

Cirkulerende insulin-lignende vækstfaktor-I (IGF-I) og IGF bindingsproteiner: Normal regulation og klinisk anvendelse

Anders Juul¹

Afdeling for Vækst og Reproduktion, Rigshospitalet afsnit 5064, Københavns Universitet, DK-2100 København Ø, Danmark

Introduktion

Væksthormon (GH) mangel medfører ekstrem dværgvækst og metabolisk dysfunktion hos børn og voksne. GH-mangel kan være medfødt (ofte genetisk bestemt) eller erhvervet senere i livet f.eks. som følge til hjernetumor eller som følge til behandling af denne. GH behandling af børn med GH-mangel har været anvendt siden starten af 1960'erne med hypofyseekstrakter fra afdøde individer, og siden midten af 1980'erne med gensplejset, rekombinant GH. Efter udviklingen af gensplejset GH (i potentielt ubegrænsede mængder), har antallet af børn som er behandlet med rekombinant GH været eksponentielt stigende. Ikke blot børn med klassisk GH-mangel har været behandlet, men også børn med dværgvækst af anden årsag har været forsøgt behandlet med GH med henblik på at øge sluthøjden. For 10 år siden dukkede de første rapporter op om gavnlige metaboliske virkninger af GH behandling hos voksne med GH-mangel efter at de havde afsluttet deres længdevækst (1,2), og dette er nu blevet en registreret indikation i mange europæiske lande. Fra at være en eksperimentel behandling med hypofyseekstrakter af udvalgte børn med dværgvækst pga GH mangel, er GH behand-

ling nu mulig på en tiltagende stor patientpopulation, børn såvel som voksne. Behandlingen er fortsat meget kostbar, og de gavnlige effekter endnu kun sikkert dokumenteret hos børn med klassisk GH mangel. Disse forhold stiller derfor store krav til vores diagnostik af den GH sekretoriske kapacitet hos det enkelte individ, som mistænkes for nedsat GH sekretion og som derfor er mulig kandidat til (eventuelt livslang) GH behandling.

GH secernerer pulsatilt fra hypofysen, og en direkte kvantitering af den GH sekretoriske kapacitet kræver derfor at man undersøger en døgnprofil for GH, hvilket vil sige kontinuerlig blodprøvetagning hvert 20.-30. minut i 24 timer. Statistiske metoder til beskrivelse af GH sekretionsmønstrer eksisterer (Pulsar, Ultra, Detect og Cluster), men forekomsten af valide normalområder for børn og voksne for GH døgnprofiler er sparsomme (3,4). I tillæg til dette er det selvsagt en besværlig og ressourcekrævende undersøgelse at foretage, specielt på børn. Man har derfor i årtier søgt efter alternative metoder til at få et udtryk for den GH sekretoriske kapacitet, og anvender typisk en farmakologisk stimulation af GH frigørelsen v.h.a. Insulin-induceret hypoglykæmi, Arginin-infusion, Clonidin, Glucagon, GHRH mm. Disse farmaka inducerer alle en frigivelse af GH i løbet af 90 min, og rent praktisk har man anvendt en specifik cut-off værdi (f.eks. 10 ng/mL) som grænsen mellem det normale og det patologiske. Denne cut-off værdi er arbitrært fastsat, man har ikke alderrelaterede normalværdier og den er afhængig af det anvendte GH assay. Endelig er testning forbundet med ubehag for patienten, og for insulin-induceret hypoglykæmi er der desuden rapporteret døds-

¹: Korrespondance til:
Anders Juul, MD, PhD
Afdeling for Vækst og Reproduktion
Rigshospitalet afsnit 5064
Københavns Universitet
Blegdamsvej 9
DK-2100 København Ø
Danmark
Tlf: +45-35 45 50 85
Fax: +45-35456054
E-post: ajuul@post4.tele.dk

fald hos børn, hvorfor denne metode ikke anbefales i standardudredningen af børn med vækstforstyrrelser. Da IGF-I niveauet er stabilt i løbet af døgnet, og til en vis grad reflekterer den integrerede GH produktion (5) ville det være af stor betydning, hvis en enkeltbestemmelse af plasma IGF-I totalkoncentrationen kunne erstatte disse farmakologiske stimulationsstest.

Man har været i stand til at måle IGF-I (tidligere kaldet somatomedin) i flere årtier, men tidligere målinger kan ikke betragtes som værende valide, idet IGF-I er målt ved hjælp af bioassays eller radioimmunanalyser på ubehandlet plasma. Med vores nuværende viden kræver valid bestemmelse af IGF-I, at interferende IGF bindingsproteiner ekstraheres bort fra serum inden den totale IGF-I koncentration bestemmes. Dette gøres ved acidificering (sur ethanol ekstraktion eller kromatografi ved lavt pH), eller ved tilsætning af overskydende IGF-II (som binder alle IGF-bindingsproteinerne). Derudover, er nye non-ekstraktions assays udviklet indenfor de sidste 5 år, og kan muligvis fremover erstatte tidligere målemetoder, idet de er mindre tidskrævende. Endelig er der udviklet nye metoder til bestemmelse af den frie fraktion af IGF-I, hvilket har muliggjort nye spændende undersøgelser af den komplekse regulation af IGF-I (6-9), men det vides endnu ikke om bestemmelsen af frit IGF-I vil øge vores diagnostiske formåen. Sammenfattende må man sige, at der er sket en revolution indenfor serumbestemmelser af IGF-I, således at man idag måler total IGF-I koncentrationer, som ikke i væsentlig grad er influeret af tilstedeværelsen af IGF-bindingsproteiner, med langt større præcision og følsomhed end tidligere.

