

**s-01 Endokrynologia molekularna 1**

Przewodniczący sesji:  
Barbara Jarząb, Katarzyna Łącka

**Wykład programowy****PRO1****WRODZONY NIEDOBÓR GLOBULINY WIAŻĄCEJ HORMONY TARCZYCY (TBG) (NOWA MUTACJA del 1711 G)**

Katarzyna Łącka<sup>1</sup>, Teresa Niżankowska<sup>2</sup>,  
Agnieszka Ogródowicz<sup>3</sup>, Izabela Korczowska<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Katedra Endokrynologii, Przemiany Materii i Chorób Wewnętrznych AM im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu;  
<sup>2</sup> Poradnia Endokrynologiczna w Rzeszowie;  
<sup>3</sup> Klinika Reumatologii i Immunologii Klinicznej AM im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu

Białko wiążące tyroksynę (Thyroxine Binding Globulin) stanowi główne białko transportujące hormony tarczycy. Jest glikoproteiną o ciężarze cząsteczkowym ok. 54 kDa syntetyzowaną w wątrobie i zbudowaną z 395 aminokwasów. Jest ono kodowane przez gen TBG, zlokalizowany na długim ramieniu chromosomu X (Xq22.2). Gen TBG składa się z pięciu eksonów o długości 5.5 kpz. Pierwszy ekson (ekson 0) zawiera krótką niekodującą sekwencję.

Zmiany w genie TBG jako wynik różnego typu mutacji zlokalizowanych w eksonach, rzadziej w promotorze, lub w intronach, prowadzą do powstania różnych wariantów białka TBG powodując całkowity lub częściowy niedobór TBG (complete TBG deficiency: TBG-CD; partial TBG deficiency: TBG-PD), nadmiar TBG (TBG excess: TBG-E) lub dając stany przebiegające z ich prawidłowym stężeniem w surowicy.

Niedobór TBG występuje z częstością 1:5000 do 1:15 000 wśród rasy kaukaskiej oraz 1:1200 do 1:9000 wśród japończyków. Sposób dziedziczenia określa się jako dominujący, związany z chromosomem X. Klinicznie choroba w pełni ujawnia się u płci męskiej lub kobiet o kariotypie 45,X i charakteryzuje się u większości chorych obecnością wola oraz prawidłową czynnością tarczycy. Wyjątkowo rzadko tarczyca jest prawidłowej wielkości oraz pojawiają się objawy hipo- lub hipertyreozы. W surowicy krwi chorych stwierdza się obniżenie całkowitych hormonów tarczycy, podwyższoną wartość współczynnika trijodotyroniny przy prawidłowym stężeniu wolnych hormonów tarczycy i TSH. Podstawą rozpoznania schorzenia jest znacznie obniżone lub nieoznaczalne stężenie TBG w surowicy.

Dotąd opisano około 25 różnego typu mutacji w obrębie genu TBG prowadzących do powstania różnych wariantów TBG. Spośród nich kilka prowadzi do całkowitego niedoboru TBG (TBG-CD). Są to: TBG-CD5 (Mori et al., 1990), TBG-CD6 (Li et al., 1991), TBG-CDJ (Japan) (Yamamori et al., 1991), TBG-CDY (Yonago) (Ueta et al., 1997), TBG-CDB (Buffalo) (Carvalho et al., 1998), TBG-CDBe (Bedouin) (Miura et al., 2000), TBG-CDK (Kankakee) (Carvalho et al., 1998), TBG-CD Jackson (Retrakul et al., 2002), TBG-CDT1 (Su et al., 2003).

W trakcie prowadzonych przez nas badań obejmujących trzech braci z wrodzonym całkowitym niedoborem TBG, a zmierzających do określenia zmian w obrębie genu TBG jako przyczyny choroby, znaleziono nową mutacją del 1711 G prowadzącą do dotąd nieopisanego w piśmiennictwie wariantu białka TBG (TBG-CDP).

Analizie poddano trzech chorych z całkowitym niedoborem TBG, w wieku: 26, 25, 21 lat. U chorych klinicznie stwierdzano eutyreozę oraz wole guzkowe. Badania dodatkowe wykazały: prawidłowe stężenie wolnych hormonów tarczycy (HT) i TSH oraz obniżone stężenie całkowitych HT. Stężenie TBG w surowicy wynosiło odpowiednio: 0.53mg/L; 0.75mg/L; 0.53mg/L (norma: 13.4-36.6mg/L). Stężenie TBG w surowicy u dwóch zdrowych braci było: 18.1 i 20.7 mg/L, u zdrowego ojca: 13.8 mg/L, natomiast u matki (nosieli choroby) było obniżone: 8.63mg/L.

DNA izolowano z leukocytów krwi obwodowej, amplifikowano cztery eksony oraz sekwencję promotora genu TBG przy użyciu reakcji PCR. Produkty PCR o wielkości 672 pz (zawierający ekson 1), 467 pz (zawierający ekson 2), 351 pz (zawierający ekson 3), 421 pz (zawierający ekson 4) oraz 248 pz (zawierający promotor) poddano bezpośrednio sekwencjonowaniu enzymatycznemu przy użyciu aparatu Abi Prism.

Badania ujawniły delecję pojedynczego nukleotydu – guaniny G - w pozycji 1711 w kodonie 201 (Asp) eksonu 2 (GAC>AC). Mutacja ta, znaleziona u każdego z trzech badanych braci, prowadzi do zmiany ramki odczytu i przedwczesnej terminacji w kodonie 206 eksonu 2. Jej obecność powoduje zmianę 5 aminokwasów i skróceniem białka TBG do 206 aminokwasów (AA), w porównaniu do 395 AA prawidłowego białka. Nie wykazano jej u zdrowych członków rodziny.

**Słowo kluczowe:** białko TBG, wrodzony defekt TBG, gen TBG, mutacje

**CONGENITAL THYROXINE BINDING GLOBULIN (TBG) DEFICIENCY (NOVEL MUTATION del 1711G)**

Katarzyna Łącka<sup>1</sup>, Teresa Niżankowska<sup>2</sup>,  
Agnieszka Ogródowicz<sup>3</sup>, Izabela Korczowska<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Department of Endocrinology, Metabolism and Internal Medicine, Poznań University of Medical Sciences, Poznań;  
<sup>2</sup> Outpatients Unit for Endocrine Diseases, Rzeszów;  
<sup>3</sup> Department of Rheumatology and Clinical Immunology, Poznań University of Medical Sciences, Poznań

Thyroxine Binding Globulin (TBG) is the principal transport protein for thyroid hormones. It is a 54-kDa glycoprotein synthesized in the liver and composed of 395 amino acids. It is encoding by TBG gene located on the long arm of chromosome X (Xq22.2). TBG gene consists of five exons spanning 5.5 kbp. The first exon (exon 0) is a short noncoding sequence.

