



Analiza ekspresji cząsteczek Fas, FasL oraz kaspazy 8 w tkance gruczołu tarczowego u młodych pacjentów z chorobami immunologicznymi i nieimmunologicznymi gruczołu tarczowego

Analysis of Fas, FasL and Caspase-8 expression in thyroid gland in young patients with immune and non-immune thyroid diseases

Artur Bossowski¹, Barbara Czarnocka², Anna Stasiak-Barmuta³, Krzysztof Bardadin⁴, Mirosława Urban¹, Jacek Dadan⁵

¹II Klinika Chorób Dzieci, Akademia Medyczna, Białystok

²Zakład Biochemii Klinicznej i Biologii Molekularnej, CMKP, Warszawa

³Zakład Alergologii Dziecięcej, Akademia Medyczna, Białystok

⁴Zakład Anatomii Patologicznej, CMKP, Warszawa

⁵I Klinika Chirurgii Ogólnej, Akademia Medyczna, Białystok

Streszczenie

Wstęp: Apoptoza to programowe obumieranie komórki. Jest to mechanizm regulacyjny pozwalający na usunięcie wytworzonych w nadmiarze i niepotrzebnych w danej chwili komórek. Zaburzenia w procesie apoptozy mogą uczestniczyć w rozwoju schorzeń autoimmunologicznych tarczycy.

Celem pracy była ocena ekspresji cząsteczek Fas/FasL i kaspazy 8 w tkance gruczołu tarczowego u pacjentów z chorobą Gravesa-Basedowa (GB, *Graves' disease*), wolem guzkowym nietoksycznym (NTNG, *non-toxic nodular goiter*) oraz zapaleniem tarczycy typu Hashimoto (HT, *Hashimoto's thyroiditis*).

Materiał i metody: Do kryteriów kwalifikacji pacjentów z chorobą GB należą: wole II°, obecność oftalmopatii, przeciwciała przeciw receptorom TSH (TRAb, *anti-TSH receptor antibodies*) wyższe niż 5 j./l, dodatnie stężenia przeciwciał anty-TPO i anty-TG oraz utrzymujące się ponad 2–3 miesiące od początku rozpoznania stężenie hormonu tyreotropowego (TSH, *thyroid stimulating hormone*) niższe niż 0,45 μmJ/ml. Wyizolowane tyreocyty znakowano metodą pośrednią: początkowo komórki łączono z przeciwciałami monoklonalnymi mysimi anty-TPO, następnie z przeciwciałami króliczymi IgG (Fab')₂ anty-mysimi znakowanymi izotiocyanidem fluoresceiny (FITC, *fluorescein isothiocyanate*). Do tak uzyskanej zawiesiny komórkowej podawano przeciwciała monoklonalne anty-Fas i anty-FasL znakowane PE (*Phycoerythrin*). Odczytu dokonano w cytometrze przepływowym (Coulter EPICS XL). Analizę ekspresji Fas/FasL uzupełniono badaniami *Western Blot* i immunohistochemicznym z wizualizacją DAB-em i barwieniem hematoksyliną Mayera. Oznaczenie ekspresji kaspazy 8 w komórkach pęcherzykowych tarczycy przeprowadzono za pomocą metody *Western Blot*.

Wyniki: W analizie ekspresji molekuł apoptozy Fas oraz FasL na powierzchni komórek tarczycy wykazano jej istotnie wyższy odsetek u pacjentów z zapaleniem tarczycy typu Hashimoto (HT, *Hashimoto's thyroiditis*) (ok. 38%, 26%) w porównaniu z pacjentami z chorobą Gravesa-Basedowa (18%, 14%). U pacjentów z HT wykazano znacznie niższy odsetek limfocytów napływających do gruczołu tarczowego z ekspresją molekuł Fas (13%) i FasL (22%) w porównaniu z grupą osób z chorobą GB (odpowiednio: 33%, 43%). W identyfikacji białek proapoptotycznych FasL i Fas stwierdzono znamiennej ich ekspresję w komórkach tarczycy u pacjentów z chorobą GB (++) i HT (+++, +++) w porównaniu z ekspresją w grupie osób z NTNG (0/+; 0/+). W analizie ekspresji kaspazy 8 w badanych grupach wykazano jej obecność u pacjentów ze schorzeniami autoimmunologicznymi tarczycy w prążku p55 (kDa) za pomocą metody *Western Blot*.



Dr hab. med. Artur Bossowski
II Klinika Chorób Dzieci, Akademia Medyczna
ul. J. Waszyngtona 17, 15-274 Białystok
tel.: 085 745 07 37, faks: 085 745 07 30
e-mail: abossowski@hotmail.com

Praca prezentowana na XVI Symposium PTED w Białowieży,
28-30.09.2006 oraz Zjeździe Europejskiego Towarzystwa
Endokrynologii Dziecięcej (ESPE), 30.06-3.07.2006, Rotterdam,
Holandia

Wnioski: Podsumowując, można stwierdzić, że przewaga ekspresji markerów proapoptotycznych w komórkach pęcherzykowych tarczycy w zapaleniu Hashimoto może świadczyć o wzroście eliminacji tych komórek i w konsekwencji wytworzeniu niedoczynności tarczycy. Odmienna sytuacja ma miejsce w chorobie GB, gdzie mniejsza aktywność apoptozy i tym samym przewaga proliferacji nad eliminacją komórek tarczycy w rezultacie prowadzi do rozwoju wola.

(*Endokrynol Pol 2007; 58 (4): 303–313*)

Słowa kluczowe: choroba Gravesa-Basedowa, Fas, FasL, apoptoza, kaspaza 8

Abstract

Introduction: Apoptosis, programmed cell death is a regulating mechanism enabling the removal of superabundantly produced and unnecessary at the certain moment cells. Disturbances of the apoptosis regulation contribute to the pathogenesis of many diseases, including autoimmune thyroid disorders.

The aim of this study was to estimate expression of proapoptotic Fas/FasL and caspase-8 in thyroid tissues in patients with Graves' disease (GD), non-toxic nodular goiter (NTNG) and Hashimoto's thyroiditis (HT).

Material and methods: Inclusion criteria of Graves' patients were: large goiter, ophthalmopathy, TRAb > 5 U/L, positive titre of anti-TPO and anti-TG antibodies and concentration of TSH < 0.45 μ IU/mL for more the 2–3 months from an onset of the disease. Isolated thyrocytes were identified by indirect method: in the first stage mouse monoclonal antibodies (mAbs) anti-TPO were bound to rabbit anti-mouse antibodies IgG (Fab')₂ labeled FITC. To obtained cellular suspension mAbs directed against apoptotic Fas/FasL molecules labeled with PE (Phycoerythrin) was added. All investigations were performed on Coulter EPICS XL flow cytometer. Detection of apoptotic proteins was confirmed by Western Blot and immunohistochemistry methods using mAbs in DAB chromogene visuality and marked by Mayer's haematoxylin. Evaluation of caspase-8 expression in thyroid follicular cells was performed by Western Blot test.

Results: The analysis of Fas and FasL expression on surface of thyroid follicular cells was higher in patients with Hashimoto's thyroiditis (38%, 26%) in comparison with patients with Graves' disease (18%, 14%). In case of patients with Hashimoto's thyroiditis significantly lower percentage of thyroid tissue infiltrating immune Fas+ (13%) and FasL+ (22%) T cells in comparison with Graves' patients (33%, 43% respectively) was observed. Identification of proapoptotic Fas and FasL molecules in the thyroid follicular cells revealed higher expression of both proteins in patients with GD (+++,++) and HT (+++,+++, respectively) in comparison with NTNG patients (+/0; +/0). Caspase-8 expression was detected in band 55 kDa using Western Blot test in patients with thyroid autoimmune diseases.

Conclusions: We conclude that alteration in the expression of proapoptotic proteins in thyroid follicular cells may play a role in pathogenesis of thyroid autoimmune disorders. In addition, suppression of apoptosis in Graves' disease led to increased proliferation of thyroid follicular cells which is responsible for goiter formation.

(*Pol J Endocrinol 2007; 58 (4): 303–313*)

Key words: Graves' disease, Fas, FasL, apoptosis, caspase-8

Wstęp

Apoptoza, czyli programowana śmierć komórki, pełni istotną rolę w utrzymywaniu homeostazy tkankowej. Jest to proces aktywny, przebiegający z udziałem metabolizmu komórkowego, obejmujący aktywację genów i syntezę białek. Apoptoza jako mechanizm regulatorowy pozwala na usunięcie wytworzonych w nadmiarze i niepotrzebnych w danej chwili komórek, na przykład autoreaktywnych limfocytów. Brak możliwości eliminowania z systemu komórek reagujących z własnym antygenem i w efekcie ich nadmierna proliferacja prowadzi do rozwoju chorób autoimmunologicznych, w tym chorób tarczycy [1].

Aktywacja kompleksu Fas/FasL (przez błonowe białka należące do nadrodziny receptorów TNFR) inicjuje wewnątrzkomórkowy szlak przemian. Cytoplazmatyczna część aktywowanego receptora Fas wiąże białko adaptacyjne, na przykład białko FADD (FADD *Fas-associated death domain protein*). Powstały w ten sposób

kompleks Fas-FADD aktywuje kaspazę 8 (FLICE, *FADD-like interleukin 1 β -converting enzyme*), która następnie inicjuje proteazy cysteinowe kompleksu kaspazy-3, które uważa się za efektorowe w apoptozie [2, 3]. Ten cykl przemian odgrywa kluczową rolę w eliminacji: obwodowych limfocytów T, komórek zapalnych i nowotworowych przy udziale komórek cytotoksycznych, CD8 oraz NK. Przedstawiona powyżej zewnętrzna droga aktywacji apoptozy stymuluje również reakcje na drodze wewnętrznej przy udziale kaspazy 8, która rozcina zawartą w cytoplazmie cząsteczkę Bid przenoszącą sygnał aktywacji do mitochondriów, w efekcie czego dochodzi do uwolnienia cytochromu c. To działanie powoduje stymulację czynnika aktywacji apoptozy 1 (APAF-1, *apoptotic protease activating factor 1*) i aktywację kaspazy 9 [4–6]. W dalszej części kaskady przemian obie drogi zewnętrznej i wewnętrznej łączą się we wspólnym punkcie, jakim jest kaspaza 3. Tak generowany sygnał apoptozy umożliwia dalsze rozprzestrzenianie się cyklu przemian

prowadzących do proteolitycznego rozpadu jądra i cytoplazmatycznych substratów kończących się w rezultacie śmiercią komórki. Z drugiej strony na uwagę zasługują cząsteczki blokujące sygnał apoptozy w postaci FAP-1, (*Fas associated phosphatase-1*) hamującej przekazywanie sygnałów z Fas na domeny regulatorowe, jak również *FLICE-like inhibitory protein* (FLIP), które zapobiegają tworzeniu kompleksu Fas-FADD-FLICE tak zwanych białek adaptacyjnych będących dalszym etapem przebiegu fizjologicznej śmierci komórek [7]. Natomiast w końcowej fazie regulatorami ograniczenia programowanej śmierci komórek są inhibitorowe białka apoptozy (IAP, *inhibitor of apoptosis proteins*) oraz cząsteczka Bcl-2 [7, 8].

