):8399-404. doi: 10.1007/s13277-015-3607-8. PMID: 26018510.
- [86] Abdallah BM, Jensen CH, Gutierrez G, Leslie RG, Jensen TG, Kassem M. Regulation of human skeletal stem cells differentiation by Dlk1/Pref-1. *J Bone Miner Res.* 2004;19(5):841-52. doi: 10.1359/JBMR.040118. PMID: 15068508.
- [87] Altenberger T, Bilban M, Auer M, Knosp E, Wolfsberger S, Gartner W, Mineva I, Zielinski C, Wagner L, Luger A. Identification of DLK1 variants in pituitary- and neuroendocrine tumors. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;340(3):995-1005. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.12.094. PMID: 16403460.
- [88] Peters J. The role of genomic imprinting in biology and disease: an expanding view. *Nat Rev Genet.* 2014; 15(8):517-30. doi: 10.1038/nrg3766. PMID: 24958438.
- [89] Katznelson L, Laws ER Jr, Melmed S, Molitch ME, Murad MH, Utz A, Wass JA; Endocrine Society. Acromegaly: an endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014; 99(11):3933-51. doi: 10.1210/jc.2014-2700. PMID: 25356808.

- [90] Szurkowska M, Szafraniec K, Gilis-Januszewska A, Szybiński Z, Huszno B. Wskaźniki insulinooporności w badaniu populacyjnym i ich wartość predykcyjna w określeniu zespołu metabolicznego. *Przegl Epidemiol.* 2005;59(3):743-51. PMID: 16433317.
- [91] Chacón MR, Miranda M, Jensen CH, Fernández-Real JM, Vilarrasa N, Gutiérrez C, Näf S, Gomez JM, Vendrell J. Human serum levels of fetal antigen 1 (FA1/Dlk1) increase with obesity, are negatively associated with insulin sensitivity and modulate inflammation in vitro. *Int J Obes (Lond).* 2008;32(7):1122-9. doi: 10.1038/ijo.2008.40. PMID: 18392037.
- [92] Andries A, Niemeier A, Støving RK, Abdallah BM, Wolf AM, Hørder K, Kassem M. Serum levels of fetal antigen 1 in extreme nutritional States. *ISRN Endocrinol.* 2012;2012:592648. doi: 10.5402/2012/592648. PMID: 22844611; PMCID: PMC3403450.
- [93] Bujak E, Ritz D, Neri D. A monoclonal antibody to human DLK1 reveals differential expression in cancer and absence in healthy tissues. *Antibodies.* 2015;4:71-87. <https://doi.org/10.3390/antib4020071>
- [94] Kavalkova P, Touskova V, Roubicek T, Trachta P, Urbanova M, Drapalova J, Haluzikova D, Mraz M, Novak D, Matoulek M, Lacinova Z, Haluzik M. Serum preadipocyte factor-1 concentrations in females with obesity and type 2 diabetes mellitus: the influence of very low calorie diet, acute hyperinsulinemia, and fenofibrate treatment. *Horm Metab Res.* 2013;45(11):820-6. doi: 10.1055/s-0033-1353210. PMID: 23979788.
- [95] Liangpunsakul S, Bennett R, Westerhold C, Ross RA, Crabb DW, Lai X, Witzmann FA. Increasing serum pre-adipocyte factor-1 (Pref-1) correlates with decreased body fat, increased free fatty acids, and level of recent alcohol consumption in excessive alcohol drinkers. *Alcohol.* 2014;48(8):795-800. doi: 10.1016/j.alcohol.2014.07.013. PMID: 25449367; PMCID: PMC4254533.
- [96] Colao A, Auriemma RS, Galdiero M, Lombardi G, Pivonello R. Effects of initial therapy for five years with somatostatin analogs for acromegaly on growth hormone and insulin-like growth factor-I levels, tumor shrinkage, and cardiovascular disease: a prospective study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94(10):3746-56. doi: 10.1210/jc.2009-0941. PMID: 19622615.
- [97] Brummer RJ, Lönn L, Kvist H, Grangård U, Bengtsson BA, Sjöström L. Adipose tissue and muscle volume determination by computed tomography in acromegaly, before and 1 year after adenomectomy. *Eur J Clin Invest.* 1993;23(4):199-205. doi: 10.1111/j.1365-2362.1993.tb00762.x. PMID: 8500511.