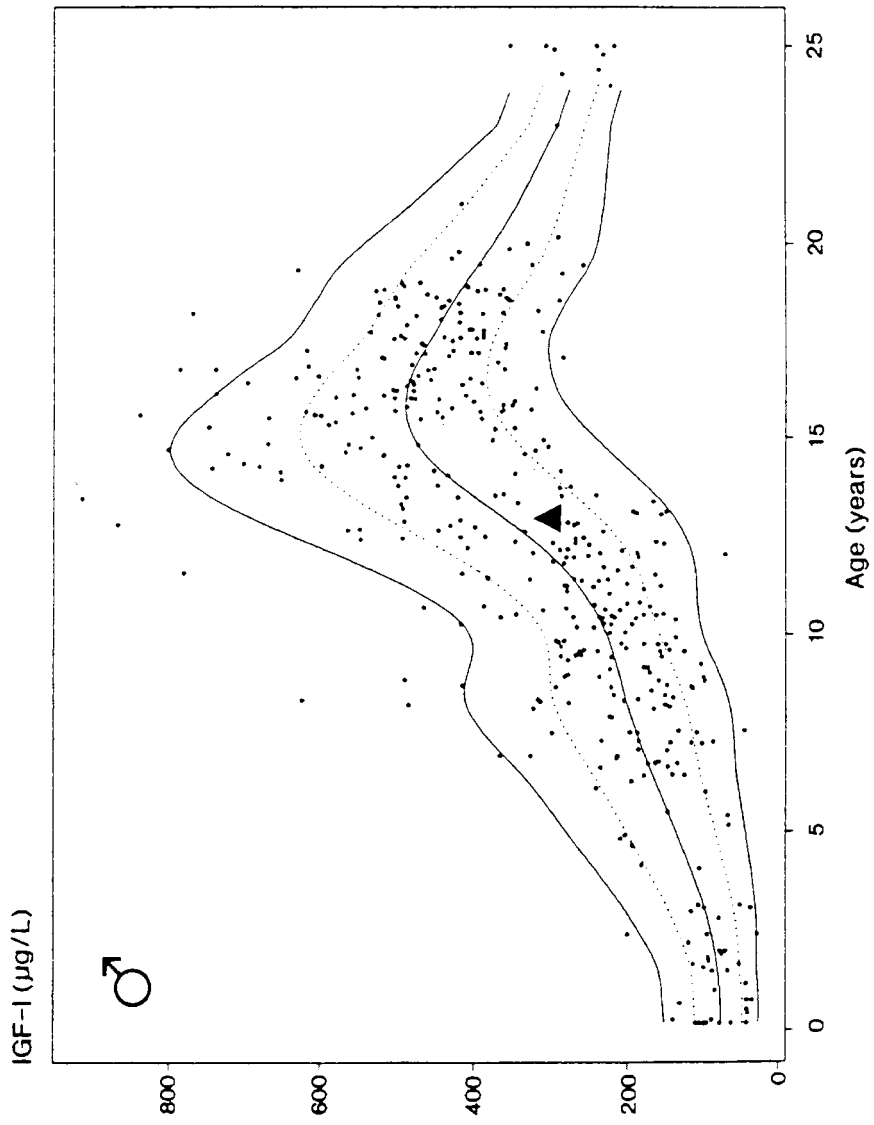
Formålet med denne oversigt er at bibringe up-to-date viden om regulationen af cirkulerende IGF-I og dens diagnostiske værdi hos patienter mistænkt for GH-mangel baseret på nyere analysemetoder.

Insulin-lignende vækstfaktorer og deres bindingsproteiner

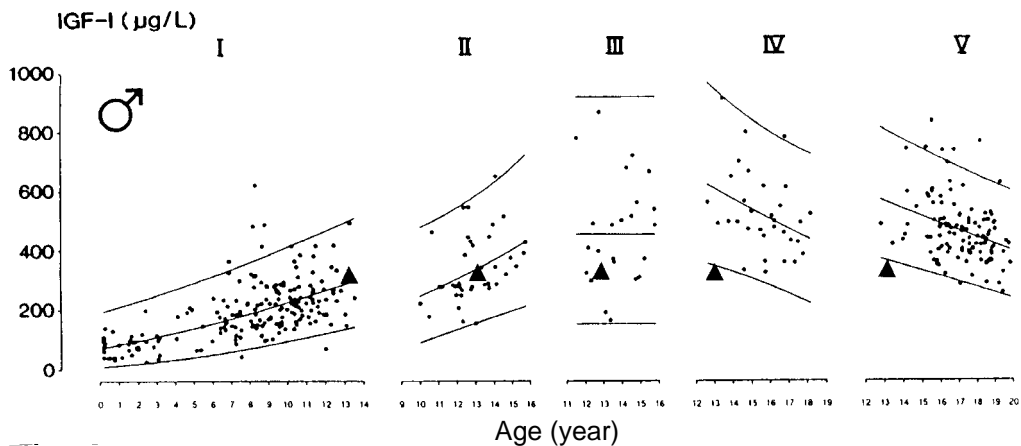
Insulin-lignende vækstfaktorer (IGF-I og -II) er vækstoffremmende peptider som har stor strukturel homologi med proinsulin. IGF-I har mito-

gen virkning, og bindes til en specifik IGF-I receptor, der ved stimulation udløser mitogent respons. IGF-II bindes til en receptor, der har vist sig at være identisk med Mannose-6-phosphat (M6P) receptoren, hvis betydning ikke er endeligt kendt. IGF-I og -II cirkulerer i plasma bundet til en familie af specifikke IGF bindingsproteiner med høj affinitet (10^{-11} mol/L), IGFBP-1 til -6, som indgår i regulationen af den biologiske aktivitet af IGF-I og -II. Udover at IGF-II cirkulerer i blodbanen i betydelige mængder, og konkurrerer med IGF-I om binding til IGF-bindingsproteinerne, er betydningen af IGF-II for postnatal vækst ikke kendt. Det cirkulerende IGF-I er overvejende dannet i leveren, hvorfra produktionen og frigivelsen er stimuleret af den pulsatile GH sekretion. Patienter med GH-mangel har således lav IGF-I koncentration, og patienter med GH overskud (akromegali) har højt IGF-I plasmaniveau.

