



SESJA 1

Molekularna analiza utraty heterozygotyczności (LOH) w *locus* 3p24.3 (gen *c-erbAβ*) w raku brodawkowatym gruczołu tarczowego

Ewa Brzezińska, Dorota Pastuszek-Lewandoska, Anna Cyniak-Magierska, Andrzej Lewiński

Klinika Endokrynologii i Terapii Izotopowej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Gen *c-erbAβ* (*TRβ*) u ludzi zmapowano w chromosomie 3 w *locus* 3p24.3. Ostatnio sugeruje się, że jego produkty mogą działać jako supresory genów poprzez hamowanie proliferacji i wzmacnianie różnicowania komórek. Dzięki zastosowaniu polimorficznych markerów sprzężonych w okolicy *locus* dla genu *c-erbAβ* zaobserwowano występowanie delecji w ramieniu krótkim chromosomu 3 (LOH 3p) w wielu typach nowotworów: jelita grubego, płuca (LOH 3p14-21), nerki, pęcherza moczowego (LOH 3p21-24), sutka (LOH 3p24-26), jajnika i jądra (LOH 3p21-25). Znaczenie zmian tego regionu (LOH 3p21-26) w nowotworach tarczycy (gruczolaku pęcherzykowym, raku pęcherzykowym, raku brodawkowatym) nie jest do końca poznane.

Celem pracy była identyfikacja utraty heterozygotyczności (LOH) w polimorficznym regionie genu *c-erbAβ* (3p24.3) w raku brodawkowatym tarczycy.

Metodyka: Materiał do badań, uzyskany podczas zabiegu tyroidektomii całkowitej, stanowiły tkanki (50-100 mg), pobrane od pacjentów z Kliniki Chirurgii Instytutu Onkologii w Gliwicach oraz ze Szpitala Św. Rodziny w Łodzi. Z zamrożonego w temp. -70°C materiału pooperacyjnego, wyizolowano DNA (Genomic Midi AX Kit, A&A BIOTECHNOLOGY), a następnie przeprowadzono reakcję PCR ze starterami obejmującymi flankujące sekwencje polimorficznego *locus* 3p24, oraz analizę PCR-RFLP z wykorzystaniem dwóch markerów RFLP (marker: MspI i HindIII).

Analizie poddano 22 próbki (15 kobiet i 7 mężczyzn), w tym: 13 raków brodawkowatych (typ pęcherzykowy), 8 raków brodawkowatych (typ klasyczny), 1 rak brodawkowaty (typ wysokokomórkowy). Dla wszystkich badanych próbek przeprowadzono analizę par fragmentów pochodzących z ognisk nowotworowych i fragmentów z tkanki tarczycy makroskopowo niezmięnionej.

Wyniki: Zaobserwowano brak LOH w układzie heterozygotycznym lub homozygotycznym dla markera HindIII u 22 (96 %) z 23 badanych pacjentów oraz w przypadku jednego (1) pacjenta (ca papillare p. folliculare) stwierdzono utratę heterozygotyczności (LOH) w układzie heterozygotycznym dla markera HindIII. Nie zaobserwowano LOH u żadnego z badanych pacjentów dla markera MspI. Planuje się potwierdzenie występowania utraty heterozygotyczności w przypadku tego pacjenta poprzez bezpośrednie sekwencjonowanie DNA.

Badania innych autorów potwierdzają występowanie cytogenetycznych i molekularnych zmian w obrębie regionu 3p21-26 w przypadku wielu typów nowotworów, w tym nowotworów tarczycy. Ponieważ obserwuje się ogólną tendencję do wzrostu częstości występo-

wania LOH w tkance nowotworowej, przypuszcza się, że istnieją znaczne różnice w mechanizmach kontrolujących komórki nowotworowe w ich tendencji do zagubienia materiału genetycznego.

Molecular analysis of loss of heterozygosity (LOH) at 3p24.3 locus (*c-erbAβ* gene) in papillary thyroid carcinoma

Ewa Brzezińska, Dorota Pastuszek-Lewandoska, Anna Cyniak-Magierska, Andrzej Lewiński

Department of Endocrinology and Isotope Therapy, Medical University of Łódź

Human *c-erbAβ* (*TRβ*) gene was mapped to chromosome 3 at 3p24.3 locus. It has recently been suggested that its products can act as gene suppressors via inhibited proliferation and enhanced cell differentiation. Using polymorphic markers that are closely linked to *c-erbAβ* gene locus, deletion at short arm of chromosome 3 (LOH 3p) were observed in many types of carcinomas: colon carcinoma, small cell lung cancer (LOH 3p14-21), renal cell carcinoma, urinary bladder cancer (LOH 3p21-24), breast cancer (LOH 3p 24-26), ovary and testis carcinoma (LOH 3p21-25). However, the significance of the changes observed at that region (LOH 3p21-26) in thyroid tumors (follicular adenoma, follicular carcinoma, papillary carcinoma) is not yet clear.

Aim of the study: Identification of loss heterozygosity (LOH) at the polymorphic region of *c-erbAβ* gene (3p24.3) in papillary thyroid carcinoma.

Methods: Tumor tissue specimens (50-100 mg) were obtained from patients after total thyroidectomy at the Department of Surgery at the Center of Oncology in Gliwice and at the Holy Family Hospital in Łódź. Postoperative material was snap-frozen in dry ice and stored at -70°C. DNA was isolated (Genome Midi AX Kit, A&A BIOTECHNOLOGY) and then PCR reaction was carried out using primers encompassing flanking polymorphic sequences at 3p24 locus; two RFLP markers (MspI and Hind III) were used for PCR-RFLP analysis of 22 samples (15 women and 7 men), including 13 ca papillary v. follicular, 8 ca papillary v. classic, one ca papillary v. tall cell. All the samples were studied using tumor thyroid tissue and normal thyroid tissue.

Results: For the Hind III marker no LOH was observed in 22 (96%) out of 23 studied patients, either in heterozygous or in homozygous ones and one case of loss of heterozygosity (LOH) was revealed in a heterozygous patient with ca papillary v. follicular. For the Msp I marker, no LOH was found in any of the studied patients. Direct DNA sequencing is planned to confirm the revealed LOH in one patient.

Studies of other investigators confirm the presence of cytogenetic and molecular changes in the 3p21-26 region, observed in many carcinomas, including thyroid gland carcinoma. Since there is an overall tendency towards increased LOH rate in cancer tissue, it indicates that there are essential differences in the mechanisms of carcinoma cell growth control, affecting the tendency towards genetic material loss.

Ekspresja genu *RXRGAMMA (RXRG)* jest podwyższona zarówno w brodawkowatym jak i w rdzeniastym raku tarczycy

Małgorzata Wiench¹, Małgorzata Koligot¹, Jan Włoch², Agnieszka Czarniecka², Małgorzata Oczko¹, Michał Jarząb³, Joanna Hucz¹, Monika Gałęza-Kulig¹, Jolanta Krajewska¹, Barbara Jarząb¹

¹Zakład Medycyny Nuklearnej i Endokrynologii Onkologicznej,

²Klinika Chirurgii Onkologicznej,

³Zakład Biologii Nowotworów Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach

Receptory dla retinoidów tj. RXRA i RXRB pełnią dobrze poznana rolę w regulacji transkrypcji. Haugen i wsp. (2004) opisali ostatnio w raku brodawkowatym tarczycy (PTC) podwyższoną ekspresję innego genu należącego do tej rodziny – *RXRG*. Gen ten znajdował się również w grupie o najbardziej zmienionej ekspresji w przeprowadzonej przez nas analizie profilu ekspresji PTC i zdrowej tkanki tarczycy. W przedstawionej pracy porównane zostały wyniki analizy ekspresji genu *RXRG* w raku brodawkowatym i w raku rdzeniastym (MTC) tarczycy przeprowadzonej metodą mikromacierzy i Q-PCR. W przypadku raka brodawkowego tarczycy ekspresja ta została porównana z ekspresją markerów różnicowania charakterystycznych dla funkcji gromadzenia jodków przez komórki tarczycy (*NIS*, *PDS*, *AIT*).

Tkanki nowotworowe zostały pobrane od 56 pacjentów operowanych z powodu: PTC (38), MTC (14) i gruczolaka tarczycy (4). Od 42 z nich pobrano również niezmienną nowotworowo tkankę tarczycy. Całkowity RNA izolowano przy pomocy RNeasy Midi/Mini Kits (Qiagen), odwrotną transkrypcję przeprowadzano z zastosowaniem zestawu Omniscript (Qiagen). Q-PCR wykonywano w systemie Taqman- ABIPRISM 7700. Krzywą standardową przygotowano na podstawie RNA wyizolowanego z tkanki woła nadczynnego. We wszystkich przypadkach wyniki były normalizowane względem kontroli endogennej *GUS*. Profil ekspresji genów analizowano na mikromacierzach HG-U133A (Affymetrix).

Uzyskano bardzo dobrą korelację wyników otrzymanych obiema metodami (współczynnik korelacji 0.9). Ekspresja genu *RXRG* była w znacznym stopniu podwyższona w rakach brodawkowatych tarczycy w porównaniu z tkanką zdrową tego gruczołu (20x w metodzie Q-PCR i 11x przy zastosowaniu mikromacierzy DNA). Była ona podwyższona również w raku rdzeniastym tarczycy (9x w metodzie Q-PCR). Nie zaobserwowano żadnych zmian w ekspresji genu *RXRG* w zmianach łagodnych. Ekspresja znanych tarczycowo-swoistych genów była obniżona w analizowanych rakach brodawkowatych tarczycy: ekspresja genu *NIS* wynosiła około 10%, genu *PDS* – około 25% i genu *AIT* – około 10% ich ekspresji w tkance zdrowej.

Uzyskane wyniki wskazują na to, iż gen *RXRG* nie jest aktywny w prawidłowo funkcjonującej komórce pęcherzykowej. Jego ekspresja wzrasta natomiast znacznie w nowotworach złośliwych, nie tylko w raku brodawkowatym, ale także w raku rdzeniastym tarczycy. Badanie to nie wyjaśnia jednak, czy obserwowana nadekspresja genu *RXRG* jest związana bardziej ze zmienionymi nowotworowo komórkami tarczycy, czy raczej z komórkami podścieliska.

Projekt finansowany z grantów KBN 305B14622 oraz 040/P04/2001

RXRGAMMA (RXRG) gene expression is up-regulated both in papillary and medullary thyroid carcinoma

Małgorzata Wiench¹, Małgorzata Koligot¹, Jan Włoch², Agnieszka Czarniecka², Małgorzata Oczko¹, Michał Jarząb³, Joanna Hucz¹, Monika Gałęza-Kulig¹, Jolanta Krajewska¹, Barbara Jarząb¹

¹Department of Nuclear Medicine and Endocrine Oncology,

²Clinic of Oncological Surgery,

³Department of Tumor Biology, Center of Oncology – Maria Skłodowska-Curie Memorial Institute, Branch Gliwice

Retinoid receptors RXRA and RXRB are well known transcriptional regulators. Another member of this family - *RXRG* - has been recently reported to be significantly up-regulated in PTC (Haugen, 2004). In the present study we compare the results of *RXRG* expression analysis by Q-PCR and DNA microarray in both papillary (PTC) and medullary (MTC) thyroid cancer. In PTC, we relate its expression level to the thyroid-specific differentiation markers important for iodine uptake – *NIS*, *PDS* and *AIT*.

Tissue samples were collected from 56 patients: PTC (38), MTC (14) and adenoma (4) together with normal thyroid tissues from 42 of them. Total RNA was isolated using RNeasy Midi/Mini Kits (Qiagen) and reverse-transcribed with Omniscript (Qiagen). Q-PCR was performed by means of ABIPRISM 7700. Standard concentration curve was prepared from a single sample of hyperfunctioning goiter. In each case the results were normalized to the endogenous control (*GUS*). Expression profile was established using HG-U133A Affymetrix arrays.

The results of microarray data correlated very well with data obtained by Q-PCR (with correlation coefficient 0.9). The *RXRG* expression was highly elevated in PTC samples (20x by Q-PCR and 11x by microarrays). The *RXRG* was also up-regulated (9x by Q-PCR) in MTC samples in comparison to paired normal thyroids. We did not observe any changes in *RXRG* expression in benign lesions. The expression of known thyroid-specific genes was down-regulated in the analysed PTC cases: the expression of *NIS* approximated 10%, *PDS* 25% and *AIT* 10% of the expression in normal tissue.

Our results indicate that *RXRG* does not participate in the normal activity of thyroid follicular cell. Its expression arises distinctly in PTC but is not restricted to this cancer type and is observed in MTC as well. However, the study does not allow for differentiation whether *RXRG* up-regulation occurs in cancer cells or in tumor stroma.

The project was supported by Polish State Committee for Scientific Research, grants 305B14622 and 040/P04/2001.

Molekularna analiza częstości występowania rearanzacji genów *RET* i *NTRK1* w raku brodawkowatym tarczycy

Ewa Brzezińska, Dorota Pastuszek-Lewandoska, Andrzej Lewiński

Klinika Endokrynologii i Terapii Izotopowej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Rak brodawkowaty tarczycy (papillary thyroid carcinoma, PTC) stanowi przykład nowotworu, w którym często ujawniają się chimeryczne onkogeny. Badania molekularne wykazały, że w dobrze zróżnicowanym sporadycznym raku brodawkowatym tarczycy obecne są specyficzne, genetyczne zmiany typu rearanżacji RET/PTC (RET/papillary thyroid carcinoma) lub TRK-T (ang. transforming receptor kinase – thyroid oncogene). Wykazano, że są one wynikiem fuzji końca 3' domeny kinazy tyrozynowej błonowego białka receptorowego (odpowiednio RET i NTRK1) z sekwencjami 5' innych genów. W rezultacie obserwuje się w tkance sporadycznych raków brodawkowatych tarczycy powstawanie wewnątrzchromosomowych inwersji chromosomu 10 lub 1. Częstość występowania rearanżacji onkogenów *RET* i *NTRK1* w populacji polskiej nie jest dokładnie znana, choć zostały przeprowadzone badania mające na celu ocenę częstości występowania rearanżacji genu *RET* w populacji polskiej [Jarząb B, Włoch J, Wiench M; Folia Histochem. Cytobiol. 2001, 39 (2):26-28]. W danych literaturowych dotyczących badań innych populacji częstość ta waha się od 3%-84%.

Celem pracy była identyfikacja rodzajów rearanżacji chromosomowych RET/PTC i TRK-T oraz wstępna ocena częstości ich występowania w populacji polskiej.

Metodyka: Materiał do badań stanowiły tkanki pooperacyjne raków pierwotnych tarczycy (brodawkowatych, pęcherzykowych i anaplastycznych) pobrane od pacjentów podczas zabiegu tyroidektomii całkowitej. Całkowite RNA, który stanowił matrycę do syntezy cDNA, wyizolowano z 75 preparatów tkankowych (raki i tkanka niezmienniona makroskopowo) przy użyciu zestawu RNeasy Protect Midi Kit (QIAGEN). Stężenie RNA oznaczano metodą spektrofotometryczną. W celu wykrycia rearanżacji form genów *RET* i *NTRK1* zastosowano metodę opracowaną przez Klugbauera [Klugbauer S, Lengfelder E, Demidchik EP, Rabes HM; Oncogene, 1995, 21(12):2459-2467]: reakcję RT i multiplex PCR oraz metodę OneStep z wykorzystaniem zestawu OneStep RT-PCR Kit (firmy QIAGEN).

Wyniki: Przebadano 41 przypadków raków tarczycy, w tym: 1 rak pęcherzykowy i 34 raki brodawkowate oraz 6 raków rdzeniastych jako grupę kontrolną. Obecność zaktywowanych form genu *RET* stwierdzono w 7 (20%) badanych próbkach (PTC). Analiza różnicująca wykazała obecność rearanżacji typu: RET/PTC3 w 4 badanych próbkach, i formę RET/PTC1 w 3 przypadkach. Rearanżacje genu *RET* występowały częściej w typie pęcherzykowym raka brodawkowatego, przy czym rearanżacja typu RET/PTC3 występowała w grupie osób pomiędzy 26-60 rokiem życia, podczas gdy typ RET/PTC1 obserwowano u osób w przedziale wiekowym 56-67 lat. W przypadku analizy aktywacji onkogeny *NTRK1*, przeprowadzony PCR wykazał wystąpienie rearanżacji w przypadku 4 badanych próbek (PTC). Przeprowadzona reakcja różnicująca w kierunku rozpoznania określonego typu rearanżacji nie potwierdziła jednak wystąpienia form: TRK-T1, TRK-T2, TRK-T3 czy TRK (TPM3). Planuje się potwierdzenie wyników pozytywnych w reakcji bezpośredniego sekwencjonowania DNA.

Molecular analysis of the type and frequency of *RET* and *NTRK1* gene rearrangements in papillary thyroid carcinoma.

Ewa Brzezińska, Dorota Pastuszek-Lewandoska, Andrzej Lewiński

Department of Endocrinology and Isotope Therapy, Medical University of Łódź

Papillary thyroid carcinoma is an example of tumor with a frequent occurrence of chimeric oncogenic sequences. Molecular analysis of well-differentiated sporadic papillary thyroid carcinoma revealed the presence of specific genetic changes of RET/PTC (RET/papillary thyroid carcinoma) type rearrangements or TRK-T (transforming receptor kinase – thyroid oncogene) rearrangement. It was proved that all of them were derived from a fusion of 3' end domain of the membrane-associated tyrosine kinase receptor (*RET* and *NTRK1*, respectively) with the 5' end sequences derived from other genes. In result, internal chromosomal inversions of chromosome 10 or chromosome 1 are observed in papillary thyroid carcinoma. The frequency of rearrangements of *RET* and *NTRK1* oncogenes in the Polish population were in fact conducted [Jarząb B, Włoch J, Wiench M; Folia Histochem Cytobiol 2001, 39 (2): 26-28]. According to data from literature referring to other populations, this frequency is between 3% and 84%.

The aim of the study was an identification of the types of chromosomal RET/PTC and TRK-T rearrangements and initial estimation of their frequency in the Polish population.

Methods: Primary thyroid carcinoma (papillary, follicular and anaplastic) tissue specimens were obtained from patients after total thyroidectomy. Total RNA (a template for cDNA synthesis) was isolated from 75 tissue specimens (carcinomatous tissue and macroscopically normal tissue) with the use of a commercially prepared kit [RNeasy protect Midi Kit (QIAGEN)]. RNA concentrations were spectrophotometrically evaluated. In order to identify *RET* and *NTRK1* gene rearrangements, RT and multiplex PCR methods were used [Klugbauer S, Lengfelder E, Demidchik EP, Rabes HM; Oncogene, 1995, 21 (12): 2459-2467] as well One-Step RT-PCR (Onestep RT-PCR kit, QIAGEN).

Results: 41 thyroid carcinomas (1 follicular carcinoma, 34 papillary carcinoma) and 6 medullary thyroid carcinoma as a control group were studied. The activated forms of *RET* gene were detected in 7 (21%) of the examined tissues (PTC). A differentiating analysis showed the presence of RET/PTC3 rearrangements in 4 examined samples, and RET/PTC1 forms were observed in 3 cases. The rearrangements of *RET* gene occur more often in the follicular type of papillary thyroid carcinoma and RET/PTC3 type is more frequently found in groups of patients between 26-60 years, while the RET/PTC1 type in groups of 56-67 years old. The PCR analysis of activated forms of *NTRK1* oncogene showed rearrangements in 4 examined samples (PTC). A differentiating analysis which was supposed to recognize the type of rearrangements did not reveal any of TRK-T1, TRK-T2, TRK-T3 or TRK (TPM3) forms. Thus, direct sequencing is planned in order to confirm the obtained positive results.

Ocena ekspresji genu kodującego symporter sodowo-jodowy (NIS) w rakach tarczycy metodą RT-PCR

Milena Tosiek¹, Lech Pomorski², Ewa Balcerczak¹, Marek Mirowski¹, Wojciech Czyż²

¹ Pracownia Biologii Molekularnej Zakład Biochemii Farmaceutycznej UM w Łodzi

² Klinika Chirurgii Endokrynologicznej UM w Łodzi

Gen *NIS* zlokalizowany na chromosomie 19 koduje białko złożone z 643 aminokwasów. Białko to należy do rodziny białek błonowych tzw. zależnych od Na⁺ symporterów glukozowych. W prawidłowej tarczycy jest zlokalizowane w błonie podstawnej tyreocyty. Fizjologiczna rola białka *NIS* polega na współudziale w biosyntezie hormonów tarczycy, umożliwia bowiem nagromadzenie w znacznym stężeniu jonów I⁻ w tyreocycie. Z doniesień literaturowych wynika, że w nowotworach złośliwych tarczycy (głównie pęcherzykowych i brodawkowatych) ekspresja genu *NIS* może wpływać na skuteczność rutynowo stosowanej terapii jodem radioaktywnym.

Celem pracy było określenie ekspresji genu *NIS* w rakach tarczycy, a także poszukiwanie korelacji między ekspresją badanego genu a stopniem zaawansowania klinicznego nowotworu oraz odpowiedzią na zastosowaną radioterapię.

Materiał do badań stanowiły mrożone skrawki tkankowe pochodzące z raków tarczycy.

Metoda, którą wykorzystano do badań była oparta na reakcji odwrotnej transkrypcji (RT) wyizolowanego RNA, po której następowała reakcja PCR wykorzystująca startery swoiste dla genu *NIS*.

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że ekspresja genu *NIS* pojawia się w różnych typach histologicznych raków tarczycy, głównie rakach brodawkowatych. Nie stwierdzono istotnych statystycznie zależności pomiędzy obecnością ekspresji genu *NIS*, a stopniem zaawansowania klinicznego zbadanych nowotworów wg klasyfikacji TNM. Zaobserwowano jednak wyraźny trend do występowania ekspresji tego genu w rakach o wyższym stopniu zaawansowania klinicznego. Nie znaleziono istotnych statystycznie zależności pomiędzy ekspresją badanego genu a płcią i wiekiem pacjenta. Na bazie dotychczasowych wyników nie ustalono związku pomiędzy ekspresją genu *NIS* a jodochwytnością zbadanych przypadków. Ustalenie zależności między ekspresją badanego genu a skutecznością jodoterapii wymaga dalszych badań z wykorzystaniem metody ilościowej.

The RT-PCR evaluation of sodium-iodine symporter (NIS) gene expression in thyroid carcinomas

Milena Tosiek¹, Lech Pomorski², Ewa Balcerczak¹, Marek Mirowski¹, Wojciech Czyż²

¹ Molecular Biology Unit, Department of Pharmaceutical Biochemistry, Medical University, Łódź

² Endocrine Surgery Department, Medical University, Łódź

The *NIS* gene located on the 19 chromosome codes protein composed of 643 amino acids. The protein belongs to a group of membrane proteins, i.e. depending

on Na⁺ glucose symporters. In normal thyroid it is located in basilar membrane of a thyrocyte. Physiological role of the *NIS* protein consists of its contribution of thyroid hormones biosynthesis as it enables the accumulation of I ions in a marked concentration in a thyrocyte. As reported in available literature, *NIS* gene expression in malignant thyroid neoplasms (mainly in follicular and papillary types) may affect the efficacy of routinely applied radioactive iodine therapy.

The aim of the research was to determine *NIS* gene expression in thyroid cancers as well as to find a correlation between the expression of the studied gene with the clinical progression of a neoplasm and with a response to applied radiotherapy.

The material were frozen tissue sections from thyroid cancers. The method implemented in the study was based of the reverse transcription (RT) of isolated RNA, followed by PCR reaction which used *NIS* gene specific starters.

The obtained results allowed the statement that the *NIS* gene expression appears in histologically different thyroid cancers, mainly of a papillary type. No statistically significant correlation was found between the presence of *NIS* gene expression and a degree of the studied neoplasms clinical progression, according to the TNM classification. However, a distinct trend was observed for this gene expression to occur in clinically more advanced cancers. No statistically significant correlation was noted between studied gene expression and a patient's sex or age. Basing on the results compiled so far, no relationship has been determined between *NIS* gene expression and iodine uptake in the studied cases. Further research requires to be undertaken to determine a relationship between the studied gene expression and iodotherapy efficacy, using the quantitative method.

