



European Journal of Clinical and Experimental Medicine

Formerly: Medical Review

Książka abstraktów

**55 Jubileuszowe Sympozjum Polskiego Towarzystwa Histochemików
i Cytochemików**

20–22 września 2023



55

JUBILEUSZOWE SYMPOZJUM
POLSKIEGO TOWARZYSTWA

HISTOCHEMIKÓW

I CYTOCHEMIKÓW

20–22 WRZEŚNIA 2023

RZESZÓW

Partner srebrny



Partner naukowy



Wystawcy



Patron honorowy

Marszałek Województwa Podkarpackiego



Rektor UR



Patroni medialni



AUTORKI:

Agata Wawrzyniak

Sabina Galiniak

Wpływ chlorku benzalkoniowego na proliferację, migrację i żywotność rąbkowych komórek macierzystych

Agnieszka Prusek, Bartosz Sikora, Aleksandra Skubis-Sikora, Piotr Czekaj

Zakład Cytofizjologii, Katedra Histologii i Embriologii, Wydział Nauk Medycznych, Śląski Uniwersytet Medyczny, Katowice

Samoodnowa nabłonka rogówki zależy od niewielkiej populacji nabłonkowych komórek macierzystych (LESC) zlokalizowanych w obszarze rąbka. LESC dzielą się i migrują stopniowo różnicując się w nabłonek rogówki. Obniżone tempo regeneracji rogówki spowodowane dysfunkcją LESC może negatywnie wpływać na jej stan. Jednym z negatywnych czynników wpływających na homeostazę nabłonka rogówki są konserwanty zawarte w kroplach do oczu, takie jak chlorek benzalkoniowy (BAC). Krople zawierające BAC mogą prowadzić do uszkodzenia nie tylko komórek nabłonkowych, ale również LESC co może powodować zmiany charakterystyczne dla zespołu suchego oka. Celem pracy jest ocena wpływu chlorku benzalkoniowego na proliferację, migrację i żywotność komórek macierzystych rąbka rogówki. LESC wyizolowano z płatków twardówkowo-rogówkowego dawcy metodą hodowli eksplantatów i enzymatyczną. Linie pierwotną namnażano do około 80% konfluencji, a następnie

pasażowano i poddano fenotypizacji wykonując barwienie immunofluorescencyjne białek p63 i ABCG2, charakterystycznych dla LESC, a także CK3 i CK12 jako markerów negatywnych oraz oceniono ekspresję ich genów na poziomie mRNA. Dokonano także oceny potencjału tworzenia kolonii (ang. CFU assay). Następnie wybrano dawkę BAC na podstawie testu MTT po 48 h ekspozycji na BAC w zakresie stężeń 0,00002-0,02%. W kolejnym etapie dokonano oceny wpływu BAC na: żywotność LESC za pomocą aneksyny V/PI z wykorzystaniem cytometrii przepływowej; migrację i proliferację LESC na podstawie testu zarysowania monowarstwy. Uzyskane wyniki wykazują, że LESC traktowane BAC posiadają niższy potencjał proliferacyjny i obniżoną aktywność metaboliczną w stosunku do kontroli.

Negatywny wpływ BAC na migrację ma istotne znaczenie dla rozwoju dalszych badań nad terapią uszkodzeń powierzchni oka przez konserwanty zawarte w kroplach.



Homotypowa entoza jako nowy czynnik rokowniczy w raku piersi

Izabela Młynarczuk-Biały¹, Agata Gawel², Paweł Tyrna², Ireneusz Dziuba³, Jolanta Rybczyńska⁴, Anna Hyc¹, Łukasz Biały¹

¹ Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Warszawa

² Koło Naukowe HESA, Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Warszawa

³ Zakład Patologii, Szpital, Nowy Targ

⁴ Zakład Histologii i Embriologii, Wydział Lekarski, Uniwersytet Kardynała Stefana Wyszyńskiego, Warszawa

Homotypowa entoza została opisana w hodowli komórkowej jak i w materiale klinicznym różnych nowotworów złośliwych. Istnieją przesłanki i dane statystyczne pokazujące związek entozy z gorszym rokowaniem i krótszym czasem przeżycia w badaniach klinicznych wybranych kohort pacjentów m. in. raka piersi, płuc, jelita grubego, głowy i szyi. Na chwilę obecną nie istnieją żadne markery entozy, nie ma żadnych uznanych międzynarodowych kryteriów porządkujących kwestie nomenklatury i klasyfikacji entozy, toteż ta „terra incognita” wymaga systematyzacji i wprowadzenia jednolitych standardów w opisie i badaniu tego zjawiska –

aby móc wysnuć bardziej uniwersalne wnioski z potencjalną wartością kliniczną.

Analizowaliśmy proces entozy w mikromacierzach tkankowych kohorty raka piersi. Badaliśmy związek entozy z grading, staging, ekspresją ER, PR, HER2 i Ki67.

Entoza w badanej kohorcie jest niezależnym od wieku i stopnia zaawansowania czynnikiem rokowniczym. Ponadto wykazano korelację entozy z HER2 i Ki67.

Postulujemy wprowadzenie nowego kryterium jakim jest entoza przyżyciowa i weryfikację rokowania z tym parametrem.

Ocena ekspresji wybranych markerów aktywacji zapalnej pierwotnych komórek śródbłónka tętnic wieńcowych w odpowiedzi na stymulację cytokiną TGF- β 1

Klaudia Bonowicz, Klaudia Piekarska, Maciej Gagat

Katedra Histologii i Embriologii, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Toruń

Przewlekły stan zapalny to główny czynnik przyczyniający się do rozwoju miażdżycy tętnic oraz jej powikłań. Krytycznymi czynnikami odpowiedzialnymi za utrzymywanie przewlekłej reakcji zapalnej są cytokiny oraz inne cząsteczki, które wysyłają ciągły sygnał aktywujący układ immunologiczny, stąd bardzo ważne jest pełne zrozumienie ich złożonych funkcji. Transformujący Czynniki Wzrostu Beta 1 (TGF- β 1) to cytokina znana z wysokiej pleiotropii, czyli zdolności do wywierania różnych efektów biologicznych w zależności od typu komórki i kontekstu mikrośrodowiskowego. W literaturze przedstawiana jest zarówno jako cytokina ochronna, która kontroluje funkcje tętnic wpływając bezpośrednio na komórki śródbłónka oraz komórki mięśni gładkich. Jednakże, pojawiają się również doniesienia o tym, że bierze udział między innymi w aktywacji genów odpowiedzialnych za aktywację komórek śródbłónka naczyniowego, napędzając tym samym rozwój chorób sercowo-naczyniowych. Celem badań jest ocena ekspresji wybranych markerów aktywacji zapalnej komórek śródbłónka w odpowiedzi na hiperaktywację szlaku TGF- β 1.

Badania przeprowadzone zostały na ludzkich pierwotnych komórkach śródbłónka tętnic wieńcowych (pHCAECs). W pracy analizowano trajektorie migracji pHCAECs w wa-

runkach kontrolnych oraz pod wpływem stymulacji prozapalnym Czynnikiem Martwicy Nowotworów (TNF- α) oraz TGF- β 1, przy użyciu mikroskopu z systemem do obserwacji przyżyciowej oraz dedykowanego oprogramowania. Dodatkowo, wykonano barwienia immunofluorescencyjne i oceniono poziom ekspresji białek takich jak pSMAD2/3, VE-kadheryna, VCAM-1 oraz F-aktyna.

Analiza migracji pHCAECs wykazała istotny wzrost odległości euklidesowej w przypadku komórek traktowanych kombinacją czynnika TNF- α oraz TGF- β 1, przy jednoczesnym wzroście kierunkowości ruchu komórek. Co więcej, ocena ekspresji wykazała znamienne obniżenie poziomu VE-kadheryny oraz wzrost ekspresji VCAM-1 w przypadku komórek traktowanych oboma związkami. Aktywację szlaku TGF- β potwierdził wzrost ekspresji ufosforylowanej formy białek SMAD2/3.

Wyniki naszych badań sugerują, że aktywacja szlaku TGF- β 1/SMAD może wpływać na nasilenie odpowiedzi zapalnej komórek śródbłónka m.in. poprzez zmniejszenie adhezji międzykomórkowej oraz poprawę zdolności migracyjnych komórek. Obserwowany mechanizm jest jednak stosunkowo niejasny i wymaga wykonania dodatkowych testów.

Wpływ angiotensyny II na przebudowę nerek w zwierzęcym modelu zespołu metabolicznego

Ewa Jankowska-Steifer¹, Emilia Kruk², Anna Ratajska²

¹Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Warszawski Uniwersytet Medyczny Warszawa

²Katedra i Zakład Patomorfologii, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Warszawa

Myszy db/db wykorzystywane są jako model zespołu metabolicznego, cukrzycy typu 2 i postępującej choroby nerek. U ludzi cukrzyca typu 2 wiąże się ze zwiększoną częstością występowania nadciśnienia tętniczego, dlatego postanowiliśmy ocenić wpływ nadciśnienia tętniczego indukowanego angiotensyną II (Ang II) na morfologię nerek w zespole metabolicznym u myszy db/db.

Badania przeprowadzano na samcach myszy BKS.Cg-Dock7⁺/Lepr^J (db/db) oraz kontrolnych - szczep C57BL/6J. Połowie osobników wszczepiono podskórnie pompę uwalniającą Ang II, indukującą nadciśnienie (db/db+AngII). Co tygodniowo dokonywano pomiaru poziomu glukozy i ciśnienia tętniczego. Nerki do badań pozyskano w 21 tygodniu eksperymentu. Na skrawkach parafinowych srebrzonych metodą Jones'a przeprowadzano pomiary gęstości, pola powierzchni i średnic ciałek nerkowych oraz pola powierzchni kłębuszków nerkowych. Na skrawkach parafinowych barwionych HE i metodą PAS oceniano morfologię nerek.

Wzrost masy ciała, poziomu glukozy oraz trójglicerydów we krwi potwierdzał cechy zespołu metabolicznego myszy db/db oraz db/db z Ang II. Glomerulomegalia wraz z przerostem ciała nerkowego obserwowana była u myszy db/db, zwłaszcza w grupie z angiotensyną 2, co negatywnie korelowało ze spadkiem gęstości kłębuszków nerkowych w tej grupie. Zmiany w morfologii nerek przejawiające się obecnością mas szklistych w przestrzeni torebki Bowmana oraz w przylegających do kłębuszka kanalikach, licznych półksiężycy oraz ognisk zapalnych z cechami włóknienia i stwardnienia obserwowano głównie w grupie db/db+AngII.

Myszy db/db są wykorzystywane jako model postępującej cukrzycowej choroby nerek jednakże nie odzwierciedlają one jednoznacznie wszystkich zmian jakie występują w nerkach ludzkich w przebiegu cukrzycy. Zastosowanie angiotensyny II do indukcji nadciśnienia w modelu db/db w sposób istotny nasila te zmiany, co stanowi nowatorski aspekt tego badania.

Rola szlaku sygnałowego VEGF-A/VEGFR/SRC w regulacji przepuszczalności mikronaczyń w sercu myszy z zespołem metabolicznym

Justyna Niderla-Bielińska, Krzysztof Bartkowiak

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Warszawa

Zespół metaboliczny (MetS) jest schorzeniem, które dotyka około 35% populacji. W patogenezie MetS kluczową rolę odgrywają zaburzenia, takie jak otyłość, nadciśnienie, dyslipidemia i hiperglukemia, a duża część pacjentów ma podwyższone ryzyko zgonu z powodów sercowo-naczyniowych. U myszy db/db, które rozwijają objawy MetS, obserwuje się niewydolność serca, spowodowaną, między innymi, obrzękiem oraz sztywnością komórek. Obrzęk, prowadzący do włóknienia mięśnia sercowego, może być wynikiem zarówno zwiększonej przepuszczalności naczyń krwionośnych, jak i nieprawidłowego funkcjonowania naczyń limfatycznych. Zaburzenia w obrębie przepuszczalności mikronaczyń mogą być spowodowane nieprawidłowym funkcjonowaniem szlaku VEGF-A/VEGFR/SRC w komórkach śródbłonna, co prowadzi do zmniejszenia gęstości i osłabienia połączeń międzykomórkowych na skutek zwiększonej fosforylacji i endocytozy VE-kadheryny. Celem pracy była zatem ocena powyższego szlaku sygnałowego w izolowanych komórkach śródbłonna serca myszy db/db. Materiał badawczy stanowiły serca oraz wyizolowane z nich komórki śródbłonna naczyniowego. W celu określenia stopnia przepuszczalności mikronaczyń wykonano analizę ultrastrukturalną, natomiast aby wyjaśnić mechanizm, leżący u podstawy zaburzonej przepuszczalności, przeprowadzono analizę ekspresji mRNA dla białek

szlaku VEGF-A/VEGFR/SRC, a także oceniano ilość ufosforylowanej formy VE-kadheryny. Dodatkowo oceniano gęstość receptora VEGFR2 oraz VE-kadheryny za pomocą mikroskopii konfokalnej.

