



## Zmiany stężenia Fas, FasL oraz Bcl-2 w surowicy krwi związane z wiekiem u pacjentów z autoimmunologicznymi chorobami tarczycy

Age related changes of soluble Fas, Fas ligand and Bcl-2 in autoimmune thyroid diseases

Janusz Myśliwiec, Magdalena Okłota, Agnieszka Nikołajuk, Maria Górska

Klinika Endokrynologii, Diabetologii i Chorób Wewnętrznych Akademii Medycznej, Białystok

### Streszczenie

**Wstęp:** Apoptoza odgrywa kluczową rolę w regulacji mechanizmów immunologicznych w patogenezie autoimmunologicznych chorób tarczycy (AITD, *autoimmune thyroid disease*). Częstość występowania AITD zwiększa się z wiekiem. Celem niniejszej pracy jest porównanie stężeń Fas, FasL i Bcl-2 w chorobie Gravesa (GD, *Graves' disease*) i chorobie Hashimoto (HT, *Hashimoto thyroiditis*) w zależności od wieku badanych.

**Materiał i metody:** Badanie przeprowadzono u 64 osób podzielonych na 3 grupy: 1/25 pacjentów z GD w eutyreozy, leczonych tiamazolem; 2/27 pacjentów z HT w eutyreozy utrzymywanej lewotyroksyną; 3/12 zdrowych ochotników (grupa kontrolna) dobranych pod względem płci i wieku do grup 1–2. Stężenia Fas, FasL i Bcl-2 w surowicy określono metodą immunoenzymatyczną.

**Wyniki:** Stwierdzono dodatnią korelację pomiędzy sFas i wiekiem pacjentów z GD ( $r = 0,35$ ;  $p < 0,05$ ). Wykazano ujemną korelację sFasL z wiekiem u wszystkich badanych ( $r = -0,34$ ;  $p < 0,01$ ). Stwierdzono także ujemną korelację pomiędzy wiekiem i sBcl-2 ( $r = -0,42$ ;  $p < 0,05$ ).

**Wnioski:** Mechanizmy apoptozy obejmujące Fas/FasL i Bcl-2 mogą zależeć od wieku, co może tłumaczyć przynajmniej w części łagodniejszy przebieg GD u osób w podeszłym wieku i zwiększoną częstość występowania HT w tej grupie pacjentów.

(*Endokrynol Pol 2007; 58 (6): 492–495*)

**Słowa kluczowe:** sFas, sFasL, sBcl-2, choroba Gravesa, choroba Hashimoto, wiek

### Abstract

**Introduction:** Apoptosis plays a pivotal role in the regulation of immune mechanisms in the pathogenesis of autoimmune thyroid diseases (AITD). The prevalence of AITD increases with age. Purpose to compare soluble Fas, FasL and Bcl-2 in Graves' disease (GD) and Hashimoto thyroiditis (HT) in relation to the age of the studied patients.

**Material and methods:** 3 groups of subjects: 1/25 patients with GD in euthyrosis on methimazol 2/27 patients with ChH in euthyrosis on levothyroxine. 3/12 healthy volunteers age and sex-matched to group 1–2. The serum levels of Fas, FasL and Bcl-2 were determined by the ELISA kit.

**Results:** We found positive correlations between sFas and age in GD patients ( $r = 0.35$ ;  $p < 0.05$ ). In GD patients we found a negative correlation between sFasL and age in all studied patients with AITD ( $r = -0.34$ ;  $p < 0.01$ ). We also found a negative correlation between sBcl-2 and age in HT patients ( $r = -0.42$ ;  $p < 0.05$ ).

**Conclusions:** Fas/FasL and Bcl-2 signaling pathways seem to be age-related and may explain, at least in part, milder course of Graves' disease in elderly patients and increased prevalence of Hashimoto disease in this group of subjects.

(*Pol J Endocrinol 2007; 58 (6): 492–495*)

**Key words:** sFas, sFasL, sBcl-2, Graves' disease, Hashimoto's thyroiditis, age



Dr hab. med. Janusz Myśliwiec  
Klinika Endokrynologii, Diabetologii i Chorób Wewnętrznych  
Akademii Medycznej w Białymstoku  
ul. M. Skłodowskiej-Curie 24 A, 15-276 Białystok  
tel.: 085 746 82 39, faks: 085 744 76 11  
e-mail: mysjan@poczta.onet.pl