Changes in the TBG gene result from various type of mutations located in exons, or rarely in promoter or noncoding sequence lead to various variants of TBG which give complete or partial TBG deficiency (TBG-CD, TBG-PD), TBG excess (TBG-E) or status with normal level of TBG in serum. j

TBG deficiency occurs with frequency: 1:5000 do 1:15 000 among Caucasian and 1:1200 do 1:9000 among Japanese. It is inherited as X-chromosome traits. Clinically TBG deficiency appears in males or females with karyotype 45,X and it is characterized by the presence of goiter and euthyrosis. Extremely rarely the thyroid is normal sized and there are symptoms of hypo- or hyperthyrosis. In serum there are decreased level of total thyroid hormones, increased triiodothyronine index, normal level of free thyroid hormones and TSH. By definition, complete TBG deficiency is the absence or very low serum TBG concentration.

Until now about 25 various types of mutations in the TBG gene were described, which lead to various variants of TBG. Among them few lead to complete TBG deficiency (TBG-CD). There are the following: TBG-CD5 (Mori et al., 1990), TBG-CD6 (Li et al., 1991), TBG-CDJ (Japan) (Yamamori et al., 1991), TBG-CDY (Yonago) (Ueta et al., 1997), TBG-CDB (Buffalo) (Carvalho et al., 1998), TBG-CDBe (Bedouin) (Miura et al., 2000), TBG-CDK (Kankakee) (Carvalho et al., 1998), TBG-CD Jackson (Retrakul et al., 2002), TBG-CDT1 (Su et al., 2003).

During our studies performed in three brothers with complete TBG deficiency, that lead to show changes in the TBG gene as a cause of disease, we have found novel mutation (del 1711G) which gives novel, which has not been described yet, TBG variant (TBG-CDP).

Three male patients aged 26, 25 and 21 with congenital complete TBG deficiency were analyzed. Clinical examination showed euthyrosis and nodular goiter. Laboratory analysis presented: normal serum free thyroid hormones and TSH concentration, and decreased total thyroid hormones levels. Serum TBG levels were respectively: 0.53mg/L; 0.75mg/L; 0.53mg/L (norm: 13.4-36.6mg/L). Serum TBG level in two healthy brothers was: 18.1 and 20.7 mg/L, in their healthy father: 13.8 mg/L, and in their mother (carrier of the disease) was slightly decreased: 8.63mg/L.

DNA was isolated from leucocytes of the peripheral blood and then four exons were amplified as well as the TBG gene promoter using PCR reaction. PCR products of the magnitude of 672 bp (containing exon 1), 467 bp (containing exon 2), 351 bp (containing exon 3), 421 bp (containing exon 4) and 248 bp (containing promoter sequence) were sequenced by direct enzymatic method using the Abi Prism apparatus.

Our studies revealed novel mutation: single nucleotide deletion – G guanine – in the position 1771, codon 201 (Asp), exon 2 (GAC>AC). This mutation was found in three studied brothers of Polish origin with congenital complete TBG deficiency. It leads to a change of the open reading frame and pre-termination in codon 206. Its presence causes a change of 5 amino acids and a shortening of TBG protein to 206 amino acids (AA) compared to 395 AA of normal TBG.

This mutation has not been found in the healthy members of the studied family.

**Key words:** TBG, congenital TBG defect, TBG gene, mutation

## Doniesienia ustne

### S01-1

#### POLIMORFIZM GENU TYREOGLOBULINY I CD40 W CHOROBY GRAWESA-BASEDOWA

<sup>1</sup>Jadwiga Żebracka, <sup>1</sup>Dorota Kula, <sup>1</sup>Beata Jurecka-Lubieniecka, <sup>1</sup>Kornelia Hasse-Lazar, <sup>1</sup>Aleksandra Krawczyk, <sup>1</sup>Sylwia Szpak, <sup>2</sup>Michał Jarzqb, <sup>3</sup>Katarzyna Steinhof-Radwańska, <sup>1</sup>Małgorzata Kowalska, <sup>3</sup>Beata Hejduk, <sup>1</sup>Elżbieta Gubała, <sup>4</sup>Tomasz Bednarczuk, <sup>1</sup>Barbara Jarzqb

<sup>1</sup>Zakład Medycyny Nuklearnej i Endokrynologii Onkologicznej,

<sup>2</sup>Zakład Biologii Nowotworów,

<sup>3</sup>Zakład Radiodiagnostyki, Centrum Onkologii – Instytut im.

Marii Skłodowskiej – Curie, ul. Wybrzeże AK 15, 44-101 Gliwice

<sup>4</sup>Zakład Endokrynologii, Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej, Polska Akademia Nauk, Warszawa

**Wstęp.** Wśród genów odpowiedzi immunologicznej, których udział w predyspozycji dziedzicznej do choroby Gravesa-Basedowa (GB) jest udowodniony (HLA-DR3, CTLA-4), znalazły się nowe geny kandydackie. Jednym z nich jest gen CD40 (koduje cząsteczkę kostymulującą biorącą udział w aktywacji limfocytów T), jednakże dane z piśmiennictwa dotyczące CD40 są sprzeczne. Jednocześnie pojawiły się doniesienia wskazujące na rolę polimorfizmu genu tyreoglobuliny w autoimmunologicznych chorobach tarczycy.

**Celem pracy** było zbadanie związku polimorfizmu genu Tg (ekson 33) i CD40 (pozycja-1) z występowaniem choroby Gravesa-Basedowa.

**Materiał i metody.** W grupie GB było 194 pacjentów, natomiast grupa kontrolna liczyła 198 osób. Polimorfizm genów badano metodą PCR-RFLP z wykorzystaniem enzymu restrykcyjnego Hpy99 I dla Tg i enzymu Sty I dla CD40.