- [98] Ferrau F, Albani A, Ciresi A, Giordano C, Cannavò S. Diabetes secondary to acromegaly: Physiopathology, clinical features and effects of treatment. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018 6;9:358. doi: 10.3389/fendo.2018.00358. PMID: 30034367; PMCID: PMC6043782.
- [99] Kopchick JJ, Berryman DE, Puri V, Lee KY, Jorgensen JOL. The effects of growth hormone on adipose tissue: old observations, new mechanisms. *Nat Rev Endocrinol*. 2020;16(3):135-146. doi: 10.1038/s41574-019-0280-9. PMID: 31780780; PMCID: PMC7180987.
- [100] Klötting N, Blüher M. Adipocyte dysfunction, inflammation and metabolic syndrome. *Rev Endocr Metab Disord*. 2014;(4):277-87. doi: 10.1007/s11154-014-9301-0. PMID: 25344447.
- [101] O'Connell J, Lynch L, Hogan A, Cawood TJ, O'Shea D. Preadipocyte factor-1 is associated with metabolic profile in severe obesity. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(4):E680-4. doi: 10.1210/jc.2010-2026. PMID: 21252254.
- [102] Wang Y, Lee K, Moon YS, Ahmadian M, Kim KH, Roder K, Kang C, Sul HS. Overexpression of Pref-1 in pancreatic islet  $\beta$ -cells in mice causes hyperinsulinemia with increased islet mass and insulin secretion. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015;461(4):630-5. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.04.078. PMID: 25918019; PMCID: PMC4439292.
- [103] González B, Vargas G, de Los Monteros ALE, Mendoza V, Mercado M. Persistence of diabetes and hypertension after multimodal treatment of acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab*. 2018;103(6):2369-2375. doi: 10.1210/jc.2018-00325. PMID: 29618021.
- [104] Carlsson C, Tornehave D, Lindberg K, Galante P, Billestrup N, Michelsen B, Larsson LI, Nielsen JH. Growth hormone and prolactin stimulate the expression of rat preadipocyte factor-1/delta-like protein in pancreatic islets: molecular cloning and expression pattern during development and growth of the endocrine pancreas. *Endocrinology*. 1997;138(9):3940-8. doi: 10.1210/endo.138.9.5408. PMID: 9275085.
- [105] Andersen DC, Laborda J, Baladron V, Kassem M, Sheikh SP, Jensen CH. Dual role of delta-like 1 homolog (DLK1) in skeletal muscle development and adult muscle regeneration. *Development*. 2012;140(18):3743-53. doi: 10.1242/dev.095810. PMID: 23946446.
- [106] Cleaton MA, Dent CL, Howard M, Corish JA, Gutteridge I, Sovio U, Gaccioli F, Takahashi N, Bauer SR, Charnock-Jones DS, Powell TL, Smith GC, Ferguson-Smith AC, Charalambous M. Fetus-derived DLK1 is required for maternal metabolic adaptations to

pregnancy and is associated with fetal growth restriction. *Nat Genet.* 2016;48(12):1473-1480. doi: 10.1038/ng.3699. PMID: 27776119; PMCID: PMC5373434.

[107] Demir Çaltekin M, Caniklioğlu A. Maternal serum delta-like 1 and nesfatin-1 levels in gestational diabetes mellitus: A prospective case-control study. *Cureus.* 2021;13(8):e17001. doi: 10.7759/cureus.17001. PMID: 34540403; PMCID: PMC8423317.

[108] Spalding KL, Arner E, Westermark PO, Bernard S, Buchholz BA, Bergmann O, Blomqvist L, Hoffstedt J, Näslund E, Britton T, Concha H, Hassan M, Rydén M, Frisén J, Arner P. Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature.* 2008;453(7196):783-7. doi: 10.1038/nature06902. PMID: 18454136.

[109] Jensen CH, Kosmina R, Rydén M, Baun C, Hvidsten S, Andersen MS, Christensen LL, Gastaldelli A, Marraccini P, Arner P, Jørgensen CD, Laborda J, Holst JJ, Andersen DC. The imprinted gene Delta like non-canonical notch ligand 1 (*Dlk1*) associates with obesity and triggers insulin resistance through inhibition of skeletal muscle glucose uptake. *EBioMedicine.* 2019;46:368-380. doi: 10.1016/j.ebiom.2019.07.070. PMID: 31383551; PMCID: PMC6711890.