

ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



025000200036



DD
610
ANA
2003

A

189

RECEIVED
ADMINISTRATIVE
SECTION

May 1964
S. J. L.

May 1964

RECEIVED
SECTION

RECEIVED

RECEIVED



Αρ. 500
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

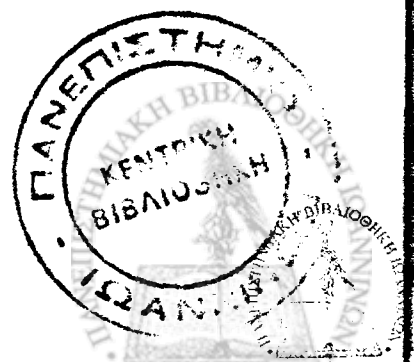
ΤΟΜΕΑΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΝΔΟΚΡΙΝΟΛΟΓΙΚΟ ΤΜΗΜΑ
Υπεύθυνος: Καθηγητής Αγαθοκλής Τσατσούλης

*Ο Ρόλος της Αποπτωτικής Οδού
Fas-Fas Ligand
στην Οζώδη Θυρεοειδική Νόσο*

ΜΑΡΙΑ Ι. ΑΝΔΡΙΚΟΥΛΑ
ΙΑΤΡΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2003



229/2003



Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα.
(Νόμος 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2)



ΛΗΨΗ ΕΚΠΟΝΗΣΗΣ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ: 9-12-1998

ΟΡΙΣΜΟΣ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ: 11-5-1999

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: Αγαθοκλής Τσατσούλης, Καθηγητής Παθολογίας Ενδοκρινολογίας

ΜΕΛΗ: - Μωϋσής Ελισάφ, Καθηγητής Παθολογίας
- Μαρία Φράγκου-Λαζαρίδη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας

ΟΡΙΣΜΟΣ ΘΕΜΑΤΟΣ: 25-6-1999

ΚΑΤΑΘΕΣΗ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ: 17-2-2003

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Νίκη Αγνάντη, Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Αγαθοκλής Τσατσούλης, Καθηγητής Παθολογίας – Ενδοκρινολογίας
Κωνσταντίνος Σιαμόπουλος, Καθηγητής Παθολογίας – Νεφρολογίας
Νικόλαος Παυλίδης, Καθηγητής Παθολογίας – Ογκολογίας
Αλέξανδρος Δρόσος, Καθηγητής Παθολογίας – Ρευματολογίας
Μωϋσής Ελισάφ, Καθηγητής Παθολογίας
Μαρία Φράγκου-Λαζαρίδη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας
Ευστάθιος Φριλήγγος, Επίκουρος Καθηγητής Βιολογικής Χημείας

ΒΑΘΜΟΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ: Άριστα

Η Γραμματέας

ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ ΤΣΑΓΓΑΛΑ



- " Η φυσιολογία αποδεικνύει ότι ο θάνατος δεν είναι ένα ακαριαίο, στιγμιαίο φαινόμενο, αλλά μια παρατεταμένη, χρονοβόρα διαδικασία. Κάθε οργανωμένο ον είναι κάθε στιγμή το ίδιο αλλά και διαφορετικό. Κάθε λεπτό κάποια κύτταρα του σώματός του πεθαίνουν και κάποια άλλα δημιουργούνται από την αρχή "

F. Engels



**Αφιερώνεται στους σεβαστούς μου καθηγητές:
Αγ. Τσατσούλη και Μ. Φράγκου**



**Στους γονείς μου Ιωάννη και Ελένη
και στην αδερφή μου Σοφία**



**Στη μνήμη του παππού μου ιατρού Κωνίνου Νικολάου,
που μου ενέπνευσε την αγάπη για την Ιατρική και την πρόοδο**



ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στο Ενδοκρινολογικό Τμήμα του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων, στο Αιματολογικό Εργαστήριο-Μονάδα Μοριακής Βιολογίας του ίδιου Νοσοκομείου και στο Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, με χρηματική υποστήριξη Ερευνητικών Προγραμμάτων της Ελληνικής Ενδοκρινολογικής Εταιρείας και της Επιτροπής Ερευνών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

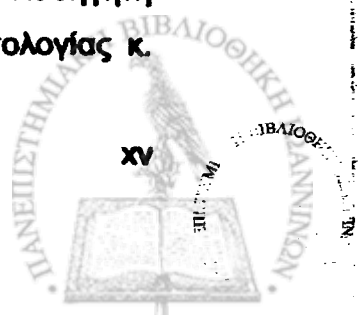
Την επίβλεψη της διατριβής είχε ο Καθηγητής Παθολογίας-Ενδοκρινολογίας κ.Αγαθοκλής Τσατσούλης, τον οποίον και ευχαριστώ θερμά για την ανάθεση του θέματος, την επιστημονική του καθοδήγηση, τη συνεχή παρακολούθηση και ηθική του συμπαράσταση σε όλα τα στάδια της διατριβής. Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας κ.Μαρία Φράγκου-Λαζαρίδη, για τον καθοριστικό της ρόλο στην ολοκλήρωση αυτής της μελέτης, το αμείωτο ενδιαφέρον της και την πολύπλευρη συμπαράστασή της. Και οι δύο με την εμπειρία τους, το οργανωτικό τους πνεύμα και την αγάπη τους για επιστημονική πρόοδο με ενέπνευσαν και με ενδυνάμωσαν, ώστε να υπερνικήσω κάθε δυσκολία που παρουσιάστηκε κατά τη διεξαγωγή της παρούσας διατριβής.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά:

Τον Δρ. Γεώργιο Βαρθολομάτο, για την καθοριστική βοήθεια που μου παρείχε σε όλα τα στάδια εκπόνησης της διατριβής. Η παρουσία του στο εργαστήριο ήταν καταλυτική για την εξέλιξη της εργασίας και η επιστημονική και ηθική του υποστήριξη ανεκτίμητη.

Τον Διευθυντή του Αιματολογικού Εργαστηρίου κ. Νικόλαο Κολαίτη, ο οποίος συνέβαλε σημαντικά στην εφαρμογή της μεθόδου ELISA και στην αξιολόγηση των αποτελεσμάτων θέτοντας εύστοχα ερωτήματα και εξασκώντας γόνιμη κριτική.

Τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής: τον Καθηγητή Παθολογίας κ. Μωϋσή Ελισσάφ, τον Καθηγητή Παθολογίας-Ρευματολογίας κ.



Αλέξανδρο Δρόσο, τον Καθηγητή Παθολογίας-Ογκολογίας κ. Νικόλαο Παυλίδη, τον Καθηγητή Παθολογίας-Νεφρολογίας κ. Κωνσταντίνο Σιαμόπουλο και τον Επίκουρο Καθηγητή Βιολογικής Χημείας κ. Ευστάθιο Φριλίγγο, για την προθυμία τους να αποτελέσουν μέλη της επιτροπής αφιερώνοντας μέρος από τον πολύτιμο χρόνο τους.

Τον Δρ. Γεώργιο Τσάγκαρη, από το Χωρέμιο Ερευνητικό Εργαστήριο του Νοσοκομείου Παιδων «Αγία Σοφία», που μου δίδαξε την τεχνική της ανοσοκυτταροχημείας.

Το συνάδελφο Παρασκευά Κουτσούμπα για τη βοήθειά του στη συλλογή των δειγμάτων.

Τους Δρ. Γεώργιο Κολλιό και Χρυσούλα Καλογερά του Βιοχημικού Εργαστηρίου του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων, για τη συμβολή τους στο εργαστηριακό μέρος.

Το συνάδελφο Κωνσταντίνο Λέτσα και τους συναδέλφους του Ενδοκρινολογικού Τμήματος για την άψογη συνεργασία μας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου, γιατί πέρα από την οικονομική υποστήριξή τους, στάθηκαν δίπλα μου, μοιράστηκαν τις αγωνίες και τους προβληματισμούς μου και με την ηθική τους υποστήριξη συνέβαλαν σημαντικά στην ολοκλήρωση αυτής της διατριβής.



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΙΚΟΝΕΣ.....	xxi
ΠΙΝΑΚΕΣ.....	xxv
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ.....	xxvii

ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ - ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΓΕΝΙΚΑ ΓΙΑ ΑΠΟΠΤΩΣΗ.....	1
1.1.1 Ο όρος απόπτωση - Ιστορική αναδρομή	1
1.1.2 Απόπτωση και Νέκρωση	3
1.1.3 Η απόπτωση στην υγεία και στην ασθένεια.....	6
1.1.4 Ανίχνευση της απόπτωσης.....	12
1.1.5 <i>Caenorhabditis elegans</i> ως πειραματικός οργανισμός	13
1.2 ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΟΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ	
ΟΔΟΙ ΜΕΤΑΔΟΣΗΣ ΣΗΜΑΤΩΝ	16
1.2.1 Βιοχημικοί και μοριακοί μηχανισμοί	16
1.2.2 Μηχανισμός και ρύθμιση της απόπτωσης.....	17
1.2.3 Ορμονική ρύθμιση της απόπτωσης.....	23
1.2.4 Γονίδια που σχετίζονται με την απόπτωση.....	24
1.2.5 Υπεροικογένεια υποδοχέων του Παράγοντα Νέκρωσης	
των Όγκων TNF.....	29
α. Υποδοχέας θανάτου Fas (Fas Death Receptor).....	32
β. Προσδεδικό μόριο Fas Ligand.....	35
γ. Διαλυτή μορφή υποδοχέα Fas (sFas).....	37
δ. Διαλυτή μορφή προσδεδικού μορίου Fas Ligand (sFasL).....	42
ε. Μετάδοση αποπτωτικών σημάτων μέσω του υποδοχέα TNFR1	44
στ. Μετάδοση αποπτωτικών σημάτων μέσω του υποδοχέα DR3.....	47
ζ. Μετάδοση αποπτωτικών σημάτων μέσω του μορίου TRAIL	
και των υποδοχέων του DR4 και DR5	48
η. Μελλοντικές προοπτικές	50
1.2.6 Κασπάσες - Οι «εκτελεστές» της απόπτωσης.....	51
α. Ρόλος των κασπασών στην απόπτωση	53
β. Τρόπος δράσης των κασπασών.....	54
1.2.7 Μιτοχόνδρια	55
α. Πυροδότηση αποπτωτικού και μη αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου	
από τα μιτοχόνδρια.....	59
1.2.8 Η οικογένεια πρωτεϊνών Bcl-2	60