Ekspresja genu i białka pendryny w tkankach nowotworowych

Joanna Skubis-Zegadło¹, Anna Nikodemka¹, M. Mikula², Ireneusz Kozicki⁴, Anna Łyczkowska¹, Krzysztof Bardadin³, Ewa Przytuła³, Barbara Czarnocka¹

¹ Zakład Biochemii Klinicznej,

² Klinika Gastroenterologii CMKP, Centrum Onkologii Warszawa,

³ Zakład Patomorfologii,

⁴ Klinika Chirurgii Ogólnej Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego

Pendryna (780-aminokwasowe białko o 12 transmembranowych domenach) jest jednym z białek biorących udział w wewnątrztrzęczycowym metabolizmie jodu. Katalizuje ona transport I⁻ z wnętrza tyreocyty do światła koloidu, gdzie ma miejsce biosynteza hormonów tarczycy.

Celem niniejszej pracy było badanie ekspresji pendryny w zróżnicowanych rakach tarczycy: pęcherzykowym (FTC) i brodawkowatym (PTC), w porównaniu do tkanek prawidłowych, metodami immunologicznymi (swoiste przeciwciała anty-pendrynowe) oraz molekularnymi.

W immunohistochemii, w prawidłowej tkance tarczycy obserwowano szczytowe, heterogenne znakowanie pendryny. W grupie zróżnicowanych raków tarczycy pozytywną, wyłącznie cytoplazmatyczną reakcję

obserwowano w 73,3% (10) z 15 FTC i 76,7% (15) z 30 badanych PTC. Silną wewnątrzkomórkową reakcję obserwowano w 6 FTC i 19 PTC. Ogniskową reakcję stwierdzono w 1 pęcherzykowym i 3 rakach brodawkowatych, pozostałe 3 z 15 FTC oraz 4 z 30 PTC były negatywne dla pendryny.

Wyniki otrzymane metodą ilościowego RT-PCR (real-time PCR), potwierdziły obecność pendryny w tkankach nowotworowych. Ekspresję mRNA w nowotworach charakteryzowała duża różnorodność. Zakres ekspresji dla nowotworów wynosił 0,006-1,86, a dla tkanek prawidłowych od 0,03-8,00. Wartość średniej znormalizowanej ekspresji mRNA pendryny była około 5 razy niższa w tkankach nowotworowych (średnia: 0,43) niż tkanek prawidłowych (średnia: 2,01). Analiza średniej znormalizowanej ekspresji mRNA pendryny w nowotworach pozwoliła na wyróżnienie czterech grup: raki, które utraciły zdolność ekspresji pendryny, raki z niską, średnią i wysoką ekspresją pendryny.

Uzyskane wyniki wskazują, że większość zróżnicowanych raków tarczycy zachowało zdolność ekspresji genu i białka pendryny, jednak transformacja nowotworowa komórek tarczycy zaburza prawidłową lokalizację pendryny.

Pendrin gene and protein expression in neoplastic tissues

Joanna Skubis-Zegadło¹, Anna Nikodemka¹, M. Mikula², Ireneusz Kozicki⁴, Anna Łyczkowska¹, Krzysztof Bardadin³, Ewa Przytuła³, Barbara Czarnocka¹

¹ Clinical Biochemistry Department and

² Gastroenterology Department CMKP, Warsaw

³ Pathomorphology Department and

⁴ General Surgery Department, Oncology Centre, Warsaw

Pendrin (780-amino acid protein of 12 transmembrane domains) is one of the proteins participating in the intrathyroid iodine metabolism. It catalyzes the I transport from the inside of a thyrocyte to the colloid lumen where thyroid hormones biosynthesis takes place.

The aim of the present paper was to study pendrin expression in differentiated thyroid carcinomas: follicular (FTC) and papillary (PTC), as compared to normal tissues. The implemented methods were immunological (specific antipendrin antibodies) and molecular.

In immunohistochemistry in normal thyroid tissue apical heterogenic pendrin marking was observed. In the group of differentiated thyroid carcinomas a positive, exclusively cytoplasmatic reaction was noted in 73.3% (10) out of 15 FTC and 76.7% (15) out of 30 studied PTC. A strong intracellular reaction was observed in 6 FTC and 19 PTC. A focal reaction was noted in 1 follicular and in 3 papillary carcinomas, the remaining 3 out of 15 FTC as well as 4 out of 30 PTC were pendrin negative. The results obtained by quantitative RT-PCR (real-time PCR) confirmed pendrin presence in neoplastic tissue. mRNA expression in neoplasms was very much diversified. The expression range for neoplasms was 0.006-1.86, and for normal tissue 0.03-8.00. Mean normalized pendrin mRNA expression was about 5 times lower in neoplastic tissue (mean: 0.43) than in normal tissue (mean: 2.01). The analysis of an average normalized mRNA pendrin expression in neoplasms allowed the division into four

groups as follows: carcinomas which have lost the ability for pendrin expression, carcinomas with low, average, and high pendrin expression. The obtained results show the majority of differentiated thyroid carcinomas to have preserved the ability for gene and protein pendrin expression. However, neoplastic transformation of thyroid cells deviates normal pendrin localization.

Profil ekspresji genów w gruczolaku pęcherzykowym

Małgorzata Oczko¹, Małgorzata Wiench¹, Michał Jarzqb², Elżbieta Gubała¹, Ewa Chmielik³, Jan Włoch⁴, Agnieszka Czarniecka⁴, Barbara Jarzqb⁵

¹ Zakład Medycyny Nuklearnej i Endokrynologii Onkologicznej,

² Zakład Biologii Nowotworów,

³ Zakład Patologii Nowotworów,

⁴ Klinika Chirurgii Onkologicznej; Centrum Onkologii- Instytut, Oddział Gliwice

Celem pracy było określenie profilu ekspresji genów w gruczolaku pęcherzykowym tarczycy.

Materiał do badań stanowił całkowity RNA wyizolowany za pomocą RNeasy Total Midi i Mini Kit (Qiagen) z zamrożonych tkanek pooperacyjnych: 7 gruczolaków pęcherzykowych, 1 gruczolaka atypowego oraz 1 wola guzowatego. Następnie przeprowadzono syntezę cDNA oraz transkrypcję *in vitro* w celu uzyskania cRNA (BioArray High Yield RNA Transcript Labeling Kit, Enzo), który został pofragmentowany i poddany hybrydyzacji z mikromacierzami wysokiej gęstości Human Genome U133A (Affymetrix). Profile ekspresji uzyskano dla poszczególnych gruczolaków i wola z ekspresją genów dla tkanki prawidłowej tarczycy będącej mieszaniną z 13 różnych tkanek tarczycy (śródooperacyjnie pobierany fragment niezmięnionej makroskopowo tarczycy) oraz z 16 tkanek raka brodawkowatego tarczycy. Analiza została wykonana przy pomocy programu Affymetrix Microarray Suite 5.0 i Affymetrix Data Mining Tool oraz GeneSpring 6.0.

Wyniki: Porównanie profilu ekspresji poszczególnych gruczolakach oraz wola guzowate porównano z tkanką prawidłową wykazało jedynie 11 genów o podwyższonej ekspresji min. takie geny jak: Rho GtPase *RHOBTB3* i kinaza białkowa zależna od kalmoduliny *CAMK2B*. Wśród tych genów 4 biorą udział w transdukcji sygnału a 3 uczestniczą w fosforylacji i defosforylacji białek. Znacznie większa grupa genów (163) charakteryzowała się obniżonym poziomem ekspresji. Są to min. geny: prekursor kalcytoniny *CALCA*, gen dla dekoryny *DCN*, *SERPINB6*. Aż 54 geny z tej grupy biorą udział w transdukcji sygnału, natomiast 11 uczestniczy w regulacji transkrypcji i tyle samo w apoptozie, a 7 zaangażowanych jest w regulację cyklu komórkowego. Porównanie profilu zmian łagodnych z nienowotworową tarczycą oraz z rakiem brodawkowatym jednoznacznie klasyfikuje gruczolaki w jednej grupie z tkankami nienowotworowymi. Większość genów składająca się na profil ekspresji gruczolaka i wola różniła się od profilu raka brodawkowatego. Jedynie geny apolipoproteina *DAPOD* i dermatopontyna *DPT* charakteryzowały się obniżoną ekspresją zarówno w gruczolakach jak i w raku brodawkowatym.

Wniosek: Przy porównaniu z tkankami niezmięzionymi makroskopowo i tkankami raka brodawkowatego,

profil ekspresji genów gruczolaków pęcherzykowych jest znacznie bliższy niezmięnionej makroskopowo tkance tarczycy niż profilowi raka brodawkowatego.

Projekt finansowany z grantu KBN 040/PO4/2001

Gene expression profile of follicular thyroid adenoma (FTA)

Małgorzata Oczko¹, Małgorzata Wiench¹,
Michał Jarzqb², Elżbieta Gubała¹, Ewa Chmielik³,
Jan Włoch⁴, Agnieszka Czarniecka⁴, Barbara Jarzqb⁵

¹ Department of Nuclear Medicine and Endocrine Oncology,

², ³ Department of Tumor Biology,

⁴ Department of Oncological Surgery; Center of Oncology, MSC Memorial Institute, Gliwice Branch

The aim of the study was to characterize the molecular expression profiles of follicular thyroid adenomas (FTA).

8 follicular adenomas, 1 atypical adenoma and 1 nodular goitre samples taken intraoperatively were investigated by oligonucleotide HG-U133A microarray. Total RNA was isolated using RNeasy Total RNA Midi and Mini Kit. An *in vitro* transcription reaction of the cDNA was performed (BioArray High Yield RNA Transcript Labeling Kit, Enzo), cRNA was fragmented, hybridized and stained with streptavidin-phycoerythrin conjugate. Absolute and comparison analyses of gene expression were performed using the Affymetrix GeneChip Analysis Suite 5.0, Data Mining Tool (Affymetrix) and GeneSpring 6.1 software. Gene expression profiles of adenomas were compared to the expression in the reference tissue (a mixture of 13 normal -- macroscopically unchanged -- fragments of thyroid tissue), as well as to 16 samples of papillary thyroid carcinoma.

The comparison of gene expression pattern of individual benign thyroid nodules with normal thyroid tissue demonstrated that only 11 genes were overexpressed in all samples studied. In this group, four genes were involved in signal transduction and 3 took part in protein phosphorylation/dephosphorylation. Among these genes were Rho GTPase *RHOBTB3* and calmodulin dependent protein kinase *CAMK2B* genes. However, distinctly more genes (163 transcripts) were under-expressed, among them calcitonin precursor *CALCA*, decorin gene *DCN* and *SERPINB6*. There were 54 genes involved in signal transduction, 11 in the regulation of transcription and apoptosis and 7 in cell cycle regulation. When the expression profile of benign lesions were compared to normal tissue and tumor samples, adenomas were unequivocally classified together with normal tissues and tumors, while the tumors group was distinctly different. Majority of genes characteristic for expression pattern of adenomas were not so prominent in carcinomas. However, Apolipoprotein D gene *APOD* and extracellular matrix gene dermatopontin *DPT* were downregulated in both types of tissues.

Our results indicate that the gene expression profiles of benign thyroid lesions are similar to the normal thyroid tissue rather than to expression profiles of papillary thyroid cancer.

The project was supported by Polish State Committee for Scientific Research, grant 040/PO4/2001

SESJA 2

Współdziałanie genu *DRB1*03* z *CTLA-4* i genami *TNF* w predyspozycji genetycznej do choroby Gravesa-Basedowa

Dorota Kula¹, Beata Jurecka-Lubieniecka¹,
Kornelia Hasse-Lazar¹, Tomasz Stęchły¹,
Aleksandra Krawczyk¹, Sylwia Szpak¹,
Michał Jarzqb², Katarzyna Steinhof-Radwańska³,
Małgorzata Kowalska¹, Agnieszka Pawlaczek¹,
Beata Hejduk³, Elżbieta Gubała¹

¹ Zakład Medycyny Nuklearnej i Endokrynologii Onkologicznej,

² Zakład Biologii Nowotworów,

³ Zakład Radiodiagnostyki, Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej

Predyspozycja genetyczna ma duże znaczenie w rozwoju choroby Gravesa-Basedowa, ze szczególnym znaczeniem genów układu HLA (przede wszystkim *DRB1*03*) oraz *CTLA-4*. Udział genów *TNF* (*TNF* - czynnika martwicy nowotworów i *LTA* - limfotoksyny A) znajdujących się na chromosomie 6, pomiędzy genami układu HLA, jest kwestionowany.

Celem pracy była ocena współdziałania allelu *DRB1*03* z genami *CTLA-4* i *TNF* w predyspozycji genetycznej do choroby Gravesa-Basedowa.

Polimorfizm genu *CTLA-4* (pozycja 49) i genów *TNF* (pozycja 308 *TNF* i 252 *LTA*) oznaczono u 222 pacjentów z chorobą GB i 208 osób zdrowych, u których nie stwierdzono choroby tarczycy, z ujemnym wywiadem rodzinnym u krewnych pierwszego stopnia i prawidłowym obrazem USG tarczycy (u kobiet po 30 roku życia). Oznaczenie antygenów HLA wykonano u 94 osób chorych na chorobę Gravesa-Basedowa i u 86 osób zdrowych.

Polimorfizm *TNF* i *CTLA-4* oznaczono techniką PCR/RFLP. Oznaczenie antygenów HLA-*DRB1* wykonano w oparciu o metodykę PCR-SSO i PCR-SSP.

Rozkład genotypowy allelu *DRB1*03* w grupie osób chorych i zdrowych różnił się znamienne (p=0,007), wartość OR była znamienne podwyższona i wynosiła 2,84. Dla genu *CTLA-4*, *TNF* i *LTA* zaobserwowano znamienne różnice w rozkładzie genotypów pomiędzy grupą osób z chorobą GB i grupą kontrolną oraz podwyższone wartości OR (odpowiednio: 2,27; 2,52; 1,75).

Współwystępowanie *DRB1*03* i rzadkiego allelu *CTLA-4* G zwiększało wartość OR do 4,04 (95% CI: 1,84-8,86), liczoną w stosunku do pozostałych genotypów. Największą wartość OR=6,98 (95% CI: 2,55-19,08) zaobserwowano, gdy antygen *DRB1*03* współwystępował równocześnie z rzadkimi allelami *TNF-2*, *LTA*1* i *CTLA-4* G; częstość tego genotypu wynosiła 30,1% u osób z chorobą Gravesa-Basedowa.

Wnioski: Zaobserwowano znamienne związki *DRB1*03* oraz genów *CTLA-4*, *TNF*, *LTA* z chorobą GB. Współwystępowanie antygeny *DRB1*03* z rzadkimi allelami genów *TNF*, *LTA* i *CTLA-4* zwiększa ryzyko zachorowania na chorobę Gravesa-Basedowa, co świadczy o niezależnym udziale genu *CTLA-4* i sugeruje również pewien niezależny wpływ genów *TNF*.

Praca finansowana przez grant KBN 3/PO5 D 148/22

Interaction of HLA II class DRB1*03 allele with CTLA-4 and TNF genes in predisposition to Graves disease

Dorota Kula¹, Beata Jurecka-Lubieniecka¹, Kornelia Hasse-Lazar¹, Tomasz Stęchły¹, Aleksandra Krawczyk¹, Sylwia Szpak¹, Michał Jarzab², Katarzyna Steinhof-Radwańska³, Małgorzata Kowalska¹, Agnieszka Pawlaczek¹, Beata Hejduk³, Elżbieta Gubata¹

¹ Department of Nuclear Medicine and Endocrine Oncology,

² Department of Tumor Biology,

³ Department of Radiology, Center of Oncology, Maria Skłodowska-Curie Memorial Institute

Known genes responsible for the genetic predisposition to Graves disease (GD) are some HLA II class genes (especially DRB1*03) and CTLA-4. The participation of TNF genes: TNF (tumor necrosis factor) and LTA (lymphotoxin A) located on the 6 chromosome among HLA genes, is questionable. The purpose of the study was to estimate interactions between simultaneous occurrence of CTLA-4 and DRB1*03, TNF and LTA alleles in respect to their association with GD.

222 patients with GD (diagnosed by hyperthyroidism and TRAb level and/or orbitopathy) were genotyped for CTLA-4 (49), TNF (308), LTA (252) polymorphism by PCR/RFLP and 94 of them were also genotyped for DRB1*03 by PCR-SSO and PCR-SSP. Control group included 208 healthy persons without history of thyroid disease, with normal thyroid sonography (done only in women over 30 years old) and with negative familial anamnesis in first-degree relatives. Among them 86 persons were genotyped for DRB1*03.

Significant differences were observed in genotypes distribution for all genes studies with respective OR values 2.84; 2.27; 2.52; 1.75 for DRB1*03; CTLA-4; TNF and LTA, respectively. The simultaneous presence of DRB1*03 and rare CTLA-4 (G) allele increased the OR values to 4.04 (95% CI: 1.84-8.86) as compared to the other genotypes. The highest OR=6.98 (95% CI: 2.55-19.08) value was noticed for simultaneous presence of DRB1*03, CTLA-4 (G), TNF-2, LTA*1 and was observed in 30.1% of GD patients.

The obtained results indicate a positive interaction between DRB1*03, CTLA-4 and TNF genes in predisposition to Graves disease in Polish population and suggest an additional positive influence of TNF genes, besides their linkage to DRB1*03.

The project was supported by Polish State Committee for Scientific Research, 3/ PO5 D 148/22

Delecja pojedynczego nukleotydu (del1711G) w eksonie 2 genu TBG przyczyną rodzinnie występującego całkowitego defektu TBG

Katarzyna Łacka¹, Agnieszka Ogrodowicz², Teresa Niżankowska³, Izabela Korczowska²

¹ Katedra Endokrynologii, Przemiany Materii i Chorób Wewnętrznych AM im. K. Marcinkowskiego, Poznań

² Klinika Reumatologii i Immunologii Klinicznej AM im. K. Marcinkowskiego, Poznań

³ Poradnia Endokrynologiczna, Rzeszów

Wrodzony niedobór TBG charakteryzuje się objawami eutyreozы, obecnością wola, znacznie obniżonym lub nieoznaczalnym stężeniem TBG w surowicy, niskim stężeniem całkowitych hormonów tarczycy przy prawidłowym stężeniu wolnych hormonów tarczycy i TSH. Dziedziczny się w sposób związany z chromosomem X i jest wynikiem zmian w genie *TBG* (*locus* Xq21-22) prowadzących do powstania różnych wariantów białka TBG.

Celem pracy było poszukiwanie mutacji w genie *TBG* u trzech braci z wrodzonym całkowitym niedoborem białka TBG, u których jego stężenie w surowicy wynosiło odpowiednio: 0.24 mg/l; 1.35 mg/l, 1.69 mg/l (norma 13.4-36.6 mg/L).

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

Badanie ujawniło delecję pojedynczego nukleotydu-guaniny (G) w pozycji 1711 w kodonie 201 (Asp) eksonu 2 (GAC>AC). Mutacja ta, znaleziona u każdego z trzech badanych braci, prowadzi do zmiany ramki odczytu i przedwczesnej terminacji w kodonie 206, co daje skrócenie białka TBG do 206 aminokwasów w porównaniu do 395 aminokwasów prawidłowego białka. Jest to mutacja po raz pierwszy opisana w dostępnym piśmiennictwie. Nie wykazano jej u zdrowych członków rodziny.

Deletion of single nucleotide (del1711G) in exon 2 of TBG gene as a cause of familial total TBG deficiency

Katarzyna Łacka¹, Agnieszka Ogrodowicz², Teresa Niżankowska³, Izabela Korczowska²

¹ Department of Endocrinology, Metabolism and Internal Medicine, Poznan University of Medical Sciences, Poznań

² Department of Rheumatology and Clinical Immunology, Poznań University of Medical Sciences, Poznań

³ Outpatient Unit of Endocrine Diseases, Rzeszów

Congenital TBG deficiency is characterized by clinical euthyreosis, goiter, decreased or undetectable serum TBG, low level of total thyroid hormones and normal concentration of free thyroid hormones and TSH in serum. Its inherited mode is transmitted in X-linked inheritance and is a result of the *TBG* gene mutations (*locus* Xq21-22) which may give various types of the TBG protein.

The aim of our study was to find a mutation in the *TBG* gene in three brothers with congenital total TBG deficiency, with serum TBG concentration: 0.24 mg/l; 1.35 mg/l, 1.69 mg/l (norm 13.4-36.6 mg/l), respectively.

DNAs were isolated from leucocytes of peripheral blood and then four exons and promoters of the *TBG* gene were amplified using standard PCR. PCR products with the following length: 672 b (containing exon 1), 467 b (containing exon 2), 351 b (containing exon 3), 421 b (containing exon 4) and 248 b (containing promoter sequence) were amplified using indirect enzyme method by AbiPrism apparatus.

Our studies revealed a single deletion of guanine in position 1711, codon 201 (Asp), exon 2 (GAC>AC). That mutation, which was found in every studied brother gives

a change of frame shift and premature stop at codon 206, resulting in the TBG variant protein of 206 amino acids compared to 395 amino acids of normal TBG. This is a novel mutation, which has been not described yet. It have been not present in the healthy members of that family.

Wpływ obecności różnych haplotypów genu dejodynazy typu 2 na jej aktywność enzymatyczną w tarczycy człowieka.

Michał Ambroziak¹, Janusz Pachucki²,
Balazs Gereben³, Alicja Nauman¹

¹ Zakład Biochemii Klinicznej, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, Warszawa

² Katedra I Kliniki Chorób Wewnętrznych I Endokrynologii Akademii Medycznej, Warszawa

³ Instytut Medycyny Doświadczalnej, Węgierska Akademia Nauk, Budapeszt, Węgry

Procesy dejodynacji tyroksyny (T_4) do trijodotyroniny (T_3) w tarczycy człowieka katalizowane są przez dwa enzymy: jodotyroninową dejodynazę typu 1 (D1) i typu 2 (D2). Kluczowy wpływ na wewnątrzkomórkowe stężenie T_3 ma aktywność D2, która charakteryzuje się niewrażliwością na działanie PTU. Obecność D2 w tarczycy człowieka potwierdzono pomiarami aktywności enzymatycznej oraz poziomu mRNA. Jednak w niektórych tkankach zwracała uwagę nietypowa aktywność enzymatyczna D2 z wyraźną wrażliwością na PTU. Jednocześnie w różnych tkankach tarczycowych można zidentyfikować polimorfizm, dotyczący jednego nukleotydu, prowadzący do mutacji Thr na Ala.

Celem pracy była ocena obecności różnych haplotypów D2 w tarczycy człowieka i ocena jej związku ze zmienioną aktywnością enzymatyczną dejodynazy typu 2.

Przeanalizowano skrawki tarczycy pochodzące od 19 chorych: 8 z chorobą Graves-Basedowa, 3 z wolem guzkowym toksycznym, 8 z rakiem brodawkowatym. We wszystkich badanych tkankach aktywność D2 mierzono w czterech warunkach: z 1 lub 100 nM T_4 , bez lub w obecności PTU. Przy pomocy RT-PCR i PCR oraz dwóch par starterów, obejmujących miejsce przypuszczalnej mutacji zamplifikowano fragment 2-go eksonu D2. Produkty reakcji poddano sekwencjonowaniu. Dziewięć z badanych przypadków było homozygotami Ala/Ala, jedna była homozygotą Thr/Thr, 10 było heterozygotami Thr/Ala. Na podstawie analizy sygnału sekwencjonowania stwierdzono, że w heterozygotach poziom ekspresji obu alleli genu był na tym samym poziomie. Jednocześnie w 7 z badanych tkanek nie obserwowano wyraźnego hamowania aktywności D2 ani przez wyższe stężenia substratu, ani przez PTU. Powyższe zmiany aktywności D2 nie korelowały z obecnością różnych haplotypów genu dejodynazy typu 2.

Influence of different haplotypes of type 2 deiodinase on tissue 5' deiodinase activity in the human thyroid

Michał Ambroziak¹, Janusz Pachucki²,
Balazs Gereben³, Alicja Nauman¹

Although human thyroid expresses both type 1 (D1) and type 2 (D2) iodothyronine deiodinases, the thyroxine (T_4) deiodination catalysed by D2 is essential for triiodothyronine (T_3) intracellular concentration. D2 is characterised by PTU insensitivity. Based on deiodinase activity measurements and presence of specific mRNA signals on Northern blots D2 is clearly detected in human thyroid tissues. In our previous studies D2 activity showed atypical kinetic with clear PTU sensitivity in some tissues. Moreover, we identified single nucleotide polymorphism (SNP) in mRNA sequence causing nonconservative mutation (Thr to Ala) in various thyroid tissues.

