

wartości HOMA w okresie 5 lat obserwacji prospektywnej była porównywalna. Przyrost m.c. u osób z ZM powoduje istotny wzrost indexu IR, podczas gdy ubytek m.c.- jego zmniejszenie. Pogorszenie funkcji komórki β w okresie 5 lat wydaje się nie zależeć od fluktuacji m.c.

CHANGE OF INSULIN RESISTANCE INDEXES (HOMA) AND BETA CELL FUNCTION (HOMA – BETA) IN HEALTHY SUBJECTS AND IN PATIENT WITH METABOLIC SYNDROME IN 5 YRS LONG FOLLOW-UP STUDY

Mardarowicz Grażyna, Łopatynski Jerzy, Nicer Teresa, Matej-Butrym Agata

Department of Family Medicine, Medical University in Lublin, Poland

The aim of the study was to compare the level of insulin resistance (IR) in healthy subjects and in patients with metabolic syndrome (MS) according to fluctuations of body weight (BW) during the 5 yrs long prospective observation.

Material nad methods: We investigated 28 healthy subjects in mean age 54.8 ± 10 yrs and with mean body mass index (BMI) 31.1 ± 2.8 in whom during the 5-yrs long observation no metabolic disorders connected to IR developed and follow-up BMI was 30.7 ± 3.8 . We compared this group with group of 201 subjects with MS analysed in three groups: A (n=38)- cases with stabile BW; B (n=69)- cases with weight gain; C (n=94)- cases with weight decrease during follow-up study. In initial and follow-up study we performed physical examination, blood pressure and anthropometric measurements and laboratory tests (glucose and insulin concentration- fasting and 2h after oral load of 75g of glucose, blood lipids), we calculated index of IR by HOMA method and beta cell function (HOMA-beta).

Results: The mean value of HOMA index in the group of healthy subjects with stabile BW changed from 1.61 ± 0.77 to 1.95 ± 1.25 and HOMA-beta from 125 ± 71 to 93 ± 59 . In group A (mean BMI 30.8 ± 3.6 ; mean age 57.8 ± 8.5) HOMA changed from 2.27 ± 2.05 to 2.30 ± 1.16 and HOMA-beta from 105.9 ± 76 to 93.7 ± 79.6 . In group B of MS patients HOMA increased from 1.96 ± 0.97 to 2.52 ± 1.29 ; this increase was especially expressed in patients with weight gain $\geq 10\%$ (1.62 ± 0.64 vs 2.47 ± 1.32 and HOMA-beta decreased from 121.2 ± 81.05 to 92.65 ± 42.69 . In group C HOMA decreased from 3.06 ± 1.99 to 2.98 ± 1.97 ; in patients with weight decrease $\geq 10\%$ (2.90 ± 1.66 vs 2.63 ± 0.92) and HOMA-beta decreased from 112.9 ± 64.4 to 91.9 ± 51.4 .

Conclusions: The level of IR indexes HOMA in MS patients are comparable to values observed in 5 yrs older "metabolically healthy" subjects. Independent of higher level of IR in MS patients than in healthy subjects, the dynamics of changes in HOMA indexes during 5 yrs long observation by stabile BW is comparable. BW gain in MS patients causes significant increase in IR-index while the weight loss causes its decrease. Deterioration of beta cell function after a lapse of 5 yrs appears to be independent of BW fluctuations.

P-02 Endokrynologia molekularna i doświadczalna 1

Przewodniczący sesji:
Wojciech Jeske, Gabriela Meleń-Mucha

14 RECEPTOR THS, NIS, PENDRYNA I PEROKSYDAZA TARCZYCOWA W RAKACH TARCZYCY: EKSPRESJA mRNA, BIAŁKA I LOKALIZACJA KOMÓRKOWA

Nikodemski Anna¹, Skubis-Zegadło Joanna¹, Łyczkowska Anna¹, Mikula Michał², Czerwińska Jolanta³, Przytuła Ewa³, Bardadın Krzysztof³, Wenzel E Björn⁴, Czarnocka Barbara¹

¹ Zakład Biochemii Klinicznej CMKP w Warszawie;

² Klinika Gastroenterologii CMKP i Centrum Onkologii w Warszawie;

³ Zakład Patomorfologii CMKP w Warszawie;

⁴ Laboratorium Immunobiologii, Wydział Medyczny I, Uniwersytet Medyczny w Lubce

Wstęp. Metabolizm jodu w tarczycy jest wieloetapowym procesem w którym uczestniczą swoiste białka: r-TSH- białko regulujące funkcję tarczycy, NIS- transporter błon podstawnych, pendryna- transporter błon szczytowych i TPO- główny enzym biosyntezy T_3/T_4 . Raki tarczycy zwykle obrazowane są jako guzki zimne, co sugeruje zmiany w metabolizmie jodu mogące wystąpić na każdym jego etapie.

Cel pracy: Analizowano ekspresję r-TSH, NIS, pendryny i TPO na poziomie mRNA i białka i ich komórkową lokalizację w serii łagodnych i złośliwych guzów tarczycy; korelowano ich ekspresję ze stopniem zaawansowania i wielkością guza.

Materiał i Metody: Do badań użyto 80 tkanek tarczyc od pacjentów z chorobą Graves'a (G)-5, wolem guzkowym (NG)-5, gruczolakami (FA) -15, zróżnicowanymi rakami tarczycy (DTC) - 45: 15 FTC-30 PTC i prawidłowe tarczycy od tych samych pacjentów (NT). Poziom transkryptu oznaczano RT-real time PCR, białko metodą Western blot i IHC. W metodach immunologicznych do detekcji NIS i pendryny używano swoiste przeciwciała poliklonalne, do detekcji r-TSH i TPO mysie przeciwciała monoklonalne.

Wyniki: Średnie wartości poziomu mRNA r-TSH, NIS, pendryny i TPO w rakach tarczycy były niższe od wartości w tarczycach prawidłowych 2, 3, 7 i 9-krotnie. Obserwowano dużą zmienność poziomu mRNA w rakach. W części DTC poziomy mRNA były niższe 25 do 300 krotnie od poziomu w NT, szczególnie dla NIS. Poziom białka potwierdzał poziom oznaczonych transkryptów z wyjątkiem białka NIS. IHC wykazano, iż r-TSH lokalizował w błonach podstawnych w DTC i NT. Większości DTC była negatywna dla białko NIS, w części obserwowano lokalizację wewnątrzkomórkową. Pendryna w $>75\%$ DTC była zlokalizowana wyłącznie cytoplazmatycznie. TPO było negatywne w IHC, ale białko TPO metodą Western blot obserwowano w większości DTC

Wnioski: Ekspresja r-TSH, NIS, pendryny, TPO w DTC ulega zmianom na poziomie mRNA i białka. Obserwuje się również zmiany w konformacji i lokalizacji komórkowej białek.

Granty CMKP: 501-2-1-01-64/02 i 501-2-1-01-60/02

THYROTROPIN RECEPTOR, NIS, PENDRIN AND THYROID PEROXIDASE IN THYROID CARCINOMAS: mRNA AND PROTEIN EXPRESSION AND CELLULAR LOCALIZATION

Nikodemka Anna¹, Skubis-Zegadło Joanna¹, Łyczkowska Anna¹, Mikula Michał², Czerwińska Jolanta³, Przytuła Ewa³, Bardadin Krzysztof³, Wenzel E Björn⁴, Czarnocka Barbara¹

¹ Department of Biochemistry, Medical Centre for Postgraduate Education, Warsaw;

² Department of Pathology, Medical Centre for Postgraduate Education, Warsaw;

³ Department of Gastroenterology, Medical Centre for Postgraduate Education, Oncology Centre, Warsaw;

⁴ Cell & Immunobiology Laboratory, Department of Medicine I, Medical University, Lübeck

Introduction: The iodine metabolic pathway in thyrocytes comprises several steps and specific proteins: TSH-receptor, NIS, pendrin, and TPO on both mRNA and the protein levels and their cellular localization in a series of benign and malignant thyroid tumors, and associated with the tumor stage/size.

Aim: In present study, we analyzed expression of TSH-r, NIS, pendrin, and TPO on both mRNA and the protein levels and their cellular localization in a series of benign and malignant thyroid tumors, and associated with the tumor stage/size.

Material and Methods: Eighty thyroid tissue samples: Graves' (G)-5, nodular goiter (NG)-5, follicular adenoma (FA) -15, differentiated thyroid carcinomas (DTC) -45: 15FTC - 30 PTC, and normal paired tissue (NT) were used for analysis. Transcripts levels were quantified by RT-real time PCR analysis. The proteins were detected by Western blot and by IHC. In immunological methods NIS and pendrin were detected with site-specific polyclonal, TSH-r and TPO with monoclonal antibodies.

Results: Mean values of mRNA levels of TSH-r, NIS, pendrin and TPO decreased in DTC by factor 2, 8, 7 and 9 respectively; however, a high variability was observed. In some cases the mRNA level in cancers were 25 to 300 fold lower than in NT, especially detected for NIS mRNA. Western blot demonstrated that all but NIS protein corroborated mRNA levels. The IHC pattern displayed variations in proteins cellular localization. TSH-r localized to basolateral membranes in both cancer and NT, NIS was rarely detected in membranes, and majority of tumors displayed intracellular staining, pendrin was solely located in the cytoplasm whereas TPO was not detected by IHC, and detected by Western blot.

Conclusions: The results of this study demonstrate that analyzed proteins expression in DTC undergo alterations on mRNA and protein levels, and improper cellular localization and conformation is observed.

Granty CMKP: 501-2-1-01-64/02 and 501-2-1-01-60/02

15 OCENA CZĘSTOŚCI WYSTĘPOWANIA MUTACJI V599E GENU BRAF W RAKU BRODAWKOWATYM TARCZYCY W POPULACJI POLSKIEJ

Ewa Brzezińska, Dorota Pastuszek-Lewandoska, Monika Migdalska-Sęk, Katarzyna Wojciechowska, Andrzej Lewiński

Klinika Endokrynologii i Chorób Metabolicznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Wstęp: Gen *BRAF* jest ludzkim homologiem ptasiego protoonkogenu *c-Rml* kodującego kinazę serynowo-treoninową. W komórkach ssaków istnieje kilka izoform tego enzymu (*ARAF*, *BRAF*, *CRAF*, *RAF1*), uczestniczących w regulacji szlaku kinaz ERK/MAPK, tj. szlaku, który odgrywa kluczową rolę w procesach proliferacji, różnicowania i apoptozy komórki. Najczęściej występującą mutacją tego genu jest transwersja (T/A) w nukleotydzie 1796, czego wynikiem jest zamiana waliny na kwas glutaminowy w pozycji 599 (V599E) aktywnego segmentu *BRAF*. Częstość występowania mutacji genu *BRAF* w nowotworach u ludzi jest różna: od ponad 80% w przypadku czerniaka do 1-3% w nowotworach płuca. W badaniach sporadycznego raka brodawkowego tarczycy (PTC) stwierdzono, że mutacja V599E genu *BRAF* jest najczęstszą zmianą genetyczną w PTC (35,8%) i nie występuje w innych łagodnych czy złośliwych guzach gruczołu tarczowego. Fakt ten może wskazywać na kluczową rolę tej mutacji w determinacji fenotypu guza i jednocześnie sugerować znaczenie genu *BRAF* jako markera w przedoperacyjnej ocenie guzków tarczycy. W populacji polskiej nie określono częstości występowania mutacji V599E genu *BRAF* w raku tarczycy, jak również nie dokonano korelacji z określonym podtypem guza.

