

23.09.2005 - piątek

**P-07 Endokrynologia
molekularna i doświadczalna 2**

*Przewodniczący sesji:
Alicja Macke-Nauman, Ludwik Malendowicz*

78

**PRZYPUSZCZALNY ZWIĄZEK POMIĘDZY
KANNABINOIDAMI A GRELINĄ
W REGULACJI ŁAKNIENIA**

Robert Ł. Zbucki¹, Bogusław Sawicki², Izabela Białuk¹, Piotr Kosiorek¹, Maria M. Winnicka¹

¹ Zakład Patologii Ogólnej i Doświadczalnej
² Zakład Histologii i Embriologii, Akademia Medyczna
w Białymstoku

Wstęp: W wielu krajach marihuana jest jedną z najczęściej stosowanych używek. Głównym psychoaktywnym składnikiem marihuany jest Δ^9 -tetrahydrokannabinol, agonista receptorów kannabinoidowych: CB1 oraz w mniejszym stopniu CB2, których ekspresję stwierdzono odpowiednio w mózgu i tkankach obwodowych. Po odkryciu receptorów kannabinoidowych oraz ich egzogennych agonistów wykazano, iż pochodne kwasu arachidonowego, a szczególnie anandamid i 2-AG pełnią rolę endogennych agonistów tych receptorów. Ośrodkowe efekty działania kannabinoidów obejmują upośledzenie aktywności motorycznej, pamięci, działanie przeciwbólowe, przeciwwymiotne oraz pobudzające apetyt. Mechanizm stymulującego apetyt działania kannabinoidów nie został wyjaśniony. Ostatnio wykazano, iż grelina, hormon uwalniany z błony śluzowej żołądka, pełni rolę czynnika pobudzającego apetyt.

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 stężenie greliny w osoczu oraz jej immunoreaktywności w błonie śluzowej żołądka u szczurów.

Materiał i metody: Badania immunohistochemiczne wykonano metodą ABC, stężenie greliny w osoczu oceniono metodą RIA.

Wyniki: Cztery godziny po iniekcji zarówno CP 55,940, jak i R(+)-methanandamidu stwierdzono obniżenie immunoreaktywności błony śluzowej żołądka z użyciem przeciwciał p/grelinie, któremu towarzyszył istotnie statystyczny wzrost stężenia greliny w osoczu.

Wniosek: Powyższe obserwacje mogą wskazywać, iż stymulujący wpływ kannabinoidów na apetyt może być związany ze wzrostem uwalniania greliny z komórek X/A-podobnych błony śluzowej żołądka.

**A POSSIBLE LINK BETWEEN CANNABINOIDS
AND GHRELIN IN APPETITE CONTROL**

Robert Ł. Zbucki¹, Bogusław Sawicki², Izabela Białuk, Piotr Kosiorek, Maria M. Winnicka¹

¹ Department of General and Experimental Pathology,
² Department of Histology and Embryology, Medical University
of Białystok, Poland

Introduction: Marijuana is one of the recreational drugs most commonly used in many countries. The principal active component of marijuana Δ^9 -tetrahydrocannabinol acts as an agonist of cannabinoid receptors: CB1 and to some extent CB2, expressed in brain and in peripheral tissues, respectively. Following a discovery of cannabinoid receptors and their exogenous ligands, an arachidonic acid derivatives, especially anandamid and 2-arachidonylglycerol, were indicated as endogenous agonists of cannabinoid receptors. Central effects of cannabinoids include disruption of psychomotor activity, memory impairment, antinociception, antiemetic effects and stimulation of appetite. The mechanism of appetite control by cannabinoids remains still unknown. Recently, ghrelin – a hormone secreted from the stomach was proposed as an appetite stimulating agent.

The aim of this study was an evaluation of the influence of a single ip. injection of a stable analogue of anandamide - R(+)-methanandamide (2.5 mg/kg) and CP 55,940 (0.25 mg/kg), an exogenous agonist of CB1 receptors, on ghrelin plasma concentration and its immunoreactivity in gastric mucosa in male Wistar rats.

Material and methods: Ghrelin-immunoreactivity was evaluated using ABC technique and plasma ghrelin concentration was detected by RIA.

Results: Four hours after a single injection of CP 55,940 and R(+)-methanandamide the attenuation of ghrelin-immunoreactivity of gastric mucosa, accompanied by a significant increase of ghrelin plasma concentration was observed.

Conclusions: These results indicate that stimulation of appetite exerted by cannabinoids may be connected with an increase of ghrelin secretion from gastric X/A-like cells.

79

**POLIMORFIZM GENU TP53 A RYZYKO
ROZWOJU RAKA KORY NADNERCZY**

Magdalena Ignaszak-Szczepaniak¹, Wanda Horst-Sikorska¹, Joanna Sawicka², Marta Kaczmarek³, Ryszard Słomski³, Anna Kasperlik-Zaluska⁴

¹ Zakład Medycyny Rodzinnej AM w Poznaniu
² Katedra i Klinika Endokrynologii i Chorób Wewnętrznych AM w Poznaniu
³ Instytut Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu
⁴ Klinika Endokrynologii CMKP, Szpital Bielański, Warszawa

Wstęp: Polimorfizm genu supresorowego TP53 dotyczy najczęściej kodonu 72 w obrębie eksonu 4. Powoduje on wbudowanie aminokwasu proliny (CCC) w miejsce argininy (CGC) w łańcuchu białkowym. Uważa się, że polimorfizm TP53 wiąże się ze zwiększonym ryzykiem niektórych nowotworów złośliwych człowieka.

Cel pracy: określenie związku pomiędzy polimorfizmem genu TP53 a ryzykiem rozwoju raka kory nadnerczy.

Materiał i metody: Do badania zakwalifikowano 46

chorych z guzami kory nadnerczy, zarówno łagodnymi AA (29 pacjentów) jak i złośliwymi AC (17 chorych). Objawy kliniczne nadczynności kory nadnerczy reprezentowało 12 chorych z grupy AA oraz 6 z AC. U 17 chorych z AA oraz 11 z AC guz wykryto przypadkowo. Grupę kontrolną stanowiło 50 zdrowych osób. DNA wyizolowane z leukocytów krwi obwodowej poddano wstępnej selekcji przy użyciu techniki przesiewowej: analizy heterodupleksów (PCR-HD). Następnie metodą sekwencjonowania cyklicznego scharakteryzowano rodzaj mutacji w obrębie badanej sekwencji DNA.

Wyniki: Polimorfizm genu *TP53* w kodonie 72 stwierdzono u: 47% chorych z rakiem kory nadnerczy (AC), 27,5% pacjentów ze zmianami łagodnymi (AA) oraz 24% osób z grupy kontrolnej. Częstość występowania genotypów Arg/Arg, Arg/Pro i Pro/Pro wynosiła odpowiednio: w guzach łagodnych: 72%/28%/0%, w rakach kory nadnerczy: 53%/35%/12%, w grupie kontrolnej: 76%/24%/0%. Wykazano, że nosiciele allelu 72Pro mieli 3-krotnie wyższe ryzyko rozwoju raka kory nadnerczy (OR= 3,05, 95%CI =1,11- 6,31, p=0.029). Ryzyko wystąpienia guza łagodnego nie było istotnie większe (OR= 1,17, 95%CI =0,44 3,06, p=0.80). Ponadto wariant polimorficzny 72Pro obserwowano znamienne częściej u chorych z rakiem kory nadnerczy wykrytym przypadkowo (38%) w porównaniu z pacjentami z AA (12%), p=0,028.

Wnioski: Obecność allelu 72Pro wiązała się z 3-krotnie wyższym ryzykiem wystąpienia raka kory nadnerczy. Uznanie wariantu polimorficznego 72Pro za marker procesu złośliwego w guzach wykrytych przypadkowo wymaga dalszych badań.

THE *TP53* GENE POLYMORPHISM AND RISK OF ADRENOCORTICAL CANCER IN POLISH PATIENTS

Magdalena Ignaszak-Szczepaniak¹, Wanda Horst-Sikorska¹, Joanna Sawicka², Marta Kaczmarek³, Ryszard Słomski³, Anna Kasperlik-Załuska⁴

¹ Department of Family Medicine Karol Marcinkowski Medical University, Poznan, Poland

² Department of Internal Medicine and Endocrinology, Karol Marcinkowski Medical University, Poznan, Poland

³ Institute of Human Genetics of Polish Academy of Sciences, Poznań, Poland

⁴ Department of Endocrinology, Centre for Postgraduate Medical Education, Warsaw, Poland

Introduction: The most common *TP53* tumor suppressor gene polymorphism occurs at codon 72 in exon 4th. It determines translation to either arginine (CGC) or proline (CCC). The correlation between *TP53* polymorphism and risk of cancer development has been considered in different human malignancies.

Aim of the study was to estimate the association of *TP53* polymorphism at codon 72 with increased risk of adrenocortical cancer in Polish patients.

Material and methods: The 46 patients with adrenocortical tumors were examined: 29 cases with benign (AA, 12 functional and 17 incidentally found) and 17 patients with malignant neoplasms (AC, 6 functional and 11 incidentally found). The control group comprised 50 healthy individuals. DNA extracted from peripheral blood samples was screened by heteroduplex analysis method

(PCR-HD). Selected probes were tested by cycle sequencing to identify sequence variation.

Results: *TP53* polymorphism at codon 72 was found out in 47% of AC cases, in 27,5% of AA and in 24% of controls. The genotype Arg/Arg, Arg/Pro and Pro/Pro distribution was respectively: 72%/28%/0% for benign tumors, 53%/35%/12% for cancers and 76%/24%/0% for controls. Carriers of 72Pro allele had increased risk of adrenocortical cancer development - OR reached 3.05 (95%CI =1.11- 6.31, p=0.029). No significance was observed in the risk of benign tumors between AA and controls (OR= 1.17, 95%CI =0.44 3.06, p=0.80). Moreover 72Pro polymorphic variant was present at higher frequency in patients with incidentally found carcinoma vs incidentally found adenoma, respectively in 38% vs 12% (p=0.028).

Conclusions: The presence of 72Pro allele was associated with 3-fold higher risk for adrenocortical cancer in examined Polish patients. The detection of 72Pro variant might be a useful tool for malignancy prediction in incidentally found adrenocortical tumors, but requires further investigations.

80

ANALIZA EKSONÓW 4, 7 I 9 GENU SUPRESOROWEGO *TP53* U PACJENTÓW Z GUZAMI KORY NADNERCZY

Magdalena Ignaszak-Szczepaniak¹, Wanda Horst-Sikorska¹, Joanna Sawicka², Marta Kaczmarek³, Ryszard Słomski³, Anna Kasperlik-Załuska⁴

¹ Zakład Medycyny Rodzinnej AM w Poznaniu

² Katedra i Klinika Endokrynologii I Chorób Wewnętrznych AM w Poznaniu

³ Instytut Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu

⁴ Klinika Endokrynologii CMKP, Szpital Bielański, Warszawa

Wstęp: Mutacje genu supresorowego *TP53* należą do najczęstszych zmian genetycznych spotykanych w nowotworach złośliwych człowieka.

Cel pracy: Poszukiwanie związku pomiędzy obecnością mutacji w eksonach: 4, 7 i 9 genu *TP53* a występowaniem guzów kory nadnerczy oraz próba określenia markera genetycznego predyspozycji do rozwoju raka kory nadnerczy.

Materiał i metody: Do badania zakwalifikowano 46 chorych z guzami kory nadnerczy, zarówno łagodnymi (29 pacjentów) jak i złośliwymi (17 chorych). Grupę kontrolną stanowiło 50 zdrowych osób. DNA wyizolowane z leukocytów krwi obwodowej poddano wstępnej selekcji przy użyciu technik przesiewowych: analizy heterodupleksów (PCR-HD dla eksonu 4) oraz polimorfizmu konformacji jednoniciowych DNA (PCR-SSCP dla eksonu 7 i 9). Metodą sekwencjonowania cyklicznego scharakteryzowano rodzaj mutacji w obrębie sekwencji DNA badanych kodonów.

Wyniki: Analiza eksonu 4 genu *TP53* wykazała obecność polimorfizmu w kodonie 72. Transwersję G>C (CGC>CCC; Arg >Pro) w jednym bądź obu allelach stwierdzono u 8 z 29 (27,5%) chorych z gruczolakami kory nadnerczy oraz u 8 z 17 pacjentów z rakami kory nadnerczy (47%). W grupie kontrolnej polimorfizm dotyczył 24% badanych. Dalsza analiza wykazała istotnie wyższy odsetek allelu polimorficznego 72Pro u pacjen-

tów z guzem złośliwym (29%) w porównaniu z grupą kontrolną (12%), $p=0,029$. Z kolei częstość występowania wariantu 72Pro nie różniła się istotnie pomiędzy pacjentami z guzami łagodnymi (14%) i kontrolną (12%), $p=0,805$. Mutacje w eksonie 7 stwierdzono u 2 pacjentów z rakiem kory nadnerczy, przy czym potwierdzenie metodą sekwencjonowania uzyskano u jednego chorego. Mutację punktową – tranzycję G>A zlokalizowano w kodonie 245 (GGC>GAC; Gly>Asp). Nie obserwowano mutacji w tym eksonie u chorych z gruczolakami. Nie wykryto zmian w sekwencji eksonu 9 zarówno u pacjentów z gruczolakami jak i guzami złośliwymi kory nadnerczy.