α.	Προαποπτωτικές Bcl-2 πρωτεΐνες	61
β.	Αντι-αποπτωτικές Bcl-2 πρωτεΐνες	62
1.3	ΘΥΡΕΟΕΙΔΗΣ ΑΔΕΝΑΣ	66
1.3.1	Ανατομία και ιστολογία του θυρεοειδούς αδένος	66
1.3.2	Φυσιολογία του θυρεοειδούς αδένος	68
1.3.3	Εργαστηριακή διερεύνηση του θυρεοειδούς αδένος.....	70
α.	Ορμονική διερεύνηση της θυρεοειδικής λειτουργίας	70
β.	Αντισώματα κατά θυρεοειδικών αντιγόνων	71
γ.	Υπερηχογράφημα θυρεοειδούς αδένος	72
δ.	Σπινθηρογράφημα θυρεοειδούς αδένος	72
ε.	Παρακέντηση θυρεοειδούς αδένος με αναρρόφηση δια λεπτής βελόνης (FNA) και κυτταρολογική διάγνωση	73
στ.	Μοριακή γενετική ανάλυση σε υλικό FNA θυρεοειδούς αδένος	74
1.3.4	Οζώδης θυρεοειδική νόσος.....	75
α.	Βρογχοκήλη	75
β.	Θυρεοειδίτιδα Hashimoto	81
1.4	Fas-FasL ΕΠΑΓΟΜΕΝΗ ΑΠΟΠΤΩΣΗ ΚΑΙ ΘΥΡΕΟΕΙΔΗΣ ΑΔΕΝΑΣ	82
1.4.1	Συμβολή απόπτωσης στην παθογένεια αυτοάνοσων θυρεοειδικών νόσων	82
1.4.2	Έκφραση προ-αποπτωτικών και αντι-αποπτωτικών γονιδίων στο θυρεοειδή αδένος.....	87
α.	Έκφραση πρωτεΐνης Fas στις θυρεοειδικές παθήσεις	89
β.	Έκφραση πρωτεΐνης Fas Ligand στις θυρεοειδικές παθήσεις	91
γ.	Επίπεδα διαλυτής μορφής της πρωτεΐνης Fas στις θυρεοειδικές παθήσεις	92
δ.	Έκφραση πρωτεΐνης Bcl-2 στις θυρεοειδικές παθήσεις.....	94
1.4.3	Αναστολείς της οδού Fas-Fas Ligand	95
1.4.4	Βρογχοκήλη και απόπτωση	96
1.4.5	Θυρεοειδίτιδα Hashimoto και απόπτωση.....	97
1.5	ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	103

ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ – ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ

2.1	ΕΚΦΡΑΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ Fas ΚΑΙ Bcl-2 ΣΕ ΘΥΡΕΟΕΙΔΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ	107
2.1.1	Ασθενείς.....	107
2.1.2	Μέθοδοι.....	107
α.	Υπερηχογράφημα θυρεοειδούς αδένος	107
β.	Δοκιμασίες θυρεοειδικής λειτουργίας	110
γ.	Παρακέντηση θυρεοειδούς αδένος με αναρρόφηση δια λεπτής βελόνης	110
δ.	Κυτταρολογική εξέταση	112
ε.	Ανοσοκυτταροχημεία	114



Προετοιμασία	115
Πρωτόκολλο εκτέλεσης	118
στ. Εκτίμηση της ανοσοαντιδραστικότητας	119
2.1.3 Αποτελέσματα	120
α. Υπερηχογραφικά ευρήματα	120
β. Δοκιμασίες θυρεοειδικής λειτουργίας	121
γ. Κυτταρολογικά ευρήματα	124
δ. Έκφραση πρωτεϊνών Fas και Bcl-2	130
Α. Μη τοξική βρογχοκήλη	130
Β. Θυρεοειδίτιδα Hashimoto	131

2.2 ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΤΩΝ ΔΙΑΛΥΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

sFas ΚΑΙ sFas Ligand ΣΤΟΝ ΟΡΟ	144
2.2.1 Ασθενείς	144
2.2.2 Μέθοδοι	144
α. Υπερηχογράφημα θυρεοειδούς αδένος	144
β. Συλλογή δειγμάτων	144
γ. Δοκιμασίες θυρεοειδικής λειτουργίας	145
δ. Κυτταρολογική εξέταση υλικού FNA θυρεοειδούς	145
ε. Ανοσοπροσροφητικός προσδιορισμός συνδεδεμένος με ένζυμο (ELISA)	145
Αρχή της μεθόδου	145
ELISA τύπου "sandwich"	146
Υλικά	146
Πρωτόκολλο εκτέλεσης	147
στ. Στατιστική ανάλυση	153
2.2.3 Αποτελέσματα	161
α. Υπερηχογραφικά ευρήματα	161
β. Δοκιμασίες θυρεοειδικής λειτουργίας	161
γ. Κυτταρολογική εξέταση	162
δ. Καθορισμός επιπέδων διαλυτής πρωτεΐνης Fas	162
ε. Συσχέτιση επιπέδων sFas με φύλο και ηλικία	163
στ. Συσχέτιση επιπέδων sFas ορού με κλινικές παραμέτρους	169
ζ. Καθορισμός των επιπέδων της διαλυτής πρωτεΐνης sFasL	169

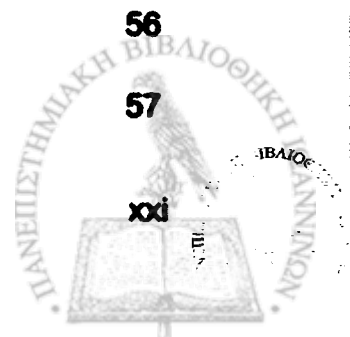
2.3 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ mRNA ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ Fas ΚΑΙ Fas Ligand

ΣΕ ΘΥΡΕΟΕΙΔΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ	173
2.3.1 Ασθενείς	173
2.3.2 Μέθοδοι	173
α. Υπερηχογράφημα θυρεοειδούς αδένος	173
β. Συλλογή δειγμάτων	173
γ. Δοκιμασίες θυρεοειδικής λειτουργίας	174
δ. Κυτταρολογική εξέταση υλικού FNA θυρεοειδούς	174
ε. Υλικά	174
στ. Διαλύματα	175

ζ.	Απομόνωση RNA.....	176
	A) Διαχωρισμός FICOLL	176
	B) Απομόνωση RNA από κύτταρα αίματος	177
	Γ) Απομόνωση RNA από υλικό FNA θυρεοειδούς αδένος.....	178
η.	Απομόνωση DNA από δείγμα αίματος με TriPure Isolation Reagent	180
θ.	Μέθοδος αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR).....	181
ι.	Μέθοδος ανάστροφης μεταγραφής-αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (RT-PCR)	183
κ.	Ηλεκτροφόρηση DNA.....	194
	Παρασκευή πηκτής αгарόζης	195
2.3.3	Αποτελέσματα	198
α.	Ανίχνευση των mRNAs για τις πρωτεΐνες Fas και FasL.....	198
2.4	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	209
ΜΕΡΟΣ ΤΡΙΤΟ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ	213	
	Η έκφραση της πρωτεΐνης Fas στην οζώδη θυρεοειδική νόσο	215
	Η έκφραση της πρωτεΐνης Fas Ligand στην οζώδη θυρεοειδική νόσο	217
	Ο ρόλος των διαλυτών πρωτεϊνών Fas και FasL στην απόπτωση των θυρεοειδικών κυττάρων	218
	Η έκφραση της πρωτεΐνης Bcl-2 στην οζώδη θυρεοειδική νόσο.....	221
	Συμπεράσματα – Μελλοντικές προοπτικές.....	223
ΜΕΡΟΣ ΤΕΤΑΡΤΟ – ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ.....	227	
	Περίληψη	231
	Summary	235
ΜΕΡΟΣ ΠΕΜΠΤΟ – ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	239	
ΜΕΡΟΣ ΕΚΤΟ – ΓΛΩΣΣΑΡΙΟ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ	275	
ΜΕΡΟΣ ΕΒΔΟΜΟ – ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ.....	303	

EIKONEΣ

Εικόνα 1	
Στάδια και διαφορές απόπτωσης και νέκρωσης	5
Εικόνα 2	
Η εξάλειψη ενεργοποιημένων T-λεμφοκυττάρων μέσω Fas/CD95 κατά τη λήξη μιας ανοσολογικής αντίδρασης	10
Εικόνα 3	
Αλληλεπιδράσεις T-κυττάρων με καρκινικά κύτταρα	11
Εικόνα 4	
Το αποπτοσωματικό μοντέλο της ρύθμισης του κυτταρικού θανάτου	14
Εικόνα 5	
Ενεργοποίηση της απόπτωσης από έλλειψη κυτταροκίνης	18
Εικόνα 6	
Γεγονότα στα οποία οδηγεί η απομάκρυνση μιας κυτταροκίνης που απαιτείται για την κυτταρική επιβίωση	19
Εικόνα 7	
Συμμετοχή της οικογένειας ICE στην απόπτωση	26
Εικόνα 8	
Αλληλεπιδράση πρωτεϊνών Bcl-2/Bax	27
Εικόνα 9	
Ομολογία μελών της οικογένειας TNF	30
Εικόνα 10	
Ο υποδοχέας Fas και άλλες πρωτεΐνες με περιοχές θανάτου	31
Εικόνα 11	
Επαγωγή απόπτωσης μέσω αλληλεπιδράσης Fas-FasL	34
Εικόνα 12	
Ισομορφές της πρωτεΐνης Fas	39
Εικόνα 13	
Αναστολή Fas-επαγόμενης απόπτωσης μέσω διαλυτής πρωτεΐνης Fas	40
Εικόνα 14	
Διαλυτή μορφή πρωτεΐνης Fas Ligand (sFasL)	43
Εικόνα 15	
Μεταγωγή προ-αποπτωτικών και αντι-αποπτωτικών σημάτων μέσω των υποδοχέων TNFR1 και DR3	46
Εικόνα 16	
Μετάδοση αποπτωτικών σημάτων μέσω των υποδοχέων DR4 και DR5 και τροποποίηση της οδού μετάδοσης από τους υποδοχείς DcR1 και DcR2	49
Εικόνα 17	
Ενεργοποίηση κασπασών	56
Εικόνα 18	
Τρόποι δράσης των κασπασών	57