Alle 6 IGF bindingsproteiner danner binære komplekser med IGF-I eller -II i plasma, mens IGFBP-3 (og til en vis grad IGFBP-5) tillige danner tertiære komplekser med IGF-I eller -II og et større protein, acid-labile subunit (ALS). *IGFBP-1* er et non-glykosyleret peptid (30 kDa), hvis plasmakoncentration fluktuerer i løbet af døgnet, omvendt korreleret til insulin niveauet. Således falder IGFBP-1 abrupt efter et måltid, og stiger markant efter faste. Det er derfor sandsynligt at IGFBP-1 indgår i glucoshomeostasen p.g.a. dets hurtige ændringer i relation til insulin, hvorvidt det påvirker den frie IGF-I koncentration. *IGFBP-2* er ligeledes et non-glykosyleret peptid som har større affinitet for IGF-II end for IGF-I. IGFBP-2 udviser ikke døgnvariation, ændres ikke efter et måltid, men stiger dog efter længerevarende faste. Der vides endnu ikke meget om dets regulation og betydning. *IGFBP-3* er det væsentligste bindingsprotein og udgøres af et 40 kDa glykosyleret protein. Mere end 90 % af det cirkulerende IGF-I forefindes i det højmolekylære IGFBP-3 (150 kDa) tertiære kompleks, der fungerer som en bufferkapacitet for det biotilgængelige IGF-I. Kun en lille fraktion af det totale IGF (ca 0.5-1.0%) cirkulerer som en fri ubunden fraktion, der formodes at være den biologisk aktive, i analogi med kønshormoner og thyroideahormoner. IGFBP-3 er reguleret af GH og korrelerer med den integrerede GH døgnproduktion (5), således at patienter med



Figur 1
 IGF-I i relation til kronologisk alder hos raske drenge. Linierne repræsenterer mean \pm 2SD(17), ▲ : hypotetisk værdi på 300 ng/mL hos en 13 årig dreng. For konversion til SI-enheder multipliser med 0,131.



Figur 2

IGF-I i relation til pubertetstrin (Tanner stadier I-V) samt kronologisk alder hos raske drenge. Linierne repræsenterer mean \pm 2SD (17), ▲ : hypotetisk værdi på 300 ng/mL hos en 13 årig dreng, afhængig af hans pubertetstrin. For konversion til SI-enheder multipliseres med 0,131.

GH mangel har lave IGFBP-3 koncentrationer, mens akromegale patienter har høje serum IGFBP-3 værdier - se senere. Da IGF-I cirkulerer i plasma i 1000 gange højere koncentration end insulin, og har insulin-lignende virkning via binding til insulinreceptoren (omend med ringe affinitet i forhold til insulin) ville der opstå svær hypoglykæmi såfremt alt IGF-I cirkulerede i dets frie form. Den cirkulerende høj-molekylære IGF-pool (IGF-I bundet til IGFBP-3-ALS komplekset) kan ikke passere endotelet i karvæggen, og herved beskyttes IGF-I mod nedbrydning og clearance fra blodbanen, hvorved den biologiske halveringstid øges fra 10-12 min (frie form) til ca 15 timer (bunden form). Der er således flere vigtige biologiske betydninger af tilstedeværelsen af IGFBP-3:

- 1) den biologiske halveringstid af IGF-I øges
- 2) IGFBP-3 fungerer som bufferkapacitet
- 3) den hypoglykæmiske virkning af frit IGF-I hæmmes

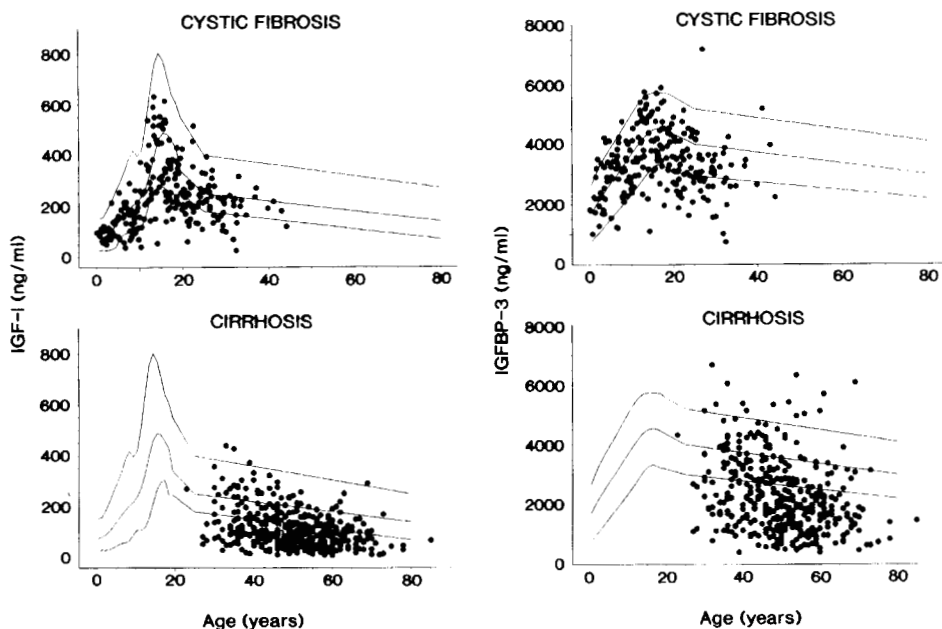
For nylig har man tillige påvist at IGF-I og -II også bindes til en ny familie af bindingsproteiner med lav affinitet, som man har betegnet IGFBP-relaterede proteiner (IGFBP-rP1 til 4) (10). Disse proteins funktion og regulation i forhold til de klassiske IGF bindingsproteiner er stadig ukendt, men under udforskning.