Wnioski: Obecność allelu polimorficznego 72Pro genu *TP53* wiązała się z występowaniem raka kory nadnerczy. Mutacje germinalne w kodonie 245 (ekson 7) mogą mieć związek z predyspozycją do nowotworów złośliwych w korze nadnerczy.

THE ANALYSIS OF EXONS 4, 7 AND 9 OF *TP53* TUMOR SUPPRESSOR GENE IN PATIENTS WITH ADRENOCORTICAL TUMORS

Magdalena Ignaszak-Szczepaniak¹, Wanda Horst-Sikorska¹, Joanna Sawicka², Marta Kaczmarek³, Ryszard Słomski³, Anna Kasperlik-Załuska⁴

¹ Department of Family Medicine Karol Marcinkowski Medical University, Poznan, Poland

² Department of Internal Medicine and Endocrinology, Karol Marcinkowski Medical University, Poznan, Poland

³ Institute of Human Genetics of Polish Academy of Sciences, Poznań, Poland

⁴ Department of Endocrinology, Centre for Postgraduate Medical Education, Warsaw, Poland

Introduction: Mutation of *TP53* are among the most common molecular abnormalities in human neoplasms.

Aim of the study: Investigation of the association between mutations in exon 4, 7 and 9 of *TP53* gene and predisposition to malignant transformation in patients with adrenocortical tumors.

Material and methods: The 46 cases with adrenocortical tumors were included: 29 patients with adenoma and 17 patients with malignant neoplasm. The control group comprised 50 healthy individuals. DNA from peripheral blood samples was examined by: heteroduplex analysis (PCR-HD for exon 4) and single strand conformers polymorphism (PCR-SSCP for exon 7 and 9), followed by direct sequencing, for detection mutations in the sequence of studied exons.

Results: The analysis of exon 4 *TP53* revealed the presence of polymorphism in codon 72. Transversion G>C (CGC>CCC; Arg>Pro) in one or two alleles was identified in: 8 of 29 (27.5%) cases of benign tumors and also in 8 of 17 patients (47%) with adrenocortical cancers. The frequency of polymorphism in the control group was 24%. We indicated significant higher percentage of polymorphic 72Pro allele in patients with ACC- 29% in comparison to control group- 12%, $p=0.029$. There was no statistical significant differs in polymorphic variant frequencies between adenoma (14%) and controls (12%) $p=0.805$. Mutations in exon 7 were detected by SSCP technique in 2 patients with adrenocortical cancers but sequencing confirmed substitution only in 1 patient (transition G>A

in 245 codon). We did not found any alterations in exon 7 neither in benign group nor in controls. No changes were observed in exon 9 neither in patients with adenomas nor carcinomas.

Conclusions: The presence of 72Pro polymorphic allele was associated with development of adrenocortical cancer. Germ-line mutation in codon 245 of *TP53* gene may predispose to relatively late onset of malignancy in adrenal cortex.

81

STRES CHRONICZNY ZAKŁÓCA ORGANIFIKACJĘ JODKU W TARCZYCY

Lilia Nadolnik, Sergei Lupaczik, Sergei Czumaczenko

Laboratorium biochemii gruczolów endokrynnych, Instytut Biochemii NAN Białorusi. Grodno, Białorusi

Cel badania: Ocena oddziaływania stresu chronicznego na metabolizm jodu (wchłanianie, utlenienie, organifikację) w tarczycy szczurów i jej strukturę morfologiczną.

Materiały i metody: Codziennie w ciągu miesiąca szczurów Wistar narażano na oddziaływanie 20-minutowego stresu emocjonalno-bólowego (SEB). W tkance tarczycy określano zawartość jodku ogólnego (Iog), jego białkowiążącej (Ibw) i wolnej frakcji (Iw) metodą cer-arsenianową. Aktywność peroksydazy tarczycowej (TPO), dysmutazy ponadtlenowej i katalazy tarczycy określano spektrofotometrycznie. Zawartość kortykosteronu we krwi i nadnerczach oznaczano metodą HPLC (wysokoprężna chromatografia cieczowa), a czynność peroksydacji lipidów – według stężenia TBARS. Dane statystyczne opracowywano za pomocą U-testu Mann-Witney.

Resultaty: Codzienne oddziaływanie 20-minutowego stresu emocjonalno-bólowego (SEB) w ciągu miesiąca powoduje znaczne zmiany metabolizmu jodu w tarczycy. Zawartość ogólna jodku w tarczycy szczurów narażanych na stres wzrastała 1,97-krotnie, jego białkowiążącej (Ibw) i wolnej frakcji (Iw) odpowiednio 1,67 i 3,10-krotnie w porównaniu z kontrolą. Wzrostowi zawartości jodku w tarczycy towarzyszyły podwyższenie proporcji Ibw/Iw o 2 razy i obniżenie proporcji Ibw/Iog o 1,8 razy, co świadczy o zaburzeniu procesu jego organifikacji. Trzykrotne podwyższenie Iw w tarczycy może być faktorem powodującym zaburzenie metabolizmu tyreocytów. Stwierdzono wzrost poziomu TBARS o 20%, obniżenie aktywności katalazy o 31%, masy tarczycy o 18%, stężenia białka – o 15%. Podczas badania mikroskopowego w tarczycy narażanych na stres szczurów stwierdzono wakuolizację nabłonka tarczycy, powiększenie średnicy pęcherzyków, rozrzedzenie i resorpcję koloidu. W strefach sklerotycznych poszczególnych tarczyc ujawniono infiltraty limfocytowe.

Wniosek: Stres chroniczny powoduje dobitnie wyrażone zmiany strukturalno-metaboliczne w tarczycy które odznaczają się wzrostem zawartości jodu, zmniejszeniem stopnia jego organifikacji, aktywacją stresu utleniającego.

Słowa kluczowe: tarczyca, jod, organifikacja, stres chroniczny

CHRONIC STRESS DISTURBS IODINE ORGANIFICATION IN THE THYROID

Liliya Nadolnik, Sergei Lupachik, Sergei Chumachenko

Laboratory of Endocrine Glands Biochemistry, Institute of Biochemistry, NAS of Belarus Grodno, Belarus

Aim: To assess the effects of chronic stress on the metabolism of iodine (uptake, oxidation, organification) in the rat thyroid and its morphological structure.

Material and Methods: Wistar rats were subjected to 20 min emotional and painful stress (EPS) daily over 1 month. The thyroid tissue was assayed for total (It) content of iodine, its protein-bound (Ipb) and free fractions (If) by a cerium arsenite method. The activities of thyroid peroxidase, superoxide dismutase and catalase were measured spectrophotometrically. Blood and adrenal corticosterone levels were determined by HPLC, where as lipid peroxidation activity – by TBARS concentration. The data were processed statistically using the Mann-Witney U-test.

Results: The daily 20 min exposure to EPS over a month pronouncedly changed thyroid iodine metabolism. The total thyroid iodine concentration in stressed rats was increased 1.97-fold, whereas those of the protein-bound and free fractions - 1.67 – and 3.10-fold, respectively, compared to controls. The raised thyroid iodine content was accompanied by a 2-fold elevated If/Ipb ratio and a 1.18-fold reduced Ipb/It ratio, thus indicating disturbed iodine organification. The three-fold increase in thyroid If may be a factor for impaired thyrocyte metabolism. The concentration of TBARS was elevated by 20%, catalase activity was decreased by 31%, thyroid weight and protein concentration were reduced by 18% and 15%, respectively. The microscopic study of stressed rat thyroids showed thyroid epithelium vacuolization, increased follicle diameter, colloid resorption and dilution. Lymphocyte infiltrates were found in thyroid individual sclerotic zones.

Conclusion: Chronic stress produced pronounced structural and metabolic changes in the thyroid characterized by increased content of iodine, its decreased organification and oxidative stress activation.

Key words: thyroid, iodine, organification, chronic stress

82

ROLA SUBSTANCJI REGULUJĄCYCH APETYT I AKTYWNOŚĆ INSULINY ORAZ POLIMORFIZMU Pro12Ala GENU PPAR- γ 2 U KOBIET Z ZESPOŁEM PCO

Bidzińska-Speichert B¹, Tworowska U¹, Demissie M¹, Bednarek-Tupikowska G¹, Ślęzak R²

¹ Katedra i Klinika Endokrynologii, Diabetologii i Leczenia Izotopami, A.M. Wrocław

² Zakład Genetyki, A.M. Wrocław

Receptory aktywowane proliferatorami perosysomów (PPARs) są jądrowymi receptorami najczęściej występującymi w tkance tłuszczowej i niektórych pozatłuszczowych tkankach, takich jak: ściana jelita, mięśnie, wątroba i makrofagi. Wpływają one na różnicowanie się adipocy-

tów i ekspresję genów współgrając z innymi czynnikami transkrypcyjnymi.

Cel pracy: wykazanie możliwych zależności pomiędzy polimorfizmem Pro12Ala genu receptora PPAR- γ 2 oraz substancjami powodującymi uczucie głodu i sytości, opornością na endogenną insulinę a także nadmiarem androgenów u kobiet z PCOS.

Materiał i metody: Przebadano 2 grupy kobiet: grupę kontrolną oraz grupę kobiet z PCOS. Zastosowano podział każdej z grup badanych na grupę kobiet nieotyłych z BMI <30 kg/m², z podgrupą z należną masą ciała (szczupłych) z BMI < 25 kg/m², i grupę kobiet otyłych z BMI \geq 30 kg/m². Wykonane badania: 1. BMI i WHR 2. oznaczenia leptyny, NPY, galaniny i CCK w osoczu 3. badanie polimorfizmu Pro12Ala genu PPAR γ 2. 4. insulina i glukoza podczas OGTT.

Wyniki: U kobiet z PCOS występuje znamienna hiperleptynemia z towarzyszącymi wysokimi stężeniami NPY oraz obniżonymi stężeniami galaniny i CCK. W grupie z PCOS częstość występowania allele Ala wynosi 23.15% i jest niższa od częstości allele Ala w GK która wynosi 26.47%

Wnioski: Stwierdzony u kobiet z PCOS układ substancji regulujących apetyt charakteryzuje się wysokimi stężeniami leptyny i NPY oraz niskimi stężeniami galaniny i CCK u otyłych kobiet z PCOS. Zmiany te sugerują wystąpienie ilościowych i jakościowych zmian w doborze pokarmu. Otyłość u pacjentek z PCOS może być również wynikiem słabszego odczuwania sytości i obniżonym stężeniem CCK. Częstość występowania allele Ala w całej grupie kobiet wynosi 24.76 % i jest znacznie wyższa od częstości w większości europejskich populacji. Polimorfizm Pro12Ala u kobiet z PCOS będących nosicielkami jednego allele Ala ma walory ochronne jeśli chodzi o hiperleptynemię, hiperandrogeniemię i insulinooporność.

ROLE OF THE SATIETY AND INSULIN ACTIVITY REGULATING COMPOUNDS AND THE Pro12Ala PPAR- γ 2 GENE POLYMORPHISM IN PCOS WOMEN

Bidzińska-Speichert B¹, Tworowska U¹, Demissie M¹, Bednarek-Tupikowska G¹, Ślęzak R²

¹ Department of Endocrinology and Diabetology, Medical University of Wrocław,

² Department of Genetics, Medical University of Wrocław

Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) are the nuclear receptors that are mostly expressed in adipocytes and some nonadipose tissues like intestinal wall, muscles, liver and macrophages. They regulate adipocytes differentiation and gene expression by an interplay with other transcription factors.

The aim of the study: was to assess the possible association between Pro12Ala PPAR- γ 2 receptor gene polymorphism and satiety factors, insulin resistance and androgen excess in PCOS women.

Material and methods: Two groups of women were studied: a control group (51) and PCOS women (54). Women were divided into a group of non-obese with BMI <30 kg/m² and obese women with BMI \geq 30 kg/m².

Examinations: 1. BMI and WHR 2. measurements of leptin, NPY, galanin and CCK 3. Pro12Ala polymorphism in the gene of PPAR γ 2. 4. insulin and glucose during OGTT

Results: Ovarian hyperandrogenism (PCOS) was connected with occurrence of hyperleptinemia and higher NPY levels. PCOS, obese and non-obese subjects had significantly lower levels of galanin. Significantly lower levels of CCK in obese women with PCOS were observed. Frequency of Ala allele in the control group was estimated at 26.47% and in the group of patients with PCOS at 23.15%.

Conclusions: PCOS patients may reveal a disrupted loop of central leptin/NPY feedback. The constellation of high leptin/NPY and low galanin/CCK levels in women with PCOS indicates possibility of quantitative and qualitative shifts in food intake. Frequency of Pro12Ala polymorphism evaluated in investigated patients is significantly higher than shown in other European populations. Pro12Ala polymorphism in women with PCOS carrying a single Ala allele has protective role as far as hyperleptinemia, hyperandrogenemia and insulin resistance is concerned.

83

WPŁYW MELATONINY NA PROCES APOPTOZY W KOMÓRKACH PĘCHERZYKOWYCH TARCZYCY U SZCZURÓW

Gesing Adam, Jagieła Joanna, Lewiński Andrzej

Katedra i Klinika Endokrynologii i Chorób Metabolicznych, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Wstęp: Zaburzenia regulacji apoptozy (apt) mogą być przyczyną wielu chorób. Niektóre substancje (np. aflatoxyna B1; AFB1) mogą indukować apoptozę w różnych tkankach i narządach. Melatonina (Mel) jest substancją o działaniu antyoksydacyjnym, antyproliferacyjnym i potencjalnym przeciwnowotworowym.