Εικόνα 19	
Η ευρύτερη οικογένεια πρωτεϊνών Bcl-2	63
Εικόνα 20	
Μοντέλο ρύθμισης Araf-1 από την οικογένεια Bcl-2	64
Εικόνα 21	
Ανατομικές δομές του τραχήλου	67
Εικόνα 22	
Ιστολογική εικόνα φυσιολογικού θυρεοειδούς αδένα	67
Εικόνες 23 Α και Β	
Διόγκωση θυρεοειδούς αδένα στην οζώδη βρογχοκήλη	78
Εικόνα 24	
Ιστολογική εικόνα βρογχοκήλης	79
Εικόνα 25	
Ιστολογική εικόνα θυρεοειδίτιδας Hashimoto	80
Εικόνα 26	
Οδός Fas-Fas Ligand	83
Εικόνα 27	
Έκφραση Fas, FasL και Bcl-2 στη θυρεοειδίτιδα Hashimoto	90
Εικόνα 28	
Παρακέντηση θυρεοειδούς αδένα δια λεπτής βελόνης (FNA)	113
Εικόνα 29	
FNA βιοψία ασθενών με οζώδη βρογχοκήλη	116
Εικόνα 30	
FNA βιοψία ασθενών με θυρεοειδίτιδα Hashimoto	117
Εικόνα 31	
Υπερηχογράφημα θυρεοειδούς αδένα ασθενούς με οζώδη βρογχοκήλη	122
Εικόνα 32	
Υπερηχογράφημα θυρεοειδούς αδένα ασθενούς με θυρεοειδίτιδα Hashimoto	123
Εικόνα 33	
FNA βιοψία ασθενούς με κολλοειδή οζώδη βρογχοκήλη	126
Εικόνα 34	
FNA βιοψία ασθενούς με υπερπλασία κυτταρικού τύπου	127
Εικόνα 35	
FNA βιοψία ασθενούς με θυρεοειδίτιδα Hashimoto	129
Εικόνα 36	
Βαθμός έκφρασης πρωτεΐνης Fas κατά ομάδα ασθενών	132
Εικόνα 37	
Έκφραση πρωτεΐνης Fas (βαθμός 1) σε θυρεοειδικά κύτταρα κολλοειδούς οζώδους βρογχοκήλης	133
Εικόνα 38	
Έκφραση πρωτεΐνης Fas (βαθμός 1) σε θυρεοειδικά κύτταρα αδενωματώδους βρογχοκήλης	134
Εικόνα 39	
Έκφραση πρωτεΐνης Fas (βαθμός 1) σε θυρεοειδικά κύτταρα αδενωματώδους βρογχοκήλης	135



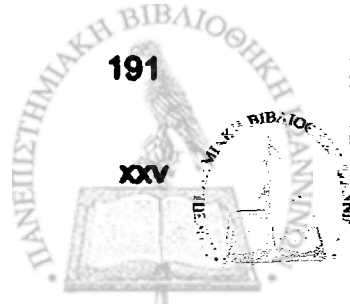
Εικόνα 40	
Βαθμός έκφρασης πρωτεΐνης Bcl-2 κατά ομάδα ασθενών	136
Εικόνα 41	
Έκφραση πρωτεΐνης Bcl-2 (βαθμός 2) σε θυρεοειδικά κύτταρα αδενωματώδους βρογχοκήλης	137
Εικόνα 42	
Έκφραση πρωτεΐνης Bcl-2 (βαθμός 3) σε θυρεοειδικά κύτταρα αδενωματώδους βρογχοκήλης	138
Εικόνα 43	
Έκφραση πρωτεΐνης Bcl-2 (βαθμός 3) σε θυρεοειδικά κύτταρα αδενωματώδους βρογχοκήλης	139
Εικόνα 44	
Έκφραση πρωτεΐνης Fas (βαθμός 3) σε θυρεοειδικά κύτταρα θυρεοειδίτιδας Hashimoto	140
Εικόνα 45	
Έκφραση πρωτεΐνης Fas (βαθμός 3) σε θυρεοειδικά κύτταρα θυρεοειδίτιδας Hashimoto	141
Εικόνα 46	
Έκφραση πρωτεΐνης Fas (βαθμός 3) σε θυρεοειδικά κύτταρα θυρεοειδίτιδας Hashimoto	142
Εικόνα 47	
Έκφραση πρωτεΐνης Bcl-2 σε κύτταρα θυρεοειδίτιδας Hashimoto	143
Εικόνα 48	
Σχηματική αναπαράσταση της τεχνικής ELISA για τη μέτρηση των επιπέδων της διαλυτής πρωτεΐνης sFas στον ορό	148
Εικόνα 49	
Σχηματική απεικόνιση μικροφρεατίου και τυπική σειρά πειραματικών βημάτων της ELISA για τη μέτρηση της διαλυτής πρωτεΐνης sFasL	150
Εικόνα 50	
Καμπύλη αναφοράς 1 για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης της διαλυτής πρωτεΐνης sFas στον ορό	154
Εικόνα 51	
Καμπύλη αναφοράς 2 για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης της διαλυτής πρωτεΐνης sFas στον ορό	155
Εικόνα 52	
Καμπύλη αναφοράς 3 για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης της διαλυτής πρωτεΐνης sFas στον ορό	156
Εικόνα 53	
Καμπύλη αναφοράς 1 για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης της διαλυτής πρωτεΐνης sFas Ligand στον ορό	157
Εικόνα 54	
Καμπύλη αναφοράς 2 για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης της διαλυτής πρωτεΐνης sFas Ligand στον ορό	158
Εικόνα 55	
Καμπύλη αναφοράς 3 για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης της διαλυτής πρωτεΐνης sFas Ligand στον ορό	159

Εικόνα 56	
Καρπύλη αναφοράς 4 για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης της διαλυτής πρωτεΐνης sFas Ligand στον ορό	160
Εικόνα 57	
Εξατομικευμένες τιμές πρωτεΐνης sFas στον ορό	165
Εικόνα 58	
Συγκέντρωση πρωτεΐνης sFas στον ορό	166
Εικόνα 59	
Συγκέντρωση διαλυτής πρωτεΐνης sFas κατά φύλο και ομάδα	167
Εικόνα 60	
Συσχέτιση επιπέδων sFas ορού με ηλικία	168
Εικόνα 61	
Συσχέτιση επιπέδων sFas με τα επίπεδα της ορμόνης TSH στον ορό	170
Εικόνα 62	
Συσχέτιση επιπέδων πρωτεΐνης sFas και αντισωμάτων anti-TPO	171
Εικόνα 63	
Ιστογράμμο συγκέντρωσης πρωτεΐνης sFasL στον ορό των εξεταζόμενων ατόμων	172
Εικόνα 64	
Σχηματική απεικόνιση των βημάτων της διαδικασίας RT-PCR	185
Εικόνα 65	
Fas mRNA	186
Εικόνα 66	
Fas Ligand mRNA	187
Εικόνα 67	
Διαδικασία παρασκευής πηκτής αγαρόζης για οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης	196
Εικόνα 68	
Η πορεία των αντιδράσεων που ακολουθήθηκε για την ανίχνευση του Fas mRNA	202
Εικόνα 69	
Αντιδράσεις RT-PCR που πραγματοποιήθηκαν για την ανίχνευση Fas mRNA	202
Εικόνα 70	
Βέλτιστες συνθήκες για την ανίχνευση Fas mRNA σε κύτταρα αίματος	203
Εικόνα 71 A	
Αντιδράσεις RT-PCR που πραγματοποιήθηκαν για την ανίχνευση FasL mRNA σε κύτταρα αίματος	204
Εικόνα 71 B	
Αντιδράσεις RT-PCR που πραγματοποιήθηκαν για την ανίχνευση FasL mRNA σε κύτταρα αίματος	205
Εικόνα 72	
Αντιδράσεις RT-PCR που πραγματοποιήθηκαν για την ανίχνευση Fas mRNA σε δείγματα FNA	207
Εικόνα 73	
Αντιδράσεις RT-PCR που πραγματοποιήθηκαν για την ανίχνευση Fas και FasL mRNA σε δείγματα FNA	208



ΠΙΝΑΚΕΣ

Πίνακας 1:	
Μορφολογικά χαρακτηριστικά απόπτωσης και νέκρωσης	4
Πίνακας 2:	
Βιοχημικά χαρακτηριστικά απόπτωσης και νέκρωσης	4
Πίνακας 3:	
Ασθένειες που σχετίζονται με μειωμένη απόπτωση	9
Πίνακας 4:	
Ασθένειες που σχετίζονται με αυξημένη απόπτωση	9
Πίνακας 5:	
Ορμονικοί παράγοντες που ρυθμίζουν την απόπτωση	20
Πίνακας 6:	
Γονίδια που ενέχονται στον αποπτωτικό μηχανισμό	28
Πίνακας 7:	
Οι υποδοχείς της οικογένειας TNF και τα αντίστοιχα προσδετικά μόρια που συνδέονται με αυτούς	28
Πίνακας 8:	
Οι κασπάσες που είναι γνωστές μέχρι σήμερα	58
Πίνακας 9:	
Βιβλιογραφικά δεδομένα για την έκφραση της πρωτεΐνης Fas στα θυρεοειδικά κύτταρα	98
Πίνακας 10:	
Βιβλιογραφικά δεδομένα για την έκφραση της πρωτεΐνης Fas Ligand στα θυρεοειδικά κύτταρα	99
Πίνακας 11:	
Η έκφραση των πρωτεϊνών Fas και Bcl-2 (βαθμοί 1-3) σε ασθενείς με NTG σε σχέση με τα κυτταρολογικά ευρήματα και τις δοκιμασίες θυρεοειδικής λειτουργίας	125
Πίνακας 12:	
Η έκφραση των πρωτεϊνών Fas και Bcl-2 (βαθμοί 1-3) σε ασθενείς με HT σε σχέση με τις δοκιμασίες θυρεοειδικής λειτουργίας	128
Πίνακας 13:	
Δημογραφικά δεδομένα και επίπεδα sFas (mean $\pm$ SD) στα 2 φύλα κάθε ομάδας εξεταζόμενων ατόμων	164
Πίνακας 14:	
Αντιδραστήρια που παρέχονται με το πακέτο υλικών Titan One Tube RT-PCR kit	190
Πίνακας 15:	
Μεταβλητές της αντίδρασης RT-PCR που μελετήθηκαν για τον καθορισμό των βέλτιστων συνθηκών	190
Πίνακας 16:	
Αντιδραστήρια που αποτελούν το Μίγμα I της αντίδρασης RT-PCR	191