IGFBP-3 proteaser

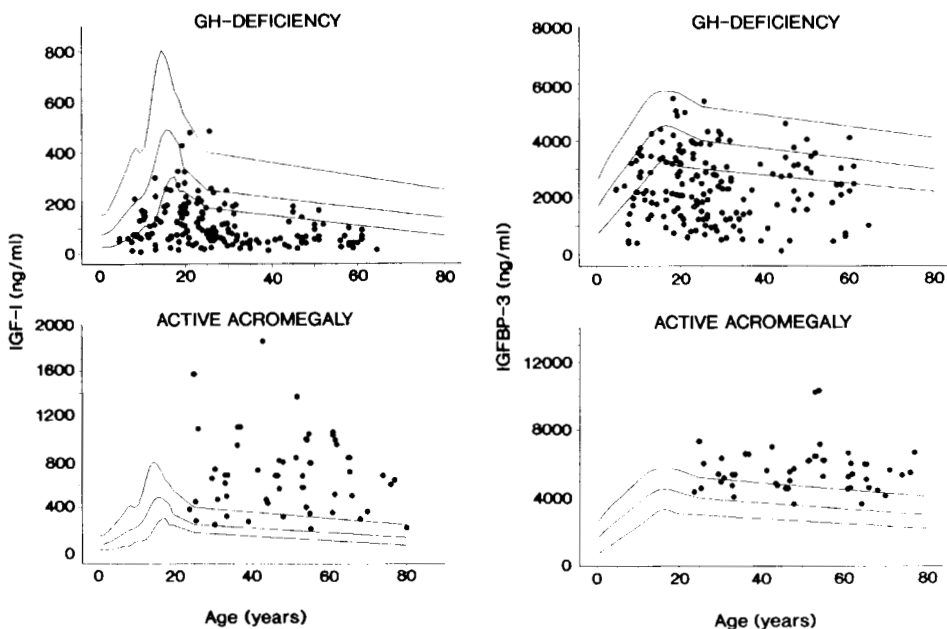
Det har vist sig at under graviditet optræder der specifikke IGFBP-3 protease i 3. Trimester (11). Disse proteaser nedbryder IGFBP-3 til mindre fragmenter, der fortsat kan binde IGF-I, omend med nedsat affinitet. IGFBP-3 proteaser induceres ligeledes under en lang række patologiske omstændigheder karakteriseret ved stresskatabolisme, såsom under sepsis (12), fejlernæring (13) større kirurgiske indgreb (14,15) og ubehandlet diabetes (16). Herved afgives IGF-I fra den cirkulerende pool med mulighed for at udøve ekstravaskulær anabol virkning. Endelig er det foreslået, at IGFBP-3 protease aktivitet kunne repræsentere en normalfysiologisk reguleringsmekanisme, hvorved IGF-I lettere kan forlade blodbanen til fordel for de perifere målorganer (f.eks. epifyseskiverne).

IGF-I og IGFBP-3 hos normale børn

I en tværsnitsundersøgelse af 1030 raske danske børn (17) påviste vi at serum IGF-I koncentrationen stiger langsomt gennem præpuberteten med en relativt konstant variation omkring gennemsnittet. I puberteten stiger IGF-I kraftigere og variationen omkring gennemsnittet øges. Dette skyldes at tværsnitskurverne ikke tager højde for variationen i tidspunktet for pubertets indtræden hos det enkelte individ, hvorfor alle værdierne svarende til en kronologisk alder



Figur 3. Serum IGF-I (venstre) og IGFBP-3 koncentrationer (højre) hos patienter med cystisk fibrose (øverste figurer) (25) og hos patienter med alkoholisk cirrhose (nederste figurer) (29). Linierne repræsenterer normalområdet (mean \pm 2SD) som er baseret på et stort antal raske individer. For konversion af IGF-I koncentrationer til SI-enheder multipliseres med 0,131.



Figur 4. Serum IGF-I (venstre) og IGFBP-3 koncentrationer (højre) hos patienter med childhood-onset GH mangel (øverste figurer) (55) og hos patienter med aktiv akromegali (nederste figurer) (64). Linierne repræsenterer normalområdet (mean \pm 2SD) som er baseret på et stort antal raske individer. For konversion af IGF-I koncentrationer til SI-enheder multipliseres med 0,131.

på f.eks. 13 år dækker over alt lige fra præpubertale drenge til drenge langt i deres pubertetsudvikling. Efter puberteten falder IGF-I igen, og vedbliver at falde gennem hele voksenlivet. Nogenlunde tilsvarende forløb ses for IGFBP-3 omend stigningen i puberteten ikke er så markant som for IGF-I (Figur 1).

Variationen kan mindskes såfremt man opdeler normalværdier efter både alder og pubertet-sudvikling; i de tidlige pubertetstrin (stadium I-II) ses stigende IGF-I med stigende alder, mens det omvendte er gældende i de sene pubertetsstadier (stadium IV-V) (Figur 2).

Eksempel: En dreng med en kronologisk alder på 13 år har en IGF-I værdi på 300 ng/mL (tilsvarende 39,3 nmol/L). Er dette normalt, for lavt eller for højt? Hvis værdien indplottes på alderskurven (Figur 1) ses det at værdien er sv.t. gennemsnittet for alder, men vi har i denne sammenhæng ingen information om pubertet-sudviklingen. Indplottes værdien for den 13 årige dreng på det kombinerede normalområde, som tager højde for både alder og pubertetsudvikling kan det ses at en værdi på 300 ng/mL er normal såfremt den 13 årige dreng er præpubertal, men at en sådan værdi er patologisk lav, såfremt han er langt i sin pubertetsudvikling (Figur 2).

Sådanne kombinerede normalområder er formentlig ikke praktisk anvendelige, men de illustrerer betydningen af at have veldefinerede normalområder baseret på at stort antal individer, samt at man er nødt til at forholde sig til såvel alder som køn og pubertetsudvikling før man kan bedømme om en værdi er normal eller patologisk hos et væksthæmmed barn.

Faktorer som påvirker IGF-I og IGFBP-3

Ernæringstilstand

IGF-I og IGFBP-3 er normale til let forhøjede hos børn med *adipositas simplex* (18,19), mens de er nedsatte hos børn med *anorexia nervosa* (20,21) og malabsorptionstilstande som *cøliaki* (22,23), *Mb. Crohn* (24) eller *cystisk fibrose* (25) (Figur 3).