The purpose of this study was to obtain the prevalence of SNP in D2 sequence obtained from thyroid tissues and to compare the enzymatic activities with the presence of different D2 haplotypes.

We evaluated thyroid tissue samples from 19 patients: 8 with Graves' disease, 3 with toxic multinodular goitre and 8 with papillary thyroid cancer. In all examined tissues D2 activity was measured in four conditions: 1 nM T_4 or 100 nM T_4 with and without PTU. We used RT-PCR and PCR technique and two sets of primers located in the 2nd exon to amplify cDNA fragment including proposed mutation site. The reaction products were sequenced. Nine cases were homozygotes with Ala/Ala, 1 case was homozygote with Thr/Thr and 10 were heterozygotes with Thr/Ala. Based on sequencing signal we estimated that in heterozygotes both allele were expressed at similar level in all tissues tested. The D2 activity was not sufficiently suppressed either by PTU or by high substrate concentration in 7 cases. The presence of atypical D2 activity kinetic didn't correlate with different D2 haplotypes.

Rola czynników epigenetycznych w nieprawidłowym wzrastaniu dzieci i młodzieży

Andrzej Kędzia¹, Anna Goździcka-Józefiak²,
Aleksandra Obrępańska-Stęplowska²,
Eugeniusz Korman¹, Monika Obara-Moszyńska¹,
Barbara Rabska-Pietrzak¹

¹ Klinika Endokrynologii i Diabetologii Wieku Rozwojowego, II Katedra Pediatrii, Akademia Medyczna im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu

² Zakład Wirusologii Molekularnej, Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii, Uniwersytet im. A. Mickiewicza, Poznań

W ciągu kilkudziesięciu lat badań nad przekazem sygnału wzrostowego główny nacisk w poszukiwaniach mutacji będących przyczynami niskorosłości kładziono na analizowanie struktury kodu genetycznego. Oceniano poprawność składu nukleotydowego eksonów kodujących zarówno receptor dla hormonu wzrostu (GHR) jak i IGF-I. W ciągu ostatnich lat kontynuowano ten kierunek badań, poszerzając zakres analiz o ocenę wewnątrzkomórkowych nośników sygnału, takich jak na przykład białka STAT. Zaowocowało to wykryciem w pojedynczych przypadkach mutacji odpowiadających za zaburzone wzrastanie.

Punktem wyjścia naszych badań było założenie, że za obniżone stężenia poszczególnych nośników przekazu wzrostowego u niskorosłych dzieci odpowiadać mogą także nieprawidłowości nukleotydowe kodu epigenetycznego.

U 88 pacjentów ze znacznym niedoborem wzrostu (hSDS = -3,2 do -6,4), u których wykluczono deficyt hormonu wzrostu oraz inne przyczyny nieprawidłowego wzrastania, analizie molekularnej (PCR, SSCP, sekwencjonowanie) poddaliśmy odcinki promotorowe i fragmenty regulatorowe genów receptora dla hormonu wzrostu *V1 GHR* oraz *P1 IGF-I*.

Okazało się, że u prawie 8 % badanych stwierdzono mutacje w *V1 GHR*, a u niespełna 15 % mutacje w *P1 IGF-I*.

Aby ocenić wpływ stwierdzonych nieprawidłowości nukleotydowych na ekspresję genów, wykonano analizę oddziaływań DNA - białko techniką spowalniania migracji (EMSA).

Nie stwierdzono nieprawidłowości w wiązaniu czynników transkrypcyjnych do fragmentu *V1 GHR*.

Analiza sekwencji nukleotydowej zmienionych fragmentów DNA *P1 IGF-I* wykazała nieprawidłowe formowanie kompleksów z białkami transkrypcyjnymi, co prawdopodobnie odpowiada za zmiany ekspresji genu *IGF-I* w komórkach różnych tkanek.

The role of epigenetic factors in discordant growth of children and adolescents.

Andrzej Kędzia¹, Anna Goździcka-Józefiak², Aleksandra Obrępańska-Stęplowska², Eugeniusz Korman¹, Monika Obara-Moszyńska¹, Barbara Rabska-Pietrzak¹

¹ II Department of Pediatrics Karol Marcinkowski University of Medical Sciences Poznań, Division of Endocrinology and Adolescent Diabetes Mellitus, Poznań

² Department of Molecular Virology, Institute of Molecular Biology and Biotechnology, Adam Mickiewicz University Poznań

During past several years spent on studying growth signal pathways transduction, main focus in analysis of short stature - causing mutations was placed on the analysis of genetic code structure. The proper composition of nucleotide exons encoding both growth hormone receptor (GHR) and also IGF-I was evaluated. During past few years this direction of study was continued, and was further expanded by the analysis of intracellular signal carriers, like the STAT proteins. Owing to these studies, single mutations responsible for discordant growth were discovered.

The hypothesis behind our research was that incorrect epigenetic nucleotide code might be responsible for lowered concentrations of growth signal transduction factors in short stature children.

In 88 patients with considerable growth deficiency (hSDS = -3,2 to -6,4) in whom growth hormone deficit and other common causes of short stature were excluded, we have conducted molecular analysis (PCR, SSCP, sequencing) of promoter regions and regulatory fragments of growth hormone receptor *V1 GHR* and *P1 IGF-I*.

It turned out that in almost 8% of patients we have encountered mutations in *V1 GHR*, and almost 15% exhibited mutations of *P1 IGF-I*.

To assess the impact of discovered mutations on gene expression, we have conducted an analysis of DNA-protein interactions with electrophoretic mobility shift assay (EMSA).

There were no abnormalities detected in binding of transcriptional factors to the *V1 GHR* fragment.

Analysis of the changed nucleotide fragments sequence of *P1 IGF-I* DNA, revealed improper formation

of complexes with transcriptional proteins, which probably explains the changes in the expression pattern for the *IGF-I* gene in different cells in various tissues.

SESJA 3

Wczesna diagnostyka przerzutowych węzłów chłonnych szyi w zróżnicowanym raku tarczycy przy użyciu techniki RT-PCR

Elżbieta Gubała¹, Daria Handkiewicz-Junak¹, Agnieszka Pawlaczek¹, Marcin Zeman², Ewa Chmielik³, Małgorzata Wiench¹, Aleksandra Kukulska¹, Krystyna Wołoszyńska³, Aleksandra Krawczyk¹

¹ Zakład Medycyny Nuklearnej i Endokrynologii Onkologicznej

² Klinika Chirurgii Onkologicznej

³ Zakład Patologii Nowotworów Centrum Onkologii, Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie, Oddział Gliwice

Cel pracy: Komórki zróżnicowanych raków tarczycy (ZRT) zachowują zdolność do produkcji tyreoglobuliny (Tg), a wykrycie mRNA dla Tg w węzłach chłonnych szyi sugeruje obecności przerzutów raka tarczycy. Zastosowanie techniki molekularnej - odwrotnej transkrypcji reakcji łańcuchowej polimerazy (RT-PCR) do wykrywania ekspresji genu dla Tg może stanowić badanie uzupełniające klasyczne badanie cytologiczne. Jednak ze względu na nieswoisty charakter markera uzasadnione jest dołączenie innego markera bardziej swoistego dla komórek nowotworowych, na przykład galektyny-3. Dlatego celem pracy była ocena przydatności oznaczania mRNA Tg i mRNA Gal-3 dla wczesnego wykrywania przerzutów ZRT do węzłów chłonnych szyi.

Materiał i metodyka: Badaniem objęto 185 chorych na ZRT (312 węzłów chłonnych). Grupę kontrolną stanowiło 54 chorych na inne nowotwory. Reakcję RT-PCR wykonywano z materiału pozostałego w igle po wykonaniu tradycyjnego rozmazu cytologicznego. Kontrolę izolacji RNA i amplifikacji cDNA przeprowadzano stosując startery dla GADPH. Obecność mRNA oceniano dla tyreoglobuliny stosując startery obejmujące eksony 3-5 i 39 cykli reakcji. Równoczesną ekspresję Gal-3 badaliśmy metodą QPCR w 50 przypadkach.

Wyniki: W pierwszym badaniu cytologicznym rozpoznano przerzuty do węzłów chłonnych u 64 chorych na ZRT. W 62 przypadkach wykonane równoległe badanie RT-PCR dla Tg dało wynik dodatni. Badanie to było również dodatnie w 16 innych przypadkach, w których wynik badania cytologicznego był ujemny. Te wyniki traktowano początkowo jako wyniki fałszywie dodatnie, a chorych tej grupy poddano dalszej wnikliwej analizie. W toku dalszej obserwacji u 6 chorych rozpoznano przerzuty do węzłów chłonnych, przy czym prawdziwie dodatni wynik badania RT-PCR wyprzedzał cytologiczne rozpoznanie przerzutu o 5-20 miesięcy. U pozostałych 10 chorych dotychczasowa obserwacja, trwająca od kilku do 24 miesięcy, nie wskazuje na wznowę raka. Nie uzyskaliśmy dodatnich wyników RT-PCR dla Tg w grupie osób chorych na inne nowotwory niż ZRT.

Na tej podstawie, czułość RT-PCR dla Tg określono wobec badania cytologicznego na 96 % (68/70), swoistość na 95 % (232/242), a wartość przewidywania dodatniego na 38%. Obecnie prowadzona jest analiza,

czy dodatkowe badanie Gal-3 zwiększy siłę predykcyjną badania molekularnego.

Wnioski: Metoda RT-PCR Tg może być zastosowana w diagnostyce wczesnych przerzutów nowotworowych zróżnicowanych raków tarczycy do węzłów chłonnych. Dodatni wynik badania molekularnego kwalifikuje chorego do grupy wysokiego ryzyka. Uzasadnione jest poszukiwanie dalszych markerów molekularnych zwiększających siłę przewidywania dodatniego.

Early detection of thyroglobulin and galectin-3 in fine needle biopsy from neck lymph node metastases of differentiated thyroid carcinoma by RT-PCR

Elżbieta Gubała¹, Daria Handkiewicz-Junak¹,
¹Agnieszka Pawlaczek¹, Marcin Zeman²,
Ewa Chmielik³, Małgorzata Wiench¹,
Aleksandra Kukulska¹, Krystyna Wołoszyńska³,
Aleksandra Krawczyk¹

¹Department of Nuclear Medicine and Endocrine Oncology,

²Clinic of Oncological Surgery

³Department of Tumor Pathology
Center of Oncology, Maria Skłodowska-Curie Memorial
Institute, Gliwice, Poland

Differentiated thyroid cancer (DTC) diagnosis may be supported by molecular methods based on the polymerase chain reaction (PCR) and reverse transcription (RT), which permit the detection of cancer cells even in poorly cellular biological material. In patients with suspicion of differentiated thyroid cancer lymph node recurrence, detection of thyroglobulin (Tg) mRNA in fine needle biopsy material supports the classical cytological examination. Our experience with Tg supported diagnosis of lymph node recurrence has been reported previously. However, Tg mRNA is a non-specific marker, thus to increase the specificity of molecular detection of DTC, other markers should be evaluated. Recent studies have shown that galectin-3 (Gal-3) is over expressed in thyroid cancer. Thus, we decided to include a Gal-3 mRNA investigation into our analysis.

Aim: 1. Prospective validation of thyroglobulin mRNA detection in neck lymph nodes in patients with suspected metastases of differentiated thyroid cancer. 2. Analysis of impact of galectin-3 mRNA analysis to increase the specificity of DTC detection.

Material and methods: 312 neck lymph nodes from 185 patients with suspected DTC recurrence were investigated. Patients (54) with suspicion of lymph node metastases of other types of cancer were included in a control group. Thyroglobulin RT-PCR was conducted in residual material left after preparation of cytological smears from fine needle biopsy specimens. Primer spanning exons 3-5 were used with 39 cycles of PCR. RNA isolation control and cDNA amplification were carried out using GAPDH starters. Gal-3 expression was measured by QPCR in 50 cases.

Results: Classical cytology confirmed nodal involvement in 64 DTC patients. RT-PCR Tg was positive in 62 of them (96%). Additional 16 specimens with RT-PCR positive, cytology negative results were diagnosed. Six positive RT-PCR results were confirmed by repeated cytology conducted 5-20 months later and by post-surgery histopathological diagnosis. Other 10 cases are still consi-

dered false positive, as no definite confirmation of DTC recurrence has been obtained. However, in 5 cases the observation period is still too short to preclude the final diagnosis. No positive results of RT-PCR were obtained in lymph nodes taken from patients with other malignancies. Thus, the specificity is 95% (232/242) and sensitivity with reference to cytology examination is 96% (68/70), while positive predictive value is 38%. The results of Gal-3 mRNA estimation are also considered for the putative increase of positive value of molecular diagnosis.

Conclusions: RT-PCR for Tg shows sufficient specificity to be applied in fine needle biopsy for early detection of lymph node metastases in differentiated thyroid cancer. Positive RT-PCR result qualifies the patients to the high-risk group. Other molecular markers are necessary to increase the predictive power of molecular investigation.

Korelacja genotyp/fenotyp w zespole MEN 2A

Janusz Krassowski¹, Małgorzata Wiench², Elżbieta Bandurska-Stankiewicz³, Elżbieta Rostłowska¹,
Maria B. Gabryelewicz⁴, Barbara Jarząb²,
Wojciech Jeske¹

¹ Klinika Endokrynologii CMKP, Warszawa,

² Zakład Medycyny Nuklearnej i Endokrynologii Onkologicznej,
Centrum Onkologii, Gliwice,

³ Oddział Diabetologiczny i Endokrynologiczny, Szpital
Wojewódzki, Olsztyn,

⁴ Zakład Patomorfologii CMKP, Warszawa

Celem pracy była ocena korelacji genotyp/fenotyp w zespole MEN 2A w oparciu o materiał Kliniki Endokrynologii CMKP.

Mutacje protoonkogenu *RET* znaleziono u 28 chorych z 10 rodzin. Zespół MEN 2A stwierdzono u 19 chorych z 5 rodzin. W pozostałych przypadkach stwierdzono zespół FMTC (familial medullary thyroid carcinoma). U 4 rodzin znaleziono najczęstszą mutację kodonie 634 (Cys>Arg), w piątej rodzinie mutację w kodonie 620 Cys>Arg. Pheochromocytoma rozpoznano u większości dorosłych pacjentów z mutacją 634, natomiast tylko u jednej pacjentki z mutacją 620. Tylko w dwóch przypadkach w mutacji 634 stwierdzono patologię przytarczyc.

Wyniki potwierdzają dotychczas opisywane w piśmiennictwie zależności między miejscem mutacji i występowaniem innych poza rakiem rdzeniastym patologii, tj. częste występowanie pheochromocytoma w mutacji Cys634Arg. Zwraca uwagę rzadkość patologii przytarczyc w naszym materiale.

Genotype/phenotype correlation in MEN2a syndrome

Janusz Krassowski¹, Małgorzata Wiench², Elżbieta Bandurska-Stankiewicz³, Elżbieta Rostłowska¹,
Maria B. Gabryelewicz⁴, Barbara Jarząb²,
Wojciech Jeske¹

¹ Department of Endocrinology, Medical Centre of Postgraduate
Education, Warsaw,

² Department of Nuclear Medicine and Oncological Endocrinology,
Institute of Oncology, Gliwice,

³ Department of Diabetology and Endocrinology, District Hospital,
Olsztyn,

⁴ Department of Pathomorphology, Medical Centre of Postgraduate
Education, Warsaw.

The aim of the study was the assessment of genotype/phenotype correlation in patients with MEN 2A syndrome seen at Department of Endocrinology, Medical Centre of Postgraduate Education, Warsaw. *RET* proto-oncogene mutations were found in 28 patients belonging to 10 families. MEN 2A syndrome was diagnosed in 19 patients from 5 families. In the remaining cases FMTC (familial medullary thyroid carcinoma) was diagnosed. The most frequent mutation was codon 634 mutation (Cys>Arg), which was found in 4 families. In the fifth family codon 620 Cys>Arg mutation was found. Pheochromocytoma was diagnosed in the majority of patients with codon 634 mutation, while in 620 mutation only one case of pheochromocytoma was diagnosed. Parathyroid pathology was found only in 2 patients with 634 mutation. Our results corroborate the earlier reports suggesting frequent association of pheochromocytoma with Cys634Arg mutation. Parathyroid pathology was relatively rare in our patients.

Analiza genetyczna mutacji genów *SDHB* i *SDHD* u chorych z guzami chromochłonnymi nadnercza i nerwiakami przyzwojowymi.

Aleksandra Krawczyk, Sylwia Szpak, Renata Cyplińska, Elżbieta Gubała, Barbara Jarząb

Zakład Medycyny Nuklearnej i Endokrynologii Onkologicznej, Centrum Onkologii – Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie, Gliwice

Guzy chromochłonne (*pheochromocytoma*) i nerwiaki przyzwojowe (*paraganglioma*) są nowotworami wywodzącymi się z tkanki chromochłonnej. Ich występowanie jest w 20-25% związane z predyspozycją dziedziczną, mogą stanowić składnik zespołu gruczolakowatości wewnątrzwydzielniczej typu 2, zespołu von Hippela-Lindaua, nerwiakowłókniakowatości typu 1 oraz zespołu guza chromochłonnego i nerwiaków przyzwojowych – PPS. W zespole tym opisano mutacje w genach kodujących podjednostki dehydrogenazy bursztynianowej (*SDHB*, *SDHD*).

Celem pracy jest opracowanie metody wykrywania mutacji w genach *SDHB* i *SDHD* u chorych z guzem chromochłonnym nadnercza i nerwiakami przyzwojowymi.

DNA izolowano z leukocytów krwi obwodowej pobranej od chorych z guzami chromochłonnymi lub nerwiakami zwojowymi. Następnie przeprowadzano reakcję łańcuchową polimerazy DNA (PCR) dla genu *SDHB* (ekson 2, 3, 4, 6, 7) i genu *SDHD* (ekson 1, 2, 3). Namnożony w ten sposób materiał poddano analizie MSCP za pomocą zestawu DNA Pointer System. W przypadku stwierdzenia mutacji przeprowadzano sekwencjonowanie w celu dokładnego określenia jej rodzaju. W pracy przedstawiamy szczegóły metody i jej pierwsze wyniki.

Opracowana metoda analizy genetycznej może mieć zastosowanie u chorych, u których jedynym objawem choroby jest guz chromochłonny lub nerwiak przyzwojowy, a nie stwierdzono mutacji w protoonkogenie *RET* i genie *VHL*. Wówczas analiza genów *SDH* może ujawnić nowe przypadki dziedziczne. Dokładna ocena przydatności metody będzie możliwa po uzyskaniu większej ilości wyników.

Analysis of *SDHB* and *SDHD* genes mutations in patients with pheochromocytoma and paraganglioma

Aleksandra Krawczyk, Sylwia Szpak, Renata Cyplińska, Elżbieta Gubała, Barbara Jarząb

Department of Nuclear Medicine and Endocrine Oncology, Center of Oncology – Institute, Gliwice

Pheochromocytomas and paragangliomas are tumors derived from chromaffine tissue. These tumors are in 20-25% inherited and may be the part of multiple endocrine neoplasia type 2, von Hippel-Lindau syndrome, neurofibromatosis type 1 and pheochromocytoma paraganglioma syndrome – PPS. In this syndrome mutations in genes encoding succinate dehydrogenase subunits B and D (*SDHB*, *SDHD*) were identified.

The aim of present study is to establish a method of detection of mutations in *SDHB* and *SDHD* genes in patients with pheochromocytoma and paraganglioma.

DNA was isolated from peripheral blood leukocytes obtained from patients with pheochromocytomas and paragangliomas. The polymerase chain reaction (PCR) was done for *SDHB* (exons 2, 3, 4, 6, 7) and *SDHD* (exons 1, 2, 3). The PCR product was then analyzed with DNA Pointer System and sequenced when mutation was found.

This method can be useful in diagnosing patients with pheochromocytoma or paraganglioma as the only symptom, in which mutations of *RET*, *VHL* and *NF-1* genes were not found. The analysis of *SDH* genes can help in detecting new inherited cases. Exact evaluation of this method will be possible after receiving more results.

Badanie ekspresji receptora naskórkowego czynnika wzrostu w niskozróżnicowanych glejakach mózgu

Dorota Kula¹, Damian Larysz², Michał Jarząb³, Zbigniew Wygoda¹, Grażyna Bierzyńska-Macyszyn⁴, Maciej Wojtacha², Tomasz Stępień⁵, Wojciech Kaspera⁵, Barbara Jarząb¹

¹ *Zakład Medycyny Nuklearnej i Endokrynologii Onkologicznej, Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej – Curie, Gliwice;*

² *Katedra i Klinika Neurochirurgii w Katowicach,*

³ *Zakład Biologii Nowotworów, Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej – Curie, Gliwice;*

⁴ *Katedra i Zakład Patologii,*

⁵ *Katedra i Kliniczny Oddział Neurochirurgii w Sosnowcu, Śląska Akademia Medyczna*

Gwiaździaki anaplastyczne i glejaki wielopostaciowe stanowią grupę źle rokujących glejaków złośliwych. Amplifikacja i nadekspresja genu receptora naskórkowego czynnika wzrostu (*EGFR*) uważana jest za cechę charakterystyczną glejaków wielopostaciowych, w związku z czym cząsteczka *EGFR* jest dobrym celem nowych form terapii w tych guzach.

Celem pracy była zbadanie poziomu ekspresji *EGFR* metodą ilościowej reakcji PCR w czasie rzeczywistym (Q-PCR) oraz ocena różnic ekspresji *EGFR* między gwiaździakami anaplastycznymi a glejakami wielopostaciowymi.

Materiał do badań stanowiło 75 tkanek: 39 glejaków wielopostaciowych, 29 gwiaździstych anaplastycznych i 7 wysokozróżnicowanych guzów glejowych. Całkowity RNA izolowano z wykorzystaniem TRIzol, oczyszczane zestawami RNeasy Mini Kit, i trawiono DNazą. Ilościową reakcję PCR w czasie rzeczywistym (Q-PCR) przeprowadzono z wykorzystaniem systemu Taqman (Applied Biosystem), oceniając ekspresję form zmutowanych (delecje w domenie zewnątrzkomórkowej), jak i formy dzikiej w oparciu o trzy zestawy sond i primerów komplementarnych do miejsca łączenia eksonów 2-3, 13-14 i 18-19. Badania immunohistochemiczne wykonano stosując zestawy przeciwciała anti-EGFR DakoCytomation, znakowane streptawidyną-biotyną i barwione chromogenem DAB.

Na podstawie wyników uzyskanych we wszystkich trzech typach reakcji Q-PCR stwierdzono wysoką ekspresję EGFR w 34 (46,5%) przypadkach, przy czym obecność delecji w domenie zewnątrzkomórkowej stwierdzono w 31 (40%) przypadkach (badanie RT-PCR). Metodą immunohistochemiczną (badanie wykonane w grupie 100 chorych, 123 tkanki) ekspresję EGFR stwierdzono w 76 (61,8%) badanych tkankach, przy czym tylko w 15 (12,2%) była to ekspresja silnie dodatnia. W obydwu metodach nie stwierdzono wyraźnego zróżnicowania między gwałdzistymi anaplastycznymi a glejakami wielopostaciowymi.

Dla 50 guzów dokonano oceny zależności między wynikami badania metodą ilościowej PCR w czasie rzeczywistym a badaniem immunohistochemicznym i wykazano znamiennej statystycznie korelację.

Wnioski: W zależności od metody analizy i przyjętego kryterium ekspresję EGFR obserwowano w 12 do 62% chorych na niskozróżnicowane glejaki mózgu. Nie obserwowano wyraźnej różnicy w częstości ekspresji EGFR między złośliwymi glejakami wielopostaciowymi a anaplastycznymi gwałdzistymi ani w badaniu molekularnym, ani w badaniu immunohistochemicznym. W 40% przypadków wykryto obecność delecji w domenie zewnątrzkomórkowej EGFR, która może zmieniać wynik badania immunohistochemicznego oraz wpływać na skuteczność stosowania immunoterapii z zastosowaniem przeciwciał przeciwko natywnej formie receptora.