**Wyniki.** Wśród osób z GB homozygoty Tg CC stanowiły 34,9%, homozygoty TT 12,6% a heterozygoty TC 52,5%, natomiast w grupie kontrolnej odpowiednio: CC 34,5%, TT 12,4%, TC 53,1%, przy czym nie obserwowano żadnych różnic pomiędzy grupami. W przypadku genu CD40 również nie zaobserwowano znamienych różnic w rozkładzie genotypów pomiędzy grupą osób chorych a grupą kontrolną. Wśród osób z GB homozygoty CD40 CC stanowiły 61,9%, TT – 1,5% a CT – 36,6%, natomiast w grupie kontrolnej odpowiednio CC 56,6%, TT 6,1% a CT 37,3%. Obecność homozygoty CC nie dawała znamiennej podwyższonej wartości ilorazu szans (OR=1,24).

**Wnioski.** Otrzymane wyniki jak dotąd nie potwierdzają udziału ani genu CD40, ani tyreoglobuliny w predyspozycji dziedzicznej do choroby Gravesa-Basedowa, jednakże konieczne będzie sprawdzenie ich interakcji z innymi genami biorącymi udział w regulacji odpowiedzi immunologicznej.

#### THYROGLOBULIN AND CD40 GENE POLYMORPHISMS IN GENETIC PREDISPOSITION TO GRAVES' DISEASE

<sup>1</sup>Jadwiga Żebracka, <sup>1</sup>Dorota Kula, <sup>1</sup>Beata Jurecka-Lubieniecka, <sup>1</sup>Kornelia Hasse-Lazar, <sup>1</sup>Aleksandra Krawczyk, <sup>1</sup>Sylwia Szpak, <sup>2</sup>Michał Jarzqb, <sup>3</sup>Katarzyna Steinhof-Radwańska, <sup>1</sup>Małgorzata Kowalska, <sup>3</sup>Beata Hejduk, <sup>1</sup>Elżbieta Gubała, <sup>4</sup>Tomasz Bednarczuk, <sup>1</sup>Barbara Jarzqb

<sup>1</sup> Department of Nuclear Medicine and Endocrine Oncology,<sup>2</sup> Department of Tumor Biology,<sup>3</sup> Department of Radiology, Center of Oncology, Maria Skłodowska-Curie Memorial Institute, Wybrzeże AK 15, 44-100 Gliwice, Poland<sup>4</sup> Department of Endocrinology, Medical Research Center, Polish Academy of Science, Warsaw, Poland

**Introduction.** Among the immune regulatory genes, which contribute to the genetic predisposition to Graves' disease (GD) (HLA-DR3, CTLA-4), there are some new candidates, like CD40, which encodes a costimulatory molecule and participates in T cell activation. The literature data for its association with GD are contradictory. Simultaneously, some reports indicate on the role of thyroglobulin (Tg) gene polymorphism in autoimmune thyroid disease.

**Purpose.** The aim of our study was to estimate the association of thyroglobulin (exon 33) and CD40 (position-1) gene polymorphism with GD.

**Material and Methods.** Our material consisted of 194 patients with GD and 198 healthy persons. Both polymorphisms were analysed by PCR-RFLP with Hpy I (for thyroglobulin) and StyI (for CD40) enzymes.

**Results.** Among GD patients there were 34.9% Tg CC homozygotes, 12.6% TT homozygotes and 52.5% TC heterozygotes. Control group consisted of 34.5% CC homozygotes, 12.4% TT homozygotes and 53.1% TC heterozygotes, without significant difference between groups. For CD40, genotypes distribution did not differ between Graves' disease and controls ( $p=0.34$ ) as well. In Graves' patients there were 61.9% CC homozygotes, 1.5% TT homozygotes and 36.6% TC heterozygotes, while in the control group we observed 56.6% CC homozygotes, 6.1% TT homozygotes and 37.3% TC heterozygotes. For the CC homozygotes we did not observe any significant increase of OR value.

**Conclusions.** The results obtained until now do not confirm either CD40 or Tg gene contribution to the genetic background of Graves' disease, however, the examination of their relations with other immune regulatory genes is necessary.

## S01-2

### OCENA ZNACZENIA ZMIAN GERMINALNYCH W STRUKTURZE PROMOTORA IGF-1 U CHORYCH Z WOLEM GUZKOWYM

Michałek Krzysztof, Waśko Ryszard, <sup>1</sup>Pacholska Joanna, <sup>1</sup>Goździcka-Józefiak Anna, Sowiński Jerzy

Katedra i Klinika Endokrynologii, Przemiany Materii i Chorób Wewnętrznych, Akademia Medyczna im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

<sup>1</sup>Zakład Wirusologii Molekularnej, Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

**Wstęp.** Polimorfizm regionu promotorowego genu insulinopodobnego czynnika wzrostu 1 (IGF-1) jest w ostatnich latach intensywnie badany. Z uwagi na częstość występowania zmian nukleotydowych w tym regionie, szczególne znaczenie ma poznanie klinicznych aspektów zaburzeń molekularnych. W dotychczasowych badaniach stwierdzono związek polimorfizmu z predylekcją do występowania niektórych chorób nowotworowych, czy zaburzeń metabolicznych. Inaktywujące zmiany stwierdzano także u dzieci z niskorosłością oraz prawidłowymi

osoczowymi stężeniami hGH i IGF-1. W poprzednich badaniach oceniliśmy częstość polimorficznych zmian somatycznych w tkankach 46 chorych poddanych strumektomii na 30,4 %.

**Cel.** Ocena znaczenia klinicznego germinalnych zmian nukleotydowych w regionie promotorowym genu IGF-1 u chorych z wolem guzkowym.

**Badani.** Badana grupa obejmowała 18 chorych w wieku 30-75 lat z obecnością zmian ogniskowych w tarczycy.

**Metody.** DNA izolowano z leukocytów krwi obwodowej metodą fenolową. Po dokonaniu oceny ilościowej i jakościowej DNA posłużył jako matryca do amplifikacji in vitro wybranego fragmentu regionu promotorowego za pomocą reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR). Produkty PCR analizowano za pomocą elektroforezy w żelu agarozowym i metodą techniki SSCP. Fragmenty wykazujące różnice w migracji w żelu poddano sekwencjonowaniu bezpośredniemu.

**Wniosek.** U badanych chorych występują germinalne zmiany nukleotydowe w regionie promotorowym genu IGF-1. Polimorfizm wydaje się być funkcjonalny (inaktywujący) i wpływać na wielkość tarczycy u dorosłych.