W kontekście autoimmunologii tarczycy, zauważa się wzrastający wskaźnik apoptozy zależnej od Fas-Fas L oraz aktywacji kaspazy 8 [3]. Według badań morfologii błony komórkowej system Fas-Fas L działa zarówno w komórkach immunologicznie kompetentnych, jak i w komórkach docelowych (tyreocytach) [9]. Generuje jednak odmienne skutki w odpowiedzi autoimmunologicznej w zależności od rodzaju komórki. Zmiany ekspresji FasL na limfocytach wewnątrztrzczycowych wydają się korelować ze stopniem uszkodzenia komórek tarczycy, co wykazano w licznych badaniach eksperymentalnych [10]. Udowodniono natomiast związek nadekspresji FasL na tyreocytach z zapobieganiem autoimmunologicznemu zapaleniu tarczycy. Zatem udział FasL, zarówno w apoptozie tyreocytów, jak i komórek T wskazuje na jego rolę w patogenezie chorób autoimmunologicznych tarczycy [11]. Kawakami i wsp. [12] potwierdzili taką zależność zachodzącą między apoptozą tyreocytów a procesami immunologicznymi w tkance gruczołu tarczowego. Autorzy ci podkreślają, że aktywowana przez Fas apoptoza tyreocytów jest modulowana przez przeciwciała skierowane przeciwko autoantygenom tarczycy oraz cytokiny. Fakt ten wskazuje, że kontrolowanie przebiegu apoptozy komórek może stać się nowym celem terapeutycznym w leczeniu chorób autoimmunologicznych.

Celem badań była ocena ekspresji Fas, FasL i kaspazy 8 w tkance gruczołu tarczowego młodych pacjentów z chorobami immunologicznymi i nieimmunologicznymi gruczołu tarczowego.

Material i metody

Badania przeprowadzono w grupie 45 młodocianych pacjentów (9 chłopców i 36 dziewcząt) w wieku 8–21 lat z chorobą Gravesa-Basedowa (GB, *Graves' disease*) ($n = 15$, śr. wieku 14 ± 6 lat), zapaleniem tarczycy typu Hashimoto (HT, *Hashimoto's thyroiditis*) ($n = 15$, śr. wieku $15,3 \pm 3$ lat) oraz wolem guzkowym nietoksycznym (NTNG, *non-toxic nodular goiter*) ($n = 15$, śr. wieku 14 ± 3 lat)

hospitalizowanych w II Klinice Chorób Dzieci AM w Białymstoku oraz Klinice Endokrynologii i Diabetologii Wieków Rozwojowego AM w Poznaniu, a poddanych zabiegom totalnej lub subtotalnej tyreoidektomii w I Klinice Chirurgii Ogólnej AMB oraz Klinice Chirurgii Dziecięcej AMP.

Rozpoznanie poszczególnych jednostek ustalono na podstawie wyników badań klinicznych, laboratoryjnych, ultrasonograficznych gruczołu tarczowego, a także dodatkowo — za pomocą biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej w zapaleniu Hashimoto i wolem guzkowym, którą przeprowadzono w Zakładzie Anatomii Patologicznej AMB. W leczeniu nadczynności tarczycy stosowano terapię metizolem początkowo w dawce 0,5–1 mg/kg/dobę łącznie z propranololem w dawce 0,5–1 mg/kg m.c./dobę. Dalsze zmniejszenie dawki (przeciętnie do dawki 10–15 mg/d.) metizolu i doprowadzenie do eutyreozы przed zabiegiem operacyjnym uzależniano od parametrów kliniczno-biochemicznych. Ponadto część pacjentów otrzymywała L-tyroksynę w dawkach 25–75 mg/dobę. Pacjenci z zapaleniem tarczycy typu Hashimoto otrzymywali wyłącznie L-tyroksynę (śr. 75 ± 25 mg/d.) w okresie 3–12 miesięcy (śr. 6 miesięcy) od rozpoznania.

Funkcję gruczołu tarczowego u pacjentów z chorobą Gravesa-Basedowa oceniano w chwili rozpoznania i przed zabiegiem operacyjnym na podstawie badania hormonalnego, które przeprowadzono łącznie z oznaczeniem stężenia przeciwciał przeciwtrzcycowych (przeciwciała przeciw peroksydazie tarczycowej [anty-TPO, *antithyroid peroxidase antibody*], przeciwciała przeciw tyreoglobulinie [anty-TG, *antithyroglobulin antibody*], przeciwciała przeciw receptorom TSH [TRAb, *anti-TSH receptor antibodies*]). W przypadku pacjentów z zapaleniem tarczycy typu Hashimoto powyższą ocenę wykonano równolegle do biopsji gruczołu tarczowego. W materiale tkankowym pacjentów z chorobami autoimmunologicznymi tarczycy przeprowadzono identyfikację ekspresji wybranych markerów apoptozy Fas/FasL oraz kaspazy 8.

Niniejsze badania uzyskały zgodę lokalnej Komisji do Spraw Etyki Nadzoru nad Badaniami na Ludziach i Zwierzętach przy Akademii Medycznej w Białymstoku.

Metoda oceny stężenia przeciwciał przeciwtrzcycowych oraz stężenia hormonów tarczycy

Krew do badań pobierano na czczo w godzinach rannych z żyły odłokciowej. Odwirowywano w wirówce przez 10 minut przy 2000 obrotów na minutę. Do chwili zebrania odpowiedniej ilości surowic do oznaczeń, przechowywano je w temperaturze -20° . W badanych surowicach oznaczano przeciwciała antytyreoperoksydazowe (anty-TPO) i antytyreoglobulinowe (anty-TG) za pomocą testu immunodiagnostycznego typu Varellisa (*Variable Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) firmy

Pharmacia Upjohn Diagnostics GmbH & Co.KG.Freiburg, Niemcy. Z kolei ocenę przeciwciał przeciwreceptorowych (TRAb) w surowicy przeprowadzono metodą radioreceptorową za pomocą zestawów TRAK-human (Brahms Diagnostica GmbH, Berlin, Niemcy), w których wartość niższa niż 1 oznaczała wynik ujemny, 1,0–1,5 — szarą strefę, natomiast wartości wyższe niż 1,5 j./l uznano za dodatnie.

Oznaczenie stężenia wolnej tyroksyny (fT4, free thyroxine), wolnej trójiodotyroniny (fT3, free triiodothyronine) oraz hormonu tyreotropowego (TSH, thyroxine stimulating hormone) w surowicy określono za pomocą analizatora mini VIDAS firmy Bio Merieux, łączącego metodę immunoenzymatyczną z końcowym pomiarem fluorescencji *Enzyme Linked Fluorescent Assay* (ELFA). Wartości prawidłowe fT4 — 0,71–1,55 (ng/dl), fT3 — 2,6–5,4 (ng/dl) i TSH — 0,32–5,0 (mj/ml).

Metoda Western Blot

Zamrożone tkanki homogenizowano za pomocą homogenizatora nożowego w 5-krotnym nadmiarze buforu (0,25 M sacharoza, 0,02 M Tris, 0,001 M EDTA o pH 7,4) zawierającym inhibitory proteaz (PMSF — 50 μ M, aprotynina — 1 μ g/ml, leupeptyna — 1 μ g/ml, pepstatyna — 1 μ g/ml). W celu odwirowania niehomogenizowanych resztek tkanki homogenaty wirowano 15 minut, z przyspieszeniem 1000 \times g, w temperaturze 4°C. Osad odrzucono, natomiast nadsącz przeniesiono do nowych próbek i wirowano godzinę, z siłą 100 000 \times g, w temperaturze 4°C. Nadsącz zlano, a osad (frakcja mikrosomalna) zawieszono w 20 mM Tris zawierającym fluorek fenylometylosulfonowy (PMSF, *phenylmethylsulfonyl fluoride*) o stężeniu 50 μ M. Próbkę przechowywano w temperaturze –80°C. Osad 75 mg białka z frakcji mikrosomalnej rozdzielono metodą SDS-PAGE (12-procentowy żel poliakrylamidowy) i elektrotransferowano do błony polifluorku winylidenu (PVDF, *polyvinylidene difluoride*) (Bio-Rad). Błonę wysycano przez noc w temperaturze 4°C, w roztworze buforu fosforanowego (PBS, *phosphate buffered saline*) z dodatkiem 5-procentowego odtłuszczonego mleka. Następnie inkubowano ją 24 godziny w temperaturze 8°C z 1-rzędowymi przeciwciałami monoklonalnymi (BD *Biosciences Pharmingen*) anty-FasL, anty-kaspaza 8 w rozcieńczeniu sugerowanym przez firmę. Po 3-krotnym płukaniu w myjącym roztworze buforowym (PBST, *phosphate buffered saline tween-20*) (po 10 min) błonę inkubowano z drugim przeciwciałem anty-mysim znakowanym peroksydazą chrzanową (HRP, *horseradish peroxidase*) godzinę w temperaturze pokojowej. Po ponownym 3-krotnym płukaniu PBST reakcję wizualizowano DAB-em. Równoległe do każdego oznaczenia przeprowadzono kontrolę ujemną oraz identyfikację β -aktyny z zastosowaniem przeciwciał monoklonalnych anty- β actin (Sigma).