Cel pracy: Celem pracy była ocena częstości występowania mutacji V599E genu *BRAF* w raku brodawkowym tarczycy w obrębie populacji polskiej oraz próba dokonania korelacji pomiędzy obecnością mutacji a podtypem guza.

Materiały i metody: Badaniem objęto 33 przypadki raka brodawkowego tarczycy. DNA izolowano z tkanki mrożonej w ciekłym azocie (Genomic Midi AX kit, A&A Biotechnology, Gdynia). Analizę mutacji prowadzono wykorzystując metody: PCR-SSCP, PCR-RFLP, specyficzną dla alleli amplifikację w czasie rzeczywistym oraz bezpośrednie sekwencjonowanie.

Wyniki: W oparciu o dotychczas przeprowadzoną analizę wykryto zmiany konformacji pojedynczych nici DNA w eksonie 15 (8/33 PTC) oraz w eksonie 11 (4/33 PTC) genu *BRAF*. W 2 z 12 przypadków PTC o zmienionym wzorze SSCP zaobserwowano zatracenie miejsca docelowego w produktach PCR eksonu 15 po trawieniu enzymem TspI. Występowanie mutacji punktowej V599E (mutacja heterozygotyczna) planuje się potwierdzić allelo-specyficzną amplifikacją w czasie rzeczywistym oraz w reakcji bezpośredniego sekwencjonowania.

Wnioski: Występowanie mutacji V599E w eksonie 15 genu *BRAF* wykryto w 2 z 33 (6%) badanych przypadków PTC. Mutacje te korelowały z podtypem wysokokomórkowym PTC (1 przypadek) oraz z podtypem klasycznym PTC (1 przypadek). Występowanie mutacji zaobserwowano u kobiet w młodszym wieku (47-49 lat).

INCIDENCE ASSESSMENT OF BRAF V599E MUTATION IN PAPILLARY THYROID CARCINOMA IN THE POLISH POPULATION

Ewa Brzezińska, Dorota Pastuszek-Lewandoska, Monika Migdalska-Sęk, Katarzyna Wojciechowska, Andrzej Lewiński

Department of Endocrinology and Metabolic Diseases, Medical University of Łódź

Introduction: *BRAF* gene is a human homologue of avian *c-Rml* protooncogene encoding serine-threonine kinase. There are several isoforms of this enzyme in mammalian cells (*ARAF*, *BRAF*, *CRAF*, *RAF1*), being components of the ERK/MAPK pathway, which plays a key role in cell proliferation, differentiation and apoptosis. The most frequent *BRAF* mutation is nucleotide transversion (T/A) at position 1796, which results in valine-to-glutamic acid substitution at residue 599 (V599E) of *BRAF* gene. The frequency of *BRAF* mutation varies widely in human cancers: from more than 80% in melanomas to 1-3% in lung cancers.

In case of sporadic papillary thyroid carcinoma (PTC), it is stated that *BRAF* V599E mutation is the most frequent lesion in PTC (35,8%) and is not found in other benign or malignant thyroid tumors. This suggests that *BRAF* mutation can play a key role in phenotype determination of thyroid lesions and can serve as a marker in preoperative evaluation of thyroid nodules. So far, the incidence of *BRAF* V599E mutation in the Polish population, as well as its correlation with tumor subtype, was not determined.

Aim of the study: The aim of the study was an assessment of *BRAF* V599E mutation incidence in PTC in the Polish population. We also tried to establish a correlation between the mutation presence and tumor subtype.

Materials and Methods: 33 cases of papillary thyroid carcinoma were analyzed. DNA was isolated from snap-frozen thyroid tissues (Genomic Midi AX kit, A&A Biotechnology, Poland). Mutation analysis was performed, based on the following methods: PCR-SSCP, PCR-RFLP, real-time allele-specific amplification and direct sequencing.

Results: The analysis of PCR products revealed changes in DNA single strand conformation in exon 15 (8/33 PTCs) and exon 11 (4/33 PTC) of *BRAF* gene. In 2 out of 12 PTCs with changed SSCP pattern, *TspI* restriction site was lost in case of exon 15. The presence of V599E point mutation (heterozygous mutation) is planned to be confirmed, using real-time allele-specific amplification and direct sequencing.

Conclusions: *BRAF* V599E mutation in exon 15 was found in 2 out of 33 (6%) studied PTC cases. The mutations correlated with tall-cell variant of PTC (1 case) and with classic variant of PTC (1 case) and were observed in younger female patients (47-49 years).

16 OCENA NADEKSPRESJI BIAŁKA ORAZ MUTACJI GENU P53 W TKANKACH NOWOTWORÓW WYWODZĄCYCH SIĘ Z KOMÓRKI PĘCHERZYKOWEJ TARCZYCY

Ewa Manuszewska-Jopek¹, Katarzyna Łącka², Krzysztof Michałek², Katarzyna Iwanik³, Przemysław Majewski³, Jerzy Skrobisz⁴, Maciej Gembicki²

¹ Wojewódzka Poradnia Specjalistyczna „Endokrynologia” w Poznaniu

² Katedra i Klinika Endokrynologii, Przemiany Materii i Chorób Wewnętrznych, Akademia Medyczna w Poznaniu

³ Katedra Patomorfologii, Akademia Medyczna w Poznaniu

⁴ Oddział Chirurgii Ogólnej, Gastroenterologicznej i Endokrynologicznej Szpital Wojewódzki w Poznaniu

Cel pracy: 1. ocena nadekspresji białka P53, 2. poszukiwanie mutacji w eksonach 5, 6, 7 i 8 genu *P53* w tarczycach chorych na łagodne i złośliwe nowotwory tarczycy, 3. ocena korelacji między typem histologicznym, stopniem zaawansowania w momencie rozpoznania oraz tempem progresji nowotworu a wykryciem dysfunkcji białka P53.

Materiał i metody: Badano uzyskane podczas operacji tarczycy 33 chorych, w których badanie histopatologiczne ujawniło: gruczolaka pęcherzykowego - 15 przypadków (45%), raka brodawkowego - 13 (40%), raka pęcherzykowego - (6%), raka anaplastycznego - 3 (9%). W grupach raków brodawkowatych i pęcherzykowych dwa wykazywały niski stopień zróżnicowania. Jako kontroli użyto tarczyc 10 chorych, u których tyreoidectomię wykonano z innych niż choroba tarczycy powodów. Izolację DNA z tarczyc mrożonych przeprowadzono metodą fenolową z użyciem proteiny K. Amplifikacji eksonów 5, 6, 7 i 8 dokonano w reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR). Produkt amplifikacji poddano wstępnej selekcji analizując polimorfizm konformacji fragmentów jednoniciowych (SSCP) w żelu poliakrylamidowym. Próbkę o zmienionym wzorze prążków poddano sekwencjonowaniu bezpośredniemu. Badanie immunohistochemiczne przeprowadzono techniką ABCComplex przy użyciu monoklonalnych przeciwciał DO-7.

Wyniki: Nadekspresję białka P53 stwierdzono w siedmiu przypadkach nowotworów złośliwych. Poziom nadekspresji był różny: w tkankach raków niezróżnicowanych (anaplastycznych) - wysoki (+++), w nisko-zróżnicowanym raku pęcherzykowym - nieco niższy (++), zaś w przypadkach raków brodawkowatych - niski (+). Mutacje genu *P53* wykazano przy użyciu techniki SSCP w pięciu przypadkach raków tarczycy, przy czym potwierdzenie metodą sekwencjonowania uzyskano w czterech próbkach. Wszystkie zmiany mają charakter mutacji punktowych zmiany sensu typu substytucji.

Chorzy, u których stwierdzono dysfunkcję białka P53, prezentowali w większości wysoki stopień zaawansowania klinicznego raka tarczycy w momencie rozpoznania choroby nowotworowej ($T_4N_{2b}M_{1 \text{ lub } 2}$). Ponadto obserwowano u nich często gwałtowną progresję choroby, co doprowadziło do zgonu w okresie kilku miesięcy od czasu podjęcia leczenia.

Wnioski:

1. Mutacje genu *P53* oraz stabilizacja białka P53 występują częściej u chorych z niskim stopniem zróżnicowa-

nia raków wywodzących się z komórek pęcherzykowych tarczycy

2. Ocena nadekspresji białka P53 oraz analiza mutacji genu *P53* są wzajemnie się uzupełniającymi technikami badawczymi w diagnostyce chorób nowotworowych tarczycy.

Słowa kluczowe: nowotwory tarczycy, białko P53, gen *P53*

THE OVEREXPRESSION INVESTIGATION OF P53 PROTEIN AND GENE MUTATIONS IN NEOPLASMAL TISSUE ARISING FROM FOLLICULAR THYROID CELLS

Ewa Manuszewska-Jopek¹, Katarzyna Łącka², Krzysztof Michałek², Katarzyna Iwanik³, Przemysław Majewski³, Jerzy Skrobisz⁴, Maciej Gembicki²

¹ Regional Endocrine Health Clinic in Poznań

² Department of Endocrinology, Metabolism and Internal Medicine, Poznań University of Medical Sciences

³ Department of Patomorphology, Poznań University of Medical Sciences

⁴ Oddział Chirurgii Ogólnej, General Gastroenterological and Endocrinological Surgery Ward, Regional Hospital in Poznań

Aim: 1) assess the overexpression of P53 protein, 2) search for the mutations within the 5, 6, 7 and 8 exons of *P53* gene in thyroids obtained from patients with benign and malignant thyroid neoplasms, 3) estimate if there is a correlation between detected overexpression of P53 protein and mutations of *P53* gene and histological type, the level of clinical advance at the moment of diagnosis and the progression rate of the neoplasm.

Materials and methods: The thyroid glands were obtained during thyroid surgery and the histopathological examination revealed: follicular adenomas in 15 (45%) cases, papillary carcinomas in 13 (40%) cases, follicular carcinomas in 6% of cases and anaplastic carcinomas in 9% of cases. There were 2 poorly differentiated forms of carcinomas in the papillary and follicular carcinomas group. The control group comprised of 10 thyroid glands obtained from patients in whom a non thyroid-disorders were the reason for thyroidectomy.

DNA isolation from frozen thyroids samples was carried out with fenol method with the use of proteinase K. The amplification of 5, 6, 7 and 8 exons was conducted with the use of polimerase chain reaction (PCR). The amplification product was initially analysed for changes in migration in poliacylamid gel detected by SSCP technique and chosen samples were directly sequenced. A part of thyroid tissues was also directed to immunohistochemical analysis, carried out with ABCComplex technique with the use of DO-7 monoclonal antibodies.