Leversygdom

Børn med leversygdom pga *galdevejsatresi*, *storage diseases* og *hepatitis* har ekstremt nedsatte IGF-I og IGFBP-3 værdier (26-28), som

normaliseres efter levertransplantation (27). Ligeledes har voksne patienter med *cirrhose* nedsatte IGF-I og IGFBP-3 værdier, og begge parametre har vist sig at være uafhængige prognostiske markører for overlevelse hos patienter med alkoholisk cirrhose (29).

Nyresygdom

Børn med *kronisk nyresygdom* som ofte er karakteriseret ved ekstrem dværgvækst har relativt normale total IGF-I koncentrationer, men eleverede IGFBP-3 værdier. Dette medfører reduceret frit IGF-I som forklaring på deres væksthæmning (30-32).

Endokrine sygdomme

Børn med pubertas præcox har eleverede IGF-I og IGFBP-3 værdier (33), som falder under GnRH agonist behandling. Ligeledes findes eleverede IGF-I og IGFBP-3 koncentrationer hos patienter med thyreotoksikose (34,35) og akromegali (Figur 4). Omvendt findes hos patienter med hypothyreose nedsatte værdier (36,37). Patienter med *diabetes* har moderat nedsatte værdier (38-41).

IGF-I or IGFBP-3 hos børn med GH-mangel

Undersøgelser at den diagnostiske værdi af h.h.v. IGF-I og IGFBP-3 hos børn med GH mangel har vist at både IGF-I og IGFBP-3 har stor diagnostisk sensitivitet og specificitet hos børn med GH mangel (42-50), omend nogle forfattere finder en relativ lav diagnostisk værdi specielt hos kranielt bestrålede børn (51-53). Det er imidlertid vigtigt at gøre sig klart at en lav IGF-I værdi er ensbetydende med IGF-I mangel, og ikke nødvendigvis GH-mangel, idet andre faktorer kan påvirke IGF-I koncentrationen (se ovenfor). Sandsynligheden for at en lav IGF-I værdi hos et barn betyder at barnet har GH mangel har således været genstand for en lang række undersøgelser, hvor IGF-I valideres overfor provokationstesten, der fortsat antages som "the gold standard". Andre forfattere har imidlertid valgt at sige, at et barn med ekstrem dværgvækst og lav IGF-I (IGF-I mangel) bør være kandidat til GH behandling uanset resultatet af en farmakologisk stimulationsstests med en arbitrært fastsat cutoff værdi som diagnostisk kriterium (54).

IGF-I og IGFBP-3 må betragtes som vigtige diagnostiske redskaber i udredning af børn med dværgvækst som mistænkes for GH-mangel. Om man vælger at bruge en lav IGF-I eller IGFBP-3 værdi som vejledende for videre udredning med stimulationstest, eller man tager dem som et udtryk for IGF-I mangel, der potentielt bør korrigeres med GH behandling er stadig under livlig debat. Ovenævnte er naturligvis under forudsætning af at man har udelukket andre sygdomme eller tilstande som medfører lave IGF-I værdier.

IGF-I og IGFBP-3 hos voksne med GH mangel

Når længdevæksten er afsluttet hos patienter i behandling med GH pga GH-mangel blev behandlingen tidligere afsluttet, men da behandling i voksenlivet er blevet en registreret indikation, skal behandling evt. fortsættes ind i voksenlivet. Inden voksensubstitution med GH fortsættes, skal patienterne genundersøges med provokationstest, hvor en relativ lav cutoff værdi anvendes som kriterium for fortsat behandling (peak GH <3 ng/mL efter ITT). Baggrunden for denne retestning er at omkring 30% af patienterne som er behandlet i barneårene har normal gentestning (55). Den diagnostiske værdi af IGF-I og IGFBP-3 værdier er fundet at være temmelig svingende. Hoffman et al (56) fandt en sensitivitet for IGF-I på kun 23% hos 23 patienter med GH-mangel erhvervet i voksenlivet (adult onset (AO)), hvilket også er vist af andre (57). I modsætning til dette fandt de Boer et al (58) en sensitivitet på 96% hos 50 yngre voksne med GH-mangel opstået i barndommen (childhood-onset (CO)). Vi fandt en sensitivitet på 76% hos 79 patienter med CO-GHD (55) i overensstemmelse med andres fund (59,60).

Disse forskelle i den diagnostiske anvendelighed af IGF-I hos voksne med GH-mangel kan med stor sandsynlighed tilskrives forskelle i IGF-I assays, validiteten af normalmaterialerne, ætiologien til GH-mangel (CO versus AO) samt alderen af den undersøgte patientpopulation. Imidlertid kan man med sikkerhed sige at lave IGF-I og IGFBP-3 værdier er prædiktive for fortsat GH-mangel hos en patient med GH-mangel (og mangel på mindst et andet hypofysehormon) som efter behandling i barneårene

genundersøges. Hos en sådan patient er retestning med ITT ikke nødvendig, men foretages alligevel af hensyn til de bevilgende myndigheder.

Monitorering af GH behandling med IGF-I og IGFBP-3

Start dosis af GH doseres ud fra vægt eller overflade hos børn med GH mangel, og dosis justeres efterfølgende afhængig af vækstresponset. Der er ikke tradition for at regulere dosis på baggrund af en målt IGF-I eller IGFBP-3 værdi. Anderledes forholder det sig hos voksne med GH-mangel, idet man her ikke har væksten som parameter. Her er det vist at bivirkningsfrekvensen øges markant såfremt IGF-I ligger supranormalt, hvorfor man de fleste steder er overgået til en dosering af GH som er titreret på baggrund af IGF-I værdien. Man tilstræber at IGF-I skal ligge i øvre halvdel af normalområdet, men ikke over øvre grænse (+2SD). Dette er også hensigtsmæssigt i lyset af de nye rapporter om at en let forhøjet IGF-I er associeret med senere udvikling af bryst cancer (61) og prostata cancer (62) hos ivotrig raske individer.