Analiza ultrastrukturalna wykazała zwiększone odstępy pomiędzy komórkami śródbłonna („junctional gap”), a także obniżony indeks pinocytarny, co wskazuje na zwiększoną przepuszczalność naczyń w grupie myszy db/db. Dodatkowo w izolowanych komórkach śródbłonna myszy db/db zaobserwowano zwiększoną ekspresję VEGF-A, VEGFR, SRC oraz VE-kadheryny na poziomie mRNA, a także zwiększoną fosforylację VE-kadheryny na poziomie białka. Gęstość VEGFR oraz VE-kadheryny, oceniana w mikronaczeniach w mikroskopie konfokalnym, była zmieniona u myszy db/db w niektórych obszarach serca.

Wyniki badań wskazują, że zwiększona ekspresja VEGF-A, obserwowana w MetS, może aktywować ścieżkę VEGF-A/VEGFR/SRC, a w konsekwencji zwiększać przepuszczalność bariery naczyniowej i przyczyniać się do obrzęku w sercach myszy db/db. Dodatkowo, zwiększona ekspresja VE-kadheryny w komórkach śródbłonna może być niewystarczająca, aby skompensować nadmierną fosforylację tego białka.

Finansowanie. ERA-CVD/LyMitDis/1/2017; MEiN, “Diamantowy grant”, D/2018020048

Udział białek ABP w migracji komórek

Magdalena Izdebska, Marta Hałas-Wiśniewska, Wioletta Zielińska

Katedra Histologii i Embriologii, Wydział Lekarski, Collegium Medicum, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Toruń

Migracja komórek nowotworowych to największy problem związany z chorobami onkologicznymi. Stąd niniejsza praca przeglądowa zawierająca głównie wyniki badań zespołu koncentruje się na roli białek związanych z cytoszkieletem aktynowym w progresji nowotworu.

Wtórna lokalizacja komórek rakowych i tworzenie guza jest ściśle związane ze zjawiskami takimi jak przejście epitelialno-mezenchymalne (EMT, ang. *epithelial-mesenchymal transition*) i jego odwrotność, czyli transformacja komórek z fenotypu mezenchymalnego na nabłonkowy (MET, ang. *mesenchymal-epithelial transition*). Wspomniana zmiana fenotypu komórek jest ściśle związana z nabyciem przez nie potencjału migracyjnego. Ruch komórek nowotworowych jest możliwy dzięki rozwojowi struktur inwazyjnych, takich jak: filopodia, czy lamellipodia, a ich tworzenie zależne od reorganizacji cytoszkieletu aktynowego. Z kolei polimeryzacja i depolimeryzacja filamentów aktynowych (F-aktyny) jest kontrolowana przez białka wiążące aktynę (ABPs,

ang. *actin binding proteins*). Na przykład profilina wpływa na dynamikę polimeryzacji poprzez uwalnianie monomerów aktyny z kompleksów białkowych. Z kolei gelsolina i fragmina blokują końce włókien aktynowych, a kompleks Arp 2/3 umożliwia ich rozgałęzianie. Za tworzenie wiązek F-aktyny odpowiada fascyna, a za jej stabilizację formina. Dodatkowo tworzenie formy monomerycznej lub polimerycznej z udziałem ABPs jest ściśle kontrolowane przez kaskady sygnalizacyjne. Wiele doniesień naukowych wskazuje również, że aktyna i białka z nią związane lokalizowane są w jądrze komórkowym, co może sugerować ich zaangażowanie w progresję nowotworu poprzez regulację ekspresji genów. Migrująca komórka docierając do miejsca nowej lokalizacji ponownie zmienia fenotyp na nabłonkowy nabywając w ten sposób aktywność proliferacyjną.

Ukierunkowanie lub ograniczanie migracji poprzez manipulację białkami ABP może być potencjalnym rozwiązaniem problemu przerzutów.

Geny EVER1 i EVER2 w zdrowiu i chorobie

Jacek Malejczyk

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Centrum Biostruktury, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Warszawa

EVER1 (TMC6) i EVER2 (TMC8) to dwa sąsiadujące ze sobą geny zlokalizowane w regionie chromosomu 17q25.3. Kodowane przez nie białka należą do rodziny białek przezbłonowych TMC (ang. *transmembrane channel-like*) zbudowanych z 6 do 10 domen przezbłonowych. Rola białek TCM nie jest dokładnie poznana, przypuszcza się jednak, że są one częścią jonowych kanałów przezbłonowych bądź ich regulatorami. Białka EVER1 i EVER2 zlokalizowane są głównie w błonach siateczki wewnątrzplazmatycznej, aparatu Golgiego i jądra komórkowego. Ich ekspresję wykazano w mysiej skórze, wątrobie, nerce, sercu, mózgu i tkankach limfatycznych. Ponadto w ludzkich keratynocytach i komórkach limfatycznych: limfocytach T CD4+ i CD8+ , limfocytach B, komórkach NK, komórkach dendrytycznych. Najwyższą ekspresję obserwuje się w tkankach limfatycznych. Białka EVER mogą regulować wewnątrzkomórkowe stężenie cynku wiążąc się z błonowym transportem cynku Znt1, odpowiedzialnym za usuwanie jonów cynku z cytozolu, głównie poprzez ich napływ do wnętrza siateczki śródplazmatycznej. Ponadto kompleks EVER/Znt-1 zmniejsza aktywność czynników transkrypcyjnych JUN i całego kompleksu AP-1, prawdopodobnie poprzez wpływ na zależną od cynku aktywację kinazy JNK. Zaobserwowano, że ekspresja EVER1/2 jest hamowana w wyniku aktywacji komórek (limfocytów,

keratynocytów). Mutacje EVER1/2 powodują podatność na infekcję wirusami b-HPV, co prowadzi do rozwoju rzadkiej, dziedzicznej choroby Epidermodysplasia verruciformis (EV). Jednak mechanizm ich działania nie został dokładnie zbadany. Co ciekawe, wykazano również, że infekcja b-HPV ma również związek z łuszczycą, przewlekłą autozapalną chorobą skóry. Mając na uwadze związek pomiędzy EVER1/2 i infekcją b-HPV postanowiliśmy zbadać poziom ekspresji tych genów w zmianach łuszczycowych.

Okazało się, że ekspresja EVER1/2 w naskórku w zmianach łuszczycowych jest zahamowana zarówno na poziomie swoistego mRNA jak i białka. Podobnej zależności nie wykryto w atopowym zapaleniu skóry. Sugeruje to, że geny EVER1/2 pełnią rolę w patogenezie łuszczycy. Ponadto udało się ustalić, że za zahamowanie ekspresji mRNA EVER1 w keratynocytach odpowiada IL-17, główna cytokina odpowiedzialna za immunopatogenezę łuszczycy. Co ciekawe, ekspresja mRNA EVER1 w keratynocytach była natomiast stymulowana przez TNF i TGF- β .

Mając na uwadze, że IL-17 jest stymulatorem proliferacji keratynocytów zaś TNF i TGF- β ją hamują można uznać, że zmiany ekspresji EVER1/2 są bezpośrednio lub pośrednio powiązane z mechanizmami regulacji proliferacji komórek. Związek ten wymaga dalszych badań.

Cytologia płynów w diagnostyce chorób opłucnej – sposoby utrwalania materiału a jakość barwień immunohistochemicznych

Mirosław Barłowski, Agnieszka Machnio

Kliniczny Zakład Patomorfologii, Uniwersytecki Szpital Kliniczny, Rzeszów

Jednym z narzędzi diagnostyki chorób opłucnej jest badanie cytologiczne płynu z jamy opłucnowej. Badania cytologiczne, w tym badania płynów z jam ciała są powszechnie stosowane w diagnostyce z uwagi na małą inwazyjność, niskie koszty i krótki czas oczekiwania na rozpoznanie. Występowanie płynu w jamie opłucnej jest częstym objawem w przebiegu chorób układu oddechowego, czy zaburzeń ogólnoustrojowych. Mikroskopowa ocena jego składu komórkowego pozwala zasugerować tło choroby.

Płyny z jam ciała utrwalone, zatopione w bloczki parafinowe mogą być wykorzystywane do badań histologicznych, diagnostyki immunohistochemicznej oraz badań molekularnych.

Jakość i sposób utrwalania materiału ma istotny wpływ na przygotowanie preparatów mikroskopowych, ich ocenę oraz możliwość wykonania dodatkowej diagnostyki. W celu przedstawienia wpływu rodzaju utrwalacza na jakość badań diagnostycznych wykonano cytobloki z zastosowaniem trzech rodzajów substancji utrwalających na bazie formaliny i alkoholu. Sposób przygotowania cytobloków znacząco różnił się dla każdego z zastosowanych utrwalaczy. Różnice zaobserwowano także w wykonywanych barwieniach immunohistochemicznych.

Potwierdzono zasadność stosowania roztworów formaliny do utrwalania materiału z uwagi na lepszą jakość barwień immunohistochemicznych.



Prezentacja metodyki badań immunohistochemicznych i immunocytochemicznych – doświadczenia własne

Magdalena Berezka, Ewelina Ochalek

Kliniczny Zakład Patomorfologii, Uniwersytecki Szpital Kliniczny, Rzeszów

Badania cytologiczne i histochemiczne to narzędzia mające na celu wyjaśnienie nieprawidłowości stwierdzanych w badaniach klinicznych, radiologicznych i czynnościowych. Jednakże dopiero diagnostyka immunohistochemiczna i immunocytochemiczna (IHC) pozwala na prawidłowe rozpoznanie chorób nowotworowych, wykrywanie czynności neuroendokrynej w nowotworach, różnicowanie podtypów raka pierwotnego i przerzutów.

Metody IHC nie należą do standardowych i dostępne są wyłącznie w wyspecjalizowanych ośrodkach. Poprawna inter-

pretacja badania IHC w dużej mierze zależy od metody pobrania materiału, jego właściwej obróbki, doboru utrwalcza oraz wykorzystania odpowiednich przeciwciał i wysokiej jakości sprzętu.

W celu zapewnienia prawidłowego procesu diagnostyki IHC niezbędna jest ciągła zewnętrzna i wewnętrzna kontrola jakości prowadzona na podstawie wdrożonego systemu zarządzania jakością.



Procedury przeprowadzania materiału tkankowego do badań histopatologicznych

Monika Czyżewska, Magdalena Cupryś-Kmon, Monika Ostrowska

Kliniczny Zakład Patomorfologii, Uniwersytecki Szpital Kliniczny, Rzeszów

Badanie patomorfologiczne to złożony zakres czynności rozpoczynający się pobraniem materiału tkankowego celem wykonania badania mikroskopowego, które pozwala na postawienie rozpoznania patomorfologicznego.

Prezentowano aktualne wytyczne i metody przeprowadzania próbek histologicznych w pracowni patomorfologicznej.

Standardy postępowania z materiałem tkankowym i cytologicznym

Aleksandra Malinowska, Małgorzata Gibała-Dytko

Kliniczny Zakład Patomorfologii, Uniwersytecki Szpital Kliniczny, Rzeszów

Ocena histopatologiczna jest podstawą do rozpoznawania chorób onkologicznych. Aby lekarz patomorfolog mógł postawić właściwe rozpoznanie histopatologiczne, konieczne jest odpowiednie opracowanie materiału tkankowego pobranego od pacjenta zgodnie z wymogami standardów akredytacyjnych. Na początku należy omówić podział badania patomorfologicznego, które ze względu na rodzaj badanego materiału i sposób pobrania możemy podzielić na: badanie histopatologiczne, gdzie badamy narząd, fragment narządu lub tkanki, pobrane od pacjenta albo ze zwłok oraz badanie cytologiczne, gdzie badamy płyny z jam ciała, materiał uzyskany z biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej, rozmazu, wymazu, wydzieliny, popłuczyn i moczu, pobranych od pacjenta albo ze zwłok.

Pojedyncze badanie patomorfologiczne zakończone postawieniem właściwego rozpoznania wraz z odpowiednim opisem należy przeprowadzić przez, wyszczególnione w raporcie Najwyższej Izby Kontroli, etapy do których należą: pobranie materiału od pacjenta, utrwalenie, transport, przyjęcie do badania, rejestracja, przygotowanie do oceny mikroskopowej, ocena mikroskopowa preparatu, wykonanie badań dodatkowych, ponowna ocena mikroskopowa preparatu, ustalenie rozpoznania i jego autoryzacja, przekazanie rozpoznania do jednostki zlecającej badanie i archiwizacja blochków oraz preparatów. Przedstawiono procedurę histopatologiczną w świetle obowiązujących standardów postępowania zgodnie z Rozporządzeniem Ministra Zdrowia DZ.U. poz. 2435 z 2017 r. i wytycznymi Polskiego Towarzystwa Patologów.