Πίνακας 17:

Αντιδραστήρια που αποτελούν το Μίγμα II της αντίδρασης RT-PCR 191

Πίνακας 18:

Βέλτιστες συνθήκες της αντίδρασης RT-PCR για την ανίχνευση mRNAs των πρωτεϊνών Fas, FasL και β-ακτίνης 193

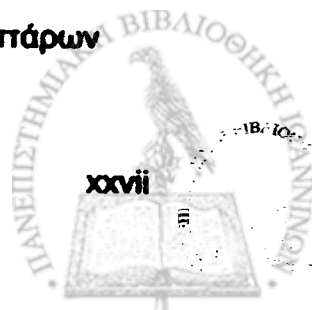
Πίνακας 19:

Αντιδραστήρια RT-PCR από RNA θυρεοειδικών κυττάρων (λήψη με FNA) 206



ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

βλ.	βλέπε
β-gal	β-γαλακτοσιδάση
σελ.	σελίδα
Ab	antibody, αντίσωμα
AMV	avian myeloblastosis virus particles
Ag	antigen, αντιγόνο
AITD	autoimmune thyroid disease, αυτοάνοση θυρεοειδική νόσος
Anti-TPO	thyroid peroxidase antibodies, αντισώματα κατά της θυρεοειδικής υπεροξειδάσης
Anti-TSHR	TSH-Receptor antibodies, αντισώματα κατά του υποδοχέα της θυρεοτροπίνης
AP	alkaline phosphatase, αλκαλική φωσφατάση
bp	base pairs, ζεύγη βάσεων
Ca	καρκίνωμα
CD	clusters of differentiation, δείκτες κυτταρικής επιφάνειας
cDNA	complementary DNA, συμπληρωματικό DNA
cm	centimeter, εκατοστό
CMIA	chemiluminescent microparticle immunoassay, ανοσοπροσδιορισμός μικροσωματιδίων με χημειοφωταύγεια
dl	deciliter, δεκατόλιτρο
DEPC	diethylpyrocarbonate, διαιθυλοπυρανθρακικός
DDT	dithiothreitol, διθειοθρεϊτόλη
dH₂O	απεσταγμένο νερό
DIT	diiodotyrosine, διϊωδοτυροσίνη
DMSO	dimethyl sulfoxide, διμεθυλοσουλφοξείδιο
DNA	deoxyribonucleic acid, δεοξυριβονουκλεϊνικό οξύ
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid, αιθυλενοδιαμινο-τετραοξικό οξύ
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay, ανοσοπροσροφητικός προσδιορισμός συνδεδεμένος με ένζυμο
EtBr	ethidium bromide, βρωμιούχο αιθίδιο
EtOH	ethanol, αιθανόλη
et al	και συνεργάτες
FNA	fine-needle aspiration, αναρρόφηση δια λεπτής βελόνης
FT3	free T3, ελεύθερη τριϊωδοθυρονίνη
FT4	free T4, ελεύθερη τετραϊωδοθυρονίνη (θυροξίνη)
GD	Graves' disease, νόσος Graves
GLB	gel-loading buffer, ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης
HLA	Human Leucocyte Antigen, αντιγόνο ανθρωπίνων λευκοκυττάρων
HRP	horseradish peroxidase, ραφανιδική υπεροξειδάση



HT	Hashimoto's thyroiditis, θυρεοειδίτιδα Hashimoto
ICE	Interleukin-converting enzyme, μετατρεπτικό ένζυμο ιντερλευκίνης 1β
IFN-γ	Interferon-γ, ιντερφερόνη-γ
IL-1β	Interleukin-1β, ιντερλευκίνη 1β
ISNT	In Situ Nick Translation (τεχνική ανίχνευσης απόπτωσης)
ITL	Intrathyroidal lymphocytes, ενδοθυρεοειδικά λεμφοκύτταρα
IU	international unit, διεθνής μονάδα
και συν.	και συνεργάτες
κ.ο.π	κατά οπτικό πεδίο
kDa	kilodalton, χιλιάδα
M	molarity, γραμμομοριακότητα
MB	μοριακό βάρος
Mg	magnesium, μαγνήσιο
MGG	May-Grünwald-Giemsa
MIT	monoiodytyrosine, μονοϊωδοτυροσίνη
μl	microliter, μικρόλιτρο
ml	milliliter, χιλιοστόλιτρο
mm	millimeter, χιλιοστό
mRNA	messenger RNA, αγγελιοφόρο RNA
ng	nanogram, νανογραμμάριο
NK cells	Natural Killer cells, κύτταρα φυσικοί φονείς
nm	nanometer, νανόμετρο
nl	nanoliter, νανόλιτρο
NTG	non-toxic goiter, μη τοξική (απλή) βρογχοκήλη
OD	optical density, οπτική πυκνότητα
PBS	phosphate buffered saline, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων
PCR	Polymerase Chain Reaction, αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
RNA	ribonucleic acid, ριβονουκλεϊνικό οξύ
rpm	round per minute, στροφές ανά λεπτό
RT-PCR	Reverse Transcriptase- Polymerase Chain Reaction, ανάστροφη αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
RT	room temperature, θερμοκρασία δωματίου
Ta	annealing temperature, θερμοκρασία σταδίου πρόσδεσης
TBE	Tris-Borate EDTA buffer, ρυθμιστικό διάλυμα Tris-Βορικού-EDTA
TBI	thyroid binding inhibitory immunoglobulins, ανοσοσφαιρίνες με ανασταλτική δράση που συνδέονται στα θυρεοειδικά κύτταρα
TBS	Tris-buffered saline, ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl pH 7.6
Tm	melting temperature, θερμοκρασία τήξης
TMB	3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, 3,3',5,5'-τετραμεθυλοβενζιδένιο
TPO	thyroid peroxidase, θυρεοειδική υπεροξειδάση
TRH	thyrotropin releasing hormone, εκλυτική ορμόνη της θυρεοτροπίνης
TSH	thyroid-stimulating hormone, θυρεοτροπίνη



TSHR thyroid-stimulating hormone receptor, υποδοχέας της θυρεοτροπίνης
TSI thyroid stimulating immunoglobulins, διεγερτικά θυρεοειδικά αντισώματα
TUNEL Terminal deoxynucleotidyl transferase TdT-mediated dUTP Nick End Labeling (τεχνική ανίχνευσης απόπτωσης)
Tg thyroglobulin, θυρεοσφαιρίνη
w/v weight per volume, βάρος κατ' όγκο

Σημείωση: Οι αγγλικοί όροι έχουν αποδοθεί στην ελληνική γλώσσα με βάση το αγγλοελληνικό λεξικό Βιοχημείας, Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας της Ελληνικής Βιοχημικής και Βιοφυσικής Εταιρείας (Χορηγός: Ευρωπαϊκή Ένωση, Ιωάννινα 1995)



Μέρος πρώτο

Εισαγωγή



ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΓΕΝΙΚΑ ΓΙΑ ΑΠΟΠΤΩΣΗ

1.1.1 Ο όρος «απόπτωση»

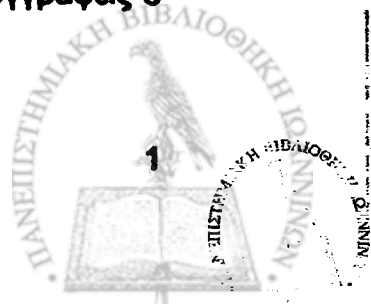
Η απόπτωση είναι μια από τις ευρύτερα χρησιμοποιούμενες λέξεις στη σύγχρονη ιατρική και βιολογία, αφού μέχρι σήμερα έχουν εντοπιστεί περί τις 20000 σχετικές αναφορές. Ο όρος εισήχθη στη σύγχρονη επιστημονική ορολογία το 1972 από τους Kerr, Wyllie και Currie (Kerr και συν. 1972) για την περιγραφή μιας μορφής κυτταρικού θανάτου, που εμφανίζει διαφορές από τη νέκρωση.

Πρόκειται για αρχαία ελληνική λέξη που σημαίνει την πτώση των φύλλων από τα δέντρα ή των πετάλων από τα λουλούδια. Συνώνυμο της απόπτωσης είναι ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος, που εκφράζει τη ρυθμιζόμενη ενεργοποίηση ενός προϋπάρχοντος προγράμματος θανάτου κωδικοποιημένου στο γενετικό υλικό.

Ιστορική αναδρομή

Στην πραγματικότητα ο όρος «απόπτωση» χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από τον Ιπποκράτη, τον πατέρα της Ιατρικής. Σε ένα από τα συγγράμματά του ο Ιπποκράτης χρησιμοποιεί τον όρο «οστέων αποπτωσίες» αναφερόμενος στα περιστατικά γάγγραινας ύστερα από αντιμετώπιση των καταγμάτων με επιδέσμους. Η λέξη απόπτωση, επομένως, επινοήθηκε για να περιγράψει δομικές μεταβολές (στην συγκεκριμένη περίπτωση οστικές διαβρώσεις), οι οποίες σχετίζονταν με τον ιστικό και κυτταρικό θάνατο.

Αργότερα, ο Έλληνας ιατρός Γαληνός αναφέρει στα συγγράμματά του τον όρο «αποπτωσίες εσχάρων». Μαζί με άλλους ρωμαίους ιατρικούς συγγραφείς ο



Γαληνός αποδείχθηκε διορατικός, αν λάβουμε υπόψη το ρόλο της απόπτωσης στην επούλωση τραυμάτων και στη φλεγμονή.