Cel pracy: Ocena wpływu Mel na proces apoptozy przebiegający w komórkach pęcherzykowych tarczycy (kpt) u szczurów (w tym – pod wpływem AFB1).

Materiał i metody: W doświadczeniu wykorzystano 30 szczurów samców szczepu Wistar. Wyróżniono 4 grupy doświadczalne: Grupa I – Kontrola [rozpuszczalnik dla Mel - alkoholizowany roztwór 0.9 % NaCl; 0.9 % NaCl_{alkoh}], Grupa II – Mel [20 mg/kg m.c.], Grupa III – AFB1 [50 µg/kg m.c.], Grupa IV – Mel [20 mg/kg m.c.] + AFB1 [50 µg/kg m.c.]. Melatonina, 0.9 % NaCl_{alkoh} i AFB1 były podawane szczurom w postaci codziennych dootrzewnowych wstrzyknięć przez okres 3 tygodni (Mel i 0.9 % NaCl_{alkoh} - w godzinach późnopołudniowych). Do oceny stopnia apoptozy, ocenianego w preparatach mikroskopowych, zastosowano zestaw *In Situ Cell Death Detection, POD* oraz zestaw *DAKO® Liquid DAB Substrate-Chromogen System*. Współczynnik nasilenia apoptozy (I_{apopt}) w kpt wyrażono liczbą komórek apt(+)immunopozytywnych/1000 tyreocytów.

Wyniki: 1) AFB1 zwiększyła I_{apopt} w kpt u szczurów w porównaniu z grupą kontrolną ($p < 0,001$); 2) W grupie otrzymującej AFB1 oraz Mel wartość współczynnika

I_{apopt} była istotnie niższa w porównaniu do wartości I_{apopt} w grupie zwierząt otrzymujących jedynie AFB1 ($p < 0,001$); 3) Wartość współczynnika I_{apopt} w grupie szczurów otrzymujących Mel nie zmieniła się w sposób istotny statystycznie w porównaniu do wartości I_{apopt} w grupie kontrolnej.

Wnioski: Melatonina może regulować wzrost komórek i tkanek, wpływając na proces apoptozy.

Praca finansowana przez Uniwersytet Medyczny w Łodzi (praca własna nr 502-11-170)

EFFECTS OF MELATONIN ON APOPTOSIS PROCESS IN RAT THYROID FOLLICULAR CELLS

Gesing Adam, Jagieła Joanna, Lewiński Andrzej

Chair and Clinic of Endocrinology and Metabolic Diseases, Medical University of Łódź

Introduction: Disturbances of apoptosis regulation can result in many diseases. Certain substances (for example - aflatoxin B1; AFB1) can induce apoptosis in various organs and tissues. Melatonin (Mel) is a substance which has antioxidant, antiproliferative and, potentially, anti-neoplastic activities.

The aim of the study was to examine Mel influence on the process of apoptosis in rat thyroid follicular cells (TFC) (AFB1 effects included).

Materials and methods: In our study, we used 30 male Wistar rats. The animals were divided into 4 groups: Group I – controls (the rats received injections of solvent for Mel - alcoholized 0.9 % NaCl; 0.9 % NaCl_{alkoh}), Group II – Mel [20 mg/kg bm], Group III – AFB1 [50 µg/kg bm], Group IV – Mel [20 mg/kg bm] + AFB1 [50 µg/kg bm]. Melatonin, 0.9 % NaCl_{alkoh} and AFB1 were administered intraperitoneally for 3 weeks (Mel and 0.9 % NaCl_{alkoh} as late-afternoon injections). In order to assess the process of apoptosis, evaluated in microscopic preparations of rat thyroids, we used the *In Situ Cell Death Detection, POD* Kit and *DAKO® Liquid DAB Substrate-Chromogen System*. The apoptotic index (I_{apopt}) values in TFC were expressed as counted apt(+) immunopositive TFC per 1000 TFC.

Results: 1) AFB1 increased the I_{apopt} in rat TFC, in comparison to controls ($p < 0,001$); 2) The I_{apopt} value in the rats, receiving Mel and AFB1 injections, was statistically lower, as compared to the value of the examined index in the group of AFB1-treated animals ($p < 0,001$); 3) No statistically significant differences of I_{apopt} value were observed between the Mel-treated group of animals and the controls.

Conclusions: Melatonin can presumably regulate the growth of cells and tissues by its influence on the process of apoptosis.

The study is supported by Medical University of Łódź (Grant nr 502-11-170)

84

WPLYW AGONISTÓW RECEPTORÓW OPIOIDOWYCH I LEKTYNOWYCH NA *IN VITRO* WYDZIELANIE GRELINY Z GRUCZOLAKA PROSTATY U LUDZI

Krystyna Pierzchała-Koziec¹, Bohdan Pawlicki²,
Joanna Zubel², Henryk Lach³

¹ Katedra Fizjologii Zwierząt, Akademia Rolnicza, Kraków

² Szpital im.G. Narutowicza, Kraków

³ Zakład Fizjologii Zwierząt, Instytut Biologii, Akademia Pedagogiczna, Kraków

Cel pracy: Określenie wpływu morfiny, agonisty receptorów opioidowych, i iskadoru, lektyny o antynowotworowym działaniu, na *in vitro* wydzielanie greliny z gruczolaka prostaty u ludzi.

Materiał i metody: Gruczoł pobrany podczas rutynowego zabiegu podzielono na skrawki, które inkubowano w buforze Krebsa napowietrzonym O₂ i CO₂ przez dwie godziny. Wydzielanie greliny było analizowane w obecności 30 mM K⁺, 100nM morfiny, greliny lub iskadoru Q. Koncentracja greliny była mierzona radioimmunologicznie w medium zbieranym przez 20 min oraz w zhomogenizowanej tkance.

Wyniki: Podstawowe wydzielanie greliny z tkanki gruczolaka wynosiło 2172±325 pg/g tkanki/20 min i było istotnie zwiększone przez morfinę do 4029±276 pg/g tkanki/20 min (86%, P<0,001). Niespodziewanie, iskador Q zwiększył wydzielanie immunoreaktywnej greliny o 625%; wzrost z poziomu podstawowego 2526±189 do 18302±1234 pg/g tkanki/20 min (P<0,001). W przeciwieństwie do tego, 100 nM egzogennej greliny nie zmieniło stopnia wydzielania immunoreaktywnej greliny (podstawowe-2865±168, po stymulacji-2550±202 pg/g tkanki/20 min, P>0,05). Koncentracja immunoreaktywnej greliny w ludzkiej prostaty z gruczolakiem wynosiła 1856±166 ng/g tkanki, zatem stosunek wydzielonej greliny do jej koncentracji wahał się od 0,13% (podstawowe) do 0,22% (po morfinie) i do 1% po dodaniu iskadoru Q.

Wnioski: Morfina i iskador Q zmieniły wydzielanie greliny co może sugerować, iż grelina wpływa na rozwój gruczolaka prostaty u ludzi poprzez receptory błonowe, podobnie jak opioidy i lektyny.

Słowa kluczowe: gruczolak prostaty, grelina, morfina, iskador

Finansowane przez PBZ-KBN-084/PO6/2002/3.10

THE EFFECT OF OPIOID AND LECTIN RECEPTOR AGONISTS ON THE *IN VITRO* GHRELIN RELEASE FROM THE HUMAN PROSTATE NEOPLASMS

Krystyna Pierzchała-Koziec¹, Bohdan Pawlicki²,
Joanna Zubel¹, Henryk Lach³

¹ Department of Animal Physiology, Agricultural University, Cracow

² Narutowicz Memorial Hospital, Cracow

³ Department of Animal Physiology, Institute of Biology, Pedagogical University, Cracow

Aim of the study was to observe the effect of morphine, an opioid receptor agonist, and iscador, lectin with anti-

tumor abilities, on the *in vitro* ghrelin release from the human prostate with benign hyperplasia.

Material and Methods: Tissues removed under routine procedure were sliced and superfused with Krebs-bicarbonate/O₂ for 2 hours. Ghrelin release was analyzed in the presence of 30 mM K⁺, 100 nM of morphine, ghrelin or iscador Q. The ghrelin concentration was measured by RIA in the perfusates collected at 20 min intervals and in the supernatant of tissues.

Results: Basal release of ghrelin from the tumor tissue was 2172±276 pg/g tissue/20 min (86%, P<0.01). Unexpectedly, iscador Q stimulated the *in vitro* secretion of immunoreactive ghrelin by 635%; increase from basal level of 2526±189 to 18302±1234 pg/g tissue/20 min (P<0.001). In contrast, 100 nM of exogenous ghrelin did not affected the secretion degree of ghrelin (change from 2865±168 to 2550±202 pg/g tissue/20 min, P>0.05). The concentration of immunoreactive ghrelin in human prostate with benign neoplasia was 1856±166 ng/g tissue, so the ratio of ghrelin secreted to ghrelin concentration fluctuated from 0.13% (basal) to 0.22% (after morphine) and to 1% after iscador Q treatment.

Conclusions: Morphine and iscador Q changed the ghrelin release what may suggest that ghrelin plays role in the development of the human benign prostate neoplasia probably by the cell membrane receptors similarly to opioids and lectins.

Key words: prostate benign neoplasia, ghrelin, morphine, iscador

Supported by Solicitd Project PBZ-KBN-084/PO6/2002/3.10

85

WPLYW GHRH(1-44)NH₂ NA WYDZIELANIE INTERLEUKINY-2 (IL-2) ORAZ ROZPUSZCZALNEGO RECEPTORA α DLA IL-2 (sIL-2Rα) PRZEZ KOMÓRKI KRWI OBWODOWEJ CZŁOWIEKA W WARUNKACH *IN VITRO*

Agnieszka Siejka, Henryk Stępień

Katedra Endokrynologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi,
91-425 Łódź, ul. Sterlinga 3

Założenia: Wzajemne powiązania pomiędzy układami neuroendokrynnym i immunologicznym są obecnie przedmiotem intensywnych badań. Somatoliberyna (GHRH) jest hormonem podwzgórzowym nasilającym uwalnianie i syntezę hormonu wzrostu (GH) z komórek przedniego płata przysadki. Nieliczne doniesienia z ostatnich lat wskazują ponadto na udział tego neurohormonu w regulacji czynności układu immunologicznego.

Cel pracy: Celem pracy było zbadanie wpływu GHRH na wydzielanie IL-2 oraz sIL-2Rα z pobudzonych mitogenem jednojądrzastych komórek krwi obwodowej człowieka.

Materiał i metody: Badania przeprowadzono na jednojądrzastych komórkach wyizolowanych z krwi obwodowej człowieka (PBMC) zgodnie z metodą opisaną przez Böyuma. Komórki, hodowane przez 24 godziny w 37^o C w atmosferze zawierającej 95% powietrza i 5% CO₂, poddano stymulacji fitohemaglutyniną (PHA; 10

µg/ml), a następnie dodawano GHRH(1-44)NH₂ w stężeniach 10⁻¹², 10⁻¹⁰, 10⁻⁸ i 10⁻⁶ M. Pomiaru poziomów badanych cytokin dokonano w oparciu o metodę immunoenzymatyczną (ELISA). Analizy statystycznej dokonano przy użyciu testu U Mann-Whitney'a. Za poziom istotności statystycznej przyjęto p<0,05.

Wyniki: Zaobserwowano, że GHRH zwiększa sekrecję IL-2 działając znamienne w stężeniu 10⁻¹²M (p<0,001). Ponadto w stężeniach 10⁻¹⁰M oraz 10⁻⁸M GHRH istotnie statystycznie nasila wydzielanie sIL-2Rα (p<0,001). Stwierdzono także silną dodatnią korelację pomiędzy wartościami stężeń sIL-2Rα w medium inkubacyjnym a testowanymi stężeniami GHRH(1-44) (r=0,8664; p<0,001).

Wnioski: Przedstawione wyniki wskazują na potencjalny udział GHRH w regulacji czynności sekrecyjnej limfocytów T.

Słowa kluczowe: interleukina-2, receptor dla interleukiny-2, somatoliberyna, neuroimmunomodulacja

Praca finansowana przez grant UIM w Łodzi No 502-11-187.

EFFECT OF GHRH(1-44)NH₂ ON THE SECRETION OF INTERLEUKIN-2 (IL-2) AND SOLUBLE IL-2 RECEPTOR α (sIL-2Rα) FROM HUMAN PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS IN VITRO

Agnieszka Siejka, Henryk Stępień

Chair of Endocrinology, Medical University of Łódź, 91-425 Łódź, ul. Sterlinga 3

Objective: The bidirectional communication between the neuroendocrine and the immune systems is now a subject of an intensive investigation. Somatoliberin (GHRH) is a hypothalamic hormone that enhances the synthesis and the release of growth hormone (GH) from the anterior pituitary cells. Few recent reports demonstrate also role of the neuropeptide in the regulation of the immune system function.

Aim: The aim of the study was to examine the influence of GHRH on IL -2 as well as sIL -2Rα secretion from mitogen-stimulated peripheral blood mononuclear cells.