Obniżenie poziomu ekspresji oraz aktywności kanału TRPM2 zapobiega indukowanej stresem oksydacyjnym dysfunkcji śródbłónka w komórkach linii EA.hy926

Wioletta Zielińska, Klaudia Piekarska, Marta Hałas-Wiśniewska, Magdalena Izdebska, Alina Grzanka, Maciej Gagat

Katedra Histologii i Embriologii, Wydział Lekarski, Collegium Medicum, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Toruń

Prawidłowe funkcjonowanie śródbłónka ma kluczowe znaczenie dla homeostazy układu krążenia. Stres oksydacyjny może prowadzić do dysfunkcji śródbłónka oraz uszkodzeń cząsteczek lipidów, białek i DNA. Reaktywne formy tlenu prowadzą również do wzrostu wewnątrzkomórkowego poziomu Ca^{2+} , m.in. poprzez aktywację nieselektywnego błonowego kanału wapniowego TRPM2. Badanie miało na celu ocenę znaczenia kanału TRPM2 w odpowiedzi modelowych komórek śródbłónka linii EA.hy926 na stres oksydacyjny oraz możliwości zastosowania bezpośrednich i pośrednich inhibitorów TRPM2 w zapobieganiu dysfunkcji śródbłónka indukowanej stresem oksydacyjnym.

Modelowe komórki śródbłónka linii EA.hy926 były hodowane w obecności nadtlenu wodoru przez 24 godziny w celu indukcji stresu oksydacyjnego. Do obniżenia poziomu ekspresji kanału wykorzystano siRNA przeciwko TRPM2. Aktywność kanału hamowano poprzez hodowlę komórek w obecności bezpośrednich (N-(p-Amylocynamilo)antra-

nilowy, kwas flufenamowy) lub pośrednich (3-aminobenzamid, 3,4- dihydro-5[4-(1-piperidynylo)butoksy]-1(2H)-izo-chinolina) inhibitorów TRPM2.

Przeprowadzone eksperymenty wykazały, że obniżenie poziomu ekspresji TRPM2 hamuje indukowane nadtlaniem wodoru zmiany charakterystyczne dla dysfunkcji śródbłónka, tj. śmierć komórek na drodze apoptozy, zmiany w obrębie regionu połączeń międzykomórkowych oraz zaburzenia migracji komórek. Ponadto, wstępna inkubacja komórek z bezpośrednimi lub pośrednimi inhibitorami TRPM2 przez 30 minut przed dodaniem nadtlenu wodoru również ograniczała jego negatywny wpływ na komórki linii EA.hy926. Uzyskane wyniki sugerują, że kanał TRPM2 jest potencjalnym celem w terapii i prewencji chorób układu krążenia związanych z indukowaną stresem oksydacyjnym dysfunkcją śródbłónka. Ocena możliwości klinicznego zastosowania bezpośrednich i pośrednich inhibitorów TRPM2 wymaga jednak dalszych badań.

Ocena wybranych parametrów odpowiedzi komórek śródbłónka na inicjację i przebieg stanu zapalnego – badania *in vitro*

Klaudia Piekarska, Klaudia Bonowicz, Dominika Jerka, Alina Grzanka, Maciej Gagat

Katedra Histologii i Embriologii, Wydział Lekarski, Collegium Medicum, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Toruń

Śródbłonek to pojedyncza warstwa komórek wyściełająca wewnętrzną ścianę naczyń krwionośnych. Określany jest największym narządem wewnątrzwydzielniczym człowieka, ze względu na sekrecję substancji działających auto- i parakrynnie, wpływając na otaczające mikrośrodowisko. Lokalizacja komórek śródbłónka sprawia, że stanowią one naturalną barierę między krwią a tkanką, biorąc udział w odpowiedzi na wszelkie bodźce fizyczne i chemiczne. W odpowiedzi na inicjację stanu zapalnego, komórki śródbłónka mogą zmieniać ilość wydzielanych substancji, modyfikować ich charakter, koordynować transport oraz regulować napięcie ściany naczyń. Obok dobrze poznanych mechanizmów reakcji na aktywność cytokin prozapalnych, w odpowiedzi na ich działanie komórki śródbłónka wykazują także zdolność do wydzielania pęcherzyków błonowych o charakterze mediatorów komunikacji międzykomórkowej. Celem niniejszej pracy jest przedstawienie mechanizmów odpowiedzi komórek na aktywność cytokiny prozapalnej TNF-alfa oraz ocena modyfikacji jakie wprowadza w środowisku komórek śródbłónka. Ze względu na doniesienia literaturowe świadczące o sekrecji pęcherzyków zewnątrzkomórkowych towarzyszącej reakcji zapalnej związanej ze wzmożoną migracją komórek i ich wzajemną komunikacją, realizacja badań przewiduje również obserwację potencjału wydzielniczego komórek śródbłónka poddanych aktywności cytokiny prozapalnej.

Materiał wykorzystany do realizacji niniejszego projektu stanowić będą komercyjnie dostępne komórki śródbłónka, poddane działaniu cytokiny TNF-alfa w stężeniu inicjującym odpowiedź zapalną komórek. Projekt zakłada wykorzystanie szeregu technik badawczych opierających się na znakowaniu immunofluorescencyjnym i wysokorozdzielczej wizualizacji komórek oraz przyżyciowej obserwacji komórek śródbłónka.

Otrzymane wyniki badań zgodnie z aktualnymi doniesieniami naukowymi, wskazują na wzrost potencjału migracyjnego komórek śródbłónka w odpowiedzi na działanie czynników zapalnych. Co więcej, aktywacja zapalna prowadzi do zmiany morfologii komórek, prowadząc do wykształcenia charakterystycznych włókien retrakcyjnych, co wiąże się z tworzeniem i wydzielaniem słabo dotąd poznanych struktur pęcherzykowatych.

Dokładne zrozumienie reakcji komórek śródbłónka na inicjację i przebieg stanu zapalnego oraz towarzyszącą sekrecję struktur błonowych może rzucić nowe światło na zrozumienie mechanizmów komunikacji międzykomórkowej komórek aktywowanych zapaleniem, wykorzystując tę informację do tworzenia nowoczesnych terapii, stosowanych w leczeniu schorzeń o etiologii zapalnej.

Teratologia ważna dla medycyny praktycznej – rozważania oparte na wynikach badań doświadczalnych na zwierzętach

Anna Sęk-Mastej

Zakład Anatomii Prawidłowej i Klinicznej, Instytut Nauk Medycznych, Kolegium Nauk Medycznych, Uniwersytet Rzeszowski, Rzeszów

Teratologia (ang. *congenital developmental disorders*, CDD) – nauka, która zajmuje się badaniem potworności, nieprawidłowości oraz wad rozwojowych. Powiązana jest ściśle z anatomią porównawczą i patologiczną, embriologią i genetyką. Pomimo współczesnego podejścia do biologii molekularnej i genetyki, wraz z najlepszymi technikami diagnostycznymi, nadal nie jesteśmy w stanie zidentyfikować faktycznej przyczyny ponad 65-70% wszystkich wad wrodzonych, które mają nieznaną etiologię.

Za ojca eksperymentalnej teratologii jest uważany lekarz Josef Warkany. W latach 30. i 40. ubiegłego wieku udowodnił, że CDD mogą być indukowane przez czynniki egzogenne także u ssaków. Od 1960 roku wzrosło rozumienie toksykologii po aferze z Talidomidem. Ekspozycja ciężarnych kobiet na talidomid (przydatny w przypadku nudności i wymiotów) powodowała deformacje kończyn płodu, hipoplazję jednej lub więcej kończyn, aż do całkowitego ich zaniku. W 1979 r. amerykańska instytucja Food and Drug Administration stworzyła klasyfikację opisującą teratogeny potencjał leków. Podział ten obejmuje pięć kategorii: A, B, C, D i X. Oznaczenie leku literą A świadczy o braku ry-

zyka dla płodu, natomiast substancje lecznicze z kategorii X są bezwzględnie przeciwwskazane w ciąży. Obecnie WHO wymaga badań doświadczalnych na zwierzętach dla każdego leku wprowadzanego do praktyki klinicznej. Ocenia się stopień toksyczności a także wpływ danej substancji na rozwój płodu w okresie feto i organogenezy. Pomimo dostępnych nowoczesnych technik molekularnych, badanie anatomii płodu jest nadal podstawową częścią badań teratologicznych w ocenie toksyczności rozwojowej leków lub innych czynników nie chemicznych.

W wystąpieniu zostaną przedstawione współczesne metody oceny embriotoksyczności i płodotoksyczności. Wykorzystanie pojedynczego barwienia czerwieni alizarynową S i podwójnego barwienia błękitem alcjanu, a także różne metody badania tkanek miękkich. Zostaną przedstawione wyniki działania tykarcyliny (Timentin) i amikacyny (Biodacyna) na rozwój płodu szczura szczepu Wistar. Wymienione antybiotyki były podawane ciężarnej samicy w kilku dawkach różnych od dawki terapeutycznej. Doświadczenie przeprowadzano zgodnie z zaleceniami WHO dla badań teratogenności leków.

Analiza lokalizacji i kolokalizacji w hodowlach komórkowych

Łukasz Uram

Katedra Chemii Nieorganicznej i Analitycznej, Wydział Chemiczny, Politechnika Rzeszowska, Rzeszów

Hodowle komórkowe, wprowadzone na początku XX wieku, pozwalają badać zachowanie komórek zwierzęcych (w tym ludzkich) w środowisku wolnym od zmian systemowych, które można zaobserwować u zwierząt w trakcie fizjologicznej homeostazy i stresu towarzyszącego eksperymentom. Zatem pozwalają w sposób powtarzalny porównywać wyniki badań otrzymywanych w wielu laboratoriach na całym świecie, a dodatkowo eliminują cierpienie zwierząt w trakcie eksperymentów i nie wymagają pozwoleń komisji bioetycznych. Pomimo faktu, że hodowle komórkowe znajdują się u podstawy piramidy metod badawczych medycyny opartej na faktach (*evidence based medicine*), znalazły zastosowanie w badaniu biologii komórki, interakcji leków, biogodności i cytotoksyczności oraz produkcji szczepionek oraz białek i wielu innych. Przyczyniły się do tego postępy w zakresie wyprowadzenia nowych linii komórkowych, ich modyfikacji genetycznych oraz sposobów hodowli, jak np. układy trójwymiarowe (3D), tworzenie kohodowli, unieśmiertnianie oraz odtwarzanie struktur obecnych w organizmie jak np. model bariery krew-mózg. Jednym z głównych narzędzi niezbędnych do badań komórek żywych pozostaje mikrosko-

pia fluorescencyjna oraz jej odmiana – mikroskopia konfokalna, której ciągły rozwój prowadzi daje bardzo potężne narzędzie do badania komórkowych funkcji białek, cząsteczek i nanocząstek. Często znaczenie funkcjonalne molekuly można określić na podstawie jej obecności w określonych przedziałach subkomórkowych lub kompleksach molekularnych, poprzez porównanie rozmieszczenia fluorescencyjnie znakowanej wersji cząsteczki z obecnością drugiej, znakowanej komplementarnie sondy. Chociaż mikroskopia konfokalna jest prawdopodobnie najpowszechniej używanym narzędziem eksperymentalnym w biomedycynie, badania oceniające kolokalizację dwóch sond rzadko są określane ilościowo, pomimo różnorodności narzędzi do analizy obrazów opracowanych specjalnie w tym celu.

Celem niniejszego wykładu będzie przybliżenie podstawowych zagadnień dotyczących metod hodowli komórek ssaczych, sposobów ich badań z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej oraz ilościowego opisu stopnia kolokalizacji białek oraz leków o strukturze nanocząstek w kompartmentach komórkowych.

Zastosowanie modelowania i druku 3D w chirurgicznym leczeniu guzów nerek

Krzysztof Balawender¹, Mariusz Oleksy²

¹ Zakład Anatomii Prawidłowej i Klinicznej, Instytut Nauk Medycznych, Kolegium Nauk Medycznych, Uniwersytet Rzeszowski, Rzeszów

² Katedra Kompozytów Polimerowych, Wydział Chemiczny, Politechnika Rzeszowska, Rzeszów

Druk 3D w medycynie stanowi szybko rozwijający się obszar badań. W ostatnich latach druk trójwymiarowy znalazł zastosowanie w tworzeniu niestandardowych implantów protetycznych i urządzeń medycznych, a także w próbach przedoperacyjnych, głównie w kontekście chorób sercowo-naczyniowych, mózgowo-naczyniowych, ale także nowotworów wątroby i nerek. W dotychczas opublikowanych badaniach oceniano możliwości tworzenia specyficznych dla pacjenta, wydrukowanych w 3D modeli nerek do zastosowań obejmujących zarówno edukację jak i planowanie przedoperacyjne złożonych przypadków guzów nerek, ze względu na zdolność modeli 3D do lepszego odzwierciedlenia anatomicznych relacji przestrzennych. Konwencjonalne metody obrazowania wolumetrycznego, takie jak tomografia komputerowa (CT) i rezonans magnetyczny (MRI), są powszechnie stosowanymi metodami obrazowania w diagnostyce i planowaniu leczenia chirurgicznego chorób nowo-

tworowych. Standardowe obrazowanie nowotworów nerek jest ograniczone do analizy zmiany w nerce na ekranie monitora w przestrzeni dwuwymiarowej (2D), a zatem operator planujący leczenie zabiegowe nie ma możliwości precyzyjnej analizy trójwymiarowej ocenianej masy patologicznej i jej topografii w stosunku do zdrowej części badanego narządu. Współcześnie standardowym postępowaniem w przypadku guzów nerek nie przekraczających 7 cm jest chirurgia nerkooszczędzająca polegająca na usunięciu guza z pozostawieniem jak największej ilości zdrowego miększu nerki wykonywanego najczęściej z dostępu laparoskopowego lub przy użyciu techniki robotycznej. Druk 3D modeli nerek wraz z trójwymiarową rekonstrukcją guza pozwala na przedoperacyjną analizę planowanego zabiegu i znacznie ułatwia lokalizację guza w szczególności, gdy masa guza nie przekracza zarysu kory nerki.