### ASSESSMENT OF SIGNIFICANCE OF GERMINAL NUCLEOTIDE CHANGES IN IGF-1 GENE PROMOTER IN PATIENTS WITH NODULAR GOITRE

Michałek Krzysztof, Waśko Ryszard, <sup>1</sup>Pacholska Joanna, <sup>1</sup>Goździcka-Józefiak Anna, Sowiński Jerzy

Department of Endocrinology, Metabolism and Internal Diseases, University of Medical Sciences in Poznań, Poland

<sup>1</sup>Department of Molecular Virology, Institute of Molecular Biology and Biotechnology, Adam Mickiewicz University in Poznań

**Introduction.** Recently, the IGF-1 gene promoter polymorphism is an object of an intensive research. In the view of the fact of a high frequency of nucleotide changes in this region, discovering the clinical relevance of this phenomenon is an important task. The polymorphism was reported to be connected with susceptibility to certain types of cancer or metabolic disorders. Inactivating changes were also found in short-stature children with normal serum IGF-1 and GH concentrations. In our previous studies we assessed the frequency of somatic polymorphic changes in the group of 46 strumectomised patients to be as high as 30.4%.

**Aim.** The assessment of significance of germinally nucleotide changes in patients with nodular goitre.

**Material.** The studied group consisted of 18 patients aged 30-75 with nodular lesions in thyroid.

**Methods.** A genomic DNA was isolated from peripheral blood leukocytes by phenol extraction. Genomic DNAs were used for in vitro amplification by polymerase chain reaction (PCR). All samples were analysed by single strain conformation polymorphism (SSCP). The fragments of DNA with altered gel migration pattern were cloned into pGEM T-Easy Vector System, and then automatically sequenced.

**Conclusion.** Germinally nucleotide changes occur in studied group in IGF-1 gene promoter. The polymorphism in thought to functional and influence the size of the thyroid gland in the adult patients.

## S01-3

### ZWIĄZEK POLIMORFIZMÓW GENU RECEPTORA JĄDROWEGO WITAMINY D (VDR) Z PODATNOŚCIĄ NA ROZWÓJ CHOROBY GRAVESA-BASEDOWA W POPULACJI POLSKIEJ

Alina Kuryłowicz<sup>1</sup>, Elizabeth Ramos-Lopez<sup>2</sup>, Klaus Badenhoop<sup>2</sup>, Ewa Bar-Andziak<sup>3</sup>, Janusz Nauman<sup>1</sup>, Tomasz Bednarczuk<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Zakład Endokrynologii Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej Polskiej Akademii Nauk w Warszawie

<sup>2</sup> I Klinika Chorób Wewnętrznych, Oddział Endokrynologii, Szpitala Uniwersyteckiego we Frankfurcie nad Menem

<sup>3</sup> Klinika Chorób Wewnętrznych i Endokrynologii Akademii Medycznej w Warszawie

**Wstęp:** Jednym z interesujących kandydatów w badaniach nad podatnością genetyczną do rozwoju choroby Gravesa-Basedowa (*ang.* Graves' disease – GD) jest gen receptora jądrowego witaminy D (*ang.* vitamin D receptor – VDR), który w odpowiedzi na 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> reguluje transkrypcję genów docelowych.

**Cel pracy:** Celem pracy było zbadanie związku polimorfizmów genu VDR z podatnością na rozwój GD w populacji polskiej oraz ich wpływu na przebieg kliniczny choroby.

**Materiał i metody:** U 339 chorych z GD i 197 zdrowych ochotników badano cztery polimorfizmy zamiany pojedynczych nukleotydów w genie VDR: *BsmI* (zamiana G na T, G→A), *Apal* (G→T), *TaqI* (T→C) i *FokI* (C→T) za pomocą analizy długości fragmentów restrykcyjnych (*ang.* restriction fragment length polymorphism – RFLP).

**Wyniki:** U chorych z GD stwierdzono zwiększoną częstość genotypów *BsmI* G/G (45,4% vs. 33,5%, P=0,007, Odds Ratio=1,65) i *FokI* C/C (29,9% vs. 18,1%, P=0,003, OR=1,93) w porównaniu z grupą kontrolną, natomiast rozkład genotypów polimorfizmów *Apal* i *TaqI* był podobny w obu badanych grupach. Analiza haplotypów utworzonych z alleli polimorfizmów *BsmI*, *Apal* i *TaqI* pozwoliła zaobserwować zwiększoną częstość haplotypu G/G/T (49,0% vs. 35,0%, P=0,005, OR=1,76) w grupie chorych z GD. Nie stwierdzono natomiast związku badanych polimorfizmów genu VDR z przebiegiem klinicznym GD: wiekiem wystąpienia choroby, stopniem zaawansowania oftalmopatii, rodzinnym występowaniem autoimmunologicznych chorób tarczycy, płcią i paleniem papierosów.

**Wnioski:** W niniejszej pracy wykazano, iż polimorfizmy genu VDR są związane z podatnością na rozwój choroby Gravesa-Basedowa w populacji polskiej. Nie stwierdzono jednak ich wpływu na przebieg kliniczny GD.

### ASSOCIATION OF THE VITAMIN D RECEPTOR (VDR) POLYMORPHISMS WITH GRAVES' DISEASE IN POLISH POPULATION

Alina Kuryłowicz<sup>1</sup>, Elizabeth Ramos-Lopez<sup>2</sup>, Klaus Badenhoop<sup>2</sup>, Ewa Bar-Andziak<sup>3</sup>, Janusz Nauman<sup>1</sup>, Tomasz Bednarczuk<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Endocrinology, Medical Research Center, Polish Academy of Science, Warsaw, Poland

<sup>2</sup> Department of Internal Medicine I, Division of Endocrinology, University Hospital Frankfurt am Main, Germany

<sup>3</sup> Department of Endocrinology, Medical University of Warsaw, Poland

**Introduction:** Diverse genes are candidates for susceptibility to Graves' disease (GD), including the vitamin D receptor (VDR) which regulates transcription of target genes in response to the active metabolite - 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>.

**Aim of the study:** The purpose of our study was to investigate the association of the VDR gene single nucleotide polymorphisms (SNPs) with susceptibility to and the clinical phenotype of GD in Polish population.