Results: The overexpression of P53 protein was detected in 7 cases of malignant carcinomas. The overexpression levels varied in different thyroid tissues and was: high (+++) in undifferentiated (anaplastic) carcinomas, moderate (++) in poorly differentiated follicular carcinoma and low (+) in cases of papillary carcinoma. The *P53* gene mutations were detected with the use of SSCP technique in 5 cases of thyroid carcinomas and were confirmed by sequencing in 4 cases. All the mutations were point mutations. Patients, in whom the stabilisation of P53 protein was detected in tumorous tissues, presented with a high

clinical advance level when the neoplasm was diagnosed ($T_4N_{2b}M_{1 \text{ or } 2}$). Moreover, the progression of the disease was very rapid and led to death within few months since the therapy was introduced.

Conclusions:

1. *P53* gene mutations and P53 protein stabilisation are commonly observed in patients with low differentiated carcinomas, developed from follicular cells,
2. The assessment of P53 protein overexpression as well as the analysis of *P53* gene mutation are essential and complementary inquiring procedures used in the diagnosis of thyroid neoplasms.

Key words: thyroid neoplasms, P53 protein, P53 gene

17 AKTYWNOŚĆ KOMÓREK ENDOKRYNNYCH TARCZYCY U SZCZURÓW PO PODANIU KANNABINOIDÓW

Robert Ł. Zbucki¹, Beata Szyńska², Bogusław Sawicki², Piotr Kosiorek¹, Izabela Białuk¹, Jacek Dadan⁴, Maria M. Winnicka¹

¹ Zakład Patologii Ogólnej i Doświadczalnej

² Zakład Patomorfologii Lekarskiej

³ Zakład Histologii i Embriologii

⁴ I Klinika Chirurgii Ogólnej i Endokrynologicznej, Akademia Medyczna w Białymstoku

Wstęp: Konopie indyjskie są jednymi z najstarszych roślin używanych w celach leczniczych. Ich wykorzystanie ograniczone jest działaniem psychotropowym oraz wpływem na układ dokrewny. W badaniach doświadczalnych wykazano obecność receptora CB1 w tarczycy oraz hamujący wpływ kannabinoidów na wydzielanie hormonów tarczycy.

Cel: Ocena wpływu jednorazowego podania kannabinoidów R(+)-methanandamidu (2.5 mg/kg), stabilnego analogu anandamidu oraz selektywnego agonisty receptora CB1 – CP 55,940 (0.25 mg/kg), na aktywność komórek endokrynnych tarczycy u szczurów.

Materiał i metody: Stężenie kalcytoniny w osoczu oceniono metodą RIA. Badania immunohistochemiczne wykonano metodą ABC z zastosowaniem przeciwciał przeciwko kalcytoninie. Badania ultrastrukturalne wykonano wg typowej procedury.

Wyniki: Cztery godziny po iniekcji obu kannabinoidów stwierdzono wzrost immunoreaktywności komórek C z towarzyszącym obniżeniem stężenia kalcytoniny w osoczu. Badania histologiczne wykazały obecność dużych rozmiarów pęcherzyków, wysłanych płaskim nabłonkiem, na szczycie którego występowały znacznie mniej liczne i niższe mikrokosmki widoczne w mikroskopie elektronowym. Obraz siateczki śródplazmatycznej, mitochondriów, jąder i znaczna ilość ciemnych ziaren sekrecyjnych w komórkach C oraz zmniejszenie ilości wakuoli resorbujących w komórkach pęcherzykowych świadczyły o obniżonej aktywności obu rodzajów komórek.

Wniosek: Powyższe obserwacje wskazują, iż kannabinoidy wpływają na aktywność komórek endokrynnych tarczycy, prawdopodobnie przez pobudzenie receptora CB1.

ACTIVITY OF THYROID ENDOCRINE CELLS AFTER CANNABINOIDS ADMINISTRATION IN RATS

Robert Ł. Zbucki¹, Beata Szyńska², Bogusław Sawicki², Piotr Kosiorek¹, Izabela Białuk¹, Jacek Dadan³, Maria M. Winnicka¹

¹ Department of General and Experimental Pathology

² Department of Medical Pathomorphology

³ Department of Histology and Embryology

⁴ 1st Department of General and Endocrinological Surgery, Medical University of Białystok, Poland

Introduction: Cannabis sativa is one of the oldest medicinal plants known to humans. The clinical use of cannabinoids is limited by their psychotropic and endocrine actions. These limitations led to increasing interest in mechanism of cannabinoids action and their influence on endocrine cells activity. The presence of cannabinoid CB1 receptors in thyroid and the inhibitory influence of cannabinoids on thyroid hormones secretion were shown.

Aim: Evaluation of the activity of thyroid endocrine cells after a single ip injection of anandamid analogue - R-(+)-methanandamide (2.5 mg/kg) and CP 55,940 (0.25 mg/kg), an exogenous agonist of CB1 receptors.

Material and methods: The plasma calcitonin concentration was detected by RIA. The immunohistochemical and ultrastructural study were performed, using typical procedure.

Results: Four hours after a single injection of both cannabinoids significant decrease of CT, accompanied by an enhancement of CT-immunoreactivity of parafollicular cells was observed. In histological image the majority of follicles had large size and a low epithelium, with less numerous and hypotrophic microvilli seen in micrographs. The pattern of endoplasmic reticulum, mitochondria, nuclei and the presence of numerous dark secretory granules in C cells, but less number of reabsorbing vacuoles in follicular cell indicate that cannabinoids attenuated both follicular cell and C cells activity.

Conclusion: These observations may point, that cannabinoids play a role in regulation of thyroid endocrine cells activity probably via CB1 receptor.

w regulacji bilansu energetycznego i masy ciała zarówno w stanach fizjologicznych, jak i patologicznych. Badania immunohistochemiczne oraz hybrydyzacja in situ wykazały, iż komórki zawierające grelinę są komórkami X/A podobnymi, należącymi do komórek neuroendokrynnych błony śluzowej żołądka. Regulacja wydzielania greliny nie została dotąd wyjaśniona.

Cel: Ocena stężenia greliny w osoczu oraz jej immunoreaktywności w błonie śluzowej żołądka u szczurów z nadczynnością tarczycy.

Materiał i metody: Model doświadczalnej nadczynności tarczycy wywołano przez codzienne dootrzewnowe podawanie L-tyroksyny w dawce 80 µg/kg przez 21 dni.

Wyniki: W badanej grupie zwierząt, wykorzystując metodę ABC oraz przeciwciała przeciwko grelinie, stwierdzono wzrost immunoreaktywności komórek błony śluzowej dystalnej części żołądka, któremu towarzyszyło istotne statystycznie obniżenie stężenia greliny w osoczu ocenione metodą RIA.

Wniosek: Powyższe obserwacje wskazują, iż hiperfagia związana z doświadczalną nadczynnością tarczycy jest niezależna od greliny.

Praca została wykonana w ramach projektu KBN nr 1-40065.

REGULATION OF GHRELIN LEVEL BY L-THYROXINE

Robert Ł. Zbucki^{1,3}, Bogusław Sawicki², Jacek Dadan³, Maria M. Winnicka¹, Zbigniew Puchalski³

¹ Department of General and Experimental Pathology, Medical University of Białystok, Poland

² Department of Histology and Embryology, Medical University of Białystok, Poland

³ 1st Department of General and Endocrinological Surgery, Medical University of Białystok, Poland

Introduction: Ghrelin is a novel 28 amino acids peptide that transmits appetite related signals from peripheral organs to the brain. Ghrelin was recognised as endogenous ligand of growth hormone secretagogue receptor. The finding that food intake increases secretion of ghrelin, suggests that this hormone may be a bridge connecting somatic growth with energy metabolism and appears to play a role in the alteration of energy homeostasis and body weight in physiological and pathological conditions. Immunohistochemical analysis and in situ hybridisation indicated that ghrelin-containing cells belong to neuroendocrine cells found in mucosa of stomach, known as X/A like cells. However, a little is known about regulation of ghrelin secretion.

The aim of this study was the evaluation of ghrelin plasma concentration and estimation of ghrelin-immunoreactivity in stomach mucosa in hyperthyroid rats.

Material and methods: Experimental model of hyperthyroidism was produced in male Wistar rats by ip. injection of L-thyroxine at the dose of 80 µg/kg daily given over 21 days.

Results: In distal part of stomach of experimental animals, an increase of ghrelin-immunoreactivity in gastric mucosa, shown by ABC technique with monoclonal specific antibodies against ghrelin, was observed. It was accompanied by the significant decrease of plasma ghrelin concentration evaluated by RIA method.

18 REGULACJA STĘŻENIA GRELINY PRZEZ L-TYROKSYNĘ

Robert Ł. Zbucki^{1,3}, Bogusław Sawicki², Jacek Dadan³, Maria M. Winnicka¹, Zbigniew Puchalski³

¹ Zakład Patologii Ogólnej i Doświadczalnej,

² Zakład Histologii i Embriologii,

³ I Klinika Chirurgii Ogólnej i Endokrynologicznej, Akademia Medyczna w Białymstoku.

Wstęp: Grelina jest ostatnio odkrytym, 28-aminokwasowym peptydem pobudzającym apetyt poprzez przekazywanie sygnału z tkanek obwodowych do mózgu. Grelina pełni rolę endogennego liganda receptora odpowiedzialnego za uwalnianie hormonu wzrostu. Odkrycie wpływu przyjmowania pokarmu na pobudzanie sekrecji greliny wskazuje na jej pomostową rolę pomiędzy procesem wzrostu, a procesami metabolicznymi oraz na jej udział

Conclusions: These observations indicate, that hyperfagia associated with experimental hyperthyroidism is not mediated by ghrelin.

This study was supported by KBN grant No: 1-40065.

19

PROFIL EKSPRESJI GENÓW W RAKU RDZENIASTYM TARCZYCY: PORÓWNANIE POSTACI DZIEDZICZNEJ I SPORADYCZNEJ

Małgorzata Oczko-Wojciechowska¹, Jan Włoch², Małgorzata Wiench¹, Krzysztof Fajarewicz³, Krzysztof Simek³, Elżbieta Gubała¹, Sylwia Szpak-Ulczoł¹

¹ Zakład Medycyny Nuklearnej i Endokrynologii Onkologicznej,

² Zakład Biologii Nowotworów,

³ Klinika Chirurgii Onkologicznej, Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach

Wstęp: Rak rdzeniasty tarczycy (medullary thyroid carcinoma, MTC) jest nowotworem wywodzącym się z okołopęcherzykowych komórek C tarczycy. W około 30% przypadków rak ma charakter dziedziczny i związany jest z obecnością mutacji germinalnej w genie RET.

Cel: Celem pracy była analiza profilu ekspresji genów charakterystycznych dla raka rdzeniastego tarczycy przy zastosowaniu mikromacierzy oligonukleotydowych wysokiej gęstości (HG U133A, Affymetrix) oraz porównanie profilu ekspresji pomiędzy postacią dziedziczną i sporadyczną tego nowotworu.