Η λέξη απόπτωση χρησιμοποιήθηκε, όμως, και σε φιλοσοφικά συγγράμματα, όπως αυτά του αυτοκράτορα-φιλοσόφου Μάρκου Αυρηλίου. Αξιοσημείωτες είναι και οι χρήσεις του όρου σε πολιτικά και κοινωνικά κείμενα, όπου η απόπτωση γίνεται συνώνυμο της αποτυχίας και της παρακμής.

Τον κυτταρικό θάνατο κατά τη φυσιολογική ανάπτυξη περιέγραψε για πρώτη φορά ο Glucksmann το 1951 (Glucksmann 1951). Το 1965, ο Kerr μελέτησε το θάνατο των ηπατοκυττάρων, μετά από απολίνωση κλάδου της πυλαίας φλέβας, όπου διέκρινε εστίες νέκρωσης, αλλά παρατήρησε και διάσπαρτα, μονήρη ηπατοκύτταρα με συρρικνωμένους πυρήνες και πυρηνικές μάζες, χωρίς ένδειξη λύσης των λυσοσωμάτων ή στοιχεία φλεγμονής (Kerr 1965). Το 1971, μετά από παρατηρήσεις στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, διαπίστωσε ότι οι πυρηνικές μάζες ήταν σωματίδια περιβαλλόμενα από μεμβράνη, που περιείχαν τμήματα συμπυκνωμένης χρωματίνης και κυτταροπλασματικά οργανίδια και αποκάλεσε το φαινόμενο «νέκρωση εκ συρρικνώσεως». Το 1972, οι Kerr και Searle, εμπνεόμενοι από την Ιλιάδα, θεώρησαν ότι η εκλεκτική και προγραμματισμένη απομάκρυνση των κυττάρων από τον οργανισμό προσομοιάζει με «τα φύλλα που ο άνεμος χαμάδης χέει» και πρότειναν να ονομαστεί το φαινόμενο «απόπτωση» (Kerr 1972).

Συμπερασματικά, δεν θα ήταν δυνατή η επιλογή καταλληλότερης λέξης για την περιγραφή του προγραμματισμένου θανάτου των κυττάρων, που έχει ως στόχο τη διατήρηση της ομοιόστασης των ιστών (Degli Esposti 1998).

Παρόλο που η απόπτωση έχει περιγραφεί εδώ και τρεις δεκαετίες ως ξεχωριστό βιολογικό φαινόμενο, μόνο πρόσφατα έγιναν σημαντικές πρόοδοι στην κατανόηση των θεμελιωδών μηχανισμών που τη ρυθμίζουν. Οι περισσότερες γνώσεις μας για τον αποπτωτικό μηχανισμό προέρχονται από τη μελέτη του νηματοειδούς σκώληκα *Caenorhabditis elegans*, ενώ η μεγαλύτερη πρόοδος συντελέστηκε από την ταυτοποίηση των «γονιδίων θανάτου» (death genes) πριν από μια δεκαετία (Ellis και συν. 1986).



1.1.2 Απόπτωση και Νέκρωση

Είναι γνωστό ότι υπάρχουν δύο κύριοι τρόποι θανάτου των ευκαρυωτικών κυττάρων: η νέκρωση και η απόπτωση (Sen 1992, Milas και συν. 1994, Steller 1995, Ameisen 1996, Barinaga 1996). Η νέκρωση (*accidental cell death*) είναι η μορφή κυτταρικού θανάτου που προκαλείται από απότομες κυτταρικές βλάβες, όπως είναι η ισχαιμία, η υπερθερμία, η υποθερμία, η υποξία, ο φυσικός ή χημικός τραυματισμός. Χαρακτηρίζεται από ρήξη της κυτταρικής μεμβράνης, οίδημα του κυτταροπλάσματος και των μιτοχονδρίων, διαρροή κυτταροπλασματικού περιεχομένου και πλήρη λύση του κυττάρου. Η νέκρωση, σε αντίθεση με την απόπτωση, οδηγεί συχνά σε οξεία φλεγμονώδη αντίδραση και παθολογική αντίδραση ιστού σε ομάδες παρακείμενων κυττάρων (Ameisen 1996) (εικόνα 1).

Η απόπτωση ή προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος (*apoptosis or programmed cell death - PCD*) είναι φυσιολογική μορφή «αυτοκτονίας» του κυττάρου (Thompson 1995), που εμφανίζεται κατά την εμβρυική ανάπτυξη (Abbadie και συν. 1993, Catlin και συν. 1993, Tata 1994, Coucounanis και συν. 1995, Haanen and Vermaes 1996, Roodman 1996, Lang 1997) και την εξέλιξη των οργάνων (Amsterdam και συν. 1997, Atwood και συν. 1995, Behl και συν. 1995, Bernal and Nunez 1995, Chun και συν. 1996, Evans-Storms and Cidlowski 1995, Hsueh και συν. 1994, Moulton και συν. 1997). Χαρακτηρίζεται από βιοχημικές και μορφολογικές αλλαγές, όπως την ταχεία δημιουργία μαλακής προσεκβολής της πλασματικής μεμβράνης (*blebbing*) χωρίς απώλεια της ακεραιότητάς της, την απώλεια των εξωτερικών χαρακτήρων της και την αλλοίωση της διαπερατότητας της μεμβράνης, την απώλεια επαφής με γειτονικά κύτταρα, τη διάλυση του πυρηνίσκου και του κυτταροσκελετού, την εκτεταμένη καταστροφή στη χρωματίνη, την κατάτμηση του DNA σε ολιγονουκλεοσώματα, τη συμπύκνωση του πυρήνα, την απώλεια μιτοχονδριακής λειτουργίας και τη συρρίκνωση του κυττάρου (πίνακες 1,2) (εικόνα 1).

Κατά την απόπτωση γίνεται συμπύκνωση του κυτταροπλάσματος με διατήρηση, όμως, της ακεραιότητας των οργανιδίων του. Γίνεται, επιπλέον, διάτρηση της κυτταρικής επιφάνειας, με αποτέλεσμα τη δημιουργία «αποπτωτικών σωματιδίων» διαφόρων μεγεθών και σύστασης, τα οποία παραμένουν συνδεδεμένα με τη μεμβράνη (εικόνα 1). Αυτά τα σωματίδια



Πίνακας 1:

Μορφολογικά χαρακτηριστικά απόπτωσης και νέκρωσης

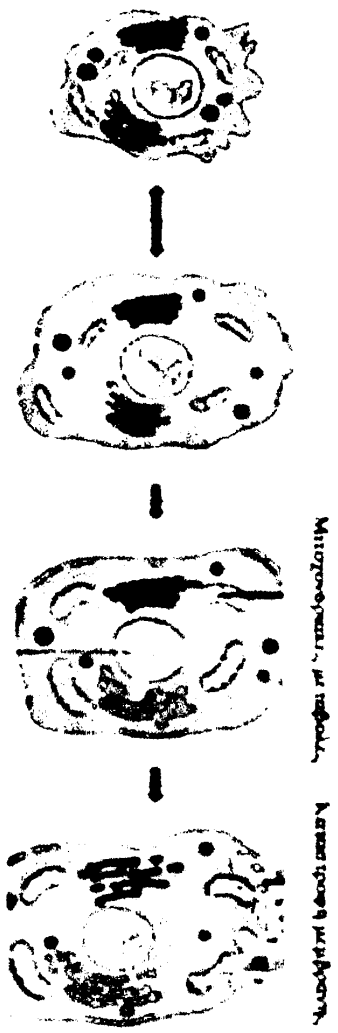
ΝΕΚΡΩΣΗ	ΑΠΟΠΤΩΣΗ
• Απώλεια ακεραιότητας μεμβράνης • Οίδημα κυτταροπλάσματος και μιτοχονδρίων • Πλήρης λύση του κυττάρου	• Blebbing κυτταρικής μεμβράνης χωρίς απώλεια ακεραιότητας • Συσσωμάτωση χρωματίνης στην πυρηνική μεμβράνη • Συρρίκνωση κυτταροπλάσματος • Συμπύκνωση πυρήνα • Κατάτμηση κυττάρου σε μικρότερα τμήματα • Δημιουργία αποπτωτικών σωματιδίων

Πίνακας 2 :

Βιοχημικά χαρακτηριστικά νέκρωσης και απόπτωσης

ΝΕΚΡΩΣΗ	ΑΠΟΠΤΩΣΗ
• Απορρύθμιση της ομοιόστασης ιόντων • Παθητική διαδικασία Δεν απαιτείται ενέργεια • Τυχαία πέψη του DNA (smear DNA μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης) • Κατάτμηση του DNA μετά τη λύση του κυττάρου	• Ισχυρά ρυθμιζόμενη διαδικασία με ενεργοποίηση ενζύμων • Ενεργητική διαδικασία ATP-εξαρτώμενη • Όχι τυχαία κατάτμηση του DNA (ladder pattern μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης) • Κατάτμηση DNA πριν τη λύση του κυττάρου • Απελευθέρωση παραγόντων από τα μιτοχόνδρια στο κυτταρόπλασμα (κυτόχρωμα c, AIF) • Ενεργοποίηση αλυσιδωτής αντίδρασης των κασπασών • Μεταβολές στη μεμβράνη (π.χ.μετατόπιση φωσφατιδυλοσερίνης από την κυτταροπλασματική στην έξω λιπιδική στιβάδα της μεμβράνης)

NEKROΣΗ



Φυσιολογικό κύτταρο Αναστρέψιμο σάβας Μη αναστρέψιμο σάβας Αβού κύτταρο

ΑΠΟΠΤΩΣΗ



Φυσιολογικό κύτταρο Στερέωση Κατέργου κύτταρο Αποστρεψιμής νέκρωσης

Εικόνα 1
Στάδια και διαφορές απόπτωσης και νέκρωσης

φαγοκυτταρώνονται από γειτονικά κύτταρα και διασπώνται από λυσοσωματικά ένζυμα.