**Material and Methods:** 339 patients with GD and 197 healthy controls were genotyped for *BsmI* (G to T change, G→A), *Apal* (G→T), *TaqI* (T→C) and *FokI* (C→T) polymorphisms in the VDR gene by the polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method.

**Results:** In patients with GD, we observed significantly increased frequency of the *BsmI* G/G (45.4% vs. 33.5%, P=0.007; Odds Ratio=1.65) and *FokI* C/C (29.9% vs. 18.1%, P=0.003, OR=1.93) genotypes, compared to the healthy subjects, whereas *Apal* and *TaqI* genotypes were equally distributed in both studied groups. Analysis of haplotypes constructed from *BsmI*, *Apal* and *TaqI* SNPs revealed the increased frequency of G/G/T haplotype (49.0% vs. 35.0%, P=0.005; OR=1.76) in patients with GD. No correlation was found between the VDR gene SNPs and the clinical phenotype of GD: age of the disease onset, severity of eye changes, gender, positive family history or smoking habits.

**Conclusions:** Our results suggest that the VDR gene polymorphisms confer susceptibility to Graves' disease in Polish population, however they do not seem to be associated with the clinical phenotype of GD.

## S01-4

### PREDYSPOZYCJA DZIEDZICZNA DO CHOROBY GRAVESA-BASEDOWA – WSPÓLDZIAŁANIE DRB1\*03 ORAZ GENÓW CTLA-4 I TNF

<sup>1</sup>Dorota Kula, <sup>4</sup>Tomasz Bednarczuk, <sup>1</sup>Beata Jurecka-Lubieniecka, <sup>1</sup>Kornelia Hasse-Lazar, <sup>1</sup>Aleksandra Krawczyk, <sup>1</sup>Sylvia Szpak, <sup>1</sup>Tomasz Stęchły, <sup>2</sup>Michał Jarząb, <sup>3</sup>Katarzyna Steinhof-Radwańska, <sup>1</sup>Małgorzata Kowalska, <sup>1</sup>Agnieszka Pawlaczek, <sup>3</sup>Beata Hejduk, <sup>1</sup>Elżbieta Gubała, <sup>1</sup>Jadwiga Żebracka, <sup>4</sup>Alina Kuryłowicz, <sup>5</sup>Ewa Bar-Andziak, <sup>4</sup>Janusz Nauman, <sup>1</sup>Barbara Jarząb

<sup>1</sup> Zakład Medycyny Nuklearnej i Endokrynologii Onkologicznej,

<sup>2</sup> Zakład Biologii Nowotworów,

<sup>3</sup> Zakład Radiodiagnostyki, Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Gliwice

<sup>4</sup> Zakład Endokrynologii, Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej, Polska Akademia Nauk, Warszawa

<sup>5</sup> Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych i Endokrynologii, Akademia Medyczna w Warszawie

**Celem pracy** była ocena związku obecności allelu HLA-DRB1\*03 w kontekście polimorfizmu genu CTLA-4 (pozycja 49) i TNF (pozycja -308) dla badania interakcji pomiędzy tymi genami w związku z występowaniem choroby Gravesa-Basedowa (GB).

**Materiał i metody.** DNA pochodziło od 430 osób z chorobą GB i 308 osób zdrowych (oznaczenia dla 200 osób z chorobą GB i 200 osób zdrowych wykonano w Gliwicach, dla 230 i 108 odpowiednio w Warsza-

wie). Oznaczanie alleli HLA-DRB1 wykonano techniką PCR-SSO i PCR-SSP, natomiast polimorfizm genu TNF i CTLA-4 badano techniką PCR/RFLP.

**Wyniki.** Przy osobnej analizie każdego z genów zaobserwowano znamienne różnice w częstości występowania genotypów DRB1\*03, TNF i CTLA-4 u osób chorych w stosunku do zdrowych, co potwierdziło ich znany związek z chorobą GB, najsilniejszy dla DRB1\*03 (OR=3,06). Współwystępowanie rzadkich alleli DRB1\*03, TNF A i CTLA-4 G było związane ze wzrostem wartości OR do 3,67. Analiza stratyfikacyjna nie wykazała osobnego wpływu polimorfizmu genu TNF, oprócz wpływu wynikającego ze sprzężenia z DRB1\*03, a udział genu CTLA-4 w predyspozycji dziedzicznej do choroby był niezależny od DRB1\*03. Wieloczynnikowa regresja logistyczna wykazała, że interakcja wszystkich trzech genów powoduje najsilniejszy wzrost względnego ryzyka zachorowania (15-krotny), obok niezależnego efektu DRB1\*03. Niezależny efekt CTLA-4 jest znacznie słabszy, choć też znamieny.

**Wnioski.** Wykonana analiza wskazuje na współdziałanie genów DRB1\*03 i CTLA-4 w predyspozycji dziedzicznej do choroby Gravesa-Basedowa, w której istotne znaczenie dodatkowe ma polimorfizm (-308) TNF.

Praca finansowana przez grant KBN nr 4 P05B 069 19 i 3 P05 D 148 22

#### PREDISPOSITION TO GRAVES' DISEASE - INTERACTION OF HLA II CLASS DRB1\*03 ALLELE WITH CTLA-4 AND TNF GENES

<sup>1</sup>Dorota Kula, <sup>4</sup>Tomasz Bednarczuk, <sup>1</sup>Beata Jurecka-Lubieniecka, <sup>4</sup>Kornelia Hasse-Lazar, <sup>1</sup>Aleksandra Krawczyk, <sup>1</sup>Sylvia Szpak, <sup>1</sup>Tomasz Stęchły, <sup>2</sup>Michał Jarzqb, <sup>3</sup>Katarzyna Steinhof-Radwańska, <sup>1</sup>Małgorzata Kowalska, <sup>1</sup>Agnieszka Pawlaczek, <sup>3</sup>Beata Hejduk, <sup>1</sup>Elżbieta Gubała, <sup>1</sup>Jadwiga Żebracka, <sup>4</sup>Alina Kuryłowicz, <sup>5</sup>Ewa Bar-Andziak, <sup>4</sup>Janusz Nauman, <sup>1</sup>Barbara Jarzqb

<sup>1</sup> Department of Nuclear Medicine and Endocrine Oncology,

<sup>2</sup> Department of Tumor Biology,

<sup>3</sup> Department of Radiology, Center of Oncology, Maria Skłodowska-Curie Memorial Institute, Gliwice, Poland

<sup>4</sup> Department of Endocrinology, Medical Research Center, Polish Academy of Science, Warsaw, Poland

<sup>5</sup> Department of Endocrinology, Medical University in Warsaw, Poland

**The purpose** of the study was to estimate the association between the presence of HLA-DRB1\*03, CTLA-4 (position 49), TNF (position -308) gene polymorphism and Graves' disease (GD). We investigated also interactions between simultaneous occurrence of rare alleles of all the analyzed genes and their influence on GD risk.