Metoda immunohistochemii

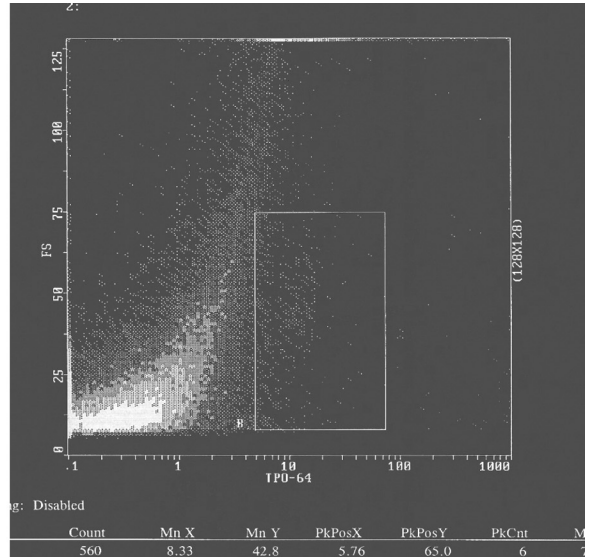
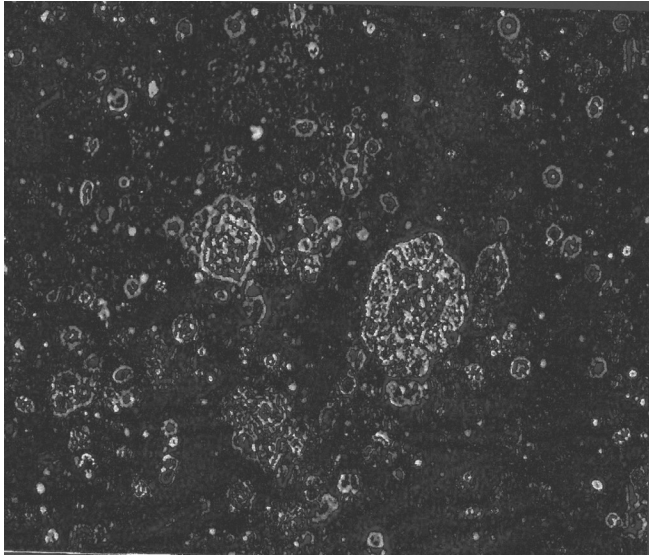
Tkanki rozmrożone w temperaturze pokojowej, po wypłukaniu nadmiaru podłoża w wodzie destylowanej, utrwalano przez 24 godziny w 4-procentowej buforowanej formalinie. Następnie przeprowadzono odwodnienie tkanek w roztworach alkoholu o różnym stężeniu, acetonie, ksylenie oraz zatapiano w parafinie w sposób typowy. Skrawki 4 μ m grubości krojono na silanizowane szkiełka, które następnie poddano suszeniu w temperaturze 60° przez noc. Po odparafinowaniu i uwodnieniu preparatów w ksylenie i alkoholu wykonywano odkrywanie antygeny w buforze cytrynowym o pH 6,0 przez 5 minut w łaźni wodnej w temperaturze 95–99°. W następnym etapie wykonano blokowanie endogennej peroksydazy 3% H₂O₂. W preparatach skrojonych seryjnie przeprowadzano inkubację z monoklonalnymi przeciwciałami: Fas, FasL (firmy BD) w temperaturze +4°C w komorze wilgotnej przez noc, następnie biotynylowym wtórnym przeciwciałem z KIT LSAB+ oraz streptawidyną znakowaną peroksydazą chrzanową. Wizualizacji dokonano chromogenem DAB, po czym następowało podbarwienie jąder hematoksyliną Mayera. Równoległe do każdego oznaczenia barwiono dodatkowy preparat z pominięciem pierwotnego przeciwciała jako kontrolę ujemną.

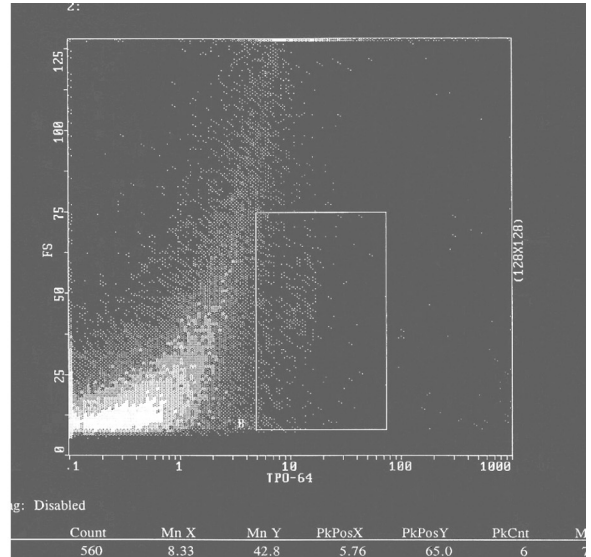
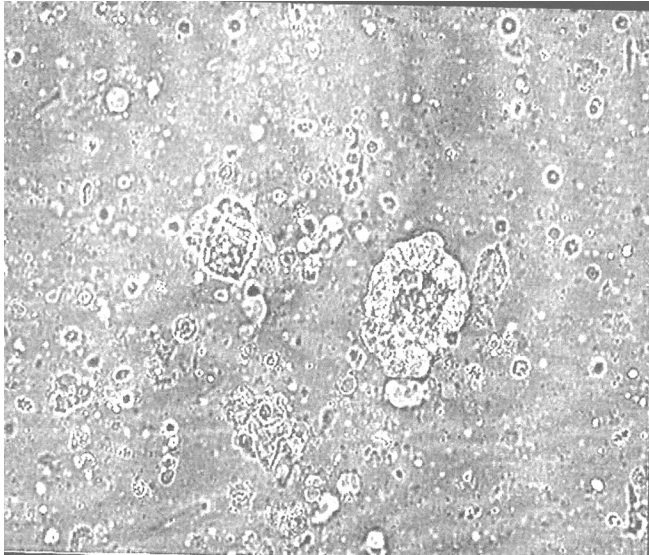
Stopień pozytywnej identyfikacji TPO: „+” obejmował 10% komórek, „++” — wielkość między 10–50% komórek, „+++” — > 50% komórek.

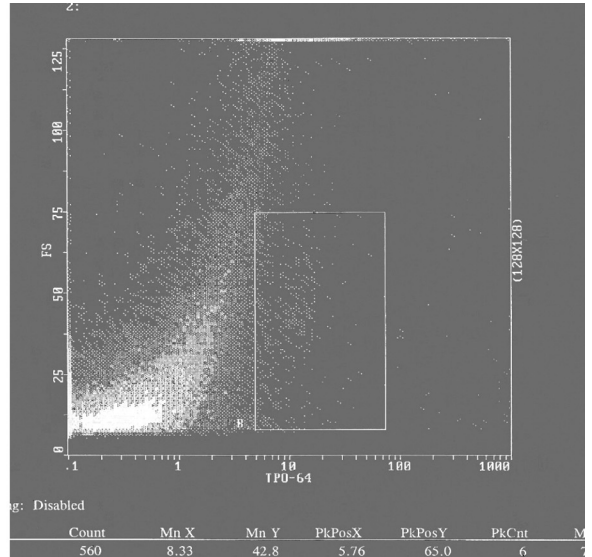
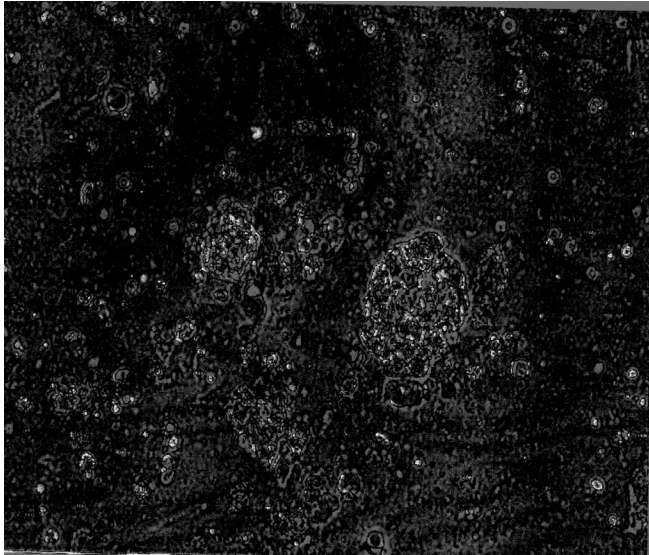
Metoda fluorocytometrycznej oceny ekspresji Fas/FasL na powierzchni komórek pęcherzykowych tarczycy

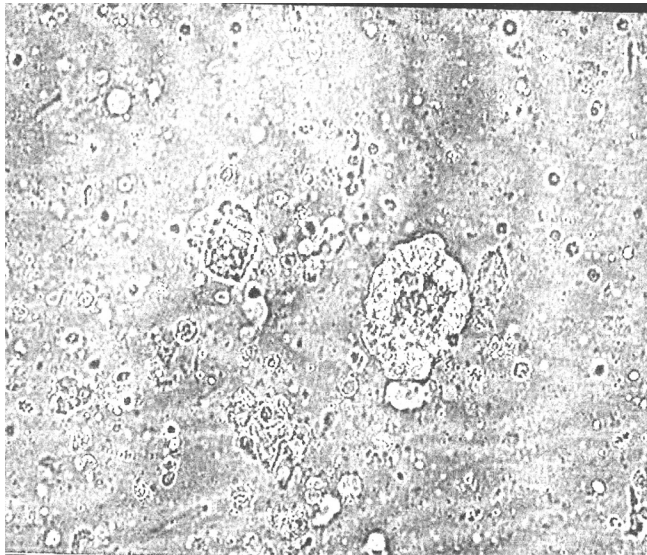
Skrawki tkanki tarczycowej pooperacyjnej wielkości 1,0 cm/1,0 cm pobierano do próbki zawierającej podłoże RPMI-1640. Część z nich poddawano bezpośrednio preparowaniu, a część zamrażano w temperaturze –85° i badano później. Na początku materiał tkankowy rozdrabniano mechanicznie metodą tak zwanego wyczesywania, a następnie po rozdrobnieniu dodano kolagenazę IV-S (Sigma). Tak przygotowaną zawiesinę komórek tarczycy rozcieńczano w proporcji 1:1 z podłożem RPMI 1640, następnie porcjowano po 50 ml i uzupełniono 10 ml roztworu zawierającego przeciwciała mysie monoklonalne (mAb) skierowane przeciw ludzkiemu epitopowi 64 TPO identyfikujące domenę B (ryc. 1).

