



## Serum leptin and adiponectin concentrations in patients infected with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) on antiretroviral therapy

Magdalena Leszczyszyn-Pynka<sup>1</sup>, Sławomir Pynka<sup>2</sup>, Anna Boroń-Kaczmarska<sup>1</sup>, Krystyna Pilarska<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Chair and Department of Infections Diseases, Pomeranian Medical University, Szczecin

<sup>2</sup> Clinic of Endocrinology, Arterial Hypertension and Metabolic Diseases, Pomeranian Medical University, Szczecin

### Summary

The lipodystrophy syndrome with dyslipidaemia and insuline resistance is side-effect of combined antiretroviral therapy (CART).

Aim of the study: to describe the influence of CART on leptin and adiponectin concentration in connection with lipids levels in HIV-infected patients on antiretroviral therapy.

BMI, serum leptin, adiponectin, triglycerides, total cholesterol, HDL- and LDL-cholesterol concentrations were measured in 56 HIV(+) patients before and on CART; average of treatment duration 38.4 ±13.2 months.

Significant increase of BMI ( $p=0.0268$ ) of ( $22.6 \pm 3.3$  before and  $23.5 \pm 3.4$  kg/m<sup>2</sup> on therapy, respectively) and all analyzed lipids were found. Mean adiponectin concentration in treated patients was significantly ( $7.256 \pm 3.551$  µg/ml) lower than mean value before treatment ( $8.395 \pm 3.568$  µg/ml;  $p=0.0011$ ). Mean values of leptin concentrations did not differ significantly (before therapy  $3.721 \pm 0.347$  log<sub>10</sub>; on therapy  $3.1737 \pm 0.353$  log<sub>10</sub>). Significant positive correlation between BMI and leptin concentrations was found before, as well as during CART ( $r=0.5333$ ;  $p<0.0001$ ), but negative correlation between adiponectin and leptin concentrations

( $r=-0.2677$ ;  $p=0.042$ ). Leptin and adiponectin concentrations did not revealed significant correlation with lipids levels before therapy. The decrease of adiponectin concentration on CART correlated negatively with total ( $r=-0.2912$ ;  $p=0.0310$ ) and LDL-cholesterol ( $r=-0.310$ ;  $p=0.0225$ ).

CART lasting longer than 2 years resulted in the decrease of adiponectin concentration, with lack of influence on leptin concentration in analyzed group.

The increase of total cholesterol and LDL-cholesterol in correlation with the decrease of adiponectin concentration confirms that CART induces metabolic disturbances related to higher risk of atherosclerosis and its sequel.

(*Pol J Endocrinol* 2005; 1(56): 19-24)

**Key words:** HIV, antiretroviral therapy, metabolic disorders, leptin, adiponectin



Magdalena Leszczyszyn-Pynka  
Chair nad Clinic of Infections Diseases  
Arkońska 4 str  
71-455 Szczecin



## Stężenia leptyny i adiponektyny w surowicy chorych zakażonych ludzkim wirusem niedoboru odporności typu 1 (HIV-1) leczonych antyretrowirusowo

Magdalena Leszczyszyn-Pynka<sup>1</sup>, Sławomir Pynka<sup>2</sup>, Anna Boroń-Kaczmarek<sup>1</sup>, Krystyna Pilarska<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Klinika Chorób Zakaźnych PAM, Szczecin

<sup>2</sup> Klinika Endokrynologii, Nadciśnienia Tętniczego i Chorób Przemiany Materii PAM, Szczecin

### Streszczenie

Efekt ubocznym skojarzonej terapii antyretrowirusowej (STA) jest zespół lipodystrofii z dyslipidemią oraz insulinoopornością.

Cel pracy: określenie wpływu STA na stężenia leptyny i adiponektyny w powiązaniu ze zmianami poziomu lipidów krwi chorych zakażonych HIV leczonych antyretrowirusowo.

U 56 chorych HIV(+) określono BMI i oznaczono we krwi stężenia leptyny, adiponektyny oraz triglicerydów, cholesterolu całkowitego, HDL- i LDL-cholesterolu przed oraz w trakcie STA, trwającej średnio 38,4 ± 13,2 miesięcy.

Stwierdzono istotny ( $p=0,0268$ ) wzrost BMI (odpowiednio 22,6 ± 3,3 przed i 23,5 ± 3,4 kg/m<sup>2</sup> po leczeniu) oraz analizowanych parametrów gospodarki lipidowej. Średnia stężenie adiponektyny u chorych leczonych była istotnie niższa (7,256 ± 3,551 µg/ml) od średniej wartości sprzed rozpoczęcia terapii (8,395 ± 3,568 µg/ml;  $p=0,0011$ ). Średnie stężenie leptyny nie różniły się istotnie (przed leczeniem 3,721 ± 0,347 log<sub>10</sub>; na leczeniu 3,1737 ± 0,353 log<sub>10</sub>). Zarówno przed, jak i w trakcie STA stwierdzono istotną, dodatnią korelację pomiędzy BMI a stężeniami leptyny ( $r = 0,5333$ ;  $p < 0,0001$ ), natomiast ujemną korelację pomiędzy stężeniami adiponektyny i leptyny ( $r = -0,2677$ ;

$p=0,042$ ). Przed leczeniem nie wykazano istotnej korelacji pomiędzy stężeniami leptyny i adiponektyny w surowicy krwi a stężeniami lipidów. Stwierdzony w trakcie STA spadek stężenia adiponektyny korelował ujemnie z poziomami cholesterolu całkowitego ( $r = -0,2912$ ;  $p=0,0310$ ) i LDL-cholesterolu ( $r = -0,310$ ;  $p=0,0225$ ).

STA trwająca ponad 2 lata spowodowała zmniejszenie stężenia adiponektyny, przy braku wpływu na stężenie leptyny u badanych chorych.

Wzrost poziomu cholesterolu całkowitego i LDL-cholesterolu korelujący ze spadkiem stężenia adiponektyny potwierdza indukowanie przez STA zaburzeń metabolicznych zwiększających ryzyko rozwoju miażdżycy i jej następstw.

(*Endokrynol Pol* 2005; 1(56): 19-24)

**Słowa kluczowe:** HIV, leczenie antyretrowirusowe, zaburzenia metaboliczne, leptyna, adiponektyna



Magdalena Leszczyszyn-Pynka  
Katedra i Klinika Chorób Zakaźnych  
ul. Arkońska 4  
71-455 Szczecin

### Wstęp

Od czasu włączenia do leczenia zakażenia HIV skojarzonej terapii antyretrowirusowej (STA) obserwuje się dramatyczny spadek zarówno chorobowości jak i śmiertelności z powodu AIDS [1]. Efekt ubocznym tej strategii leczniczej jest wystąpienie lipodystrofii z redystrybucją tkanki tłuszczowej (spadek ilości tkanki podskórnej i jej akumulacja w obrębie jamy brzusznej) lub lipoatrofii (zanik obwodowej tkanki tłuszczowej) w skojarzeniu z dyslipidemią oraz insulinoopornością [2, 3, 4, 5, 6].

Oprócz istotnych zmian w wyglądzie pacjentów, zaburzenia metaboliczne związane z STA mogą doprowadzić do rozwoju cukrzycy, a aterogenny profil lipidowy zwiększa ryzyko powikłań sercowo-naczyniowych [7, 8, 9].

W ostatnich latach odkryto, że tkanka tłuszczowa, poza dobrze znaną rolą „magazynu”

lipidów, spełnia również istotną i czynną rolę metaboliczną produkując i wydzielając szereg biologicznie czynnych substancji białkowych zwanych adipocytokinami [10]. Jedną z nich jest leptyna, która spełnia ważną rolę w regulacji bilansu energetycznego pośrednicząc pomiędzy tkanką tłuszczową a ośrodkowym układem nerwowym. Jej wydzielanie zależy głównie od ilości tkanki tłuszczowej (szczególnie podskórnej) oraz stanu odżywienia. Drugą z adipocytokin jest adiponektyna, której główne działanie poprzez zwiększenie oksydacji kwasów tłuszczowych prowadzi do zmniejszenia insulinooporności. Jej poziom obniża się u osób otyłych, w cukrzycy i zaburzeniach lipidowych [11, 12, 13, 14]. Aktualnie prowadzone badania mogą przynieść odpowiedź na pytanie, czy adiponektyna jest cytokiną chroniącą przed rozwojem miażdżycy.

Celem pracy jest określenie wpływu STA na stężenia leptyny i adiponektyny w powiązaniu

ze zmianami poziomu lipidów we krwi chorych zakażonych HIV leczonych antyretrowirusowo dłużej niż 2 lata.

## Materiał i metody

Badania przeprowadzono u 56 chorych z potwierdzonym zakażeniem ludzkim wirusem niedoboru odporności typu 1 (HIV-1). Charakterystykę demograficzną i epidemiologiczną przedstawia Tabela I. W analizowanej grupie nie było osób przyjmujących aktualnie narkotyki (wyjątek stanowili pacjenci otrzymujący substytucyjnie metadon) i nadużywających alkoholu. U żadnego z chorych nie rozpoznano cukrzycy wg obowiązujących obecnie kryteriów.

Tabela I. Charakterystyka badanej grupy.

Dane	Kobiety, n=19	Mężczyźni, n=37	Razem, n=56
Wiek (lata): zakres średnia±SD	22-57 31,2 ±9,6	19-50 33,5 ±7,8	19-57 32,8 ±8,4
Kategoria kliniczna zakażenia HIV – klasyfikacja CDC, 1993 [16]	A – 2 B – 12 C – 5	A – 3 B – 25 C – 9	A – 5 B – 37 C – 14
Droga zakażenia HIV: - kontakty seksualne - przyjmowanie środków odurzających drogą dożylną	12 7	28 9	40 16

Wszyscy chorzy spełniali kryteria kliniczne, immunologiczne i wirusologiczne rozpoczęcia STA [15]. Leczenie zakażenia HIV prowadzono w latach 1997-2004 kojarząc 3 lub 4 leki antyretrowirusowe z następujących grup [15]:

1. nukleozydowych inhibitorów odwrotnej transkryptazy HIV,
2. nienukleozydowych inhibitorów odwrotnej transkryptazy HIV,
3. inhibitorów proteazy HIV.

Czas trwania STA wynosił od 24 do 72 miesięcy (średnia: 38,4 ±13,2 miesięcy; mediana: 36 miesięcy).

Wskaźnik masy ciała (BMI) oznaczano z pomiaru wzrostu i wagi według wzoru

$$\text{BMI} = \text{waga (kg)} : \text{wzrost (m}^2\text{)}.$$

Krew do badań pobierano na czczo, po 8-12 godzinach od ostatniego posiłku – przed rozpoczęciem terapii oraz po co najmniej 2 latach leczenia (średnio w 39 miesiącu). Poziom triglicerydów, cholesterolu całkowitego, HDL-cholesterolu i LDL-cholesterolu oznaczano przy pomocy aparatu COBAS Integra 39-5620. Stężenie leptyny w surowicy krwi oznaczano metodą ELISA (Quantikine Human Leptin Immunoassay, R&D Systems, Inc., USA), a stężenie adiponektyny – metodą radioimmunologiczną (Human Adiponectin RIA Kit, LINCO Research Inc., USA).

Analizę statystyczną przeprowadzono z zastosowaniem programu GraphPad Prism, wersja 3.0,

wykonując test *t*-Studenta dla zmiennych powiązanych (poziom istotności  $p=0,05$ ) oraz wyznaczając współczynnik korelacji Pearsona *r*. Dla zmiennych, których rozkład nie spełniał kryteriów rozkładu normalnego, dokonano ich transformacji logarytmicznej ( $\log_{10}$ ) przed dalszą analizą.

## Wyniki

W tabeli II przedstawiono średnie wartości BMI, stężeń leptyny, adiponektyny i lipidów przed (wyjściowo) i w trakcie terapii trwającej nie krócej niż 24 miesiące. Stwierdzono istotny ( $p=0,0268$ ) wzrost BMI (odpowiednio 22,6 ±3,3 przed i 23,5 ±3,4 kg/m<sup>2</sup> po leczeniu) oraz wszystkich analizowanych parametrów gospodarki lipidowej w badanej grupie chorych. Średnia stężeń adiponektyny u chorych leczonych była istotnie niższa od średniej wartości sprzed rozpoczęcia terapii. Natomiast średnie stężeń leptyny nie różniły się istotnie.

Zarówno przed, jak i w trakcie terapii antyretrowirusowej stwierdzono istotną, dodatnią korelację pomiędzy BMI a stężeniami leptyny, natomiast ujemną

korelację wykazano pomiędzy stężeniami adiponektyny i leptyny (tabela III i IV).

O ile przed leczeniem nie udało się wykazać istotnej korelacji pomiędzy stężeniami leptyny i adiponektyny w surowicy krwi a stężeniami lipidów, to stwierdzano w trakcie STA spadek stężenia adiponektyny korelował ujemnie zarówno z poziomami cholesterolu całkowitego jak i LDL-cholesterolu. Zaobserwowano również dodatnią korelację między stężeniami leptyny a poziomem HDL-cholesterolu u chorych leczonych (tabela IV).

## Dyskusja

Od czasu opisanego po raz pierwszy przypadków lipodystrofii związanej z HIV (HIV LDS) u chorych leczonych inhibitorami proteazy, zespół ten pozostaje w sferze intensywnych badań. Częstość występowania waha się od 25–75%, a jego związek ze stosowaniem terapii antyretrowirusowej jest dobrze udokumentowany [3, 6, 17, 18, 19, 20]. Wystąpieniu redystrybucji tkanki tłuszczowej i dyslipidemii z reguły towarzyszy insulinooporność. Ponieważ STA powinna być stosowana dożywotnio, powstaje problem następstw indukowanych przez tę terapię zaburzeń metabolicznych, szczególnie wobec znacznie przedłużonego życia zakażonych HIV i spadku umieralności z powodu AIDS [1, 7, 21].

**Tabela II.**  
Wskaźnik masy ciała (BMI), stężenia leptyny i adiponektyny oraz wybranych parametrów lipidowych w badanej grupie przed i w trakcie leczenia.