Παρόλα αυτά έχουν εντοπισθεί και κύτταρα τα οποία κατά το θάνατό τους εμφανίζουν μίγμα αποπτωτικών και νεκρωτικών μορφολογικών χαρακτηριστικών. Η ενδιάμεση αυτή μορφή θανάτου φαίνεται ότι οφείλεται στη διαφορετική κάθε φορά έκφραση αλληλοεπικαλυπτόμενων νεκρωτικών και αποπτωτικών διαδικασιών και την κάλυψη της απόπτωσης από τη λεγόμενη «δευτεροπαθή νέκρωση» (Papassotiropoulos και συν. 1996) (εικόνα 1). Αυτή η κατάσταση μπορεί να ονομασθεί «νεκραπόπτωση» (necrapoptosis). Η μορφή του κυτταρικού θανάτου (νεκρωτική, αποπτωτική ή νεκραποπτωτική) εξαρτάται από την ένταση και τη διάρκεια των τραυματικών ερεθισμάτων και από τα ενεργειακά αποθέματα του κυττάρου. Σε αντίθεση με την απόπτωση, η νέκρωση δεν απαιτεί ενέργεια. Έτσι, κύτταρα που έχουν μπει στη διαδικασία της απόπτωσης, μπορεί στη συνέχεια να υποστούν νέκρωση λόγω ελάττωσης των ενεργειακών επιπέδων, όπως υποστηρίζουν ορισμένοι ερευνητές (Saikumar 1998). Αυτή η αλληλοεπικάλυψη νεκρωτικών και αποπτωτικών φαινομένων είχε ως αποτέλεσμα τη λανθασμένη ερμηνεία μηχανισμών κυτταρικού θανάτου σε ιστούς που νοσούν και κυρίως σε ιστούς που εμφανίζουν ισχαιμία.

Πρέπει να αποδεχθούμε ότι ο όρος «νέκρωση» είναι ανακριβής, αφού αναφέρεται σε πληθώρα μεταβολών που εμφανίζονται τόσο στον «προγραμματισμένο» όσο και στον «τυχαίο» (accidental) κυτταρικό θάνατο. Επομένως, επειδή η απόπτωση είναι μια ισχυρά ρυθμιζόμενη και ενεργειακά εξαρτώμενη διαδικασία, ο όρος «μη αποπτωτικός κυτταρικός θάνατος» (non-apoptotic cell death) είναι πιο κατάλληλος σε σύγκριση με τον όρο «νέκρωση» (Ανδρίκουλα και Βαρθολομάτος 2001).

1.1.3 Η απόπτωση στην υγεία και στην ασθένεια

Ενώ μέχρι τώρα θεωρούσαμε τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων ως την κύρια παράμετρο ελέγχου του κυτταρικού πληθυσμού, διαπιστώθηκε ότι το ίδιο σημαντικό είναι και ο κυτταρικός θάνατος.

Ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος εμφανίζεται σπάνια σε προκαρυωτικούς οργανισμούς ή πρωτόζωα, ενώ έχει περιγραφεί σε λίγους μονοκυττάριους οργανισμούς. Στα αμφίβια, η απόπτωση ευθύνεται για την εξέλιξη



των προνυμφικών οργάνων κατά τη μεταμόρφωση. Επομένως, εξελικτικά η απόπτωση υπήρχε ως φαινόμενο και η πολυπλοκότητά του είναι αλληλένδετη με την εξέλιξη των όντων (Ameisen 1996).

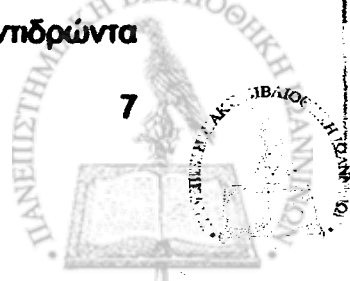
Ο αποπτωτικός θάνατος έχει σημαντικούς βιολογικούς ρόλους στην ομοιόσταση και τη φυσιολογική ανάπτυξη των θηλαστικών. Καλά μελετημένα μοντέλα απόπτωσης είναι η εξάλειψη των κυτάρων κατά την ανάπτυξη του εντερικού βλεννογόνου και του αμφιβληστροειδούς (Hazanen and Vermaes 1996).

Η ομοιόσταση διατηρείται στους πολυκύτταρους οργανισμούς με την ισορροπία κυτταρικού πολλαπλασιασμού – κυτταρικού θανάτου. Η απόπτωση είναι η μορφή κυτταρικού θανάτου χάρη στην οποία γίνεται συνεχής ανανέωση των ιστών με κυτταρική διαίρεση, ενώ ταυτόχρονα διατηρείται το επίπεδο σταθερότητας των διαφόρων ιστολογικών διαμερισμάτων (Ameisen 1996).

Χαρακτηριστικό παράδειγμα του ομοιοστατικού αυτού μηχανισμού αποτελεί το νευρικό σύστημα, αφού με τη νευρογένεση παράγεται ο διπλάσιος αριθμός νευρώνων από αυτόν που απαιτεί το ώριμο νευρικό σύστημα. Η μείωση του αριθμού των νευρώνων γίνεται με απόπτωση, που προκαλείται από την αλληλεπίδραση νευρώνα-ιστού (Rubin 1997).

Είναι σημαντικό να επισημανθεί ότι η φυσιολογική εξέλιξη των ενδοκρινοεξαρτώμενων ιστών, που επάγεται από μεταβολές των συγκεντρώσεων των τροφικών ορμονών στο αίμα, επιτυγχάνεται μέσω απόπτωσης (π.χ ωοθυλακική ατρησία), όπως συμβαίνει και με άλλες φυσιολογικές διαδικασίες εξέλιξης (Evans-Storms and Cidlowski 1995, Hsueh και συν. 1994, Moulton και συν. 1997). Η παθολογική ατροφία ενδοκρινοεξαρτώμενων οργάνων, ύστερα από ελάττωση της τροφικής ορμονικής διέγερσης, συνοδεύεται από ένα μαζικό κύμα απόπτωσης. Αυτό έχει παρατηρηθεί στον προστάτη, ύστερα από χειρουργική αφαίρεση των όρχεων (Sinowatz και συν. 1995) και στον φλοιό των επινεφριδίων, ύστερα από καταστολή της έκκρισης της επινεφριδιοτρόπου ορμόνης (ACTH) μέσω εξωγενούς χορήγησης γλυκοκορτικοειδών (Ceccatelli και συν. 1995).

Το ανοσοποιητικό σύστημα είναι ίσως το καλύτερο σύστημα μελέτης της απόπτωσης, γιατί ένας ιδιαίτερα μεγάλος αριθμός T- και B-κυττάρων εισέρχεται φυσιολογικά σε μια διαδικασία προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου σε πολλά στάδια της επιλογής και της διαφοροποίησής τους. Η εξάλειψη του 95% των T-λεμφοκυττάρων στο θύμο κατά τη διαδικασία επιλογής και ωρίμανσής τους είναι αποτέλεσμα της επαγωγής του αποπτωτικού μηχανισμού σε αυτοαντιδρώντα



κύτταρα (Halevy 1995). Επιπλέον, η αύξηση της αντισωματικής συγγένειας των Β-κυττάρων στα βλαστικά κέντρα είναι αποτέλεσμα της επαγωγής του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου σε Β-κύτταρα, τα οποία παρουσιάζουν ελαττωμένη συγγένεια για τα αντιγόνα. Επομένως, η επίτευξη της ωρίμανσης και του ελέγχου των Τ- και Β- λεμφοκυτταρικών ανοσολογικών αντιδράσεων είναι αποτέλεσμα της επαγωγής του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου σε αυτοαντιδρώντα ή μη-αντιδρώντα ανοσολογικά στοιχεία (εικόνα 2).

Η αποτυχία των κυττάρων να υποστούν προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο μπορεί να σχετίζεται με την παθογένεια ενός μεγάλου αριθμού ασθενειών του ανθρώπου, όπως ο *καρκίνος*, τα *αυτοάνοσα νοσήματα* και οι *ιικές λοιμώξεις* (πίνακας 3). Επίσης, μεγάλος αριθμός ασθενειών που χαρακτηρίζονται από απώλεια κυττάρων, όπως οι *νευροεκφυλιστικές διαταραχές*, το *AIDS*, και η *οστεοπόρωση* μπορεί να προκαλούνται από επιταχυνόμενους ρυθμούς κυτταρικού θανάτου (πίνακας 4) (Thompson 1995).

Σε περιπτώσεις ισχαιμίας, όπως σε έμφραγμα μυοκαρδίου (Geng 1997) ή εγκεφαλικό επεισόδιο (Rubin 1997), τα κύτταρα πεθαίνουν τόσο με απόπτωση όσο και με νέκρωση. Κατά τον ίδιο τρόπο, ερεθίσματα όπως η θερμότητα, η ακτινοβολία, τα κυτταροτοξικά φάρμακα (Boesen-de Cock 1999) και η υποξία (Saikumar 1998) προκαλούν την απώλεια μεγάλων ομάδων κυττάρων και με τις δύο μορφές κυτταρικού θανάτου.

Οι παθογόνοι μικροοργανισμοί εμπλέκονται και αυτοί στην οδό του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Ο HIV οδηγεί στο θάνατο τα Τ-βοηθητικά λεμφοκύτταρα, τα οποία είναι απαραίτητα για την ενεργοποίηση και την παρεμπόδιση του αποπτωτικού θανάτου των κυτταροτοξικών Τ-λεμφοκυττάρων, που χρησιμεύουν στην άμυνα του ξενιστή έναντι των ιών (Kalams and Walker 1998). Άλλοι παθογόνοι μικροοργανισμοί συμβάλλουν στην επιβίωση του ξενιστή τους αναστέλλοντας την επαγωγή του κυτταρικού θανάτου.