Projekt finansowany z grantu KBN Projekt KBN nr 6 PO5A 021 20.

Expression level of epidermal growth factor receptor in high-grade gliomas

Dorota Kula¹, Damian Larysz², Michał Jarzab³, Zbigniew Wygoda¹, Grażyna Bierzyńska-Macyszyn⁴, Maciej Wojtacha², Tomasz Stępień⁵, Wojciech Kaspera⁵, Barbara Jarzab¹

¹ Department of Nuclear Medicine and Endocrine Oncology,

² Department of Neurosurgery in Katowice,

³ Department of Tumor Biology, Center of Oncology, Maria Skłodowska-Curie Memorial Institute, Gliwice;

⁴ Department of Pathology,

⁵ Department of Neurosurgery in Sosnowiec, Silesian University School of Medicine

Glioblastoma multiforme and anaplastic astrocytoma are malignant brain tumors with poor prognosis. Amplifica-

tion and increased expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) gene is a very prominent molecular feature of glioblastomas, thus the EGFR molecule seems to be a good target for new molecular therapy approaches in these tumors.

The aim of this study was to estimate the EGFR expression by real time quantitative PCR (Q-PCR) and to evaluate the putative differences in expression level between glioblastomas and anaplastic astrocytomas.

75 tumor brain samples were analysed: 39 glioblastomas, 29 anaplastic astrocytomas and 7 low-grade gliomas. Total RNA was isolated by TRIzol method followed by purification with RNeasy Mini Kit method (QIAGEN). Q-PCR analysis was performed by real-time PCR detection method (Taqman; Applied Biosystems). For wild type and mutated forms of EGFR gene (extracellular domain deletions) analysis three primer-probe sets were used, measured the expression of gene fragments encompassing following exon junctions: 2-3, 13-14, 18-19. Anti-EGFR immunohistochemistry analysis was performed with DakoCytomation antibody, labeled by streptavidin-biotin procedure and stained with DAB.

By Q-PCR the increased level of EGFR expression for all three measurements was found in 34 (46.5%) patients. The presence of mutated EGFR was observed in 31 (40%) cases. By immunohistochemistry (made in 100 patients, 123 tissues) the EGFR expression was observed in 76 (61.8%) cases, however the highest level of expression was present only in 15 (12.2%) tissues. There were no differences between glioblastomas and astrocytomas.

The correlation between Q-PCR and immunohistochemistry results was statistically significant (analysis on the set of 50 samples).

Conclusions: The EGFR expression was observed in 12%-62% cases of high grade gliomas dependent on the method used. There was no difference between glioblastoma multiforme and anaplastic astrocytoma neither in Q-PCR nor in immunohistochemistry analysis. The presence of mutated EGFR forms in 40% cases may influence the immunohistochemistry results and is important for the efficiency of anti-EGFR targeted therapy, when antibodies against the native EGFR molecule are used.

The project was supported by Polish State Committee for Scientific Research, nr 6 PO5A 021 20.

Nieprawidłowa aktywacja promotora 5'-dejdynazy typu 1 przez mutanty receptorów T₃ izolowane z raków jasnokomórkowych nerki

Maciej Pietrzak¹, Monika Puzianowska-Kuźnicka^{1,2}, Agnieszka Krystyniak¹, Zbigniew Tański³, Janusz Nauman¹, Alicja Nauman²

¹ Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej, PAN, Warszawa,

² Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego, Warszawa,

³ Szpital Wojewódzki, Ostrołęka.

Tarczycza jest jedynym organem syntetyzującym tyroksynę (T₄) będącą prekursorem trijodotyroniny (T₃). Znakomita większość T₃ produkowana jest w tkankach obwodowych organizmu w procesie dejodynacji T₄,

katalizowanej przez 5'-dejdodynyzy typu 1 oraz 2. Jednym z czynników regulujących ekspresję genu dejdodynyzy typu 1 (*hdio1*) jest trijodotyronina. Hormon ten za pośrednictwem swoich jądrowych receptorów (TR) wiąże się ze specyficznymi sekwencjami (TRE) w obrębie promotora i aktywuje transkrypcję *hdio1*. Najwyższą aktywność enzymatyczną dejdodynyzy typu 1 zaobserwowano w zdrowej wątrobie, tarczycy i w nerkach.

W nowotworach wywodzących się z tych narządów zaobserwowano natomiast znaczące obniżenie aktywności tego enzymu. Co więcej, w nowotworach tych zaobserwowano wysoką częstość mutacji genów kodujących TR. Aby określić wpływ mutantów TR na aktywność *hdio1* przeprowadzono badania regulacji transkrypcji tego promotora. Komórki HEK 293 transfekowano wektorem reporterowym pGL2-DI zawierającym fragment promotora *hdio1* o długości 1,5kb oraz wektorem ekspresyjnym kodującym dzikie typy lub mutanty TRa1 oraz TRb1. Wykazano, że z wyjątkiem jednego mutantu (D1-26, S380F), który aktywował promotor *hdio1* tak jak dziki typ receptora, wszystkie pozostałe mutanty aktywowały ten promotor od 2,5 do 10 razy słabiej niż dziki typ TR. Testy opóźnienia migracji w żelu wykonane z sondą zawierającą TRE-DR4 pochodzące z promotora *hdio1* wykazały, że niektóre mutacje występujące w obrębie domeny wiążącej DNA mogą upośledzać powinowactwo receptora do TRE.

Powyższe badania wykazały, że znalezione przez nas w rakach jasnokomórkowych nerki ludzkiej mutacje genów kodujących TR, zmieniając sekwencję i funkcję kodowanego receptora, mogą przyczyniać się do obserwowanego w tkankach nowotworowych obniżenia aktywności 5'-dejdodynyzy typu 1. Skutkiem niskiej aktywności enzymatycznej jest zmniejszona lokalna produkcja T_3 , co nasilać może deregulację hormonalną kontroli cyklu komórkowego, różnicowania i apoptozy w tkankach nowotworowych.

Aberrant type 1 5'-deiodinase activation by mutated thyroid hormone receptors cloned from renal clear cell carcinoma.

Maciej Pietrzak¹, Monika Puzianowska-Kuźnicka^{1,2}, Agnieszka Krystyniak¹, Zbigniew Tański³, Janusz Nauman¹, Alicja Nauman²

¹ Medical Research Center, Polish Academy of Sciences, Warsaw, Poland;

² Medical Center for Postgraduate Education, Warsaw, Poland

³ Voivodship Hospital, Ostrołęka.

Thyroid gland is the only organ synthesizing thyroxine (T_4), a triiodothyronine (T_3) prohormone. Majority of T_3 is produced in extrathyroidal tissues by T_4 deiodination, catalyzed by type 1 and type 2 deiodinases. One of the factors that up-regulate type 1 5'-deiodinase (5'-DI) gene (*hdio1*) expression is T_3 . T_3 exerts this function via thyroid hormone receptors (TRs) bound to two thyroid hormone response elements (TREs) present in *hdio1* promoter. The highest activity of 5'-DI is observed in liver and kidney. However, in cancers originating from these organs *hdio1* mRNA amount as well as 5'-DI enzymatic activity are very low. Interestingly, TR mutations are frequently found in these cancers. To assess the *hdio1* promoter activity in the presence of TR mutants, the transcrip-

tion regulation tests were performed. HEK 293 cells were transfected with the reporter construct pGL2-DI containing firefly luciferase reporter gene driven by 1,5 kb *hdio1* promoter fragment and the wild type or mutated TRa1 or TRb1 expression vector. We found that all but one mutant (TRb1 D1-26, S380F, which activity was similar to the wild type TRb1) activated *hdio1* promoter 2.5 to 10-fold weaker than the respective wild type TR. Electromobility shift assays performed with direct repeat TRE-DR4 from *hdio1* promoter show that certain mutations in DNA binding domain might alter receptor binding to TRE. Our findings suggest that aberrant regulation of *hdio1* promoter by TR mutants might be one of the factors responsible for the low 5'-DI enzymatic activity observed in RCCC tissues. Subsequently, this might result in the spatially restricted decrease of T_3 bioavailability. We speculate that this might alter the regulation of expression of T_3 -dependent genes involved in the control of cell cycle, differentiation and apoptosis. This might exacerbate the effect of other genetic alterations observed in tumor tissues.

SESJA 4

Polimorfizm genu *ICAM-1* w cukrzycy typu 1

Katarzyna Mirończuk, Adam Krętowski, Ida Kinalska

Klinika Endokrynologii, Diabetologii i Chorób Wewnętrznych, Akademia Medyczna, Białystok

Gen kodujący cząsteczkę adhezji międzykomórkowej 1 (*ICAM-1*) znajduje się na chromosomie 19p13 w regionie wykazującym związek z cukrzycą typu 1 w badaniach sprzężeń genetycznych. Badania doświadczalne sugerują również, że *ICAM-1* może odgrywać kluczową rolę w powstawaniu nacieku zapalnego (insulitis) w wyspach trzustkowych u zwierząt z cukrzycą autoimmunologiczną.

Celem wykonanych badań była ocena związku polimorfizmów genu *ICAM-1* z predyspozycją do cukrzycy typu 1 w populacji polskiej. Obecność polimorfizmów: c.721 G→A w eksonie 4 genu *ICAM-1* oraz c.1405 A→G w eksonie 6 wykonano metodą PCR z wykorzystaniem allelospecyficznych starterów oraz potwierdzono sekwencjonowaniem (ABI Prism 310) u 211 rodzin osób chorych na cukrzycę typu 1 oraz 211 zdrowych ochotników.

W badanej grupie chorych na cukrzycę typu 1 częstość występowania allelu G była istotnie statystycznie wyższa, a częstość allelu R w pozycji odpowiadającej 241 aminokwasowi cząsteczki *ICAM-1* była istotnie statystycznie niższa niż w grupie 211 osób zdrowych (13,5% vs. 20,4%, $p=0,008$). Różnice te były spowodowane częstszym występowaniem u chorych na cukrzycę typu 1 homozygot 241GG oraz niskim odsetkiem homozygot RR w tej grupie. Podobnie w pozycji 469 cząsteczki *ICAM-1* częstość odpowiadającego jej kodującego allelu E była istotnie statystycznie wyższa (46,5% vs. 38,2%), a allelu K niższa (53,5 vs. 61,8%, $p=0,0138$) u chorych na cukrzycę w porównaniu do grupy kontrolnej, co wynikało głównie z niższej częstości występowania homozygoty 469KK u chorych na cukrzycę typu 1. Zaobserwowane wyniki sugerujące istotny związek polimorfizmów genu *ICAM-1* z wiekiem zachorowania na cukrzycę typu 1 pozwalają na postawienie przypuszczenia o możliwej roli terapii immunomodulacyjnej wpływającej na ekspresję/funkcję

cząsteczki adhezji międzykomórkowej 1 w opóźnieniu rozwoju (zapobieganiu) cukrzycy typu 1.

ICAM-1 gene polymorphism in type 1 diabetes mellitus

Katarzyna Mirończuk, Adam Krętowski, Ida Kinalska

Department of Endocrinology, Diabetology and Internal Medicine, Medical University of Białystok, Białystok

ICAM-1 gene is located on chromosom 19p13 within the region which was shown to be associated with type 1 diabetes the in linkage studies. There are also experimental data suggested the key role of ICAM-1 molecule in the pathogenesis of inflammatory process (insulinitis) in pancreatic islet cells observed in animal model of autoimmune diabetes.

The aim of our study was to evaluate if 2 known polymorphisms of ICAM-1 gene are associated with risk of type 1 diabetes in Polish population.

Using PCR sequence specific primers method and direct DNA sequencing (ABI Prism 310) we have genotype polymorphisms in exon 4 (c.721 G→A) and exon 6 (c1405 A→G) of ICAM-1 gene in 211 Polish families affected by type 1 diabetes and 210 healthy controls from the same region of Poland.

In genotyped Polish diabetic families we have observed a less frequent transmission of 241R allele to affected offsprings from heterozygous parents (37.5%, 21 transmissions of 56, $p=0,043$), but a lower frequency of allele R in subjects with type 1 diabetes in comparison to healthy age matched controls (13.5% vs. 20.4%, $p=0.008$). We have also found the higher frequency of 469E allele in patients with type 1 diabetes in comparison to healthy controls (46.9% vs. 38.2%, $p=0.01$). We have analyzed the frequencies of alleles and genotypes in relation to the age of diagnosis and we have observed that the frequency of 241R allele is significantly lower in subjects with type 1 diabetes diagnosed before 25 yrs. of age in comparison to adult onset type 1 diabetes (11.8% vs. 21.6%, $p=0.025$).

The results of our study suggest that G241R amino acid substitutions in ICAM-1 molecule could influence the intensity/duration of the autoimmunity process. We believe that our observations concerning the associations of ICAM-1 gene polymorphisms with the age of onset of autoimmune diseases give additional support to the hypothesis that potential ICAM-1 pathway-targeted treatment may delay the onset of type 1 diabetes mellitus.

Ocena roli alleli genów DRB1, DQA1 i DQB1 HLA w cukrzycy ciężarnych

Maciej Kinalski, Anna Okruszko, Katarzyna Mirończuk, Natalia Wawrusiewicz, Mariusz Kuźmicki, Adam Krętowski, Ida Kinalska

Klinika Endokrynologii, Diabetologii i Chorób Wewnętrznych, AM w Białymstoku
Zakład Patofizjologii Ciąży, AM w Białymstoku

Cukrzyca pojawiająca się w okresie ciąży (GDM) istotnie wpływa na wzrost ryzyka powikłań matczyno-płodowych

oraz zwiększa prawdopodobieństwo rozwoju cukrzycy po porodzie. Istnieje coraz więcej dowodów, że zaburzenia węglowodanów pojawiające się w ciąży mają heterogenne podłoże, przy czym najnowsze badania sugerują kluczową rolę czynników genetycznych w warunkowaniu predyspozycji do określonych „podtypów” cukrzycy ciężarnych.

Celem badań była ocena częstości występowania wybranych alleli oraz dystrybucji haplotypów genów II klasy HLA: DRB1, DQA1, DQB1 u pacjentek z cukrzycą ciężarnych w porównaniu do kobiet, u których w ciąży nie występowały zaburzenia tolerancji węglowodanów. Analizie poddano również istnienie zależności między badanymi allelami II klasy HLA, a ryzykiem rozwinięcia się cukrzycy w ciągu kolejnych 5 lat po porodzie czy koniecznością insulinoterapii.

Badania wykonano u 168 kobiet z cukrzycą ciężarnych oraz w grupie 144 zdrowych kobiet, u których w czasie ciąży nie obserwowano zaburzeń węglowodanów. Genotypowanie alleli genów DRB1, DQA1, DQB1 wykonano metodą SSP-PCR. Częstość alleli DRB1*03 i DQB1*0302 była istotnie wyższa, a alleli DQB1*0602 i *0603 istotnie niższa w grupie pacjentek z cukrzycą wymagającą terapii insuliną w okresie ciąży, w porównaniu do ciężarnych leczonych tylko dietą i grupy kontrolnej.

Zaobserwowano również wyższą częstość alleli DRB1*03 i/lub *04 oraz DQB1*02 wśród pacjentek, u których po GDM rozwinęła się cukrzyca, w porównaniu do grupy pacjentek z wywiadem GDM oraz prawidłową tolerancją węglowodanów w ciągu kolejnych 5 lat obserwacji po ciąży (44,4% vs. 19,1% oraz 55,6% vs 38,5%). U żadnej z pacjentek z GDM posiadającej allel DQB1*0602 i/lub *0603 nie stwierdzono klinicznych wskazań do włączenia insulinoterapii w ciągu kolejnych 5 lat po ciąży.

Ocena profilu genetycznego może być użyteczna w diagnozowaniu podtypów w cukrzycy ciężarnych oraz analizie ryzyka rozwoju cukrzycy wymagającej insulinoterapii po porodzie.

Praca finansowana z programu KBN Nr 6P05B027 20.

The estimation of DRB1, DQA1, DQB1 HLA gene alleles in gestational diabetes mellitus

Maciej Kinalski, Anna Okruszko, Katarzyna Mirończuk, Natalia Wawrusiewicz,, Mariusz Kuźmicki, Adam Krętowski, Ida Kinalska

Department of Endocrinology, Diabetology and Internal Medicine, Medical University of Białystok
Department of Pathophysiology of Pregnancy, Medical University of Białystok

Gestational diabetes mellitus (GDM) is associated with an increased risk of maternal and fetal complications and further development of diabetes after delivery. There is an increasing evidence that glucose level disturbances observed during pregnancy have heterogeneous etiologies and that genetic factors could play a key role in the predisposition to different “subtypes” of gestational diabetes. The aim of the study was the estimation of the frequency of diabetes type 1-associated HLA alleles and haplotypes of DRB1, DQA1 and DQB1 genes in women with gestational diabetes in comparison to subjects without glucose intolerance during the pregnancy. The association between the studied alleles and the risk of

diabetes development in the next 5 years after delivery or the insulin therapy were also analyzed.

The study was performed in 168 subjects with gestational diabetes and 144 healthy age and BMI matched women with normal glucose tolerance during the pregnancy.

Alleles of *DRB1*, *DQA1*, *DQB1* genes were genotyped using SSP-PCR method. The frequency of DRB1*03 or DQB1*0302 alleles were significantly higher and the frequency of DQB1*0602 or *0603 alleles were lower in subjects with gestational diabetes treated with insulin in comparison to the group treated with low carbohydrate diet only or controls. Moreover the higher frequency of DRB1*03 and/or 04 and DQB1*02 alleles were observed in GDM women, who developed diabetes in the next 5 years after delivery in comparison to the group with normal postpartum glucose tolerance (44.4% vs. 19.1% and 55.6% vs. 38.5%). After delivery none of the women with DQB1*0602 or 0603 alleles and previous GDM have clinical indications for the insulin treatment during the next 5 years after delivery.

The genetic profile (diabetes type 1-associated HLA alleles) could be useful for the diagnosis of different „subtypes” of gestational diabetes mellitus and could serve as a predictor of insulin-dependency during the next 5 years after delivery.

The study was founded by grant from KBN (6P05B02720)

Ocena immunologicznych parametrów odpowiedzi komórkowej u pacjentów z autoimmunologiczną cukrzycą u osób dorosłych

Barbara Szepietowska, Małgorzata Szlachowska, Maria Górka, Ida Kinalska

Klinika Endokrynologii, Diabetologii i Chorób Wewnętrznych, AM w Białymstoku

Do określenia typu cukrzycy, wstępnie rozpoznawanej jako typ 2 z dodatnim mianem przeciwciał skierowanych przeciwko antygenom wysp trzustkowych, zaproponowano termin późno ujawniającej się cukrzycy typu 1 u osób dorosłych. Patogeneza cukrzycy typu LADA (latent autoimmune diabetes in adults) nie jest do końca poznana. Istotną rolę, podobnie jak w typie 1, odgrywa proces autoimmunologiczny, w którym limfocyty T i makrofagi doprowadzają do uszkodzenia komórek β wysp trzustkowych u osób genetycznie predysponowanych. Po utracie tolerancji immunologicznej i prezentacji autoantygenu limfocytom T dochodzi do aktywacji tych komórek i sekrecji specyficznych cytokin. Uważa się, że cytokiny wydzielane przez subpopulację limfocytów Th1, takie jak: IFN- γ , IL-2, 18, IL-1b powodują proces destrukcji komórek β . Natomiast cytokiny wydzielane przez subpopulację limfocytów Th2: IL-4 i 10 działają ochronnie, poprzez hamowanie aktywności limfocytów Th1.

Celem pracy była ocena stężenia w surowicy krwi wybranych cytokin jako wskaźników aktywności immunologicznego układu komórkowego w zależności od obecności przeciwciał skierowanych przeciwko antygenom wysp trzustkowych.

W grupie 52 pacjentów, z czasem trwania cukrzycy od 6 miesięcy oraz grupie kontrolnej dokonano pomiaru

stężenia w surowicy krwi IL-1b, IFN- γ , IL-18, IL-4 i IL-10. U wszystkich pacjentów oraz w grupie kontrolnej oznaczono miano przeciwciał: skierowanych przeciwko dekarboksylazie kwasu glutaminowego (anty-GAD), przeciwinulinowych (IAA) i przeciwko fosfatazie tyrozyny białkowej (anty-IA2) metodą radioimmunologiczną (RIA). Badanie stężenia peptydu C na czczo i po stymulacji glukagonem oraz wybranych cytokin wykonano metodą immunoenzymatyczną (ELISA).

U pacjentów ze świeżo rozpoznaną cukrzycą bez przeciwciał przeciwko antygenom wysp trzustkowych stężenia IL-1b i IL-18 było istotnie wyższe w stosunku do grupy kontrolnej. Stężenie IFN- γ nie różniło się istotnie w badanych grupach. Stwierdzono istotnie wyższe stężenie IL-4 w grupie kontrolnej w porównaniu do grupy ze świeżo rozpoznaną cukrzycą i istotnie podwyższonym mianem jednego z przeciwciał skierowanych przeciwko antygenom wysp trzustkowych. Nie zaobserwowano znacznych różnic w stężeniu IL-10 pomiędzy grupami badanymi i grupą kontrolną. Stwierdzono istotną, dodatnią korelację pomiędzy stężeniem peptydu C na czczo a stężeniem IL-10 w grupie osób z cukrzycą. Zaburzenia równowagi pomiędzy wydzielaniem cytokin przez populację limfocytów Th2 oraz ujemna korelacja pomiędzy hormonalnym a komórkowym układem immunologicznym może być ważnym czynnikiem wpływającym na późniejsze ujawnienie się objawów cukrzycy autoimmunologicznej.

Serum profile cytokine levels in patients with autoimmune diabetes in adults.

Barbara Szepietowska, Małgorzata Szlachowska, Maria Górka, Ida Kinalska

Department of Endocrinology, Diabetology and Internal Medicine, Medical Academy, Białystok

Aim/hypothesis: The estimation of serum concentrations of macrophages (interleukin 1 β), T helper 1 (interferon γ) and T helper 2 (interleukin 4 and interleukin 10) lymphocytes derived cytokines and interleukin 18 – in newly diagnosed non-obese adult diabetic patients in relation to the presence of antiislets antigen autoantibodies and β cell capacity.

Methods: Serum cytokines and C peptide were detected in three groups of subjects: 27 autoantibody positive diabetic patients (GADA and/or IAA and/or IA-2A), 25 negative and a group of 29 controls. Cytokines serum levels and C peptide basal and stimulated were quantified by ELISA. Autoantibodies titers were measured by RIA.

Results: We found a lower concentration of interleukin 4 in the group positive for autoantibodies than in the control group. We did not observe any differences in the concentrations of interleukin 10 in the studied groups. However, interleukin 10 levels positively correlated with basal C peptide concentrations in the group positive for autoantibodies. Interleukin-1 β and interleukin 18 was lower in the group positive for autoantibodies in comparison to negative and controls. Interferon- γ systemic level did not differ between the investigated groups.

Conclusion/interpretation: Our findings have shown the down regulation of serum T helper 2 cytokines in

patients with an adult onset of diabetes type 1. Relatively lower concentrations of pro-inflammatory cytokines in the group of patients positive for autoantibodies may reflect a negative feedback between cellular and humoral immunity in subjects with an adult onset autoimmune diabetes. Interleukin 18 in autoimmune diabetes may play an important role in β cell protection, by stimulating T helper 2 immune responses in the absence of interleukin 12.

SESJA 5

Wpływ ścieżek sygnałowych kinazy A i TGF- β na ekspresję genu *LIPE* kodującego hormonozależną lipazę/hydrolazę estrów cholesterolu w komórkach H295R

Dawid Nowak, Marcin Hołysz, Natalia Derebecka-Hołysz, Wiesław H. Trzeciak

Katedra i Zakład Biochemii i Biologii Molekularnej, Akademia Medyczna im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu

Hormonozależna lipaza/hydrolaza estrów cholesterolu – CEH (cholesteryl ester hydrolase), kodowana przez gen *LIPE*, katalizuje reakcję hydrolizy triacylogliceroli w tkance tłuszczowej jak również estrów cholesterolu w korze nadnerczy, jajnikach i jądrach. Gen *LIPE* zlokalizowany jest na chromosomie 19 w prążku q13.1-13.2. Produkt reakcji katalizowanej przez CEH – wolny cholesterol jest używany jako prekursor w biosyntezie hormonów steroidowych. Steroidogeneza w korze nadnerczy jest kontrolowana przez ACTH, a CEH jest jednym z głównych obiektów regulacji. Regulacja steroidogenezy niezależna od ACTH/cAMP obejmuje czynniki pobudzające i hamujące, a sekrecja steroidów jest wypadkową ich współdziałania z ACTH. Hamowanie sekrecji steroidów obserwowano w obecności transformującego czynnika wzrostu beta (TGF- β).