Zastosowanie sekwencjonowania następnej generacji w onkologii klinicznej – wyzwania diagnostyczne

Marek Cieśla

Instytut Nauk Medycznych, Kolegium Nauk Medycznych, Uniwersytet Rzeszowski, Rzeszów

Sekwencjonowanie DNA jest techniką pozwalającą na badanie zmian w kodzie genetycznym człowieka. Rozwój tej techniki od klasycznej metody opracowanej przez Sangera i współpracowników do równoległego masowego sekwencjonowania zaliczanego do sekwencjonowania następnej generacji (ang. *next generation sequencing*, NGS) pozwoliło na określenie statusu mutacji na bardzo szeroką skalę. NGS jest techniką wielkoprzepustową pozwalającą na badanie wielu genów lub całego genomu i jednocześnie jest to technika bardzo czuła pozwalająca wykryć obciążenie zmutowanym wariantem na poziomie kilku procent. Technika ta znalazła m.in. zastosowanie w praktyce klinicznej, w tym onkologii i hematologii oraz diagnostyce genetycznej chorób rzadkich. Rutynowo do badań onkologicznych przy zastosowaniu metod biologii molekularnej wykorzystywane są tkanki utrwalone w formalinie i zatopione w parafinie (ang. *formalin-fixed paraffin-embedded*, FFPE). Wykonane z nich bloczki są łatwe do przechowywania i obróbki, jednak formaldehyd może wchodzić w interakcję ze strukturami DNA

powodując tworzenie m.in. wiązań krzyżowych, deaminacji zasad azotowych czy wytworzenie miejsc bezzasadnych. Zmiany te wpływają na strukturę DNA powodując jej osłabienie, co skutkuje zwiększoną fragmentacją badanego materiału genetycznego. Również czas przechowywania tkanek w bloczkach parafinowych może mieć istotny wpływ na jakość izolowanych kwasów nukleinowych. Istnieją metody laboratoryjne pozwalające częściowo ograniczyć wpływ tych zmian na wartość diagnostyczną uzyskanych wyników. Najbardziej istotnym etapem badania molekularnego jest proces ekstrakcji kwasów nukleinowych oraz określenia ich koncentracji. Ma to szczególne znaczenie w procesie sekwencjonowania typu NGS. Ważną rolę w analizie uzyskanych danych odgrywa proces filtracji zidentyfikowanych zmian w kodzie genetycznym. Jest on związany z odrzuceniem wariantów o słabej jakości, występujących z dużą częstotliwością w badanej populacji czy zlokalizowanych poza sekwencjami kodującymi białko.



Automatyzacja technik histologicznych – doświadczenia własne

Ewa Kaznowska

Zakład Patomorfologii, Instytut Nauk Medycznych, Kolegium Nauk Medycznych, Uniwersytet Rzeszowski, Rzeszów

W dobie stale wzrastającej ilości badań materiału tkankowego w pracowniach patomorfologicznych przy jednoczesnych niedoborach specjalistycznej kadry patologów i techników niezbędna jest zmiana zarządzania i organizacji pracy, która pozwoli na skrócenie czasu wykonywania preparatów i zapewni kontrolę kosztów. Rozwiązaniem może być zastosowanie nowoczesnych urządzeń umożliwiających automatyzację rutynowych zadań. Jednym z kroków w tym kierunku jest prezentacja pierwszej w Polsce automatycznej linii SMART

Automation, która została stworzona do przeprowadzania i zatapiania materiału tkankowego. To rozwiązanie ma potencjał, aby znacząco usprawnić procesy pracy w pracowni patomorfologicznej. Dzięki automatyzacji ręcznych czynności możemy skoncentrować się na bardziej zaawansowanych aspektach diagnostyki, jednocześnie zapewniając zachowanie wysokich standardów jakości, które są kluczowe dla prawidłowego rozpoznania patomorfologicznego.

Przykłady zastosowania metod histochemicznych w badaniach anatomicznych

Andrzej Żytkowski, Michał Golberg, Grzegorz Wiesiadecki

Zakład Anatomii Prawidłowej i Klinicznej, Katedra Anatomii i Histologii Uniwersytetu Medycznego, Łódź

Granica pomiędzy anatomią ogólną a histologią nie jest ostra. Ilustruje to cytat z Encyklopedia Britannica: „Terminy histologia i anatomia mikroskopowa są czasami używane zamiennie, ale można dokonać wyraźnego rozróżnienia między tymi dwoma kategoriami. Podstawowym celem histologii jest określenie, w jaki sposób zorganizowane są tkanki na wszystkich poziomach strukturalnych. Z drugiej strony, anatomia mikroskopowa zajmuje się nie tylko tkankami, ponieważ te są ułożone w większe jednostki, takie jak narządy i układy narządów”. W oparciu o to podejście anatomie mikroskopowej można traktować jako płynne przejście między anatomią a histologią. Prezentowane doniesienie ma na celu ukazanie przykładowych badań, w których metody histochemiczne pozwalają ukazać w dużym powiększeniu anatomię topograficzną niewielkich obszarów, takich jak zatoka jamista czy kanał tętnicy szyjnej.

W badaniach anatomicznych często istnieje potrzeba przedstawienia złożonych zależności topograficznych w powiększeniu, czyli w sposób bardziej szczegółowy, wykraczający poza zakres widziany okiem nieuzbrojonym. Jednak do lepszego zrozumienia rozmieszczenia małych struktur anatomicznych często potrzebne jest coś więcej niż tylko powięk-

szenie. Specjalne barwienia pozwalają na różnicowanie zrębu tkanki łącznej oraz prezentację relacji topograficznych zachodzących pomiędzy drobnymi strukturami, takimi jak naczynia krwionośne i nerwy. Zaletą barwień histochemicznych jest jego stosunkowo niski koszt i duża ilość informacji, jakie można uzyskać za ich pomocą. Prezentowane doniesienie ma na celu ukazanie przykładowych badań, w których metody histochemiczne pozwalają ukazać w dużym powiększeniu anatomię topograficzną niewielkich obszarów takich jak jama zwoju trójdzielnego (jama Meckela), zatoka jamista, czy kanał tętnicy szyjnej. W podanych przykładach udało się uzyskać pełniejsze dane na temat zależności pomiędzy blaszkami opony twardej, nerwami i naczyniami krwionośnymi. Za pomocą metod histochemicznych można również badać szczegółowy układ struktur w obrębie pęczków naczyniowo-nerwowych. Celem doniesienia jest zatem przedstawienie wybranych metod histochemicznych, które mogą znaleźć zastosowanie w badaniach anatomicznych. Ten zwięzły zarys może być inspiracją dla morfologów oraz klinicystów zgłębiających szczegółowe tajemnice ludzkiego organizmu.

Wpływ melatoniny na wytwarzanie pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (EVs) przez komórki macierzyste z tkanki tłuszczowej

Bartosz Sikora, Aleksandra Skubis-Sikora, Aleksandra Bryzek, Patrycja Wieczorek, Piotr Czekaj

Zakład Cytofizjologii, Śląski Uniwersytet Medyczny, Katowice

Komórki macierzyste z tkanki tłuszczowej (ADSC) stosowane są w terapiach mających na celu regenerację tkanek. Ich właściwości są badane w coraz bardziej celowanych procesach. Obecnie zwraca się uwagę na właściwości wydzielanych przez nie substancji, wśród których znajdują się pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (EVs) o wciąż odkrywanych właściwościach. Wytwarzanie EVs o danej zawartości jest zależne od warunków panujących w otoczeniu ADSC, więc parametry hodowli mogą wpływać na rodzaj wydzielanych EVs. Melatonina znajduje zastosowanie np. w terapiach przeciwnowotworowych, przeciwzapalnych. Nie jest do końca znany jej wpływ na aktywność ADSC. Badanie miało na celu ocenę wpływu melatoniny na wytwarzanie EVs przez ADSC. ADSC hodowano w DMEM z pozbawionym egzosomów FBS'em i antybiotykami. Fenotyp ADSC oceniono za pomocą cytometrii (markery CD90, CD73, CD105) oraz testu badającego adipo-, chondro- i osteogenezę. Różnicowanie oceniono histochemicznie. EVs izolowano z medium kondycjonowanego (MK). Do zbioru MK stosowano DMEM z 5%

FBS'u i 1% antybiotyków. Grupy badane zawierały dodatek melatoniny i melatoniny z inhibitorem jej receptorów. EVs izolowano ultrawiwaniem sekwencyjnym, identyfikowano za pomocą przeciwciał przeciw CD9 znakowanych złotem koloidalnym i obrazowano w S-TEM. Populacje EVs badano cytometrycznie z wykorzystaniem kulek magnetycznych skoniugowanych z przeciwciałami.

ADSC wykazywały prawidłowy fenotyp i zdolność do różnicowania w adipo-, chondro- i osteocyty. Metody S-TEM i cytometria przepływowa potwierdziły obecność pożądanych frakcji EVs w izolatach. Cytometryczne badanie immunomagnetyczne pozyskanych EVs wykazało różnice między grupami badanymi.

ADSC wydzielają EVs. Melatonina wpływa na aktywność sekrecyjną ADSC.

Finansowanie. NCN nr DEC-2022/06/X/NZ3/00715 oraz instytucjonalnych (SUM) nr: PCN-2-031/K/1/I; PCN-2-047/K/2/I; PCN-2-003/N/0/O; PCN-2-020/K/1/I

Analiza ekspresji neuropeptydów: nesfatyny-1 i speksyny (SPX) w przedmurzu człowieka

Artur Pałasz¹, Anna Borowicz¹, Julia Kistowska¹, Aleksandra Suszka-Świtek¹, Andrzej Kaśkosz², Aneta Piwowarczyk-Nowak²

¹ Zakład Histologii, Katedra Histologii i Embriologii, Śląski Uniwersytet Medyczny, Katowice

² Katedra Anatomii Prawidłowej, Śląski Uniwersytet Medyczny, Katowice

W ostatnich latach dzięki rozwojowi zaawansowanych metod molekularnych i bioinformatycznych zidentyfikowano i opisano szereg nowych neuropeptydów OUN, charakteryzujących się zazwyczaj szerokim spektrum aktywności fizjologicznej w poszczególnych okolicach oraz szlakach neuronalnych mózgu, wśród nich nesfatynę-1 i speksynę (SPX). Pomimo licznych badań neurochemicznych, nie wszystkie struktury mózgu kręgowców zostały scharakteryzowane pod kątem profilu dystrybucji nowych neuropeptydów regulatorowych. Jedną z nich jest przedmurze (*claustrum*), osobliwe pasmo istoty szarej wkomponowane między jądra soczewkowate a korę wyspy, któremu przypisuje się rolę w generowaniu i utrzymywaniu stanu świadomości oraz integracji bodźców czuciowych. Celem pracy było zbadanie czy w przedmurzu człowieka obecne są komórki nerwowe wykazujące immunoekspresję nesfatyny-1 i speksyny oraz przeprowadzenie, o ile będzie to możliwe ilościowej oceny dystrybucji tych komórek w dwu przeciwstawnych topograficznie i konektomicznie okolicach ludzkiego *claustrum*. Fragmenty ludzkiego mózgu (osoby dorosłe), bez zmian patologicznych zostały pobrane z preparatów pozyskanych w ramach Programu Świadomej Donacji prowadzonego przez Katedrę Anatomii Prawidłowej ŚUM w Katowicach.

Mózgowia były poddane perfuzji zbuforowanym 4% roztworem formaldehydu (pH 7.2-7.4) i przechowywane w płynie utrwalającym o identycznym składzie. Fragmenty mózgowia zawierające przedmurze zostały następnie odwodnione, prześwietlone w ksylenie i zatopione w bloczkach parafinowych, które krojono na skrawki grubości 7 mm. Przeprowadzono reakcje immunohistochemiczne z użyciem przeciwciał poliklonalnych: nesfatin-1 (1-82) antibody oraz spexin/NPQ antibody (Phoenix Pharmaceuticals) a otrzymane obrazy poddano jakościowej i ilościowej analizie morfologicznej. Liczba neuronów z ekspresją nesfatyny-1 jest większa w głębiej położonych warstwach przedniej części *claustrum*, z kolei w tylnej części, jej brzuszne strefy wykazywały mniejszą zagęszczenie komórek immunopozytywnych. Komórki z ekspresją speksyny odznaczają się zbliżonym do nesfatyny-1 modelem dystrybucji w ludzkim przedmurzu. Nowe neuropeptydy regulatorowe nesfatyna-1 i speksyna mogą odgrywać rolę w czynnościach realizowanych przez neurony przedmurza człowieka. Dystrybucja przestrzenna neuronów z ekspresją nesfatyny-1 i speksyny w przedmurzu ludzkim jest zbliżona, co sugeruje istnienie potencjalnych korelacji funkcjonalnych pomiędzy tymi peptydami.