## Wstęp

Starzenie się ma związek z postępującym zaburzeniem czynności układu immunologicznego, co z jednej strony usposabia do zakażeń i nowotworów, z drugiej natomiast do rozwoju procesów autoimmunologicznych. Charakterystycznymi cechami układu immunologicznego u starszych osób jest zaburzona reaktywność komórek T, proliferacja poliklonalna komórek T i zwiększona produkcja przeciwciał [1, 2]. U osób w podeszłym wieku delecja autoreaktywnych subpopulacji limfocytów T jest niewystarczająca [3]. Wyniki badań doświadczalnych wskazują, że istotny wpływ na niewydolność eliminacji limfocytów ma upośledzona apoptoza zależna od Fas i jego ligandu (FasL) [4, 5]. Autoimmunologiczne choroby tarczycy (AITD, *autoimmune thyroid diseases*) występują u 1,5% populacji [6]. Zachorowalność na chorobę Gravesa (GD, *Graves' disease*) jest podobna w różnych grupach wiekowych, natomiast częstość choroby Hashimoto (HT, *Hashimoto thyroiditis*) zwiększa się z wiekiem i częściej występuje u kobiet [7]. Opublikowane ostatnio prace potwierdzają istotną rolę apoptozy zależnej od aktywacji Fas przez jego ligand w procesach cytotoxyczności, prowadzących do uszkodzenia tyreocytów w HT [8]. Istnieją także doniesienia na temat udziału procesów apoptozy w rozwoju GD [9]. Fas (CD95, APO-1) i FasL (CD95L, CD178) należą do nadrodziny czynnika martwicy nowotworu (TNF, *tumour necrosis factor*) i w postaci błonowej występują zarówno na aktywowanych komórkach T, jak i na tyreocytach pacjentów z AITD [10]. Mechanizm FasL/Fas jest regulowany na kilku poziomach: od kontroli ekspresji formy błonowej receptora Fas i jego odszczepiania, poprzez zahamowanie wewnątrzkomórkowych domen śmierci, do modulowania przez czynniki antyapoptotyczne, wśród których najważniejszą rolę odgrywa Bcl-2 [11]. Rola Bcl-2 w AITD pozostaje niejasna [12]. Tak więc, celem niniejszej pracy jest porównanie stężeń Fas, FasL i Bcl-2 w GD i HT w zależności od wieku badanych.

## Material i metody

Badanie przeprowadzono u 64 osób podzielonych na 3 grupy: 1/25 pacjentów z GD w eutyreozy, leczonych tiamazolem — 20 kobiet i 5 mężczyzn w średnim wieku  $42 \pm 14$  lat i wywiadem GD 7–25 miesięcy; 2/27 pacjentów z HT w eutyreozy utrzymywanej lewotyrosyną — 19 kobiet i 8 mężczyzn w średnim wieku  $44 \pm 20$  lat z wywiadem HT 12–134 miesięcy; 3/12 zdrowych ochotników (grupa kontrolna) dobranych pod względem płci i wieku do grup 1–2 — 8 kobiet i 4 mężczyzn w wieku  $42 \pm 18$  lat, u których w wywiadzie nie występowała GD, HT ani inne choroby autoimmunolo-

giczne. Kliniczne eutyreoza była potwierdzona oznaczeniem tyrotropiny i wolnej tyroksyny w surowicy krwi. Nie obserwowano cech ostrej infekcji w okresie 3 tygodni poprzedzających badanie.

Protokół badania został zatwierdzony przez Komisję Bioetyczną. Surowice przechowywane były do czasu oznaczeń w temperaturze  $-70^{\circ}\text{C}$ . Stężenia Fas, FasL i Bcl-2 określono przy zastosowaniu metody immunoenzymatycznej, używając przygotowanych zestawów: Fas (Quantikine kit, R&D, Mineapolis, Stany Zjednoczone; czułość 20 pg/ml; *intra-assay precision* [CV] 3,8%) FasL (Quantikine kit, R&D, Mineapolis, Stany Zjednoczone; czułość 2,66 pg/ml; CV 4,7%) i Bcl-2 (Bender Medsystems, Wiena, Austria; czułość 0,5 ng/ml; CV 8,6%). Do analizy statystycznej posłużono się testem Manna-Whitney'a, natomiast w celu określenia zależności pomiędzy zmiennymi — testem Spearmana, używając programu Statistica 6.0 dla Windows XP (StaSoft, Tulsa, Stany Zjednoczone).