Material and method: Mononuclear cells (PBMC) were isolated from the peripheral blood of healthy adults according to the technique described by Böyum. Cells, cultured 24 hours at 37⁰ C in humidified atmosphere of 95% air and 5% CO₂, were stimulated with phytohemagglutinin (PHA; 10 µg/ml), and then GHRH(1-44)NH₂ at the final concentrations 10⁻¹², 10⁻¹⁰, 10⁻⁸ and 10⁻⁶ M was added to appropriate wells. ELISA kits were used to measure IL-2 and sIL-2Rα concentrations in the supernatants of cultured cells. Comparisons between tested groups were made by U Mann-Whitney test. The differences were considered significant if p < 0.05.

Results: GHRH stimulated the secretion of IL -2 into the supernatants acting significantly at the concentration of 10⁻¹²M (p < 0.001). Moreover, GHRH at concentrations 10⁻¹⁰M and 10⁻⁸M significantly increased the secretion of sIL-2Rα (p<0.001). Strong positive correlation between tested GHRH concentrations and sIL-2Rα levels in the supernatants was demonstrated (r = 0.8664; p < 0.001).

Conclusions: The results demonstrate the potential involvement of GHRH in the regulation of T lymphocytes secretory function.

Key words: interleukin-2, interleukin-2 receptor, somatoliberin, neuroimmunomodulation

Supported by a grant of the Medical University of Łódź No 502-11-187.

86 WYSOKIE SPOŻYCIE NASYCONYCH KWASÓW TŁUSZCZOWYCH Z DIETĄ BOGATOTŁUSZCZOWĄ ZABURZA NEUROENDOKRYNNE MECHANIZMY KONTROLI HOMEOSTAZY ENERGETYCZNEJ

Małgorzata Stachoń, Ewa Fürstenberg, Joanna Gromadzka-Ostrowska

Katedra Dietetyki, SGGW, Warszawa

Wstęp: Leptyna zaliczana jest do podstawowych hormonów zaangażowanych w regulację bilansu energetycznego organizmu. Hamuje ona syntezę i wydzielanie głównego podwzgórzowego orektyna - neuropeptydu Y (NPY). NPY i leptyna stanowią zatem neurohormonalny układ regulujący równowagę energetyczną organizmu. Wydaje się, że zaburzenie funkcjonowania tego układu, u podstaw którego może leżeć nieprawidłowa dieta, jest przyczyną zmian metabolicznych na poziomie narządów i tkanek oraz rozwoju wielu chorób cywilizacyjnych. Przypuszcza się, że czynnikiem modulującym funkcje tego układu może być m.in. ilość i rodzaj przyjmowanego z dietą tłuszczu

Cel pracy: określenie wpływu rodzaju tłuszczu zawartego w diecie wysokotłuszczowej (>60% energii) na zawartość NPY w podwzgórzku oraz stężenie leptyny w osoczu szczurów

Materiał i metody: doświadczenie przeprowadzono na 35 samcach szczurów rasy Wistar, którym (po 2-tygodniowym okresie adaptacyjnym) przez 6 tygodni podawano jedną z diet różniących się rodzajem zawartego w nich tłuszczu. Diety zawierały olej słonecznikowy (S), rzepakowy (R), palmowy lub smalec. Referencyjna grupa zwierząt otrzymywała granulaty zawierający wagowo 4,5% tłuszczu (Pe). Zawartość NPY w podwzgórzku oraz stężenie leptyny w osoczu oznaczono metodą radioimmunologiczną

Wyniki: stwierdzono niższe osoczowe stężenie leptyny u szczurów z grupy Pe oraz niższą zawartość NPY w podwzgórzku szczurów karmionych dietami S i R niż u zwierząt z pozostałych grup doświadczalnych

Wnioski: Wydaje się, że wysokie spożycie nasyconych kwasów tłuszczowych wraz z dietą bogatotłuszczową (zawierającą olej palmowy lub smalec) może zaburzać działanie leptyny, indukując wysoką zawartość NPY w podwzgórzku zwierząt

Badania finansowane z grantu KBN 5P06G02517

HIGH SATURATED FATTY ACID INTAKE IN FAT-RICH DIET IMPAIRS NEUROENDOCRINE CONTROL MECHANISMS OF ENERGY HOMEOSTASIS

Małgorzata Stachoń, Ewa Fürstenberg, Joanna Gromadzka-Ostrowska

Department of Dietetics, SGGW, Warsaw

Introduction: Leptin plays an important role in controlling energy metabolism. It inhibits synthesis and secretion of the main hypothalamic neuropeptide – NPY. NPY and leptin may thus be described as a neurohormonal system regulating energy metabolism of an organism. Any imbalance in this system, imposed by (among others) dietary factors, can lead to metabolic changes in peripheral tissues and may be one of the reasons for the development of many non-communicable diseases. The consumed diet, particularly the amount and type of dietary fat, is among factors which presumably modulate this neurohormonal system.

Aim of the study: to examine the effect of the type of fat in high-fat diets (60% energy as fat) on the hypothalamus NPY content and plasma leptin concentration in rats

Materials and methods: the study was performed using 35 male Wistar rats fed (after a two-week adaptation period) on one of six diets containing sunflower (S), rapeseed (R), palm oil or lard as the fat source, for six weeks. The reference group (Pe) received standard laboratory pellets containing 4,5% fat by weight. The hypothalamus NPY content and plasma leptin concentration were determined by radioimmunoassay methods

Results: as compared to other groups, Pe group was shown to have lower plasma leptin levels, while hypothalamus NPY contents were the lowest in S and R groups

Conclusions: high saturated fatty acid intake in the fat-rich diets (containing palm oil or lard) seems to lead to the impairment of leptin action and, in consequence, to the induction of high hypothalamic NPY levels

This work was supported by the KBN grant 5P06G02517

87 BADANIA NAD REGULACJĄ EKSPRESJI REZYSTYNY W KOMÓRKACH GONADY MĘSKIEJ SZCZURA

Sawiński Piotr, Łukaszyk Andrzej, Balcerek Małgorzata, Ciesiółka Sylwia

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii Akademii Medycznej im. K. Marcinkowskiego Poznań,

Wstęp. W badaniach interakcji komórkowych w gonadzie męskiej w poprzednich latach koncentrowano się na roli czynników zaangażowanych w regulację procesów głodu i sytości. W ostatnim czasie stwierdzono produkcję białka rezystyny (ang.: resistin) w komórkach Leydiga i Sertoliego, regulowaną przez gonadotropiny przysadkowe i zmieniającą się podczas głodzenia. Nie przebadano natomiast, czy synteza ta podlega wpływowi lokalnego układu regulacyjnego obejmującego produkty sekrecyjne komórek jądra.

Cel pracy. W przedstawianych doświadczeniach badano ekspresję rezystyny *in vivo* w komórkach Leydiga

i komórkach kanalików nasiennych oraz *in vitro* w komórkach Leydiga poddanych wpływowi interleukiny-1 (IL-1) i interleukiny-6 (IL-6).

Materiał i metody. Komórki Leydiga i kanalików nasiennych izolowano z jąder szczurów w wieku 40 dni. Komórki Leydiga poddawano działaniu wybranych stężeń IL-1 α , IL-1 β i IL-6 w obecności lub bez LH. Izolowano RNA z komórek, wykonywano odwrotną transkrypcję a uzyskane cDNA amplifikowano za pomocą PCR ze starterami dla szczurzej rezystyny. Produkty analizowano elektroforetycznie. Przeprowadzono też analizę ilościową mRNA za pomocą fluorescencyjnej RT-PCR w czasie rzeczywistym. Dodatkowo oznaczono stężenia testosteronu w płynach hodowlanych metodą radioimmunologiczną.

Wyniki i wnioski. Wykazano ekspresję rezystyny w komórkach Leydiga i komórkach kanalików nasiennych. W warunkach podstawowych, stężenia mRNA dla rezystyny były zwiększone w obecności badanych cytokin. LH także stymulowało produkcję mRNA rezystyny, a badane interleukiny znosiły to zjawisko. Ilości mRNA rezystyny w komórkach Leydiga *in vivo* były podobne do stwierdzanych *in vitro* w warunkach podstawowych, natomiast znacznie niższe stężenia oznaczono w komórkach kanalików nasiennych, gdzie głównym źródłem rezystyny wydają się być komórki Sertoliego. Otrzymane wyniki mogą wskazywać, że ekspresja badanego białka ulega regulacji przez czynniki parakrynowe wydzielane lokalnie w gonadzie męskiej.

THE STUDY ON THE REGULATION OF EXPRESSION OF RESISTIN IN RAT TESTICULAR CELLS

Sawiński Piotr, Łukaszyk Andrzej, Balcerek Małgorzata, Ciesiółka Sylwia

Department of Histology and Embryology, Poznań University of Medical Sciences, Poznań, Poland

Introduction. Studies on testicular cell interactions in past year focused on the role of factors involved in control of appetite and obesity. Recently, the expression of resistin, influenced by gonadotropins and fasting, has been observed in Leydig and Sertoli cells. It is unknown whether resistin expression is regulated by local mechanism including secretory products of testicular cells.

The aim of the study. In the presented study the expression of resistin was investigated *in vivo* in Leydig and seminiferous tubule cells, as well as *in vitro* in Leydig cells influenced by interleukin-1 (IL-1) and interleukin-6 (IL-6).

Material and methods. Leydig cells and seminiferous tubule cells were isolated from 40-day-old rats. Then, Leydig cells were subjected to chosen concentrations of IL-1 α , IL-1 β and IL-6, under or without stimulation with LH. RNA isolated from cells was amplified with double-step RT-PCR using primers specific for rat resistin. The products were analysed in gel electrophoresis. Moreover, the quantification of cDNA synthesis was performed by means of fluorescence real-time RT-PCR. To compare obtained results to the influence of studied cytokines on testosterone secretion by Leydig cells, culture media were collected for testosterone radioimmunoassay.

Results and conclusions. The results show the expression of resistin in Leydig cells and seminiferous tubule cells. In basal conditions, concentrations of resistin mRNA were increased in presence of all interleukins. LH also stimulated production of mRNA for resistin, and all interleukins reversed this phenomenon. The levels of resistin mRNA in Leydig cells *in vivo* were similar to those in basal conditions *in vitro*, while significantly lower concentrations were detected in seminiferous tubules, where its main source seem to be Sertoli cells. It may be concluded that the expression of resistin in male gonad is subjected to local regulation provided by paracrine interactions of testicular cells.

Słowa kluczowe: starzenie, głodzenie, refeeding, hormony, WKT, szczur

HORMONAL AND METABOLIC RESPONSES TO SHORT-TERM FASTING AND REFEEDING ARE ALTERED IN RAT DURING AGING

Zbigniew Kmiec¹, Leszek Pokrywka¹, Grażyna Kotlarz¹, Andrzej Szutowicz², Andrzej Myśliwski¹

¹ Department of Histology and Immunology, Medical University, Gdańsk

² Department of Laboratory Medicine, Medical University, Gdańsk

Background: Regulatory mechanisms of metabolic homeostasis undergo important alterations during aging. The age-related changes become often evident only during stimulation such as fasting and subsequent refeeding which represent natural challenge to energy metabolism.

Aim of the study was to determine the effect of short-term fasting and refeeding on serum levels of key hormones and metabolites in young adult (5 month-old, $n=41$) and old (24 month-old, $n=39$) male Wistar rats.

Methods: Control rats were fed ad libitum. Animals were fasted for 48 h or fasted and refed for 24 h. Metabolite serum concentrations were measured by standard methods. Leptin, insulin, ACTH, and corticosterone were determined by rat-specific RIA, and adiponectin by ELISA.

Results: 1. Control serum levels of key metabolites and hormones were similar in both age groups except for increased triglycerides (TG) in old rats. 2. Fasting caused a significant decrease of leptin, insulin, glucose, and TG serum levels in both age groups, and an increase of free fatty acids (FFA), however, only in young animals. 3. Upon refeeding serum glucose, TG and insulin reverted to control levels in both age groups, however, FFA decreased only in young rats. 4. In contrast to young animals, in old rats refeeding decreased serum corticosterone and failed to increase serum leptin to control level. 5. Neither fasting nor refeeding changed adiponectin and ACTH serum concentrations in both age groups.

Conclusions: Aging suppresses leptin and corticosterone secretion during refeeding after short-term starvation. This process may represent age-related adaptation directed to sustain high serum level of FFA as efficient energy substrates.

Key words: aging, fasting, refeeding, hormones, FFA, rat

88

PROCES STARZENIA ZMIENIA ODPOWIEDŹ UKŁADU ENDOKRYNNEGO SZCZURA PODCZAS GŁODZENIA I PO PODANIU POKARMU

Zbigniew Kmiec¹, Leszek Pokrywka¹, Grażyna Kotlarz¹, Andrzej Szutowicz², Andrzej Myśliwski¹

¹ Katedra Histologii i Immunologii AM w Gdańsku

² Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej, AM w Gdańsku

Wstęp: Starzenie zmniejsza sprawność mechanizmów regulujących homeostazę metaboliczną, co często uwidacznia się podczas głodzenia i następującego po nim karmienia, czyli tzw. refeeding'u.

Cel pracy: Porównanie efektu głodzenia i refeeding'u na stężenia we krwi hormonów oraz metabolitów kluczowych dla regulacji homeostazy energetycznej u młodych i starych szczurów.