Parametr (średnia±SD)	Przed leczeniem	W trakcie leczenia	p
BMI (kg/m <sup>2</sup> ) zakres średnia±SD	15,9 – 33,5 22,6 ± 3,31	17,7 – 33,6 23,5 ± 3,4	<b>p = 0,0268</b>
Leptyna (pg/ml): zakres średnia±SD	1500 - 42120 7356 ± 7199	1500 - 41790 7903 ± 8434	Nie analizowano*
Leptyna (log 10): zakres średnia±SD	3,176 – 4,624 3,721 ± 0,347	3,176 – 4,621 3,1737 ± 0,353	p = 0,699
Adiponektyna (µg/ml): zakres średnia±SD	1,490 – 19,8 8,395 ± 3,568	1,520 – 17,5 7,256 ± 3,551	<b>p = 0,0011</b>
Triglicerydy (mg/dl): zakres średnia±SD	48,0 – 647,0 152,8 ± 90,6	46,0 – 712,0 217,5 ± 170,9	<b>p = 0,0046</b>
Cholesterol całkowity (mg/dl): zakres średnia±SD	89,0 – 323,0 160,5 ± 48,6	84,0 – 390,0 205,2 ± 58,1	<b>p &lt; 0,0001</b>
HDL Cholesterol (mg/dl): zakres średnia±SD	15,2 – 100,7 39,9 ± 15,9	20,1 – 81,0 48,6 ± 13,6	<b>p &lt; 0,0001</b>
LDL Cholesterol (mg/dl): zakres średnia±SD	20,0 – 244,0 97,9 ± 44,7	28,0 – 271,0 114,1 ± 52,7	<b>p = 0,0026</b>

\* wartości nie odpowiadały rozkładowi normalnemu

**Tabela III.**  
Korelacje badanych parametrów przed leczeniem.

Parametr	Leptyna	Adiponektyna
BMI	r = 0,5333 p < 0,0001	NS*
Leptyna	-	r = - 0,2677 p = 0,042
Triglicerydy	NS	NS
Cholesterol całkowity	NS	NS
LDL Cholesterol	NS	NS
HDL Cholesterol	NS	NS

\* NS – różnica nieistotna statystycznie

**Tabela IV.**  
Korelacje badanych parametrów w trakcie leczenia.

Parametr	Leptyna	Adiponektyna
BMI	r = 0,5467 p < 0,0001	NS*
Leptyna	-	r = - 0,3964 p = 0,0027
Triglicerydy	NS	NS
Cholesterol całkowity	NS	r = - 0,2912 p = 0,0310
LDL Cholesterol	NS	r = - 0,3101 p = 0,0225
HDL Cholesterol	r = 0,2827 p = 0,0348	NS

\* NS – różnica nieistotna statystycznie

Udział adipocytokin w patofizjologii HIV LDS jest podkreślany w doniesieniach z ostatnich lat [22, 23, 24, 25, 26]. Autorzy niniejszego opracowania podjęli próbę oceny wpływu skojarzonej terapii antyretrowirusowej na poziom lipidów oraz dwóch z adipocytokin – leptyny i adiponektyny. Nie

wyodrębniliśmy w grupie badanej osób z cechami klinicznymi i laboratoryjnymi HIV LDS, mimo że u ponad połowy chorych (30/56) stwierdzało się fenotypowo redystrybucję tkanki tłuszczowej lub lipoatrofię (dane nie przedstawione). Wydaje się konieczne przeprowadzenie oddzielnej analizy dla chorych, którzy rozwijają zmiany w obrębie tkanki tłuszczowej w związku z STA. Dane z piśmiennictwa wskazują, że zmiany w stężeniach adipocytokin i lipidów występują głównie u pacjentów rozwijających HIV LDS [22, 26, 27].

Zastosowanie terapii antyretrowirusowej spowodowało istotny wzrost BMI w badanej grupie, w której chorzy z objawami niedoboru odporności (kategoria B i C wg klasyfikacji CDC) stanowili 82%. Objawowemu zakażeniu HIV z reguły towarzyszy wyniszczenie. Zahamowanie replikacji HIV i odbudowa układu immunologicznego wskutek stosowania STA, eliminuje występowanie m.in. zakażeń oportunistycznych i anoreksję związaną z gorączką, skutkując znaczącą poprawą stanu odżywienia. Mimo wyraźnej korelacji między BMI a stężeniami leptyny, zarówno przed leczeniem, jak i w trakcie leczenia, średni poziom leptyny nie zmienił się istotnie. Może to sugerować, że poprawa stanu odżywienia dokonuje się głównie poprzez przyrost beztłuszczowej masy ciała. Znaczenie leptyny jako cytokiny tkanki tłuszczowej w patogenezie HIV LDS pozostaje jednak nie do końca wyjaśnione [24, 28, 29].

Stwierdziliśmy istotne obniżenie stężenia adiponektyny u chorych stosujących STA co najmniej 2 lata. Stężenie adiponektyny nie korelowało z BMI, natomiast wykazano ujemną korelację między stężeniami adiponektyny i leptyny u chorych

przed leczeniem, jak i leczonych. Takiej korelacji nie wykazali inni autorzy. [23,26]. Ujemna korelacja między adiponektyną a leptyną może pośrednio świadczyć o redystrybucji tkanki tłuszczowej (na korzyść akumulacji tkanki tłuszczowej wewnątrzbrzusznej). Wykazano bowiem, że obniżonemu poziomowi adiponektyny towarzyszy zwiększenie ilości tkanki tłuszczowej wewnątrzbrzusznej oraz zwiększona insulinooporność [22]. W wyjaśnieniu tego zjawiska mogłyby pomóc badania składu masy ciała w analizowanej grupie leczonych chorych.

Obniżenie stężenia adiponektyny w przebiegu STA jest podkreślane w badaniach z ostatnich lat [22, 23, 26, 27, 30].

W przedstawionej pracy wykazaliśmy istotny wzrost poziomu triglicerydów, cholesterolu całkowitego, LDL- i HDL-cholesterolu u chorych leczonych co najmniej 2 lata. Poszczególne leki antyretrowirusowe różnią się między sobą, jeżeli chodzi o indukowanie wzrostu triglicerydów lub cholesterolu [31]. Natomiast uzyskane przez nas wyniki potwierdzają dotychczasowe doniesienia, że każda terapia antyretrowirusowa, niezależnie od tego, czy zawiera w swoim składzie leki szczególnie podnoszące poziom lipidów (np. inhibitory proteazy), czy też nie, niesie ze sobą ryzyko dyslipidemii [5, 31, 32]. Niektóre zmiany w stężeniu lipidów, występujące w trakcie leczenia, mogą także wynikać z częściowej normalizacji zaburzeń metabolicznych obecnych także przed leczeniem u chorych z zaawansowaną chorobą, wyniszczonych [33, 34, 35]. Przykładem może być stwierdzony w analizowanej grupie chorych leczonych wzrost poziomu HDL-cholesterolu, opisany także w innym doniesieniu [29].

Nie stwierdzono istotnej korelacji między stężeniami leptyny i adiponektyny a poziomem lipidów u chorych dotychczas nie leczonych. Natomiast po trwającej minimum 2 lata terapii antyretrowirusowej stężenie leptyny korelowało z poziomem HDL-cholesterolu. Nie znaleziono korelacji z poziomem triglicerydów wskazywanej przez innych autorów [22, 27]. Stężenie adiponektyny u chorych leczonych korelowało ujemnie z poziomem cholesterolu całkowitego i LDL-cholesterolu; nie stwierdzono również korelacji z poziomem triglicerydów. Brak korelacji poziomu triglicerydów z badanymi adipocytokinami u naszych chorych nie znajdujący potwierdzenia w piśmiennictwie, wymaga, w naszej ocenie, pogłębionej analizy. Analiza taka uwzględniałaby pomiary składu masy ciała oraz podzielenia chorych na podgrupy leczonych STA zawierającą inhibitorami proteazy, leczonych STA nie zawierającą inhibitorów proteazy oraz na rozwijających HIV LDS w czasie terapii oraz bez objawów zespołu metabolicznego związanego z STA.

Niższe poziomy adiponektyny towarzyszą zwiększonej insulinooporności u chorych HIV(+) leczonych antyretrowirusowo [23, 26]. Wykazane

przez nas obniżenie stężenia adiponektyny wraz ze wzrostem cholesterolu całkowitego i LDL-cholesterolu u chorych poddanych STA powinno skłaniać do szczególnie starannej kontroli chorych zakażonych HIV. Powinna ona uwzględniać identyfikację wszystkich innych czynników ryzyka rozwoju miażdżycy i modyfikację tych, na które można wpływać (np. palenie tytoniu, nadciśnienie tętnicze). Należy się spodziewać – również w populacji polskiej osób zakażonych HIV, leczonych przyczynowo – zawałów serca, rozwoju cukrzycy i naczyniowych epizodów mózgowych, występowaniu których sprzyjać będzie rozwój HIV LDS.

## Wnioski

1. Skojarzona terapia antyretrowirusowa trwająca ponad 2 lata spowodowała zmniejszenie stężenia adiponektyny, przy braku wpływu na stężenie leptyny u chorych w badanej grupie.
2. Wzrost poziomu cholesterolu całkowitego i LDL-cholesterolu korelujący ze spadkiem stężenia adiponektyny potwierdza indukowanie przez terapię antyretrowirusową zaburzeń metabolicznych zwiększających ryzyko rozwoju miażdżycy i jej następstw.

## Piśmiennictwo

1. Palella FJ, Delaney KM, Moorman AC et al. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* 1998; 338:853-860
2. Kotler DP, Rosenbaum K, Wang J, Pierson RN. Studies of body composition and fat distribution in HIV-infected and control subject. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovir* 1999; 20(3): 228-237.
3. Carr A, Samaras K, Thorisdottir A et al. Diagnosis, prediction, and natural course of HIV-1 protease-inhibitor associated lipodystrophy, hyperlipidaemia and diabetes mellitus: a cohort study. *Lancet* 1999; 353(9170): 2093-2099.
4. Carr A, Samaras K, Burton S et al. Syndrome of peripheral lipodystrophy, hyperlipidaemia and insulin resistance in patients receiving HIV protease inhibitors. *AIDS* 1998; 12(7): F51-58.
5. Riddler SA, Smit E, Cole SR et al. Impact of HIV infection and HAART on serum lipids in men. *JAMA*. 2003; 289 : 2978-2982
6. Thiebaut R, Daucourt V, Mercie P et al. Lipodystrophy, metabolic disorders and human immunodeficiency virus infection: Aquitaine Cohort, France, 1999, Group d'Epidemiologie Clinique du Syndrome d'Immunodeficiency Acquis en Aquitaine. *Clin Infect Dis* 2000; 31(6): 1482-1487.
7. Bozzette SA, Ake CF, Tam HK et al. Cardiovascular and cerebrovascular events in patients treated for human immunodeficiency virus infection. *New Engl J Med* 2003; 348: 702-710.
8. The D:A:D Study Group. Antiretroviral combination treatment and risk of myocardial infarction. Results from D:A:D Study. *N Engl J Med* 2003; 349: 1993-2003.
9. The Writing Committee\* of the D:A:D Study Group. Cardiovascular and cerebrovascular events in HIV-infected persons. *AIDS* 2004; 18: 1811-1817
10. Fruhbeck G, Gomez-Ambrosi J, Muzurabal FJ, Burrell MA. The adipocyte: a model for integration of endocrine and

metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001; 280: 827-847

11. Engeli S, Feldpausch M, Gorzelniak K et al. Association Between Adiponectin and Mediators of Inflammation in Obese Women. *Diabetes* 2003; 52 : 942-947
12. Weyer C, Funahashi T, Tanaka S et al. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes : close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 66:1930-1935.
13. Weiss R, Dufour S, Groszmann A et al. Low adiponectin Levels in Adolescent Obesity: A Marker of Increased Intramyocellular Lipid Accumulation. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88(5): 2014-2018.
14. Schulze MB, Rimm EB, Shai I et al. Relationship Between Adiponectin and Glycemic Control, Blood Lipids, and Inflammatory markers in Men With Type 2 Diabetes.
15. Panel on Clinical Practices for Treatment of HIV Infection (DHHS). Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in HIV-1-Infected Adults and Adolescents, March 23, 2004. <http://AIDSinfo.nih.gov>
16. Centers for Diseases Control and Prevention. 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. *MMWR* 1992; 41: 1-19.
17. Hengel LR, Watts NB, Lennox JL. Benign symmetric lipomatosis associated with protease inhibitors. *Lancet* 1997; 350: 1596.
18. Tsiodras S, Mzntzoros C, Hammer S, Samore M. Effects of protease inhibitors on hyperglycemia, hyperlipidemia, and lipodystrophy: a 5-year cohort study. *Arch Intern Med* 2000; 160(13): 2050-2056.
19. Gervasoni C, Ridolfo AL, Trifiro G et al. Redistribution of body fat in HIV-infected women undergoing combined antiretroviral therapy. *AIDS* 1999; 13(4): 465-471.
20. Mallal S, John M, Moore CB et al. Contribution of nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitors to subcutaneous fat wasting in patients with HIV infection. *AIDS* 2000; 14: 1309-1316.
21. Schambelan M, Benson CA, Carr A et al. Management of metabolic complications associated with antiretroviral therapy for HIV-1 infection: recommendations of an International AIDS Society-USA Panel. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2002; 31: 257-275.
22. Addy CL, Gavrila A, Tsiodras S et al. Hypoadiponectinemia is Associated with Insulin Resistance, Hypertriglyceridemia, and Fat Redistribution in Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients Treated With Highly Active Antiretroviral Therapy. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88(2): 627-636
23. Mynarcik DC, Combs T, McNurlan MA et al. Adiponectin and Leptin Levels in HIV-Infected Subjects With Insulin Resistance and Body Fat Redistribution. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2002; 31(5): 514-520
24. Estrada V, Serrano-Rios M, Martinez Larrad MT et al. Leptin and adipose tissue maldistribution in HIV-infected male patients with predominant fat loss treated with antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2002; 29(1): 32-40
25. Yarasheski KE, Zachwieja JJ, Horgan MM et al. Serum leptin concentrations in human immunodeficiency virus-infected men with low adiposity. *Metabolism* 1997; 46(3):303-305
26. Vigoroux C, Maachi M, Nguen T-H, et al. Serum adipocytokines are related to lipodystrophy and metabolic disorders in HIV-infected men under antiretroviral therapy. *AIDS* 2003; 17: 1503-1511.
27. Qiang Tong, Jean-Louis Sankalé, Colleen M. Hadigan et al. Regulation of Adiponectin in Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients: Relationship to Body Composition and Metabolic Indices. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88(4): 1559-1564.
28. Paganelli R, Mezzaroma I, Mazzone AM et al. Leptin levels in HIV-positive patients treated with HAART. *AIDS* 1999; 13: 2479-2482.
29. Pynka M. Dyslipidemia in HIV-infected women before and after starting highly active antiretroviral therapy (HAART). Abstract Book, XIV International AIDS Conference, Barcelona 2002, WePeB5971.
30. Kinlaw WB, Marsh B. Adiponectin and HIV Lipodystrophy: Taking HAART. *Endocrinology* 2004; 145(2): 484-486.
31. Fontas E, van Leth F, Sabin CA et al. Lipid Profiles in HIV-Infected Patients Receiving Combination Antiretroviral Therapy : Are Different Antiretroviral Drugs Associated with Different Lipid Profiles? *JID* 2004; 189: 1056-1074
32. Leszczyszyn-Pynka M, Bander D, Pynka S, Boroń-Kaczmarek A. Atherogenic lipid profile in HIV-infected women receiving antiretroviral treatment. *HIV&AIDS Review* 2004; 3(2): 35-38.
33. Grunfeld C, Kotler DP, Hamadeh R et al. Hypertriglyceridemia in the acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Med* 1989; 86: 27-31.
34. Leszczyszyn-Pynka M, Bander D, Boroń-Kaczmarek A. Etiopatogeneza zespołu wyniszczenia w przebiegu zakażenia HIV – implikacje terapeutyczne. *Problemy HIV i AIDS* 1998; 4(2): 77-83.
35. Grunfeld C, Feingold KR. Metabolic disturbances and wasting in acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* 1992; 327:329-336.