Celem badań było sprawdzenie, czy ekspresja genu *LIPE* jest regulowana przez aktywatory ścieżki sygnałowej kinazy białek A (cAMP/PKA) oraz TGF- β . Do badań wykorzystano komórki ustalonej linii raka kory nadnerczy H295R. Po osiągnięciu monowarstwy ciągłej, komórki inkubowano z aktywatorem cykazy adenylationowej – forskoliną (25 mM), TGF- β (2,5 ng/ml) jak również obydwoma substancjami razem, przez 6 lub 24 godziny. Wyizolowane metodą Chomczyńskiego i Sacchi (Anal. Biochem. 162, 156-159, 1987) całkowite RNA przepisywano odwrotnie (RT-PCR), a CEH cDNA amplifikowano przy użyciu specyficznych starterów. Produkty amplifikacji rozdzielano elektroforetycznie i analizowano densytometrycznie. Poziom ekspresji genu *LIPE* oznaczano metodą RT PCR przy pomocy aparatu LightCycler (Roche).

W wyniku sześciogodzinnej inkubacji komórek H295R z forskoliną, TGF- β i obydwoma substancjami nie zaobserwowano istotnych zmian w poziomie ekspresji genu *LIPE*. Natomiast inkubacja z forskoliną przez 24 godziny spowodowała istotny wzrost ekspresji genu *LIPE*. TGF- β nie wpływał na podstawowy poziom ekspresji genu *LIPE*, jednak istotnie zahamował efekt stymulacji ekspresji tego genu przez forskolinę.

Wnioskuje się, że ekspresja genu *LIPE* jest pobudzana przez ACTH za pośrednictwem ścieżki sygnałowej kinazy A, podczas gdy TGF- β osłabia ten efekt.

The influence of protein kinase A and TGF- β pathways on the expression of *LIPE* gene encoding hormone sensitive lipase/cholesterol esterase in H295R cells

Dawid Nowak, Marcin Hołysz, Natalia Derebecka-Hołysz, Wiesław H. Trzeciak

Department of Biochemistry and Molecular Biology, Poznań University of Medical Sciences, Poznań

Hormone-sensitive lipase/cholesteryl ester hydrolase (CEH) encoded by the *LIPE* gene catalyses the hydrolysis of triacylglycerols in adipose tissue and cholesterol esters in the adrenals, ovaries and testes. *LIPE* gene is located on chromosome 19q13.1-13.2 l.

The product of CEH – catalysed reaction, free cholesterol is used as a precursor for ACTH – controlled steroid hormones biosynthesis, CEH being one of the main targets. Transforming growth factor beta (TGF- β) decreases biosynthesis of steroid hormones in the adrenal cortex.

The main purpose of the study was to determine if cAMP/PKA and TGF- β signalling pathways regulate the level of expression of the *LIPE* gene in human adrenocortical cells.

Human adrenal cortex H295R cells were cultured to obtain a confluent monolayer. Cells were then incubated with test substances: forskolin (25 mM), TGF- β (2.5 ng/ml) or both substances together, for 6 or 24 h. Total RNA was isolated according to the method of Chomczynski and Sacchi (Anal. Biochem. 162, 156-159, 1987). PolyA⁺ RNA was reverse transcribed (RT-PCR) and fragments of cholesteryl esterase cDNA were amplified under optimal conditions, using specific primers. The CEH cDNA content was electrophoresed and quantified by densitometry. Quantitative analysis of the *LIPE* gene expression was conducted also with the use of the LightCycler System (Roche).

Incubation with forskolin, TGF- β or both substances for 6 h did not significantly affect the level of the *LIPE* gene expression, whereas incubation with forskolin for 24 h resulted in a significant increase in the expression of this gene. TGF- β did not change the basal level of the *LIPE* gene expression, while it significantly lowered the stimulatory effect of forskolin.

It was concluded that the expression of *LIPE* gene is positively regulated by ACTH via cAMP/PKA pathway, while TGF- β attenuates this effect.

Ocena stężeń wybranych czynników pro i antyangiogennych we krwi u chorych z nieczynnymi hormonalnie guzami nadnerczy

Marzena Korzeniewska², Krzysztof Kołomecki¹, Henryk Stępień³, Maciej Naze¹, Tomasz Stępień¹, Krzysztof Kuzdak¹

¹ Klinika Chirurgii Endokrynologicznej i Ogólnej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

² Oddział Anestezjologii i Intensywnej Terapii Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego im. M. Kopernika w Łodzi

³ Instytut Endokrynologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Wprowadzenie: Wzrost i rozwój guzów litych i ich przerzutów związany jest z procesem angiogenezy. Aktywność czynników pobudzających i hamujących ten proces decyduje o jego rozwoju. Czynnikiem wzrostu komórek śródbłonka naczyń (VEGF) jest jednym z najważniejszych czynników stymulujących angiogenezę. Do inhibitorów należą min. rozpuszczalne receptory naczyniowego czynnika wzrostu (sVEGFR-1, sVEGFR-2). Rozpuszczalne receptory VEGF (sVEGFR) zawierające domenę zewnątrzkomórkową receptorów, wiążącą ligand, wydają się być naturalnym antagonistą VEGF.

Cel pracy: Ocena wartości poziomu VEGF, sVEGFR-1 i sVEGFR-2 w surowicy krwi, jako markera złośliwości, u pacjentów z nieczynnymi hormonalnie guzami nadnerczy.

Materiał i metody: Badaniom zostało poddanych 27 pacjentów (18 kobiet, 9 mężczyzn: średni wiek $48 \pm 4,3$ lat) z rakiem kory nadnerczy (N=8), z guzem przerzutowym do nadnerczy (N=4) i z gruczolakiem kory nadnerczy (N=15). Próba kontrolna została odpowiednio dobrana pod względem płci i wieku ze zdrowych ochotników (N=10). Poziomy VEGF i sVEGFR w surowicy krwi były oznaczane za pomocą testu ELISA. Statystyczna analiza została przeprowadzona przy użyciu testu T-studenta, testu korelacji Pearsona i testu serii.

Wyniki: W zdrowej próbie kontrolnej średni poziom VEGF wynosił 197,2 pg/ml, sVEGFR-1 43,5 pg/ml, a sVEGFR-2 8976,3 pg/ml. U pacjentów z rakiem kory nadnerczy istotnie wyższe były poziomy VEGF (1263,8 pg/ml), a niższe sVEGFR-2 (5893,7 pg/ml) w porównaniu z grupą kontrolną ($p < 0,05$). Z drugiej strony u pacjentów z łagodnym gruczolakiem kory nadnerczy poziom VEGF (334,2 pg/ml) nie różnił się istotnie od grupy kontrolnej ($p > 0,05$), natomiast poziomy sVEGFR-1 (21,7 pg/ml) i sVEGFR-2 (7106,4 pg/ml) były istotnie niższe niż w grupie kontrolnej ($p < 0,05$). W grupie z guzami przerzutowymi poziomy VEGF (485,9 pg/ml) były istotnie wyższe, a sVEGFR-2 (5455,2 pg/ml) niższe w porównaniu z grupą kontrolną ($p < 0,05$).

Wnioski: Uzyskane wyniki badań sugerują, że oznaczenie poziomu VEGF i sVEGFR w surowicy krwi u pacjentów z nieczynnymi hormonalnie guzami nadnerczy może być zastosowane jako dodatkowy marker złośliwości guzów nadnerczy.

Assessment of pro- and antiangiogenic factors blood serum concentrations in patients with hormonal inactive adrenal tumors

Marzena Korzeniewska, Krzysztof Kołomecki, Henryk Stępień, Maciej Naze, Tomasz Stępień, Krzysztof Kuzdak

Department of Anaesthesiology and Intensive Care, Kopernik's Memorial Hospital

Introduction: The growth and persistence of solid tumors and their metastases is connected with angiogenesis. This process is determined by activity of pro-and antiangiogenic factors. VEGF is the one of the most important factors having a stimulant effect on angiogenesis. Soluble forms of VEGF receptors are inhibitors of angiogenesis. The soluble forms of VEGF receptors containing extra

cellular part of receptor, which binds ligand, seem to be real inhibitors of VEGF.

The aim of the study: Evaluation the value of serum VEGF and soluble forms of VEGF receptors concentration as a marker of malignancy in patients with hormonal inactive adrenal tumors.

Material and methods: Twenty seven patients (18 female, 9 male; mean age 48 ± 4.3 years) with adrenocortical carcinoma (N=8), adrenal metastases (N=4) and adrenocortical adenoma (N=15) were included in this study. Age- and gender- matched control samples were acquired from healthy volunteers (N=10). Serum VEGF and sVEGFR levels were determined by means of ELISA assay.

Statistical analysis was performed using the Student-t test, the Pearson's test and the series tests.

Results: In healthy controls mean VEGF level was 197.2 pg/ml, sVEGFR-1 43.5 pg/ml and sVEGFR-2 8976.3 pg/ml. Patients with adrenocortical carcinoma had, the levels of VEGF (1263.8 pg/ml) significantly higher and of sVEGFR-2 (5893.7 pg/ml) significantly lower in comparison to control group ($p < 0,05$). On the other hand the mean VEGF (334.2 pg/ml) concentration in patients with benign adrenocortical adenoma wasn't significant different than in control group ($p > 0,05$), but mean sVEGFR-1 (21.7 pg/ml) and sVEGFR-2 (7106.4 pg/ml) concentration were significantly lower than in the control ($p < 0,05$). In metastases group mean VEGF (485.9 pg/ml) level was higher and sVEGFR-2 (5455.2 pg/ml) was lower than in control group ($p < 0,05$).

Conclusion: These data suggest that determination of VEGF and sVEGFR concentration in the serum of patients with hormonal inactive adrenal tumors may be applied as an additional marker of malignancy.

Przydatność badań immunohistochemicznych markerów proliferacji i bcl-2 w diagnostyce patomorfologicznej zmian guzowatych przytarczyc

Przemysław Majewski¹, Donata Jarmołowska-Jurczyszyn¹, Jadwiga Kłosin¹, Agnieszka Górna¹, Andrzej Kluk¹, Michał Głyda², Katarzyna Łącka³

¹ Katedra Patomorfologii Klinicznej,

² Katedra Chirurgii Ogólnej, Gastroenterologicznej

i Endokrynologicznej,

³ Katedra Endokrynologii i Przemiany Materii Akademii Medycznej im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Przewlekła nadczynność przytarczyc wywołana nadmierną sekrecją parathormonu (PTH) związana jest najczęściej z występowaniem gruczolaka lub rozrostu komórek głównych przytarczyc.

Celem pracy była ocena aktywności proliferacyjnej komórek głównych i nasilenia apoptozy w zmianach rozrostowych przytarczyc.

Badania przeprowadzono u 49 chorych operowanych z powodu nadczynności przytarczyc. We wszystkich przypadkach wykonano rutynowe badanie histologiczne preparatów barwionych H+E i badanie immunohistochemiczne markerów proliferacji Ki-67, PCNA, jak również białka regulatorowego apoptozy bcl-2. Wynik reakcji immunohistochemicznych oceniano w mikroskopie świetlnym obliczając indeks barwliwości Ki-67 i PCNA,

a natężenie ekspresji cytoplazmatycznej bcl-2 oceniano półilościowo jako małe, średnie i duże. W celu obiektywizacji oceny reakcji immunohistochemicznych zastosowano komputerową analizę obrazu metodą wizualizacji przestrzennej, obliczając rzeczywisty obszar dodatniej reakcji oraz jej nasilenie.

W 38 przytarczycach pochodzących od 21 pacjentów (14 kobiet – 66,6%, średni wiek 47,8 lat i 7 mężczyzn – 33,4%, średni wiek 45,1 lat) postawiono rozpoznanie histopatologiczne hyperplazja guzowata lub hyperplazja rozlana. U 13 chorych (11 kobiet – 84,6%, średni wiek 52,2 lata i 2 mężczyzn – 15,3%, 38 i 43 lata) ustalono w 14 przytarczycach rozpoznanie histopatologiczne gruczolaka. W 21 przytarczycach pochodzących od 13 chorych (6 kobiet – 46,2%, średni wiek 47,0 lat i 7 mężczyzn – 53,8%, średni wiek 42 lata) obraz histologiczny resekowanych przytarczyc nie odbiegał od normy. U 2 pacjentów: kobiety 43-letniej i mężczyzny 47-letniego przebadano 3 przytarczycy i oceniono histologicznie jako zanikowe.

Zarówno w ocenie półilościowej w mikroskopie świetlnym jak i w przestrzennej wizualizacji komputerowej stwierdzono znacznie wyższą aktywność proliferacyjną komórek głównych w hyperplazji i w gruczolaku w porównaniu z prawidłowymi przytarczycami. Zwrócono uwagę na nieregularną i ogniskową aktywność komórek w utkaniu gruczolaka i hyperplazji. Indeks barwności był znacznie wyższy dla PCNA niż Ki-67. Badanie indeksu barwności Ki-67 i PCNA może być przydatne w rozpoznawaniu hyperplazji przytarczyc w jej wczesnej fazie rozwoju.

Natężenie reakcji cytoplazmatycznej dla bcl-2 było wyższe w grupie kontrolnej, szczególnie w przytarczycach z cechami zaniku. Natężenie reakcji cytoplazmatycznej z bcl-2 w gruczolakach i rozroście przytarczyc było znacznie słabsze w porównaniu z grupą kontrolną. Obniżenie natężenia reakcji z bcl-2 sugeruje gotowość komórek głównych do wejścia w apoptozę i świadczy, że białko bcl-2 odgrywa ważną rolę w etiopatogenezie zmian rozrostowych gruczolu przytarczycowego.

The usefulness of immunohistochemical evaluation of proliferation markers and bcl-2 in pathomorphological diagnosis of parathyroid tumors

Przemysław Majewski¹, Donata Jarmołowska-Jurczyszyn¹, Jadwiga Kłosa¹, Agnieszka Górna¹, Andrzej Kluk¹, Michał Głyda², Katarzyna Łęcka³

¹ Chair of Clinical Pathomorphology,

² Chair of General, Gastroenterologic and Endocrinologic Surgery,

³ Chair of Endocrinology and Metabolic Diseases, Poznań University of Medical Sciences, Poland

Chronic hyperthyroidism associated with oversecretion of parathormone (PTH) is most commonly caused by parathyroid adenoma or hyperplasia of the chief cells.

The aim of this study was evaluation of the proliferative activity of the chief cells and the intensity of apoptosis in hyperplastic lesions of parathyroid gland.

The studies were conducted on 49 patients who underwent surgery because of the hyperparathyroidism. In all cases routine histological examination of HE slides as well as immunohistochemical (IHC) studies on the proliferation markers (Ki-67 and PCNA) and apoptosis regula-

ting protein bcl-2 were performed. Results of IHC staining were evaluated under light microscope and stainability index for Ki-67 and PCNA was calculated. The intensity of cytoplasmic expression of bcl-2 was evaluated using semi-quantitative method as low, medium or high. For the quantification of IHC reactions a computerized image analysis with space visualization method was used, and the real area of positive reaction and its intensity were calculated.

In 38 parathyroid glands from 21 patients (14 women – 66,6%, mean age 47,8 years, and 7 men – 33,4%, mean age 45,1 years) nodular or diffused hyperplasia was diagnosed. And in 14 parathyroid glands from 13 patients (11 women – 84,6%, mean age 52,2 years, and 2 men – 15,3%, 38 and 43 years) an adenoma was diagnosed. In 21 glands from 13 patients (6 women – 46,2%, mean age 47,0 years, and 7 men – 53,8%, mean age 42 years) the histological picture was consistent with normal one. From 2 patients (43-year-old woman and 47-year-old man) 3 glands were received and diagnosed as atrophic.

In both, semi-quantitative evaluation under light microscope and computer-based space visualization method, statistically significant higher proliferative activity was found in parathyroid adenoma or hyperplasia comparing the normal glands. In adenoma and hyperplasia, an irregular and focal cell activity was observed. Stainability index was much higher for PCNA than Ki-67. The studies of the stainability index of Ki-67 and PCNA seems to be useful for an early stage of parathyroid hyperplasia diagnosis.

The intensity of cytoplasmic reaction for bcl-2 was higher in control group, especially in atrophic glands. The intensity of this reaction was significantly lower in gland hyperplasia or adenoma comparing control group. The lowering of the bcl-2 reaction intensity suggests that chief cells are ready for apoptosis and proves that bcl-2 protein plays an important role in etiopathogenesis of hyperplastic lesions of parathyroid gland.

Analiza immunohistochemiczna nacieku zapalnego w przewlekłych zapaleniach tarczycy

Donata Jarmołowska-Jurczyszyn¹, Edyta Nieruchalska¹, Jadwiga Kłosa¹, Michał Drews², Przemysław Majewski¹

¹ Katedra Patomorfologii Klinicznej,

² Katedra Chirurgii Ogólnej, Gastroenterologicznej i Endokrynologicznej Akademii Medycznej im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Przewlekłe zapalenia tarczycy to niejednorodna grupa chorób pod względem etiologii, morfologii i rokowania.

Celem pracy jest znalezienie podobieństw i różnic między naciekiem zapalnym w przewlekłym ogniskowym zapaleniu tarczycy i zapaleniu limfocytarnym typu Hashimoto.

Badania wykonano u 58 kobiet i 2 mężczyzn w wieku od 22 do 67 lat, średnio 44,6 lat. Wszyscy ci chorzy byli operowani z powodu wola guzkowego. W dwóch przypadkach przed operacją podejrzewano raka tarczycy, a w jednym klinicznie sugerowano zapalenie. We wszystkich przypadkach wykonano rutynowe badanie histolo-

giczne materiału operacyjnego oraz badania immunohistochemiczne CD 20 (limfocyty B), CD 43 (limfocyty T), CD 8 (limfocyty T cytotoksyczne), CD 68 (makrofagi), CD 15 (granulocyty obojętnochłonne) i S 100 (komórki dendrytyczne). Ekspresję markerów immunohistochemicznych oceniano ilościowo w mikroskopie świetlnym. Celem obiektywizacji wyników badania wykonano również komputerową analizę stosując metodę wizualizacji przestrzennej, obliczając rzeczywisty obszar reakcji barwnej.

Na podstawie badania histologicznego w 25 przypadkach rozpoznano przewlekłe ogniskowe zapalenie tarczycy i podzielono je na IV klasy w zależności od liczby ognisk zapalenia. W 25 dalszych przypadkach ustalono rozpoznanie histopatologiczne zapalenia limfocytarnego typu Hashimoto. Do tej grupy chorych zaliczyliśmy tylko tych, których obraz mikroskopowy tarczycy spełniał wszystkie klasyczne kryteria choroby – intensywny naciek zapalny z tworzeniem grudek chłonnych, obecność onkocytów, włóknienie i destrukcja pęcherzyków. Ostatnią grupę chorych stanowiło 10 pacjentek z wolem koloidowym bez odczynu zapalnego.

W badaniu immunohistochemicznym stwierdzono obecność limfocytów B, głównie w centrach rozmnażania grudek chłonnych, limfocyty T występowały natomiast na ich obrzeżach. Tylko w małych ogniskach limfocyty T i B były przemieszane. W przypadku małego nasilenia zmian zapalnych ogniska zapalne miały charakter zwarty – w odróżnieniu od intensywnego zapalenia, gdzie obwodowe limfocyty T były rozproszone pomiędzy pęcherzykami tarczycy. Stwierdzono większą ekspresję cytotoksycznych limfocytów T w chorobie Hashimoto. Również liczba makrofagów była w tej chorobie wyższa. W żadnym z badanych przypadków nie obserwowano granulocytów obojętnochłonnych w składzie nacieku zapalnego. Komórki dendrytyczne występowały ogniskowo, pojedynczo zarówno w zapaleniach ogniskowych jak i limfocytarnych typu Hashimoto. W dwóch przypadkach wola koloidowego w badaniu immunohistochemicznym stwierdzono małe ogniska zapalne złożone z limfocytów B i T.

Na podstawie przeprowadzonych badań wydaje się, że istotną rolę w patogenezie przewlekłych zapaleń tarczycy odgrywają limfocyty T cytotoksyczne i makrofagi, których liczba wzrasta wraz z nasileniem procesu zapalnego.

Immunohistochemical analysis of inflammatory infiltrate in chronic thyroiditis

Donata Jarmołowska-Jurczyszyn¹,
Edyta Nieruchalska¹, Jadwiga Kłosińska¹,
Michał Drews², Przemysław Majewski¹

¹ Chair of Clinical Pathomorphology,

² Chair of General, Gastroenterologic and Endocrinologic Surgery,
Poznań University of Medical Sciences, Poland

Chronic thyroiditis is an heterologic group of diseases in regard of etiology, morphology and prognosis.

The aim of the present study was assessment of similarities and differences in the inflammatory infiltrate in chronic focal thyroiditis and lymphocytic thyroiditis of Hashimoto.

The following studies were performed on resected goiters from 58 women and 2 men aged from 22 to 67

years (mean 44.6). In two cases pre-operative diagnosis suggested a thyroid cancer and in one a clinical suspicion of thyroiditis occurred. In all cases routine histological examination was done. Additionally, the following immunohistochemical stainings were performed: CD 20 (B lymphocytes), CD 43 (T lymphocytes), CD 8 (cytotoxic T lymphocytes), CD 68 (macrophages), CD 15 (neutrophils) and S 100 (dendritic cells). The expression of immunohistochemical markers was evaluated under light microscope using semi-quantitative method. For the quantification of immunohistochemical reaction a computer-based image analysis with space visualization method was used for calculations of the real area of positive reaction.

On the base of histological examination in 25 cases a chronic focal thyroiditis was diagnosed and classified into four classes according to the number of inflammatory foci. In the next 25 cases lymphocytic thyroiditis of Hashimoto was diagnosed. In this group there were only cases where all classic microscopic criteria for lymphocytic thyroiditis of Hashimoto were fulfilled (e.g. intensive inflammatory infiltrate with lymphoid follicles, presence of oncocytes, follicles destruction and fibrosis). The last studied group consisted of colloid goiters without inflammatory infiltrate taken from 10 female patients.

In the immunohistochemical studies we found B lymphocytes occurring mainly in the germinal centers of the lymphoid follicles, and T lymphocyte at the periphery of the follicles. Only in small foci T and B lymphocytes were mixed. With the lower number of the inflammatory foci they were more condense. It was dissimilar with the intense inflammatory infiltrates where peripheral T lymphocytes were dispersed between follicles. In Hashimoto thyroiditis a higher expression of cytotoxic T lymphocytes as well as increased number of macrophages was found. There were no neutrophils found in all studied cases. Single dendritic cells were found focally, both in focal chronic thyroiditis and lymphocytic thyroiditis of Hashimoto. In two cases of colloid goiter we found small inflammatory foci composed of T and B lymphocytes.

On the base of this study it seems, that an important role in chronic thyroiditis is played by cytotoxic T lymphocytes and macrophages, as their number increases with the severity of inflammatory process.

Przerzuty raka brodawkowatego tarczycy (RBT) do węzłów chłonnych w badaniu immunohistochemicznym i molekularnym.

Krzysztof Kaczka¹, Izabela Wójcik², Maria Matejkowska³, Krzysztof Kuzdak¹, Lech Pomorski¹

¹ Klinika Chirurgii Endokrynologicznej i Ogólnej, Uniwersytet Medyczny, Łódź

² Zakład Patologii Molekularnej i Neuropatologii Uniwersytet Medyczny, Łódź

³ Zakład Patomorfologii, Szpital im. M. Kopernika, Łódź

Wstęp: Całkowita tyreoidektomia z limfadenektomią jest najczęściej wykonywaną operacją w przypadku RBT. Zakres resekcji węzłów chłonnych jest sprawą dyskusyjną. Według niektórych publikacji, przerzuty w węzłach chłonnych nie wpływają na przeżycia odległe, w związku z tym selektywna resekcja węzłów chłonnych jest wystarczającą operacją. Inni autorzy podkreślają, że

wznowa miejscowa, najgorszy czynnik prognostyczny, pojawia się najczęściej w węzłach chłonnych, sugerując bardziej radykalny zabieg operacyjny. Aby rozwiązać ten problem próbujemy znaleźć właściwsze od histopatologii metody oceny węzłów chłonnych.