Materiał i metody: Do doświadczeń użyto samce, szczury rasy Wistar w wieku 5 (młode, $n=41$) oraz 24 miesiące (stare, $n=39$). Szczury kontrolne karmiono ad libitum, szczury głodzone pozbawiano pokarmu na 48 godz., szczury trzeciej grupy (refeeding) głodzone przez 48 godz., a następnie karmiono przez 24 godziny. Stężenia metabolitów w surowicy krwi oznaczano standardowymi metodami, poziomy leptyny, insuliny, ACTH i kortykosteronu testami RIA specyficznymi dla szczura, a stężenie adyponektyny testem ELISA.

Wyniki: 1. Stężenia w surowicy krwi hormonów i metabolitów były podobne u młodych i starych szczurów, z wyjątkiem wzrostu trójglicerydów (TG) u starych zwierząt. 2. W obu grupach wiekowych głodzenie obniżało poziomy leptyny, insuliny, glukozy i TG oraz nie zmieniało stężenia ACTH, kortykosteronu i adyponektyny. 3. W wyniku głodzenia poziom wolnych kwasów tłuszczowych (WKT) wzrastał jedynie u zwierząt młodych. 4. Refeeding przywracał kontrolny poziom glukozy, TG i insuliny w obu grupach wiekowych oraz obniżał stężenie WKT, ale tylko u młodych szczurów. 5. Refeeding obniżał stężenie kortykosteronu we krwi starych szczurów oraz prowadził do normalizacji poziomu leptyny tylko u młodych zwierząt.

Wniosek: Obniżenie stężenia leptyny i kortykosteronu u starych szczurów poddanych refeeding'owi może mieć korzystne znaczenie adaptacyjne prowadząc do podtrzymania poziomu wysokoenergetycznego substratu, WKT, we krwi.

89

WPLYW BROMIANU POTASOWEGO NA PEROKSYDACJĘ LIPIDÓW W HOMOGENATACH TKANEK SZCZURZYCH ORAZ PORÓWNANIE OCHRONNEGO DZIAŁANIA MELATONINY, KWASU INDOLO-3-PROPIONOWEGO I PROPYLOTIOURACYLU

Magdalena Stasiak, Agnieszka Kokoszko, Krzysztof Zasada, Arkadiusz Zygmunt, Małgorzata Karbownik, Andrzej Lewiński

Klinika Endokrynologii i Chorób Metabolicznych, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki, Łódź

Wstęp: Bromian potasowy (KBrO_3) jest znanym prooksydantem i czynnikiem rakotwórczym. Melatonina – hormon szyszynki – jest uznanym antyoksydantem. Ponadto, odnotowano antyoksydacyjne efekty kwasu indolo-3-propionowego (IPA) oraz propylthiouracylu (PTU) – leku przeciwtarczycowego.

Cel pracy: ocena prooksydacyjnego działania KBrO_3 w tkankach szczurzych – nerkach, wątrobie i płucach – i porównanie ochronnego wpływu melatoniny, IPA i PTU przed peroksydacją lipidów wywołaną przez KBrO_3 .

Materiały/metody: Homogenaty tkanek szczurzych z grupy kontrolnej i z grupy szczurów, które otrzymywały wstrzyknięcia melatoniny (0,0645 mmol/kg, dootrzewnowo, 2 x dziennie przez 10 dni), inkubowano w obecności KBrO_3 (0,1, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0 mM). W kolejnym doświadczeniu, homogenaty płuc szczurzych inkubowano w obecności KBrO_3 (10,0 mM) oraz jednego z antyoksydantów: melatoniny (0,01, 0,1, 0,5, 1,0, 5,0, 7,5 mM) lub IPA lub PTU (0,01, 0,1, 0,5, 1,0, 5,0, 7,5, 10,0 mM). Poziom produktów peroksydacji lipidów – malonaldehydu + 4-hydroksyalkenali (MDA+4-HDA) – mierzono spektrofotometrycznie.

Wyniki: KBrO_3 spowodował podwyższenie peroksydacji lipidów w homogenatach płuc z grupy kontrolnej; efektu takiego nie odnotowano w homogenatach płuc pobranych od zwierząt, które otrzymywały wstrzyknięcia melatoniny. Podwyższeniu peroksydacji lipidów wywołanemu przez KBrO_3 zapobiegła jedynie melatonina. W homogenatach wątroby i nerek, zarówno w grupie kontrolnej jak i „melatoninowej”, KBrO_3 spowodował obniżenie podstawowej peroksydacji lipidów.

Wnioski: Melatonina wykazuje działanie ochronne przed peroksydacją lipidów wywołaną przez KBrO_3 w płucach szczurzych.

EFFECTS OF POTASSIUM BROMATE ON LIPID PEROXIDATION IN RAT TISSUE HOMOGENATES AND COMPARISON OF PROTECTIVE EFFECTS OF MELATONIN, INDOLE-3-PROPIONIC ACID AND PROPYLTHIOURACIL

Magdalena Stasiak, Agnieszka Kokoszko, Krzysztof Zasada, Arkadiusz Zygmunt, Małgorzata Karbownik, Andrzej Lewiński

Department of Endocrinology and Metabolic Diseases, Medical University of Łódź, Polish Mother's Memorial Hospital-Research Institute, Łódź

Introduction: Potassium bromate (KBrO_3) is a well known prooxidant and carcinogenic agent. Melatonin, the pineal hormone, is an effective antioxidant. Recently, antioxidative effects of indole-3-propionic acid (IPA) – an indole, and propylthiouracil (PTU) – an antithyroid drug, have been found.

The aim of the study was to evaluate prooxidative effects of KBrO_3 in the rat kidney, liver and lung, and to compare protective effects of melatonin, IPA and PTU against KBrO_3 -induced lipid peroxidation.

Materials/methods: Homogenates of rat tissues collected from either control rats or melatonin-treated animals (0.0645 mmol/kg b.w., i.p., twice daily, for 10 days) were

incubated in the presence of KBrO_3 (0,1, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0 mM). In the other set of experiments, lung homogenates were incubated in the presence of KBrO_3 (10 mM) plus one of the antioxidants: melatonin (0,01, 0,1, 0,5, 1,0, 5,0, 7,5 mM), or IPA or PTU (0,01, 0,1, 0,5, 1,0, 5,0, 7,5, 10,0 mM). The level of lipid peroxidation products – malondialdehyde+4-hydroxyalkenals (MDA+4-HDA) – was measured spectrophotometrically.

Results: A concentration-dependent increase in lipid peroxidation was observed, due to KBrO_3 treatment in the control lung homogenates, but not in lung homogenates of the melatonin-treated rats. Melatonin, but neither PTU nor IPA, significantly reduced KBrO_3 -related lipid peroxidation in the control lung homogenates. In homogenates of the liver and kidney from both the Control and melatonin groups, KBrO_3 caused a concentration-dependent decrease in lipid peroxidation.

Conclusion: Melatonin, but neither IPA nor PTU, protects against lipid peroxidation, due to KBrO_3 in the rat lung.

90

TŁUSZCZ POŻYWIENIA A RECEPTORY ANDROGENOWE W AORCIE

Olczak Elżbieta¹, Gromadzka-Ostrowska Joanna¹, Rembiszewska Alina²

¹ Katedra Dietetyki Wydziału Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji SGGW, Warszawa

² Zakład Patologii Molekularnej Centrum Onkologii – Instytut, Warszawa

Cel pracy: Ocena wpływu tłuszczów zwierzęcych wysokotłuszczowej diety na rozmieszczenie i gęstość receptorów androgenowych w aorcie szczurów.

Materiał i metody: Badania wykonano na młodych dorosłych szczurach samcach rasy Wistar karmionych przez 3 (grupa T3 i S3) i 6 (grupa T6 i S6) tygodni wysokotłuszczowymi (20% w/w) dietami zawierającymi jako źródło tłuszczu tran (grupy T) zawierający kwasy jedno- (55%) i wielonienasycone (22%), stosunek kwasów wielonienasyconych do nasyconych 0,96] i smalec (grupy S) zawierający nasycone kwasy tłuszczowe (43,6%), stosunek kwasów wielonienasyconych do nasyconych 0,17. W ścianie aorty określano lokalizację i gęstość receptorów androgenowych (AR) metodą immunohistochemiczną z użyciem poliklonalnych przeciwciał PC-167 (Calbiochem). Stopień intensywności wybarwienia jąder komórek przydanki (P), warstwy mięśniowej (M) i śród-błonka (S) aorty określano przyjmując skalę: 0 – brak reakcji, I – reakcja słaba, II – reakcja średnia, III – reakcja intensywna.

Wyniki: W grupie T3 rozmieszczenie AR w P (0 – 5%, I – 70,7%, II – 23,2%, III – 1,1%) i Ś (0 – 2%, I – 70,6%, II – 23,4%, III – 4%) było inne niż w M (0 – 78,6%, I – 19,4%, II – 2%, III – 0%). W grupie T6 wzrosła gęstość AR w Ś (II – 56%, III – 44%) i P (II – 49,7%, III – 38,1%), natomiast w M różnice te były mniejsze (0 – 17,8%, I – 41,2%, II – 40,2%, III – 0,8%).

W grupie S3 nie stwierdzono znacznej gęstości AR w żadnej z warstw ściany aorty (III punkt skali – 0%), a w Ś (I – 74,7%) i P (I – 74,0%) była ona niewielka. W M przeważająca ilość jąder wykazywała brak reakcji (0 – 83,3%). W grupie S6 w M najwięcej było jąder słabo (I – 61,2%)

i średnio (II – 24,5%) zabarwionych, a w Ś i P średnio zabarwionych (II – 61,8% i 49,2%).

Wnioski: Rozmieszczenie i poziom receptorów androgenowych w ścianie aorty zależy od rodzaju tłuszczu zawartego w diecie i długości okresu karmienia.

Badania finansowane z grantu promotorskiego KBN nr 2 P06T 031 27

FOOD FAT AND ANDROGEN RECEPTORS IN AORTA

Olczak Elżbieta¹, Gromadzka-Ostrowska Joanna¹, Rembiszewska Alina²

¹ Department of Dietetic, Human Nutrition and Consumer Science, Warsaw Agricultural University

² Laboratory of Molecular Pathology, Oncology Centre – Institute, Warsaw

The aim of the study was estimation of animal dietary fat influence on androgen receptors localization and density in rat's aorta.

Material and Method: Experiment was undertaken on young adult male Wistar rats fed during 3 (T3 and S3 groups) or 6 (T6 and S6 groups) weeks high-fat (20% w/w) diets with fish oil (T groups) containing monounsaturated (55%) and polyunsaturated (22%) fatty acids, unsaturated to saturated ratio 0,96 or lard (S groups) containing saturated (43,6%) fatty acids, unsaturated to saturated ratio 0,17.

Androgen receptors (AR) distribution and localization as the percentage of stained nucleus in the epithelium (Ś), thick muscle layer (M) and tunica adventitia (P) of aorta were estimated by the immunohistochemical method with polyclonal antibody (PC-167, Calbiochem) and described using the following scale: 0 – negative, I – low, II – moderate, III – intense of staining.

Results: Nuclear staining for AR was observed in cells of the all aorta wall layers. In group T3 AR localization in P (0 – 5%, I – 70,7%, II – 23,2%, III – 1,1%) and Ś (0 – 2%, I – 70,6%, II – 23,4%, III – 4%) were different than in M (0 – 78,6%, I – 19,4%, II – 2%, III – 0%). In group T6 AR density in Ś (II – 56%, III – 44%) and P (II – 49,7%, III – 38,1%) growing up, whereas in M only a slight differences were observed (0 – 17,8%, I – 41,2%, II – 40,2%, III – 0,8%).

In group S3 in all aorta wall layers AR intense staining were not observed (III – 0%), in Ś (I – 74,7%) and P (I – 74,0%) AR showed only low reaction, whereas in M in most nucleus (0 – 83,3%) negative reaction were found. In group S6 M layer showed low (I – 61,2%) and moderate (II – 24,5%) AR staining, in Ś and P layers most of them had moderate stained (II – 61,8% and 49,2%).

Conclusions: AR localization and density I aorta depends on type of dietary fat and feeding period.

Ewelina Motylewska, Hanna Ławnicka, Gabriela Meleń-Mucha

Katedra Endokrynologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, Sterlinga 3, 91-425 Łódź

Wstęp: Z powodu niezadowalającej skuteczności 5-fluorouracylu (5-FU) - leku z wyboru w leczeniu uzupełniającym raka jelita grubego, trwają poszukiwania nowych metod terapeutycznych, w tym substancji nasilających działanie tego cytostatyku. Od wielu lat dyskutowana jest potencjalna rola estrogenów w rozwoju raka jelita grubego.

Cel: Celem naszej pracy była ocena wpływu estradiolu, tamoksyfenu (selektywnego modulatora receptorów estrogenowych - SERM) i 5-FU zastosowanych w różnych stężeniach osobno lub łącznie na proliferację komórek mysiego raka jelita grubego Colon 38 w 24-h hodowli komórkowej.

Materiał i metody: Przeprowadzono 6 eksperymentów. Działanie tamoksyfenu badano w stężeniach 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} i 10^{-9} M, estradiol w stężeniach 10^{-4} , 10^{-7} , 10^{-8} i 10^{-9} M, zaś 5-FU w stężeniach 0.125 µg/ml, 0.25 µg/ml, 2.5 µg/ml i 25 µg/ml. Proliferację komórkową oznaczano w oparciu o metodę kolorymetryczną Mosmanna.