## Estimation of sodium/iodide symporter gene expression (NIS) in thyroid cancer by RT-PCR technique (preliminary study)

Milena Tosiek<sup>1#</sup>, Lech Pomorski<sup>2</sup>, Ewa Balcerczak<sup>1</sup>, Marek Mirowski<sup>1</sup>, Wojciech Czyż<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Molecular Biology Laboratory, Department of Pharmaceutical Biochemistry, Medical University, Łódź, Poland

<sup>2</sup> Department of Endocrinological and General Surgery, Medical University, Łódź, Poland

<sup>#</sup> Students' Learned Societies, Molecular Biology Laboratory, Department of Pharmaceutical Biochemistry, Medical University, Łódź, Poland

### Abstract

*NIS* gene is located on chromosome 19 and encodes 643 amino acid protein. It belongs to membrane Na<sup>+</sup> dependent glucose symporter proteins family. In normal thyroid is located in basolateral membrane of thyrocyte. It plays a main role in concentrating of iodine in thyrocyte and thus in thyroid hormones synthesis. It was proved that *NIS* expression influences effectiveness of radioactive iodine therapy in well-differentiated thyroid cancers. The aim of this study was to estimate the *NIS* expression and its dependence with gender, age and stage in thyroid papillary and follicular cancers. The frozen sections of tissue were used as a source of tumor RNA. RT-PCR technique was employed for *NIS* expression analysis. We did not find dependence between the presence of *NIS* expression in investigated thyroid cancers and stage of disease estimated according to TNM classification. We also did not find dependence between *NIS* expression

and gender or sex of the patients. Our results suggest that there is no dependence between *NIS* expression and iodine uptake.

(*Pol J Endocrinol* 2005; 1(56): 25-29)

**Key words:** sodium/iodide gene expression, thyroid cancer



Marek Mirowski  
Molecular Biology Laboratory,  
Department of Pharmaceutical Biochemistry,  
Medical University,  
Muszynskiego 1,  
90-151 Lodz, Poland  
tel/fax: 42 677-91-30,  
e-mail: (mmirowski@pharm.am.lodz.pl)



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

Milena Tosiek<sup>1#</sup>, Lech Pomorski<sup>2</sup>, Ewa Balcerczak<sup>1</sup>, Marek Mirowski<sup>1</sup>, Wojciech Czyż<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Pracownia Biologii Molekularnej, Zakład Biochemii Farmaceutycznej, Uniwersytet Medyczny, Łódź

<sup>2</sup> Klinika Chirurgii Endokrynologicznej i Ogólnej, Uniwersytet Medyczny, Łódź

<sup>#</sup> Studenckie Koło Naukowe przy Pracowni Biologii Molekularnej, Zakład Biochemii Farmaceutycznej, Uniwersytet Medyczny

### Streszczenie

Gen *NIS* zlokalizowany na chromosomie 19 koduje białko złożone z 643 aminokwasów. Białko to należy do rodziny białek błonowych tzw. zależnych od Na<sup>+</sup> symporterów glukozy. W prawidłowej tarczycy jest zlokalizowane w błonie podstawnej tyreocyty. Fizjologiczna rola białka *NIS* polega na współdziałaniu w biosyntezie hormonów tarczycy, umożliwia bowiem nagromadzenie w znacznym stężeniu jonów I<sup>-</sup> 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 zależności pomiędzy 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. 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.

(*Endokrynol Pol* 2005; 1(56): 25-29)

**Słowa kluczowe:** ekspresja genu symportera sodowo/jodowego, rak tarczycy



Marek Mirowski  
Pracownia Biologii Molekularnej,  
Zakład Biochemii Farmaceutycznej,  
Uniwersytet Medyczny,  
ul. Muszyńskiego 1,  
90-151 Łódź  
tel/fax: 42 677-91-30,  
e-mail: (mmirowski@pharm.am.lodz.pl)



## Wstęp

Gen symportera sodowo-jodowego (*NIS*), sklonowany po raz pierwszy w 1996 roku, zlokalizowany jest u człowieka w pozycji 19p12~13.2. W obrębie genu występuje 15 eksonów i 14 intronów [1, 2]. Produktem genu *NIS* jest białko złożone z 643 aminokwasów o masie 90-97 kDa, które w warunkach prawidłowych jest zlokalizowane w błonie podstawnej (bazolateralnej) tyreocyty. Funkcją fizjologiczną symportera jest wychwyt jonów I<sup>-</sup> z krwi i ich nagromadzenie w znacznym stężeniu we wnętrzu komórki tarczycy. W warunkach fizjologicznych gen *NIS* ulega ekspresji w komórkach tarczycy, ślinianek, żołądka, nerki, gruczołu sutkowego podczas laktacji oraz w warstwie cytotrofoblastycznej łożyska [3, 4]. W rakach tarczycy, chorobach autoimmunologicznych tarczycy, wrodzonej niedoczynności tarczycy oraz w chorobach niezwiązanych z gruczołem tarczowym, np. w raku piersi obserwowano zmienione poziomy mRNA dla genu *NIS*, jak również jego produktu białkowego. Doniesienia na temat ekspresji genu symportera w nowotworach tarczycy są niejednoznaczne – obserwowano obniżony poziom ekspresji tego genu [5-7], jak również jego nadekspresję [8, 9]. Ward i wsp., 2003 [7] stwierdzili, że brak ekspresji genu symportera wiąże się z większym zaawansowaniem nowotworu i gorszym rokowaniem dla pacjenta (badania na rakach brodawkowatych tarczycy).

Zdolność komórek tarczycy do wychwyty jodu jest podstawą do stosowania izotopów jodu (<sup>131</sup>I) w diagnostyce i terapii tego narządu [10]. Ekspresja genu symportera w rakach tarczycy może mieć wpływ na skuteczność zastosowanej radioterapii. Obecnie prowadzone są badania *in vitro*, polegające na wprowadzaniu genu symportera do komórek niejodochwytnych (np. raka prostaty, czerniaka złośliwego, watreby), celem uzyskania jodochwytności tych komórek [11].

Celem pracy było określenie ekspresji genu *NIS* w rakach tarczycy a następnie poszukiwanie zależności między ekspresją tego genu a płcią, wiekiem pacjenta, typem histologicznym nowotworu, stopniem zaawansowania klinicznego wg klasyfikacji TNM i jodochwytnością.

## Materiał i metody

### Pacjenci

Pacjenci byli operowani w Klinice Chirurgii Endokrynologicznej i Ogólnej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi w latach 2003-2004. W badanej grupie było 20 kobiet i 4 mężczyzn, do 40 roku życia - 6, a powyżej - 18 osób.

### Tkanki

Analizowany materiał stanowiły tkanki pozyskane w wyniku resekcji guzów tarczycy. 23 przypadki

sklasyfikowano jako raki a 1 przypadek jako gruczolak pęcherzykowy tarczycy. W badanej grupie raków wyodrębniono 18 raków brodawkowatych, 4 pęcherzykowe i 1 anaplastyczny.

### Przygotowanie tkanek i izolowanie RNA

Zamrożone skrawki tkanek o masie ok. 20-50 mg wstępnie rozdrabniano sterylnym skalpelem i homogenizowano. Następnie izolowano całkowite RNA z komórek korzystając z zestawu odczynników „Total RNA Prep Plus” firmy A&A Biotechnology. Zasada izolowania opiera się na zmodyfikowanej metodzie Chomczyńskiego [12]. Stężenie wyizolowanego RNA sprawdzano spektrofotometrycznie poprzez pomiar absorbancji przy długości fali  $\lambda=260$  nm.

### Reakcja RT-PCR

Syntezę cDNA prowadzono przy użyciu odczynników „Enhanced Avian HS RT-PCR Kit” firmy Sigma. Do reakcji stosowano uniwersalny starter oligo(dT)<sub>23</sub>, który zapewniał swoiste przepisane wszystkich poliadenylowanych mRNA. Przygotowywano na lodzie mieszaninę reakcyjną o składzie: całkowite komórkowe RNA (stężenie końcowe w mieszaninie 0,1 µg/µl), 1 µl uniwersalnego startera oligo(dT)<sub>23</sub> o stężeniu 3,5 µM, 1 µl mieszaniny deoksynukleotydów (po 500 µM dATP, dGTP, dTTP i dCTP) i woda wolna od nukleaz do objętości 10 µl. Próby inkubowano w temperaturze 70°C przez 10 minut. Następnie dodawano 1 µl odwrotnej transkryptazy eAMV-RT (Enhanced Avian Myeloblastosis Virus Reverse Transcriptase) o aktywności 200 U/µl w roztworze wodno-glicerolowym, 2 µl buforu dla AMV-RT, 1 µl inhibitora rybonukleazy o aktywności 20 U/µl i wodę wolną od nukleaz do końcowej objętości 20 µl. Mieszaninę inkubowano w temperaturze 45° przez 50 min.

### Reakcja PCR

Przygotowywano na lodzie mieszaninę reakcyjną o składzie: 1,8 µl buforu 10x, 1 µl MgCl<sub>2</sub> (stęż. 50 µM), 0,4 µl mieszaniny dNTP<sub>3</sub> (10 mM), 0,3 µl polimerazy Delta i po 0,7 µl każdego z primerów (0,5 µM). Sekwencję starterów zaplanowano w oparciu o dane z banku genów (starter 1: 5'-CAT GGA CGC CGT GGA GAC CGG-3'; starter 2 - 5'-GGG GAC TCC AGG CAG ATC TTC-3'). Warunki reakcji PCR zdefiniowano następująco: denaturacja wstępna DNA: 94°C, 1 min, denaturacja cykliczna: 94°C, 1 min, przyłączanie starterów: 60°C, 1 min, elongacja: 72°C, 2 min, elongacja końcowa: 72°C, 7 min, ilość cykli: 34. W reakcji PCR uzyskiwano produkt o długości 287 pz. Dla części prób przeprowadzono reakcję multiplex PCR z użyciem starterów dla genu  $\beta$ -aktyny jako genu referencyjnego (387 pz). Produkty reakcji PCR i multiplex PCR poddawano następnie rozdzielowi elektroforetycznemu w 2% żelu agarozowym.

**Analiza statystyczna**

Wyniki badań opracowano korzystając z programu komputerowego STATISTICA wersja 5.0.

**Wyniki**

Ekspresję genu *NIS* w badanych 24 próbach oceniano w sposób jakościowy metodą RT-PCR. Podstawą do stwierdzenia, że w danym przypadku gen *NIS* ulega ekspresji była obecność w elektroforegramie prążka o długości 287 pz przy braku prążków nieswoistych i czystej próbie kontrolnej. Ekspresję genu symportera stwierdzono w 9 z 24 zbadanych przypadków (37,5%).

W badanej grupie było 20 kobiet (83,3%) i 4 mężczyźni (16,7%). Ekspresję genu *NIS* stwierdzono wyłącznie u kobiet. Analiza statystyczna nie wykazała jednak istnienia zależności między ekspresją genu symportera a płcią ( $p=0,2589$ , dokładny test Fishera).

Ekspresję genu *NIS* odniesiono również do wieku pacjentów. Do celów statystycznych, pacjentów podzielono umownie na grupy do 40 r.ż. i po 40 r.ż. Ekspresję badanego genu stwierdzono w 4 z 6 przypadków pacjentów poniżej 40 r.ż. (66,7%) i w 5 z 18 przypadków pacjentów powyżej 40 r.ż. (27,7%) ( $p=0,1501$ , dokładny test Fishera).

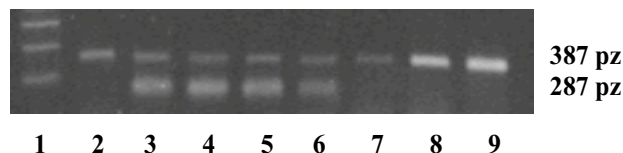
Ekspresję genu *NIS* porównano z typem histologicznym nowotworu. Obecność ekspresji genu *NIS* stwierdzono w 8 z 18 przypadków sklasyfikowanych jako raki brodawkowate (42%) i w 1 z 4 przypadków raka pęcherzykowego (25%). Ekspresja genu symportera towarzyszyła głównie rakom brodawkowatym (8 z 9 przypadków ze stwierdzoną ekspresją genu *NIS*). Nie znaleziono jednak zależności statystycznej między ekspresją tego genu a typem histologicznym nowotworu ( $p=0,6161$ , dokładny test Fishera).