Materiał i metody: Analizie poddano 24 próbki tkankowe, w tym 12 tkanek MTC oraz 12 odpowiadających im tkanek zdrowych. Połowę grupy stanowiły przypadki dziedziczne (iMTC), w tym cztery mutacje w kodonie 634 i dwie w kodonie 620. We wszystkich tkankach raka sporadycznego potwierdzono obecność mutacji somatycznej w kodonie 918. Do analizy bioinformatycznej wykorzystano metodę SVD (analiza wartości singularnych, Singular Value Decomposition) oraz metodę opartą o maszyny wektorów wspierających – Recurrent Feature Replacement (RFR).

Wyniki: W analizie SVD dwie pierwsze tryby obrazowały różnicę guz/tkanka zdrowa, trzecia tryba SVD była związana przynajmniej częściowo z odpowiedzią immunologiczną. Wzór ekspresji charakterystyczny dla raka rdzeniastego obejmował zatem nie tylko zmiany w obrębie genów związanych z samym procesem nowotworowym lecz również podwyższoną ekspresję genów w komórkach C (RET, CALCA, GFRA2 i 4). Dalsza analiza drugiej tryby przy pomocy analizy wariancji pozwoliła wyodrębnić dwie podgrupy w obrębie tkanek nowotworowych, podział ten nie był jednak związany z różnicą iMTC/sMTC. Zastosowanie RFR także nie pozwoliło na znalezienia wyraźnej różnicy w profilu ekspresji pomiędzy tymi dwoma grupami raków.

Wnioski: Uzyskane dane nie pozwalają na wyodrębnienie istotnych różnic w profilu ekspresji genów pomiędzy sporadycznym i dziedzicznym rakiem rdzeniastym tarczycy, co przemawia za wspólnym torem transformacji nowotworowej w obydwu postaciach choroby.

Projekt finansowany przez Ministerstwo Nauki i Informatyzacji.

GENE EXPRESSION PROFILE OF MEDULLARY THYROID CARCINOMA: COMPARISON OF SPORADIC AND INHERITED CANCER

Małgorzata Oczko-Wojciechowska¹, Włoch Jan², Wiench Małgorzata¹, Fajarewicz Krzysztof³, Simek Krzysztof³, Gubała Elżbieta¹, Szpak-Ulczoł Sylwia¹

¹ Department of Nuclear Medicine and Endocrine Oncology

² Department of Tumor Biology,

³ Department of Oncology Surgery -MSC Memorial Institute-Center of Oncology, Gliwice

Introduction: Medullary thyroid carcinoma (MTC) occurs both a sporadic and a familial disease. Inherited MTC accounts for about 30% of all MTC cases.

Aim: The aim of the study was to define gene expression profile of medullary thyroid carcinoma (MTC) and to characterize molecular profiles of sporadic and inherited MTC by high density oligonucleotide microarray.

Material i methods: 12 MTC samples and corresponding normal tissues taken intraoperatively were investigated by HG-U133A microarray. Among six inherited MTC (iMTC) patients there were four with germline mutation at codon 634 and two at codon 620 of RET proto-oncogene. All sporadic cases exhibited somatic mutation at codon 918.

Results: First, the differences between MTC and normal tissue were analyzed by means of Singular Value Decomposition (SVD). The characteristic expression pattern, besides of very numerous changes of cancer-related genes, included an up-regulation of genes specific for thyroid C cells (e.i. RET, CALCA, GFRA 2 and 4) while follicular thyroid cell genes, as expected, were found to be down-regulated. No differences between sporadic and inherited MTC were detected by SVD and ANOVA which confirmed the very similar expression profile in both forms of MTC. However, when a supervised method (Recurrent Feature Replacement, RFR) was applied, some minor differences in gene activation was obtained.

Conclusions: The obtained results indicate a very similar gene expression pattern in inherited and sporadic MTC, due to the common mechanism of neoplastic transformation.

This project was supported by Polish Ministry of Scientific Research

20

EKSPRESJA GENU DPP4 W RAKU BRODAWKOWATYM TARCZYCY

Joanna Ożóg¹, Michał Jarząb², Agnieszka Pawlaczek¹, Małgorzata Oczko-Wojciechowska¹, Jan Włoch³, Józef Roskosz¹, Elżbieta Gubała¹, Barbara Jarząb¹

¹ Zakład Medycyny Nuklearnej i Endokrynologii Onkologicznej,

² Zakład Biologii Nowotworów,

³ Klinika Chirurgii Onkologicznej, Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach

Wstęp: We wstępnej analizie profilu ekspresji genów w raku brodawkowatym tarczycy (PTC) wytypowano przy użyciu mikromacierzy oligonukleotydowych (Jarząb i wsp., Cancer Res. 2005) gen dipeptydylopeptydazy IV (DPP IV) jako potencjalny marker molekularny

w PTC. Ekspresja DPP IV obserwowana jest w komórkach nabłonkowych wielu narządów, komórkach układu odpornościowego a także w takich nowotworach jak czerniak, rak prostaty, jelita grubego i tarczycy. Badania kliniczne nad inhibitorami tego białka wzmacniają zainteresowanie genem DPP IV jako możliwym molekularnym punktem uchwytu dla nowych form terapii.

Cel: Celem pracy jest zbadanie ekspresji genu DPP IV w raku brodawkowatym tarczycy oraz w tkance prawidłowej za pomocą mikromacierzy oligonukleotydowych i ilościowej reakcji RT-PCR w czasie rzeczywistym (Q RT-PCR).

Materiał i metody: Materiał uzyskano z tkanek pobranych śródoperacyjnie, całkowity RNA wyizolowano przy użyciu zestawu RNeasy Midi i Mini (Qiagen). Przy pomocy mikromacierzy oligonukleotydowych HG-U133A analizie poddano 97 tkanek (47 PTC i 44 tkanki nienowotworowe). W 102 tkankach (62 PTC oraz 40 tkanek nienowotworowych) do oceny ekspresji genu DPP IV zastosowano również reakcję Q RT-PCR, równocześnie z pomiarem beta-glukuronidazy jako genu odniesienia.

Wyniki: Ekspresję genu DPP IV mierzono na macierzach trzema zestawami sond. Wszystkie trzy sondy wykazywały silnie znamienne statystycznie różnicę pomiędzy ekspresją w PTC a tkankami nienowotworowymi (207,3 jedn. w porównaniu do 7,7 jedn.). Dla najlepiej różniącego zestawu sond, tylko 2,3% tkanek zdrowych oraz 83% raków brodawkowatych wykazywało ekspresję powyżej 100 jedn. Także w reakcji Q RT-PCR stwierdzono znamienne różnicę między PTC a tkankami nienowotworowymi, jednak była ona mniej wyraźna, co mogło wynikać z gorszej jakości użytego RNA.

Wnioski: Uzyskane wyniki wskazują na użyteczność genu DPP IV jako markera w raku brodawkowatym tarczycy. Analiza za pomocą ilościowej Q-RT-PCR wymaga jednak dalszej optymalizacji reakcji oraz zastosowania innych metod normalizacji.

EXPRESSION OF DPP IV IN PAPILLARY THYROID CARCINOMA

Joanna Ożóg¹, Michał Jarzab², Agnieszka Pawlaczek¹, Małgorzata Oczko-Wojciechowska¹, Jan Włoch³, Józef Roskosz¹, Elżbieta Gubała¹, Barbara Jarzab¹

¹ Department of Nuclear Medicine and Endocrine Oncology

² Department of Tumor Biology,

³ Department of Oncology Surgery -MSC Memorial Institute-Center of Oncology, Gliwice

Introduction: Analysis of gene expression profile of papillary thyroid cancer (PTC) by oligonucleotide microarray (Jarzab et al., Cancer Res. 2005) indicates that dipeptidyl peptidase IV (DPP IV) could be strong molecular marker. DPP IV is widely expressed in epithelial cells of many organs, immune cells and also has been found in different malignancies: melanoma, prostate, colon and thyroid carcinoma. At the moment, specific inhibitors of this protein are in early stage of clinical trials, which may also make it an interesting molecular target in PTC.

Aim: To study of DPP IV expression in papillary and normal thyroid tissues by oligonucleotide microarrays and real-time RT-PCR (Q RT-PCR).

Material and methods: Thyroid tissues were taken intraoperatively and snap-frozen, total RNA was extracted by RNeasy Midi and Mini Kit (Qiagen). 97 tissues (47 PTC and 44 normal tissues) were analyzed by GeneChip HG-U133A oligonucleotide microarray. 102 tissues were investigated (62 PTC and 40 normal tissues) by real-time quantitative PCR for DPP IV gene, in multiplex setting with beta-glucuronidase as a reference gene.

Results: DPP IV expression on U133 microarray was measured by three probesets. All were highly significantly different between PTC samples and benign/normal thyroid. Mean expression in benign thyroid samples was 7,7 units, comparing to 207,3 units in PTC. For the best differentiating probeset, only 2,3% of benign tissues exhibited value higher than 100 units, while this was the case in 83% of tumors. In the Q RT-PCR there were more outliers than in microarray samples, which we link to worse RNA quality of samples analyzed by Q-PCR.

Conclusion: The obtained results indicate the usefulness of DPP IV gene as a marker of papillary thyroid cancer. Its measurement by Q-RT-PCR demands adequate reaction design and needs further optimization.

21

EKSPRESJA MRNA PODJEDNOSTEK TELOMERAZY (TERT, TR, TP1) W TKANKACH TARCZYCY Z UŻYCIEM TECHNIKI QRT-PCR

Dariusz Kajdaniuk¹, Bogdan Marek¹, Urszula Mazurek², Anna Fila², Barbara Strzałka², Beata Kos-Kudła³, Zofia Ostrowska⁴, Joanna Kajdaniuk¹, Lucyna Siemińska¹, Halina Borgiel-Marek⁵, Joanna Głogowska-Szeląg¹, Mariusz Nowak¹, Wanda Foltyn³, Tadeusz Wilczok²

¹ Zakład Patofizjologii i ² Klinika Endokrynologii Katedry Patofizjologii i Endokrynologii, Śląska Akademia Medyczna, Zabrze

² Zakład Biologii Molekularnej, Śląska Akademia Medyczna, Sosnowiec

⁴ Zakład Biochemii Klinicznej, Śląska Akademia Medyczna, Zabrze

⁵ Klinika Chirurgii Szczękowo-Twarzowej, Śląska Akademia Medyczna, Katowice

Telomeraza składa się z trzech podstawowych podjednostek: odwrotnej transkryptazy (TERT), telomerowego RNA (TR), telomerowego białka (TP1).

Celem badań była ocena ekspresji mRNA podjednostek telomerazy w tkankach tarczycy pobranych od chorych z wolem guzkowym obojętnym (NTG) i nadczynnym (TG), chorobą Gravesa (GD), rakiem brodawkowatym tarczycy (PC). Badania przeprowadzono u 63 chorych poddanych tyreoidektomii. Grupa PC liczyła 6, NTG - 27, TG - 22, GD - 8 chorych. Ekspresję mRNA w tkankach tarczycy oceniono z użyciem ilościowej reakcji odwrotnej transkrypcji i polimeryzacji (QRT-PCR). Tkanek kontrolną (C) stanowiły fragmenty zdrowej tkanki pochodzące z obwodowych części usuniętego płata tarczycy chorych operowanych z powodu pojedynczego łagodnego guza tarczycy.