**Material and Methods.** GD group consisted of 430 patients compared to 308 healthy persons, all genotyped for HLA-DRB1 (PCR-SSP and PCR-SSO), CTLA-4 and TNF polymorphism (PCR-RFLP) (200 GD patients and 200 healthy persons were examined in Gliwice, 230 and 108 respectively in Warsaw).

**Results.** Significant differences were stated in the genotypes distribution for DRB1\*03, CTLA-4 and TNF between GD and controls. OR values for all investigated genes were significantly increased, with the highest value for

DRB1\*03 (3.06). The simultaneous presence of DRB1\*03, CTLA-4 G and TNF A increased the OR to 3.67. Next, the contribution of each of them was analysed, first by the stratification analysis, which did not indicate any independent influence of TNF gene on GD besides the linkage disequilibrium with DRB1\*03. The effect of CTLA-4 did not depend on DRB1\*03 presence, thus, both genes were considered as additive. When the multiple logistic regression was performed, it revealed, that the highest relative risk was observed for the DRB1\*03 - CTLA-4 - TNF interaction. The independent effect of DRB1\*03 was also very distinct, while the effect of CTLA-4 alone was rather small, although significant. The interaction between these both genes without TNF contributed to a much lesser extent to the observed GD occurrence.

**Conclusions.** DRB1\*03 and CTLA-4 contribute to Graves' disease in a cooperative manner and this effect is strengthened by the presence of TNF (-308) polymorphism.

The project was supported by Polish State Committee for Scientific Research, 4 P05B 069 19 and 3 P05 D 148 22

#### S01-5 EKSPRESJA GENÓW NIS, PDS I AIT W RAKU BRODAWKOWATYM TARCZYCY I PRZERZUTACH DO WĘZŁÓW CHŁONNYCH

Małgorzata Wiench<sup>1</sup>, Małgorzata Kowalska<sup>1</sup>,  
Jolanta Krajewska<sup>1</sup>, Michał Jarzqb<sup>2</sup>, Agnieszka  
Czarniecka<sup>3</sup>, Elżbieta Gubała<sup>1</sup>, Agnieszka  
Pawlaczek<sup>1</sup>, Ewa Chmielik<sup>4</sup>, Jan Włoch<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Zakład Medycyny Nuklearnej i Endokrynologii Onkologicznej;

<sup>2</sup> Zakład Biologii Nowotworów;

<sup>3</sup> Klinika Chirurgii;

<sup>4</sup> Zakład Patologii Nowotworów; Centrum Onkologii- Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach.

**Wstęp:** Spadek ekspresji genów, kodujących białka błonowe biorące udział w transporcie jonów jodkowych: NIS, PDS i AIT może prowadzić do zmniejszenia jodochwytności obserwowanej w raku tarczycy.

**Celem pracy** była analiza poziomu ekspresji genów NIS, PDS i AIT w rakach brodawkowatych tarczycy (PTC) przy pomocy reakcji Q-PCR w czasie rzeczywistym.

**Materiał i metody:** Materiał do badań stanowił całkowity RNA wyizolowany z 58 tkanek raka tarczycy i odpowiadających im tkanek zdrowych oraz z 41 przerzutowych węzłów chłonnych. 0,5 µg całkowitego RNA wykorzystywano w reakcji odwrotnej transkrypcji. Geny NIS i PDS były amplifikowane we wspólnej mieszaninie reakcyjnej z genem odniesienia (GUS), natomiast gen AIT i GUS były namnażane w oddzielnych reakcjach.

**Wyniki:** We wszystkich analizowanych tkankach, jak i w materiale z biopsji, transkrypt dla genu GUS był obecny, a jego poziom był stabilny. W kontrolnych tkankach prawidłowej tarczycy średnia wartość ekspresji wynosiła: 0,5 dla NIS, 1,14 dla PDS i 0,78 dla AIT w jednostkach arbitralnych, podczas gdy w tkankach guza: 0,008, 0,13, 0,07 odpowiednio dla NIS, PDS, AIT. W tkankach guza zaobserwowaliśmy korelację pomiędzy ekspresją wszystkich trzech genów i była ona najbardziej wyraźna pomiędzy genami PDS i AIT. Korelację tych dwóch genów zaobserwowaliśmy również w tkankach prawidłowych, w których brak było takiej zależności pomiędzy ekspre-

sją NIS a PDS i AIT. W przerzutowych węzłach chłonnych obniżenie ekspresji genów PDS i AIT było bardziej wyraźne niż w guzach (0,008 i 0,007). Ekspresja genu NIS również była niska, ale jej wartość nie różniła się od wartości w guzach tarczycy.

**Wnioski:** Ekspresja genów kodujących NIS, pendrynę i AIT ulega w znacznym stopniu obniżeniu w rakach brodawkowatych tarczycy oraz w przerzutowych węzłach chłonnych. Regulacja transkrypcji jest podobna dla genów PDS i AIT, natomiast różni się dla genu NIS.

## EXPRESSION OF GENES NIS, PDS AND AIT IN PAPILLARY THYROID CARCINOMAS AND LYMPH NODE METASTASES

*Małgorzata Wiench<sup>1</sup>, Małgorzata Kowalska<sup>1</sup>, Jolanta Krajewska<sup>1</sup>, Michał Jarząb<sup>2</sup>, Agnieszka Czarniecka<sup>3</sup>, Elżbieta Gubała<sup>1</sup>, Agnieszka Pawlaczek<sup>1</sup>, Ewa Chmielik<sup>4</sup>, Jan Włoch<sup>3</sup>*

<sup>1</sup> Department of Nuclear Medicine and Endocrine Oncology,

<sup>2</sup> Department of Tumor Biology,

<sup>3</sup> Department of Oncological Surgery,

<sup>4</sup> Department of Tumor Pathology; Maria Skłodowska-Curie Memorial Cancer Center and Institute of Oncology, Gliwice, Poland

**Introduction:** Altered expression of genes coding membrane transporters which take part in the iodide transport: NIS, PDS and AIT, may be an important factor leading to the reduced <sup>131</sup>I accumulation in most thyroid cancers.