Następnie poszukiwano zależności pomiędzy ekspresją genu symportera a stopniem zaawansowania klinicznego nowotworu wg klasyfikacji TNM. Dane dotyczące ekspresji genu *NIS* w zależności od parametrów klasyfikacji TNM zebrano w tabeli I. Analiza powyższych wartości dokładnym testem Fishera nie wykazała istotnej zależności między ekspresją genu *NIS* a wielkością guza, zajęciem okolicznych węzłów chłonnych czy obecnością przerzutów odległych.

**Tabela I**

*Ekspresja genu symportera w zależności od parametrów klasyfikacji TNM.*

	T1-T2		T3		N0		N1a-N1b		M0		M1	
	p=0,6106				p=0,6570				p=0,1423			
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<i>NIS</i> (+)	1	20,0	8	44,4	2	28,6	7	43,8	7	33,3	2	100
<i>NIS</i> (-)	4	80,0	10	55,5	5	71,4	9	56,2	14	66,7	0	0



**Ryc.1**

*Przykładowy rozdział elektroforetyczny produktów reakcji multiplex PCR. Ekspresja genu *NIS* jest obserwowana w przypadkach 3-6, przypadki 2 oraz 7-9 nie wykazują ekspresji tego genu. Wzorce długości fragmentów DNA - 1. Produkt o długości 387 pz odpowiada genowi  $\beta$ -aktywny, a produkt o długości 287 pz - genowi symportera.*

Korzystając z danych dotyczących jodochwytności raków sprawdzono, czy istnieje zależność między ekspresją genu symportera a zdolnością tkanki do wychwytu  $^{131}\text{I}$ . Ekspresję genu symportera stwierdzono w 7 z 18 przypadków ocenionych jako jodochwytne (38,9%) i w 2 z 5 przypadków sklasyfikowanych jako niejodochwytne (40%). Analiza statystyczna wyników dokładnym testem Fishera nie wykazała istotnej zależności między tymi parametrami ( $p=1,000$ ).

**Dyskusja**

Warunkiem powodzenia jodoterapii jest selektywny wychwyt  $^{131}\text{I}$  z krwi przez komórki tarczycy, czy też w pewnych przypadkach przez przerzuty raków tarczycy. Tymczasem badania *in vitro* wykazały, iż wczesną cechą transformacji nowotworowej komórek tarczycy jest utrata zdolności do wychwytu jodu z krwi. Linie komórkowe nowotworów tarczycy ujawniły obniżony poziom ekspresji genu *NIS* lub jej brak [13].

Wg niektórych autorów [5] utrata jodochwytności na skutek braku lub niewystarczającej ilości symportera jest prawdopodobna dla raków pęcherzykowych (defekt transportu przez błonę bazolateralną). Obniżoną jodochwytność w rakach brodawkowatych wiąże się ze zmienionym transportem przez błonę apikalną [5]. Utratę ekspresji tego genu obserwowano natomiast w gruczolakach i rakach tarczycy [5,14].

W niniejszej pracy ekspresji genu *NIS* nie stwierdzono w 62,5% badanych tkanek sklasyfikowanych jako raki. Wśród przypadków ze stwierdzoną ekspresją tego genu 8 z 9 prób stanowiły raki brodawkowate. Nie wykazano jednakże istotności statystycznej między typem histologicznym nowotworu a ekspresją genu symportera. Z doniesień literaturowych wynika, iż utrata ekspresji genu *NIS* w tkance nowotworowej dotyczy wszystkich typów histologicznych, choć badania *in vitro* wskazują, że gen *NIS* jeśli ulega ekspresji, to właśnie w rakach brodawkowatych [15].

Istnieją doniesienia, że ekspresja genu *NIS* wiąże się z lepszym rokowaniem dla pacjenta [7], jednak

w niniejszej pracy nie wykazano zależności statystycznej między ekspresją badanego genu a którymkolwiek z parametrów klasyfikacji TNM. Podobnie nie znaleziono zależności między ekspresją genu *NIS* a płcią i wiekiem pacjenta.

Mimo że w niniejszej pracy 78,3% badanych tkanek sklasyfikowano jako jodochwytne, to jedynie 30,4% populacji była zarazem jodochwytna i wykazywała ekspresję genu symportera. Jak więc wyjaśnić zdolność do wychwytu jodu prawie 50% tkanek, skoro nie stwierdzono u nich ekspresji genu *NIS*? Niektórzy autorzy sugerują, że dla optymalnego efektu radioterapii konieczna jest ekspresja obu genów: *NIS* i *PDS* (genu kodującego inny przenośnik jodu zwany pendryną). Białko pendryny, jakkolwiek odpowiada za transport jodu, to jego lokalizacja w komórce (błona apikalna) wyklucza jego uczestnictwo w wychwycie jodu z krwi. Inny problem stanowi niejodochwytność ponad 8% przebadanych w pracy przypadków, w których stwierdzono ekspresję genu *NIS*. W świetle doniesień literaturowych istnieje kilka możliwości wyjaśnienia tego zjawiska. Tkankę zmienioną nowotworowo może cechować zupełny brak ekspresji genu *NIS* i ta sytuacja była możliwa do zweryfikowania w niniejszym doświadczeniu (badanie jakościowe). Częściej jednak poziom ekspresji tego genu ulega obniżeniu w stosunku do tkanki prawidłowej i tym zjawiskiem tłumaczy się obniżoną jodochwytność tkanki nowotworowej. Poziom ekspresji genu jest możliwy do oceny jedynie w badaniu ilościowym (real time PCR). Istnieje więc możliwość, że w tkankach sklasyfikowanych jako niejodochwytne poziom ekspresji genu *NIS*, choć stwierdzony, był za niski do efektywnego wychwytu jodu radioaktywnego z krwi.

Niektórzy badacze [8, 9] wskazują na przypadki, w których transformacji nowotworowej towarzyszy nadekspresja genu *NIS*, a mimo to tkanka taka jest niejodochwytna. Badania immunohistochemiczne wykazały jednak, że produkowane w nadmiarze białko *NIS* jest wówczas niewłaściwie zlokalizowane – w cytoplazmie zamiast w błonie podstawnej [8, 9]. Mimo ekspresji genu *NIS* syntetyzowane białko symportera może być nieprawidłowe na skutek mutacji, błędów w procesie transkrypcji (skrócone białko) czy modyfikacji potranslacyjnych (brak glikozylacji) [16].

## Wnioski końcowe

W przeprowadzonych badaniach wstępnych nie stwierdzono zależności między ekspresją genu *NIS* a wiekiem i płcią pacjenta, typem histologicznym i zaawansowaniem klinicznym nowotworu wg klasyfikacji TNM.

Jakościowa ocena ekspresji genu symportera nie jest wystarczająca do określenia jodochwytności tkanki. Do pełnej oceny należy wykonać badania

ilościowe ekspresji tego genu oraz badania poziomu i lokalizacji białka symportera w komórce.

## Piśmiennictwo

1. Smanik PA, Ryu KY, Thiel KS. Cloning of the human iodide symporter. *Biochem. Biophys Res Commun* 1996; 226: 339-345
2. Smanik PA, Ryu Y, Thiel KS. Expression, exon-intron organisation and chromosome mapping of the human iodide symporter. *Endocrinology* 1997; 138: 3555-3558
3. Arturi F, Lacroix L. Presta Regulation by Human Chorionic Gonadotropin of Sodium/Iodide Symporter Gene Expression in the JAr Human Choriocarcinoma Cell Line. *Endocrinology* 2002; 143: 2216-2220
4. Elisei R, Vivaldi A, Pacini F. Biology and clinical application of the *NIS* gene. *Tumori* 2003; 89: 523-528
5. Gerard AC, Daumerie C, Mestdagh C. Correlation between the loss of thyroglobulin iodination and the expression of thyroid-specific proteins involved in iodine metabolism in thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 4977-83
6. Petrich T, Helmeke J, Meyer GJ. Establishment of radioactive astatine and iodine uptake in cancer cell lines expressing the human sodium/iodide symporter. *Eur J Nucl Med* 2002; 29: 842-854
7. Ward LS, Santarosa PL, Granja F, da Assumpcao LV. Low expression of sodium iodide symporter identifies aggressive thyroid tumors. *Cancer Lett* 2003; 8: 85-91
8. Czarnocka B, Pastuszka D, Łyczkowska A. Ekspresja symportera sodowo-jodowego (*NIS*) i peroksydazy tarczycowej (*TPO*) w rakach tarczycy rozwiniętych z komórek nabłonkowych tarczycy. *Endokrynologia Polska* 2003; 4: 501
9. Saito T, Endo T, Kawaguchi A. Increased expression of the sodium iodide symporter in papillary thyroid carcinomas. *J Clin Invest* 1998; 101: 1296-1300
10. Kordek R, Jassem J, Krzakowski M. *Onkologia. Podręcznik dla studentów i lekarzy*. Wyd. Medical Press Gdańsk 2003
11. Schipper ML, Weber A, Behe M. Radioiodide treatment after sodium iodide symporter gene transfer is a highly effective therapy in neuroendocrine tumor cells. *Cancer Res* 2003; 63: 1333-1338
12. Chomczyński P, Sacchi N. Single - step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate - phenol - chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 1987; 162: 156-159
13. Trapasso F, Iuliano R, Chiefari E. Iodide symporter gene expression in normal and transformed rat thyroid cells. *Eur J Endocrinol* 1999; 140: 447-451
14. Bidart JM, Mian C, Lazar V. Expression of pendrin and the pendred syndrome (*PDS*) gene in human thyroid tissues. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 2028-2033
15. Arturi F, Russo D, Bidart JM. Expression pattern of the pendrin and sodium iodide symporter genes in human thyroid carcinoma cell lines and human thyroid tumors. *Eur J Endocrinol* 2001; 145: 129-135
16. Trouttet-Masson S, Selmi-Ruby S, Bernier-Valentin F. Evidence for transcriptional and posttranscriptional alterations of the sodium/ iodide symporter expression in hypofunctioning benign and malignant thyroid tumors. *Am J Pathol* 2004; 165: 25-34



## Place of thyroglobulin antibodies assay in laboratory diagnostic of autoimmune thyroid diseases

Ewa Jastrzębska-Bohaterewicz, Wanda Wojciechowska, Andrzej Gardas

Department of Clinical Biochemistry, Medical Center of Postgraduate Education, Warsaw, Poland

### Summary

Tyroglobulin and thyroid peroxidase antibodies have been estimated in patients with thyroid autoimmune diseases. In a group of 109 patients with Hashimoto's thyroidities 85.53% and 78.89% were positive for Tyroglobulin antibodies and anti-TPO antibodies respectively. The anti-Tg antibodies has not been detected in 14.67% and anti-TPO in 21.1% patients. Both antibodies have not been detected in 1.83% of patients.

In a group of 79 patients with Graves' disease 62.02 and 91.13% were positive for anti-Tg and anti-TPO antibodies respectively. The anti-Tg antibodies has not been detected in 37.97% and anti-TPO in 8.66% patients. Both antibodies have not been detected in one patients with exophthalmos (1.26%). Our results indicate that anti-tyroglobulin

antibodies should be estimated only in patients suspected for thyroid autoimmune disease and negative for thyroid peroxidase antibodies.

(Pol J Endocrinol 2005; 1(56): 30-34)

**Key words:** thyroglobulin antibodies, autoimmune disease, diagnostic test



Andrzej Gardas  
Department of Clinical Biochemistry,  
Medical Center of Postgraduate Education,  
01-813 Warsaw. Marymoncka 99, Poland

## Miejsce oznaczeń poziomu przeciwciał anty-tyreoglobulinowych w diagnostyce autoimmunologicznych chorób tarczycy

Ewa Jastrzębska-Bohaterewicz, Wanda Wojciechowska, Andrzej Gardas

Zakład Biochemii Klinicznej, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, Warszawa

### Streszczenie

Oznaczano poziom przeciwciał anty tyreoglobulinowych (anty-Tg) i anty- peroksydazowych (anty-TPO) u pacjentów z autoimmunologicznymi chorobami tarczycy, celem określenia przydatności oznaczania poziomu przeciwciał anty-tyreoglobulinowych w diagnostyce laboratoryjnej chorób autoimmunologicznych tarczycy.

W grupie 109 pacjentów z chorobą Hashimoto przeciwciała anty-Tg wykryto u 85,53% a anty-TPO u 78,89%. Przeciwciała anty-Tg nie występowały u 14,67% a anty-TPO u 21,1% pacjentów. U 1,83% pacjentów nie wykryto obydwu typów autoprzeciwciał

W grupie 79 pacjentów z chorobą Graves-Basedowa przeciwciała anty-Tg wykryto u 62,02% a anty-TPO u 89,87%. Przeciwciała anty-Tg nie występowały u 37,97% a anty-TPO u 10,12% pacjentów. Jeden pacjent z wytrzeszczem (1,26%) nie posiadał obydwu typów autoprzeciwciał. Nasze dane wskazują na celowość oznaczania poziomu autoprzeciwciał anty tyreoglobulinowych (anty -Tg) tylko u pacjentów z podejrzeniem wystąpienia choroby autoimmunologicznej

tarczycy u których nie występują przeciwciała anty-peroksydazowe (anty -TPO).

(Endokrynol Pol 2005; 1(56): 30-34)

**Słowa kluczowe:** przeciwciała anty-tyreoglobulinowe, choroba autoimmunologiczna



Andrzej Gardas  
Zakład Biochemii Klinicznej CMKP  
01-813 Warszawa, Marymoncka 99

Praca została wykonana w ramach grantu KBN 2 PO5A 083 27

## Wstęp

Ostatnie zalecenia National Academy of Clinical Biochemistry [1] i prace duńskie [2, 3] wskazują na niecelowość oznaczeń poziomu autoprzeciwciał antytyreoglobulinowych u pacjentów z autoimmunologicznymi chorobami tarczycy z wyjątkiem terenów niedoboru jodu. Odmienny pogląd prezentują prace z ośrodków japońskich (największa dobową podaż jodu) które wskazują na dobrą korelację poziomu przeciwciał anti-Tg z wynikami biopsji i obrazem ultrasonograficznym [4, 5, 6]. Również Toyoda et al. [7] wykazują na wysoką użyteczność oznaczania poziomu przeciwciał anti-Tg w monitorowaniu subklinicznej niedoczynności tarczycy, poporodowego zapalenia tarczycy i leczenia interferonem. Podobnie Lindberg et al. [8] wskazują na użyteczność oznaczania przeciwciał anti-Tg u dzieci i młodzieży w diagnostyce autoimmunologicznych schorzeń tarczycy.