Po 20 minutach inkubacji w temperaturze pokojowej do próbek dodawano przeciwciało królicze F(ab')₂-FITC (DAKO, USA) i przeprowadzano dalszą inkubację przez dalszych 20 minut. Tak uzyskaną zawiesinę komórkową płukano 3-krotnie w PBS, po czym do każdej próbki dodawano po 10 ml przeciwciał anty-Fas-PE lub anty-FasL-PE/FITC i poddano 20-minutowej inkubacji. Następnie uzupełniono próbki 250 ml PBS-u i 50 ml 1% paraformaldehydu. Po dokładnym

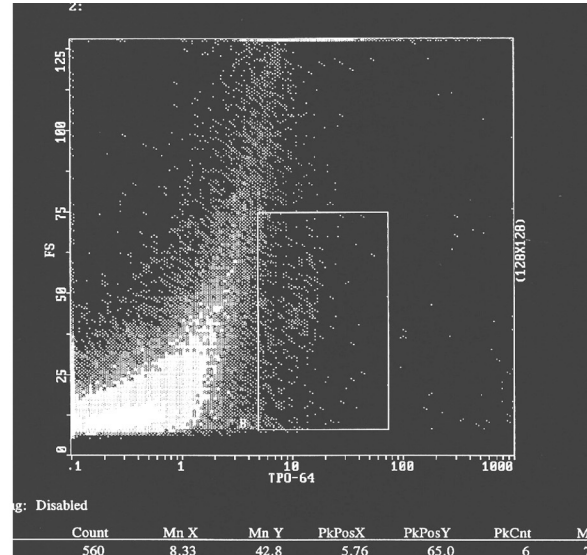








Tarczycza po trawieniu kolagenazą (kom. pęcherzykowe w zawiesinie) w podłożu RPMI-1640



Identyfikacja tyreocytów przy udziale mysich przeciwciał monoklonalnych mAb #64 anti-TPO

Rycina 1. Izolacja komórek pęcherzykowych tarczycy w podłożu RPMI-1640 i ich cytofluometryczna identyfikacja z zastosowaniem przeciwciał monoklonalnych mysich mAb #64 anti-TPO

Figure 1. Isolation of thyroid follicular cells on RPMI-1640 medium and cytofluorometric identification with use of monoclonal mouse mAb #64 anti TPO antibodies

wymieszaniu próbki poddawano analizie w cytometrze przepływowym (Coulter EPICS XL).

Analiza statystyczna

Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej przy użyciu programu Statistica 6.0. Porównanie poszczególnych parametrów w badanych grupach przeprowadzono za pomocą testu *t*-Studenta, U Manna-Whitney'a oraz Fishera. Za istotną statystycznie uznano wartość *t*, dla której wartość *p* była mniejsza niż 0,05. Do oceny współzależności między kolejnymi parametrami zastosowano współczynnik korelacji Spearmana.

Wyniki

W tabeli I przedstawiono charakterystykę i badania laboratoryjne pacjentów z chorobą Gravesa-Basedowa (przed leczeniem metizolem, a następnie w okresie kliniczno-biochemicznej eutyreozy przed zabiegiem operacyjnym), z zapaleniem tarczycy typu Hashimoto oraz wolem guzkowym nietoksycznym (przed zabiegiem operacyjnym). U pacjentów, u których w badaniu ultrasonograficznym wykryto zmiany guzkowe powyżej 1 cm, przeprowadzono biopsję aspiracyjną cienkoigłową, w której stwierdzono zmiany o charakterze łagodnym w postaci „wola guzkowego koloidowego”.

W analizie powierzchni antygenowej peroksydazy tarczycowej metodą cytometrii przepływowej zastosowano

wano mysie przeciwciała monoklonalne wytworzone przeciwko ludzkiej natywnej TPO. W ocenie odsetka komórek tarczycy z ekspresją epitopu TPO wiążącego mAb 64 nie stwierdzono istotnej różnicy pomiędzy grupą pacjentów z chorobą GB a badanymi z zapaleniem tarczycy typu Hashimoto (73% vs. 65%, NS) przy stężeniu przeciwciał anti-TPO równym 400 µg/ml. Zaobserwowano, że przy zmniejszających się stężeniach przeciwciał anti-TPO dochodzi do obniżenia średniego odsetka komórek tarczycy z ekspresją regionu antygenowego 64. Podobny obraz identyfikujący TPO z zastosowaniem przeciwciał mAb-47 uwidoczono także na podstawie badania immunohistochemicznego w wybarwieniu hematoksyliną Mayera. U pacjentów z chorobą Gravesa-Basedowa i wolem Hashimoto stopień ekspresji oceniono na „+++”, w przypadku dzieci z wolem guzkowym nietoksycznym ekspresja wynosiła „+”.

Wyniki powyższych badań potwierdziły zwiększoną immunogenność komórek pęcherzykowych tarczycy w chorobie Gravesa-Basedowa i zapaleniu tarczycy typu Hashimoto względem wola guzkowego nietoksycznego. Wykazano natomiast porównywalny stopień ekspresji peroksydazy tarczycowej w obu chorobach autoimmunologicznych tarczycy, co umożliwiło dalsze badania w kierunku identyfikacji cząsteczek apoptozy na powierzchni tyreocytów.

W poddanej ocenie ekspresji cząsteczek Fas/CD95 i FasL/CD95L w materiale tkankowym u pacjentów

Tabela I

Dane pacjentów z chorobą Gravesa-Basedowa przed leczeniem metizolem, po 6 miesiącach terapii (przed zabiegiem operacyjnym), w wolu wieloguzkowym nietoksycznym oraz zapaleniu tarczycy typu Hashimoto

Table I

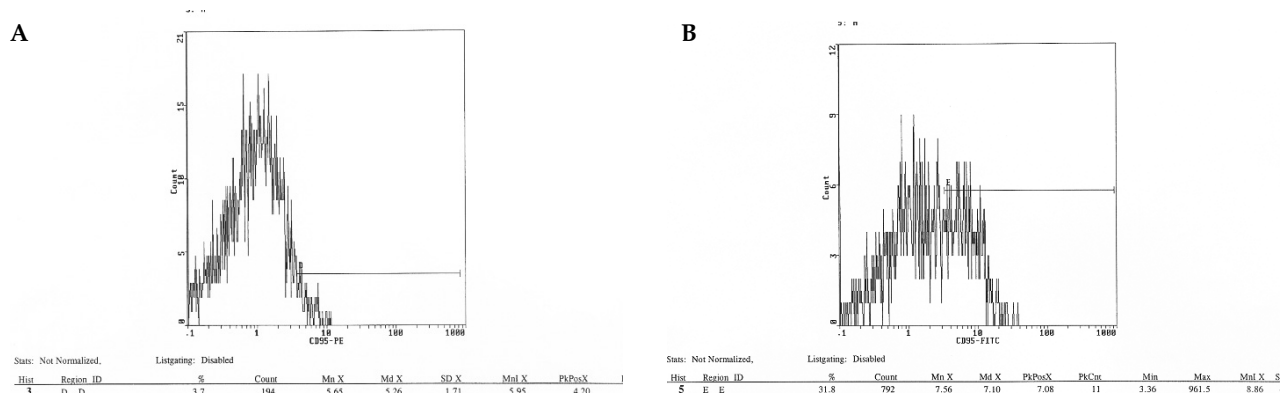
Data of Graves' disease patients before metizol treatment, after 6 month therapy (before surgical operation), patients with non-toxic nodular goiter and Hashimoto's thyroiditis patients

Zmienne (x ± SD)	Grupy				p
	Choroba nieleczonea A	Gravesa-Basedowa po 6 msc leczenia metizolem (n = 15) A'	Zapalenie tarczycy typu Hashimoto (n = 15) B	Wole guzkowe nietoksyczne (n = 15) C	
Wiek	13,7 ± 6	14,3 ± 5	15,3 ± 3	14,1 ± 3	NS
Płeć M/Ż	2/13	2/13	2/13	2/13	NS
Masa ciała [kg]	58 ± 11,0	62 ± 5,3	60,9 ± 8,0	60,5 ± 7,0	NS
Wzrost [cm]	166 ± 3	169 ± 1	170 ± 5	169 ± 7	NS
Tyroksyna [mg/d]	–	25–75	50 ± 12,5	75 ± 25	–
Metizol [mg/d]	–	10 ± 5	–	–	–
TRAb [j./l]	> 5 dodatnie	> 3 dodatnie	< 1 ujemne	< 1 ujemne	–
anty-TPO [mjm./ml]	1279 ± 289	750 ± 90	1650 ± 550	44,3 ± 38	p < 0,0001 p* < 0,01 p** < 0,001
anty-TG [mjm./ml]	630 ± 243	450 ± 50	780 ± 320	160 ± 81,4	p < 0,001 p* < 0,01 p** < 0,001
TSH [mj./ml]	0,05 ± 0,02	1,3 ± 0,2	3,2 ± 1,4	2,9 ± 0,3	p < 0,001 p* < 0,01
fT4 [ng/dl]	5,5 ± 2,0	2,04 ± 0,3	1,31 ± 0,14	1,29 ± 0,20	p < 0,001
fT3 [ng/l]	8,65 ± 2,1	3,8 ± 0,5	3,46 ± 0,84	2,94 ± 0,21	p < 0,002

p — istotność statystyczna między grupą A a grupą C; p* — istotność statystyczna między grupą A' a grupą C, p** — istotność statystyczna między grupą B a grupą C; X — wartości średnie; TRAb (anti-TSH receptor antibodies) — przeciwciała przeciw receptorom TSH; TSH (thyroid stimulating hormone) — hormon tyreotropowy; SD (standard deviation) — odchylenie standardowe, NS (no statistical significance) — nieistotne statystycznie

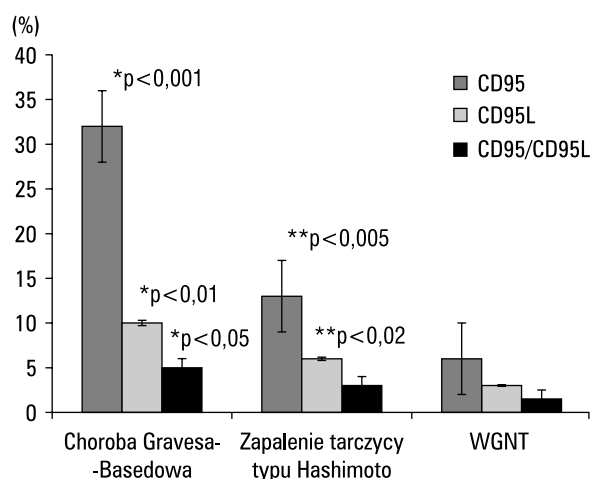
z chorobą Gravesa-Basedowa stwierdzono istotne statystycznie podwyższenie odsetka limfocytów T CD95+ (p < 0,005, p < 0,001), T CD95L+ (p < 0,02, p < 0,01) oraz T CD95/CD95L (NS, p < 0,05) w porównaniu z grupą z zapaleniem tarczycy typu Hashimoto oraz wolem guzkowym nietoksycznym (ryc. 2, 3). Z kolei analiza ekspresji cząsteczek apoptozy CD95/CD95L na powierzchni samych tyreocytów w chorobie Gravesa-Basedowa (p < 0,01, p < 0,01) i wolem guzkowym nietoksycznym (p < 0,001, p < 0,004) była znacząco niższa w porównaniu z ich obecnością u dzieci z zapaleniem tarczycy typu Hashimoto (ryc. 4, 5). W odniesieniu do łącznej ekspresji obu cząsteczek Fas (CD95) i FasL (CD95L) na powierzchni tyreocytów uzyskano większy ich odsetek u pacjentów z zapaleniem tarczycy typu Hashimoto (p < 0,02, p < 0,002) niż chorobą Gravesa-Basedowa i wolem guzkowym nietoksycznym (odpowiednio: 18%, 8% i 1%) (ryc. 5).