Wyniki: Stwierdzono: brak różnicy w ekspresji mRNA TP1 pomiędzy tkanką patologiczną i C we wszystkich badanych grupach; brak różnicy w ekspresji mRNA TP1 pomiędzy tkankami patologicznymi w badanych grupach chorych; brak różnicy w ekspresji mRNA TERT i TR pomiędzy tkanką C i patologiczną (NTG, TG, GD); istotne zwiększenie ilości kopii mRNA TERT oraz TR w

tkance PC w porównaniu z C; brak różnic w ekspresji mRNA TERT i TR pomiędzy tkankami patologicznymi uzyskanymi od chorych (NTG, TG, GD); istotnie większą ekspresję mRNA TERT i TR w tkance PC w porównaniu do tkanki guza łagodnego (NTG).

Wniosek: Wysoka ekspresja podjednostek TERT i TR telomerazy w guzie nowotworowym w porównaniu do innych tkanek, zarówno kontrolnych jak i tkanki guza łagodnego dowodzi dużego znaczenia tych parametrów w diagnostyce raka brodawkowego tarczycy.

Praca zrealizowana w ramach grantu KBN - 3P05B03123.

QRT-PCR ANALYSIS OF TELOMERASE SUBUNITS (TERT, TR, TP1) mRNA EXPRESSION IN THYROID TISSUE

Dariusz Kajdaniuk¹, Bogdan Marek¹, Urszula Mazurek², Anna Fila², Barbara Strzalka², Beata Kos-Kudła³, Zofia Ostrowska⁴, Joanna Kajdaniuk¹, Lucyna Sieminska¹, Halina Borgiel-Marek⁵, Joanna Glogowska-Szeląg¹, Mariusz Nowak¹, Wanda Foltyn³, Tadeusz Wilczok²

¹ Division of Pathophysiology and ³ Clinic of Endocrinology, Department of Pathophysiology and Endocrinology, Medical University of Silesia, Zabrze

² Department of Molecular Biology, Medical University of Silesia, Sosnowiec

⁴ Department of Clinical Biochemistry, Medical University of Silesia, Zabrze

⁵ Department of Maxillofacial Surgery, Medical University of Silesia, Katowice

Human telomerase is a complex consists of three major subunits: telomerase reverse transcriptase (TERT), telomerase RNA (TR), telomerase-associated protein (TP1).

The aim of the study was to investigate the expression of telomerase subunits mRNA in thyroid tissue of patients with non-toxic (NTG) and toxic multinodular goiter (TG), Graves' disease (GD), papillary cancer (PC). Studies were performed in 63 patients undergoing thyroidectomy. PC group consisted of 6, NTG - 27, TG - 22, GD - 8 patients. The levels of the mRNAs in thyroid specimens were evaluated by quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (QRT-PCR). Part of normal thyroid tissue from the peripheral parts of removed lobe of thyroid gland of patients operated due to single benign tumor of thyroid gland was a control tissue (C).

Results: It was shown: no difference in expression of mRNA TP1 between diseased and C tissues in all groups; no difference in expression of mRNA TP1 between diseased tissues; no difference in expression of mRNA TERT and TR between diseased (NTG, TG, GD) and C tissues; significant increase in the number of copies of mRNA TERT and TR in PC in comparison with C; no differences in expression of mRNA TERT and TR between diseased (NTG, TG, GD) tissues; significantly higher expression of mRNA TERT and TR in PC in comparison with tissue of benign tumor (NTG).

Conclusion: High expression of mRNA TERT and TR in neoplastic tumor in comparison with other tissues - control tissues as well as tissue of benign tumor - proves big importance of these parameters in diagnostics of papillary cancer of thyroid gland.

This work was supported by a grant 3P05B03123 (KBN).

22

KURKUMINA MODYFIKUJE FUNKCJĘ TARCZYCY SZCZURÓW Z INDUKOWANĄ HIPOTYREOZĄ

Monika Papież, Marcin Kaja, Barbara Nowak

Zakład Cyto biologii i Histochemii, Wydział Farmaceutyczny, Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

Wstęp: Kurkumina (dwuferuilo metan) jest roślinnym polifenolem wywołującym hiperplazję nabłonka pęcherzyków tarczycy u myszy po długotrwałym (2 lata) podawaniu.

Cel pracy: Badanie wpływu kurkuminy na stan czynnościowy prawidłowej lub niedoczynnej tarczycy szczura.

Materiał i metody: Badania przeprowadzono na 3-miesięcznych samcach szczurów rasy Wistar. Szczury podzielono na 4 grupy, 1 kontrolną K i 3 doświadczalne (D1-D3). Szczurom podawano doustnie, codziennie przez 30 dni: grupa K - 1 ml oleju kukurydzianego (5 osobników), grupa D1 - kurkuminę w dawce 100 mg/kg m.c. (5 osobników), grupa D2 - propylotiouracyl (PTU) w dawce 1 mg/kg m.c. (6 osobników), grupa D3 - jednocześnie kurkuminę (100 mg/kg m.c.) i PTU (1 mg/kg m.c.) - 6 osobników. Kurkuminę i PTU podawano w 1 ml oleju kukurydzianego. Od szczurów pobrano tarczycę oraz krew z żyły ogonowej. W surowicy krwi oznaczono poziom FT4 i FT3 metodą radioimmunologiczną. Tarczycę poddano analizie morfologicznej i wykonano histomorfometryczne pomiary wysokości nabłonka pęcherzyków oraz frakcji objętościowej koloidu. Do pomiarów morfometrycznych użyto komputerowego systemu analizy obrazów mikroskopowych z programem MultiScan v 6.08. Analizę statystyczną wyników przeprowadzono za pomocą testu ANOVA.

Wyniki: W tarczycach szczurów grupy D1 nie obserwowano różnic morfologicznych w stosunku do kontrolnych K. W grupie D1 wykazano znamienne wzrost stężenia FT4 i brak różnic w FT3 w surowicy krwi w stosunku do grupy K. U szczurów grupy D2 występowały symptomy hipotyreozy: hiperplazja nabłonka pęcherzyków, spadek poziomu FT4. W grupie D3 obserwowano zwiększenie hiperplazji nabłonka pęcherzyków i zmniejszenie objętości koloidu w stosunku do grupy D2. Nie wykazano znamienych różnic w poziomie FT4 i FT3 między grupą D2 i D3.

Wnioski i podsumowanie: Na podstawie przedstawionych wyników badań można przypuszczać, że kurkumina działa synergistycznie z PTU, nasilając objawy indukowanej hipotyreozy u szczurów.

CURCUMIN MODIFIES THYROID FUNCTION IN RATS WITH INDUCED HYPOTHYROIDISM

Monika Papież, Marcin Kaja, Barbara Nowak

Department of Cytobiology and Histochemistry, Pharmaceutical Faculty, Collegium Medicum, Jagiellonian University, Kraków

Introduction: Curcumin (diferuloylmethane) is a plant polyphenol which evokes hyperplasia of the follicular epithelium in the thyroid of mice after prolonged (2-year) treatment.

Aim of the study: Investigation into the influence of curcumin on normal thyroid or hypothyroidism in rats.

Materials and methods: The study was conducted on 3-month-old male Wistar rats. The animals were divided into four groups: 1 control (K) and 3 experimental (D1-D3) ones. They were treated daily for 30 days by gavage: group K – with 1 ml of corn oil (5 rats); group D1 – with curcumin, 100 mg/kg b.w. (5 rats); group D2 – with propylthiouracil (PTU), 1 mg/kg b.w. (6 rats); group D3 – with simultaneous curcumin, 100 mg/kg b.w., and PTU, 1 mg/kg b.w. (6 rats). Curcumin and PTU were administered in 1 ml of corn oil. Thyroid glands were excised and venous blood was collected. The blood plasma FT4 and FT3 were radioimmunologically measured. The thyroid glands were morphologically analyzed, and histomorphometric measurement of follicular epithelium height and of the volume density of the colloid was carried out. A morphometric assay was performed using a computer-assisted image analyzer with the MultiScan v 6.08 programme. The results were statistically analyzed by the ANOVA test.

Results: There were no morphological differences in the thyroid glands between the D1 and the K groups of rats. In group D1, a significant increase in FT4 concentration and no significant differences in that of FT3 were observed compared to group K. Hypothyroidism symptoms, such as hyperplasia of the follicular epithelium and a decrease in plasma FT4 content, occurred in group D2 rats. In group D3, an increased hyperplasia of the follicular epithelium and a reduced colloid D3 volume were found compared to group D2. There were no proven significant differences in FT4 and FT3 concentrations between groups D2 and D3.

Conclusions: It is assumed that curcumin synergistically interacts with PTU by enhancing induced hypothyroidism symptoms in rats.

cją ZRT. Wykonano u nich doszczętne wycięcie tarczycy, uzupełnione o limfadenektomię środkową oraz zmodyfikowane, jedno- lub wielopolowe wycięcie układu chłonnego szyi z przedziałów bocznych szyi i śródpierśia górnego. Każdy uzyskany WCH podzielono na dwie równoważne części. Jedną wykorzystano do przeprowadzenia RBH. Drugą do badania RT-PCR.

Wyniki: Obecność przerzutów ZRT oceniono w 238 WCH. W RBH znaleziono przerzuty w 33(36,26%) WCH u 11(35,48%) chorych. Obecność mRNA dla Tg za pomocą techniki RT-PCR stwierdzono w 41(42,27%) WCH u 12(38,71%) chorych. U jednej chorej w badaniu RT-PCR stwierdzono obecność przerzutów w 2 WCH, które w RBH były ujemne. U czterech pacjentów stwierdzono za pomocą badania RT-PCR więcej przerzutowych WCH niż w RBH. Trzech z nich miało po 2 WCH, z których uzyskano dodatni wynik RT-PCR przy ujemnym wyniku RBH. Inna chora miała jeden taki WCH. U innej pacjentki stwierdzono w RBH 3 przerzuty w WCH przedziału bocznego prawego. Dodatni wynik RT-PCR uzyskano jedynie z 2 WCH od tej chorej. Badanie molekularne zmieniło ocenę zaawansowania u 5(16,13%) z 31 chorych, z czego w klasyfikacji TNM cecha N uległa zmianie z N0 na N1 u 1 chorej, u pozostałych zmianie uległa tylko liczba zajętych WCH.

Wnioski:

1. Metoda RT-PCR dla Tg mRNA może wspomóc RBH w wykrywaniu komórek ZRT w WCH.
2. Wyniki BM nie wpływają w sposób istotny na zmianę zaawansowania w klasyfikacji TNM.

METASTASES OF THE DIFFERENTIATED THYROID CANCER (DTC) TO LYMPH NODES (LNS) IN THE ROUTINE HISTOPATHOLOGICAL EXAMINATION (RHE) AND MOLECULAR EXAMINATION (ME)

Kaczka Krzysztof, Jakubiak-Wielganowicz Magdalena, Wójcik Izabela, Niedźwiecki Sebastian, Kuzdak Krzysztof, Pomorski Lech

Clinic of Endocrine and General Surgery of Medical University in Łódź

Introduction: The removed LNs, during the operation of DTC, are evaluated only by the RHE. In case of other cancers also ME, especially RT-PCR, are used to find the metastases in the LNs.