W naszej pracy chcieliśmy przebadać celowość oznaczania poziomu przeciwciał anti-Tg u pacjentów z chorobą Hashimoto i chorobą Graves-Basedowa z terenu Mazowsza.

## Materiały i metody

Pacjenci pochodzili z Miejskiego Szpitala w Siedlcach, diagnoza była oparta na klasycznych badaniach klinicznych i laboratoryjnych oznaczeniach poziomu TSH, fT<sub>4</sub>, fT<sub>3</sub> i przeciwciał antytarczycowych w surowicy krwi. Surowice pobierano tylko celem oznaczeń parametrów tarczycy i przechowywano w -70°C. Diagnoza była weryfikowana po 6 miesiącach leczenia u 85% pacjentów, 15% pacjentów zostało straconych z obserwacji.

Poziom autoprzeciwciał antytyreoglobulinowych (anti-Tg) i anty-peroksydazowych (anti-TPO) wykonywano jak opisano uprzednio [9, 10]. W skrócie płytki polistyrenowe firmy COSTAR opłaszczane antygenem (1 µg/ml) w buforze węglanowym o pH=9,6 inkubowano z rozcieńczoną surowicą 200 razy w roztworze TBS (roztwór soli fizjologicznej buforowanej trisem) z dodatkiem 0,1% Tweenu-20 i albuminy wołowej 1 mg/ml. Po 60 minutowej inkubacji płytki płukano czterokrotnie roztworem TBS z dodatkiem Tween-20, 0,1%. Do każdej studzienki płytki dodawano roztwór przeciwciał króliczych anti ludzkie IgG sprzężonych z peroksydazą chrzanową (firmy Sigma) w buforze TBS z dodatkiem Tween-20, 0,1% i BSA 1mg/ml. Po 60-minutowej inkubacji w temperaturze pokojowej płytki płukano czterokrotnie jak wyżej i dodawano substrat peroksydazy TMB (tetramethylbenzidine) w 0,1M buforze cytrynianowym o pH=4,0 w stężeniu 0,1 mg/ml. Inkubowano z substratem przez 15 minut i reakcję przerywano przez dodanie do każdej studzienki płytki 0,1 ml 1N kwasu siarkowego. Wynik odczytywano

przy długości fali 450 nm. Oznaczenia dla każdej surowicy o poziomie autoprzeciwciał powyżej 2000 IU/ml powtarzano przy rozcieńczeniu surowicy 1000-krotnym lub większym z powodu dużych błędów w górnej części krzywej standardowej. Oznaczenia standaryzowano według standardu WHO International Laboratory for Biological Standards, National Institute for Biological Standard and Control dla anti-Tg nr 65/93 i dla anti-TPO nr 66/387. Jako poziom odcięcia surowic negatywnych od pozytywnych przyjęto 100 IU/ml dla obydwu typów autoprzeciwciał

## Wyniki

Poziom autoprzeciwciał u pacjentów z chorobami autoimmunologicznymi waha się w bardzo szerokich granicach i tak u pacjentów z chorobą Hasimoto [93] u których stwierdzono występowanie przeciwciał anti-Tg ich poziom wynosił od 105 IU/ml do 170550 IU/ml, średnia arytmetyczna 6020 IU/ml, mediana 374 IU/ml, odchylenie standardowe 21109 IU/ml a współczynnik zmienności 350%. Poziom przeciwciał anti-TPO u tych samych pacjentów zawierał się w granicach od 140 IU/ml do 12000 IU/ml, średnia arytmetyczna 1554 IU/ml, mediana 854 IU/ml, odchylenie standardowe 2004 IU/ml a współczynnik zmienności 128% (tabela I).

Poziom autoprzeciwciał anti-Tg u pacjentów z chorobą Graves-Basedowa wynosił od 103 IU/ml do 118090 IU/ml, średnia arytmetyczna 3731 IU/ml, mediana 288 IU/ml, odchylenie standardowe 16813 IU/ml a współczynnik zmienności 450%. Poziom przeciwciał anti-TPO wahał się od 100 IU/ml do 13247 IU/ml, średnia arytmetyczna 2136 IU/ml, mediana 684 IU/ml, odchylenie standardowe 4234 IU/ml, a współczynnik zmienności 198% (tabela II).

W grupie 109 pacjentów z chorobą Hasimoto przeciwciała anti-Tg występowały u 93 pacjentów (85,53%), przeciwciała anti-TPO u 86 pacjentów (78,89%), przeciwciała anti-Tg nie stwierdzono u 16 pacjentów (14,67%) a przeciwciała anti-TPO nie stwierdzono u 23 pacjentów (21,1%), u dwóch pacjentów (1,83%) nie wykryto obydwu typów autoprzeciwciał. U 21 pacjentów (19,26%), u których nie wykryto przeciwciał anti-TPO stwierdzono obecność przeciwciała anti-Tg. U 14 pacjentów (12,84%), u których nie stwierdzono przeciwciał anti-Tg, wykryto obecność przeciwciał anti-TPO (tabela III).

W grupie 79 pacjentów z chorobą Graves-Basedowa przeciwciała anti-Tg występowały u 49 pacjentów (62,02%), przeciwciała anti-TPO u 71 pacjentów (89,87%), brak było przeciwciał anti-Tg u 30 pacjentów (37,97%) a przeciwciała anti-TPO brak było u 8 pacjentów (10,12%). U jednego pacjenta z wytrzeszczem (1,26%) nie występowały przeciwciała skierowane do obydwu antygenów.

**Tabela I.***Poziom autoprzeciwciał u 50 pacjentów z chorobą Graves-Basedowa*

Nr pacjenta	Poziom autoprzeciwciał w IU/ml	
	Anty-Tg	Anty-TPO
2	116	684
7	844	39
11	961	292
14	79	391
18	1362	3166
22	677	282
24	3074	7892
39	150	160
41	130	30
44	30	13247
46	130	220
51	150	270
66	30	230
68	11585	28000
71	595	280
74	89	1075
77	19710	450
88	180	110
93	920	30
110	160	547
111	118090	847
108	38	2471
117	38	1020
118	47	390
122	250	458
124	30	2500
126	38	42
127	81	1141
128	230	1941
132	103	1816
137	69	760
138	51	1150
141	60	190
164	82	624
166	33	538
168	30	480
172	31	2745
173	812	360
175	69	731
176	736	2500
177	284	67
201	65	353
201	51	1010
204	5038	10636
226	1888	50
238	41	102
251	30	245
260	30	169
261	42	959
264	30	344

**Tabela II.***Poziom autoprzeciwciał u 50 pacjentów z chorobą Hashimoto.*

Nr pacjenta	Poziom autoprzeciwciał w IU/ml	
	Anty-Tg	Anty-TPO
3	653	449
6	2828	1488
12	143	662
20	362	944
21	124	1352
40	109	450
45	230	300
47	240	250
55	2500	3484
59	300	1440
62	30	150
69	158	580
72	12	30
75	2130	340
76	127	2500
79	69	12000
80	263	250
81	1180	280
82	800	380
83	30	180
95	2160	320
102	320	90
107	1100	1785
115	45	380
121	66655	5370
125	150	30
130	1100	90
131	115	30
133	2500	2500
136	49068	600
139	280	325
140	55	2700
142	320	1300
144	52	208
145	354	673
146	170550	6500
149	2520	1942
167	119	881
180	1465	10
4195	1344	74
203	77	1950
205	26250	4435
206	62	1050
223	606	30
234	182	705
237	610	685
246	126	1210
252	36	208
256	1450	544
259	308	1359

**Tabela III.**  
Przeciwiwała anty-Tg i anty-TPO u pacjentów z chorobą Graves-Basedowa i chorobą Hashimoto.

Przeciwiwała	Choroba Graves-Basedowa, n=79		Choroba Hashimoto, n=109	
	Liczba pacjentów	%	Liczba pacjentów	%
Anty-Tg (+)	49	62,02	93	85,53
Anty-TPO (+)	71	89,87	86	78,89
Anty-Tg (-)	30	37,97	16	14,67
Anty-TPO (-)	8	10,12	23	21,10
Anty-Tg (-) i Anty-TPO (-)	1	1,26	2	1,83
Anty-Tg (+) i anty-TPO (-)	7	8,86	21	19,26
Anty-Tg (-) i Anty-TPO (+)	29	36,70	14	12,84

U 29 pacjentów u których nie wykryto obecności przeciwiwał anty-Tg (36,7%) stwierdzono obecność przeciwiwał anty-TPO. U 7 pacjentów (8,86%) u których nie wykryto przeciwiwał anty-TPO stwierdzono obecność przeciwiwał anty-Tg, Tabela III.

## Dyskusja

Wydaje się, że ze względów ekonomicznych podstawowym autoprzeciwiwałem oznaczanym w chorobach autoimmunologicznych tarczycy powinny być przeciwiwała anty-peroksydazowe (anty-TPO) zgodnie z zaleceniami National Academy of Clinical Biochemistry [1]. Przeciwiwała anty-TPO są uznawane za najczulszy wskaźnik procesu autoimmunologicznego w tarczycy [11, 12].

Przedstawione wyniki wskazują jednak, że zalecenie National Academy of Clinical Biochemistry [1] i prace duńskie [2, 3] zalecające rezygnację z oznaczania poziomu przeciwiwał anty-tyreoglobulinowych (anty-Tg) u wszystkich pacjentów z autoimmunologicznymi schorzeniami tarczycy odnoszą się tylko do niektórych rejonów geograficznych i w rejonie Mazowsza, przynajmniej w części przypadków, wskazane jest również oznaczanie poziomu przeciwiwał anty-tyreoglobulinowych (anty-Tg). Wyniki nasze wskazują, że oznaczenia poziomu przeciwiwał anty-Tg powinny być wykonywane u pacjentów, u których nie wykryto przeciwiwał anty-TPO a równocześnie istnieje podejrzenie choroby autoimmunologicznej tarczycy. Przyjmując taki system postępowania diagnostycznego potwierdzimy obecność procesu autoimmunologicznego w tarczycy u 19,26% pacjentów z chorobą Hashimoto i 8,86% pacjentów z chorobą Graves-Basedowa, u których nie wykryto przeciwiwał anty-peroksydazowych. Również nasze wyniki wskazują, że równoczesne oznaczanie obydwu typów przeciwiwał (anty-TPO i anty-Tg) jest niewskazane ze względów ekonomicznych, wykrycie przeciwiwał anty-tyreoglobulinowych u pacjentów z obecnymi przeciwiwałami anty-peroksydazowymi (anty-TPO) nie dostarcza istotnych informacji diagnostycznych a znacznie podwyższa koszty diagnostyki. Występowanie przeciwiwał anty-tarczycowych wskazuje przede wszystkim na

toczący się proces autoimmunologiczny i według większości autorów nie rozstrzyga o rodzaju schorzenia i nie ma wartości prognostycznej [13, 14, 15]. Chociaż u części pacjentów zmiana w poziomie autoprzeciwiwał w surowicy dobrze koreluje z aktywnością choroby.

Dane nasze natomiast nie zaprzeczają wysokiej użyteczności oznaczeń przeciwiwał anty-Tg w poporodowym zapaleniu tarczycy, monitorowaniu leczenia interferonem, amiodaronem lub litem i bezwzględnej konieczności ich oznaczania we wszystkich przypadkach oznaczania poziomu tyreoglobliny jako markera wznowy zróżnicowanych nowotworów tarczycy, zgodnie z zaleceniami National Academy of Clinical Biochemistry [1]. Często wzrost poziomu przeciwiwał anty-Tg jest pierwszym sygnałem nawrotu choroby [16]

W naszej pracy niewielka część pacjentów z autoimmunologicznymi chorobami tarczycy nie wykazywała zarówno obecności przeciwiwał anty-TPO jak i anty-Tg, 1,83% w chorobie Hashimoto i 1,26% w chorobie Gravesa, dane te są zgodne z pracami innych autorów którzy również opisują przypadki chorób autoimmunologicznych tarczycy bez autoprzeciwiwał [17].