**The aim of the study** was to investigate the NIS, PDS and AIT genes expression in papillary thyroid carcinomas by means of real-time Q-PCR.

**Material and methods:** Total RNA was isolated from 58 paired normal and PTC samples and 41 samples of lymph node metastases. 0.5 µg total RNA was taken to the reverse transcription reaction. Both NIS and PDS mRNA were amplified in multiplex reaction with GUS mRNA as a control. AIT and GUS genes were amplified in a single reaction.

**Results:** All the investigated tissues as well as fine needle biopsy specimens displayed GUS transcript. Its expression was stable in all tissues. In control thyroid tissues the median values were: 0.5 for NIS, 1.14 for PDS and 0.78 for AIT, whereas in papillary thyroid carcinomas: 0.008, 0.13, 0.07 for NIS, PDS and AIT, respectively. In tumor tissues NIS, PDS and AIT expression correlated with each other, the most prominent correlation was between PDS and AIT. The co-expression of this two genes was also evident in normal tissues. Simultaneously, in normal samples there was no correlation between NIS and both PDS and AIT expression. The down-regulation of PDS and AIT was more distinct in lymph node metastases than in tumor tissues and the median expression values were 0.008 and 0.007. The expression of NIS was very low but its median value did not differ from that in primary tissues.

**Discussion:** The expression of NIS, PDS and AIT genes is distinctly down-regulated in papillary thyroid carcinomas and lymph node metastases. Transcriptional control seems to be similar for PDS and AIT but different in NIS gene.

## S01-6

### PROFIL EKSPRESJI W RAKU BRODAWKOWATYM TARCZYCY OTRZYMANY METODĄ MIKROMACIERZY DNA: METAANALIZA

*Jarosław Starzyński<sup>1</sup>, Małgorzata Oczko-Wojciechowska<sup>2</sup>, Michał Jarząb<sup>3</sup>, Elżbieta Gubała<sup>2</sup>, Aleksandra Kukulska<sup>2</sup>, Daria Handkiewicz-Junak<sup>2</sup>, Anna Goc<sup>2</sup>, Barbara Jarząb<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> Pracownia Genetyki, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Toruń

<sup>2</sup> Zakład Medycyny Nuklearnej i Endokrynologii Onkologicznej,

<sup>3</sup> Zakład Biologii Nowotworów, Centrum Onkologii – Instytut im. M.Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach

**Wstęp:** Statystyczna selekcja dużej liczby genów otrzymanych przy użyciu mikromacierzy DNA jest obarczona dużą niedokładnością oszacowania, którą określa się poprzez ryzyko wyniku fałszywie dodatniego (FDR). Dopiero porównanie wyników dla danych publikowanych przez wiele grup pozwala na wyselekcjonowanie wysoce wiarygodnych markerów molekularnych i redukcję ryzyka wyników fałszywie dodatnich. Ze względu na dużą liczbę porównywanych genów, konieczne jest zastosowanie metod bioinformatycznych do tego celu.

**Cel:** Celem niniejszej pracy było dokonanie metaanalizy danych dotyczących transkryptomu raka brodawkowatego tarczycy i porównanie ich z własnymi wynikami.

**Materiał i metody:** Analizę przeprowadzono na danych dotyczących profilu ekspresji 50tkanek – raków tarczycy i tkanek normalnych (Jarząb i wsp., Cancer Res. 2005, mikromacierz HG U-133A dostępne pod adresem [www.genomika.pl/thyroidcancer/](http://www.genomika.pl/thyroidcancer/)), przez ich porównanie do list genów pochodzących z badań publikowanych przez 14 grup zajmujących się genomiką funkcjonalną nowotworów tarczycy. Geny z innych publikacji zidentyfikowano za pomocą bazy NetAffx, analizę przeprowadzono za pomocą oprogramowania GeneSpring 7.2.

**Wyniki:** W danych pochodzących z 14 innych grup badawczych (17 publikacji) wymieniono 1494 geny. Po porównaniu 16 tkanek raka brodawkowatego i 16 tkanek normalnej tarczycy (nasz zbiór uczący) 3135 transkryptów wykazało istotną statystycznie różnicę w ekspresji. Kiedy podjęto analizę dla danych pochodzących z metaanalizy, zidentyfikowano 590 genów o FDR <5%, z których 72 nie zostały zidentyfikowane w naszej wyjściowej grupie. 518 genów, potwierdzonych dzięki obydwu podejściom, może stanowić grupę wysoce przydatnych markerów molekularnych.

**Wnioski:** W raku brodawkowatym tarczycy metodą mikromacierzy można zidentyfikować silne i wiarygodne markery molekularne. Najlepszy potencjał różnicujący między guzem a tkanką zdrową mają geny: FN1, DPP4, MET, CDH3, LGALS3.

*Projekt finansowany przez Ministerstwo Nauki i Informatyzacji: PBZ-KBN-040/P04/2001*

## EXPRESSION PROFILE IN PAPILLARY THYROID CANCER BY DNA MICROARRAY METHOD: META-ANALYSIS

*Jarosław Starzyński<sup>1</sup>, Małgorzata Oczko-Wojciechowska<sup>2</sup>, Michał Jarząb<sup>3</sup>, Elżbieta Gubała<sup>2</sup>, Aleksandra Kukulska<sup>2</sup>, Daria Handkiewicz-Junak<sup>2</sup>, Anna Goc<sup>2</sup>, Barbara Jarząb<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> Dept. of Genetics, Mikołaj Kopernik University, Toruń<sup>2</sup> Dept. of Nuclear medicine and Endocrine Oncology<sup>3</sup> Dept. of Tumor Biology, – MSC Memorial institute, Center of Oncology, Gliwice<sup>1</sup> Klinika Endokrynologii CMKP i Poradnia Endokrynologiczna, Warszawa<sup>2</sup> Zakład Teleradioterapii, Instytut Onkologii, Warszawa<sup>3</sup> I Klinika Chirurgii Szczękowej, AM Warszawa<sup>4</sup> Oddział Okulistyczny, Szpital Czerniakowski, Warszawa<sup>5</sup> Klinika Laryngologii CMKP, Warszawa

**Introduction:** Statistical selection of large number of genes obtained from DNA oligonucleotide microarray analysis is burdened with false estimation. It is usually estimated as False Discovery Rate (FDR). The comparison of own results with data published by different groups justifies the selection of reliable molecular markers and reduces the risk of false-positives, however, at the large numbers of genes to be compared, requires bioinformatical tools.