Cel pracy: Porównanie wyników wykrywania przerzutów RBT w węzłach chłonnych za pomocą badania immunohistochemicznego i badania RT-PCR mRNA dla tyreoglobuliny.

Materiał i metodyka: Każdy z 184 węzłów chłonnych uzyskanych od 21 pacjentów operowanych w naszej Klinice z powodu RBT podzielono na 2 części: jedną z nich zbadano za pomocą badania histopatologicznego i immunohistochemicznego, w drugiej poszukiwano mRNA dla tyreoglobuliny. W badaniu immunohistochemicznym wykorzystano specyficzne przeciwciała przeciwko tyreoglobulinie.

Wyniki: Zaobserwowano 100% zgodność wyników pomiędzy badaniem immunohistochemicznym i histopatologicznym. Dla immunohistochemii i RT-PCR odmienne wyniki uzyskano dla 6 (25%) osób. U 4 (16,7%) pacjentów badanie RT-PCR było bardziej czułe w wykrywaniu przerzutów, a u 2 (8,3%) pacjentów ujawniło ono mniej zajętych węzłów chłonnych niż immunohistochemia. U reszty pacjentów nie obserwowano różnic w wynikach. Czternastu (58,3%) z nich nie miało przerzutów w węzłach chłonnych, 4 (16,7%) miało zajęte te same węzły chłonne we wszystkich badaniach.

Wnioski:

- 1) RT-PCR dla Tg mRNA jest właściwą metodą dla wykrywania komórek RBT.
- 2) W połączeniu z innymi badaniami może ono pomóc w określeniu obecności przerzutów raka brodawkowatego tarczycy w węzłach chłonnych.

Lymph node metastases of papillary thyroid cancer in immunohistochemical and molecular examination - preliminary report

Krzysztof Kaczka¹, Izabela Wójcik², Maria Matejkowska³, Krzysztof Kuzdak¹, Lech Pomorski¹

Department of Endocrinological and General Surgery, Medical University of Łódź

Background: Total thyroidectomy with lymphadenectomy is the most typical operation in a case of papillary thyroid cancer. Range of lymph node resection still remains a matter of controversy. In some publications treatment of lymph node metastases doesn't affect survival, so only selective lymph node resection is the extended enough operation. The others remark that local relapse- the worst prognostic factor, appears the most often in the lymph nodes, so they suggest more aggressive treatment. To solve that problem we try to find more sensitive methods to examine lymph nodes.

Aim: To compare the results of detection lymph node metastases of papillary thyroid cancer by immunohistochemistry with the results of RT-PCR for Tg mRNA.

Material and methods: Each of one hundred eighty four cervical lymph nodes obtained from 24 patients, operated in our Department was divided into 2 halves: one was used for conventional histopathology and immunohistochemistry, the other part was investigated by RT-PCR for Tg mRNA. Immunohistochemical staining for Tg was

performed on formalin-fixed, paraffin-embedded sections with anti-Tg antibodies.

Results: According to routine, histopathological examination 8 (33,5%) patients had involved lymph nodes. One hundred correspondence of the results of immunohistochemistry and histopathology was observed. We obtained different results of examination of the lymph nodes in six (25%) patients. In four patients (16,7%) RT-PCR was more sensitive in detection of positive lymph nodes, in two patients (8,3%) it revealed less metastasized lymph nodes than immunohistochemistry. The remaining 18 patients didn't have any differences, fourteen (58,3%) of them had the negative lymph nodes and four (16,7%) had positive, the same lymph nodes in all examinations. Finally, according to RT-PCR 10 (41,7%) of the patients had metastasized lymph nodes.

Conclusion: Tg RT-PCR is a sensitive method of detection of papillary thyroid cancer cells and may help to detect the metastases of papillary thyroid cancer in regional lymph nodes.

Immunohistochemiczna ocena receptorów gamma aktywowanych proliferatorami peroksysomów w ludzkich gruczolakach przysadki: ujemna korelacja z markerem proliferacji (PCNA)

Katarzyna Winczyk i Marek Pawlikowski

Zakład Endokrynologii Doświadczalnej i Diagnostyki Hormonalnej, Instytut Endokrynologii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Receptory gamma aktywowane proliferatorami peroksysomów (PPAR γ) są receptorami jądrowymi, które biorą udział w wielu procesach patologicznych takich jak: dyslipidemia, cukrzyca, miażdżycy, zapalenie i karcinogeneza. Liczne badania wykazały, że aktywacja receptorów PPAR γ wywiera antyproliferacyjne, proróżnicujące i proapoptotyczne działanie na różne komórki nowotworowe. Ostatnio udowodniono, że agoniści PPAR γ hamują wzrost doświadczalnych i samoistnych gruczolaków przysadki w warunkach *in vitro* oraz hamują wzrost doświadczalnych, zwierzęcych guzów przysadki w warunkach *in vivo*. Ponadto w gruczolakach przysadki stwierdzono nadekspresję receptorów PPAR γ .

W prezentowanej pracy badaliśmy występowanie receptorów PPAR γ w ludzkich gruczolakach przysadki i w przysadkach niezmiennych nowotworowo. Ponadto oceniliśmy korelację pomiędzy receptorami PPAR γ i antygenem jądrowym komórek proliferujących (PCNA) będącym immunohistochemicznym markerem proliferacji. Zbadano 50 gruczolaków przysadki (11 somatotropinoma, 8 prolaktinoma, 10 kortykotropinoma, 14 gonadotropinoma i 7 gruczolaków hormonalnie immunonegatywnych) oraz 6 niezmiennych nowotworowo przysadek. Receptory PPAR γ i PCNA uwidoczniło metodami immunohistochemicznymi, stosując odpowiednio poliklonalne przeciwciała anti-PPAR γ lub monoklonalne przeciwciała anti-PCNA.

Obecność receptorów PPAR γ wykazano we wszystkich badanych tkankach. Liczba komórek z dodatnim odczynem jądrowym była średnio 3-krotnie wyższa

w gruczolakach w porównaniu z niezmienionymi nowotworowo przysadkami. Najsilniejszą ekspresję receptorów PPAR γ stwierdzono w gruczolakach somatotropowych. Oprócz odczynu jądrowego typowego dla receptorów PPAR γ zaobserwowano także dodatni odczyn w cytoplazmie. Był on zdecydowanie silniejszy w gruczolakach niż w niezmienionych nowotworowo w przysadkach. Statystyczna analiza wykazała ujemną korelację pomiędzy PPAR γ i PCNA we wszystkich gruczolakach przysadki, z wyjątkiem guzów hormonalnie immunonegatywnych.

Podsumowując możemy stwierdzić, że nasze wyniki badań potwierdzają istotną rolę receptorów PPAR γ w hamowaniu proliferacji komórkowej, a wykazana w pracy wysoka ekspresja receptorów PPAR γ w gruczolakach przysadki daje możliwość zastosowania agonistów PPAR γ (tiazolidinedionów) w leczeniu guzów przysadki.

Immunohistochemical detection of peroxisome proliferator-activated receptors gamma in the human pituitary adenomas: negative correlation with proliferation marker (PCNA)

Katarzyna Winczyk and Marek Pawlikowski

Department of Experimental Endocrinology and Hormone Diagnostics, Institute of Endocrinology, Medical University of Lodz

The peroxisome proliferator-activated receptors gamma (PPAR γ) are nuclear receptors which participate in several pathological processes including dyslipidemia, diabetes, atherosclerosis, inflammation and carcinogenesis. Many investigations indicated that activation of PPAR γ exerts antiproliferative, prodifferentiation and proapoptotic effects on various carcinoma cells. Recently, it was shown that PPAR γ agonists inhibited the growth of experimental and spontaneous pituitary adenomas *in vitro* and the growth of experimental animal pituitary tumors *in vivo*. Moreover in pituitary adenomas, the overexpression of PPAR γ was found compared with normal tissues.

In the present study, we estimated the occurrence of PPAR γ receptors in the human pituitary adenomas and in the non-tumoral human pituitary gland. Additionally the correlation between PPAR γ receptors and the proliferating cells nuclear antigen (PCNA) – immunohistochemical proliferation marker was evaluated. Fifty surgically removed pituitary adenomas (11 somatotropinomas, 8 prolactinomas, 10 corticotropinomas, 14 gonadotropinomas and 7 immunonegative adenomas) and six non-tumoral pituitary glands were investigated. The PPAR γ and PCNA were detected by immunohistochemical methods using polyclonal anti-PPAR γ and monoclonal anti-PCNA antibodies, respectively.

The occurrence of PPAR γ was shown in all examined tissues. The mean number of cells with positive nuclear reaction was 3-fold higher in pituitary adenomas in comparison with non-tumoral pituitary glands. The strongest expression of PPAR γ was found in somatotropinomas. Besides the nuclear reaction, which is typical for PPAR γ , the positive immune reaction was observed also in cytoplasm. It was clearly stronger in pituitary adenomas than in non-tumoral pituitaries. Statistical analysis indicated a negative correlation between PPAR γ

and PCNA in all pituitary adenomas, with except the hormone immunonegative tumors.

Summing up, our findings confirm an essential role of PPAR γ in inhibition of cell proliferation. The high expression of PPAR γ receptors in pituitary adenomas creates the possibility to use of PPAR γ agonists (like thiazolidinediones) in the treatment of pituitary tumors.

Wpływ endogennych (leptyna) i egzogennych regulatorów łaknienia (diazepam i chlorpromazyny) na wydzielanie naczyniowo - śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF) oraz proliferację komórek śródbłonka naczyniowego HECa10 *in vitro*

Jan Komorowski, B. Misztal-Dethloff, Henryk Stępień

Institut Endokrynologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Leptyna jest peptydowym hormonem odpowiedzialnym za kontrolę równowagi energetycznej organizmu. Stwierdzono, że powszechnie stosowane leki należące do grupy tzw. małych (pochodne benzodiazepiny) i dużych trankwilizatorów (pochodne fenotiazyny) wpływają na pobór pokarmu.

Celem badań było określenie wpływu leptyny oraz diazepam i chlorpromazyny na proliferację oraz wydzielanie śródbłonkowo-naczyniowego czynnika wzrostu (VEGF) z komórek śródbłonka mysiego HECa10 *in vitro*.

Badania zostały przeprowadzone w warunkach *in vitro* na modelu komórek unieśmiertelnionej mysiej linii śródbłonka HECa10. Do badań zastosowano rekombinowaną mysię leptynę (R&D Systems, USA) w stężeniach: 0,5 ng/ml, 5 ng/ml, 25 ng/ml, 250 ng/ml, diazepam (Relanium, Polfa) i chlorpromazynę (Fenactil, Polfa) w stężeniach: 10⁻⁴M, 10⁻⁵M, 10⁻⁶M oraz 10⁻⁷M. Proliferacja komórek śródbłonka została oceniona po 24 i 72 godzinach (metodą według Mosmanna I., Immunol. Meth., 1983; 65: 55-63), a wydzielanie mysiego VEGF do medium inkubacyjnego metodą ELISA (R&D Systems, USA).

Nie stwierdzono wpływu leptyny, we wszystkich badanych stężeniach, na proliferację komórek HECa10 w 24-godzinnej hodowli komórkowej. Natomiast po 72-godzinnej inkubacji leptyna w stężeniach: 5 ng/ml i 25 ng/ml pobudzała proliferację komórek śródbłonka.

Leptyna w stężeniu 0,5 ng/ml, 5 ng/ml i 25 ng/ml nasilała uwalnianie VEGF do medium inkubacyjnego w hodowli 24-godzinnej. Leptyna w stężeniach: 0,5 ng/ml, 5 ng/ml oraz 25 ng/ml zwiększała uwalnianie VEGF do medium w hodowli 72-godzinnej.

Diazepam w stężeniach: 10⁻⁴M w hodowli 24-godzinnej i w hodowli 72-godzinnej hamował proliferację komórek śródbłonka. Nie stwierdzono natomiast wpływu na wydzielanie VEGF z hodowli komórek endotelium.

Chlorpromazyna w stężeniach: 10⁻⁵M i 10⁻⁴M w hodowli 24-godzinnej hamowała proliferację komórek. Stwierdzono również hamujące działanie tego związku w 72-godzinnej hodowli, w stężeniach: 10⁻⁶M, 10⁻⁵M i 10⁻⁴M. Chlorpromazyna wpływała także hamująco na wydzielanie VEGF w hodowli 24-godzinnej, w stężeniach: 10⁻⁵M i 10⁻⁴M oraz w hodowli 72-godzinnej, w stężeniach: 10⁻⁵M i 10⁻⁴M.

Wniosek: Leptyna wykazuje właściwości pobudzające, a badane neuroleptyki (diazepam i chlorpromazyna) hamujące, na mechanizmy angiogenezy in vitro.

The effect of endogenous (leptin), and exogenous (diazepam and chlorpromazine) appetite regulators on proliferation activity and vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion from cultured endothelial cells HECa10 in vitro

Jan Komorowski, B. Misztal-Dethloff, Henryk Stepień

Institute of Endocrinology, Medical University of Lodz

Leptin the product of the *ob* gene, a plasma protein secreted by adipocytes, plays a key role in the regulation of body weight, controlling food consumption, sympathetic nervous system activation and thermogenesis. Leptin is a pleiotropic hormone is involved in regulatory processes in immunity, inflammation, hematopoiesis and angiogenesis. It is also known that some of commonly used neuroleptic drugs (diazepam and chlorpromazine) are modulators of food intake.

Angiogenesis, the development of new blood vessels, is required for normal tissue repair and also for tumor cell proliferation, extracellular matrix invasion, and hematogenous metastases. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is an endothelial cell-specific mitogen proved to play a key role in neovascularization.

We have studied the effect of leptin, the hormone of adipose tissue, and chlorpromazine and diazepam on proliferation activity and VEGF release from murine endothelial cells HECa10 cultured in vitro.

The proliferation activity of HECa10 cells were studied by Mosmann and VEGF release by ELISA methods.

Murine leptin in concentrations from 5 to 25 ng/ml stimulated the proliferation activity of 72 h endothelial cell cultures and in concentrations from 0.5 to 25 ng/ml augmented the secretion of VEGF into supernatants of 24 h and 72 h cultured cells.

Diazepam in concentrations of 10^{-4} M diminished the proliferation activity of 24 h and 72 h cultured cells without any influence on VEGF release.

Chlorpromazine in concentrations from 10^{-6} M to 10^{-4} M diminished the proliferation activity and in concentration from 10^{-5} M to 10^{-4} M inhibited VEGF secretion into supernatants of 24 h or 72 h endothelial cell cultures.

In conclusion, leptin stimulated but diazepam and chlorpromazine inhibited angiogenesis in vitro.

Angiotensyna III moduluje aktywność kinaz tyrozynowych w przysadce mózgowej szczura

Elżbieta Rębaś¹, Agnieszka Lachowicz-Ochędalska²

¹ Instytut Fizjologii i Biochemii,

² Zakład Endokrynologii Doświadczalnej i Diagnostyki Hormonalnej Instytutu Endokrynologii Uniwersytet Medyczny, Łódź

Angiotensyna III (Ang III) jest jednym z peptydów należących do rodziny angiotensyn, biologicznie aktywnych związków biorących udział w wielu ważnych komórkowych procesach, między innymi w procesach proliferacji komórek przysadki. Ang III jest produktem przekształcenia Ang II przy udziale aminopeptydazy A, lecz biologiczne znaczenie, jak również typ receptora, poprzez który działa, nie są jeszcze poznane. Wykazano, że obecność niektórych peptydów będących pochodnymi angiotensyny II, jak np. Ang IV, (ale nie Ang II) mogą wpływać na aktywność białkowych kinaz tyrozynowych (PTKs).

Celem pracy było zbadanie, czy Ang III (fragment 2-8 angiotensyny II) także może zmieniać aktywność tych enzymów.

Źródłem badanych enzymów był homogenat przysadki szczura. Jako substratu użyliśmy sztucznego związku specyficznego dla kinaz tyrozynowych – polyGlu,Tyr. Reakcja fosforylacji prowadzona była w obecności radioaktywnego γ 32P-ATP. Próby były preinkubowane w obecności Ang III w stężeniach od 10^{-6} M do 10^{-11} M. Otrzymane wyniki porównywano z próbą kontrolną nie zawierającą peptydu (tzw. podstawowa aktywność kinaz tyrozynowych), która wynosiła 260-300 pmoli 32P wbudowanego w substrat/ mg białka/ w ciągu 1 min).

Wyniki nasze wskazują, że Ang III posiada hamujący wpływ na fosforylację polyGlu,Tyr przez kinazy tyrozynowe. Najsilniej wpływ ten zaznaczył się przy stężeniach 10^{-6} M, 10^{-9} M oraz 10^{-11} M a stopień ufosforylowania substratu wynosił 56 – 89% wartości kontrolnych i był zależny od stężenia Ang III.

Ang III wydaje się być kolejnym peptydem z rodziny angiotensyn, mogącym modulować aktywność kinaz tyrozynowych w przysadce szczura, i w ten sposób odgrywać istotną rolę w powstawaniu guzów przysadki.

Badania finansowane były z grantu Uniwersytetu Medycznego w Łodzi N° 502-11-188

Angiotensin III modifies the protein tyrosine kinases activity in rat anterior pituitary

Elżbieta Rębaś¹, Agnieszka Lachowicz-Ochędalska²

¹ Institute of Physiology and Biochemistry

² Institute of Experimental Endocrinology Medical University of Lodz, Poland

Angiotensin III (Ang III) is the one of peptide from family of angiotensins, biological active compounds involved in many important processes, among others in proliferation of the anterior pituitary cells. Ang III is the product of angiotensin II conversion by aminopeptidase A, but its biological role, as well as receptors is not clear yet. It was shown, that some of angiotensin derivatives peptides, like angiotensin IV but not angiotensin II, could modulate activity of protein tyrosine kinases (PTKs). The aim of our study was to explain, if the angiotensin III (the 2-8 fragment of angiotensin) has effect on protein phosphorylation by PTKs in rat anterior pituitary.

Homogenates of male rat pituitaries were the source of tested enzymes. We used specific synthetic polyGlu,Tyr as a PTKs substrate. The γ -32P-ATP was donor of

phosphorus in reaction of phosphorylation. The reaction was carry out in presence of Ang III in concentration from 10^{-6} M to 10^{-11} M. The obtained results we compared to control samples not contained studied peptide (basal activity of PTKs activity in rat pituitary amount 260-300 pmoles of 32 P incorporated with polyGlu,Tyr on 1 mg of protein during 1 min).

Our results showed that Ang III has an inhibitory effect on polyGlu,Tyr phosphorylation by protein tyrosine kinases in rat anterior pituitary. The maximal influence was observed at concentration 10^{-6} M, 10^{-9} M and 10^{-10} M and the degree of 32 P incorporation to substrate amounted 56 – 89 % of control value in dependence on Ang III concentrations.

Ang III appears as the next peptide from angiotensins family, which can change PTKs activity in the anterior pituitary, and thus can play role in origin of pituitary tumors.

This study was supported by Medical University of Lodz grant N° 502-11-188

SESJA 6

Trijodotyronina (T_3) jako dominujący sygnał hormonalny dla wywołania spermatogenezy

Renata Walczak-Jędrzejowska, Jolanta Słowikowska-Hilczer, Katarzyna Marchlewska, Elżbieta Oszukowska, Anna Gumińska i Krzysztof Kula

Zakład Andrologii i Endokrynologii Płodności, Instytut Endokrynologii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Ekspresja genu receptora dla hormonu tarczycy (TR) w jądrze szczura jest wysoka po urodzeniu i zanika pomiędzy 15 a 20 dniem życia. Z kolei transkrypcja receptora dla FSH wzrasta od porodu do 7 dnia, od kiedy pozostaje na stałym poziomie. Pourodzeniowa ekspresja TR zbiega się z postępem pierwszej spermatogenezy do komórek mejotycznych co sugeruje, że T_3 może brać udział w wywołaniu spermatogenezy.

Celem pracy było zbadanie zapoczątkowania i zmian w wydzielaniu T_3 i FSH u noworodków szczura oraz odniesienie ich do postępu pierwszej spermatogenezy.

Grupy liczące od 8 do 12 szczurów były uśmiercane pomiędzy 2 a 16 dniem życia w odstępach 2-u dniowych. Krew pobierano do oznaczania wolnej T_3 (fT_3) i FSH.

Zakres pomiarów dla fT_3 mieścił się pomiędzy 0 – 30 pg/ml (AxSYM System, Abbot) a dla FSH – pomiędzy 1,6 i 50 ng/ml (Amersham Life Science Ltd). W skrawkach histologicznych jąder badano zaawansowanie spermatogenezy. Pojawienie się 6 dnia pierwszych spermatogonii A poprzedzone było wzrostem poziomu zarówno fT_3 (od $0,3 \pm 0,1$ w 2 dniu życia do $1,2 \pm 0,1$ pg/ml w 6 dniu) jak i FSH (od $3,3 \pm 2,2$ w 2 dniu życia do $7,6 \pm 4,8$ ng/ml w 6 dniu). Z kolei, pojawienie się pierwszych spermatogonii B, spermatocytów preleptotenu (w 12 dniu życia) oraz spermatocytów pachytenu (w 14 dniu życia) poprzedzone było dalszym wzrostem poziomu fT_3 (od $1,3 \pm 0,2$ w 12 dniu życia do $2,0 \pm 0,7$ pg/ml w 16 dniu) oraz spadkiem poziomu FSH (od $8,5 \pm 0,4$ w 10 dniu życia do $3,2 \pm 1,4$ ng/ml w dniu 16).

Wnioski: 1) Różnicowanie gonocytów do pierwszych spermatogonii zbiega się z zapoczątkowaniem wydzielania zarówno T_3 jak i FSH, co wskazuje na rolę obu hormonów w tym etapie. 2) Różnicowanie pierwszych spermatogonii do komórek mejotycznych poprzedzone jest wzrostem wydzielania T_3 i spadkiem wydzielania FSH. 3) Przy zapoczątkowaniu spermatogenezy rola T_3 może być dominująca.

Praca Własna UM w Łodzi, nr 502-11-017.

Triiodothyronine (T_3) as dominant hormonal signal to evoke spermatogenesis

Renata Walczak-Jędrzejowska, Jolanta Słowikowska-Hilczer, Katarzyna Marchlewska, Elżbieta Oszukowska, Anna Gumińska and Krzysztof Kula

Department of Andrology and Reproductive Endocrinology, Institute of Endocrinology, Medical University of Łódź

In rats' testes thyroid hormone receptor (TR) expression is high after birth and disappears after 15–20 days of life. In turn, FSH receptor transcription starts at birth and increases up to 7 days of age, when remains stable. The postnatal expression of TR coincides with the progression of first spermatogenesis up to meiotic cells what suggests that T_3 may participate in evocation of spermatogenesis. We aimed to investigate initiation and pattern of T_3 and FSH secretory changes in newborn/peripubertal rats and to relate these changes to progression of first spermatogenesis. Groups of 8 to 12 animals were autopsied with two days intervals, between 2nd and 16th day after birth. Blood was collected for free T_3 (fT_3) and rat-FSH determinations. The capacity of fT_3 measurement ranged between 0-30pg/ml (AxSYM System, Abbot) and for rat-FSH between 1,6 and 50ng/ml (Amersham Life Science Ltd.). Qualitative analysis of the spermatogenesis advance was performed in histological sections. The appearance of first A spermatogonia on 6 day of life follows the increase in fT_3 (from $0,3 \pm 0,1$ on 2 day to $1,2 \pm 0,1$ pg/ml on 6 day) and FSH (from $3,3 \pm 2,2$ on 2 day to $7,6 \pm 4,8$ ng/ml on 6 day) levels. In turn, the appearance of first B spermatogonia, preleptotene spermatocytes (on 12 day) and pachytene spermatocytes (on 14 day) follows the further increase of fT_3 (from $1,3 \pm 0,2$ on 12 day to $2,0 \pm 0,7$ pg/ml on 16 day) but decrease in FSH level (from $8,5 \pm 0,4$ on 10 day to $3,2 \pm 1,4$ ng/ml on 16 day). Conclusions: 1) Differentiation of gonocytes into first spermatogonia coincides with the initiation of both T_3 and FSH secretion, what indicates a role of T_3 and FSH in this initial step. 2) Differentiation of first spermatogonia into meiotic cells follows the increase in T_3 and fall of FSH secretion, indicating the predominant role of T_3 over FSH in premeiotic steps of first spermatogenesis.