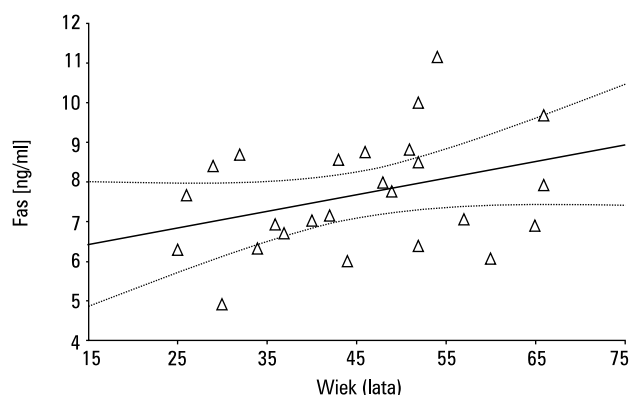
## Wyniki

Stężenia Fas, FasL i Bcl-2 w surowicy krwi przedstawiono w ng/ml w postaci median i zakresów kwartylowych (ryc. 1–3). Stężenie sFas nie różniło się pomiędzy grupami z GD 7,5 (5,0–8,4) i HT 7,8 (5,4–8,8), przy czym stężenie sFas u pacjentów z HT było istotnie wyższe w porównaniu z grupą kontrolną 6,6 (4,4–8,0) ( $p < 0,05$ ). Surowicze stężenie sFasL nie różniło się istotnie pomiędzy grupą z GD 9,6 (8,4–11,2), HT 9,9 (8,8–10,6) i kontrolą 9,7 (8,8–10,9). Wartości sBcl-2 w grupie HT 30,2 (13,6–43,4) były istotnie wyższe zarówno w stosunku do pacjentów z GD 8,9 (6,8–18,0) ( $p < 0,05$ ), jak i do grupy kontrolnej 8,2 (5,2–18,7) ( $p < 0,05$ ).

Zależności Fas, FasL i Bcl-2 w surowicy krwi od wieku pacjentów przedstawiono na rycinach 1–3. Stwierdzono dodatnią korelację między sFas i wiekiem pacjentów z GD ( $r = 0,35$ ;  $p < 0,05$ ). Wykazano ujemną korelację sFasL z wiekiem u pacjentów z GD i HT ( $r = -0,34$ ;  $p < 0,01$ ). W grupie pacjentów z HT stwierdzono ujemną korelację pomiędzy wiekiem i sBcl-2 ( $r = -0,42$ ;  $p < 0,05$ ).

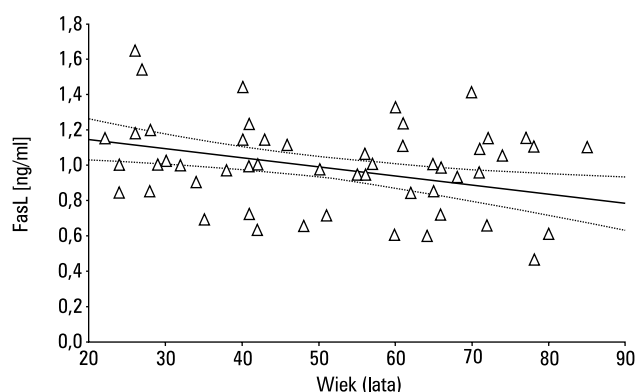
## Dyskusja

Piśmiennictwo z ostatnich lat wskazuje, że zarówno u zwierząt, jak i u ludzi procesy apoptozy ulegają spowolnieniu wraz z wiekiem, prowadząc do gromadzenia autoreaktywnych limfocytów T i upośledzenia tolerancji wobec własnych antygenów [13, 14]. Jedną z głównych przyczyn zaburzeń eliminacji komórek immunokompetentnych jest upośledzenie delecji, w której pośredniczy układ FasL/Fas [15]. W modelu doświadczalnym u myszy wykazano, że przywrócenie genu Fas



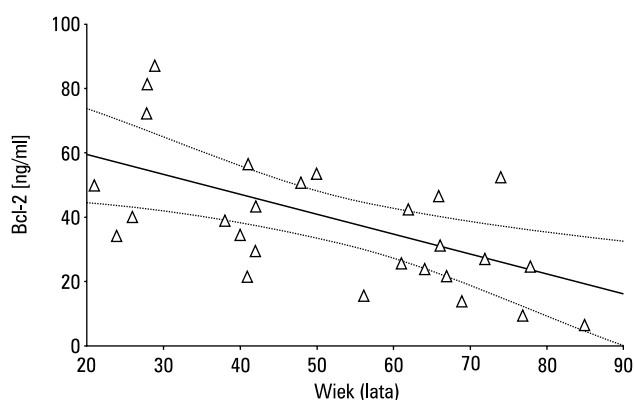
**Rycina 1.** Korelacja między Fas i wiekiem pacjentów z GD ( $r = 0,35$ ;  $p < 0,05$ )