Wyniki: 5-FU hamował proliferację komórek raka Colon 38 we wszystkich badanych stężeniach, działając najsilniej w stężeniu 2,5 i 25 µg/ml. Dlatego do badań interakcji 5-FU zastosowano w stężeniu 2.5 µg/ml. Tamoksyfen w stężeniu 10^{-4} M hamował proliferację komórek raka Colon 38, nie działając antyproliferacyjnie w pozostałych badanych stężeniach. Nie zaobserwowano korzystnego współdziałania tamoksyfenu z 5-FU. Estradiol w stężeniu 10^{-4} M hamował proliferację komórek raka Colon 38, a w stężeniach 10^{-7} , 10^{-8} i 10^{-9} M nasilał antyproliferacyjne działanie 5-FU. Ponadto estradiol w stężeniu 10^{-9} M nasilał hamujące działanie tamoksyfenu w stężeniu 10^{-4} M. Zaobserwowano również synergistycznie współdziałanie 5-FU z wybranymi stężeniami tamoksyfenu i estradiolu.

Wnioski: Wykazane w tej pracy antyproliferacyjne działanie tamoksyfenu i estradiolu oraz synergistyczne współdziałanie tych substancji z 5-FU wskazuje na możliwość potencjalnego wykorzystania tych związków w terapii raka jelita grubego, co wymaga jednak dalszych badań.

EFFECTS OF ESTRADIOL AND TAMOXIFEN GIVEN ALONE OR IN COMBINATION WITH 5-FLUOROURACIL ON THE PROLIFERATION OF MURINE COLON 38 CANCER CELLS IN VITRO

Ewelina Motylewska, Hanna Ławnicka, Gabriela Meleń-Mucha

Chair of Endocrinology, Medical University of Łódź, Dr Sterling 3, 91-425 Łódź

Introduction: The efficacy of 5-fluorouracil (5-FU), which is the reference chemotherapeutic drug for colon cancer treatment, is unsatisfactory. Therefore the researches for new substances enhancing the antineoplastic effect of 5-FU are still carried on. The potential role of estrogens in the pathogenesis of colon cancer has been discussed for many years.

91

WPLYW ESTRADIOLU I TAMOKSYFENU ORAZ ICH ŁĄCZNEGO DZIAŁANIA Z 5-FLUOROURACYLEM NA PROLIFERACJĘ KOMÓREK MYSIEGO RAKA JELITA GRUBEGO COLON 38 IN VITRO

Aim: The aim of this study was to examine the effect of estradiol, tamoxifen (selective estrogen receptor modulator - SERM) and 5-FU applied alone or in combination at various concentrations on the proliferation of murine Colon 38 cancer cells in 24 hours cell culture.

Material and methods: Six separate experiments were done. The effect of tamoxifen was studied at the concentrations of 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} M, estradiol at the concentrations of 10^{-4} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} M and 5-FU at the concentrations of 0.125 µg/ml, 0.25 µg/ml, 2.5 µg/ml, 25 µg/ml. The cell proliferation was assessed by the colorimetric Mosmann method.

Results: We found that 5-FU inhibited the proliferation of Colon 38 cancer cells at all studied concentrations, exerting the most potent antiproliferative action at the concentration of 2.5 and 25 µg/ml. Thus, the concentration of 2.5 µg/ml was used to study the interaction with 5-FU. Tamoxifen inhibited the proliferation of Colon 38 cancer cells at the concentration of 10^{-4} , but it did not exert such effect in the other studied concentration. We also did not observe synergistic action of tamoxifen and 5-FU. Estradiol inhibited the proliferation of Colon 38 cells at the concentration of 10^{-4} and applied with 5-FU exerted a synergistic inhibitory effect at the concentrations of 10^{-7} , 10^{-8} and 10^{-9} M. Estradiol at the concentration of 10^{-9} M enhanced the inhibitory effect of tamoxifen at the concentration of 10^{-4} . Furthermore, in this study we observed synergistic effect of 5-FU applied with the chosen concentrations of tamoxifen and estradiol on the inhibition of proliferation of Colon 38 cells.

Conclusions: The antiproliferative effect of tamoxifen and estradiol and their synergy with 5-FU suggests a possibility of using them in treatment of colon cancer. However, further studies are necessary.

92

GERMINALNE MUTACJE GENÓW SDHB I SDHD I ICH KONSEKWENCJE KLINICZNE

Krawczyk Aleksandra¹, Pawlaczek Agnieszka¹, Rusinek Dagmara¹, Hasse-Lazar Kornelia¹, Pęczkowska Mariola², Preibisz Aleksander², Kubaszek Agata², Gubała Elżbieta¹, Januszewicz Andrzej², Jarzab Barbara¹

¹ Zakład Medycyny Nuklearnej i Endokrynologii Onkologicznej, Centrum Onkologii-Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach

² Klinika Nadciśnienia Tętniczego, Instytut Kardiologii, Warszawa

Wstęp: Guzy chromochłonne rozwijają się w rdzeniu nadnerczy, natomiast nerwiaki przyzwojowe powstają z ciała przyzwojowych, najczęściej obrębie głowy i szyi. Do genów predysponujących należą gen *RET*, *VHL* czy *NF1*. Ostatnie badania wskazują na związek mutacji germinalnych w genach *SDHB* i *SDHD* z rozwojem guzów chromochłonnych nadnercza i nerwiaków przyzwojowych, które kodują podjednostki dehydrogenazy bursztynianowej, enzymu występującego w mitochondriach i należącego do II kompleksu oddechowego.

Cel pracy: Analiza mutacji germinalnych genów *SDHB* i *SDHD* i ich roli w rozwoju guzów chromochłonnych i nerwiaków przyzwojowych.

Materiał i metody: Badanie przeprowadzono w grupie 84 pacjentów ze zdiagnozowanymi guzami chromochłon-

nymi i nerwiakami przyzwojowymi, DNA wyizolowanym z leukocytów krwi obwodowej metodą wysalania białek. W reakcji PCR amplifikowano następujące eksony *SDHB*: 2,3,4,6,7; *SDHD*: 1,2,3; *RET*: 10,11,13,16. Następnie otrzymane produkty reakcji PCR poddawano wstępnej przesiewowej analizie MSCP na żelu poliakrylamidowym. Końcowym etapem analizy było potwierdzenie zidentyfikowanych mutacji poprzez sekwencjonowanie.

Wyniki: Mutacje w genie *SDHD* wykryto do tej pory u pięciu pacjentów. U czterech z nich (z rozpoznaniem nerwiaków przyzwojowych) zidentyfikowano mutację germinalną w pierwszym eksonie genu *SDHD* dotyczącą 11 kodonu, co stanowi 36% tej podgrupy. U jednego pacjenta z rozpoznaniem guza chromochłonnego współwystępującego z zespołem MEN2A, u którego wcześniej wykryto mutację germinalną w kodonie 11 genu *RET*, stwierdzono obecność jednonukleotydowego podstawienia *SDHD* w kodonie 12. W przypadku genu *SDHB* stwierdzono u sześciu pacjentów jednonukleotydowe podstawienia w intronach, a u trzech pacjentów z rozpoznaniem guza chromochłonnego zidentyfikowano jednonukleotydowe podstawienia IVS2+35. Jedna z tych osób ma też mutację w kodonie 11 genu *RET* i zespół MEN2A. U pozostałych trzech osób stwierdzono jednonukleotydowe podstawienia IVS2-36.

Wnioski: Opracowana metoda analizy mutacji genu *SDHD* i *SDHB* potwierdza znaczenie mutacji *SDHD* w przyzwojakach dziedzicznych. Nasza analiza ich znaczenia w guzach chromochłonnych wymaga większej liczby przypadków, opracowana metoda daje już taką możliwość.

Grant KBN: 2 P05B08526

GERMLINE MUTATIONS OF SDHB AND SDHD AND THEIR CLINICAL EFFECTS

Krawczyk Aleksandra¹, Pawlaczek Agnieszka¹, Rusinek Dagmara¹, Hasse-Lazar Kornelia¹, Pęczkowska Mariola², Preibisz Aleksander², Kubaszek Agata², Gubała Elżbieta¹, Januszewicz Andrzej², Jarzab Barbara¹

¹ Zakład Medycyny Nuklearnej i Endokrynologii Onkologicznej, Centrum Onkologii-Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach

² Klinika Nadciśnienia Tętniczego, Instytut Kardiologii, Warszawa

Background: Pheochromocytomas arise from the chromaffine tissue in the adrenal medulla, whereas paragangliomas generally develop in the head and neck region. *RET*, *VHL* and *NF1* belong to susceptibility genes. The recent studies indicate association of pheochromocytoma and paraganglioma susceptibility with the presence of germline mutations of *SDHB* and *SDHD* genes, which encode units of succinate dehydrogenase – the mitochondrial enzyme, component of the respiratory chain complex II.

Aim of the study: Analysis of germline mutations of *SDHB* and *SDHD* genes and evaluation of their role in development of pheochromocytomas and paragangliomas.

Material and methods: The analysis was carried out in 84 patients with pheochromocytomas and paragangliomas. DNA was isolated from the peripheral blood leuko-

cytes with the use of saline precipitation method. By PCR we amplified SDHB exons: 2,3,4,6,7; SDHD exons: 1,2,3; RET exons: 10, 11, 13, 16. The products of PCR reaction were examined with the use of MSSCP analysis in polyacrylamide gel. Mutations were identified by sequencing analysis.

Results: We identified mutations in the SDHD gene in five patients until now. Four of them (35%), all with paragangliomas, had germline mutation in exon 1 (codon 11). In one patient with pheochromocytoma as the component of MEN2A syndrome (with germline mutation in RET protooncogene, exon 11) we found a nucleotide substitution in codon 12. For SDHB gene in six patients we found nucleotide substitutions in introns. In three of them (all with pheochromocytoma) we identified IVS2+35 substitution. One of them had also germline mutation in codon 11 RET protooncogene and diagnosed MEN2A syndrome. In three remaining persons we found IVS2-36 nucleotide substitution.

Conclusions: The introduced method of analysis SDHB and SDHD genes mutations confirms significant role of SDHD mutations in hereditary paragangliomas. In the case of pheochromocytoma, more cases are required and the elaborated algorithms enable further analysis.

Grant KBN: 2 P05B08526

93

WPLYW INTERLEUKINY-1 I INTERLEUKINY-6 NA EKSPRESJĘ GHRELINY I JEJ RECEPTORA W KOMÓRKACH LEYDIGA SZCZURA

Sawiński Piotr, Łukaszyk Andrzej

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii Akademii Medycznej im. K. Marcinkowskiego, Ul. Święcickiego 6, 60-781 Poznań, E-mail: pisaw@amp.edu.pl

Wstęp. Ghrelina i jej receptor (GHS-R), zaangażowane w regulację procesów głodu i sytości w ośrodkowym układzie nerwowym, zostały wykryte w wielu tkankach obwodowych, między innymi w komórkach Leydiga. Obserwowano także hamowanie wydzielania testosteronu przez komórki Leydiga, pod wpływem ghreliny. Dotychczas mało poznana jest regulacja ekspresji ghreliny w gonadzie męskiej.

Cel pracy. Celem badań była ocena wpływu lokalnie produkowanych cytokin - interleukiny-1 (IL-1) i interleukiny-6 (IL-6), które, jak wynika z badań własnych, biorą udział w regulacji funkcji komórek Leydiga, na ekspresję ghreliny i jej receptora przez komórki Leydiga *in vitro*.

Materiał i metody. Komórki Leydiga izolowano z jąder 40-dniowych szczurów i poddawano działaniu wybranych stężeń IL-1 α , IL-1 β i IL-6 w obecności lub bez LH. Izolowano RNA z komórek, przeprowadzano odwrotną transkrypcję a uzyskane cDNA amplifikowano za pomocą PCR ze starterami dla szczurzej ghreliny i GHS-R. Produkty analizowano elektroforetycznie na żelu agarozowym. Ponadto, przeprowadzano analizę ilościową mRNA dla w/w białek za pomocą fluorescencyjnej RT-PCR w czasie rzeczywistym. Wyniki badań odnoszono do wpływu badanych cytokin na wydzielanie testosteronu przez komórki Leydiga, oceniane metodą radioimmunologiczną.

Wyniki i wnioski. Analiza ilościowa pokazała wpływ IL-1 β i IL-6 na stężenie cDNA dla ghreliny oraz brak efektu IL-1 α na jej ekspresję – zarówno w warunkach podstawowych, jak i podczas stymulacji LH. Wszystkie badane cytokiny zmniejszały stężenie cDNA dla GHS-R w warunkach podstawowych. Podczas stymulacji LH, IL-6 zmniejszała efekt hamujący tej gonadotropiny na ekspresję GHS-R. Wydzielanie testosteronu stymulowane LH było hamowane przez wszystkie cytokiny w sposób niezależny od stężenia. Pozostawało to w zgodzie ze zwiększeniem stężenia cDNA dla ghreliny przez te substancje. Otrzymane wyniki mogą wskazywać, że ekspresja ghreliny i jej receptora w jądrze podlega wpływowi lokalnych czynników parakrynowych.