Grant of Medical University of Łódź, no. 502-11-017

Pobudzający i hamujący wpływ triiodotyroniny (T_3) na zapoczątkowanie spermatogenezy u szczura

Katarzyna Marchlewska, Jolanta Słowikowska-Hilczer, Renata Walczak-Jędrzejowska, Elżbieta Oszukowska i Krzysztof Kula

Zakład Andrologii i Endokrynologii Płodności, Instytut Endokrynologii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Noworodki szczurze płci męskiej poddawano codziennym wstrzyknięciom T_3 w dawce 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ m.c. przez okres różnicowania gonocytów (G) do spermatogonii, tj. między 1. a 5. dniem życia w doświadczeniu krótkotrwałym (autopsja w 6 dobie) (I); krótkotrwałym-przebiegowym (II): T_3 od 1. do 5. doby, autopsja w 16. dobie, i ciągłym (III): T_3 od 1. do 15. doby (autopsja w 16. dobie). Krew pobierano do oznaczenia poziomów hormonów: T_3 (fT_3), FSH i prolaktyny. W preparatach histologicznych przeprowadzono ilościową analizę nabłonka plemnikotwórczego. Określano liczbę komórek na jądro. Badano także występowanie komórek wykazujących ekspresję jądrowego antygenu proliferacji komórkowej (PCNA). W dośw. I i III średni poziom FSH we krwi nie zmienił się, podczas gdy w dośw. II wzrósł ($5,7 \pm 4,9$ vs $3,4 \pm 1,6$ ng/ml w kontr.; $p < 0,05$). Średni poziom prolaktyny wzrósł we wszystkich dośw. Średnia masa jąder wzrosła w dośw. II (138,5% kontr. $p < 0,01$), a zmalała w dośw. III (85,2% kontr. $p < 0,05$). Liczba PCNA-dodatnich komórek Sertoliego obniżyła się znacząco w dośw. I (84,3% kontr., $p < 0,01$) i II (17,3% kontr., $p < 0,01$), a w III spadła prawie do zera. Dojrzewanie komórek Sertoliego (wyrażone formowaniem światła kanalików) wzrosło ponad 10-krotnie w II i III dośw. T_3 pobudzała różnicowanie G w dośw. I: średnia liczba G obniżyła się do 38% kontr., a średnia liczba spermatogonii A (SgA) wzrosła do 470% $p < 0,001$. W dośw. II obserwowano wzrost liczby przedmeiotycznych komórek plemnikotwórczych: liczba SgA obniżyła się do 62,9% kontr. a liczba SgB, spermato-cytów preleptotenu i pachytenu wzrosły od 148 do 342%. Niespodziewanie w dośw. III liczba wszystkich komórek plemnikotwórczych obniżyła się do 67-25% kontr.

Wnioski: 1) T_3 pobudza różnicowanie G do pierwszych spermatogonii w krótkim okresie do 5 dni po urodzeniu. 2) Ten wczesny efekt daje wzrost liczby pierwszych komórek meiotycznych. 3) Przy ciągłym podawaniu, T_3 wywołuje przedwczesne dojrzewanie komórek Sertoliego, co hamuje wzrost jąder i zainicjowanie spermatogenezy.

Praca własna UIM, nr 502-11-017.

Stimulatory and inhibitory effects of triiodothyronine in the initiation of spermatogenesis in rats

Katarzyna Marchlewska, Jolanta Słowikowska-Hilczer, Renata Walczak-Jędrzejowska, Elżbieta Oszukowska, Krzysztof Kula

Department of Andrology and Reproductive Endocrinology, Institute of Endocrinology, Medical University of Łódź

In newborn male rats T_3 (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ b.w.) was daily injected during the period of differentiation of gonocytes

(G) into first spermatogonia, i.e. between 1st and 5th postnatal days in short (autopsy on 6th day) (I) and transient (autopsy on 16th day) (II) experiments. In the third experiment rats were injected continuously from 1st to 15th day (autopsy on 16th day) (III). Blood was collected for free T_3 (fT_3), FSH and prolactin measurements. Quantitative analysis of the seminiferous epithelium was performed in histological sections. Cell numbers were expressed per testis. Percentage of cells positive for proliferative cell nuclear antigen (PCNA) was evaluated. In I and III mean FSH level didn't change, whereas in II increased ($5,7 \pm 4,9$ vs $3,4 \pm 1,6$ ng/ml in contr.; $p < 0,05$). In all experiments serum prolactin was significantly elevated. Mean testicular weight increased in II (138% of contr., $p < 0,01$) and reduced in III (85,2% of contr., $p < 0,05$). PCNA-positive Sertoli cells were significantly reduced in I (84,3% of contr., $p < 0,01$) and II (17,3% of contr., $p < 0,01$), and were absent in III. Sertoli cells maturation (measured by tubular lumen formation) was increased more than 10 times in II and III. T_3 stimulated differentiation of G in I: while mean number of G was reduced to 38% of contr., the number of A spermatogonia (SgA) rose to 470%, the number of A spermatogonia (SgA) rose to 470%, the number of B spermatogonia, preleptotene and pachytene spermatocytes increased from 148% to 342%. Unexpectedly in III the numbers of germ cell reduced to 67-25% of contr. Conclusions: 1) T_3 stimulates differentiation of G into first spermatogonia, within the short time frame of 5 days after birth. 2) This early effect results in numerical acceleration of first meiotic cells. 3) Continuous treatment with T_3 induces precocious maturation of Sertoli cells, which inhibits testicular growth and initiation of spermatogenesis.

Grant of Medical University of Łódź, no 502-11-017.

Estradiol z testosteronem, ale żaden z hormonów osobno, odbudowują pierwszą spermatogenezę, uszkodzoną przez antagonistę GnRH

Renata Walczak-Jędrzejowska, Jolanta Słowikowska-Hilczer, Wojciech Tkaczyński¹, Krzysztof Kula

Zakład Andrologii i Endokrynologii Płodności,
¹Zakład Farmakologii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

GnRH bezpośrednio pobudza czynność komórek Leydiga. Aby zbadać względną rolę testosteronu (T) i estradiolu (E) przy zapoczątkowaniu spermatogenezy, niedojrzałym samcom szczura podawano antagonistę GnRH (Ant) oddzielnie lub w połączeniu z T lub E. Pomiędzy 5. a 15. dniem życia szczury otrzymywały codziennie 5 $\mu\text{g}/10$ g m.c. Ant (Cetrorelix) lub Ant+2,5 mg propionianu T (Ant+T) lub Ant + 12,5 μg benzoianu E (Ant+E) lub Ant+T+E. W 16. dobie przeprowadzono autopsję. W preparatach histologicznych jąder przeprowadzono ilościową analizę nabłonka plemnikotwórczego. Określono liczbę komórek na jądro. Ant spowodował spadek masy jąder do 39% wartości grupy kontrolnej (K) ($p < 0,001$), długości kanalików do 59% K ($p < 0,001$) a liczbę

komórek Sertoliego do 56% K ($p < 0,001$). Podobne zmiany wystąpiły po Ant+E: odpowiednio 52% ($p < 0,001$), 78% ($p < 0,01$), 74% ($p < 0,01$). Masa jąder była obniżona także w Ant+T (75% K, $p < 0,01$), ale długość kanalików plemnikotwórczych oraz liczba komórek Sertoliego powróciły do wartości K. Odbudowanie wszystkich trzech parametrów naraz wystąpiło po Ant+T+E. Po Ant, Ant+T i Ant+T+E obserwowano spadek wydzielania FSH (odpowiednio: $3,0 \pm 0,7$, $p < 0,01$, $1,9 \pm 1,1$, $p < 0,001$ i $2,6 \pm 1,0$, $p < 0,01$ vs. $4,3 \pm 1,0$ ng/ml w K). We wszystkich grupach nastąpiło hamowanie różnicowania spermatogonii do komórek meiotycznych (KM) (28-73% K). Mimo hamowania po Ant+T+E liczba KM wzrosła 3-krotnie. Ponieważ wzrostowi KM towarzyszył wzrost liczby spermatogonii (230% K, $p < 0,01$), to wydaje się, że pod wpływem T+E przejście od spermatogonii do KM ominęło kilka pośrednich etapów różnicowania komórkowego. Wnioski: 1) Ant hamuje wzrost jądra i zapoczątkowanie spermatogenezy. 2) Wzrost jądra może być przywrócony przez T, a spermatogenezy przez łączne działanie T i E.

Praca Własna UIM w Łodzi, nr 502-11-017.

Estradiol with testosterone in concert, but none of the hormones alone, recovers the onset of spermatogenesis that is impaired by GnRH antagonist

Renata Walczak-Jędrzejowska, Jolanta Słowikowska-Hilczner, Wojciech Tkaczyński¹, Krzysztof Kula

Department of Andrology and Reproductive Endocrinology,
¹ Department of Clinical Pharmacology, Medical University of Lodz

GnRH stimulates Leydig cell function. To ascertain relative roles of testosterone (T) and estradiol (E) in the onset of spermatogenesis, GnRH antagonist (Ant) was administered alone or in combinations with T or E to immature male rats. Rats were daily injected between 5. and 15. days after birth with $5\mu\text{g}/10\text{g}$ b.w. of Ant (Cetrorelix) or Ant + 2,5 mg T propionate (Ant+T) or Ant + 12,5 μg E benzoate (Ant+E) or Ant+T+E. On 16. day the autopsy was performed. Quantitative analysis of the seminiferous epithelium was performed in histological sections. Cell numbers were expressed per testis. Ant alone resulted in decrease of testicular weight to 39% of control (C) values ($p < 0,001$), length of the seminal tubules to 59% ($p < 0,001$) and Sertoli cells number to 56% ($p < 0,001$). Similar effects were seen in Ant+E: 52% ($p < 0,001$), 78% ($p < 0,01$), and 74% ($p < 0,01$) respectively. Although the testicular weight was reduced in Ant+T (75% of C, $p < 0,01$), the length of the seminal tubules and Sertoli cells number rebounded to C. Restoration of all three parameters was seen after Ant+T+E. After Ant, Ant+T and Ant+T+E decrease of FSH ($3,0 \pm 0,7$, $p < 0,01$, $1,9 \pm 1,1$, $p < 0,001$ and $2,6 \pm 1,0$, $p < 0,01$ vs. $4,3 \pm 1,0$ ng/ml in C, respectively) was observed. All treatments reduced differentiation of spermatogonia into meiotic cells (MC) (28-73% of C.). However, after Ant+T+E it rebounded with increased formation of MC (3-fold of C). This rebound was associated with the dramatic increase in the number of spermatogonia (230% of C, $p < 0,01$) suggesting that differentiation of spermatogonia into MC skipped some intermediate steps. Conclu-

sions: 1) Ant inhibits testicular growth and spermatogenic onset. 2) Inhibition of testicular growth recovers by supplementation with T, spermatogenic onset by supplementation with T and E.

Grant of Medical University of Łódź, no. 502-11-017.

Estradiol może uczestniczyć w tworzeniu środowiska lipidowego sprzyjającego rozwojowi miażdżycy u mężczyzn

Jerzy K. Wranicz¹, Marcin Rosiak², Jolanta Słowikowska-Hilczner³, Piotr Kula⁴, Wojciech Zaręba⁵ i Krzysztof Kula³

¹ Katedra Kardiologii,

² Katedra Kardiologii Interwencyjnej,

³ Zakład Andrologii i Endokrynologii Płodności,

⁴ Katedra Kardiologii, Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, Polska

⁵ Zakład Kardiologii, Uniwersytetu w Rochester, USA

Choroba wieńcowa (CW) związana jest ze zwiększonym poziomem estradiolu w surowicy krwi, chociaż związek ten budzi kontrowersje. Przebadano 111 mężczyzn w wieku 39-73 lat, z CW potwierdzoną w badaniu angiograficznym. Zwężenie tętnic oceniano na podstawie kardioangiogramów. Pacjenci z więcej niż 3-ma naczyniami, o świetle $>50\%$ uznano jako chorych z zaawansowaną CW. W surowicy krwi oznaczano poziom estradiolu (E), testosteronu (T), siarczanu dihydroepiandrosteronu (DHEA-S), białka wiążącego steroidy płciowe (SHGB), FSH i LH oraz wskaźnik wolnego testosteronu (FTI). Oznaczano także poziom całkowitego cholesterolu (T-Ch), HDL-Ch, LDL-Ch i triglicerydów i stosunek T-Ch/HDL-Ch. U 70% pacjentów z zaawansowaną CW poziom T był niższy w porównaniu z pacjentami z mniej zaawansowaną CW (odpowiednio: $17,8$ S.D.- $6,7$ vs $22,3$ S.D.- $11,0$ nmol/l). Znalaziono dodatnie korelacje pomiędzy poziomem T-Ch i E ($r=0,31$, $p < 0,01$), LDL-Ch i E ($r=0,32$, $p < 0,01$, T-Ch/HDL i E ($r=0,26$, $p < 0,05$) oraz pomiędzy triglicerydami i E ($r=0,24$, $p < 0,05$). FSH jak i LH korelowały dodatnio z HDL-Ch (odpowiednio: $r=0,23$, $p < 0,05$; $r=0,25$, $p < 0,05$). Te korelacje pozostawały znamienne po wyłączeniu wpływu wieku, nadciśnienia, cukrzycy, wcześniejszego zawału przez wieloczynnikową analizę warancji. Kiedy wpływ E i T analizowano po podziale pacjentów na poziomie mediany, chorzy z wyższym E ($>73,5$ pmol/l) wykazywali znamienne wyższy T-Ch ($245,6$ mg/dl) i LDL-Ch ($172,1$ mg/dl), niż chorzy z niższym E (odpowiednio: $216,0$ mg/dl, $p < 0,01$ i $146,3$ mg/dl, $p < 0,01$). T, DHEA-S i SHBG nie wykazywały korelacji z lipidami. Wnioski: 1) Wyższe poziomy T-Ch, LDL-Ch i triglicerydów, uważane za istotne czynniki ryzyka miażdżycy, są znamienne związane z wyższym poziomem E, a nie z T lub DHEA-S. 2) Zaawansowana CW jest związana z niższym T, co może wskazywać na związek pomiędzy obniżonym wydzielaniem T i rozwojem miażdżycy. 3) Gonadotropiny mogą wykazywać działanie przeciwmiażdżycowe.

Estradiol may participate in the creation of pro-atherogenic lipid milieu in men

Jerzy K. Wranicz¹, Marcin Rosiak², Jolanta Słowikowska-Hilczer³, Piotr Kula⁴, Wojciech Zaręba⁵ and Krzysztof Kula³

¹ Department of Cardiology,

² Department of Interventional Cardiology

³ Department of Andrology and Reproductive Endocrinology,

⁴ Department of Cardiosurgery, Medical University of Lodz, Poland;

⁵ Cardiology Unit of Rochester University, USA

Advanced coronary artery disease (CAD) has been reported to be associated with increased serum levels of estradiol, however, the field remains controversial. 111 men, aged 36-73, with CAD substantiated by angiography were studied. Degree of artery stenosis was determined on the basis of angiograms. Patients with above 3 vessels with reduction of lumen >50% were considered to have an advanced CAD. Serum levels of estradiol (E), testosterone (T), dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA-S), sex hormone binding globulin (SHBG), FSH and LH were assessed and index of free testosterone (FTI) was calculated. Blood levels of total cholesterol (T-Ch), HDL-Ch, LDL-Ch and triglyceride were also determined and T-Ch/HDL-Ch ratio was calculated. 70% of patients with advanced CAD had lower levels of T than patients with less advanced CAD (17.8 ±6.7 vs. 22.3 ±11.0 nmol/l, respectively). Significant positive correlations were found between serum levels of T-Ch and E (r = 0.31, p<0.01), LDL-Ch and E (r = 0.32; p<0.01), T-Ch/HDL ratio and E (r = 0.26, p<0.05), and between triglyceride and E (r = 0.24, p<0.05). FSH correlated positively with HDL-Ch (r = 0.23, p<0.05) as LH did (r = 0.25, p<0.05). These correlations remained significant after adjustment to clinical co-variables (age, hypertension, diabetes, prior infarction) in the multivariate logistic regression model. When E and T were analysed as dichotomized at median value, patients with higher levels of E (>73.5 pmol/l) had significantly higher T-Ch (245.6 mg/dl) and LDL-Ch (172.1 mg/dl) than those with lower E (216.0 mg/dl, p<0.01 and 146.3 mg/dl, p<0.01, respectively). T, DHEA-S and SHBG did not correlate with lipids. Conclusions: 1) Higher levels of T-Ch, LDL-Ch and triglyceride, considered important factors of atherosclerotic risk, are significantly associated with higher E but not with T or DHEA-S. 2) Advanced CAD is associated with lower T, what might indicate a link between decreased T secretion and atherogenic process. 3) Gonadotropins may have an anti-atherogenic effect.

Zmiany nowotworowe jądra w odniesieniu do zaburzeń spermatogenezy

Jolanta Słowikowska-Hilczer¹, Elżbieta Oszukowska¹, Marek Sosnowski², Wojciech Kuzański³, Jan Plaza⁴, Katarzyna Marchlewska¹ i Krzysztof Kula¹

¹ Zakład Andrologii i Endokrynologii Płodności

² Klinika Urologii

³ Klinika Chirurgii Dziecięcej i Onkologii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

⁴ I Oddz. Urologii, Szpital im. Prof. Michałowskiego, Katowice

Badano częstość występowania nowotworów jądra z komórek płciowych (ang. germ cell tumours – GCT) oraz

carcinoma in situ (CIS) w jądrze w odniesieniu do zaburzeń spermatogenezy u 112 mężczyzn z 3 grup ryzyka GCT. Biopsje jądra wykonano u 109 mężczyzn w wieku 19-71 lat z powodu: 1) uprzedniego leczenia GCT w przeciwległym jądrze, 2) niezstąpionych jąder (NJ) i 3) azoospermii (A). U 3 innych mężczyzn usunięto całe gonady z powodu inwazyjnego GCT (u 2 z GCT w drugim jądrze i u 1 z grupy NJ). W 35 przypadkach oznaczono stężenie FSH, LH i testosteronu we krwi. Stwierdzono następujące zaburzenia: hypospermatogeneza, zatrzymanie spermatogenezy (ZS), zespół samych komórek Sertoliego (SCO) oraz atrofia kanalików jądra. U 2 spośród 25 mężczyzn z GCT (8%) stwierdzono GCT w pozostawionym jądrze, a u 5 innych - CIS (20%). W sumie zmiany nowotworowe wystąpiły w 28%, a zaburzenia spermatogenezy w 60%. U 1 spośród 23 mężczyzn z NJ stwierdzono GCT (4,3%), a u 2 innych - CIS (8,6%). W sumie przy NJ zmiany nowotworowe miało 13%, a u 78,3% stwierdzono zaburzenia spermatogenezy. U 3 spośród 65 mężczyzn z A stwierdzono CIS (4,6%), a zaburzenia spermatogenezy u 80%. U 6 pacjentów z A i prawidłową spermatogenezą średnie stężenie FSH we krwi wynosiło 3,9±1,8 IU/L, LH: 3,3±1,0 IU/L, a testosteronu: 15,0±8,0 nmol/L (grupę uznano za referencyjną). Przy SCO pacjenci (n=10) mieli znamienne wyższe stężenie FSH: 15±7,1 IU/L (p<0,01), podobnie jak przy ZS (n=11): 11,0±9,2 IU/L (p<0,05). Niespodziewanie, kiedy SCO lub ZS towarzyszył CIS, pacjenci mieli prawidłowe FSH: 5,5±2,8 IU/L (n=5). **Wnioski:** 1) Wyższej częstości zmian nowotworowych towarzyszy niższa częstość zaburzeń spermatogenezy. 2) Chociaż podwyższone stężenia FSH we krwi współistnieją z SCO lub ZS (hipergonadotropizm), to przy obecności zmian nowotworowych czynność komórek Sertoliego może być prawidłowa.

Germ cell neoplasia in relation to spermatogenic failures

Jolanta Słowikowska-Hilczer¹, Elżbieta Oszukowska¹, Marek Sosnowski², Wojciech Kuzański³, Jan Plaza⁴, Katarzyna Marchlewska¹ and Krzysztof Kula¹

¹ Department of Andrology and Reproductive Endocrinology,

² Department of Urology,

³ Department of Child Surgery and Oncology, Medical University of Lodz

⁴ I Department of Urology, Prof. Michałowski Memorial Hospital, Katowice

Possibly germ cell tumours (GCT) can be promoted by disturbances in testicular organogenesis. We therefore aimed to relate the incidence of germ cell neoplasia (GCT and testicular *carcinoma in situ* – CIS) to the incidence of spermatogenic failures in 112 men from 3 risk groups of GCT. Unilateral testicular biopsy was done in 109 men, aged 19-71 years, because of: 1) previously treated GCT in opposite testis, 2) history of undescended testes (UT) and 3) infertility with azoospermia. In 3 other men the whole gonads were removed because of GCT (2 with GCT and 1 with UT). In 35 cases serum FSH, LH and testosterone were determined. The following spermatogenic failures were identified: hypospermatogenesis, spermatogenic arrest (SA), Sertoli cell only syndrome (SCO), or tubular atrophy. In 25 men with GCT 2 cases (8%) revealed GCT and 5 other - CIS (20%) in the remaining gonad. In total 28% had neoplasia and 60%

defective spermatogenesis. In 23 men with UT 1 case had GCT (4,3%) and 2 cases CIS (8,6%). In total 13% had neoplasia and 78,3% defective spermatogenesis. In 65 azoospermics 3 had CIS (4,6%), whereas 80% had defective spermatogenesis. In 6 examined azoospermic men with normal spermatogenesis mean serum level of FSH was $3,9 \pm 1,8$ IU/L, LH: $3,3 \pm 1,0$ IU/L and testosterone: $15,0 \pm 8,0$ nmol/L. They were considered as eugonadal reference group. Patients with SCO (n=10) had significantly higher serum FSH: $15,0 \pm 7,1$ IU/L ($p < 0,01$), as well as with SA (n=11): $11,0 \pm 9,2$ IU/L ($p < 0,05$). Unexpectedly, when SCO or SA coexisted with CIS, patients had normal FSH: $5,5 \pm 2,8$ IU/L (n=5).

Conclusions: 1) In men with increased risk of GCT higher incidence of germ cell neoplasia is associated with lower incidence of spermatogenic failure. 2) Although increased serum FSH coexists with SCO or SA (hypergonadotropism), cases where germ cell neoplasia accompanies these changes may have functional Sertoli cells.

SESJA 7

Polimorfizmy *MTHFR* i *PON1* oraz poziom homocysteiny u kobiet z zespołem policystycznych jajników

Katarzyna Mel¹, Bartosz Kempisty¹,
Joanna Sokołowska¹, Mariusz Łaciński¹, Jolanta Dorszewska², Alina Warenik-Szymankiewicz³,
Wiesław H.Trzeciak¹

¹ Katedra i Zakład Biochemii i Biologii Molekularnej Akademii Medycznej w Poznaniu,

² Zakład Neurochemii Akademii Medycznej w Poznaniu,

³ Klinika Endokrynologii i Ginekologicznej Akademii Medycznej w Poznaniu.

Zespół jajników policystycznych (PCOS) jest jednym z najczęstszych schorzeń endokrynologicznych występującym u kobiet w wieku rozrodczym. Obok typowych objawów klinicznych, takich jak: zaburzenie miesiączkowania, niepłodność, hirsutyzm, obserwuje się również szereg symptomów będących czynnikami ryzyka chorób serca: nadwaga, zaburzenia metabolizmu lipidów, insulinooporność, hiperinsulinemia oraz nadciśnienie tętnicze. Jednym z intensywnie badanych czynników ryzyka chorób serca i PCOS jest podwyższony poziom homocysteiny (Hcy). Molekularnym podłożem tych zaburzeń są mutacje i polimorfizmy genów kodujących enzymy metabolizmu Hcy: reduktazy metylenotetrahydrofolianowej (*MTHFR*) i paraoksonazy (*PON1*).