Pooperacyjny materiał tkankowy powyższych grup pacjentów dodatkowo poddano identyfikacji proapoptotycznych białek Fas/FasL metodą immunohistochemii. Badania te ujawniły w tyreocytach pacjentów z chorobą Gravesa-Basedowa i zapaleniem Hashimoto znaczącą obecność cząsteczki FasL i Fas, których stopień ekspresji oceniono odpowiednio na ++, ++ dla GB i +++, +++ dla HT (ryc. 6 A, B). W przypadku osób młodych z wolem guzkowym nietoksycznym stopień ten był śladowy i wynosił 0/+, 0/+ (ryc. 6 C). Materiał tkankowy tarczycy badano także w kierunku ekspresji kaspazy 8 oraz cząsteczki FasL przy użyciu metody Western Blot, uzyskując u pacjentów z chorobami autoimmunologicznymi tarczycy obecność białka FasL w prążku p21 (kDa) oraz dla kaspazy 8 w prążku p55 (kDa) (ryc. 7 A, B). U pacjentów z wolem guzkowym nietoksycznym stopień ekspresji FasL był śladowy przy całkowitym braku detekcji kaspazy 8 (ryc. 7 A, B).



Rycina 2. Ekspresja cząsteczki Fas (CD95) na powierzchni limfocytów wewnątrztrzczycowych u pacjenta z chorobą Gravesa-Basedowa (%CD3-Fas⁺ 32%) (A) i zapaleniem tarczycy typu Hashimoto (%CD3-Fas⁺ 3,7%) (B)

Figure 2. Molecule Fas (CD95) expression on the surface of interthyroidal lymphocytes in patient with Graves' disease (%CD3-Fas⁺ 32%) (A) and Hashimoto's thyroiditis (%CD3-Fas⁺ 3,7%) (B)



Rycina 3. Analiza ekspresji cząsteczek apoptozy CD95/CD95L na powierzchni limfocytów wewnątrztrzczycowych w chorobach immunologicznych i nieimmunologicznych gruczołu tarczowego; *znamiennosć statystyczna między grupą z chorobą Gravesa-Basedowa a wolem guzkowym nietoksycznym; **znamiennosć statystyczna między grupą z chorobą Gravesa-Basedowa a zapaleniem Hashimoto

Figure 3. Analysis of apoptosis molecules CD95/CD95L expression on the surface of interthyroidal lymphocytes in immune and non-immune thyroid diseases

Każdy materiał tkankowy tarczycy badanych przez autorów prezentowanej pracy pacjentów poddano ocenie obecności białka β -aktyny metodą *Western Blot*, którego ekspresja potwierdza, że tkanki nie były zdegradowane i wskazuje na właściwą jakość wykonanych analiz.

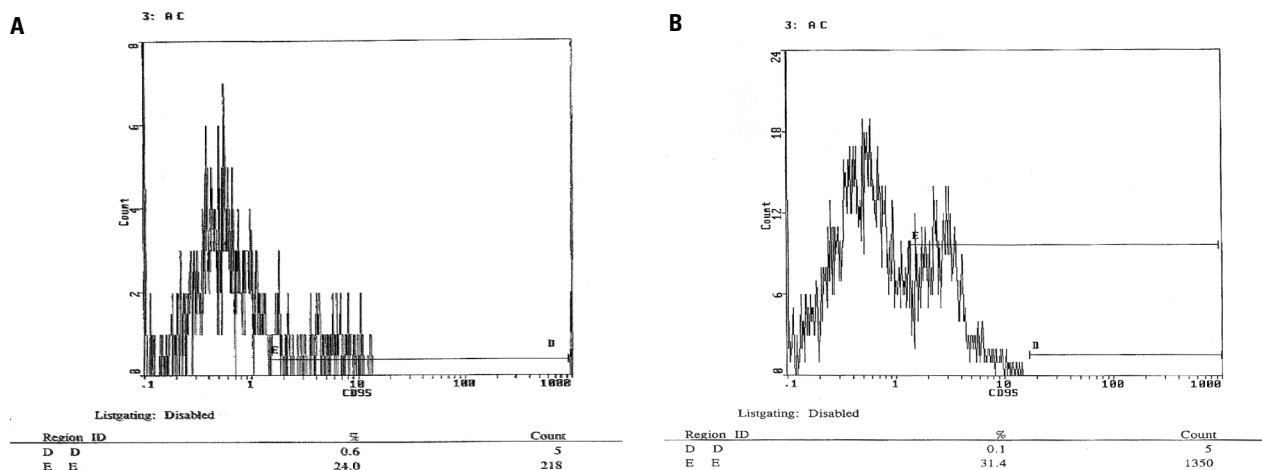
W badanych przez autorów niniejszego artykułu materiale brano pod uwagę związek między przeciwciałami przeciwtrzcycowymi a odsetkiem komórek

tarczycy z ekspresją cząsteczek apoptozy. U pacjentów z chorobą GB stwierdzono istotną statystycznie ujemną korelację między odsetkiem tyreocytów z ekspresją Fas a stężeniem przeciwciał TRAb ($R = 0,58$, $p < 0,02$), natomiast takich zależności nie obserwowano w odniesieniu do zapalenia tarczycy typu Hashimoto i wola guzkowego nietoksycznego. Poddana z kolei ocenie zależność stężenia hormonów tarczycy w odniesieniu do wartości odsetkowej limfocytów wewnątrztrzczycowych z ekspresją Fas i FasL nie wykazała istotnych zależności w badanych grupach.

Dyskusja

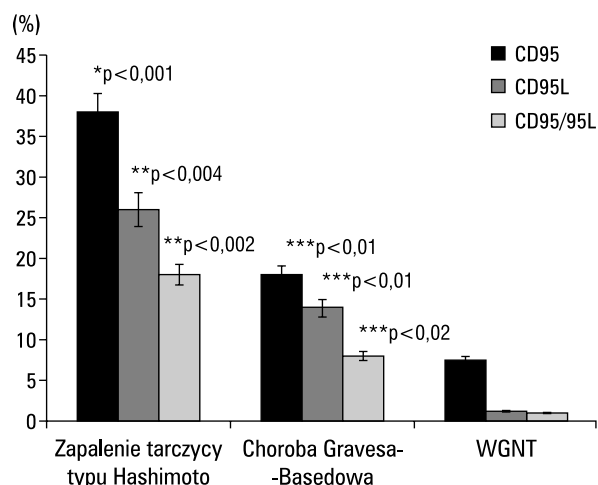
Schorzenia immunologiczne tarczycy to około 30% wszystkich chorób autoimmunologicznych [13]. Badania odpowiedzi immunologicznej w zapaleniu tarczycy typu Hashimoto dowiodły, że limfocyty T cytotoxyczne mogą być odpowiedzialne za destrukcję tyreocytów, a w konsekwencji — rozwój niedoczynności tarczycy. Z kolei w chorobie Gravesa-Basedowa aktywacja limfocytów B prowadzi do uwalniania przeciwciał stymulujących tarczycę, które łącząc się z receptorem dla TSH, w rezultacie powodują trudną do powstrzymania nadprodukcję hormonów i w konsekwencji powstaje nadczynność tarczycy [14, 15]. Wykazano, że współczynnik apoptozy tyreocytów koreluje z klinicznymi objawami chorób autoimmunologicznych tarczycy [16, 17].

W prezentowanej pracy badano ekspresję cząsteczek apoptozy Fas/FasL u młodych pacjentów z chorobą Gravesa-Basedowa, zapaleniem tarczycy typu Hashimoto i wolem guzkowym nietoksycznym. W przeprowadzonej analizie wykazano zwiększoną ekspresję molekuł apoptozy Fas i FasL na powierzchni



Rycina 4. Ekspresja cząsteczki Fas (CD95) na powierzchni komórek pęcherzykowych tarczycy (TFC, thyroid follicular cells) u pacjenta z chorobą Gravesa-Basedowa (% TCR-Fas⁺ 24%) (A) i zapaleniem tarczycy typu Hashimoto (% TFC-Fas⁺31,4%) (B)

Figure 4. Molecule Fas (CD95) expression on the surface of thyroid follicular cells (TFC) in patient with Graves' disease (% TCR-Fas⁺ 24%) (A) and Hashimoto's thyroiditis (% TFC-Fas⁺31,4%) (B)