THE INFLUENCE OF INTERLEUKIN-1 AND INTERLEUKIN-6 ON THE EXPRESSION OF GHRELIN AND ITS RECEPTOR IN RAT LEYDIG CELLS

Sawiński Piotr, Łukaszyk Andrzej

Department of Histology and Embryology, Poznań University of Medical Sciences, Ul. Święcickiego 6, 60-781 Poznań, Poland, E-mail: pisaw@amp.edu.pl

Introduction. Ghrelin and its receptor (GHS-R), involved in regulation of appetite on the level of central nervous system have been detected in many peripheral tissues, among others in Leydig cells. Moreover, the suppression of testosterone secretion under the influence of ghrelin has been observed. To date, little is known about the regulation of ghrelin expression in the testis.

The aim of the study. The aim of the study was to investigate the influence of locally produced cytokines - interleukin-1 (IL-1) and interleukin-6 (IL-6), observed in our previous studies to affect Leydig cell function, on expression of ghrelin and its receptor in Leydig cells *in vitro*.

Materials and methods. Leydig cells were isolated from 40-day-old rats and subjected to chosen concentrations of IL-1 α , IL-1 β and IL-6, under or without stimulation with LH. RNA isolated from cells was reverse transcribed and obtained cDNA was amplified by PCR with primers specific for rat ghrelin and GHS-R. The products were analysed in gel electrophoresis. In addition, the quantification of cDNA synthesis under different experimental conditions was carried out using fluorescence real-time RT-PCR. The results were compared with the influence of studied cytokines on testosterone levels in culture media of Leydig cells, detected with radioimmunoassay.

Results and conclusions. Quantitative analysis showed that the concentration of cDNA for ghrelin was influenced by IL-1 β and IL-6, with no effect of IL-1 α , both in basal conditions and under influence of LH. All cytokines decreased concentrations of cDNA for GHS-R in basal conditions. Under stimulation with LH, IL-6 diminished inhibitory effect of gonadotropin on GHS-R expression. LH-stimulated testosterone secretion was decreased by all cytokines in dose-independent manner, in parallel with increase in concentration of ghrelin cDNA. These results indicate that expression of ghrelin and its receptor in the testis is under control of local paracrine factors.

94

LEPTYNA WE KRWI PĘPOWINOWEJ ORAZ ŁOŻYSKOWA EKSPRESJA RECEPTORÓW LEPTYNOWYCH W CIAŻY POWIKŁANEJ STANEM PRZEDZRUCAWKOWYM I WEWNĄTRZMACICZNYM ZAHAMOWANIEM WZROSTU PŁODU

Dariusz Szukiewicz^{1,2}, Danuta Maślińska³, Michał Pyzlak¹

¹ Zakład Patologii Ogólnej i Doświadczalnej AM w Warszawie

² Klinika Położnictwa i Ginekologii, II Wydział Lekarski AM w Warszawie

³ CMDiK PAN, Warszawa

Wstęp: Rola leptyny w patofizjologii ciąży, a szczególnie interakcje w układzie jednostka maciczno-łożyskowo-płodowa/organizm matki, wymagają dalszych badań.

Cel: Zbadano korelację pomiędzy stężeniem leptyny we krwi pępowinowej a ekspresją receptorów leptynowych (LR) w łożyskach z ciąż powikłanych stanem przedrzucawkowym (PE), lub wewnątrzmacicznym zahamowaniem wzrostu płodu (IUGR).

Materiał i metody: Zbadano 6 łożysk z ciąż powikłanych PE (Grupa I), 6 łożysk z ciąż powikłanych IUGR (Grupa II), oraz 6 łożysk z ciąż fizjologicznych (Grupa III). Ciąże ukończono cięciem cesarskim ok. 37 tygodnia (średni wiek ciążowy: 261 ±6 dni), przedciążowe wskaźniki masy ciała pacjentek były zbliżone a wszystkie noworodki płci żeńskiej. We krwi z żyły pępowinowej oznaczano immunoenzymatycznie stężenie leptyny. Z każdego łożyska pobierano 5 wycinków i po przygotowaniu preparatów histologicznych wykrywano immunohistochemicznie obecność tzw. formy długiej LR. Ekspresję LR badano ilościową metodą immunohistochemiczną na bazie morfometrii komputerowej.

Wyniki: Średnie stężenia leptyny były istotnie ($p < 0,05$) podwyższone w Grupie I, oraz obniżone w Grupie II, w porównaniu z Grupą III. Ekspresja LR w IUGR była istotnie obniżona, stanowiąc 77,54 % ±SD 14,30 wartości obniżonej w Grupie III, podczas gdy nie stwierdzano istotnych różnic pomiędzy grupami I i III.

Wnioski: Zaburzenia genu kodującego leptynę mogą prowadzić do hiperleptinemii i nadciśnienia towarzyszących PE, podczas gdy obniżona ekspresja łożyskowych LR i hipoleptynemia w IUGR mogą mieć znaczenie patofizjologiczne, wpływając m.in. na miejscową angiogenezę.

UMBILICAL CORD BLOOD LEPTIN AND PLACENTAL EXPRESSION OF LEPTIN RECEPTORS IN PREGNANCIES COMPLICATED BY PREECLAMPSIA AND INTRAUTERINE GROWTH RETARDATION

Dariusz Szukiewicz^{1,2}, Danuta Maślińska³, Michał Pyzlak¹

¹ Dept. Gen. & Exp. Pathology, Medical University, Warsaw

² Dept. Obstet. & Gynecol., 2nd Faculty of Medicine, Medical University, Warsaw

³ Polish Acad. Sci., Medical Research Center, Warsaw

Introduction: Role of leptin in pathophysiology of pregnancy, particularly leptin interactions within utero-placento-fetal unit and mother, needs further studies.

Aim: Correlation between umbilical cord blood leptin concentration and placental leptin receptors (LR) expression were examined in pregnancies complicated by preeclampsia (PE) or intrauterine growth retardation (IUGR).

Material and Methods: Six placentae from preeclamptic patients (Group I), 6 IUGR placentae (Group II), and 6 placentae from normal pregnancies (Group III) were examined. The pregnancies were terminated by cesarean sections (mean gestational age: 261 ±6 days), subject pregestational body mass indexes were similar, and all newborns were females. Leptin concentration in umbilical cord venous blood was determined immunoenzymatically. From each placenta 5 specimens were obtained and the long form of LR was localized by immunohistochemistry in histological slides. LR expression were studied using computer morphometry-based quantitative immunohistochemistry.

Results: Leptin concentrations were higher in Group I ($p < 0,05$) and lowered in Group II, compared with Group III. LR expression was decreased in IUGR ($p < 0,05$), and amounted 77,54% ±SD14,3 of the value calculated for Group III, whereas there were no statistical differences between groups I and III.

Conclusions: Disorders of leptin coding gene may lead to hyperleptinemia and hypertension accompanying PE, while lowered placental LR expression and hypoleptinemia in IUGR might be of pathophysiological importance, influencing local angiogenesis among others.

95

ZACHOWANIE ZDOLNOŚCI DO OWULACJI W WARUNKACH HIPOKSJI A STĘŻENIE CZYNNIKÓW ANGIOGENNYCH W PŁYNIE PĘCHERZYKOWYM – BADANIA IN VITRO

Dariusz Szukiewicz, Danuta Maślińska, Jakub Klimkiewicz¹

¹ Zakład Patologii Ogólnej i Doświadczalnej AM w Warszawie

² Klinika Położnictwa i Ginekologii, II Wydział Lekarski AM w Warszawie

³ CMDiK PAN, Warszawa

Wstęp: Miejscowa hipoksja doprowadza do wzrostu stężenia czynników angiogennych, indukując geny dla naczyniowego śródbłonkowego czynnika wzrostowego (VEGF) i leptyny, oraz nasilając uwalnianie histaminy z komórek tłuszczowych.

Cel: Ocena wzrostu i zdolności do owulacji pęcherzyków jajnikowych w warunkach hipoksji, w zależności od zmian stężenia VEGF, leptyny i histaminy w płynie pęcherzykowym.

Materiał i Metody: Po mechanicznym wyizolowaniu pęcherzyków preantralnych (100-120 μm średnicy; N = 120) z jajników niedojrzałych (8-dniowych) myszy szczepu BALB/CanNCrIcmd prowadzono pojedynczo przez 6 dni hodowlę in vitro przy 5% O₂ na pożywce zawierającej αMEM i 5% surowicę myszą. Codziennie oceniano rozmiary pęcherzyków, a w 5 dniu pobierano

płyn pęcherzykowy i oznaczano metodą radioimmunologiczną stężenia VEGF, leptyny i histaminy. W tym samym dniu, podgrupa pęcherzyków poddawana była stymulacji za pomocą FSH i w 6 dniu określano wskaźnik owulacji. W grupie kontrolnej utrzymywano normoksję (20% O₂).

Wyniki: Stwierdzono, że utrzymanie zdolności do wzrostu w warunkach hipoksji wiązało się z istotnym ($p < 0,05$) podwyższeniem stężenia VEGF, leptyny i histaminy w płynie pęcherzykowym. Wskaźnik owulacji wynosił w tej populacji pęcherzyków 31%. W grupie kontrolnej, we wzrastających w warunkach normoksji pęcherzykach nie wykryto podwyższonych stężeń VEGF, leptyny i histaminy, ale obserwowany wskaźnik owulacji był podobny (33%).

Wnioski: Wyniki wskazują, że wzrost stężenia czynników angiogennych w płynie pęcherzykowym może być przejawem skutecznie działającego mechanizmu kompensacyjnego, zabezpieczającego pęcherzyki jajnikowe przed niedotlenieniem.

PRESERVATION OF ABILITY FOR OVULATION IN HYPOXIC CONDITIONS AND ANGIOGENIC FACTORS CONCENTRATIONS IN FOLLICULAR FLUID – AN IN VITRO STUDY

Dariusz Szukiewicz, Danuta Maślińska, Jakub Klimkiewicz¹

¹ Department of General and Experimental Pathology, Medical University, Warsaw

² Department of Obstetrics and Gynecology, 2nd Faculty of Medicine, Medical University, Warsaw

³ Polish Academy Sciences, Medical Research Center, Warsaw

Introduction: Local hypoxia leads to increase in angiogenic factors concentrations, inducing genes coding vascular endothelial growth factor (VEGF) and leptin, as well as enhancing histamine release from mast cells.

Aim of the study: To examine growth and ability for ovulation of ovarian follicles in hypoxia, in relation to the changes in follicular fluid (FF) concentrations of VEGF, leptin and histamine.

Material and Methods: Preantral follicles (100-120 μm in diameter; N = 120) were mechanically isolated from the ovaries of immature (8-day-old) BALB/CanNCrICmd mice and cultured individually for 6 days under 5% O₂ in Minimal Essential Medium alpha, containing 5% mouse serum. Follicular growth was examined daily, and on day 5th, FF was collected and VEGF, leptin and histamine concentrations were measured by radioimmunoassay. On the same day, subgroup of follicles were FSH-stimulated and on the day 6th, the ovulation rate was estimated. The control culture was kept under normoxia (20% O₂).

Results: We found, that maintenance of follicular growth during hypoxia was associated with significantly ($p < 0,05$) increased levels of VEGF, leptin and histamine in FF. A 31% ovulation rate was found in such population of the follicles. In control culture, normally growing follicles did not showed increased levels of VEGF, leptin and histamine, but observed ovulation rate was similar (33%).

Conclusions: The results indicate, that increase in angiogenic factors concentration in FF may be involved in compensatory mechanism, protecting follicles against hypoxia.

96

WPLYW GENISTEINY, RESVERATROLU I 8-PRENYLNARINGENINY NA PRODUKCJĘ INTERFERONU-g ORAZ INTERLEUKINY-10 PRZEZ AKTYWOWANE IN VITRO SPLENOCYTY MYSIE

Dominik Rachoń^{1,2}, Guillermo Rimoldi², Wolfgang Wuttke²

¹ Zakład Immunologii, Akademia Medyczna w Gdańsku, ul. Dębinki 1, 80 210 Gdańsk

² Zakład Endokrynologii Klinicznej i Doświadczalnej, Uniwersytet w Getyndze, Robert-Koch Strasse 40, 37-075 Getynga, Niemcy

Wstęp: Fitoestrogeny stanowią grupę biologicznie aktywnych związków pochodzenia roślinnego, których przestrzenna struktura chemiczna zbliżona jest do 17β-estradolu (E2). Ponieważ receptory estrogenowe obecne są także na komórkach układu immunologicznego, fitoestrogeny mogą mieć także duży wpływ na odporność. Komórki T-pomocnicze (Th) odgrywają dużą rolę w utrzymaniu prawidłowej homeostazy układu odpornościowego. Komórki Th1, poprzez produkcję określonych cytokin prozapalnych (np. TNF, IL-2, IFNγ, IL-12) pobudzają rozwój nieswoistej i swoistej odpowiedzi komórkowej. Z kolei komórki Th2 poprzez produkcję określonych cytokin o działaniu przeciwzapalnym (np. IL-4, IL-5, IL-10) pobudzają produkcję immunoglobulin i rozwój nabytej odpowiedzi humoralnej. Zaburzenie równowagi Th1/Th2 ma duży wpływ na rozwój i przebieg różnych chorób zakaźnych, alergicznych oraz autoimmunizacyjnych jak również nowotworowych.

Celem naszej pracy była ocena wpływu genisteiny, resweratrolu oraz 8-prenylaringeniny (8-PN) na równowagę Th1/Th2 poprzez zbadanie ich wpływu na produkcję interferonu-g (IFNγ) oraz interleukiny-10 (IL-10) – cytokin reprezentujących odpowiednio subpopulacje Th1 i Th2, przez stymulowane splenocyty mysie.