## Piśmiennictwo

- Demers LM, Spencer CA. Laboratory support for the diagnosis and monitoring of thyroid disease. National Academy of Clinical Biochemistry <http://www.nacb.org> 2002;1:125.
- Feldt-Rasmussen U, Hoier-Madsen M, Bech K et al. Antithyroid peroxidase antibodies in thyroid disorders and non-thyroid autoimmune diseases. *Autoimmunity* 1991; 9: 245-253.
- Ericsson UB, Christensen SB, Thorell JI et al., A high prevalence of thyroglobulin autoantibodies in adults with and without thyroid disease as measured with a sensitive solid-phase immunosorbent radioassay. *Clin Immunol Immunopathol* 1985; 37: 154-162.
- Takamatsu J, Yoshida S, Yokozawa T et al. Correlation of antithyroglobulin and antithyroid-peroxidase antibody profiles with clinical and ultrasound characteristic of chronic thyroiditis. *Thyroid* 1998; 8: 1101-1106.
- Kasagi K, Kousaka T, Higuchi K et al. Clinical significance of measurements of antithyroid antibodies in the diagnosis of Hashimoto's thyroiditis: comparison with histological findings. *Thyroid* 1996; 6: 445-456

6. Senda Y, Kawai NM, Mizukami Y, et al., Estimation of anti-thyroid peroxidase autoantibody (TPOAb) and anti-thyroglobulin autoantibody (TgAb) in patients with various thyroid disease - comparison between histopathological findings and serological results in patients with Hashimoto's thyroidities. *Jap J Clin Patholo.* 1995; 43: 1243-1250.
7. Toyoda N, Nishikawa M, Iwasaki T. Anti-thyroglobulin antibodies *Jap J Clin Medicine* 1999; 57: 1810-1814.
8. Lindberg B, Svensson J, Ercsson UB et al., Comparison of some different methods for analysis of thyroid autoantibodies: impiorntance of thyroglobulin autoantibodies. *Thyroid* 2001; 11: 265-269.
9. Gardas A, Bauer A. Immunoenzymatyczna metoda oznaczania autoprzeciwciał reagujących z peroksydazą tarczycową. *Diagnostyka Laboratoryjna* 1995; 31:43-49.
10. Gardas A, Bauer A. Immunoenzymatyczna metoda oznaczania poziomu autoprzeciwciał anty-tyreoglobulinowych w surowicy krwi. *Endokrynologia Polska* 1987; 38: 233-241.
11. Mariotti S, Caturgeli P, Piccolo P et al. Antithyroid peroxidase autoantibodies in thyropid diseases. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 71: 35-40.
12. Hollowell JG, Staehling NW, Flanders WD et al. Serum TSH T4 and thyroid antibodies in the USA population (1988-1994) National Health and Nutrtrion Survey. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:489-499.
13. Lavard L, Perrild H, Jacobsen BB et al. Prevalence of thyroid peroxidase, thyroglobulin and thyrotropin receptor antibodies in a long-term follow-up of juvenile Graves' disease. *Autoimmunity* 2000; 32: 267-172.
14. Gardas A, Blottner A, Domek H. Comparison of autoantibodies level in thyroid autoimmune disease estimated by different methods. *Exp Clin Endocrinol* 1988; 92: 77-84.
15. Feldt-Rasumussen U, Schleusener H, Caryon P. Meta-analysis evaluation of the impact of thyrotropin receptor antibodies on long term remission after medical therapy of Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 78: 980103.
16. Spencer CA, Wang C, Fatemi S et al. Serum thyroglobulin autoantibodies: prevelance, influence on serum thyroglobulin measurement and prognostic significance in patients with differentiated thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 1121-1127.
17. Weetman AP, McGregor AM. Autoimmune thyroid disease: further developments in our understanding. *Endocrine Reviews* 1994; 15: 788-830.





## Biochemical symptoms of hypothyreosis in the population of Warsaw region

**Jerzy Janecki**

*Institute of Biocybernetics and Biomedical Engineering, Polish Academy of Sciences*

### Summary

Doctors in Warsaw region claimed that the results of fT4 and TSH examinations originating from different laboratories are incomparable. Therefore the Gaussian Reference Ranges (GRR) of archival sets of data from 6 laboratories (together 18793 fT4 and 44851 TSH results) were calculated separately with JEG method. The upper and lower ranges were compared with data from 11 bibliographical sources. It was found that in the investigated population the both averaged ranges (high and low) of GRR of fT4 are statistical significant lower than the reference data. In the same time the averaged upper range of GRR of TSH was higher than the averaged data from the literature. Based on statistic analysis of these results it could be estimated that about 20% of the investigated population show evident and about 50% show moderate signs of hypothyreosis.

*(Pol J Endocrinol 2005; 1(56): 35-38)*

**Key words:** free thyroxine in population, thyroid-stimulating hormone in population, hypothyreosis

## Laboratoryjne objawy niedoczynności tarczycy w populacji okręgu warszawskiego

**Jerzy Janecki**

*Instytut Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej Polskiej Akademii Nauk, Warszawa*

### Streszczenie

Ponieważ lekarze skarżyli się na nieporównywalność wyników oznaczania fT4 i TSH wykonanych w różnych laboratoriach regionu warszawskiego, przebadano zbiory archiwalne 6 laboratoriów z tego regionu (łącznie 18793 badania fT4 i 44851 badania TSH) wyznaczając Gaussowskie Zakresy Referencyjne metodą JEG. Zakresy, górny i dolny, porównano z analogicznymi zakresami podanymi w 11 pozycjach piśmienniczych. Stwierdzono, że oba uśrednione zakresy GZR fT4 są statystycznie istotnie niższe a górny zakres GZR dla TSH istotnie wyższy w populacji badanej, aniżeli uśrednione wartości referencyjne podawane w piśmiennictwie. Na podstawie tych wyników można szacować, że ok. 20% poddanej badaniu populacji ma wyraźną a połowa umiarkowaną pierwotną niedoczynność tarczycy.

*(Endokrynol Pol 2005; 1(56): 35-38)*

**Słowa kluczowe:** wolna tyroksyna w populacji, tyreotropina w populacji, niedoczynność tarczycy



Jerzy Janecki  
Instytut Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej  
Polskiej Akademii Nauk  
02-109 Warszawa, ul.Księcia Trojdena 4  
e-mail: jejan@ibib.waw.pl

## Wstęp

Lekarze z Warszawy i okolic skarżyli się, że wyniki badań panelu tarczycowego pochodzące z różnych laboratoriów wykazują znaczną rozbieżność. Dla zobiektywizowania tego faktu porównano wyniki archiwalne z 6 dużych laboratoriów [1]. Przy tej okazji zauważono, że zakresy referencyjne („normy”) fT4 i TSH odbiegają od wartości literaturowych. Dla wyjaśnienia zjawiska porównano statystycznie uśrednione wartości zakresu referencyjnego fT4 i TSH z sześciu laboratoriów warszawskich z uśrednionymi wartościami referencyjnymi z różnych źródeł literaturowych.

## Materiał i metody

Wszystkie laboratoria stosowały metodę immunoenzymatyczną typu ELISA z odczytem fluorescencji lub chemoluminescencji. Aparaty analityczne były kalibrowane zgodnie z procedurami polecanymi przez producentów zestawów roboczych z użyciem oryginalnych kalibratorów i odczynników. Wyniki badania TSH przed analizą statystyczną logarytmowano.

Dla statystycznej oceny rozkładów zbiorów wyników stosowano metodę JEG [2, 3, 4] umożliwiającą wyznaczenie z tych rozkładów Gaussowskich Zakresów Referencyjnych (GZR), które dobrze korelują z ogólnie przyjętymi wartościami referencyjnymi. Różnice pomiędzy wynikami z laboratoriów i danymi z piśmiennictwa oceniono testem t Studenta [5].

## Wyniki

W tabeli I przedstawiono informacje o poddanych analizie zbiorach wyników badań laboratoryjnych, o używanych przez laboratoria automatach oraz cechy rozkładów (dolne i górne zakresy) łącznie 18 793 wyników (GZR) oznaczania fT4 oraz 44 851 wyników TSH.

Tabela II prezentuje uwzględnione źródła literaturowe [5-15], podawane przez nie zakresy referencyjne fT4 i TSH, oraz porównanie statystyczne tych wyników z danymi z naszych laboratoriów (z tabeli I).

**Tabela I**

*Analizowane Pracownie, ich sprzęt i wyniki oznaczania (GZR) fT4 oraz TSH*

laboratorium	Aparat	ilość badań fT4	fT4 poziom dolny	fT4 poziom górny	ilość badań TSH	TSH poziom dolny	TSH poziom górny
A	Immulite	298	<b>4,00</b>	<b>11,04</b>	3 350	0,22	5,60
B	Centaur	776	<b>11,00</b>	18,9 2	8 555	<b>0,44</b>	5,39
K	AxSym	3 189	8,00	17,72	11 983	0,33	5,40
M	Access	2 163	5,00	14,38	5 702	0,22	<b>4,24</b>
N	m Vidas	3 101	7,61	17,68	5 016	0,37	5,02
Z	Immulite	9 266	8,48	<b>24,21</b>	10 245	<b>0,16</b>	<b>8,10</b>
średnia (MV)			<b>7,35</b>	<b>17,32</b>		<b>0,29</b>	<b>5,63</b>
odchyl.stand.(SD)			2,52	4,44		0,11	1,31
WZ%			34,29	25,64		37,93	23,27

**Tabela II**

*Uwzględnione źródła literaturowe, podawane przez nie zakresy referencyjne fT4 i TSH, (d = poziom dolny, MV-2SD, g = poziom górny, MV+2SD) oraz porównanie statystyczne tych wyników z danymi (GZR) z naszych laboratoriów*

źródło	rok	fT4 d	fT4 g	TSH d	TSH g
Jakubowki [6]	1994	<b>9,0</b>	24,0	0,30	3,00
Gardas [7]	2000	10,3	25,7	0,25	3,10
Elmlinger [8]	2001	9,3	<b>20,5</b>	0,52	<b>2,36</b>
Neumeister [9]	2001	10,0	22,0	0,20	3,10
Merck [10]	2001	10,0	23,0	<b>0,50</b>	4,70
Demers [11]	2002	9,0	23,0	0,40	4,00
Dębińska [12]	2002	<b>12,0</b>	25,0	0,23	3,80
Gietka [13]	2002	9,0	23,0	0,30	5,00
Hubl [14]	2002	11,2	<b>26,9</b>	<b>0,17</b>	4,23
Sztefko [15]	2002	10,5	23,0	0,30	3,00
Cuartero [16]	2003	11,48	23,2	0,44	<b>5,74</b>
liczba danych referencyjnych		11	11	11	11
<b>średnio (MV) ref.</b>		<b>10,2</b>	<b>23,6</b>	<b>0,35</b>	<b>3,82</b>
odchylenie stand. (SD) ref.		1,06	1,77	0,12	1,03
WZ% ref.		10,39	7,5	34,2	26,9
liczba GZR		6	6	6	6
<b>średnio (MV) GZR</b>		<b>7,35</b>	<b>17,32</b>	<b>0,29</b>	<b>5,63</b>
SD GZR		2,52	4,44	0,11	1,31
WZ% GZR		34	26	37	23
różnica GZR-ref		-2,85	-6,28	-0,06	1,81
<b>test t</b>		<b>-3,309</b>	<b>-7,292</b>	-1,01	<b>3,146</b>
istotność p		<b>&lt;0,01</b>	<b>&lt;&lt;0,01</b>	>0,20	<b>&lt;0,01</b>

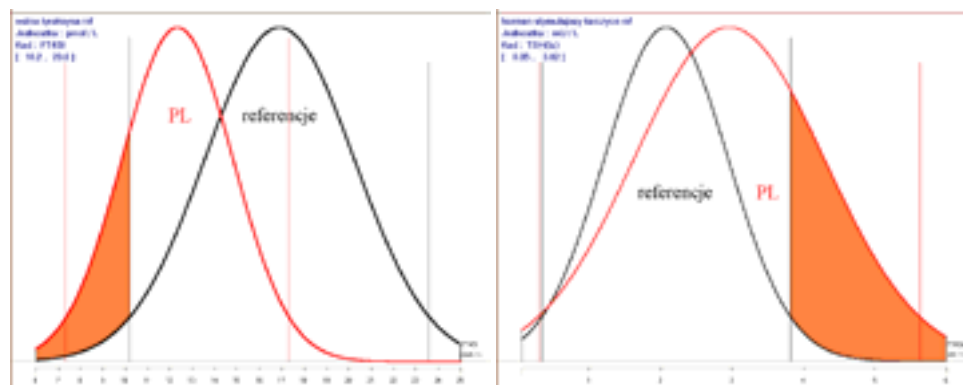
## Omówienie wyników

Zgodnie ze Standardami Endokrynologii [17] podwyższenie poziomu tyreotropiny z jednoczesnym obniżeniem poziomu tyroksyny wskazuje na pierwotną niedoczynność tarczycy.

Stopień tej niedoczynności w zbadanej populacji można przedstawić w postaci wizualnej, jak na ryc. 1. Na obu obrazach tej ryciny ustalone uśrednione wyniki przedstawiono w postaci krzywych rozkładu normalnego. Ciemniejsze linie odpowiadają uśrednionym zakresom podanym przez 11 źródeł piśmienniczych, jaśniejsze linie ograniczają uśrednione reprezentacje wyników objętych GZR

**Ryc. 1.**

Obrazy przedstawiające uśrednione GZR rozkładów wyników oznaczania FT4 i TSH w 6 laboratoriach polskich (jaśniejsze linie) oraz wartości referencyjne z literatury (ciemniejsze linie).



danych zebranych w 6 laboratoriach polskich. Na wszystkich krzywych dzwonowych przedstawiono także pionowymi liniami zakres wartości „normalnych” dla danej krzywej, odpowiadających ich wartościom średnim zmniejszonym i zwiększonym o podwójne wartości odpowiednich odchyłeń standardowych. Zaciemnione pola reprezentują te wyniki z laboratoriów polskich, które wykraczają poza zakres wartości referencyjnych. Na lewym obrazie ryciny 1, przedstawiającej sytuację wolnej tyroksyny, wyraźnie widać, że zaciemniony obszar leży poza zakresem referencyjnym wartości niskich. Na tym obrazie widoczne jest także przesunięcie całego rozkładu wyników FT4 w lewo, ku wartościom niższym: prawie cały rozkład wartości z laboratoriów polskich odpowiada dolnej połowie rozkładu wartości referencyjnych, lub też znajduje się poza ich zakresem. Sytuację wyników tyreotropiny przedstawia prawy obraz ryciny 1. Można zauważyć, że krzywa rozkładu wyników TSH z polskich laboratoriów jest znacznie szersza od krzywej rozkładu wartości referencyjnych, co wskazuje na większy rozrzut wyników. Nie wykonano dokładnych pomiarów, ale wydaje się, że obszar wyników TSH wykraczający poza zakres referencyjny jest nieco większy, aniżeli FT4, w każdym razie jest z nim porównywalny. Cała krzywa reprezentująca wyniki TSH w polskich laboratoriach jest względem zakresu referencyjnego przesunięta ku wartościom wyższym.

**Wnioski**

1. Na zbiorach archiwalnych, pochodzących z sześciu polskich laboratoriów z regionu warszawskiego, przeprowadzono badania zakresów statystycznych rozkładów (GZR) 18793 wyników oznaczania wolnej tyroksyny i 44851 wyników oznaczania tyreotropiny, ustalając ich dolne i górne granice, które uśredniono.
2. Analogicznie uśredniono dolne i górne wartości „norm” tych hormonów podane w 11 źródłach piśmienniczych.
3. Porównanie tych uśrednionych wartości wykazało między nimi statystycznie istotne

różnice w postaci obniżenia w materiale własnym średnich wartości FT4, natomiast podwyższenia średnich wartości TSH.