Celem pracy było zbadanie częstości występowania polimorfizmów: *MTHFR* C677T, A1298C, G1793A oraz *PON1* A192G u kobiet z PCOS. Ponadto podjęto próbę korelacji poziomu Hcy z badanymi polimorfizmami w grupie chorych i kontrolnej.

Materiał do badań molekularnych stanowiło DNA wyizolowane z krwi obwodowej 60 kobiet z PCOS, diagnozowanych w Klinice Endokrynologii i Ginekologicznej AM w Poznaniu. Grupę kontrolną stanowiło 100 zdrowych kobiet. Identyfikacji genotypów dokonano w oparciu o analizę RFLP-PCR z wykorzystaniem enzymów restrykcyjnych: *Hinfl* (C677T), *MbolI* (A1298C), *Mbil* (G1793A) oraz *MbolI* (A192G). Poziom Hcy w osoczu krwi oznaczono techniką HPLC.

Częstości genotypów C677T, G1793A oraz A192G w badanych grupach nie wykazywały odstępstw od

równowagi Hardy'ego-Weinberga. W zakresie tych polimorfizmów nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic między grupą badaną a kontrolną, zarówno pod względem częstości genotypów, jak i alleli. Częstość genotypów polimorfizmu A1298C w grupie z PCOS znacząco odbiega od równowagi Hardy'ego-Weinberga ($p < 10^{-6}$). Różnice częstości genotypów A1298C pomiędzy grupą badaną a kontrolną są istotne statystycznie ($p = 0,038$). Poziom Hcy w obu grupach nie wykazuje różnic istotnych statystycznie. Uzyskane wyniki sugerują, że heterozygotyczność A1298C mogłaby zmniejszać ryzyko pojawienia się objawów PCOS.

MTHFR and *PON1* gene polymorphisms and homocysteine level in patients with polycystic ovary syndrome

Katarzyna Mel¹, Bartosz Kempisty¹,
Joanna Sokołowska¹, Mariusz Łaciński¹, Jolanta Dorszewska², Alina Warenik-Szymankiewicz³,
Wiesław H.Trzeciak¹

¹ Department of Biochemistry and Molecular Biology, Poznan University of Medical Sciences, Poznań,

² Department of Neurochemistry, Poznan University of Medical Sciences, Poznań,

³ Department of Gynecological Endocrinology, Poznan University of Medical Sciences, Poznań,

Polycystic ovary syndrome (PCOS) is one of the most common endocrine disease in women in the reproductive age. Typical clinical syndromes are: chronic anovulatory cycles, infertility and hirsutism. There are also observed some cardiovascular diseases risk factors such as: obesity, lipid abnormalities, insulin resistance, hyperinsulinemia and hypertension. Hyperhomocysteinemia is one of the most intensively explored risk factors of cardiovascular diseases. The molecular basis of these disorders are mutations and polymorphisms of the genes encoding homocysteine (Hcy) metabolism enzymes: methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) and paraoxonase (*PON1*).

The aim of this study was to examine the polymorphisms frequency of: *MTHFR* C677T, A1298C, G1793A and *PON1* A192G in the PCOS patients. Moreover, we attempted to correlate Hcy level with the analysed polymorphisms in patients and controls.

DNA was isolated from peripheral blood leukocytes of 60 patients (diagnosed in the Department of Gynaecological Endocrinology, University of Medical Sciences in Poznań) and 100 healthy women. The identification of the genotypes was based on RFLP-PCR analysis using following restriction enzymes: *Hinfl* (C677T), *MbolI* (A1298C), *Mbil* (G1793A) and *MbolI* (A192G). The Hcy level in serum was determined by high performance liquid chromatography (HPLC).

The genotype frequency of C677T, G1793A and A192G polymorphisms was in Hardy-Weinberg equilibrium in both groups. There were no statistically significant differences in the distribution of genotypes and alleles between patients and controls. The frequency of the A1298C genotypes in PCOS group was not compatible with Hardy-Weinberg equilibrium ($p < 10^{-6}$) and statistically significant differences were observed ($p = 0,038$). Determined Hcy level was identical in both groups. Our study suggests that the A1298C heterozygosity might decrease the risk of PCOS symptoms appearing.

Podłoże molekularne negatywnej regulacji ekspresji genu *LHβ* przez progesteron w przednim płacie przysadki mózgowej szczura jako prawdopodobny mechanizm podwyższonego poziomu lutropiny u kobiet z PCOS

Bartosz Kempisty, Katarzyna Mel,
Wiesław H. Trzeciak

Katedra i Zakład Biochemii i Biologii Molekularnej Akademii Medycznej im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu

Zespół policystycznych jajników (PCOS) jest złożonym schorzeniem endokrynologicznym występującym u kobiet w wieku rozrodczym. Do najważniejszych symptomów zespołu należą niepłodność, zaburzenia miesiączkowania, hirsutyzm, jak również podwyższony poziom lutropiny, insulinooporność oraz hyperinsulinemia. Celem pracy było zbadanie podłoża molekularnego: podwyższonego poziomu LH w surowicy kobiet z PCOS z towarzyszącą hyperinsulinemią. W tym celu przeprowadzono analizę poziomu ekspresji genów: receptora gonadoliberyny (GnRHR), podjednostki β lutropiny oraz receptora progesteronu (PR). Materiał do badań stanowiły samice szczurów szczepu Wistar w wieku około 120 dni. W doświadczeniu *in vivo* szczury poddawano domięśniowej iniekcji insuliną w dawce 4 jednostek/100 g m.c. Po 12 godz. zwierzęta dekapitowano, po czym pobierano przysadkę mózgową oraz podwzgórze. W doświadczeniu *in vitro* hodowano komórki przedniego płata przysadki mózgowej do osiągnięcia monowarstwy ciągłej. Komórki inkubowano przez 24 godz. z GnRH (50 lub 100 pmol/ml) oraz progesteronem (50 lub 100 pmol/ml). Z podwzgórza i przysadki mózgowej, jak również z inkubowanych komórek wyizolowano RNA, a PoliA+ RNA przepisywano odwrotnie (RT-PCR). cDNA odpowiadające GnRHR, LH β oraz PR amplifikowano przy użyciu specyficznych starterów. Poziomu ekspresji genów oszacowano densytometrycznie wykorzystując program LabImage 2.7 Demo. Wykazano stymulujące działanie GnRH na ekspresję LH β , hamujący wpływ progesteronu na ekspresję LH β w przysadce mózgowej oraz zbliżony poziom ekspresji PR w przysadce mózgowej i podwzgórze. Wykazano stymulujące działanie insuliny na poziom ekspresji GnRHR oraz LH β w przysadce mózgowej. Ponadto stwierdzono, że insulina działa hamująco na ekspresję PR na poziomie przysadki. Znacznie słabszy jest hamujący wpływ insuliny na ekspresję PR na poziomie podwzgórza. Uzyskane wyniki pozwalają przypuszczać, że zwiększenie ekspresji GnRHR pod wpływem insuliny może powodować zwiększenie wydzielania GnRH przez komórki podwzgórza. GnRH z kolei pobudza ekspresję genu LH β . Z drugiej zaś strony insulina blokuje ekspresję PR, a więc mogłaby osłabiać efekt hamowania wydzielania LH przez komórki przedniego płata przysadki mózgowej. Powyższe badania pozwalają przypuszczać, że powodem podwyższonego poziomu LH w surowicy jest hyperinsulinemia, będąca jednym z symptomów towarzyszących PCOS.

Molecular basis of polycystic ovary syndrome

Bartosz Kempisty, Katarzyna Mel,
Wiesław H. Trzeciak

Department of Biochemistry and Molecular Biology, Poznan University of Medical Sciences, Poznań

Polycystic ovary syndrome (PCOS) is the most common endocrine disease of women in reproductive age. The most important clinical symptoms of the disease are: chronic anovulatory cycles, hirsutism, insulin resistance and hyperinsulinemia. The aim of study was searching of a genetic basis of the most frequent symptoms appearing in PCOS: increase of LH level and hyperinsulinemia. We carried on an analysis of gonadotropin releasing hormone receptor (GnRHR), lutropin- β -subunit (LH β) and progesteron receptor genes expression. *In vivo* experiment we were using female of rats (Wistar) in the age about 120 days, which were an insulin injected in the doses of 4u/100g BW. After 12 hours the rats were decapitated. After that we took out a pituitary gland and the hypothalamus. *In vitro* experiment we cultured a pituitary gland cells to obtain confluent monolayer state. Cells were incubated for 24 hours with GnRH (50 or 100 pmol/ml) and progesteron (50 or 100 pmol/ml). The RNA was isolated from pituitary and hypothalamus as well as pituitary gland cells from a culture. PoliA+ RNAs were analyzed by a reverse transcription reaction (RT-PCR). cDNA for genes: GnRHR, LH β and PR were amplified with specific primers. Levels of genes expression were defined by using densitometry program LabImage 2.7 Demo. This research proved stimulating effect of insulin on the level of GnRHR and LH β genes expression in a pituitary gland. Besides we demonstrated that insulin inhibited PR expression in both pituitary gland and hypothalamus. Nevertheless in a hypothalamus we observed less important insulin inhibitory effect on PR expression. We suppose that LH β mRNA increase is due to inhibition of PR expression as well as stimulation of GnRHR expression by insulin. In summary we concluded that in PCOS women insulin could inhibit PR gene expression and stimulate GnRHR, and consequently induce LH secretion by pituitary gland. Probably it could be a reason of higher LH concentration in serum of hiperinsulinemic PCOS' women.

10 lat doświadczeń w diagnostyce klinicznej i molekularnej zespołu Pradera-Williego

E. Obersztyn¹, A. Szecht-Potocka¹, T. Mazurczak¹,
P. Stankiewicz¹, E. Bocian¹, Kostyk², A. Kruczek²,
M. Lassota³, A. Midro⁴, B. Dawydzik⁵, I. Jałowicz⁶,
A. Latos-Bieleńska⁷

¹ Zakład Genetyki Medycznej, Instytut Matki i Dziecka, Warszawa

² Zakład Genetyki Medycznej, Collegium Medicum UJ, Kraków

³ ZOZ Przychodnia Specjalistyczna Nr 1, Rzeszów

⁴ Zakład Genetyki Klinicznej, Białystok

⁵ Poradnia Zaburzeń Metabolicznych, Instytut Zdrowia Matki Polki, Łódź

⁶ Wojewódzki Specjalistyczny Szpital Dziecięcy, Kielce

⁷ Katedra i Zakład Genetyki Medycznej, Akademia Medyczna, Poznań.

Zespół Pradera-Williego (Prader-Willi Syndrome-PWS), jest genetycznie uwarunkowaną chorobą uwarunkowaną specyficzną regulacją ekspresji genów określaną mianem rodzicielskiego piętna genomowego (genomic imprinting). PWS spowodowany jest brakiem aktywności genów w podcentromerowym regionie 15q11-13 pochodzącym od ojca, które są nieaktywne (ulegają piętnowaniu na chromosomie 15 pochodzącym od matki. Wśród dominujących w obrazie klinicznym objawów choroby występują: głęboka hipotonia, brak odruchu ssania oraz trudności w karmieniu w okresie noworodkowym i niemowlęcym, hipogonadyzm, niedobór wysokości ciała, małe dłonie i stopy, niepełnosprawność intelektualna, hiperfagia i znacznego stopnia otyłość powyżej trzeciego roku życia. Przedstawiono wyniki badań klinicznych oraz cytogenetyczno - molekularnych w grupie 299 chorych w wieku od 1 miesiąca do 37 lat z podejrzeniem zespołu Pradera-Williego, kierowanych z różnych ośrodków medycznych w Polsce w okresie ostatnich 10 lat. Przeprowadzono szczegółową charakterystykę cech klinicznych, ocenę rozwoju somatycznego 111/299 (37,1%) chorych, u których diagnoza kliniczna PWS została potwierdzona na podstawie wyników badań cytogenetycznych (HRT), fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* FISH oraz badań molekularnych (analiza wzoru metylacji oraz polimorfizmu sekwencji mikrosatelitarnych w regionie PWS/AS). Obecność delecji 15q11-13 wykazano u 69(76%) chorych, mUPD u 19(21%) chorych oraz defekt imprintingu u 3% chorych. U 17 (15,3%) chorych nie udało się określić rodzaju defektu molekularnego odpowiedzialnego za wystąpienie choroby. Nie stwierdzono istotnych różnic w ekspresji cech klinicznych PWS w grupie chorych chorych z delecją oraz mUPD. Zwraca uwagę niedostateczna znajomość obrazu PWS wśród lekarzy co skutkuje znacznym opóźnieniem ostatecznego rozpoznania i profilaktyki otyłości w wieku dojrzałym.

Ten years of clinical and molecular studies in Prader - Willi syndrome patients

E. Obersztyń¹, A. Szecht-Potocka¹, T. Mazurczak¹, P. Stankiewicz¹, E. Bocian¹, Kostyk², A. Kruczek², M. Lassota³, A. Midro⁴, B. Dawydzik⁵, I. Jałowicz⁶, A. Latos-Bieleńska⁷

¹ Department of Medical Genetics, Institute of Mother and Child, Warsaw

² Department of Medical Genetics, Collegium Medicum UJ, Cracow

³ Specialistic Medical Center No 1, Rzeszów

⁴ Department of Clinical Genetics, Med. Univ. Białystok

⁵ Division of Metabolic Diseases, Polish Mother's Memorial Hospital Research Institute, Łódź

⁶ Specialistic Hospital for Children, Kielce

⁷ Department and Division of Medical Genetics, Poznan University of Medical Sciences, Poznań.

The Prader-Willi Syndrome (PWS) is a multisystem, neurogenetic disorder linked to abnormalities in imprinted domain on chromosome 15q11-13 resulting in specific gene regulation (genomic imprinting). All of genetic abnormalities in PWS are associated with loss of expression of paternally derived alleles in PWCR region, which are inactive on maternal chromosome 15. Among characteristic clinical features of PWS are: profound hypotonia, poor suck and feeding difficulties in infancy, hypogonadism, short stature, small hands and feet, mental

retardation, hyperphagia in early childhood resulting in obesity over the age of 3 years. We present results of clinical, cytogenetic, FISH and molecular studies in the group of 299 patients ranging from 1 month to 37 years, suspected for PWS and diagnosed in our center during last 10 years. Detailed clinical evaluation, somatic development and results of cytogenetic and molecular studies (methylation specific PCR analysis for *SNRPN*, microsatellite polymorphism within PWS/AS region) are presented. Among 111/299 (37,2%) cases with confirmed PWS diagnosis, 69 (76%) deletion, 19 (21%) mUPD and 3% imprinting defect cases were found. In 17 (15,3%) of whole confirmed PWS patients molecular defect was not recognized because of uninformative results. There were no significant differences in clinical presentation between patients with deletion and mUPD of chromosome 15. It was noted that knowledge about natural history of PWS among medical doctors is not sufficient and it causes delay in clinical diagnosis and prevention of the morbid obesity in the adult patients.

Rodzinna translokacja X/Y powiązana z różnymi fenotypami płci

Andrew Sharp¹, Kamila Kusz², Jadwiga Jaruzelska², Maria Szarras-Czapnik³, Jan Wolski⁴, Patricia Jacobs¹

¹ Wessex Regional Genetics Laboratory, Salisbury District Hospital, Salisbury Wiltshire, Wielka Brytania

² Instytut Genetyki Człowieka PAN, Poznań

³ Instytut Centrum- Pommik Zdrowia Dziecka, Warszawa

⁴ Centrum Niepłodności Novum, Warszawa

Hermafrodytyzm prawdziwy definiowany jako współistnienie żeńskiej i męskiej tkanki gonadalnej u jednej osoby ma heterogenne podłoże genetyczne. Mniej niż 10% hermafrodytów prawdziwych 46,XX posiada gen SRY, co spowodowane jest nieprawidłową translokacją pomiędzy Xp a Yp.

W niniejszej pracy opisujemy dwie rodziny, w których translokacja X/Y (SRY+) dziedziczona jest przez co najmniej trzy pokolenia i jest związana z różnymi fenotypami płci: płodnymi kobietami, płodnymi mężczyznami lub hermafrodytami prawdziwymi. Ta różnorodność fenotypowa może być rezultatem zróżnicowanej ekspresji genu SRY, spowodowanej 1/inaktywacją chromosomu X rozpościerającą się na translokowany fragment Yp lub 2/ efektem pozycji spowodowanym bliskim sąsiedztwem punktu pęknięcia translokacji.

Analiza polimorfizmu oraz punktu pęknięcia sugeruje, że obie rodziny są spokrewnione. Na podstawie naszych obserwacji proponujemy mechanizm, poprzez który translokacja X/Y może być przekazywana przez wiele pokoleń.

Familial X/Y translocations associated with variable sexual phenotype

Andrew Sharp¹, Kamila Kusz², Jadwiga Jaruzelska²,
Maria Szarras-Czapnik³, Jan Wolski⁴, Patricia
Jacobs¹

¹ Wessex Regional Genetics Laboratory, Salisbury District
Hospital, Salisbury, Wiltshire, UK

² Institute of Human Genetics, Polish Academy of Sciences, Poznan

³ The Children's Memorial Health Institute, Warsaw

⁴ Infertility Center Novum, Warsaw

True hermaphroditism, defined clinically as the presence of both male and female gonadal tissue in the same individual is a genetically heterogeneous condition. Less than 10% of true hermaphrodites with an apparent 46,XX constitution are *SRY*-positive, usually resulting from translocation between Xp and Yp.

We describe two families in which an *SRY* positive X/Y translocation segregates through at least three generations causing variable sexual phenotypes: fertile males or true hermaphrodites. This phenotypic variation may be due to variable *SRY* expression resulting from either 1. spreading of X inactivation into the translocated Yp segment, or 2. a position effect due to the close proximity of a translocation breakpoint.

Polymorphism and junction fragment analyses indicate both families are descended from a common ancestor. Based on our observations we propose a mechanism by which X/Y translocations could be silently transmitted for many generations.

INDEKS AUTORÓW

Ambroziak Michał	377
Balcerczak Ewa	373
Bandurka-Stankiewicz Elżbieta	379
Bardadin Krzysztof	373
Bereza Tomasz	308
Biernacka-Łukanty Justyna	355
Bierzyńska-Macyszyn Grażyna	380
Bocian E	397
Brzezińska Ewa	370, 371
Chmielik Ewa	374, 378
Cyniak-Magierska Anna	370
Cyplińska Renata	380
Czarnecka Agnieszka	371, 374
Czarnocka Barbara	373
Czyż Wojciech	373
Dawydzik B	397
Derebecka-Hołyśz Natalia	385
Dorszewska Jolanta	396
Drewny Michał	387
Gabryelewicz Maria B	379
Gałęza-Kulig Monika	371
Gereben Balazs	377
Głyda Michał	386
Goździcka-Józefiak Anna	377
Górna Agnieszka	386
Górska Maria	384
Gubała Elżbieta	293, 374, 375, 378, 380
Gumińska Anna	392
Handkiewicz-Junak Daria	378
Hasse-Lazar Kornelia	375
Hejduk Beata	375
Hołyśz Marcin	385
Hucz Joanna	371
Jacobs Patricia	398
Jakubowski Lucjusz	285
Jałowicz I	397
Jarmołowska-Jurczyszyn Donata	386, 387
Jaruzelska Jadwiga	398
Jarząb Barbara	293, 362, 371, 374, 379, 380
Jarząb Michał	371, 374, 375, 380
Jeske Wojciech	379
Jurecka-Lubieniecka Beata	375
Kacalska Olga	308
Kaczka Krzysztof	388
Kaspera Wojciech	380
Kempisty Bartosz	396, 397
Kędzia Andrzej	377
Kinalska Ida	302, 382, 383, 384
Kinalski Maciej	383
Kluk Andrzej	386
Kłosin Jadwiga	386, 387
Koligot Małgorzata	371
Kołomecki Krzysztof	385
Komorowski Jan	390
Korcowska Izabela	376
Korman Eugeniusz	377

Korzeniewska Marzena	385	Pastuszek-Lewandoska Dorota	370, 371
Kostyk	397	Pawlaczek Agnieszka	375, 378
Kowalska Małgorzata	375	Pawlikowski Marek	389
Kozicki Ireneusz	373	Pietrzak Maciej	339, 381
Krajewska Jolanta	371	Plaza Jan	395
Krassowski Janusz	302, 379	Pomorski Lech	373, 388
Krawczyk Aleksandra	375, 378, 380	Przytuła Ewa	373
Krętowski Adam	302, 382, 383	Puzianowska-Kuźnicka Monika	339, 381
Kruczek A	397	Rabska-Pietrzak Barbara	377
Krystyniak Agnieszka	381	Rębaś Elżbieta	391
Krzyczkowska-Sendrakowska Magdalena	308	Rosiak Marcin	394
Krzysiek Józef	308	Rosłonowska Elżbieta	379
Krzysiek-Mączka Grażyna	308	Sharp Andrew	398
Kukulska Aleksandra	378	Skubis-Zegadło Joanna	373
Kula Dorota	375, 380	Słopiń Radosław	359
Kula Krzysztof	314, 392, 393, 394, 395	Słowikowska-Hilczler Jolanta	314, 392, 393, 394, 395
Kula Piotr	314, 394	Sokołowska Joanna	396
Kusz Kamila	398	Sosnowski Marek	395
Kuzański Wojciech	395	Sporny Stanisław	346
Kuzdak Krzysztof	385, 388	Stankiewicz P	397
Kuźmicki Mariusz	383	Steinhof-Radwańska Katarzyna	375
Lachowicz-Ochędalska Agnieszka	322, 391	Stęchły Tomasz	375
Lange Dariusz	293	Stępień Henryk	380, 385, 390
Larysz Damian	380	Stępień Tomasz	385
Lassota M	397	Szarras-Czapnik Maria	398
Latos-Bieleńska Anna	397	Szelachowska Małgorzata	384
Lehmann Tomasz	355	Szepietowska Barbara	384
Lewiński Andrzej	370, 371	Szpak-Ulczo Sylwia	362, 375, 380
Łaciński Mariusz	396	Szpecht-Potocka A	397
Łącka Katarzyna	327, 376, 386	Tański Zbigniew	381
Łyczkowska Anna	373	Taran Katarzyna	346
Majewski Przemysław	386, 387	Tkaczyński Wojciech	393
Marchlewska Katarzyna	314, 392, 393, 395	Tosiek Milena	373
Matejkowska Maria	388	Trzeciak Wiesław H	355, 385, 396, 397
Mazurczak T	397	Walczak-Jędrzejowska Renata	314, 392, 393
Mel Katarzyna	396, 397	Warenik-Szymankiewicz Alina	356, 359, 396
Meleń-Mucha Gabriela	333	Wawrusiewicz Natalia	383
Męczekalski Błażej	356	Wiencz Małgorzata	371, 374, 378, 379
Midro A	397	Wińczyk Katarzyna	389
Mikula M	373	Włoch Jan	362, 371, 374
Milewicz Tomasz	308	Wojtacha Maciej	380
Mirończuk Katarzyna	382, 383	Wolski Jan	398
Mirowski Marek	373	Wołoszyńska Krystyna	378
Misztal-Dethloff B	390	Wójcik Izabela	388
Naze Maciej	385	Wranicz Jerzy K	314, 394
Nauman Alicja	377, 381	Wygoda Zbigniew	380
Nauman Janusz	381	Zaręba Wojciech	394
Nieruchalska Edyta	387	Zeman Marcin	378
Nikodemowska Anna	373	Żabińska-Popieła Marta	308
Nizankowska Teresa	376		
Nowak Dawid	385		
Obara-Moszyńska Monika	377		
Obersztyn E	397		
Obrępańska-Stęplowska Aleksandra	377		
Oczko-Wojciechowska Małgorzata	362, 371, 374		
Ogrodowicz Agnieszka	376		
Okruszko Anna	383		
Oszukowska Elżbieta	314, 392, 393, 395		
Pachucki Janusz	377		