Profil ekspresji enzymów realizujących syntezę neuromodulatorów gazowych w mózgu szczurów poddanych działaniu olanzapiny

Artur Pałasz, Julia Kistowska, Anna Borowicz, Aleksandra Suszka-Świtek, Łukasz Filipczyk, Katarzyna Bogus

Zakład Histologii, Katedra Histologii i Embriologii, Śląski Uniwersytet Medyczny, Katowice

Farmakoterapia zaburzeń psychicznych w tym schizofrenii stanowi istotne zagadnienie współczesnej psychiatrii. Mechanizm działania leków przeciwpsychotycznych na poziomie sygnalizacji synaptycznej oraz cytofizjologii neuronu nie jest jednak do końca wyjaśniony. Dynamiczny rozwój neurochemii oraz biologii molekularnej ujawnia coraz to nowe elementy szlaków sygnalizacyjnych, które mogą być potencjalnymi, alternatywnymi punktami działania antypsychotyków, związanymi z ich zarówno korzystną jak i niepożądaną aktywnością farmakologiczną. Przedstawiona oryginalna praca eksperymentalna dotyczy zmian ekspresji enzymów: neuronalnej syntazy tlenu azotu (nNOS), b-syntazy cytotazoninowej (CBS) oraz hemoooksygenazy-2 (HO-2) odpowiedzialnych za syntezę neurotransmiterów gazowych (NO, H₂S, CO) w mózgu szczurów poddanych chronicznemu działaniu olanzapiny – neuroleptyku II generacji.

W przeprowadzonych badaniach wykorzystano materiał tkankowy, który stanowiły mózgowia szczurów szczepu Sprague – Dawley z hodowli utrzymywanej przez Centrum Medycyny Doświadczalnej SUM w Katowicach. Zwierzętom podano dootrzewnowo olanzapinę w formie roztworu w soli fizjologicznej w dawce 5 mg/kg w ciągu 28-dni. Mózgowia były utrwalane w 4% roztworem formaldehydu (pH 7.2-7.4)

a następnie odwodnione, prześwietlone w ksylenie i zatopione w bloczkach parafinowych, które krojono na skrawki grubości 7 mm. Przeprowadzono reakcje immunohistochemiczne i fluorescencyjne z użyciem przeciwciał poliklonalnych: anty-HO-2 antibody (Enzo Life Sci.) i anty-CBS Antibody (Fine Test Biotech) oraz monoklonalnego anty-nNOS antibody (Invitrogen) a otrzymane obrazy poddano jakościowej i ilościowej analizie morfologicznej.

Badania wykazały, że olanzapina stymuluje syntezę NO przez komórki nerwowe w prążkowiu, czyli manifestuje cechy potencjalnego modulatora sygnalizacji nitrergicznej. Zaobserwowano również, że olanzapina redukuje syntezę H₂S w hipokampie oraz prążkowiu, powoduje natomiast istotne zwiększenie produkcji CO w hipokampie.

Olanzapina jest potencjalnym modulatorem sygnalizacji nitrergicznej w prążkowiu szczura i czynnikiem stymulującym syntezę NO przez lokalne komórki nerwowe. Jednym z efektów działania olanzapiny w mózgu szczura jest redukcja syntezy H₂S zachodzącej w astrocytach hipokampa i prążkowie. Oddziaływanie na ośrodkowe mechanizmy syntezy neurotransmiterów gazowych może być jedną z alternatywnych dróg wyzwalania efektów farmakologicznych przez leki przeciwpsychotyczne II generacji.

Tkankowa ekspresja receptorów somatostatynowych w raku jelita grubego

Aldona Kasprzak¹, Małgorzata Andrzejewska¹, Agnieszka Seraszek-Jaros², Paulina Pietras¹,
Marta Leśniczak-Staszak¹, Agnieszka Geltz¹, Elżbieta Kaczmarek², Witold Szaflarski¹

¹ Zakład Histologii i Embriologii, Uniwersytet Medyczny, Poznań

² Zakład Bioinformatyki i Biologii Obliczeniowej, Katedra Patomorfologii Klinicznej, Uniwersytet Medyczny, Poznań

Rak jelita grubego (ang. *colorectal cancer*, CRC) jest globalnie jednym z najczęstszych nowotworów złośliwych u ludzi. Pod względem zachorowalności zajmuje trzecie, a pod względem śmiertelności – drugie miejsce. Większość CRC (75-80%) stanowią zachorowania sporadyczne, kształtowane przez czynniki środowiskowe i genetyczne. Zróżnicowaną ekspresję receptorów somatostatynowych (SST1-5) (mRNA, białko) opisuje się głównie w neuroendokrynnych guzach/nowotworach żołądkowo-jelitowo-trzustkowych. Kwestią otwartą pozostaje natomiast diagnostyczno-prognostyczna rola ekspresji tkankowej SST1-5 w sporadycznym CRC. Zanalizowano immunohistochemiczną (IHC) ekspresję trzech receptorów somatostatynowych (SST2, SST3 i SST5) oraz antygenu Ki-67 w skrawkach parafinowych z materiału operacyjnego (n=30) oraz w dostępnych komercyjnie TMAs (tissue microarrays) chorych na CRC (n=30). Ekspresję tę odniesiono do analizy ekspresji SSTRs w przerzutach CRC do węzłów chłonnych (metastases, meta) (n=30) oraz prawidłowym jelicie grubym (kontrola) (n=58). Do oceny ilo-

ściowej nasilenia reakcji IHC na SSTRs wykorzystano metodę morfometryczną (program Filtr HSV). Ekspresję Ki-67 oceniono w 4-pkt skali półilościowej.

Wskaźnik wykrywalności SST2/3/5 w CRC wynosił odpowiednio: 100%/88%/100%. Wykazano znamienne wyższą ekspresję SST2 w CRC i w meta w porównaniu z kontrolą (p=0,001, p=0,03, odpowiednio). W każdej z badanych grup wykazano istotnie większą ekspresję SST2 niż SST3 oraz przewagę ekspresji SST5 nad SST3. W CRC pozytywne korelacje dotyczyły wzajemnej ekspresji wszystkich trzech receptorów, a najsilniejsze pomiędzy SST2 z SST5 w CRC, oraz w meta (r=0,790, r=0,780, odpowiednio). W CRC wykazano negatywną korelację ekspresji SST3 z Ki-67 (r=-0,480). Wraz ze wzrostem zaawansowania klinicznego (stage) CRC, rosła ekspresja SST2.

Nadekspresja SST2 może stanowić marker diagnostyczno-prognostyczny CRC. Potencjalną rolę w regulacji proliferacji komórkowej CRC wydaje się odgrywać SST3.

Dynamika uszkodzenia wątroby w eksperymentalnych modelach hepatotoksyczności indukowanej D-galaktozaminą lub czterochlorkiem węgla – implikacje dla terapii piorunującego, ostrego i przewlekłego uszkodzenia wątroby

Piotr Czekaj, Mateusz Król

Zakład Cytofizjologii, Katedra Histologii i Embriologii, Śląski Uniwersytet Medyczny, Katowice

Eksperymentalne modele hepatotoksyczności indukowane D-GalN i CCl₄ służą ocenie terapii piorunującego (FLF), ostrego (ALF) i przewlekłego (ChLF) uszkodzenia wątroby. Brakuje jednak opracowań dotyczących dynamiki uszkodzenia w tych modelach. Celem badań było określenie optymalnego momentu interwencji poprzez histopatologiczną i biochemiczną ocenę uszkodzenia wątroby w czasie.

U myszy BALB/c oceniano 6 modeli uszkodzenia wątroby poprzez iniekcje różnych dawek D-GalN lub CCl₄. Pobrano krew i wątrobę w różnych punktach czasowych odpowiadających kolejnym fazom uszkodzenia. Oznaczono aktywność aminotransferaz, oceniono histopatologiczne i immunohistochemiczne wykładniki uszkodzenia wątroby.

Optymalna dawka dla indukcji FLF wynosiła 500 mg/100 g masy ciała dla D-GalN i 300 µl/100 g masy ciała dla CCl₄. W modelu FLF/D-GalN zaobserwowano pierwsze oznaki uszkodzenia wątroby oraz wzrost aktywności aminotransferaz między 24 a 72 godziną po podaniu. W modelu FLF/CCl₄ pierwsze oznaki uszkodzenia wątroby pojawiły się między 5 a 16 godziną po intoksykacji, a po 16 godzinach stwierdzono

wysoką śmiertelność i słabą kondycję zwierząt. W modelu ALF/D-GalN wczesna faza zapalenia wątroby występowała po 48 godzinach, natomiast w modelu ALF/CCl₄ oznaki niewydolności wątroby widoczne były już po 12 godzinach i rozwijały się do 48 godzin. W modelu ChLF/CCl₄ zaobserwowano wczesne włóknienie przed 4 tygodniem intoksykacji oraz ustalone włóknienie po 8 tygodniach. W modelu ChLF/D-GalN myszy nie wykazywały istotnych zmian w uszkodzeniu i włóknieniu wątroby.

Interwencja terapeutyczna dla FLF/D-GalN powinna być przeprowadzana między 24 a 72 godziną po podaniu, podczas gdy dla CCl₄/FLF okno terapeutyczne jest krótkie (5-16 godzin) i wiąże się z niską kondycją zwierząt. Optymalne punkty odcięcia dla interwencji terapeutycznej w modelu ALF to 48 godzin dla D-GalN i 12-48 godzin dla CCl₄. Wczesne włóknienie (przed 4 tygodniem intoksykacji) i ustalone włóknienie (po 8 tygodniach intoksykacji) są odpowiednimi momentami dla interwencji terapeutycznej w modelu ChLF/CCl₄. Model D-GalN/ChLF nie jest zalecany ze względu na długi okres inkubacji i słabe działanie toksyczne.

Calcitonin gene-related peptide α (α -CGRP) but not calcitonin gene-related peptide β (β -CGRP) is elevated in the blood serum and primary tumor tissue of metastatic colorectal cancer patients

Jacek Kiezun¹, Marta Kiezun², Zbigniew Kmiec^{1,3}, Janusz Godlewski¹, Bartłomiej E. Krazinski¹

¹ Department of Human Histology and Embryology, Faculty of Medical Sciences, University of Warmia and Mazury, Olsztyn

² Department of Animal Anatomy and Physiology, Faculty of Biology and Biotechnology, University of Warmia and Mazury, Olsztyn

³ Department of Histology, Faculty of Medicine, Medical University of Gdansk, Gdansk

The two forms of calcitonin gene-related peptide (CGRP), α - and β -CGRP, are synthesized from the two distinct genes located at the human chromosome 11. Both β -CGRP and to the lesser extent α -CGRP participate in the regulation of digestive system functions, but their role in colorectal cancer (CRC) remains unclear to date. This study aimed to evaluate the concentration of α - and β -CGRP (1) in the blood serum of CRC patients and healthy volunteers and (2) in tissue homogenates of CRC tumors and peritumoral or distant fragments of large intestine. Correlations between the α - and β -CGRP levels and clinicopathological characteristic of the patients with CRC were investigated. The blood samples were collected from 53 CRC patients and 25 healthy volunteers. The tissue samples for homogenization were obtained from the primary tumors, mucosa/submucosa (M+SM) and muscularis externa (ME) of the peritumoral or distant large intestine fragments of 16 CRC patients. The concentrations of α - and

β -CGRP were evaluated by ELISA. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$. The Mann-Whitney U test was used to assess associations between the CGRPs levels and clinico-pathological data of the patients.

CRC patients exhibited decreased serum concentrations of α -CGRP when compared to the healthy volunteers whereas β -CGRP levels did not differ between the studied groups. Interestingly, the sera and homogenates of primary tumors of metastatic patients exhibited nearly two-fold increase in α -CGRP level as compared to those without metastasis. No associations were disclosed between β -CGRP and any clinic-pathological data of the patients.

The concentration of α -CGRP, not β -CGRP, may play a role in the metastatic process in CRC. Moreover, the association between a high serum level of α -CGRP and distant metastasis suggests that α -CGRP may be considered as CRC biomarker.

HLA antigens and cell adhesion molecules in the endomyocardial biopsy specimens patients with clinically suspected myocarditis

Edyta Reichman-Warmusz, Oliwia Warmusz, Piotr Lewandowski, Gracja Ryznar, Romuald Wojnicz

Katedra Histologii i Patologii Komórki, Śląski Uniwersytet Medyczny, Zabrze

The aim of this study was to characterise the expression of cell adhesion molecules (CAMs) and HLA antigens in biopsy specimens patients with two clinical suspected myocarditis. Study group consisted of 47 randomly selected patients (pts) classified in two groups based on left ventricular ejection fraction (LVEF): A – 29 pts, with LVEF $\leq$ 30% (24M, 5F, mean age 39 ± 6) and B – 18 pts with LVEF $> 40\%$ (15M, 3F, mean age 38 ± 7). The expression of HLA class I (A,B,C) and II (DR) antigens and CAMs on frozen sections were examined using a Leica Bond Max autostainer (BOND Polymer Refine Red Detection; DS9390; Leica Biosystems) and monoclonal antihuman antibodies (HLA-DR, HLA-ABC, ICAM-1 and VCAM-1 from DAKO). The semiquantitative scoring system was defined as follows: 0-1, absent or slight focal staining of the endothelium; 2+, diffuse endothelial staining, 3+, diffuse endothelial and concomitant focal myocyte staining. The routine histopathological study was performed with hematoxylin & eosin and Masson trichrome stain. The data

were analysed by a Mann-Whitney U test and Spearman R correlation coefficient test. A p value of < 0.05 was statistically significant.