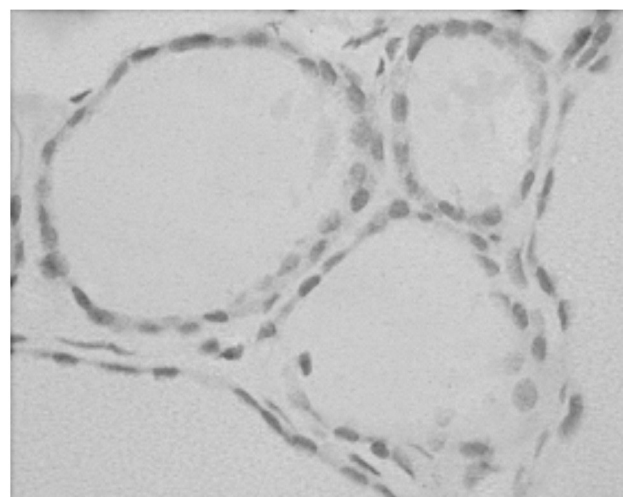
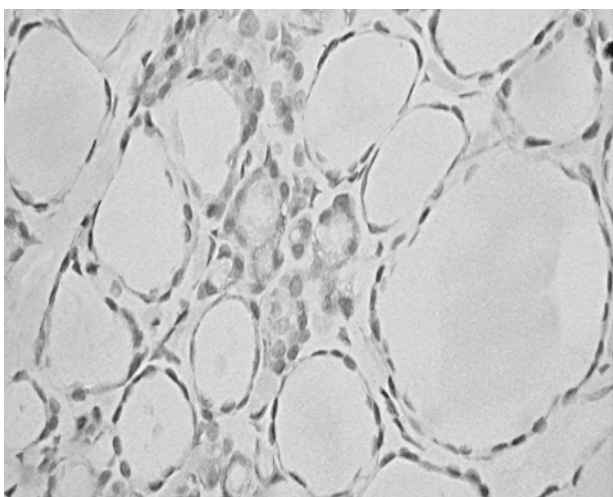
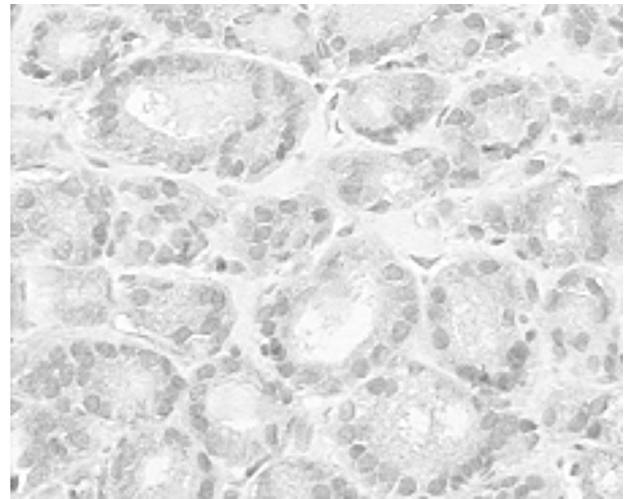
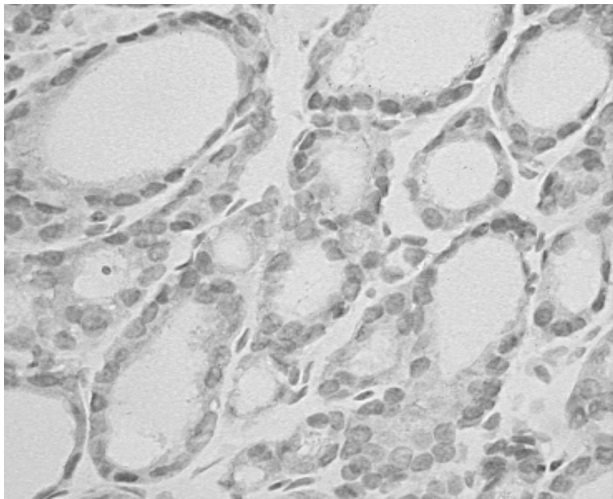
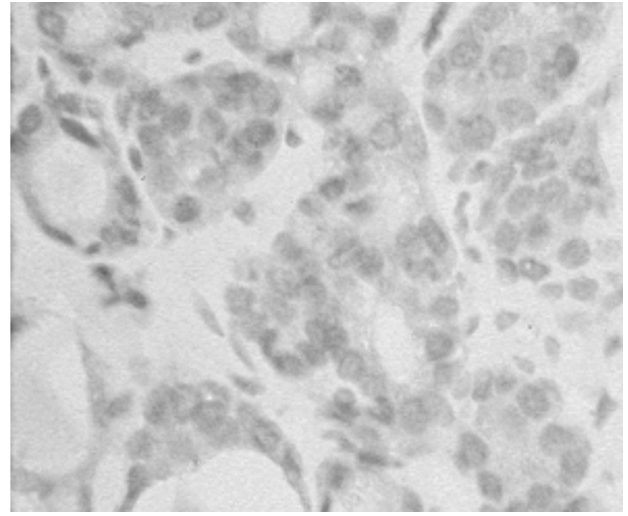
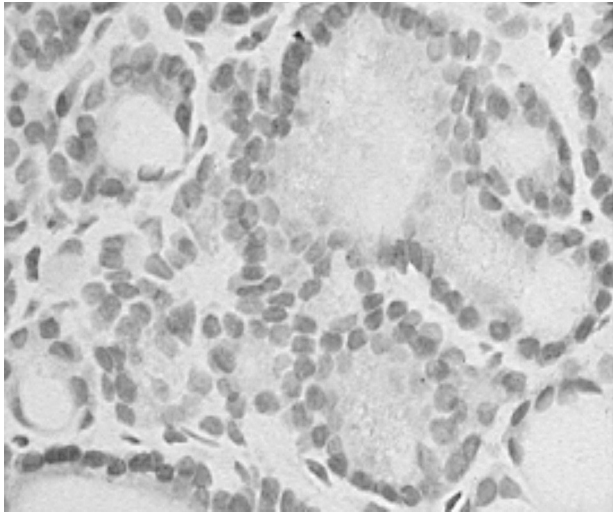


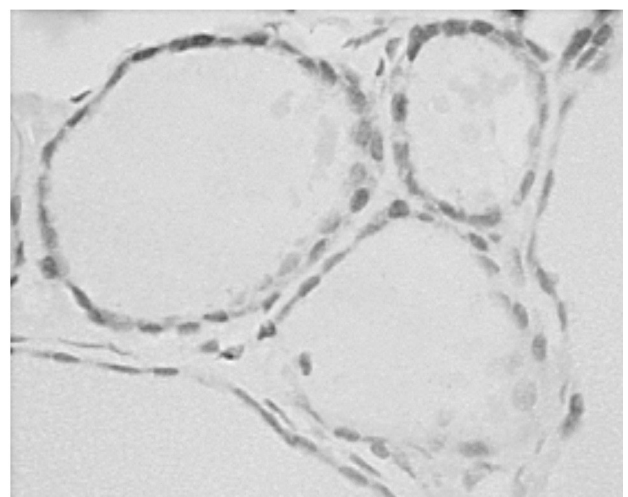
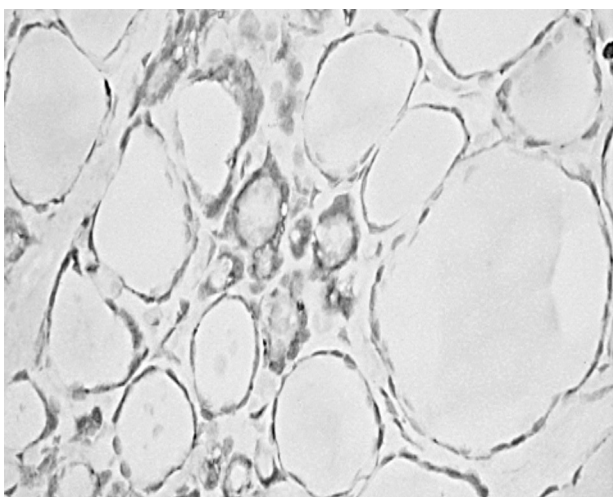
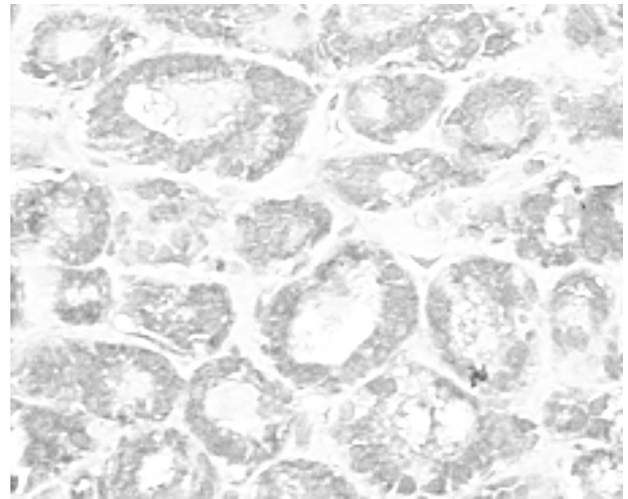
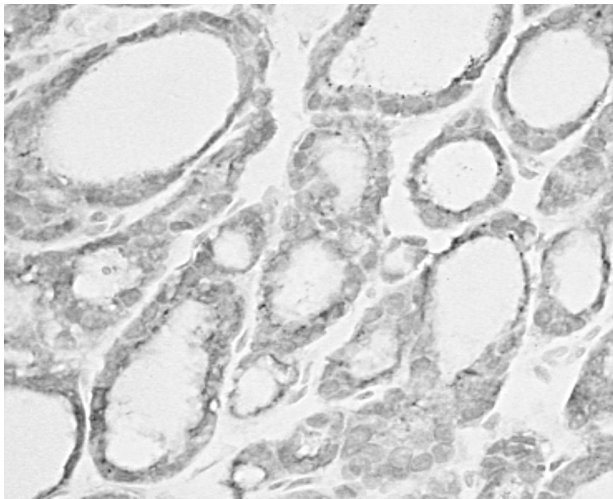
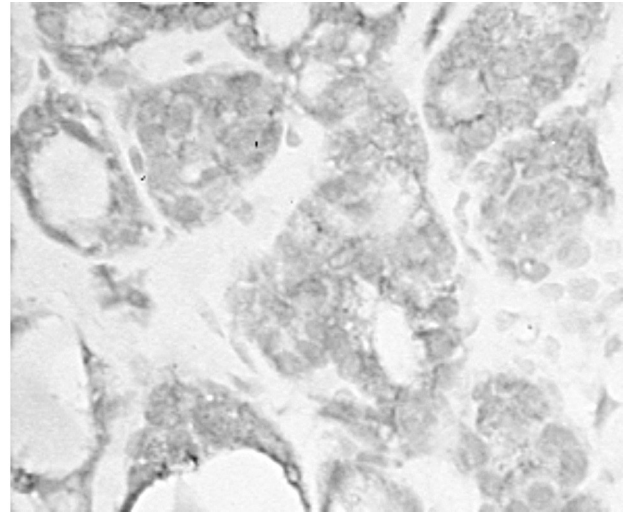
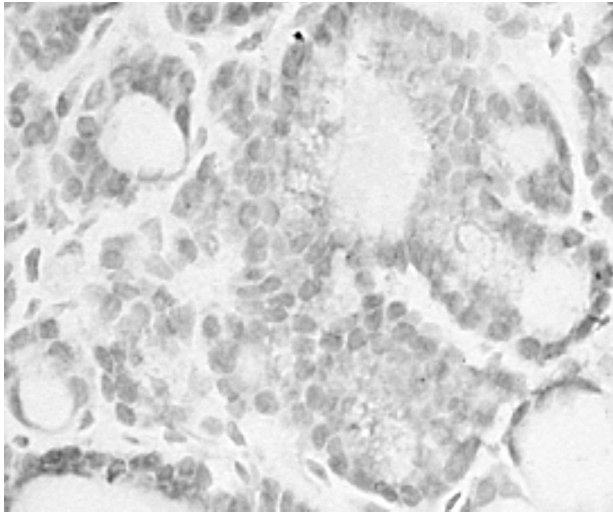
Rycina 5. Analiza ekspresji molekuł apoptozy CD95/CD95L na powierzchni tyreocytów w chorobach immunologicznych i nieimmunologicznych gruczołu tarczowego; *, **znamiennność statystyczna pomiędzy grupą z zapaleniem tarczycy typu Hashimoto a wolem guzkowym nietoksycznym; ***, **znamiennność statystyczna między grupą z zapaleniem tarczycy typu Hashimoto a chorobą Gravesa-Basedowa