**Figure 1.** Correlation between Fas and age of GD patients ( $r = 0,35$ ;  $p < 0,05$ )



**Rycina 2.** Korelacja między FasL i wiekiem pacjentów z GD i HT ( $r = -0,34$ ;  $p < 0,01$ )

**Figure 2.** Correlation between FasL age of the patients with GD and HT ( $r = -0,34$ ;  $p < 0,01$ )



**Rycina 3.** Korelacja między Bcl-2 i wiekiem pacjentów z HT ( $r = -0,42$ ;  $p < 0,05$ )

**Figure 3.** Correlation between Bcl-2 and age of HT patients ( $r = -0,42$ ;  $p < 0,05$ )

poprzez transfekcję zapobiega starzeniu się limfocytów T i przywraca ich prawidłową reaktywność [16]. Obecność receptora Fas stwierdza się zarówno na błonach komórkowych tyreocytów, jak i limfocytów pacjentów z autoimmunologicznymi chorobami tarczycy, a interakcja Fas/FasL istotnie wpływa na nasilenie uszkodzenia komórek pęcherzykowych u pacjentów z HT i eliminację limfocytów T [12]. Krążące receptory Fas uważane za czynniki hamujące apoptozę poprzez wiązanie FasL mogą pochodzić z form błonowych poprzez proteolityczne odszczepienie, a także mogą być bezpośrednim produktem transkrypcji mRNA [17].

Dane uzyskane w niniejszej pracy, wskazujące na zwiększone stężenie sFas u pacjentów z HT mogą odzwierciedlać nasiloną ekspresję Fas i apoptozę, w której pośredniczy układ Fas/FasL, doprowadzając w efekcie do nieodwracalnego uszkodzenia tkanki tarczycy z następczym zanikiem i włóknieniem. Wykazano, że związana z Fas apoptoza w HT w większym stopniu dotyczy tyreocytów niż naciekających limfocytów i najprawdopodobniej wiąże się to ze wzmożoną ekspresją Fas [5]. W swojej poprzedniej pracy autorzy niniejszego artykułu wykazali dodatnią korelację pomiędzy stężeniem sFas i przeciwiał przeciwko peroksydazie tarczycowej, posiadających właściwości cytotoksyczne [18]. W niniejszej pracy u pacjentów z GD obserwowano dodatnią korelację pomiędzy sFas i wiekiem badanych. Ponadto stwierdzono ujemną korelację pomiędzy FasL i wiekiem badanych zarówno wśród pacjentów z GD, jak i HT. Podobne zmiany stężenia Fas związane z wiekiem obserwowali Zhou i wsp. [19]. Zmniejszone stężenie sFasL może być pochodną związanej z wiekiem mniej nasilonej ekspresji form błonowych komórek immunokompetentnych, co stwierdzono zarówno u myszy, jak i ludzi [20, 21]. Biorąc pod uwagę, że sFas uważa się za czynnik wiążący FasL i przez to hamujący proces apoptozy tyreocytów, to stwierdzone w badaniach własnych zależności mogą tłumaczyć, przynajmniej w pewnym stopniu, wolniejszy rozwój procesu autoimmunologicznego u osób starszych i w następstwie łagodniejszy przebieg GD i HT w tej grupie pacjentów.

Jako czynnik hamujący apoptozę Bcl-2 odgrywa istotną rolę w regulacji apoptozy w AITD [22]. Pomimo wielu badań nad błonowymi Bcl-2 brakuje danych na temat rozpuszczalnych form tego białka. Stwierdzone w niniejszej pracy zwiększenie stężenia sBcl-2 u pacjentów z HT może być efektem zwiększonej ekspresji błonowego Bcl-2 jako czynnika przeciwdziałającego nadmiernej apoptozie, w której pośredniczy układ FasL/Fas. Zmniejszoną ekspresję Bcl-2 na limfocytach T związaną z wiekiem wykazali Aggarwal i wsp. [23]. Redukcja stężenia Bcl-2 wraz z wiekiem u chorych z HT może potwierdzać zmniejszenie intensywności procesu apopto-

toży i w następstwie także czynników antyapoptotycznych w ramach odpowiedzi autoimmunologicznej.

Podsumowując, na podstawie uzyskanych danych można stwierdzić, że zwiększająca się z wiekiem częstość występowania HT może być w znacznym stopniu związana z postępującą niewydolnością mechanizmów apoptozy uwarunkowanych interakcją Fas z FasL w eliminacji autoreaktywnych komórek immunokompetentnych. Obserwowane w GD związane z wiekiem zmiany surowiczych stężeń Fas, FasL i Bcl-2 wydają się odzwierciedlać mniejsze nasilenie procesu autoimmunologicznego, co może tłumaczyć przynajmniej w części łagodniejszy przebieg GD u osób w podeszłym wieku.