The expression of HLA-DR antigens $> 2+$ was seen in the 17 (59%) pts in Gr. A and 12 (67%) in Gr. B. The expression of the HLA-A,B,C antigens was observed in the 11 (38%) and 12 (67%) pts, respectively. ICAM-1 and VCAM-1 immunoreactivity $> 2+$ was seen: ICAM-1, Gr. A – 12 (41%) and Gr. B – 9 (50%); VCAM-1, Gr. A – 6 (21%) and Gr. B – 9 (50%). There was no statistical differences between both groups and there was no relationship between LVEF and HLA-DR, HLA-ABC, ICAM-1 and VCAM-1 immunoreactivity.

The lack relationship between positive staining for HLA antigens and CAMs in two groups of pts with clinically suspected myocarditis (with and without symptomatic congestive heart failure) indicates on independence of immunological reactions in myocardium.

Kwasy tłuszczowe wyizolowane z archeologicznych ludzkich kości a diogeneza

Michał Kulus¹, Paweł Dąbrowski², Katarzyna Kapczyńska³, Katarzyna Szymczak-Kulus⁴, Marzena Styczyńska⁵, Ireneusz Zawiaślak⁵, Dominika Domagała², Piotr Kmiecik⁶

¹ Zakład Badań Ultrastrukturalnych, Uniwersytet Medyczny, Wrocław

² Zakład Anatomii Prawidłowej, Uniwersytet Medyczny, Wrocław

³ Międzyzakładowa Pracownia Analizy Instrumentalnej i Preparatyki, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk, Wrocław

⁴ Laboratorium Glikobiologii, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk, Wrocław

⁵ Katedra Żywienia Człowieka, Uniwersytet Przyrodniczy, Wrocław

⁶ Instytut Przyrodniczo-Techniczny, Akademia Nauk Stosowanych Angelusa Silesiusa, Wałbrzych

Metody bioarcheologiczne stosowane do rekonstrukcji wzorców żywieniowych dawnych populacji obejmują analizę izotopową lub chemiczną pierwiastków w kościach, ze szczególnym uwzględnieniem części nieorganicznej lub białek kostnych. Badanie lipidów kostnych zamiast białek otwiera wiele obiecujących możliwości: zapewniają one wgląd w spożycie diety bliżej czasu śmierci i są ściślej skorelowane ze składem całej diety. Celem obecnego badania jest porównanie archeologicznego profilu kwasów tłuszczowych kości ze składem pierwiastkowym tej tkanki.

Materiał użyty w obecnym badaniu składał się z 20 archeologicznych próbek kości pobranych z kości korowej kości udowej, datowanych na 17-18 w. Skład pierwiastkowy kości i profil lipidowy kości określono metodami spektrometrycznymi. Zawartość kwasów tłuszczowych w kościach korelowała ze wskaźnikami zachowania kości; w porównaniu do współczes-

nych kości, kości archeologiczne mają tendencję do posiadania większej ilości nasyconych i bardzo długich kwasów tłuszczowych (C22:0 i C24:0). Najprawdopodobniej dłuższe kwasy tłuszczowe są lepiej zachowane w kościach archeologicznych i odzwierciedlają głównie lipidy komórkowe kości. Korelacja między C22:0 a stosunkiem Sr/Ba sugeruje możliwy związek między profilem kwasów tłuszczowych kości a dietą morską.

Skład kwasów tłuszczowych kości archeologicznej różni się od kości współczesnej, z obniżonym poziomem nienasyconych kwasów tłuszczowych i podwyższonym poziomem dłuższych kwasów tłuszczowych. Podwyższone poziomy kwasów tłuszczowych C22:0 i C24:0 w kościach archeologicznych sugerują wzbogacenie lipidów komórkowych, które mogą być bardziej odporne na degradację niż te związane z macierzą mineralną kości.

Analiza zmian poziomu wybranych markerów metabolicznych w prążkowie podczas rozwoju postnatalnego w szczurzym modelu zespołu nadpobudliwości psychoruchowej z deficytem uwagi (ADHD)

Ewelina Bogdańska-Chomczyk¹, Paweł Wojtacha², Anna Kozłowska¹

¹Katedra Fizjologii i Patofizjologii Człowieka, Wydział Lekarski, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski, Olsztyn

²Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Żywności, Wydział Nauki o Żywności, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski, Olsztyn

Zespół nadpobudliwości psychoruchowej z deficytem uwagi (ADHD) jest neurorozwojowym zaburzeniem psychicznym, charakteryzującym się deficytem uwagi, hiperaktywnością oraz impulsywnością. Jak dotąd patogeneza schorzenia nie została w pełni poznana, jednakże w przebiegu ADHD obserwuje się szereg nieprawidłowości w obszarach mózgu zaangażowanych w kontrolę ruchu m.in.: korze przedczołowej, korze motorycznej i prążkowie. Coraz więcej dowodów wskazuje, że zmiany w metabolizmie mózgu pełnią istotną rolę w patofizjologii tego zaburzenia. Celem przedstawionych badań było porównanie wybranych markerów metabolicznych w prążkowie tj.: żelaza (Fe), glukozy (G), aminotransferazy alaninowej (ALT) oraz aminotransferazy asparaginianowej (AST) u szczurów z genetycznie uwarunkowanym nadciśnieniem tętniczym (SHR – *spontaneously hypertensive rats*), będących najlepiej zwalidowanym modelem ADHD, a także u zwierząt kontrolnych (WKY –

Wistar Kyoto rats). Prążkowie zarówno u SHR jak i WKY pobrano w dwóch stadiach rozwojowych (5 i 10 tygodni). Następnie pobrane tkanki zhomogenizowano i odwirowano. Zawartość G, Fe, ALT i AST oznaczono przy użyciu odpowiednich komercyjnych zestawów odczynników zgodnie z instrukcjami producenta. Wyniki pomiarów poddano analizie statystycznej.

Wyniki wykazały statystycznie istotny ($p < 0.005$) wszystkich badanych markerów u 5-tygodniowych SHR w porównaniu do zwierząt 10 tygodniowych.

Podwyższony metabolizm w prążkowie może prowadzić do zmian w neurotransmisji tej struktury i w ten sposób wpływać na nasilenie objawów ADHD u młodocianych zwierząt. Ponadto, może być on również powiązany z opóźnionym dojrzewaniem prążkowie u SHR. Jednakże, niezbędne są dalsze szczegółowe badania, aby potwierdzić powyższe przypuszczenia.

PDIA3 moduluje odpowiedź genomową na $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ w płaskonabłonkowym raku skóry

Joanna I. Nowak¹, Anna M. Olszewska¹, Anna Piotrowska¹, Kamil Myszczyński²,
Paweł Domżański¹, Michał A. Żmijewski¹

¹ Katedra i Zakład Histologii, Gdański Uniwersytet Medyczny, Gdańsk

² Centrum Analiz Biostatystycznych i Bioinformatycznych, Gdański Uniwersytet Medyczny, Gdańsk

Celem pracy było zbadanie wpływu białka PDIA3 na odpowiedź raka płaskonabłonkowego (SCC) linii A431 na aktywną formę witaminy D - $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Badania zostały przeprowadzone na linii A431 płaskonabłonkowego raka skóry z lub bez delecji *PDIA3* lub *VDR*. Przeprowadzono testy proliferacyjne (SRB), migracyjne (test zarastania rany) oraz zbadano rozkład faz cyklu komórkowego oraz wykonano analizę transkryptomiczną badanych linii komórkowych po traktowaniu $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ [10^{-7} M] po 24h. Dane przeanalizowano przy pomocy narzędzi bioinformatycznych. Komórki pozbawione *PDIA3* wykazały zwiększoną wrażliwość na $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, co prowadziło do zmniejszenia ich proliferacji oraz migracji. Traktowanie $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ zmieniło również profil ekspresji genów w komórkach A431 Δ *PDIA3* w porównaniu do komórek A431WT, wskazując na istnienie genów zależnych od PDIA3. Co ciekawe, klasyczne cele dla receptora witaminy D (*VDR*), tj. *CAMP*, *TRPV6* były regulowane w różny sposób przez $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ w komórkach delecją *PDIA3*. Delecja *PDIA3* obniżyła ekspresję genów *PTGS2*,

MMP12 i *FOCAD* zależną od $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Geny te zostały zidentyfikowane jako zależne od PDIA3.

Knockout *PDIA3* skutkował zmianą w ekspresji ponad 2000 genów oraz modulował proliferację, cykl komórkowy oraz mobilność komórek, sugerując ważną fizjologiczną rolę PDIA3 w komórkach. Traktowanie komórek $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ zmieniło profil ekspresji genów w linii komórkowej z delecją *PDIA3*, w porównaniu do komórek typu dzikiego (WT), wskazując na istnienie efektów genomowych zależnych od obecności białka PDIA3. Dodatkowo, odpowiedź na $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ w nowotworowych komórkach A431 różniła się od unieśmiertnionych keratynocytów HaCaT, stosowanych jako kontrola nienowotworowa. Zarówno wyciszenie genu *PDIA3* i traktowanie komórek $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, przynajmniej częściowo odwraca ekspresję genów związanych z fenotypem nowotworowym komórek A431. Tak więc, ekspresja genu *PDIA3* może być markerem procesy nowotworzenia, a białko PDIA3 jest ważnym modulatorem odpowiedzi genomowej na witaminę D.

Ekspresja białka LC3-B w różnych podtypach molekularnych raka gruczołu piersiowego – badania wstępne

Katarzyna Haczekiewicz-Leśniak¹, Piotr Dzięgiel², Aleksandra Piotrowska²,
Aleksandra Partyńska², Michał Kulus¹, Agnieszka Gomułkiewicz², Karolina Jabłońska²,
Alicja Kmiecik², Katarzyna Ratajczak-Wielgomas², Magdalena Baran-Pelc¹, Katarzyna
Ratajczak², Agnieszka Rusak², Marta Migocka-Patrzałek³, Ewelina Iwaneczko⁴, Rafał Matkowski⁵,
Marzenna Podhorska-Okołów¹

¹ Zakład Badań Ultrastrukturalnych, Wydział Lekarski, Uniwersytet Medyczny, Wrocław

² Zakład Histologii i Embriologii, Katedra Morfologii i Embriologii Człowieka, Uniwersytet Medyczny, Wrocław

³ Zakład Biologii Rozwoju Zwierząt, Wydział Nauk Biologicznych, Uniwersytet Wrocławski, Wrocław

⁴ Zakład Patomorfologii, Dolnośląskie Centrum Onkologii, Pulmonologii i Hematologii, Wrocław

⁵ Katedra Onkologii, Zakład Chirurgii Onkologicznej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, Pododdział Chirurgii Piersi Dolnośląskiego Centrum Onkologii, Pulmonologii i Hematologii, Wrocław

Autofagia, regulowana przez białka związane z autofagią, umożliwia przetrwanie komórkom warunków stresu, poprzez częściową degradację organelli w wakuolach autofagowych. Głównym markerem procesu jest białko LC3-B, które w zależności od izoformy punktowo znakuje autofagosomy lub odpowiada za reakcję dyfuzyjną. Aktywacja lub inhibicja autofagii została stwierdzona w wielu nowotworach, co może mieć związek ze wzrostem poziomu onkoprotein oraz progresją lub zahamowaniem rozwoju raka. Z drugiej strony, w już ukształtowanym guzie, komórki nowotworowe indukują ten proces, w celu uniknięcia apoptozy. Zatem rola autofagii w przeżyciu lub śmierci komórek raka pozostaje niejednoznaczna. Celem badań było wykazanie aktywacji lub hamowania autofagii w materiale klinicznym inwazyjnego przewodowego raka piersi (IDC) oraz w badaniach *in vitro*. Badania zostały wykonane na fragmentach guzów pobranych od pacjentek z Dolnośląskiego Centrum Onkologii we Wrocławiu i zabezpieczonych do reakcji immunohistochemicznych (IHC), do badań ultrastrukturalnych (błoczki epoksydowe), w materiale mrożonym i w odczynniku RNA-later. Ocena reakcji IHC została przeprowadzona skalą wg

Bortnik i in. (2020), w formie iloczynu wybarwionych komórek nowotworowych i intensywności ekspresji cytoplazmatycznej oraz oszacowania poziomu autofagii w postaci punktów markera LC3-B. Badania kliniczne uzupełniono badaniami *in vitro* z wykorzystaniem linii MCF-7 (rak luminalny), SK-BR-3 (rak HER2+), MDA-MB-231 oraz BO2 (rak potrójnie negatywny).