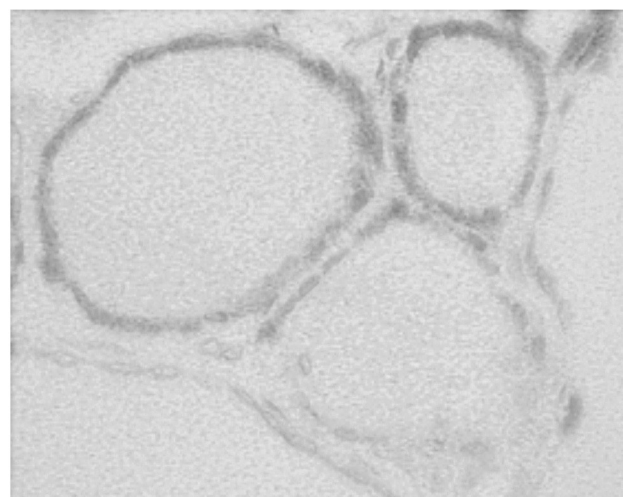
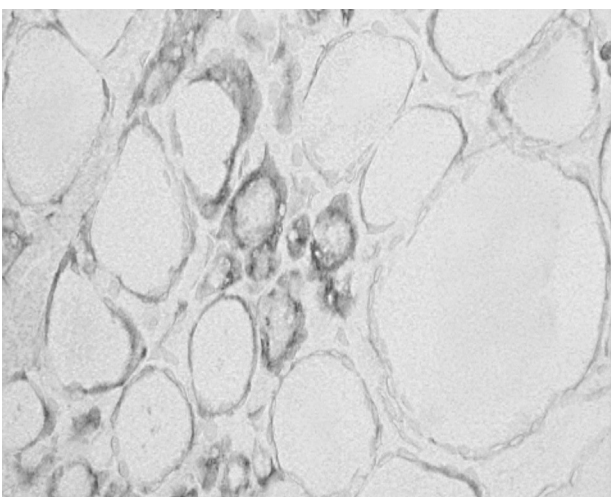
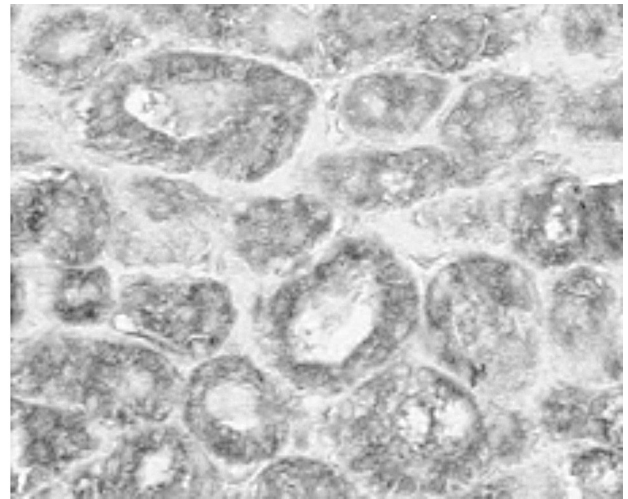
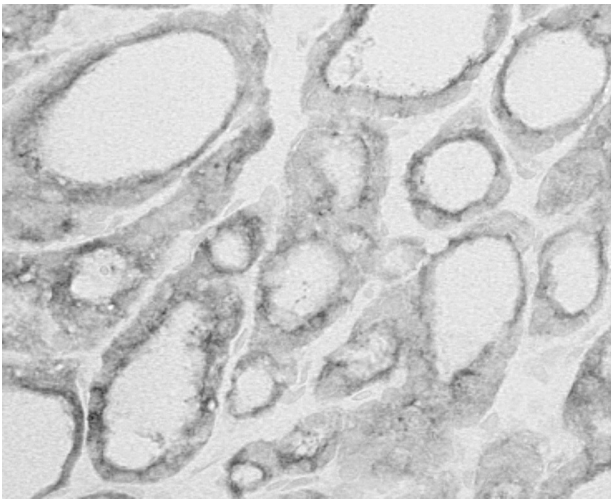
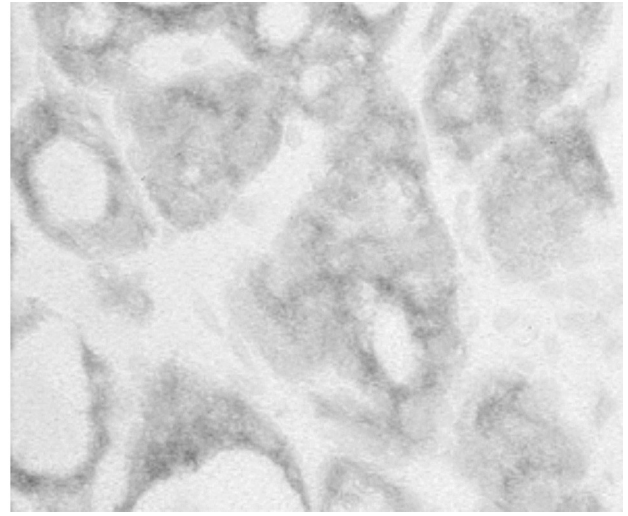
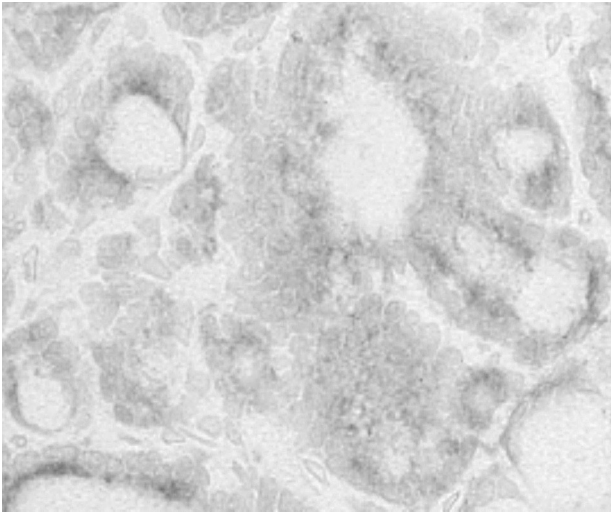
Figure 5. Analysis of apoptosis molecules CD95/CD95L expression on the surface of thyrocytes in immune and non-immune thyroid diseases

tyreocytów u pacjentów z zapaleniem tarczycy typu Hashimoto w porównaniu z ich obecnością w chorobie Gravesa-Basedowa i wolem guzkowym nietoksycznym. Podobne obserwacje przedstawili Giordano i wsp. [18] wskazując, że stopień ich ekspresji istotnie wpływa na zmiany aktywności procesu apoptozy, doprowadzając do rozwoju wola bądź jego inwolucji. Dodatkowo Stassi

i wsp. [19] dowiedli, że w świeżo wyizolowanych tyreocytach u pacjentów z chorobą Hashimoto ekspresja CD95 i CD95L jest wzmożona w aktywnej fazie choroby, co sugeruje zaangażowanie układu receptor-ligand w progresywnej destrukcji gruczołu tarczowego. Natomiast zdaniem tych autorów w zdrowym mięszu tarczycy ekspresja CD95 jest niewystarczająca do inicjacji apoptozy. Zmiany w dystrybucji powyższych markerów apoptozy w chorobach tarczycy mogą być zatem wynikiem wpływu cytokin prozapalnych, które oddziałują nie tylko w układzie immunologicznym, ale także mają wpływ na komórki docelowe [20]. Podczas autoimmunologicznego zapalenia tarczycy cytokiny uwalniane przez makrofagi i limfocyty Th1 indukują zwiększoną ekspresję cząsteczek CD95 na powierzchni tyreocytów [21]. Stymulacja ta powoduje aktywację zaprogramowanej śmierci komórki wskutek mechanizmu samo- lub bratobójstwa, doprowadzając w konsekwencji do destrukcji komórek pęcherzykowych tarczycy i rozwoju niedoczynności tarczycy. W chorobie Gravesa-Basedowa dochodzi natomiast do nacieku głównie limfocytów Th2 oraz produkcji IL-4, IL-10, co indukuje z kolei ekspresję antyapoptycznych cząsteczek, powodując oporność tyreocytów na przebiegającą za pośrednictwem CD95 apoptozę [22]. Potwierdzeniem powyższej hipotezy jest uzyskanie w niniejszym materiale badawczym na powierzchni tyreocytów większej ekspresji zarówno Fas, jak i FasL u pacjentów z zapaleniem Hashimoto w porównaniu z ich ekspresją na tyreocytach pacjentów w chorobie Gravesa-Basedowa i wolem guzkowym nietoksycznym. Zatem zmiany ekspresji obu cząsteczek Fas (CD95) i FasL (CD95L) w chorobach autoimmunologicznych







A. Identyfikacja FasL i Fas u pacjenta z zapaleniem tarczycy typu Hashimoto



B. Identyfikacja FasL i Fas u pacjenta z chorobą Gravesa-Basedowa



C. Identyfikacja FasL i Fas u pacjenta z wolem guzkowym nietoksycznym



Rycina 6. Identyfikacja cząsteczek FasL i Fas metodą immunohistochemii u pacjentów z chorobami immunologicznymi i nieimmunologicznymi tarczycy

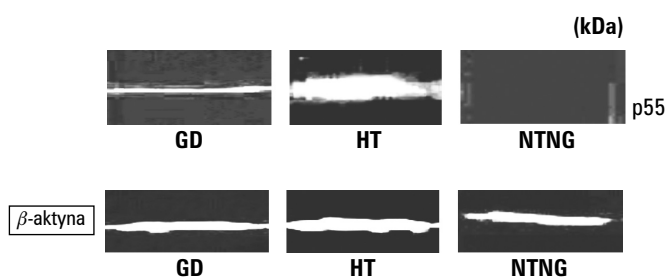
Figure 6. Identification of FasL and Fas molecules by immunohistochemistry method in patients with immune and non-immune thyroid diseases