Πρόσφατα ερευνητικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι η απόπτωση παίζει σημαντικό ρόλο στη *ρύθμιση της ανάπτυξης ενός όγκου* και έχει σχέση με την *ανταπόκρισή του στην αντικαρκινική θεραπεία* (εικόνα 3). Οι διάφορες μορφές θεραπείας του καρκίνου, όπως οι ποικίλοι χημειοθεραπευτικοί παράγοντες και οι μέτριες δόσεις ακτινοβολίας επάγουν εκτεταμένη απόπτωση σε ταχέως αναπτυσσόμενους κυτταρικούς πληθυσμούς. Η αποπτωτική ανταπόκριση είναι στενά συνδεδεμένη με την αποτελεσματικότητα της αντικαρκινικής θεραπείας. Το



Πίνακας 3

Ασθένειες που σχετίζονται με μειωμένη απόπτωση

ΝΕΟΠΛΑΣΙΑ

- Λεμφώματα, λευχαιμίες
- Καρκινώματα με μεταλλάξεις p53
- Ορμονο-εξαρτώμενοι όγκοι (Ca μαστού, Ca προστάτου, Ca ωοθηκών)

ΑΥΤΟΑΝΟΣΕΣ ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ

- Αυτοάνοσο λεμφοϋπερπλαστικό σύνδρομο (σύνδρομο Canale-Smith)
- Συστηματικός ερυθηματώδης λύκος
- Σπειραματονεφρίτιδα ανοσοσυμπλεγμάτων

ΕΝΔΟΚΡΙΝΙΚΕΣ ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ ΚΑΙ ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ

- Νόσος του Graves
- Θυρεοειδίτιδα Hashimoto
- Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 1
- Οστεοπόρωση

ΙΙΚΕΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ

- Ερπητοϊοί
- Ιοί Pox (Cowpox virus απΑ)
- Αδενοϊοί

5. ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ

Πίνακας 4

Ασθένειες που σχετίζονται με αυξημένη απόπτωση

1. AIDS

2. ΝΕΥΡΟΕΚΦΥΛΙΣΤΙΚΕΣ ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ

- Νόσος Alzheimer
- Νόσος Parkinson
- Νόσος Huntington
- Μελαχρωματική αμφιβληστροειδοπάθεια
- Παρεγκεφαλική εκφύλιση

3. ΜΥΕΛΟΔΥΣΠΛΑΣΤΙΚΑ ΣΥΝΔΡΟΜΑ

- Απλαστική αναιμία

4. ΙΣΧΑΙΜΙΑ

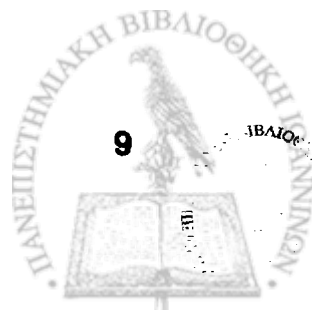
- Έμφραγμα μυοκαρδίου
- Εγκεφαλικό επεισόδιο

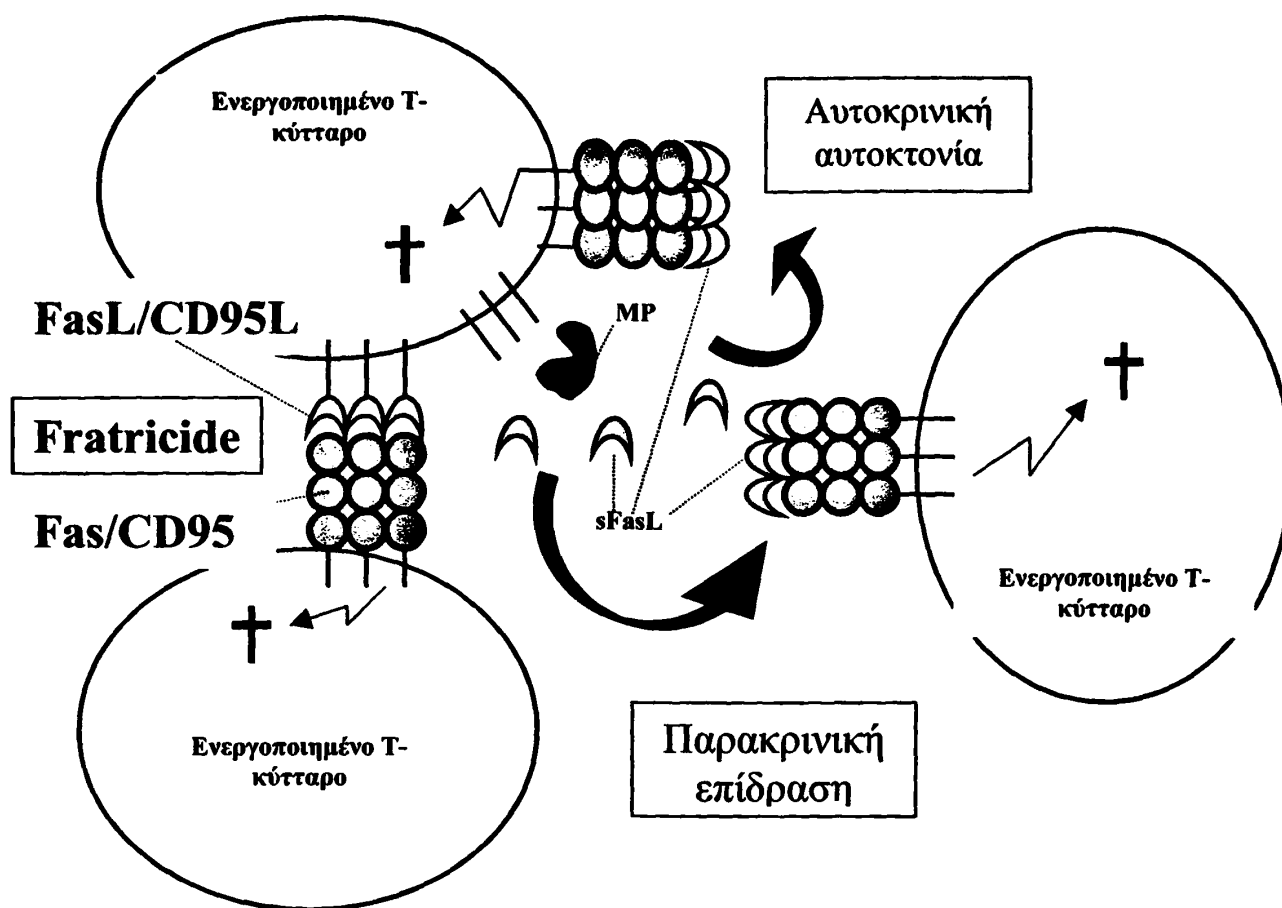
5. ΗΠΑΤΙΚΗ ΝΟΣΟΣ ΑΠΟ ΤΟΞΙΝΕΣ (π.χ αλκοόλ)

6. ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ

7. ΑΛΛΕΣ ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ

- Θυρεοειδίτιδα Hashimoto
- Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 1
- Συστηματικός Ερυθηματώδης Λύκος
- Ελκώδης κολίτιδα
- Νόσος Wilson
- Χρόνια ουδετεροπενία

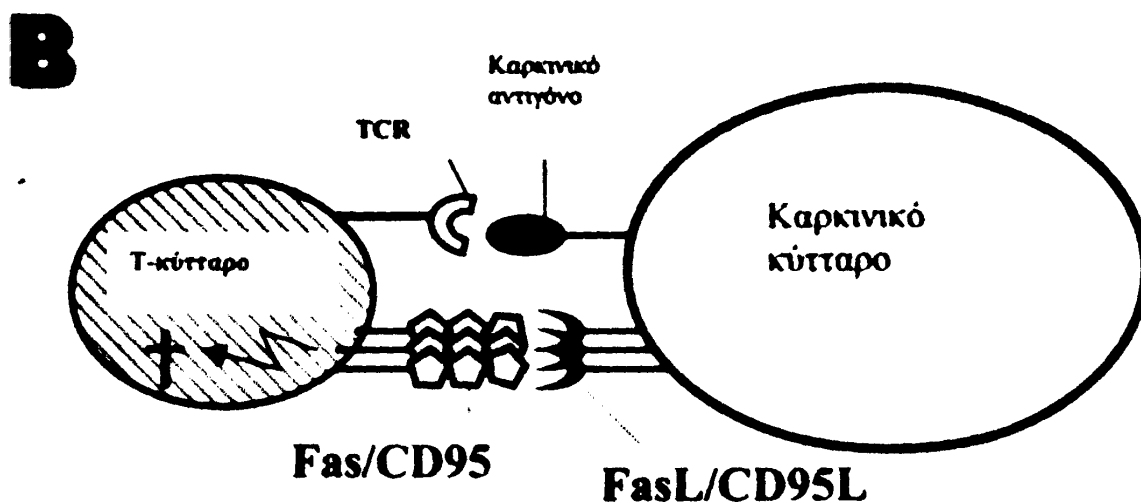
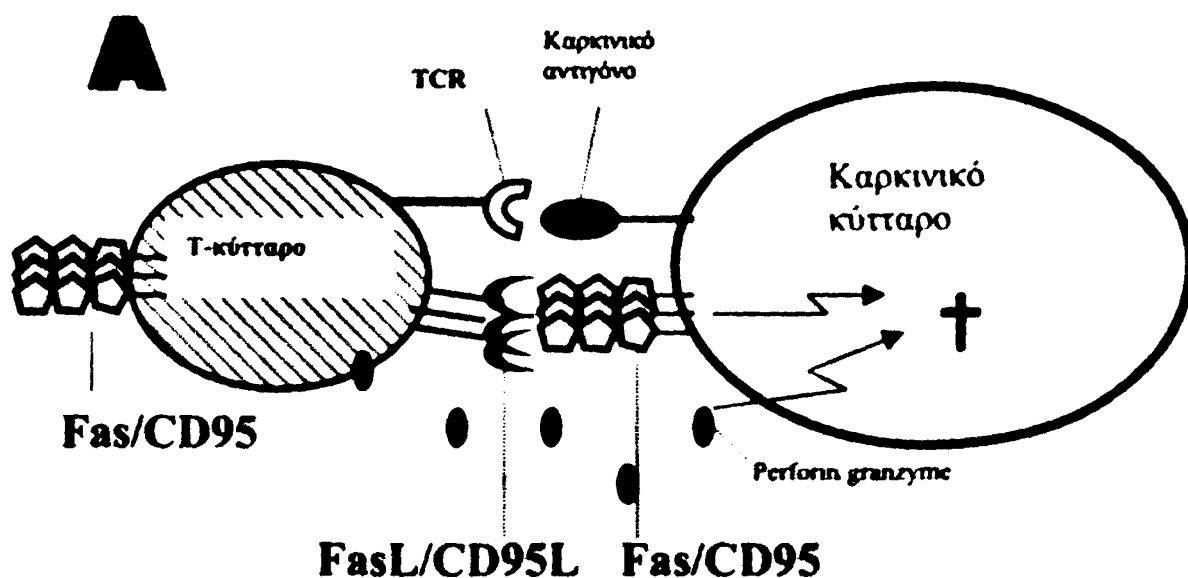




Εικόνα 2

Η εξάλειψη ενεργοποιημένων Τ-λεμφοκυττάρων μέσω Fas/CD95 κατά τη λήξη μιας ανοσολογικής αντίδρασης.