Aktywacja autofagii miała miejsce w 142 przypadkach guzów w komórkach nowotworowych oraz w 201 przypadkach w komórkach podścieliska łącznotkankowego z 243 poddanych ocenie. Obserwacje ultrastrukturalne i reakcje IF wykazały obecność autofagosomów w materiale klinicznym oraz we wszystkich liniach komórkowych, co potwierdziło wynik reakcji IHC w formie punktów LC3-B, odnotowanych w 87 przypadkach guzów. Ponadto odnotowano tendencję do większego nasilenia autofagii w raku o stopniu złośliwości G2 i G3 oraz w podtypie potrójnie negatywnym w porównaniu do raka luminalnego.

Aktywacja autofagii oraz obecność autofagosomów w guzach i w liniach komórkowych może wskazywać na rolę tego procesu w promowaniu przeżycia komórek nowotworowych.

Zmiany w zawartości receptorów hormonu folikulotropowego oraz luteotropowego w hipokampie szczurów spontanicznie rozwijających nadciśnienie tętnicze – zwierzęcy model ADHD

Anna Kozłowska¹, Paweł Wojtacha², Ewelina Bogdańska-Chomczyk¹, Mariusz Majewski¹

¹ Katedra Fizjologii i Patofizjologii Człowieka, Wydział Lekarski, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski, Olsztyn

² Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Żywności, Wydział Nauki o Żywności, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski, Olsztyn

ADHD (zespół nadpobudliwości psychoruchowej z deficytem uwagi) jest jednym z najczęściej występujących zaburzeń wśród dzieci i młodzieży. Coraz częściej to zaburzenie diagnozuje się również u osób dorosłych. Wśród najczęstszych objawów ADHD można wymienić nadmierną ruchliwość i impulsywność, znaczne problemy z koncentracją uwagi oraz z pamięcią krótkotrwałą. Strukturą, która przetwarza informacje znajdujące się w obrębie pamięci krótkotrwałej jest hipokamp w którym wykazano obecność receptorów hormonu folikulotropowego (FSHR) oraz luteotropowego (LHR). Co więcej, hormon luteotropowy ma zdolność modulowania aktywności hipokampa, a jego podwyższony poziom występował u mężczyzn z zaburzeniami hiperseksualnymi. Z kolei, hormon folikulotropowy jest zaangażowany w rozwój zaburzeń afektywnych. Dlatego też, celem badania było określenie zawartości FSHR oraz LHR w hipokampie szczurów spontanicznie rozwijających nadciśnienie tętnicze (SHR) oraz szczurów kontrolnych (Wistar Kyoto – WKY) w dwóch stadiach rozwojowych: osobniki młodociane w wieku 5 tygodni oraz dojrzałe płciowo w wieku 10 tygodni.

W celu określenia zawartości FSHR oraz LHR w hipokampach pobranych od 5 i 10-tygodniowych szczurów SHR i WKY wykorzystano metodę ELISA. Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej używając testu Tukeya (Graph-Pad Software, USA).

Zawartość FSHR i LHR w hipokampie była znacznie obniżona ($p < 0,02-0,004$) u 10-tygodniowych SHR w porównaniu ze zwierzętami grupy kontrolnej (WKY). Co więcej, zawartość tych receptorów była istotnie wyższa ($p < 0,02-0,002$) w badanej strukturze u 10-tygodniowych WKY w porównaniu z 5-tygodniowymi szczurami tego szczepu.

Obniżenie zawartości receptorów FSH i LH w hipokampie 10-tygodniowych szczurów SHR sugeruje opóźnienie w dojrzewaniu mózgu. Konieczne są jednak dalsze badania w celu poznania przyczyn tego zjawiska.

Finansowanie. Prezentowane badania zostały sfinansowane ze środków Narodowego Centrum Badań i Rozwoju (PL-TW II/4/2015) oraz ze środków statutowych Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie (61.610.008-110).

Wpływ iryzyny (Ir) na komórki śródbłónka i angiogenezę niedrobnokomórkowego raka płuc (NSCLC) – badania wstępne

Katarzyna Nowińska¹, Alicja Kmieciak¹, Aleksandra Piotrowska¹, Karolina Jabłońska¹,
Urszula Ciesielska¹, Marzenna Podhorska-Okołów², Piotr Dzięgiel¹

¹Zakład Histologii i Embriologii, Uniwersytet Medyczny, Wrocław

²Zakład Badań Ultrastrukturalnych, Uniwersytet Medyczny, Wrocław

Jedną z przyczyn progresji nowotworów są naczynia powstające w guzach. Różnią się one od tych, pojawiających się w procesie gojenia ran. Różnice te dotyczą m.in. obecności integrynowych receptorów $\alpha V\beta 3$ i $\alpha V\beta 5$ na powierzchni komórek śródbłónka. Ligandem dla $\alpha V\beta 5$ mogłaby być iryzyna (Ir), którą zaobserwowano w komórkach niedrobnokomórkowego raka płuc (NSCLC). Ir łączy się z $\alpha V\beta 5$ na osteocytach aktywując szlaki sygnałowe. Ekspresja genu *FNDC5* (kodującego Ir) wzrasta w fibroblastach płucnych w obecności komórek raka płuc. Podwyższony poziom Ir w podścielisku wpływa na progresję NSCLC i jest obserwowany u pacjentów z przerzutami odległymi. Celem pracy było zbadanie związku Ir z czynnikiem proangiogennym VEGFA oraz markerami naczyniowymi CD-31 i CD34 w NSCLC. Kolejnym celem było określenie wpływu Ir na komórki śródbłónka naczyń oraz zbadanie kolokalizacji Ir z $\alpha V\beta 5$, VEGFR1 i VEGFR2.

Badania przeprowadzono na archiwalnym materiale 360 guzów NSCLC w postaci mikromacierzy tkankowych (TMA) oraz na linii komórkowej śródbłónka naczyń HMEC-1. Na

TMA zostały wykonane reakcje immunohistochemiczne wykrywające Ir, VEGFA, CD-31 i CD-34. Na komórkach HMEC-1 wykonano testy MTT po 24h inkubacji z różnymi stężeniami Ir i inhibitora (blokującego $\alpha V\beta 5$), a także wykonano reakcje immunofluorescencyjne badające kolokalizację Ir z receptorami $\alpha V\beta 5$, VEGFR1 i VEGFR2. Uzyskane dane zostały poddane analizie statystycznej.

Zaobserwowano słabą dodatnią korelację poziomu ekspresji Ir z czynnikiem wzrostu śródbłónka naczyń VEGFA oraz CD-34 w komórkach raka NSCLC, a także w komórkach podtypu gruczolakoraków płuc (AC). Po 24h inkubacji z Ir w stężeniu 1 ng/ μ l odnotowano wzrost przeżywalności komórek HMEC-1. Przy użyciu mikroskopu konfokalnego została zaobserwowana kolokalizacja Ir z integryną $\alpha V\beta 5$ i VEGFR2 w komórkach śródbłónka naczyń HMEC-1. Nie obserwowano natomiast kolokalizacji Ir z receptorami VEGFR1.

Ir może uczestniczyć w regulacji angiogenezy guzów NSCLC przez związek z receptorem $\alpha V\beta 5$ i wpływem na przeżywalność komórek śródbłónka naczyń.

Uwrażliwianie opornych komórek nowotworowych piersi za pomocą nanocząstek złota w terapii borowo-neutronowej

Wiktoria Krakowiak¹, Karolina Wójciuk², Michał Dorosz², Magdalena Płodowska¹,
Aneta Węgierek-Ciuk¹, Andrzej Wójcik³, Anna Lankoff⁴, Halina Lisowska¹

¹ Uniwersytet Jana Kochanowskiego, Kielce

² Narodowe Centrum Badań Jądrowych, Świerk

³ Katedra Biologii Molekularnej, Uniwersytet Sztokholmski, Sztokholm

⁴ Instytut Chemii i Techniki Jądrowej, Warszawa

Terapia borowo-neutronowa (ang. *boron neutron capture therapy* – BNCT) to odmiana hadronoterapii, która jest oparta na zdolności nieradioaktywnego izotopu boru-10 do wychwytu neutronów termicznych lub epitermicznych. Skuteczność terapii zależy od równomierności rozkładu izotopu boru-10 wewnątrz komórek nowotworowych. Celem prowadzonych badań była analiza wpływu nanocząstek złota na uwrażliwianie komórek nowotworowych piersi w terapii borowo-neutronowej. W badaniach wykorzystano linie komórkowe nowotworowe piersi typu trójjemnego – MDA-MB-231 oraz typu luminalnego – MCF-7. Komórki poddawano działaniu promieniowania neutronowego otrzymanego z reaktora badawczego MARIA znajdującego się w Narodowym Centrum Badań Jądrowych w Świerku. Dawka pochłonięta przez komórki wynosiła około 2,5 Gy. Komórki napromieniano po 4 godzinach i 24 godzinach inkubacji z nanocząstkami złota. BPA dodawano 4 godziny przed napromienianiem komórek do każdej próbki zawierającej nanocząstki złota. Odpowiednią ilość komórek roz-

siano do testu klonogenego po 24 godzinach od napromienienia i powstałe kolonie zliczano po 3 tygodniach. Rozkład komórek w cyklu komórkowym mierzono za pomocą cytometru przepływowego (BD LSR II) po 24 godzinach od napromienienia komórek. W przypadku testu klonogenego w obu typach komórek zaobserwowano istotny spadek przeżywalności po napromienieniu w próbach z dodanymi nanocząstkami złota. W rozkładzie komórek w cyklu komórkowym w przypadku MDA-MB-231 można zauważyć, że są one zatrzymane w fazie G2 cyklu po napromienieniu. W przypadku typu luminalnego MCF-7, nie zaobserwowano próby, w której przebieg cyklu komórkowego byłby całkowicie zablokowany. Uzyskane wyniki świadczą, że dodanie nanocząstek złota uwrażliwia komórki nowotworowe piersi poprawiając tym samym skuteczność terapii borowo-neutronowej w szczególności jeśli chodzi o typ trójjemny MDA-MB-231. Jednakże, dokładna przyczyna takich wyników nie jest obecnie znana i istnieje potrzeba dalszych badań.

Ocena histopatologiczna neuroprotektoryjnego wpływu hydrożelowego homogenatu porożogennych komórek macierzystych na neurony w doświadczalnie uszkodzonym rdzeniu kręgowym u trzody chlewnej

Małgorzata Tarnowska¹, Piotr Kuropka¹, Tomasz Gębarowski¹, Renata Nowaczyk¹, Marcin Wrzosek²

¹ Katedra Biostruktury i Fizjologii Zwierząt, Zakład Histologii i Embriologii, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Przyrodniczy, Wrocław

² Katedra Chorób Wewnętrznych z Kliniką Koni, Psów i Kotów, Zakład Diagnostyki Klinicznej i Laboratoryjnej, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Przyrodniczy, Wrocław

Uszkodzenia rdzenia kręgowego (SCI) są nadal jednym z najpoważniejszych problemów w neurologii człowieka. Jedną z form terapii dających nadzieję na uzyskanie stabilizacji tkanki pourazowej oraz jej ewentualną regenerację są komórki macierzyste, w tym porożogene komórki macierzyste. Celem przeprowadzonych badań była ocena działania zmodyfikowanego rusztowania żelowego z zawartością homogenatu porożogennych komórek macierzystych (HPKM) o właściwościach neuroprotektoryjnych na zwierzęcym modelu selektywnego uszkodzenia rdzenia kręgowego. Zwierzęta podzielono na 3 grupy doświadczalne. W każdej z grup liczących po 7 zwierząt, wykonano procedurę kontrolowanego uszkodzenia rdzenia kręgowego według założonego standardu, polegającą na selektywnym jednostronnym przecięciu powrózka grzbietowego: I - kontrola, II - rusztowanie żelowe bez HPKM, III - rusztowanie żelowe z zawartością HPKM. Materiał do badań stanowiły wycinki rdzenia kręgowego, które po pobraniu utrwalano w 4% zbufoformowanej formalinie. Po płukaniu w bieżącej wodzie, materiał odwodniono i zatopiono w parafinie. Skrawki o grubości 7 µm barwiono rutynowo hematoksyliną i eozyną oraz fioletem krystalicznym. Ponadto przeprowadzono reakcje immunocytochemiczne w celu wykrycia GFAP i AIF1. W celu dalszego porównania grup przeprowadzono analizę ilościową (skoring), w której uwzględniono następujące cechy: struk-

turę włókien nerwowych, zachowanie perykarionów komórek nerwowych w obrębie rdzenia, brak obrzęku i nacieków zapalnych, zmiany kierunku przebiegu włókien, dodatni wynik dla GFAP, brak dodatniego wyniku dla AIF1.

Badania histologiczne wykazały obecność zaawansowanej angiogenezy w miejscu przecięcia, której towarzyszyły umiarkowane limfocytarne-makrofagowe nacieki zapalne obserwowane głównie od strony opony miękkiej rdzenia, towarzyszące nowo powstałym naczyniom krwionośnym. Obrzęk obserwowano w grupach II i III, podczas gdy w grupie I występowała całkowita degeneracja nerwów rdzeniowych. Na uwagę zasługuje fakt utrzymania komórek glejowych grupy III w odcinku doogonowym rdzenia kręgowego. Ochronne działanie wytworzonego żelu zawierającego HPKM uzyskano w nerwach wchodzących i wychodzących z rdzenia kręgowego oraz w obrębie zwojów międzykręgowych.