Konklusion

IGF-I cirkulerer i blodbanen bundet til specifikke IGF bindingsproteiner (IGFBP-1 til -6), hvoraf IGFBP-3 er det kvantitativt mest betydende. Mere end 90% af det totale IGF-I cirkulerer bundet til IGFBP-3 i et højmolekylært proteinkompleks (150 kDa), og kun 0.5-1.0% cirkulerer i den frie (biologisk aktive) form. Regulationen af den biologiske aktivitet af IGF-I er yderst kompleks og involverer udover dannelseshastighed og clearance for IGF-I, også IGF bindingsproteinerne samt specifikke IGFBP proteaser. Måling af IGF-I indbefatter måling af total IGF-I efter forudgående ekstraktion af de interferende bindingsproteiner, men også bestemmelse af den frie IGF-I fraktion er nu mulig.

Både IGF-I og IGFBP-3 er primært reguleret af GH, og udviser i modsætning til GH ringe døgnvariation. Måling af IGF-I og IGFBP-3 har derfor vundet indpas som en måde at evaluere den GH sekretoriske kapacitet i udredning-

en af børn med vækstforstyrrelser. Korrekt klinisk anvendelse af IGF-I og IGFBP-3 er kun mulig såfremt valide normalmaterialer baseret på et stort antal individer er tilstede. Andre faktorer som malabsorption, lever-, nyresygdom eller andre endokrine sygdomme påvirker IGF-I koncentrationen. Såfremt man har udelukket andre sygdomme, er IGF-I og IGFBP-3 værdier under -2SD for en given alder ensbetydende med IGF-I mangel, og bør i de flestes øjne medføre nærmere udredning med stimulationstest inden GH behandling startes. Der er dog klinikere som mener at dværgvækst forenet med IGF-I mangel er indikation nok for at starte behandling.

"Irrespective of the age of the patient, however, it must be kept in mind that the distribution of the GH secretory capacity in a given population, including those with suspected GH deficiency, is rather continuous. There is no reason to assume that IGF measurements or any other test could ever introduce discontinuity where continuity exist. The apparently clear distinction between GHD and non-GHD is a fiction. It reflects in the end nothing else but the decision of the investigator to treat or not to treat the patient with hGH." (W. Blum (63)).

Referencer

1. Jørgensen JOL, Pedersen SA, Thuesen L, Jørgensen J, Ingemann-Hansen T, et al. Beneficial effects of growth hormone treatment in GH-deficient adults. *Lancet* 1989;ii:1221-5.
2. Salomon F, Cuneo RC, Hesp R, Sönksen PH. The effects of treatment with recombinant human growth hormone on body composition and metabolism in adults with growth hormone deficiency. *N Engl J Med* 1989;321:1797-1803.
3. Albertsson-Wikland K, Rosberg S, Karlberg J, Groth T. Analysis of 24-hour growth hormone profiles in healthy boys and girls of normal stature: relation to puberty. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;78:1195-1201.
4. Rose SR, Municchi G, Barnes KM, Kamp GA, Uriarte MM, et al. Spontaneous growth hormone secretion increases during puberty in normal girls and boys. *J Clin Endocrinol Metab* 1991;73:428-35.
5. Blum WF, Albertsson-Wikland K, Rosberg S, Ranke MB. Serum levels of Insulin-like Growth Factor I (IGF-I) and IGF Binding Protein 3 reflect spontaneous Growth Hormone Secretion *J Clin Endocrinol Metab* 1993;76:1610-6.
6. Frystyk J, Skjærbæk C, Dinesen B, Ørskov H. Free Insulin-like Growth Factors (IGF-I and IGF-II) in human serum. *FEBS Letters* 1994;348:185-91.
7. Hasegawa Y, Hasegawa T, Takeda M, Tsuchiya Y. Plasma free insulin-like growth factor I concentrations in growth hormone deficiency in children and adolescents. *Eur J Endocrinol* 1996;134:184-9.
8. Juul A, Flyvbjerg A, Frystyk J, Müller J, Skakkebak NE. Serum concentrations of free and total insulin-like growth factor-I, IGF binding proteins-1 and -3 and IGFBP-3 protease activity in boys with normal and precocious puberty. *Clin Endocrinol* 1996;44:515-23.
9. Juul A, Holm K, Kastrup KW, Pedersen SA, Michaelsen KF, et al. Free Insulin-like Growth Factor (IGF)-I serum levels in 1430 healthy children and adults, and its diagnostic value in patients suspected of Growth Hormone-deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:2497-2502.
10. Baxter RC, Binoux MA, Clemmons DR, Conover CA, Drop SLS, et al. Recommendations for nomenclature of the insulin-like growth factor binding protein superfamily. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:3213.
11. Giudice LC, Farrell EM, Pham H, Lamson