Aim: The investigation of DTC metastases in the LNs by the RHE and Tg mRNA RT-PCR evaluation of the impact of ME results from the LNs on the TNM staging.

Material and methods: The LNs from 31 patients (26 women, 5 men) were analyzed. They were from 19 to 68 years old and were suspected or recognized of DTC before the operation. During the operation total thyroidectomy with central lymphadenectomy were performed. Also modified, radical lymphadenectomy in the lateral neck compartments and the upper mediastinum were made. Each obtained lymph node was cut into two equal parts. One of them was used for the RHE, the other one for RT-PCR.

Results: The presence of DTC metastases was evaluated in 238 LNs. In RHE 33(36,26%) metastases in 11(35,48%)

23

PRZERZUTY ZRÓŻNICOWANEGO RAKA TARCZYCY (ZRT) DO WĘZŁÓW CHŁONNYCH (WCH) W RUTYNOWYM BADANIU HISTOPATOLOGICZNYM (RBH) I BADANIU MOLEKULARNYM (BM)

Kaczka Krzysztof, Jakubiak-Wielganowicz Magdalena, Wójcik Izabela, Niedźwiecki Sebastian, Kuzdak Krzysztof, Pomorski Lech

Klinika Chirurgii Endokrynologicznej i Ogólnej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Wstęp: Usunięte w trakcie operacji ZRT WCH są oceniane jedynie w RBH. W innych nowotworach złośliwych do oceny obecności przerzutów w WCH używano BM, szczególnie z wykorzystaniem RT-PCR.

Cele: 1.Ocena obecności przerzutów ZRT w WCH za pomocą: RBH i badania RT-PCR ukierunkowanego na wykrycie mRNA dla tyreoglobuliny. 2.Ocena wpływu wyników badania molekularnego z WCH w ZRT na ocenę zaawansowania guza w układzie TNM.

Materiał i metodyka: W badaniu analizowano WCH od 31 chorych (26 kobiet i 5 mężczyzn) w wieku od 19 do 68 lat, u których podejrzewano lub rozpoznano przed opera-

were found. Positive Tg mRNA signal was observed in 41(42,27%) LNs from 12(38,71%) patients. In one patient, two histopathologically negative LNs, were positive in the ME. In four other patients more lymph node metastases in the ME were found than in the RHE. Three of these patients had two more positive LNs in RT-PCR, the other patient had one more positive lymph node. In other woman, three positive LNs in histopathology were found. According to RT-PCR there were only two positive LNs. The ME has changed the evaluation of the tumor's stage in 5(16,13%) patients but only in one woman TNM staging was increased from N0 to N1. In the rest of the patients only the number of the involved LNs was changed.

Conclussions:

1. Tg mRNA RT-PCR might help in the detection of the lymph node metastases of DTC.
2. The results of the ME don't change significantly TNM staging.

24

CHARAKTERYSTYCZNY WZORZEC IMMUNOEKSPRESJI BIAŁEK CYKLU KOMÓRKOWEGO: CYKLINA E, pRb, p21^{Cip1/WAF1} W RAKU BRODAWKOWATYM TARCZYCY

Brzeziński Jan¹, Migodziński Adam², Toczek Aleksandra³, Tazbir Józef², Dedecusz Marek¹

¹ Klinika Chirurgii Endokrynologicznej i Ogólnej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

² Samodzielny Oddział Medycyny Ratunkowej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

³ Pracownia Immunologii Kardiologicznej i Transplantacyjnej, W.S.S. im. M. Kopernika w Łodzi

Wstęp: niekontrolowany podział komórek, będący jedną z charakterystycznych cech nowotworu, może być zarówno skutkiem nadekspresji stymulatorów jak i supresji inhibitorów cyklu komórkowego.

Celem obecnej pracy była analiza immunosupresji panelu trzech białek regulatorowych cyklu komórkowego: jednego stymulatora – cyklina e, oraz dwóch inhibitorów – p21^{Cip1/WAF1} i pRb, w różnych stadiach zaawansowania raka brodawkowatego tarczycy.

Materiały i metody: Analizę immunoekspresji panelu analizowanych białek przeprowadzono na materiale 51 raków brodawkowatych tarczycy w stopniu zaawansowania od pT1a do pT4, uwzględniając dane kliniczne i histopatologiczne.

Wyniki: Wraz ze wzrostem zaawansowania nowotworu obserwowano utratę immunoekspresji p21^{Cip1/WAF1} przez jego komórki. Różnice ekspresji tego białka były istotne pomiędzy rakami pT1a i pT4 oraz między mikrorakami a rakami pT4. Podobnie zachowywała się immunoekspresja pRb, a różnice ekspresji tego białka osiągnęły poziom istotności statystycznej pomiędzy rakami pT1a i pT4 oraz między mikrorakami a rakami pT4. Ekspresja cykliny e była stwierdzona w 90,4% raków brodawkowatych tarczycy o stopniu zaawansowania większym od pT1a. Ponadto różnica średniej wartości immunoekspresji tego białka była istotna pomiędzy mikrorakami a pozostającymi nowotworami. Obserwowano dodatnią korelację pomiędzy indeksem immunohistochemicznym a stopniem zaawansowania nowotworu wyrażonym w skali

TNM. Wszystkim przypadkom, w których wystąpiły przerzuty do węzłów chłonnych towarzyszyła ekspresja, a w większości nadekspresja cykliny E. Co więcej, zaobserwowano ujemną korelację pomiędzy immunoekspresją cykliny E i pRb.

Wnioski: Wyniki obecnej pracy sugerują, że ekspresja (lub nad ekspresja) cykliny E wraz z supresją pRb i p21^{Cip1/WAF1} mogą stanowić charakterystyczny wzorzec dla raków brodawkowatych tarczycy wcześniej dających przerzuty do węzłów chłonnych. Jeśli obecne wyniki potwierdziłyby się na większej grupie pacjentów to przeciwciała przeciwko badanym białkom mogłyby stanowić panel diagnostyczny umożliwiając przewidywanie przerzutowego potencjału raków brodawkowatych tarczycy.

24-1

DEJODYNAZA TYPU PIERWSZEGO (D1) JEST OBECNA W TKANCE RAKÓW PIERSI

Marcin Dębski¹, Janusz Pachucki¹, Michał Ambroziak², Janusz Nauman¹, Alicja Nauman², Edward Towpik³, Włodzimierz Olszewski⁴, Ewa Bar-Andziak¹

¹ Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych i Endokrynologii, Akademia Medyczna w Warszawie

² Zakład Biochemii, Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego, Warszawa

³ Klinika Nowotworów Piersi i Chirurgii Rekonstrukcyjnej, Instytut Onkologii, Warszawa

⁴ Zakład Patologii, Instytut Onkologii, Warszawa

Wstęp: Hormony tarczycy wpływają na procesy wzrostu, podziału, różnicowania oraz apoptozy komórek. Procesy te są zaburzone w chorobach nowotworowych. Aktywną postacią hormonów tarczycy jest trójiodotyronina, która powstaje głównie w narządach obwodowych w reakcji katalizowanej przez dejodynazę typu pierwszego. Zaburzoną jej funkcję obserwowano w różnych nowotworach przykładowo w raku jasnokomórkowym nerki i raku tarczycy.

Cel: Zbadanie obecności D1 na poziomie mRNA oraz aktywności enzymatycznej w tkankach pochodzących z raka sutka i w kontrolnych tkankach niezmiennych nowotworowo.

Materiał: Zebrano 36 tkanek pochodzących z raków sutka i 36 tkanek kontrolnych sutka niezmiennych nowotworowo. Tkanki podzielono według stopnia złośliwości histopatologicznej oraz zaawansowania klinicznego choroby.

Metody: Aktywność enzymatyczna była mierzona za pomocą pomiaru jodu radioaktywnego uwolnionego z substratu. Swoiste mRNA dla dejodynazę typu pierwszego oceniano metodą Northern blot z użyciem specyficznej sondy radioaktywnej.

Wyniki: W tkankach kontrolnych stwierdzono bardzo niską lub niewykrywalną aktywność enzymatyczną D1. Swoiste mRNA było obecne tylko w 2 przypadkach. W tkankach raków sutka w 29 tkankach obserwowano podwyższoną aktywność D1, a mRNA było obecne w 13 przypadkach guzów. Aktywność enzymatyczna pozytywnie korelowała z ekspresją mRNA. Wyższe aktywności obserwowano w guzach mniejszych i o niższym stopniu złośliwości.

Wnioski: Dejodynaza typu pierwszego jest wykrywalna w rakach sutka zarówno na poziomie aktywności enzymatycznej, jak i ekspresji mRNA. Regulacja jej aktywności wydaje się zachodzić na poziomie przed- i potranslacyjnym oraz w sposób odmienny w zależności od stopnia złośliwości i zaawansowania. D1 jest obecna w tkance niezmięnionej nowotworowo w stopniu znikomym lub niewykrywalnym przy zastosowanej metodycie.

DEIODINASE TYPE ONE (D1) IS PRESENT IN BREAST CANCER TISSUE

Marcin Dębski¹, Janusz Pachucki¹, Michał Ambroziak², Janusz Nauman¹, Alicja Nauman², Edward Towpik³, Włodzimierz Olszewski⁴, Ewa Bar-Andziak¹

¹ Department of Internal Medicine and Endocrinology, Medical University of Warsaw

² Department of Biochemistry, Medical Centre of Postgraduate Education, Warsaw

³ Department of Breast Cancer and Reconstructive Surgery, Warsaw Cancer Institute

⁴ Department of Pathology, Warsaw Cancer Institute

Introduction: Thyroid hormones influence processes of cell growth, division, differentiation and apoptosis. All these processes are disturbed in neoplastic diseases. The active form of thyroid hormones is triiodothyronine, which is produced mainly in peripheral organs in reaction catalyzed by deiodinase type one. Its impaired function was observed in different neoplasms for example in renal clear cell carcinoma and in thyroid cancer.

Aim: The aim of the study was to investigate the presence of D1 on 2 levels: on the mRNA expression and on the enzymatic activity in breast cancer tissues and in non-neoplastic control breast tissues.

Material: 36 breast cancer tissues and 36 control tissues were obtained. The tissues were divided according to histopathological grading and clinical staging.

Method: The enzymatic activity was measured by the assay of radioactive iodide released from substrate. mRNA for deiodinase type one was assessed in Northern blot with the use of radio-labelled specific probe.

Results: In control tissues enzymatic activity of deiodinase type was very low or undetectable. Specific mRNA was present only in 2 cases. On the contrary, in breast cancer tissues increased enzymatic activity of deiodinase type one was observed in 29 cases and mRNA was present in 13 cases. Enzymatic activity positively correlated with mRNA level. Higher activities were found in smaller tumors and in tumors of lower grade.

Conclusions: Deiodinase type one is present in breast cancer tissues both on the level of enzymatic activity and on mRNA level. The regulation of its activity seems to take place on pre- and posttranslational stage and acts in different manner depending on histopathological grade and clinical stage. Deiodinase type one is present in non-neoplastic breast tissue in very small amount or is undetectable for methods that were applied.