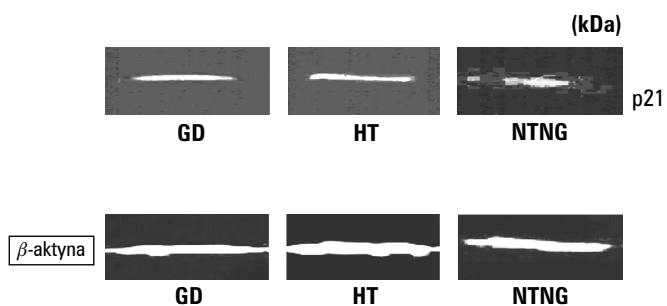




A. Ekspresja kaspazy 8 i β -aktyny w tkance gruczołu tarczowego



B. Ekspresja cząsteczki FasL i β -aktyny w tkance gruczołu tarczowego



Rycina 7. Identyfikacja kaspazy 8 i FasL metodą Western Blot u pacjentów z chorobą Gravesa-Basedowa, zapaleniem tarczycy Hashimoto i wolem guzkowym nietoksycznym

Figure 7. Identification of caspase-8 (A) and FasL (B) proteins by Western Blot method in patients with Graves' disease, Hashimoto's thyroiditis and non-toxic nodular goiter

tarczycy przebiegających zarówno z hiperplazją, jak i involucją tyreocytów mogą być wynikiem zaburzeń aktywności procesu apoptozy. Fakt ten wiąże się prawdopodobnie z wpływem przeciwciał stymulujących receptor TSH oraz działaniem hormonu tyreotropowego przysadki na zmiany ekspresji cząsteczki Fas [23]. Autorzy niniejszego badania uzyskali ujemną zależność między odsetkiem tyreocytów z ekspresją Fas a stężeniem przeciwciał TRAb, co potwierdzałoby powyższą zależność. Dodatkowo Mihara i wsp. [24] wykazali, że nadmiar hormonów tarczycy oddziałuje na aktywację apoptozy limfocytów napływających do gruczołu tarczowego w trakcie procesu zapalnego. W związku z tym prawdopodobnie może dochodzić do zwiększonej przeżywalności komórek pęcherzykowych tarczycy w sytuacji nadmiernej eliminacji komórek immunologicznych. W materiale autorów prezentowanego badania uzyskali zwiększoną ekspresję cząsteczek Fas/CD95 i FasL/CD95L na limfocytach wewnątrztrzęcowych T u pacjentów z chorobą Gravesa-Basedowa w porównaniu z grupą z zapaleniem tarczycy typu Hashimoto. W związku z tym wzrost aktywności procesu apoptozy w obrębie limfocytów u pacjentów z chorobą GB może doprowadzać z kolei do przewagi proliferacji

nad eliminacją komórek tarczycy, a w konsekwencji odpowiadać za powiększenie gruczołu tarczowego.

Udział cząsteczek FasL i Fas, zarówno w apoptozie tyreocytów, jak i komórek T, wskazuje na ich rolę w patogenezie autoimmunologicznych chorób tarczycy. Z jednej strony zwiększona ekspresja Fas i FasL obserwowana w chorobach autoimmunologicznych sugeruje, że cytotoksyczność, w której pośredniczy Fas jest odpowiedzialna w dużej mierze za uszkodzenie tkanek [25]. Z drugiej zaś zarówno w badaniach prowadzonych na modelach zwierzęcych, jak i wśród ludzi wykazano, że dziedziczna mutacja prowadząca do uszkodzenia funkcji Fas zakłóca homeostazę limfocytów i w konsekwencji powoduje rozwój procesu autoimmunologicznego [26, 27]. Bona i wsp. [28] wykazali obecność upośledzonej funkcji cząsteczki Fas na limfocytach krwi obwodowej u dzieci w chorobach autoimmunologicznych tarczycy. Autorzy ci stwierdzili ten defekt na podstawie obecności obniżonej aktywności kaspazy 8 oraz kaspazy 9 w zapaleniu tarczycy typu Hashimoto i kaspazy 8 w chorobie Gravesa-Basedowa. W niniejszym materiale autorzy przeprowadzili identyfikację obecności białka kaspazy 8 w tyreocytach, uzyskując pojedynczy prążek p51 kDa w obu chorobach autoimmunologicznych tarczycy, przy całkowitym braku jej ekspresji w wole guzkowym nietoksycznym. Analiza ta potwierdziła więc zwiększoną aktywność proapoptotyczną cząsteczki Fas w obrębie samych tyreocytów w chorobach immunologicznych tarczycy.

Zrozumienie przebiegu procesu apoptozy na poziomie molekularnym może przyczynić się nie tylko do lepszego poznania patogenezy chorób autoimmunologicznych tarczycy, ale także stwarza nowe możliwości diagnostyczne, prognostyczne i terapeutyczne.

Wnioski

1. Zmiany ekspresji cząsteczek apoptozy na powierzchni limfocytów T i komórkach pęcherzykowych tarczycy u pacjentów z chorobami autoimmunologicznymi tarczycy sugerują ich znamienny udział w patogenezie choroby Gravesa-Basedowa i zapaleniu tarczycy typu Hashimoto.
2. Zwiększona ekspresja receptorów śmierci i ich ligandów na powierzchni komórek pęcherzykowych tarczycy u pacjentów z zapaleniem tarczycy typu Hashimoto wskazuje na możliwość udziału sąsiednich tyreocytów w bratobójczej apoptozie komórek, prowadząc w efekcie do ich niszczenia i rozwoju niedoczynności gruczołu.

Analiza zmian ekspresji cząsteczek Fas/FasL oraz kaspazy 8 w tkance gruczołu tarczowego może infor-

mować o stopniu aktywności i fenotypie immunologicznym badanego schorzenia.

Podziękowanie

Składam serdeczne podziękowanie pani Annie Łyczkowskiej (Zakład Biochemii Klinicznej i Biologii Molekularnej CMKP w Warszawie) i pani Jolancie Czerwińskiej (Zakład Patomorfologii CMKP w Warszawie) za przeprowadzenie oznaczeń białek apoptozy metodą *Western Blot* i immunohistochemii.

Piśmiennictwo

- Salamaco C, Bagnasco M, Pesce G i wsp. Regulation of apoptosis in endocrine autoimmunity. *Ann NY Acad Sci* 2002; 966: 496–501.
- Vaux D, Flavell RA. Apoptosis genes and autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 2000; 12: 719–724.
- Andrikoula M, Tsatsoulis A. The role of Fas-mediated apoptosis in thyroid disease. *Eur J Endocrinol* 2001; 144: 561–568.
- Kroemer G, Zamzami N, Susin SA. Mitochondria control of apoptosis. *Immunol Today* 1997; 18: 44–51.
- Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998; 281: 1309–1312.
- Desagher S, Martinou JC. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends in Cell Biology* 2000; 10: 369–377.
- Tsatsoulis A. The role of apoptosis in thyroid disease. *Minerva Med* 2002; 93: 169–180.
- Mitsiades N, Poulaki V, Mitsiades CS i wsp. Apoptosis induced by FasL and TRAIL/Apo2L in the pathogenesis of thyroid diseases. *Trends Endocrinol Metab* 2001; 12 (9): 384–390.
- Giordano C, Richiusa P, Bagnasco M i wsp. Differential regulation of Fas-mediated apoptosis in both thyrocyte and lymphocyte cellular compartments correlates with opposite phenotypic manifestations of autoimmune thyroid disease. *Thyroid* 2001; 11 (3): 245–247.
- Wei Y, Chen K, Sharp GC i wsp. Expression and regulation of Fas and Fas ligand on thyrocytes and infiltrating cells during induction and resolution of granulomatous experimental autoimmune thyroiditis. *J Immunol* 2001; 167: 6678–6686.
- Hiromatsu Y, Hoshino T, Yagita H i wsp. Functional Fas ligand expression in thyrocytes from patients with Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 2896–2902.
- Kawakami A, Eguchi K. Involvement of apoptotic cell death in autoimmune diseases. *Med. Electron Microsc* 2002; 35: 1–8.
- Weetman AP, McGregor AM. Autoimmune thyroid disease: Further developments in our understanding. *Endocr Rev* 1994; 15: 788–830.
- Constagliola S, Many MC, Deneff JF i wsp. Genetic immunization of out bred mice with thyrotropin receptor cDNA provides a model of Graves' disease. *J Clin Invest* 2000; 105: 803–811.
- Pujol-Borrel R, Todd I, Londei M i wsp. New ideas in thyroid autoimmunity. *Horm Res* 1987; 26: 118–124.
- Baker JR Jr. The nature of apoptosis in the thyroid and the role it may play in autoimmune thyroid disease. *Thyroid* 2001; 11: 245–247.
- Stassi G, Zeuner A, Di Liberto D i wsp. Fas/FasL in Hashimoto's thyroiditis. *J Clin Immunol* 2001; 21: 19–23.
- Giordano C, Stassi G, De Maria R i wsp. Potential involvement of Fas and its ligand in the pathogenesis of Hashimoto's thyroiditis. *Science* 1997; 275: 960–963.
- Stassi G, Todaro M, Bucchieri F i wsp. Fas/Fas ligand-driven T cell apoptosis as a consequence of ineffective thyroid immunoprivilege in Hashimoto's thyroiditis. *J Immunol* 1999; 162: 263–267.
- Heter M, Aust G, Ode-Hakim S i wsp. Different cytokine mRNA profiles in Graves' disease, Hashimoto's thyroiditis and nonautoimmune thyroid disorders determined by quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). *Thyroid* 1996; 6: 97–106.
- Stassi G, Zeuner A, Di Liberto D i wsp. Fas/FasL in Hashimoto's thyroiditis. *J Clin Immunol* 2001; 21: 19–23.
- Stassi G, De Maria R. Autoimmune thyroid disease: New models of cell death in autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 195–204.
- Kawakami A, Eguchi N, Matsuoka N i wsp. Modulation of Fas-mediated apoptosis of human thyroid epithelial cells by IgG from patients with Graves' disease (GD) and idiopathic myxedema. *Clin Exp Immunol* 1997; 110: 434–439.
- Mihara S, Suzuki N, Wakisaka S i wsp. Effects of thyroid hormones on apoptotic cell death of human lymphocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 1378–1385.
- De Maria R, Testi R. Fas-FasL interactions: a common pathogenetic mechanism in organ-specific autoimmunity. *Immunol Today* 1998; 19: 121–125.
- Fisher GN, Rosenberg FJ, Strans SF i wsp. Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human lymphoproliferative syndrome. *Cell* 1995; 81: 935–946.
- Rieux-Loucat R, Le Deist F, Hivroz C i wsp. Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science* 1995; 268: 1347–1349.
- Bona G, Defranco S, Chiochetti A i wsp. Defective function of Fas in T cells from paediatric patients with autoimmune thyroid diseases. *Clin Exp Immunol* 2003; 133: 430–437.