4. Stwierdzone przesunięcia wartości wyników FT4 i TSH odpowiadają pierwotnej niedoczynności tarczycy.
5. Przesunięcia ilościowe stwierdza się w zakresie całych porównywanych krzywych rozkładów wyników. Można szacować, że z punktu widzenia diagnostyki laboratoryjnej niedoczynność tarczycy jest ewidentna u 20 – 25% badanych osób, ale umiarkowane zaburzenie równowagi tyreologicznej obejmuje około połowy badanej populacji.

**Piśmiennictwo**

1. Janecki J, Urbaniak A, Rau J. Porównanie dużych zbiorów wyników badania panelu tarczycowego (FT3, FT4, TSH). *Diagn Lab* 2004; 40 (3): 518
2. Janecki J. Wizualna analiza rozkładów dużych zbiorów wyników badań laboratoryjnych. *Diagn Lab* 2000; 36 (4): 439 – 469 Część I „Metoda”; Część II „Gaussowskie Zakresy Referencyjne”; Część III - „Zmienność GZR oraz praktyczne wykorzystanie metody”.
3. Janecki J. A computerised graphic method for the extraction of a Gaussian part from the Gaussian - like distribution and its application in a medical laboratory. *Application of Mathematics in Biology and Medicine. Proc. of the VII. National Conference. Zawoja* 2001: 67-71
4. Janecki J. Analiza rozkładów wyników badań laboratoryjnych. Wyznaczenie GZR IBIB PAN, Warszawa, 2004: 1-209
5. Tadeusiewicz R, Izworski A, Majewski J. *Biometria*. AGH, Kraków, 1993
6. Jakubowski Z, Kabata J, Kalinowski L, Szczepańska-Konkel M, Angielski S. *Badania laboratoryjne w codziennej praktyce*. 1994, Gdańsk
7. Gardas A. *Diagnostyka laboratoryjna schorzeń tarczycy*. Wiedza Medyczna, 2000
8. Elmlinger MW, Kuhnle W, Lambrecht HG, Renke MB. Reference intervals from birth to adulthood for serum thyroxine, triiodothyronine, free T3, free T4, thyroxine binding globulin and thyrotropin. *Clin Chem Lab Med* 2001; 39 (10): 973-979
9. Neumeister B, Besenthal I, Liebich H: *Diagnostyka Laboratoryjna*. Urban & Partner, Wrocław, 2001
10. *The Merck Manual. Podręcznik Diagnostyki i Terapii*. Urban & Partner, Wrocław, 2002
11. Demers LM, Spencer CA: Free thyroxine (FT4) and free triiodothyronine (FT3) estimate test. *NACB Laboratory support for the diagnosis and monitoring of thyroid disease*. 2002, 3B 29; 3C 34

12. Dębińska-Kieć A, Naskalski J. Diagnostyka laboratoryjna z elementami biochemii klinicznej. Urban & Partner, Wrocław, 2002
13. Gietka-Czernel M. Wole guzowate obojętne. In: Standardy Endokrynologii (Zgliczyński S, Zgliczyński W, ed). Studio PIN, Kraków, 67
14. Hubl W, Schmieder J, Gladrow E, Demant T. Reference intervals for thyroid hormones on the Architect analyser. Clin Chem Lab Med 2002; 40 (2): 165-6
15. Sztefko K. Wykłady monograficzne z diagnostyki laboratoryjnej. Wydawnictwo UJ, Kraków, 2002
16. Cuartero BG et al. Valores de tirotropina, triyodotironina libre y tiroxina libre an ninos y adolescentes en la Comunidad Autonoma de Madrid mediante quimioluminiscencia. Anales in Pediatría, 2003; 58 (3): 222-227
17. Jastrzębska H. Niedoczynność tarczycy. In: Standardy Endokrynologii (Zgliczyński S, Zgliczyński W, ed). Warszawa 2004: 59
18. Janecki J. The identification and correction of systematic and random errors in laboratory tests results based on analysis of distribution in the in- and outpatients population. <http://www.janecki.info>



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

Marzena Korzeniewska<sup>2</sup>, Krzysztof Kołomecki<sup>1</sup>, Henryk Stępień<sup>3</sup>, Maciej Naze<sup>1</sup>, Tomasz Stępień<sup>1</sup>, Krzysztof Kuzdak<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of General and Endocrinological Surgery, Medical University, Łódź

<sup>2</sup> Department of Anesthesiology and Intensive Care, Regional Specialistic Hospital, Łódź

<sup>3</sup> Institute of Endocrinology, Medical University of Łódź

### Abstract

**Introduction:** The growth and persistence of solid tumors and their metastases is connected with angiogenesis. This process is determined by activity of pro- and antyangiogenic 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 test.

**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) concentrations 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.

(*Pol J Endocrinol* 2005; 1(56): 39-44)

**Key words:** angiogenesis, VEGF, sVEGFR-1, sVEGFR-2, adrenal tumors



M. Korzeniewska  
Kopernik's Memorial Hospital  
Department of Anaesthesiology and Intensive Care  
ul. Pabianicka 62  
93-513 Lodz, Poland



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

Marzena Korzeniewska<sup>2</sup>, Krzysztof Kołomecki<sup>1</sup>, Henryk Stępień<sup>3</sup>, Maciej Naze<sup>1</sup>, Tomasz Stępień<sup>1</sup>, Krzysztof Kuzdak<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Klinika Chirurgii Endokrynologicznej i Ogólnej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

<sup>2</sup> Oddział Anestezjologii i Intensywnej Terapii Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego im. M. Kopernika w Łodzi

<sup>3</sup> Instytut Endokrynologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

### Streszczenie

**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 śródbłonna 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±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.

(*Endokrynol Pol* 2005; 1(56): 39-44)

**Słowa kluczowe:** angiogeneza, VEGF, sVEGFR-1, sVEGFR-2, guzy nadnerczy



M. Korzeniewska  
Oddział Anestezjologii i Intensywnej Terapii  
Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego  
im. M. Kopernika w Łodzi  
ul. Pabianicka 62  
93-513 Łódź

## Wstęp

Szybki rozwój nowoczesnych technik obrazowania jamy brzusznej (USG, TK, MR) spowodował wzrost liczby przypadkowo wykrytych nieczynnych hormonalnie guzów nadnerczy. Guzy o tym charakterze zwane guzami incydentaloma, mogą być zarówno zmianami łagodnymi, jak i złośliwymi. Przedoperacyjne różnicowanie tych zmian na zmiany łagodne i złośliwe jest bardzo trudne, ponieważ prawidłowe stężenie hormonów nadnerczowych i ich metabolitów nie daje żadnych wskazówek diagnostycznych. Stosowane metody obrazowe dokładnie uwidaczniając położenie guza, nie są w stanie ostatecznie określić charakteru utkania diagnozowanej zmiany [1-4].

Angiogeneza, jako proces powstawania nowych naczyń krwionośnych, leży u podstaw wzrostu i rozwoju guzów litych i ich przerzutów. Sieć nowych naczyń umożliwia odpowiednie zaopatrzenie guza w tlen i w produkty odżywcze [5, 6]. Wzajemny stosunek aktywności czynników pobudzających i hamujących angiogenezę decyduje o stopniu jej rozwoju. Jednym z najważniejszych czynników stymulujących rozwój angiogenezy jest naczyniowo śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF). Do czynników hamujących angiogenezę należą min. rozpuszczalne receptory naczyniowo śródbłonkowego czynnika wzrostu (sVEGFR-1 i sVEGFR-2) [5-8]. VEGF działa stymulująco nie tylko na proliferację komórek śródbłonka, ale również na ich migrację. Wzmaga on wzrost przepuszczalności naczyń, umożliwiając przenikanie do przestrzeni pozanaczyniowej plazminogenu i fibrynogenu. Powoduje stymulację aktywatorów plazminogenu odpowiedzialnych za przekształcenie plazminogenu w plazminę, która odślania aktywne centra metaloproteinaz (MMPs) [5, 6, 9, 10]. MMPs, enzymy proteolityczne macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM), jako jedyne trawią kolagen typu IV, stanowiący szkielet błony podstawnej naczyń [10, 11]. Rozpuszczalne receptory VEGF (sVEGFR) zawierające domenę zewnątrzkomórkową receptorów, wiążącą ligand, wydają się być naturalnym antagonistą VEGF. Związanie czynnika wzrostu przed jego dotarciem do receptora na powierzchni komórek śródbłonka zapobiega stymulacji tych komórek do ich proliferacji i migracji, a tym samym ogranicza tworzenie nowych naczyń krwionośnych. Za powstawanie rozpuszczalnych form receptorów odpowiedzialne są dwa różne mechanizmy. Pierwszy mechanizm wymagający proteolizy, ograniczonej do zewnętrznego regionu receptora błonowego (domena zewnątrzkomórkowa wiążąca ligand), nazywany został „shedding” (zrzucenie). W drugim mechanizmie rozpuszczalny receptor (sVEGFR-1) powstaje przez przepisanie sekwencji nukleotydów na molekularne białko przy pomocy mRNA (zawiera informację z domeny wewnątrzkomórkowej) [8, 12, 13]. sVEGFR-1

z dużym prawdopodobieństwem jest negatywnym regulatorem dostępności VEGF (łączy się z VEGF z takim samym powinowactwem jak pełnej długości receptor błonowy). Może też tworzyć heterodimery z receptorami VEGFR-1 i VEGFR-2 znosząc przeniesienie sygnału w komórce [12, 13].

Wydaje się, że metody oceny stopnia rozwoju angiogenezy guzów, w tym także guzów wywodzących się z gruczołów dokrewnych, mogą mieć znaczenie diagnostyczne w różnicowaniu zmian łagodnych i złośliwych [1, 2, 5, 7, 10, 14].

## Cel pracy

Celem pracy była ocena stężeń wybranych, przeciwstawnie działających na proces angiogenezy czynników, we krwi u chorych z nieczynnymi hormonalnie guzami nadnerczy.

## Materiał i metoda

Badaniami objęto grupę 27 chorych w wieku 36 – 72 lata (18 kobiet i 9 mężczyzn) operowanych w Klinice Chirurgii Endokrynologicznej i Ogólnej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi w latach 2001 – 2003 z powodu nieczynnych hormonalnie guzów nadnerczy. U żadnego z tych chorych nie występowały kliniczne cechy nadczynności hormonalnej kory ani rdzenia nadnerczy. Guzy te zostały wykryte przypadkowo, w czasie badania USG lub TK, wykonywanych z innych powodów aniżeli podejrzenie istnienia guza nadnercza. U wszystkich chorych wykonano następujące badania hormonalne oceniające czynność hormonalną kory: stężenie ACTH, kortyzolu (profil dobowy) i aldosteronu we krwi, stężenie wolnego kortyzolu w dobowej zbiórce moczu, skrócony test Liddle’a. Celem wykluczenia nadczynności rdzenia nadnerczy u wszystkich chorych zbadano stężenie chromograniny A we krwi. Wyniki wszystkich wykonanych badań były w granicach normy. Stężenie VEGF, sVEGFR-1 i sVEGFR-2 oznaczano przed zabiegiem operacyjnym, w surowicy krwi, metodą immunoenzymatyczną ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), przy użyciu zestawów Quantikine firmy R&D Systems.

Rodzaj guza określono na podstawie badania histopatologicznego usuniętej zmiany. Przypadki raka kory nadnerczy były rozpoznawane według kryteriów histologicznych ujętych w „Zasadach diagnostyki i chirurgicznego leczenia nowotworów w Polsce” [15]. Ze względu na rodzaj utkania usuniętego guza chorych podzielono na trzy grupy.

Grupę I (8 chorych) stanowili chorzy z pierwotnymi rakami kory nadnerczy (bez odległych przerzutów).

Grupę II (4 chorych) stanowili chorzy z guzami przerzutowymi do nadnerczy (3 osoby – przerzut raka płuc, 1 osoba – przerzut raka nerki).

Grupę III (15 chorych) stanowili chorzy z gruczolakami kory.

Grupę kontrolną IV stanowiło 10 zdrowych ochotników w wieku 33 – 68 lat (6 kobiet i 4 mężczyźni).

Analizę statystyczną przeprowadzono posługując się testem t-Studenta dla porównania wartości średnich badanych czynników, testem korelacji Pearsona dla oceny współczynnika korelacji pomiędzy wartościami w poszczególnych grupach badanych oraz testem serii dla porównania całych prób (badane czynniki).

## Wyniki

Stężenia VEGF, sVEGFR-1 i sVEGFR-2 podane są w pg/ml. Przyjęto, że jeżeli poziom istotności jest mniejszy niż 0,05 to różnica jest istotna statystycznie.

Szczegółowe średnie wartości stężeń badanych czynników w poszczególnych grupach chorych przedstawia tabela I

Średnie stężenie VEGF było istotnie wyższe w grupie I (raki) i grupie II (guzy przerzutowe) w porównaniu z grupą kontrolną. Nie różniło się natomiast istotnie pomiędzy grupą III (gruczolaki) a grupą kontrolną. Średnie stężenie VEGF było istotnie wyższe w grupie I niż w grupie II i III oraz wyższe w grupie II niż w III.

Średnie stężenie sVEGFR-1 było istotnie wyższe w grupie kontrolnej i w obu grupach badanych z guzami złośliwymi (grupa I i II) w porównaniu z grupą III, nie stwierdzono różnicy średnich stężeń sVEGFR-1 pomiędzy grupami chorych I i II. Nie wykazano istotnych różnic pomiędzy średnimi

stężeniami sVEGFR-1 w grupach chorych z guzami złośliwymi (grupa I i II) a grupą kontrolną.

Średnie stężenie sVEGFR-2 nie wykazywało różnic pomiędzy grupami I i II, natomiast było istotnie wyższe w grupie III w stosunku do grupy I i II. We wszystkich grupach badanych tzn. I, II, III stwierdzono istotnie niższą wartość średniego stężenia sVEGFR-2 w stosunku do grupy kontrolnej.