Podziękowania. Spółka Stem Cells Spin S.A. zrealizowała projekt współfinansowany ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Regionalnego Programu Operacyjnego Województwa Dolnośląskiego 2014-2020: „Opracowanie hydrożelu z homogenatem porożogennych komórek macierzystych o działaniu neuroprotektoryjnym na tkankę rdzenia kręgowego”.

Modele nauczania maszynowego histologicznych preparatów cyfrowych

Joanna Jagielska, Elżbieta Kaczmarek

Zakład Bioinformatyki i Biologii Obliczeniowej, Katedra Patomorfologii i Immunologii Klinicznej, Uniwersytet Medyczny, Poznań

Rozpoznawanie obrazów histologicznych algorytmami nauczania maszynowego jest procesem automatycznego wykrywania i segmentacji komórek, ich jąder lub wybranych obszarów preparatu spełniających określone kryteria. Wybrane obiekty są kategoryzowane metodami statystycznymi i modelami matematycznymi na podstawie cech morfologicznych. Celem pracy jest implementacja wielorozdzielczego modelu nauczania maszynowego do obiektywizacji i interpretacji cech istotnych w diagnostyce i rokowaniu przeżycia chorych. Materiał i metodyka Materiał do badań reakcji histochemicznej stanowiły preparaty cyfrowe z wykładnikami włóknienia w przewlekłym zapaleniu wątroby oraz alkoholowym uszkodzeniu wątroby, wybarwione H+E oraz czerwienią Syriusza. Materiał do oceny immunohistochemicznej stanowiły preparaty cyfrowe z nowotworem jelita grubego. Reakcję immunohistochemiczną z wykorzystaniem mysich przeciwciał anti-PCNA (klon PC10, DakoCytomation) w stężeniu 1:100 wykonano metodą ABC. Segmentację multirozdzielczą wykonano przy pomocy programu Image-Pro Premiere (Media Cybernetics). Losowo wybrano preparaty cyfrowe z potwierdzoną diagnozą patomorfologa i wynikami segmentacji do zbioru obrazów uczą-

cych (80%) oraz obrazów do walidacji (20%). Utworzono także zbiór testowy preparatów cyfrowych z nieokreśloną diagnozą i poddano go ocenie algorytmami nauczania maszynowego. Wynik decyzji systemu uczącego został przesłany do weryfikacji patomorfologa. Wyniki Średni procent włóknienia śródmiąższu wątroby przy powiększeniu obiektywu 20x oraz przy średniej rozdzielczości wynosił $6,08 \pm 5,07$ (próbkowanie systematyczne) oraz $5,70 \pm 4,34$ (próbkowanie losowe), natomiast przy wysokiej rozdzielczości $5,98 \pm 5,29$ (próbkowanie systematyczne) i $5,47 \pm 4,37$ (próbkowanie losowe). Ocena liczby jąder komórkowych PCNA+ przy powiększeniu 20x i średniej rozdzielczości wyniosła 140 ± 80 (próbkowanie systematyczne) oraz 133 ± 75 (próbkowanie losowe), natomiast przy wysokiej rozdzielczości 140 ± 79 (próbkowanie systematyczne) i 135 ± 73 (próbkowanie losowe). Różnice powyższych wyników nie były istotne statystycznie (test Wilcoxona). Wnioski W diagnostyce histopatologicznej skanowanie preparatów przy powiększeniu 20-krotnym i średniej rozdzielczości jest optymalne do wykonania analizy morfometrycznej na podstawie podobrazów losowanych systematycznie (o ile nie dotyczy diagnostyki chorób rzadkich).

Cyklina C jako potencjalny czynnik warunkujący agresywność czerniaka złośliwego

Agnieszka Żuryń, Adrian Krajewski, Alina Grzanka

Collegium Medicum, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Toruń

Celem pracy była ocena roli białka cyklu komórkowego – cykliny C w warunkowaniu agresywności komórek czerniaka ludzkiego. Cyklina C wraz z kinazą cyklinozależną CDK3 reguluje przejście komórek z fazy G0 do fazy G1, a także bierze udział w procesie transkrypcji. Leczenie czerniaka, a w szczególności jego późnych stadiów wciąż charakteryzuje niska skuteczność. Zasadne jest zatem poszukiwanie nowych szlaków molekularnych, które w przyszłości mogą być celem terapii przeciwnowotworowej.

Model badawczy stanowiły komercyjnie dostępne, linie komórkowe czerniaka ludzkiego, charakteryzujące się zróżnicowanym stopniem agresywności. Po obniżeniu ekspresji cykliny C w komórkach oceniono proliferację, zdolność do migracji oraz reakcję na związki stosowane w leczeniu czerniaka. Zastosowane metody: transfekcja wektorem wirusa, test MTT, test migracji, test klonogenności, cytometria przepływowa, immunofluorescencja.

Test MTT oraz tworzenia kolonii wykazały, że linie komórkowe o obniżonej ekspresji cykliny C charakteryzuje nieco

większe tempo wzrostu. Test migracji wykazał, że pomimo zwiększenia proliferacji, komórki z niską ekspresją cykliny C charakteryzuje obniżona zdolność do migracji. Zaobserwowano również zmiany w ekspresji markerów związanych z przejściem epitelialno – mezenchymalnym (EMT), takich jak wimentyna czy fibronektyna, natomiast nie zaobserwowano zmiany w ekspresji czynnika transkrypcyjnego TWIST1, co sugeruje, że zmiany w ekspresji wyżej opisanych białek są regulowane przez inny czynnik transkrypcyjny. Test MTT oraz barwienie Aneksyną V wykazały, że komórki o obniżonej ekspresji cykliny C charakteryzują się zwiększoną opornością na działanie cytostatyków.

Otrzymane wyniki sugerują, że cyklina C, może stanowić swoisty przełącznik molekularny pomiędzy stanem, w którym komórki nowotworowe namnażają się, a momentem, kiedy nabywają zdolności do migracji poprzez macierz zewnątrzkomórkową i mogą spowodować powstanie przerzutu odległego.

Technika mikromanipulacji w badaniach nad starzeniem – replikacyjny model starzenia drożdży *Saccharomyces cerevisiae*

Karolina Stępień

Zakład Histologii i Embriologii, Kolegium Nauk Medycznych, Uniwersytet Rzeszowski, Rzeszów

Drożdże piekarnicze są uważane za ważny układ modelowy, za pomocą którego z powodzeniem można badać procesy starzenia. W modelu tzw. replikacyjnego starzenia drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, starzenie określone jest przez liczbę komórek potomnych jaką komórka „matka” jest w stanie wyprodukować w trakcie swojego życia. Parametr ten określany jest jako RLS. Dzięki asymetrii komórek możliwe jest łatwe odróżnienie komórki „matki” od komórki „córkę” pod mikroskopem optycznym. Dlatego też RLS mierzy się poprzez fizyczne usunięcie komórek potomnych wykorzystując w tym celu technikę mikromanipulacji. W rzeczywistości RLS jest parametrem obrazującym potencjał reprodukcyjny na poziomie pojedynczej komórki. Jest to klasyczne podejście

do replikacyjnego starzenia drożdży *S. cerevisiae*. Metoda ta została jednak udoskonalona. Dzięki temu istnieje także możliwość określenia parametrów czasowych tj. całkowity czas życia komórki (będący sumą czasu w jakim komórka pozostawała w stanie reprodukcyjnym oraz czasu jaki komórka przeżyła w fazie po-reprodukcyjnej), czas w jakim komórka pozostaje w stanie reprodukcyjnym oraz czas jaki komórka jest w stanie przeżyć w fazie po-reprodukcyjnej. Dodatkowo można także określić średni czas podwojenia. Dzięki takiemu podejściu model replikacyjnego starzenia drożdży *S. cerevisiae* z powodzeniem wykorzystywany jest do odwzorowywania procesów starzenia komórek aktywnych mitotycznie u wyższych organizmów.

Markery stresu oksydacyjnego w raku jasnokomórkowym nerki

Sabina Galiniak, Marek Biesiadecki

Instytut Nauk Medycznych, Kolegium Nauk Medycznych, Uniwersytet Rzeszowski

Rak jasnokomórkowy nerki (ang. clear cell renal cell carcinoma, ccRCC) stanowi 85% pierwotnych nowotworów nerki. Identyfikacja oksydacyjnych i nitrozacyjnych modyfikacji białek oraz określenie ich roli w ccRCC może być pomocne w opracowaniu ukierunkowanych podejść terapeutycznych. Celem badania było określenie poziomu stresu oksydacyjnego i nitrozacyjnego oraz jego roli w rozwoju i progresji ccRCC. Materiał i Metodyka: Badana grupa składała się z 48 pacjentów z ccRCC i 30 zdrowych osób, u których oznaczono stężenia markerów stresu oksydacyjnego w surowicy. Dodatkowo oceniano korelację pomiędzy stopniem zaawansowania nowotworu ocenianym według klasyfikacji TNM oraz wpływem obecności angioinwazji na poziom markerów stresu. Wyniki: Stężenie produktów Amadori, 3-nitrotyrozyny

i azotanów/azotynów były podwyższone, podczas gdy poziom grup tiolowych był obniżony w grupie osób z ccRCC w porównaniu do osób zdrowych ($p < 0,05$). Wraz ze wzrostem stopnia zaawansowania nowotworu zaobserwowano zwiększenie stężenia produktów utlenienia białek i 3-nitrotyrozyny oraz obniżenie stężenia grup tiolowych. U pacjentów z angioinwazją poziom azotanów/azotynów i dialdehydu malonowego był znacznie wyższy niż u pacjentów, u których nie występowała angioinwazja ($p < 0,01$). Stres oksydacyjny nasila się wraz ze stopniem zaawansowania nowotworu nerki ocenianym według TNM i w przypadku obecności angioinwazji. Wyniki wskazują na ogólnoustrojowy stres oksydacyjny w ccRCC, co sugeruje terapeutyczne zastosowanie przeciwutleniaczy.

Neurony zawierające kalretyninę (CR) w prążkowie grzbietowym (StD) nowonarodzonych samic i samców szczura linii WHP (wysoko preferujące alkohol)

Barbara Wasilewska¹, Elżbieta Łopieńska-Biernat², Agnieszka Bossowska¹, Urszula Mazur¹, Mariusz Majewski¹

¹ Katedra Fizjologii i Patofizjologii Człowieka, Wydział Lekarski, Collegium Medicum, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski, Olsztyn

² Katedra Biochemii, Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski, Olsztyn

Kalretynina (CR), jedno z białek regulujących wewnątrzkomórkową homeostazę jonów Ca^{2+} , odgrywa znaczącą rolę w procesach rozwojowych mózgowia, uczestnicząc w kontroli cyklu komórkowego, proliferacji i procesach różnicowania, między innymi interneuronów GABAergicznymi (kwas gamma-aminomasłowy) prążkowie grzbietowego (StD). Wiadomym jest, iż ekspozycja płodu na metabolity spożywane przez matkę alkoholu etylowego może wpływać na wzór ekspresji CR przez rozwijające się neurony, zakłócając w ten sposób homeostazę Ca^{2+} , zaburzając, np., zarówno liczbę, jak i wzór płodowej migracji komórek z przyśrodkowej wyniosłości zwojowej. Celem naszych badań było określenie liczebności i wzorów rozmieszczenia komórek CR-pozytywnych w StD potomstwa matek spożywających i niespożywających alkohol w trakcie ciąży.

Badania przeprowadzono na noworodkach szczura (P0) linii WHP (o wysokiej preferencji alkoholu, 5g/kg/24h i powyżej) oraz pochodzących z grupy kontrolnej (C; linia Wistar, brak spożycia alkoholu). Noworodki szczura linii WHP pochodziły zarówno od matek, które piły alkohol podczas ciąży (pWHP), jak i matek, które nie miały dostępu do alkoholu

(nWHP). Liczebność komórek CR-pozytywnych oceniano na 12- μm skrawkach StD barwionych immunofluorescencyjnie; ponadto za pomocą testu ELISA oznaczono stężenia CR w badanym ośrodku.

Nie zaobserwowano różnic w rozmieszczeniu i morfologii neuronów CR+ pomiędzy analizowanymi grupami i między płciami: neurony CR+ rozproszone były na terenie całego ośrodku, tylko w odcinku początkowym i końcowym StD obserwowano większe skupienie neuronów, zwłaszcza w jego grzbietowej części. Analiza gęstości numerycznej interneuronów CR+ w StD noworodków wykazała obecność istotnych statystycznie różnic pomiędzy grupą C a pWHP, oraz grupą nWHP a pWHP u samic. Test Elisa wykazał ilościowe różnice w zawartości CR w StD pomiędzy analizowanymi grupami w obrębie płci oraz pomiędzy płciami, za wyjątkiem nWHP.

Wyniki sugerują wpływ wysokiej dawki alkoholu na liczbę interneuronów CR+ nowonarodzonych szczurów.

Finansowanie. Praca została sfinansowana w części przez NCN, grant nr. DEC-2017/01/X/NZ5/01074.