Materiał i metody: Po wyizolowaniu splenocytów ze śledzion sześciu myszy C-57, komórki hodowano na 48-dobkowych płytkach i stymulowano PMA (12-miristate 13-acetate) (5ng/ml) oraz ionomycyną (50ng/ml) w obecności różnych stężeń (10⁻⁸ – 10⁻⁶M) badanych fitoestrogenów lub E2. Po 36 godzinnej inkubacji zbierano nadszczę, w których następnie metodą immunoenzymatyczną (Bio-source, Belgium) oznaczano poziomy IFNγ oraz IL-10.

Wyniki: Genisteina w stężeniach 10⁻⁶M i 10⁻⁷M oraz resweratrol w stężeniach 10⁻⁶M znacząco zmniejszyły stosunek IFNγ/IL-10. Efekt ten był porównywalny do działania E2 w stężeniu 10⁻⁷M. 8-PN nie wykazywała wpływu na stosunek IFNγ/IL-10.

Wnioski: Wyniki naszych badań sugerują, iż podobnie jak E2, fitoestrogeny posiadają także właściwości immunomodulacyjne.

IN VITRO EFFECTS OF GENISTEIN, RESVERATROL AND 8-PRENYLNARINGENIN ON THE PRODUCTION OF INTERFERON-G AND INTERLEUKIN-10 BY ACTIVATED MURINE SPLENOCYTES

Dominik Rachoń^{1,2}, Guillermo Rimoldi², Wolfgang Wuttke²

¹ Department of Immunology, Medical University of Gdańsk, ul. Dębinki 1, 80-210 Gdańsk, Poland

² Department of Clinical and Experimental Endocrinology, University of Göttingen, Robert-Koch-Strasse 40, 37-075 Göttingen, Germany

Introduction: Phytoestrogens are a group of biologically active plant derived substances with a chemical structure that is similar to that of 17 β -oestradiol (E2). As the presence of oestrogen receptors has been identified in several immune cells, phytoestrogens may also have a great impact on immunity. T-helper (Th) cells are important for the homeostasis of the immune system. Th1 lymphocytes, by producing a certain panel of proinflammatory cytokines (i.e. TNF, IL-2, IFN γ , IL-12) stimulate the innate and acquired cellular response. In contrast, Th2 cells produce anti-inflammatory cytokines (i.e. IL-4, IL-5, IL-10) which enhance the production of immunoglobulins, thus stimulating the development of acquired humoral response. An imbalance in the relative numbers or/and activity of these Th cell subpopulations may affect the state and progression of several diseases, including infectious, allergic and auto-immune disorders, but also cancer.

The aim of our study was to determine the effects of phytoestrogens on the Th1/Th2 balance by studying the *in vitro* effects of: genistein, resveratrol and 8-prenylnaringenin (8-PN), on the production of interferon- γ (IFN γ) and interleukin-10 (IL-10) - representing Th1 and Th2 type response respectively, by stimulated murine splenocytes.

Materials and methods: After isolation of murine splenocytes from six spleens of C-57 mice, cells were cultured on 48 well plastic plates and stimulated with 12-miristate 13-acetate (PMA) (5ng/ml) and ionomycin (50ng/ml) in the presence of different concentrations (10⁻⁸ – 10⁻⁶M) of the studied substances or E2. After 36h of incubation the supernatants were collected and the levels of IFN γ and IL-10 were measured using immunoenzymatic assay (Biosource, Belgium). The IFN γ /IL-10 ratio was estimated as an index of the Th1/Th2 profile.

Results: Genistein at the concentrations of 10⁻⁶M and 10⁻⁷M and resveratrol at the concentrations of 10⁻⁶M decreased significantly the IFN γ /IL-10 ratio. This decrease was comparable to that of E2 at the concentrations of 10⁻⁷M. 8-PN had no effect on the IFN γ /IL-10 ratio.

Conclusions: Our results clearly show that phytoestrogens may possess several immunomodulatory effects some of which resemble those of E2.

97

WPŁYW VIP I PACAP 38 NA WYDZIELANIE PROGESTERONU (PROG) I ALDOSTERONU (ALDO) U SZCZURZYC PO OWARIEKTOMII (OVX) ORAZ U SAMCÓW SZCZURÓW PO ODWODNIENIU

Wasilewska-Dziubińska Elżbieta, Wolińska-Witort Ewa, Martyńska Lidia, Chmielowska Magdalena, Bik Wojciech, Tadeusiak Wiesław* i Baranowska Bogusława.

Zakład Neuroendokrynologii Klinicznej CMKP Warszawa
Klinika Anestezjologii i Intensywnej Terapii CMKP Warszawa

Naczynioruchowy peptyd jelitowy (VIP) odgrywa istotną rolę w utrzymaniu homeostazy sodowej. Progesteron działa przeciwstawnie do mineralokortykoidów poprzez wpływ na cewki nerkowe prowadząc do zwiększonego wydalania sodu z moczem. W naszych wcześniejszych badaniach wykonanych na OVX samicach i samcach szczurów stwierdziliśmy, wzrost poziomu PROG po dożylnym podaniu VIP a efekt ten nie występował po podaniu PACAP 38 szczurzycom OVX.

Cel. Celem pracy była ocena wpływu VIP i PACAP 38 na wydzielanie PROG i ALDO u owariektomizowanych (OVX) szczurzy i samców szczurów w warunkach odwodnienia.

Materiał. Eksperymenty przeprowadzono na OVX szczurzych i samcach szczurach w warunkach kontrolnych i po 24 godz. odstawienia wody pitnej (odwodnienie hiperosmotyczne). Poszczególne grupy zwierząt otrzymywały dożylnie 0.9% NaCl, VIP, PACAP 38. W surowicy oznaczano stężenie PROG, ALDO sodu, potasu i osmolalność.

Wyniki. W grupach zwierząt odwodnionych w stosunku do grup kontrolnych stwierdzono wzrost osmolalności i stężenie sodu w surowicy przy braku zmian w stężeniach potasu. Stężenie PROG i ALDO było wyższe w grupach szczurzy OVX i szczurów samców po odwodnieniu. U obu płci podanie VIP spowodowało wzrost stężenia ALDO i brak zmian w stężeniu PROG. Podanie PACAP 38 w tym modelu doświadczalnym nie powodowało zmian wydzielania ALDO i PROG.

Wnioski. Wydzielanie PROG i ALDO u odwodnionych i OVX szczurzy i szczurów samców jest zależne od stężenia sodu w surowicy. U odwodnionych zwierząt tylko VIP stymulował wydzielanie ALDO.

THE EFFECTS OF VIP AND PACAP 38 ON PROGESTERONE (PROG) AND ALDOSTERONE (ALDO) RELEASE IN DEHYDRATED OVARIECTOMIZED (OVX) RATS AND MALE RATS

Wasilewska-Dziubińska Elżbieta, Wolińska-Witort Ewa, Martyńska Lidia, Chmielowska Magdalena, Bik Wojciech, Tadeusiak Wiesław* and Baranowska Bogusława.

Department of Clinical Neuroendocrinology Medical Centre of Postgraduate Education, Warsaw, Poland
* Department of Anaesthesiology and Critical Care Medicine of Medical Centre of Postgraduate Education, Warsaw, Poland

Introduction. Neuropeptide VIP appears to participate in sodium homeostasis. It is known that PROG antagonized mineralocorticoid action at the renal tubular level leading to natriuresis. In our earlier experiments performed on OVX rats and male rats we observed that in response to iv administration of VIP serum PROG level was increased but it was unaffected by PACAP 38 in OVX rats.

The aim of this study was to estimate the influence of VIP and PACAP 38 on PROG and ALDO secretion in dehydrated OVX rats and male rats.

Material and Methods. The experiments were performed on euhydrated and water deprived (hyperosmotic hypovolemia) OVX rats and male rats in which 0,9 % NaCl, VIP and PACAP 38 were injected iv. Serum concentrations of PROG, ALDO, sodium, potassium and osmolality were determined.

Results. An increase of serum osmolality and sodium concentration without changes in potassium concentration was observed after 24h water deprivation in comparison with control conditions. Serum PROG and ALDO concentrations were increased in dehydrated OVX rats and male rats. In all water deprived rats after VIP administration the increased of ALDO was observed without change of PROG concentration. In the same experimental conditions PACAP 38 administration did not influenced PROG and ALDO release.

Conclusions. The release of PROG and ALDO in OVX rats and male rats is dependent on serum sodium concentration. In dehydrated rats VIP but not PACAP 38 stimulated ALDO secretion.

98

KALCYLITYK NPS 2143 MA DZIAŁANIE HIPERTENSYJNE U SZCZURÓW

Artur Lehmann¹, Konrad Boblewski¹, Anna Jurska¹, Czesława Orlewska², Henryk Foks², Apolonia Rybczyńska¹

¹ Samodzielna Pracownia Patofizjologii, Akademia Medyczna, Gdańsk

² Katedra i Zakład Chemii Organicznej, Akademia Medyczna, Gdańsk

Cel pracy: ocenić czy podanie zsyntetyzowanego kalcylicytki NPS 2143 spowoduje wzrost A/. sekrecji parathormonu (PTH), stężenia wapnia zjonizowanego w osoczu, wydalania fosforanów z moczem, oraz B/. średniego ciśnienia tętniczego (MAP), u szczurów normotensyjnych.

Materiał i metody: samce szczurów Wistar zostały znieczulone Thiopentalem i otrzymały infuzję dożylną soli fizjologicznej z dodatkiem 3H inuliny w celu pomiaru filtracji kłębowej (GFR). W czasie 0 eksperymentu, NPS 2143 został podany w dawce jednorazowej 1 mg/kg c.c. (n=10). Grupa kontrolna szczurów otrzymała tylko vehiculum (n=8). MAP było monitorowane w tętnicy szyjnej. Zbiórki moczu pobierano poprzez dren umieszczony w pęcherzu moczowym.

Wyniki: podanie NPS 2143 zwiększyło istotnie stężenie wapnia zjonizowanego w osoczu z 1.25 do 1.37 oraz 1,38 mmol/l, frakcyjne wydalanie fosforanów z 1,1 do 28,3 oraz do 25,7%, odpowiednio, w 30 oraz 60 min. eksperymentu. W grupie kontrolnej nie obserwowano, w

czasie eksperymentu, istotnych zmian stężenia wapnia w osoczu oraz wydalania wapnia z moczem. Podanie NPS 2143 wywołało wzrost stężenia PTH w osoczu szczurów. Ponadto, NPS 2143 wywołał wzrost MAP z 113 do 122 and 121 mmHg w czasie 30 oraz 60 min. eksperymentu. W grupie kontrolnej, w tym samym czasie, obserwowano spadek MAP z 123 do 121 i 115 mmHg.

Wnioski: wyniki naszych doświadczeń wskazują, że a) NPS 2143 spełnia kryteria aktywności typowe dla kalcylicytów, szacowane przez wzrost sekrecji PTH, wzrost Ca²⁺ osocza jak również FEPi, oraz b) istnieje możliwość, że podanie NPS 2143 zwiększa sekrecję przytarczycznego czynnika hipertensyjnego, oszacowanego poprzez wzrost MAP u szczurów normotensyjnych.

Słowa kluczowe: przytarczycy, parathormon, czynnik hipertensyjny przytarczyc, nadciśnienie

CALCILYTIC NPS 2143 INDUCES HYPERTENSIVE EFFECT IN RATS

Artur Lehmann¹, Konrad Boblewski¹, Anna Jurska¹, Czesława Orlewska², Henryk Foks², Apolonia Rybczyńska¹

¹ Laboratory of Pathophysiology, Medical University of Gdańsk

² Department of Organic Chemistry, Medical University of Gdańsk

Aim of the study was to test if synthesized calcilytic NPS 2143 administration results in increase of A/. parathyroid hormone (PTH) secretion, plasma calcium concentration, urinary phosphate excretion, and B/. mean arterial blood pressure (MAP), in normotensive rats.

Material and methods: male Wistar rats were anaesthetized with Thiopental and infused i.v. with saline supplemented with 3H inulin for GFR determination. At the time 0 of experiment, NPS 2143, 1 mg/kg b.w. was administered i.v. as a bolus (n=10). Control group of rats received vehicle only (n=8). MAP was monitored in carotid artery. Urine was collected from cannulated urinary bladder.

Results: NPS 2143 administration increased significantly plasma calcium concentration from 1.25 to 1.37 and 1.38 mmol/l, fractional phosphate excretion from 11.1 to 28.3 and 25.7 % at 30 and 60 min. of experiment, respectively. In control group there were no significant changes in plasma calcium and phosphate excretion during experiment. NPS 2143 application resulted in elevation of plasma PTH concentration in rats. Moreover, NPS 2143 induced increase of MAP from 113 to 122 and 121 mmHg after 30 and 60 min. of experiment. In control group the decrease of MAP from 123 to 121 and 115 mmHg in the same period of time was observed.

Conclusions: our study indicated that a) NPS 2143 fulfills the criteria of calcilytic activity, estimated by elevated PTH secretion and increase of plasma Ca²⁺ and FEPi, and b) there is the possibility that administration of NPS 2143 induced secretion of parathyroid hypertensive factor, estimated by increased of MAP in normotensive rats.

Key words: parathyroids, parathyroid hormone, parathyroid hypertensive factor, hypertension