- G, Rosenfeld RG. Insulin-like growth factor binding proteins in maternal serum throughout gestation and in the puerperium: effects of a pregnancy-associated serum protease activity. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;71:806-16.
12. Davies SC, Wass JAH, Ross RJM, Cotterill AM, Buchanan CR, et al. The induction of a specific protease for insulin-like growth factor binding protein-3 in the circulation during severe illness. *J Endocrinol* 1991;130:469-73.
 13. Schalch DS, Turman NJ, Marcsisin VS, Heffernan M, Guler H-P. Short-term effects of recombinant human insulin-like growth factor I on metabolic control of patients with type II diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;77:1563-8.
 14. Skjærbæk C, Frystyk J, Ørskov H, Kissmeyer-Nielsen P, Jensen MB, et al. Differential changes in free and total insulin-like growth factor I after major, elective abdominal surgery: The possible role of insulin-like growth factor binding protein-3 proteolysis. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:2445-9.
 15. Hughes SCC, Cotterill AM, Molloy AR, Cassell TB, Braude N, et al. The induction of specific proteases for insulin-like growth factor-binding proteins following major heart surgery. *J Endocrinol* 1992;135:135-45.
 16. Bereket A, Lang CH, Blethen SL, Fan J, Frost RA, et al. Insulin-like Growth Factor Binding Protein-3 proteolysis in children with insulin-dependent diabetes mellitus: A possible role for insulin in the regulation of IGFBP-3 protease activity. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:2282-8.
 17. Juul A, Bang P, Hertel NT, Main K, Dalgaard P, et al. Serum insulin-like growth factor-I in 1030 healthy children, adolescents and adults; relation to age, sex, stage of puberty, testicular size and body mass index. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;78:744-52.
 18. Argente J, Caballo N, Barrios V, Pozo J, Muñoz MT, et al. Multiple endocrine abnormalities of the growth hormone and insulin-like growth factor axis in prepubertal children with exogenous obesity: Effect of short- and long-term weight reduction. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:2076-83.
 19. Faloni A, Bini V, Cabiati G, Papi F, Arzano S, et al. Serum levels of type I procollagen c-terminal propeptide, insulin-like growth factor-I (IGF-I), and IGF binding protein-3 in obese children and adolescents: relationship to gender, pubertal development, growth, insulin, and nutritional status. *Metabolism* 1997;46:862-71.
 20. Argente J, Caballo N, Barrios V, Muñoz MT, Pozo J, et al. Multiple endocrine abnormalities of the growth hormone and insulin-like growth factor axis in patients with anorexia nervosa: Effect of short- and long-term weight recuperation. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:2084-92.
 21. Counts DR, Gwirtzman H, Carlsson LMS, Lesem M, Cutler GBJ. The effect of anorexia nervosa and refeeding on growth hormone-binding protein, the insulin-like growth factors (IGFs), and the IGF-binding proteins. *J Clin Endocrinol Metab* 1992;75:762-7.
 22. Hernández M, Argente J, Navarro A, Caballo N, Barrios V, et al. Growth in malnutrition related to gastrointestinal diseases: coeliac disease. *Horm Res* 1992;38(suppl 1):79-84.
 23. Eichler I, Frisch H, Granditsch G. Growth failure and insulin-like growth factor (IGF-I) in childhood celiac disease. *Klin Wochenschr* 1991;69:825-9.
 24. Thomas AG, Holly JMP, Taylor F, Miller V. Insulin-like Growth Factor-I, Insulin-like Growth Factor Binding Protein-1, and insulin in childhood Crohn's disease. *Gut* 1993;34:944-7.
 25. Laursen EM, Juul A, Lanng S, Højby N, Koch C, et al. Diminished levels of Insulin-

- like growth factor I (IGF-I) in patients with cystic fibrosis. *Arch Dis Child* 1995;72:494-7.
26. Hassan AHI, Moneim AE, Aal AAAE, Aly SAAA, Ahmed SH, et al. Circulating growth hormone, insulin-like growth factor I, cortisol and free thyroxine in children with schistosomiasis with and without hepatic fibrosis. *J Tropical Pediatr* 1991;37:25-30.
 27. Holt RIG, Jones JS, Stone NM, Baker AJ, Miell JP. Sequential changes in insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF-binding proteins in children with end-stage liver disease before and after successful orthotopic liver transplantation. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:160-8.
 28. Buzi F, Bontempelli AM, Alberti D, Jones J, Pilotta A, et al. Growth, Insulin-like growth factor I (IGF-I), and IGF-binding proteins 1 and 3 in children with severe liver disease before and after liver transplantation: A longitudinal and cross-sectional study. *Pediatr Res* 1998;43:478-83.
 29. Møller S, Becker U, Juul A, Skakkebaek NE, Christensen E, et al. Prognostic value of insulin-like growth factor-I [IGF-I] and its binding protein [IGFBP-3] in patients with alcoholic liver disease. *Hepatology* 1996;23:1073-8.
 30. Tönshoff B, Blum WF, Wingen A-M, Mehls O, The European study group for nutritional treatment of chronic renal failure in childhood. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:2684-91.
 31. Blum WF, Ranke MB, Kietzmann K, Tönshoff B, Mehls O. Growth hormone resistance and inhibition of somatomedin activity by excess of insulin-like growth factor binding protein in uraemia. *Pediatr Nephrol* 1991;5:539-44.
 32. Hokken-Koelega ACS, Stijnen T, Keizer-Schrama SMPFd, Wit JM, Wolff ED, et al. Placebo-controlled, double-blind, cross-over trial of growth hormone treatment in prepubertal children with chronic renal failure. *Lancet* 1991;338:585-90.
 33. Juul A, Scheike T, Nielsen CT, Krabbe S, Müller J, et al. Serum Insulin-like Growth Factor (IGF)-I and IGF Binding Protein-3 levels are increased in central precocious puberty: Effects of two different treatment regimens with GnRH agonists, without or in combination with an anti-androgen (Cyproterone acetate). *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:3059-67.
 34. Valimaki M, Liewendahl, Karonen SL, Helenius T, Suikkari AM. Concentrations of somatomedin-C and triiodothyronine in patients with thyroid dysfunction and non-thyroidal illness. *J Endocrinol Invest* 1990;13:155-9.
 35. Foldes J, Lakatos P, Zsadanyi J, Horvath C. Decreased serum IGF-I and dehydroepiandrosterone sulphate may be risk factors for the development of reduced bone mass in postmenopausal women with endogenous subclinical hyperthyroidism. *Eur J Endocrinol* 1997;136:277-81.
 36. Miell JP, Zini JD, Jones J, Portioli I, Valcavi R. Reversible effects of cessation and recommencements of thyroxine treatment on Insulin-like Growth Factors (IGFs) and IGF-binding proteins in patients with total thyroidectomy. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;79:1507-12.
 37. Miell JP, Taylor AM, Zini M, Maheshwari G, Ross RJM, et al. Effects of hypothyroidism and hyperthyroidism on Insulin-like Growth Factors (IGFs) and growth hormone- and IGF-binding proteins. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;76:950-5.
 38. Batch JA, Baxter RC, Werther G. Abnormal regulation of insulin-like growth factor binding proteins in adolescents with insulin-dependent diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 1991;73:964-8.
 39. Janssen JAMJL, Jacobs ML, Derckx FMH, Weber RFA, van der Lely AJ, et al. Free and total insulin-like growth factor I (IGF-