W przypadku stężeń VEGF istotną statystycznie różnicę między próbami stwierdzono porównując testem serii grupy I do II, III, IV oraz grupę II do IV.

W przypadku stężeń sVEGFR-1 istotną statystycznie różnicę między próbami stwierdzono porównując testem serii grupy chorych z guzami złośliwymi (grupa I i II) do grupy III (zmiany łagodne).

W przypadku stężeń sVEGFR-2 istotną statystycznie różnicę między próbami stwierdzono porównując testem serii grupy II do IV.

Nie stwierdzono żadnej istotnej statystycznie korelacji pomiędzy wartościami stężenia VEGF i sVEGFR we krwi u chorych z grup badanych ani u osób z grupy kontrolnej.

## Dyskusja

W wielu pracach podnosi się znaczenie roli VEGF w rozwoju guzów litych. W procesie angiogenezy dowiedziono udział endogennych inhibitorów, takich jak: angiostatyna, endostatyna, rozpuszczalne receptory naczyniowego czynnika wzrostu (sVEGFR-1, sVEGFR-2). Zaobserwowano występowanie podwyższonego stężenia VEGF we krwi u chorych z guzami złośliwymi, w tym z rakami nadnerczy [9, 16]. Podwyższone stężenie endostatyny we krwi stwierdzono u chorych z zaawansowaną chorobą nowotworową np. w przebiegu raka jelita grubego [17]. Wielu autorów obserwoowało podwyższone stężenie zarówno VEGF, jak i endostatyny u chorych z różnymi guzami złośliwymi [9, 16-20]. Ostatnio wielu autorów bada wpływ rozpuszczalnych form receptorów na angiogenezę. Pierwsze doniesienia o formach rozpuszczalnych sVEGFR-1 pochodziły od autorów badających surowice lub płyn owodniowy ciężarnych kobiet [8, 12, 13, 21, 22]. Kendall i Thomas w 1993 roku znaleźli „zbiór” cDNA z komórek śródbłonna żyły pępowinowej (HUVECs) odpowiedzialny za powstawanie sVEGFR-1 [21]. Barleon i wsp. donieśli o obecności endogennych rozpuszczalnych form receptora VEGF (sVEGFR-1, sVEGFR-2) w surowicy niezależnie od płci i wieku u zdrowych dawców [12].

Kasperlik-Zaluska i wsp. nie potwierdzili istnienia zależności pomiędzy złośliwymi guzami nadnerczy a stężeniem VEGF we krwi u chorych z tymi guzami, wskazując na konieczność dalszych

**Tabela I** Średnie wartości stężeń VEGF, sVEGFR-1 i sVEGFR-2

**Table I** VEGF, sVEGFR-1 and sVEGFR-2 mean blood serum levels

	VEGF	sVEGFR-1	sVEGFR-2
Grupa I (raki kory) n=8	1263,8 (SD=897,8) <b>p&lt;0,05</b>	53,8 (SD=21,4) <b>p&gt;0,05</b>	5893,7 (SD=1043,6) <b>p&lt;0,05</b>
Grupa II (guzy przerzutowe) n=4	485,9 (SD=101,2) <b>p&lt;0,05</b>	51,7 (SD=9,5) <b>p&gt;0,05</b>	5455,2 (SD=1014,8) <b>p&lt;0,05</b>
Grupa III (gruczolaki) n=15	334,2 (SD=305,3) <b>p&gt;0,05</b>	21,7 (SD=7,2) <b>p&lt;0,05</b>	7106,4 (SD=1263,6) <b>p&lt;0,05</b>
Grupa IV (kontrolna) n=10	197,2 (SD=103,6)	43,5 (SD=21,5)	8976,3 (SD=1456,3)

Group I (cortex carcinoma)

Group II (adrenal metastases)

Group III (cortex adenoma)

Control group

SD-odchylenie standardowe / standard deviation

p-poziom istotności: pomiędzy grupą kontrolną a poszczególnymi grupami

p-significance level: between the control group and each group studied



badania na większej grupie chorych [23]. W naszej pracy potwierdziliśmy obserwację, publikowaną w poprzednich doniesieniach, że średnie stężenie VEGF we krwi chorych z guzami złośliwymi nadnerczy jest istotnie wyższe w porównaniu z chorymi z łagodnymi gruczolakami i z osobami z grupy kontrolnej [9, 16]. Teraz wykazaliśmy dodatkowo, że średnie stężenie tej cytokiny jest istotnie wyższe we krwi u chorych z rakami pierwotnymi kory nadnerczy (bez przerzutów odległych), aniżeli u chorych z guzami przerzutowymi do nadnerczy.

Porównanie średnich stężeń sVEGFR-1 i sVEGFR-2 może świadczyć o korelacji stężeń sVEGFR we krwi z rozwojem złośliwych guzów nadnerczy. W grupie chorych z guzami złośliwymi stwierdziliśmy, że średnie stężenie sVEGFR-2 we krwi jest istotnie niższe w porównaniu z grupą chorych ze zmianami łagodnymi i grupą kontrolną. Średnie stężenie sVEGFR-1 we krwi w tej grupie chorych jest istotnie wyższe w stosunku do chorych z gruczolakami kory nadnerczy i nie różni się istotnie w stosunku do grupy kontrolnej.

Na podstawie naszych poprzednich badań, ciekawą obserwacją było stwierdzenie obniżenia wartości średniego stężenia endostatyny u chorych z łagodnymi gruczolakami, w porównaniu nie tylko z chorymi z guzami złośliwymi, ale również z osobami z grupy kontrolnej [16]. Oceniając wartości stężeń sVEGFR-1 uzyskaliśmy podobne zależności jak w przypadku endostatyny. Stwierdziliśmy, że średnie stężenie sVEGFR-1 we krwi u chorych z gruczolakami jest istotnie niższe w porównaniu z grupą chorych ze zmianami złośliwymi i z grupą kontrolną. Wydaje się, że u chorych z gruczolakami nadnerczy, ze względu na wolniejszy metabolizm w zmianach łagodnych (mniejsze zapotrzebowanie na tlen i składniki odżywcze), dochodzi do słabszej stymulacji wytwarzania inhibitorów angiogenezy, w tym i braku stymulacji genu wpływającego na produkcję sVEGFR-1. Niski poziom stężenia sVEGFR-1 w stosunku do grupy kontrolnej możemy tłumaczyć „związaniem” wcześniej wytworzonego sVEGFR-1 przez VEGF i jego receptory, VEGFR-1 i VEGFR-2.

Brak korelacji pomiędzy wartościami stężeń we krwi VEGF i sVEGFR może świadczyć o tym, że nie ma bezpośredniego związku pomiędzy wzajemnym oddziaływaniem tych czynników. Równoczesne występowanie istotnych różnic pomiędzy wartościami średnimi może świadczyć, że czynniki te biorą udział, poprzez regulację procesu angiogenezy, w rozwoju nowotworów złośliwych. Wydaje się jednak, że zjawiska stymulowania i hamowania angiogenezy są związane z bardziej skomplikowanym wzajemnym oddziaływaniem czynników pro- i antyangiogennych. Można sądzić, że o rozwoju angiogenezy, a pośrednio i rozwoju guza, decyduje indywidualnie występujący u każdego

chorego wzajemny stosunek aktywności czynników pro- i antyangiogennych. Wielu autorów podkreśla, że ten „balans” pomiędzy oddziaływaniem tych czynników decyduje o rozwoju guza [9, 16, 18, 24].

Kluczowe zjawiska w procesie angiogenezy następują poprzez pobudzenie receptorów dla VEGF. Związanie VEGF z receptorem VEGFR-2 na komórkach śródbłonna może wiązać się z obniżeniem jego form rozpuszczalnych w surowicy krwi (mechanizm shedding powstawania rozpuszczalnej formy receptora). Istotnie wyższe stężenie sVEGFR-1 w guzach złośliwych w stosunku do zmian łagodnych może wiązać się z pobudzeniem genu dla flt-1 i wzrostem produkcji sVEGFR-1 w tych zmianach. Kendall donosił o wysokim powinowactwie sVEGFR-1 do VEGF i jego receptorów [21]. Hornig i wsp badając stężenia rozpuszczalnych form receptora VEGFR-1 w różnych płynach ustrojowych (surowica, płyn owodniowy) stwierdzili dominujące działanie sVEGFR-1 jako „negatywnego” receptora w stosunku do VEGFR-1 i VEGFR-2 [22]. Zablokowaniem receptorów VEGFR-2 można też tłumaczyć uzyskane istotnie niższe wartości średniego stężenia sVEGFR-2 we krwi w grupie chorych z gruczolakami kory nadnerczy w stosunku do osób z grupy kontrolnej.

Reasumując, można wnioskować na podstawie przedstawionych wyników badań, że zarówno VEGF, jak i rozpuszczalne formy receptora VEGF odgrywają rolę w rozwoju guzów złośliwych nadnerczy, a ocena ich stężeń we krwi może mieć znaczenie diagnostyczne.

## Wnioski:

1. U chorych z pierwotnymi rakami kory nadnerczy i z guzami przerzutowymi do nadnerczy stwierdzono wyższe niż u ludzi zdrowych stężenia czynników pobudzających (VEGF) mechanizmy angiogenezy.
2. U chorych z gruczolakami kory nadnerczy stwierdzono niższe niż u ludzi zdrowych stężenia czynników o charakterze antyangiogennym (sVEGFR-1, sVEGFR-2) oraz prawidłowe stężenia VEGF.
3. Ocena stężenia VEGF i sVEGFR-2 we krwi u chorych z nieczynnymi hormonalnie guzami nadnerczy może mieć znaczenie diagnostyczne w różnicowaniu zmian złośliwych i łagodnych.
4. Nie wykazano zależności pomiędzy stężeniami badanych czynników angiogennych we krwi w żadnej z analizowanych grup chorych.

## Piśmiennictwo

1. Babińska A, Linde J, Sworczak K. Incidental discovered adrenal mass (incidentaloma) – contemporary opinion. *Pol Arch Med Wew* 2000; 104(1): 391-400
2. Stajgis P, Drews M, Stawny B et al. Incidental adrenal tumors – should we operate? *Pol Prz Chir* 1999; 71(10): 1003-1008

3. Billbey JH, Mc Loughin RF, Kurkijan PS et al. MR imaging of adrenal masses: value of chemical-shift imaging for distinguishing adenomas from the other tumors. *AJR* 1995; 164: 637-644
4. Barzon L, Boscaro M. Diagnosis localization and management of adrenal incidentalomas. *J Urology* 2000; 163: 398-403
5. Bałan BJ. Angiogenesis – problem of XXI century. *Nowa Med Pulmonologia* 2000; 100(4)
6. Folkman J. Clinical application of research on angiogenesis. *N Engl J Med* 1995; 333: 1757
7. Ferrara N. VEGF and the quest for tumour angiogenesis factor. *Nat Rev Can* 2002; 2: 795-803
8. Barleon B, Siemeister G, Martiny-Baron G et al. Vascular endothelial growth factor up-regulates its receptor fms-like tyrosine kinase 1 (FLT-1) and a soluble variant of FLT-1 in human vascular endothelial cells. *Cancer Res* 1997; 57: 5421-5425
9. Kołomecki K, Stępień H, Bartos M, Kuzdak K. Usefulness of VEGF, MMP-2, MMP-3 and TIMP-2 serum level evaluation in patients with adrenal tumors. *Endoc Regul* 2001; 35:9-16
10. Szala S, Radzikowski C. Podłoże molekularne angiogenezy nowotworów. *Nowotwory* 1997; 47: 1-19
11. Ray JM, Stetler-Stevenson WG. The role of matrix metalloproteinases and their inhibitors in tumor invasion, metastasis and angiogenesis. *Eur Respir J* 1994; 7: 2062-2072
12. Barleon B, Reusch P, Totzke F et al. Soluble VEGFR-1 secreted by endothelial cells and monocytes is present in human serum and plasma from healthy donors. *Angiogenesis* 2001; 4: 143-154.
13. Röckl W, Hecht D, Sztajer H et al. Differential binding characteristics and cellular inhibition by soluble forms of KDR and Flt-1. *J Exp Cell Res* 1998; 241: 161-170
14. Herbst RS, Lee AT, Tran HT, Abbruzzese JL. Clinical studies of angiogenesis inhibitors: the University of Texas MD Anderson Center Trial of Human Endostatin. *Curr Oncol Rep* 2001; 3:131-140
15. Tołłoczko T, Cichońska A, Górnicka B et al. Nowotwory nadnercza. In: *Zasady diagnostyki i chirurgicznego leczenia nowotworów w Polsce*. (Szawłowska AW, Szmidi J) Fundacja-Polski Przegląd Chirurgiczny 2003:143-151
16. Korzeniewska M, Hedayati M, Kołomecki K. Ocena stężeń śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF) i endostatyny we krwi u chorych z guzami nadnercza „incidentaloma”. *Onkol Pol* 2003; 6,3:99-102
17. Kuroi K, Tanaka C, Toi M. Circulating levels of endostatin in cancer patients. *Oncol Rep* 2001; 8:405-409
18. Feldman AL, Alexander HR, Bartlett DL. Prospective analysis of plasma endostatin levels in colorectal cancer patients with liver metastases. *Ann Surg Oncol* 2001; 8:741-745
19. Feldman AL, Alexander HR, Yang JC et al. Prospective analysis of circulating endostatin levels in patients with renal cell carcinoma. *Cancer* 2002; 95, 8:1637-1643
20. Folkman J: Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature Med* 1995; 1:27-31
21. Kendall RL, Thomas KA. Inhibition of vascular endothelial growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 10705-10709
22. Hornig C, Behn T, Bartsch W et al. Detection and quantification of complexed and free soluble human vascular endothelial growth factor receptor-1 (sVEGFR-1) by ELISA. *J Immun Meth* 1999; 226: 169-17
23. Kasperlik-Załuska A, Czarnocka B, Pastuszka D et al. Is vascular endothelial growth factor (VEGF) a marker of malignancy in adrenal tumors? *Pol J Endocrinol*. 2000; 51; (2): 285-289
24. Takahashi Y, Kitadai Y, Bucana SD et al. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis and proliferation of human colon cancer. *Cancer Res* 1995; 55: 3964-3968