24-2 STĘŻENIA sFasL ORAZ sBcl-2 U PACJENTÓW Z OFTALMOPATIĄ TARCZYCOWĄ W TRAKCIE DOŻYŁNEJ GLIKOKORTYKOSTERODOTERAPII

G. Kulig, K. Pilarska, B. Krzyżanowska-Świniarska, S. Pynka

Klinika Endokrynologii, Nadciśnienia Tętniczego i Chorób Przemiany Materii PAM w Szczecinie

Celem pracy jest analiza dynamiki rozpuszczalnych form potencjalnych inhibitorów procesu apoptozy: Bcl-2, sFasL i u pacjentów z naciekową postacią oftalmopatii tarczycowej (OT) w trakcie pulsacyjnego leczenia metyldprednizolonem.

Materiał i metody: Do grupy I należało 28 pacjentów w wieku 26-59 chorobą Gravesa-Basedowa stadium eutyreozy oraz postępującą oftalmopatią tarczycową. Stopień zaawansowania zmian ocznych oceniano według skali NOSPECT. Aktywność zmian ocznych w oparciu o CAS. Grupę II tworzyło 28 zdrowych osób w przedziale wiekowym od 28-58 lat. U pacjentów w grupie I przed rozpoczęciem terapii, a następnie po 1, 3 i 6 cyklu Solu-Medrolu stężenia sBcl-2 i sFasL oznaczano metodą ELISA. W grupie II badania sFasL i sBcl-2 wykonywano jednorazowo.

Wyniki: W grupie I początkowe stężenia zarówno sFasL jak i sBcl-2 były istotnie wyższe w porównaniu do grupy kontrolnej (sFasL 6,16 vs 4,58 µg/ml; p<0,05, sBcl-2 462,72 vs 200,70 U/ml; p<0,05). W grupie I nie znaleziono korelacji pomiędzy stężeniami sBcl-2 i sFasL a stopniem zaawansowania zmian ocznych i aktywnością choroby. W trakcie dożylnego leczenia metyldprednizolonem stwierdzono początkowo przejściowy wzrost średniego stężenia sBcl-2 po 1 cyklu do 513,2 U/ml, natomiast po kolejnych cyklach wartości sBcl-2 obniżyły się tylko nieznacznie. Końcowe stężenie sBcl-2 pozostawało nadal istotnie podwyższone w stosunku do wartości uzyskanej w grupie kontrolnej (do 403,22 vs 220,72 U/ml, p<0,05). W przeciwieństwie do sBcl-2, stężenia sFasL w trakcie stosowania metyldprednizolonu uległy istotnemu obniżeniu, a średnie stężenie sFasL po zakończeniu terapii było nieznacznie niższe niż w grupie II (4,25 vs 4,58 µg/ml, p>0,05).

Wnioski:

1. Naciekowej postaci oftalmopatii tarczycowej towarzyszą podwyższone stężenia inhibitorów procesu apoptozy.
2. Dożylna steroidoterapia poprzez obniżenie stężeń sFasL i Bcl-2 nasila proces apoptozy komórek.

Słowa kluczowe: choroba Gravesa-Basedowa, apoptoza, glikokortykosteroidy

24-3 EKSPRESJA GENÓW 5- α -REDUKTAZY TYPU 1 I TYPU 2 A CZYNNÓŚĆ HORMONALNA U KOBIET Z HIRSUTYZMEM

Skalba Piotr¹, Dąbkowska-Huć Anna¹, Wojciech Kaźmierczak¹, Arkadiusz Samojedny², Monika Paul-Samojedny², Zbigniew Chełmicki¹

¹ Katedra i Klinika Endokrynologii Ginekologicznej Śląskiej Akademii Medycznej w Katowicach

² Zakład Biologii Molekularnej Śląskiej Akademii Medycznej w Katowicach

Celem pracy była analiza ekspresji genów dla 5- α -reduktazy typu 1 i 2 w brodawkach włosowych skóry podbrzusza oraz wpływu endogennych androgenów na jej nasilenie, a także ocena przydatności glukuronianu 3- α -androstendiolu (3- α -diolu G) jako surowiczego markera aktywności 5- α -reduktaz.

Materiały i metody: Badaniem objęto 42 kobiety z hirsutyzmem, spośród których u 25 rozpoznano zespół policystycznych jajników (PCOS), a u 18 hirsutyzm idiopatyczny (IH). Następnie oznaczono stężenia w surowicy: FSH, LH, estradiolu, prolaktyny, TSH, fT_4 , wolnego testosteronu, androstendionu, DHEAS, 17-OH-progesteronu i 3- α -diolu-G.

Celem analizy ilościowej ekspresji genów dla 5- α -reduktazy typu 1 i 2 od pacjentek pobrano wycinki skóry podbrzusza, z których wyizolowano brodawki włosowe. Następnie przeprowadzano ekstrakcję RNA i ilościową reakcję QRT-PCR przy użyciu starterów zaprojektowanych do sekwencji cDNA, specyficznych dla 5- α -reduktazy typu 1 i 2.

Wyniki: Stwierdzono, że log liczby kopii mRNA/ μ g całkowitego RNA 5- α -reduktazy typu 1 jest istotnie wyższy niż typu 2 u wszystkich pacjentek. Wykazano dodatnią korelację pomiędzy log liczby kopii mRNA/ μ g całkowitego RNA 5- α -reduktazy typu 2 w brodawkach włosowych a stężeniem wolnego testosteronu w surowicy u wszystkich kobiet, a także dodatnią korelację pomiędzy log liczby kopii mRNA 5- α -reduktazy/ μ g całkowitego RNA typu 1 i 2 w brodawkach włosowych a stężeniem wolnego testosteronu w surowicy zarówno w grupie kobiet z PCOS i z IH. Stężenie 3- α -diolu G w surowicy krwi korelowało z nasileniem hirsutyzmu tylko u kobiet z PCOS.

Wnioski:

1. W brodawkach włosowych skóry podbrzusza u kobiet z hirsutyzmem dominuje 5- α -reduktaza typu 1.
2. Testosteron pobudza ekspresję genów kodujących 5- α -reduktazę typu 1 i 2 zarówno w przypadkach IH, jak i PCOS.
3. Nasilenie hirsutyzmu nie zależy od ekspresji genów kodujących 5- α -reduktazy typu 1 i 2.
4. Stężenie we krwi 3- α -diolu G nie może zostać uznane za dobry marker miejscowej aktywności 5- α -reduktaz.

THE EXPRESSION OF GENES FOR 5- α -REDUCTASE TYPE 1 AND TYPE 2 AND HORMONAL ACTIVITY IN HIRSUTE WOMEN

Skalba Piotr¹, Dąbkowska-Huć Anna¹, Wojciech Kaźmierczak¹, Arkadiusz Samojedny², Monika Paul-Samojedny², Zbigniew Chełmicki¹

¹ Department of Gynaecological Endocrinology, Medical University of Silesia, Katowice,

² Department of Molecular Biology; Medical University of Silesia, Katowice

Aim of the study was the analysis of gene expression for 5- α -reductase type 1 and 2 in hair papillae from lower abdominal skin region and the influence of endogenous androgens on their expression. Moreover, the usability of 3- α -diol-G as the serum marker of activity of 5- α -reductases was estimated.

Materials and methods: 42 hirsute patients were included into the study. Polycystic ovary syndrome (PCOS) was

diagnosed in 24 patients and idiopathic hirsutism (IH) in 18 patients. Then, serum levels of FSH, LH, estradiol, prolactin, TSH, fT_4 , free testosterone, androstenedione, DHEA-S, 17-OH-progesterone and 3- α -diol-G were assayed.

To analyze quantitatively the expression of genes for 5- α -reductase type 1 and 2, samples of lower abdominal skin were taken and the isolation of hair papillae was performed. Successively, RNA extraction and quantitative QRT-PCR reaction were conducted. The content of mRNA for 5- α -reductases was assessed with the use of starters designed for cDNAs, specific for 5- α -reductase type 1 and 2.

Results: Log of mRNA copy number/ μ g of total RNA for 5- α -reductase type 1 was significantly higher than that for type 2 in all women. Moreover, a positive correlation between log of mRNA copy number/ μ g of total RNA for 5- α -reductase type 2 and the free testosterone levels were found in all women. A positive correlation between log of mRNA copy number/ μ g of total RNA for 5- α -reductase type 1 and 2 and free serum testosterone levels was observed in PCOS and IH patients. There was a positive correlation between the serum levels of 3- α -diol-G and the intensity of hirsutism in the group with PCOS.

Conclusions:

1. The content of mRNA for gene of 5- α -reductase type 1 is significantly higher than for type 2 of the enzyme.
2. Testosterone increase the expression of genes coding 5- α -reductase type 1 and 2 in women with PCOS and IH.
3. The intensity of hirsutism does not depend on the expression of genes coding 5- α -reductase type 1 and 2 neither on the levels of androgens in the serum.
4. The levels of 3- α -diol G are not a good marker of the local activity of 5- α -reductases.

24-4

OCENA STĘŻEŃ CAŁKOWITEJ HOMOCYSTEINY W SUROWICY KRWI W FIZJOLOGICZNYM CYKLU MIESIĘCZNYM I W TRAKCIE STYMULACJI OWULACJI

Anna Lewczuk, Krzysztof Sworczak, Piotr Wiśniewski

Klinika Chorób Wewnętrznych, Endokrynologii i Zaburzeń Hemostazy Akademii Medycznej w Gdańsku

Wstęp: „Homocysteinowa teoria miażdżycy” zapoczątkowała badania nad rolą homocysteiny (tHcy). Udowodniono związek tHcy z wadami wrodzonymi, powikłaniami ciąży, zakrzepicą żylną, chorobą Alzheimerera, depresją i nowotworami. Najważniejsze czynniki wpływające na aktywności enzymów szlaku metionina-homocysteina-cysteina to: witaminy B₆, B₁₂, kwas foliowy (FA), używki, leki, niewydolność nerek, niedoczynność tarczycy oraz mutacje genów β -syntazy cystationiny i reduktazy metylenotetrahydrofolianowej (MTHFR). Stwierdzono zależne od płci i wieku różnice w stężeniach tHcy. U mężczyzn oraz u kobiet po menopauzie stężenia tHcy są wyższe niż u kobiet w okresie rozrodczym. Hormonalna terapia zastępcza obniża tHcy.

Cel pracy: Celem pracy była ocena zmienności stężenia tHcy w fizjologicznym cyklu miesięcznym oraz w czasie

przygotowania i stymulacji owulacji oraz określenie zależności stężenia tHcy od stężeń 17β -estradiolu (E_2), FA i witaminy B_{12} w surowicy oraz genotypu MTHFR.