**Aim of study:** The aim of our study was to perform the meta-analysis of functional genomics studies in papillary thyroid cancer and to compare them with our own results.

**Material and methods:** The analysis was conducted on the microarray dataset of gene expression in 50 papillary thyroid cancer and normal thyroid tissues (Jarzab et al., Cancer Res. 2005, HG U133A micorarray, available at www.genomika.pl/thyroidcancer), by their comparison to the list of genes obtained from the studies published by 14 other groups, related to papillary thyroid cancer. Genes from different publications were identified by NetAffx database, the statistical analysis was conducted by GeneSpring 7.2.

**Results:** In the datasets from 14 studies (in total 17 papers) 1494 genes were mentioned. When we compared 16 tumor and 16 normal tissues (our initial set) we found 3135 transcripts significantly different between both classes. When we performed this comparison on genes obtained by the meta-analysis, we identified 590 genes with FDR <5%. 72 of these genes were not significant in our initial analysis. 518 genes selected by both approaches may constitute useful molecular markers in PTC.

**Conclusions:** In papillary thyroid cancer we can reveal some strong molecular markers, which are appearing in many datasets, among them FN1, DPP4, MET, CDH3, LGALS3.

*Project funded by Ministry of Science and Information Society Technologies: PBZ-KBN-040/P04/2001*

S-02

## Tarczycyca 1

Przewodniczący sesji:

Ewa Bar-Andziak, Janusz Nauman

### Wykład programowy

PR2

#### KORTYKOTERAPIA, RADIOTERAPIA I LECZENIE CHIRURGICZNE – TRZY KOLEJNE ETAPY STANDARDOWEGO LECZENIA 1050 CHORYCH Z CIĘŻKĄ OFTALMOPATIĄ GRAVESA

Helena Jastrzębska<sup>1</sup>, Małgorzata Gietka-Czernel<sup>1</sup>, Jadwiga Janik<sup>1</sup>, Stefan Zgliczyński<sup>1</sup>, Regina Karczmarzyk<sup>2</sup>, Jacek Fijuth<sup>2</sup>, Hubert Wanyura<sup>3</sup>, Barbara Potyra<sup>4</sup>, Jan Kuś<sup>5</sup>

Celem pracy było opracowanie standardowego leczenia ciężkiej oftalmopatii Graves'a. Oceniano skuteczność i tolerancję 3 etapowego leczenia- kortykoterapia (I), radioterapia (II) i leczenie operacyjne (III) u 1050 chorych w wieku 20-73 lat, średnio 51,2±12,1 zaliczonych do klas od 3c do 6 wg. Amerykańskiego Towarzystwa Tyreologicznego. Wyniki leczenia oceniano w oparciu o wskaźnik oftalmopatii. I etap leczenia fazy aktywnej u 966 badanych polegał na podaniu prednisonu doustnie w dawce wstępnej 60-100mg/d. W 36 przypadkach ciężkiej neuropatii n.wzrokowego podawano 1000mg methyprednisonu dożylnie przez 7 dni, a następnie prednison doustnie. U 331 chorych kortykoterapię zakończono po 20 tyg. II etap leczenia fazy aktywnej polegał na megawoltażowej radioterapii oczodołów w dawce 20Gy zastosowanej u 564 chorych. Leczenie wdrażano po 4 tyg kortykoterapii i kojarzono z kortykoterapią trwającą łącznie 12 tyg. III etap-dekompresję chirurgiczną oczodołów przeprowadzono u 49 chorych. W fazie nieaktywnej choroby u 86 chorych wykonano rehabilitacyjne operacje mięśni okoruchowych. Kortykoterapia prowadziła do wybitnej poprawy w obniżeniu wskaźnika oftalmopatii z 7,4 do 4,4 (p<0,01) ze szczególnym wpływem na tkanki miękkie i nerw wzrokowy (poprawa u 80% i 81% leczonych). Nawroty fazy aktywnej dotyczyły 54% chorych w czasie 12 miesięcy od przebytego leczenia. Objawy uboczne wystąpiły u 42% badanych w czasie pierwszej kortykoterapii i u 59% podczas powtarzanej terapii, wśród nich najczęściej cukrzyca (13% leczonych). Kortykoterapia (I etap) połączona z radioterapią (II etap) okazała się najbardziej skuteczną metodą zachowawczego leczenia. Prowadziła do wczesnej poprawy porównywalnej z kortykoterapią, co wyrażało się obniżeniem wskaźnika oftalmopatii z 8,0 do 4,7 (p<0,01). Odsetek nawrotów fazy aktywnej ograniczył się do 15%. Leczenie skojarzone umożliwiło skrócenie czasu trwania kortykoterapii o 30% i zmniejszenia całkowitej dawki kortykoidów o 50%. Wczesne objawy popromienne ze strony tkanek miękkich oczu wystąpiły u 15% leczonych. Chirurgiczna dekompresja oczodołów prowadziła do istotnej poprawy z obniżeniem wskaźnika oftalmopatii z 9,2 do 5,4 (p<0,01). Szczególny wpływ dotyczył proptozy, uszkodzenia rogówki i nerwu wzrokowego (poprawa u odpowiednio 100%, 100% i 80% leczonych). Powikłaniem leczenia było nasilenie lub pojawienie się podwójnego widzenia u 21% leczonych. Operacje mięśni okoruchowych doprowadziły u 80% leczonych do ustąpienia podwójnego widzenia przy patrzeniu na wprost i ku dołowi. Wobec braku skutecznej pojedynczej metody leczenia ciężkich zmian ocznych w chorobie Graves'a, wprowadzenie standardowego 3- etapowego sposobu postępowania umożliwiło uzyskanie poprawy lub wyleczenia u wszystkich 1050 chorych, spośród których 29 niewidomych odzyskało zdolność widzenia.

#### CORTICOTHERAPY, RADIOTHERAPY AND SURGERY- THREE STAGES OF STANDARD THERAPY FOR 1050 PATIENTS WITH SEVERE GRAVES' OPHTHALMOPATHY