### Piśmiennictwo

- Gupta S. Molecular mechanisms of apoptosis in the cells of the immune system in human aging. *Immunol Rev* 2005; 205: 114–129.
- Hsu HC, Scott DK, Mountz JD. Impaired apoptosis and immune senescence — cause or effect? *Immunol Rev* 2005; 205: 130–146.
- Kobayashi M, Yasui N, Ishimaru N i wsp. Development of autoimmune arthritis with aging via bystander T cell activation in the mouse model of Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 3974–3984.
- Roths JB, Murphy ED, Eicher EM. A new mutation, *gld*, that produces lymphoproliferation and autoimmunity in C3H/HeJ mice. *J Exp Med* 1984; 159: 1–20.
- Radvanyi LG, Raju LG, Spaner D i wsp. Interleukin-2 reverses the defect in activation-induced apoptosis in T cells from autoimmune *lpr* mice. *Cell Immunol* 1998; 183: 1–12.
- Broadley SA, Deans J, Sawcer J i wsp. Autoimmune disease in first — degree relatives of patients with multiple sclerosis. *Brain* 2000; 123: 1102–1111.
- Laurberg P, Jorgensen T, Perrild H i wsp. The Danish investigation on iodine intake and thyroid disease, DanThyr: status and perspectives. *Eur J Endocrinol* 2006; 155: 219–228.
- Stassi G, Zeuner A, Di Liberto D i wsp. Fas — FasL in Hashimoto's thyroiditis. *J Clin Immunol* 2001; 21: 19–23.
- Hiromatsu Y, Hoshino T, Yagita H. Functional Fas ligand expression in thyrocytes from patients with Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 2896–2899.
- Hammond LJ, Palazzo FF, Shattoc M i wsp. Thyrocyte targets and effectors of autoimmunity: a role for death receptor? *Thyroid* 2001; 11: 919–927.
- Salmaso C, Bagnasco M, Pesce G i wsp. Regulation of apoptosis in endocrine autoimmunity: insight from Hashimoto's thyroiditis and Graves' disease. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 966: 496–501.
- Hiromatsu Y, Kakau H, Mukai T i wsp. Immunohistochemical analysis of Bcl-2, Bax and Bak expression in thyroid glands from patients with Graves' disease. *Endocrinol J* 2004; 51: 399–405.
- Bryl E, Vallejo AN, Weyend CM i wsp. Down-regulation of CD28 expression by TNF-alpha. *J Immunol* 2001; 167: 3231–3238.
- Jiang J, Anaraki F, Blank KJ i wsp. Cutting edge: T cells from aged mice are resistant to depletion early during virus infection. *J Immunol* 2003; 171: 3353–3347.
- Zhou T, Edwards CK, Mountz JD. Prevention of age related T-cell apoptosis defect in CD2-fas-transgenic mice. *J Exp Med* 1995; 182: 129–137.
- Hsu HC, Zhou T, Yang PA i wsp. Increased acute phase response and renal amyloidosis in aged CD-2-fas-transgenic mice. *J Immunol* 1997; 158: 5988–5996.
- Hiromatsu Y, Bednarczuk T, Soyejima E i wsp. Increased serum soluble Fas in patients with Graves' disease. *Thyroid* 1999; 9: 341–345.
- Myśliwiec J, Okłota M, Nikolajuk A i wsp. Soluble Fas, Fas ligand and Bcl-2 in autoimmune thyroid diseases: relation to humoral immune response markers. *Adv Med Sc* 2006; 61: 119–122.
- Zhou T, Mountz JD, Kimberly RP. Immunobiology of tumor necrosis factor receptor superfamily. *Immunol Res* 2002; 26: 323–336.
- Hsu HC, Shi J, Yang P i wsp. Activated CD8 (+) T cells from aged mice exhibit decreased activation-induced cell death. *Mech Ageing Dev* 2001; 122: 1663–1684.
- Pinti M, Troiano L, Nasi M i wsp. Balanced regulation of mRNA production for Fas and Fas ligand in lymphocytes from centenarians: how the immune system starts its second century. *Circulation* 2004; 110: 3108–3114.
- Mitsiades N, Poulaki V, Kotoula V i wsp. Fas/Fas ligand up-regulation and Bcl-2 down-regulation may be significant in the pathogenesis of Hashimoto's thyroiditis. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 2199–2203.
- Aggarwal S, Gupta S. Increased apoptosis of T cell subsets in aging humans: altered expression of Fas (CD95), Fas ligand, Bcl-2, and Bax. *J Immunol* 1998; 160: 1627–1637.