Materiał i metody: Badaniem objęto łącznie 69 kobiet w wieku 21-44 lat, średni wiek wynosił $31,6 \pm 5,9$ lat. Grupę pierwszą stanowiły zdrowe kobiety z prawidłowym cyklem miesięcznym potwierdzonym badaniami stężeń hormonów oraz badaniem ultrasonograficznym. Oznaczenia wykonywano w fazie folikularnej, okołowulacyjnej i lutealnej. Grupa druga to kobiety leczone z powodu niepłodności. Oznaczenia wykonywano: w 16 dniu przyjmowania Marvelonu, ostatniego dnia stymulacji owulacji, 36 godzin po podaniu HCG. W obu grupach każdorazowo oceniano: E_2 , tHcy, witaminy: B_{12} , FA, w ostatnim badaniu oznaczano dodatkowo progesteron i pobierano materiał na badanie genotypu MTHFR.

Wyniki: W grupie kobiet z cyklem fizjologicznym stężenie tHcy zależy w sposób istotny statystycznie od E_2 , przy czym wpływ E_2 jest mniejszy niż witaminy B_{12} i FA. W grupie kobiet stymulowanych gonadotropinami nie wykazano istotnej statystycznie zależności pomiędzy stężeniami E_2 i tHcy. Rozpatrując łącznie obie grupy, wykazano istotną statystycznie zależność stężenia tHcy od E_2 , który był drugim co do siły oddziaływania czynnikiem, po FA.

W całej populacji, po pominięciu oznaczeń w trakcie Marvelonu, wykazano, że stężenie E_2 ma istotny statystycznie wpływ na stężenie tHcy. Wszystkie 4 dyskutowane modele wyjaśniały 38,17%-55,87% zmienności tHcy.

Analiza w grupach, w których wykonano pomiary stężenia progesteronu, nie wykazała jego istotnego statystycznie wpływu na stężenie tHcy.

Wnioski:

1. Stężenie tHcy jest niższe w fazie lutealnej niż folikularnej prawidłowego cyklu miesięcznego. Interpretując wyniki oznaczeń stężeń tHcy u kobiet przed menopauzą należy uwzględnić fazę ich cyklu miesięcznego.
2. Stężenie tHcy obniża się wraz ze wzrostem stężenia E_2 w surowicy.
3. Stężenie tHcy nie zależy od ponadfizjologicznych stężeń E_2 w surowicy jakie uzyskiwane są w trakcie stymulacji owulacji.
4. Stężenia tHcy w fazie folikularnej i lutealnej prawidłowego cyklu miesięcznego oraz w czasie stymulacji owulacji nie zależy od genotypu C677T MTHFR.
5. Stężenie FA w surowicy jest czynnikiem najsilniej wpływającym na stężenie tHcy w obu fazach fizjologicznego cyklu miesięcznego i w czasie stymulacji owulacji.

TOTAL SERUM HOMOCYSTEINE CONCENTRATIONS DURING THE NORMAL MENSTRUAL CYCLE AND UNDER OVARIAN STIMULATION

Anna Lewczuk, Krzysztof Sworczak, Piotr Wiśniewski.

Department of Internal Medicine, Endocrinology and Hemostatic Disorders, Medical University of Gdańsk, Poland

Introduction: The so-called „homocysteine theory of atherosclerosis” was a basis for investigations of the role of homocysteine (tHcy). The role of tHcy in inborn defects, gestational complications, venous thrombosis, Alzheimer’s disease, depression and malignancy has been proved. The most important factors influencing enzyme activity of the methionin-homocystein-cystein pathway are: vitamin B6, B12, folic acid (FA), medication, renal insufficiency, hypothyreosis and the beta-cystathionin-synthase and methylentetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene mutations. Age and gender-dependent differences have been found. Men and postmenopausal women have higher tHcy concentrations than premenopausal women. Hormone replacement therapy lowers the tHcy concentration.

Aim of the study: The aim of the study was to assess the variability of tHcy concentration during the normal menstrual cycle and during the preparation to and actual ovarian stimulation; further to analyse the correlation between tHcy concentration and the serum concentrations of 17β -estradiol (E_2), vitamin B12 and FA as well as tHcy level dependence on the MTHFR genotype.

Material and methods: 69 women aged 21 to 44 years (mean 31.6 ± 5.9) were included in the study. The first group consisted of healthy women with normal menstrual cycles (confirmed by hormonal and ultrasonographic studies). The serum samples were acquired during the follicular phase, in the periovulatory period and in the luteal phase. The second group consisted of women treated for infertility. The samples were taken on the 16th day of Marvelon intake, on the last day of ovarian stimulation, and 36 hours after the administration of HCG. In both groups, in every sample taken, we determined E_2 , tHcy, vitamin B12 and FA concentrations; in the last sample we also measured the progesteron level and on the same day, material for MTHFR was sampled.

Results: In the group of women with normal menstrual cycles, there is a statistically significant correlation between tHcy concentrations and E_2 levels, E_2 influence being lesser than that of vitamin B12 and FA. In the group of women undergoing gonadotropine stimulation, no statistically significant correlation between E_2 and tHcy was demonstrated. When both groups were assessed together, we found a statistically significant dependence of tHcy on E_2 , which was the second strongest influencing factor, weaker only than FA. The analysis of all the samples except for those taken during Marvelon intake showed that E_2 concentration has statistically significant influence on tHcy levels. All the four considered models explained 38.17%-55.87% of tHcy variability. Results analysis of the groups where progesteron levels were determined did not show a statistically significant impact of progesteron levels on tHcy concentration.

Conclusions:

1. The tHcy concentration during the normal menstrual cycle is lower in the luteal phase compared with the follicular phase. When interpreting the results of homocysteine concentration measurements in premenopausal women, the phase of the menstrual cycle should be taken into consideration.
2. The tHcy concentration decreases with increasing E_2 serum concentrations.
3. The tHcy concentration does not correlate with excessive E_2 levels reached during ovarian stimulation.

4. The tHcy concentrations both in the luteal and follicular phases of the normal menstrual cycle and during ovarian stimulation do not depend on the C677T MTHFR genotype.
5. The FA serum concentration is the strongest determining factor influencing tHcy concentrations in both phases of the normal menstrual cycle and during ovarian stimulation.

P-03 Andropauza i menopauza

Przewodniczący sesji:
Józef Krzysiek, Romuald Dębski

25 STĘŻENIE LEPTYNY U KOBIET PRZED I PO MENOPAUZIE PRZYJMĄCYCH HORMONALNĄ TERAPIĘ ZASTĘPCZĄ

Bednarek-Tupikowska Grażyna, Filus Alicja, Kulczkowska-Płaksej Justyna, Bohdanowicz-Pawlak Anna, Tupikowski Krzysztof, Milewicz Andrzej

Katedra i Klinika Endokrynologii, Diabetologii i Leczenia Izotopami Akademii Medycznej we Wrocławiu

Celem pracy było zbadanie wpływu estradiolu i hormonalnej terapii zastępczej na stężenie leptyny u kobiet przed i po menopauzie.

Materiał i metody. Grupa badana składała się z 26 kobiet z chirurgiczną menopauzą (51.8+/-2.64 lat) i 54 kobiet z fizjologiczną menopauzą (50.5+/-3.04 lat) oraz z 40 zdrowych kobiet premenopauzalnych (48.3+/-2.3 lat) stanowiących grupę kontrolną. Kobiety z chirurgiczną menopauzą przyjmowały estradiol (50 µg / die) drogą przezskórną, a te z fizjologiczną menopauzą dodatkowo octan medroksyprogesteronu (5 mg/dzień) przez ostatnich 12 dni cyklu. Mierzono masę ciała, obwód talii i bioder oraz ciśnienie tętnicze, a także obliczano współczynniki BMI (Body Mass Index) oraz WHR (Waist /Hip). Na początku i po czterech miesiącach leczenia oznaczano w surowicy stężenia leptyny, FSH i estradiolu.

Wyniki. Stężenia leptyny nie różniły się statystycznie między grupami. Nie było korelacji między stężeniem leptyny, a stężeniami FSH i estradiolu we badanych grupach przed i po leczeniu. Stwierdzono dodatnią korelację między stężeniem leptyny, a masą ciała, BMI, obwodem biodra i talii. Nie było korelacji między stężeniem leptyny, a WHR zarówno w grupie przed, jak i po menopauzie. U kobiet premenopauzalnych stwierdzono dodatnią korelację między stężeniem leptyny, a wartościami ciśnienia tętniczego.

Wnioski. Stężenie estradiolu oraz terapia estrogenowa jak i estrogenowa u kobiet po menopauzie nie wpływają na stężenie leptyny we krwi. Poziom leptyny jest związany z masą ciała i wielkością BMI, a nie ze stężeniem hormonów płciowych. Typ otyłości nie wpływał istotnie na stężenie leptyny. Stwierdzona korelacja między stężeniem leptyny, a wielkością ciśnienia tętniczego w grupie kobiet premenopauzalnych wymaga dalszych badań.

Słowa kluczowe: leptyna, menopauza, estradiol, hormonalna terapia zastępcza

SERUM LEPTIN CONCENTRATIONS IN PRE- AND POSTMENOPAUSAL WOMEN ON SEX HORMONES REPLACEMENT THERAPY

Bednarek-Tupikowska Grażyna, Filus Alicja, Kulczkowska-Płaksej Justyna, Bohdanowicz-Pawlak Anna, Tupikowski Krzysztof, Milewicz Andrzej

Department of Endocrinology and Diabetology, Wrocław Medical University, Poland

Aim of study was to investigate the influence of estradiol and sex hormones replacement therapy on serum leptin concentration in pre- and postmenopausal women.

Material and Methods. Study group consisted of 26 women with surgical (51.8+/-2.6 y) and 54 with physiological menopause (50.5+/-3.0 y) and of 40 healthy premenopausal (48.3+/-2.3 y) controls. Group with surgical menopause received estradiol transdermally (50 µg/die) and women with natural menopause additionally medroksyprogesterone acetate (5 mg/day) for 12 last days of cycle. Body weight, waist and hip circumferences, blood pressure were measured and BMI (Body Mass Index) and WHR (Waist /Hip) were calculated. Serum leptin, FSH and estradiol were measured prior and after 4 months of therapy.

Results. Leptin concentrations did not differ statistically in all groups. No correlations between leptin and hormones: estradiol and FSH concentrations were found in groups before and after treatment. Leptin levels positively correlated with body mass, BMI, hip and waist circumferences. There were no correlations between leptin and WHR in pre- and postmenopausal subjects. In premenopausal group leptin levels correlated with blood pressure.

Conclusions. Endogenous estradiol and estrogen and estrogen replacement therapy do not have influence on serum leptin concentrations. Serum leptin level is related to body mass and BMI and not to sex hormones status. The type of obesity do not influence on serum leptin concentration. The correlation between serum leptin concentration and blood pressure in premenopausal women require further investigations.

Key words: leptin, menopause, estradiol, hormone replacement therapy

26 WPŁYW NIEDOBORU ESTROGENÓW, LECZENIA ESTROGENOWEGO I ESTRO-PROGESTAGENOWEGO NA STĘŻENIE HOMOCYSTEINY I NADTLENKÓW LIPIDÓW U KOBIET PO MENOPAUZIE

Grażyna Bednarek-Tupikowska, Justyna Kulczkowska-Płaksej, Alicja Filus, Jadwiga Szymczak, Krzysztof Tupikowski, Andrzej Milewicz

Katedra i Klinika Endokrynologii, Diabetologii i Leczenia Izotopami AM we Wrocławiu