- I), IGF-binding protein.1 (IGFBP-1), and IGFBP-3 and their relations to the presence of diabetic retinopathy and glomerular hyperfiltration in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:2809-15.
40. Radetti G, Paganini C, Antoniazzi F, Pasquino B, Valentini R, et al. Growth hormone binding proteins, IGF-I and IGF-binding proteins in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus. *Horm Res* 1997;47:110-5.
 41. Bereket A, Lang CH, Blethen SL, Co Ng L, Wilson TA. Insulin treatment normalizes reduced free insulin-like growth factor-I concentrations in diabetic children. *Clin Endocrinol* 1996;45:321-6.
 42. Lee PDK, Wilson DM, Rountree L, Hintz RL, Rosenfeld RG. Efficacy of Insulin-like Growth Factor I levels in predicting the response to provocative growth hormone testing. *Pediatr Res* 1990;27:45-51.
 43. Rosenfeld RG, Wilson DM, Lee PDK, Hintz RL. Insulin-like growth factors I and II in evaluation of growth retardation. *J Pediatr* 1986;109:428-33.
 44. Hasegawa Y, Hasegawa T, Aso T, Kotoh S, Nose O, et al. Clinical utility of insulin-like growth factor binding protein-3 in the evaluation and treatment of short children with suspected growth hormone deficiency. *Eur J Endocrinol* 1994;131:27-32.
 45. Adan L, Souberbielle J-C, Brauner R. Diagnostic markers of permanent idiopathic growth hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;78:353-8.
 46. Blum WF, Ranke MB, Kietzmann K, Gaugel E, Zeisel HJ, et al. A specific radioimmunoassay for the growth hormone (GH)-dependent somatomedin-binding protein: its use for diagnosis of GH deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;70:1292-8.
 47. Jackson-Smith W, Nam TJ, Underwood LE, Busby WH, Celnicker A, et al. Use of insulin-like growth factor-binding protein-2 (IGFBP-2), IGFBP-3, and IGF-I for assessing growth hormone status in short children. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;77:1294-9.
 48. Rasat R, Livesey J, Espiner EA, Abbott GD, Donald RA. IGF-1 and IGFBP-3 screening for disorders of growth hormone secretion. *New Zealand Medical Journal* 1996;109:156-9.
 49. Rikken B, van Doorn J, Rongeling A, van den Brande JL, Massa G, et al. Plasma levels of insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF-II and IGF-binding protein-3 in the evaluation of childhood growth hormone deficiency. *Horm Res* 1998;50:166-76.
 50. Juul A, Skakkebaek NE. Prediction of the outcome of growth hormone provocative testing in short children by measurement of serum levels of insulin-like growth factor I and insulin-like growth factor binding protein 3. *J Pediatr* 1997;130:197-204.
 51. Thomas MR, Miell JP, Taylor AM, Ross RJM, Arnao JR, et al. Endocrine and cardiac paracrine actions of insulin-like growth factor-I (IGF-I) during thyroid dysfunction on the rat: is IGF-I implicated in the mechanism of heart weight/body weight change during abnormal thyroid function?. *J Mol Endocrinol* 1993;10:313-23.
 52. Tillmann V, Buckler JMH, Kibirige MS, Price DA, Shalet SM, et al. Biochemical tests in the diagnosis of childhood growth hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:531-5.
 53. Cianfarani S, Boemi S, Spagnoli A, Cappa M, Argiro G, et al. Is IGF binding protein-3 assessment helpful for the diagnosis of GH deficiency? *Clin Endocrinol* 1995;43:43-7.
 54. Rosenfeld RG, Albertsson-Wikland K, Cassorla F, Frasier SD, Hasegawa Y, et al. Diagnostic controversy: The diagnosis of childhood growth hormone deficiency revisited. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:1532-40.

55. Juul A, Kastrup KW, Pedersen SA, Skakkebaek NE. Growth hormone (GH) provocative retesting of 108 young adults with childhood-onset GH deficiency and the diagnostic value of Insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF Binding Protein-3. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:1195-1201.
56. Hoffman DM, O'sullivan AJ, Baxter RC, Ho KKY. Diagnosis of growth-hormone deficiency in adults. *Lancet* 1994;343:1064-8.
57. Roelen CA, Koppeschaar HP, de Vries WR, Zelissen PM, Snel YE, et al. High-affinity growth hormone binding protein, insulin-like growth factor I and insulin-like growth factor binding protein 3 in adults with growth hormone deficiency. *Eur J Endocrinol* 1996;135:82-6.
58. De Boer H, Blok G-J, Popp-Snijders C, Van der Veen EA. Diagnosis of growth hormone deficiency in adults. *Lancet* 1994;343:1645-6.
59. Attanasio AF, Lamberts SWJ, Matranga AMC, Birkett MA, Bates PC, et al. Adult growth hormone (GH)-deficient patients demonstrate heterogeneity between childhood onset and adult onset before and during human GH treatment. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:82-8.
60. Ghigo E, Aimaretti G, Gianotti L, Bellone J, Arvat E, et al. New approach to the diagnosis of growth hormone deficiency in adults. *Eur J Endocrinol* 1996;134:352-6.
61. Hankinson SE, Willett WC, Colditz GA, Hunter DJ, Michaud DS, et al. Circulating concentrations of insulin-like growth factor-I and risk of breast cancer. *Lancet* 1998;351:1393-6.
62. Chan JM, Stampfer MJ, Giovannucci E, Gann PH, Ma J, et al. Plasma insulin-like growth factor-I and prostate cancer risk: A prospective study. *Science* 1998;279:563.
63. Blum WF. Insulin-like growth factors and IGF-binding proteins: their use for diagnosis of growth hormone deficiency. In: Juul A, Jørgensen JOL, eds. *Growth hormone in adults. Physiological and clinical aspects*. Cambridge: Cambridge University Press, 1996:48-74.
64. Juul A, Main K, Blum WF, Lindholm J, Ranke MB, et al. The ratio between serum insulin-like growth factor (IGF)-I and the IGF binding proteins (IGFBP-1, -2 and -3) decreases with age and is increased in acromegalic patients. *Clin Endocrinol* 1994;41:85-93.