Τα ενεργοποιημένα κύτταρα με την έκφραση Fas/CD95 και FasL/CD95L αλληλοκαταστρέφονται (fratricide). Η διάσπαση του FasL/CD95L από μια μεταλοπρωτεΐνωση (MP) οδηγεί στην παραγωγή διαλυτού sFasL/sCD95L, ο οποίος μπορεί να οδηγήσει σε θάνατο το αρχικό κύτταρο (αυτοκρινική αυτοκτονία, autocrine suicide), ή άλλα ενεργοποιημένα Τ-κύτταρα (παρακρινική δολοφονία).



Εικόνα 3

Αλληλεπιδράσεις T-κυττάρων με καρκινικά κύτταρα.

A. Το T-κύτταρο αναγνωρίζει το καρκινικό κύτταρο μέσω του υποδοχέα του TCR (T-cell receptor) και το σκοτώνει μέσω της αλληλεπιδράσης Fas/FasL ή με την απελευθέρωση perforin/granzyme.

B. Το καρκινικό κύτταρο είναι ανθεκτικό στην απόπτωση λόγω της έκφρασης FasL. Το T-κύτταρο αναγνωρίζει το καρκινικό κύτταρο, αλλά οδηγείται σε αποπτωτικό θάνατο από το καρκινικό κύτταρο μέσω αλληλεπιδράσης Fas/FasL ("tumor counterattack").

γεγονός αυτό την καθιερώνει ως προγνωστικό δείκτη για την ανταπόκριση στη θεραπεία αυτή (Milas και συν. 1994).

Η ανταπόκριση στη θεραπεία με κυτταροτοξικά φάρμακα ή ακτινοβολία ποικίλλει μεταξύ των διαφόρων όγκων. Η ρύθμιση, επομένως, της απόπτωσης μπορεί να είναι ένας αποτελεσματικός και φυσικός τρόπος βελτίωσης της αντικαρκινικής θεραπείας. Ο θεραπευτικός στόχος θα μπορούσε να επιτευχθεί είτε με την επαγωγή της απόπτωσης σε ιστούς με καρκίνο, είτε με την αναστολή της απόπτωσης σε φυσιολογικούς ιστούς (Milas και συν. 1994).

Επίσης, είναι γνωστό ότι τα Τ-λεμφοκύτταρα και τα κύτταρα-φυσικοί φονείς (Natural Killer cells) είναι ικανά να προκαλέσουν απόπτωση (Duke και συν. 1983). Η απόπτωση που επάγεται από κύτταρα του ανοσολογικού συστήματος μπορεί να εμπλέκεται στην ογκογένεση και σε αυτοάνοσες ασθένειες όπως η αυτοάνοση θυρεοειδική νόσος και ο σακχαρώδης διαβήτης (Li και συν. 1996).

Επιπλέον, στην πολυκυστική νεφρική νόσο έχουμε απώλεια νεφρικού ιστού σε συνδυασμό με προοδευτική έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας. Στους πολυκυστικούς νεφρούς και πιο συχνά σε πολυκυστικούς νεφρούς ασθενών με νεφρική ανεπάρκεια, ανιχνεύτηκε αποπτωτικός τεμαχισμός του DNA, ενώ κάτι τέτοιο δεν παρατηρήθηκε σε ασθενείς χωρίς νεφρική νόσο (Kiess 1998).

Συμπερασματικά, λοιπόν, ειδικές θεραπείες σχεδιασμένες να εξαλείψουν ή να ελαττώσουν την ευαισθησία των κυττάρων να υποστούν απόπτωση θα μπορούσαν να αποτελέσουν τη βάση για την αντιμετώπιση πολλών από τις προαναφερθείσες ασθένειες.

1.1.4 Ανίχνευση της απόπτωσης

Η πιο κατάλληλη τεχνική για ανίχνευση της απόπτωσης εξαρτάται κάθε φορά από τον τύπο του κυττάρου ή του ιστού που αναλύεται και τις μεθόδους επαγωγής απόπτωσης.

Οι τεχνικές εντόπισης των αποπτωτικών κυττάρων βασίζονται σε μορφολογικές παρατηρήσεις, βιοχημικές και ανοσοϊστοχημικές μεθόδους και στην ανίχνευση του κατακερματισμένου DNA *in situ*.

Από τις πιο σημαντικές και συχνά χρησιμοποιούμενες τεχνικές είναι η μέθοδος *TUNEL* (Terminal deoxynucleotidyl transferase TdT-mediated dUTP Nick End Labeling) με την οποία μπορεί να διαπιστωθεί *in situ* η κατάτμηση του



DNA. Η τεχνική αυτή βασίζεται στη σύνδεση του ενζύμου TdT με τα 3'-OH άκρα των θραυσμάτων του DNA και στην προσθήκη βιοπνυκωμένου νουκλεοτιδίου στις θέσεις εντομής. Παραλλαγή της μεθόδου είναι η τεχνική ISNT (In Situ Nick Translation), στην οποία χρησιμοποιείται το ένζυμο πολυμεράση I. Οι τεχνικές αυτές εφαρμόζονται σε τομές ψυκτικού μικροτόμου και παραφίνης.

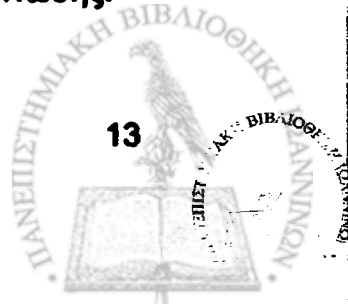
Η απόπτωση είναι δυνατό να διαπιστωθεί και με τη μελέτη της έκφρασης ειδικών πρωτεϊνών που σχετίζονται με την απόπτωση, όπως είναι οι κασπάσες. Επίσης, η αννεξίνη V χρησιμοποιείται για την ανίχνευση των αποπτωτικών κυττάρων με κυτταρομετρία ροής, επειδή συνδέεται με τη φωσφατιδυλοσερίνη, η οποία έχει μετατοπιστεί στην εξωτερική στοιβάδα της κυτταρικής μεμβράνης, κατά τη διάρκεια της αποπτωτικής διεργασίας. Με την τεχνική Comet (ή Single-cell gel electrophoresis, SCGE) ανιχνεύεται το κερματισμένο DNA σε μεμονωμένα κύτταρα, με ηλεκτροφόρηση.

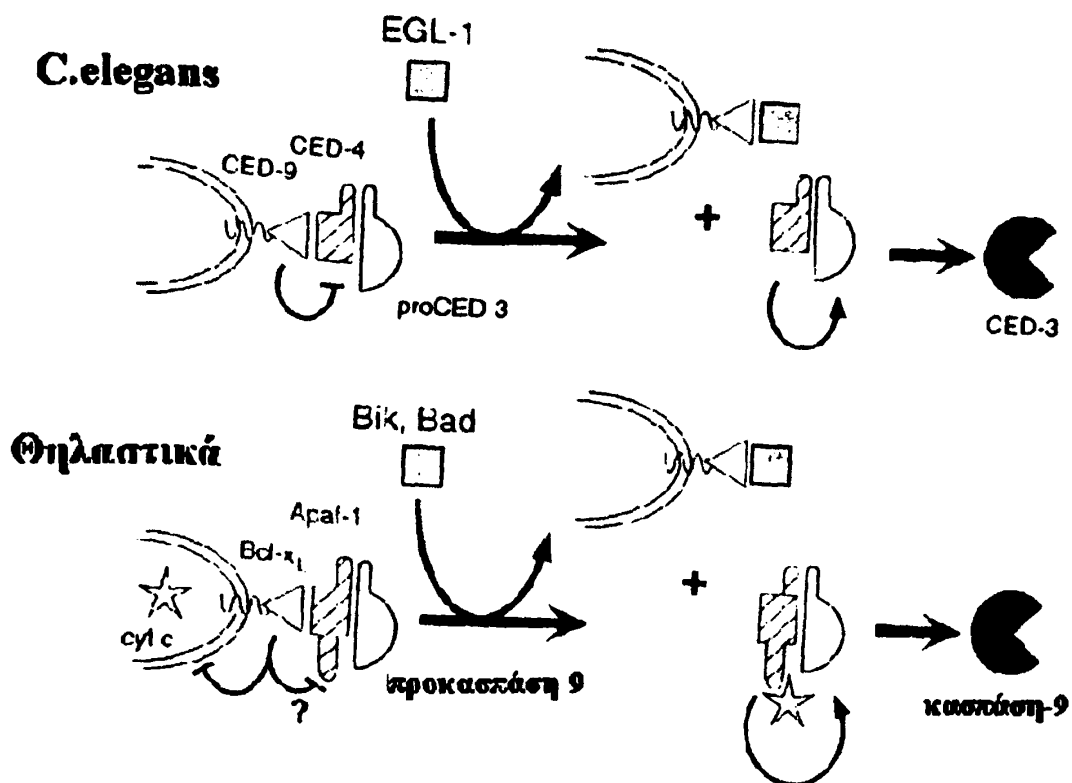
Άλλος δείκτης της απόπτωσης είναι η διάσπαση των «υποστρωμάτων θανάτου» (death substrates) σε τεμάχια χαμηλού μοριακού βάρους, που διαπιστώνεται με τη μέθοδο αποτύπωσης κατά Western, καθώς και η απώλεια της ακεραιότητας του DNA (π.χ ανεύρεση υποδιπλοειδικού DNA), που διαπιστώνεται με κυτταρομετρία ροής (Ashkenazi and Dixit 1998).

1.1.5 *Caenorhabditis elegans* ως πειραματικός οργανισμός

Από την εισαγωγή του στην ερευνητική κοινότητα μέσω του Sydney Brenner (1974) το νηματοειδές *C.elegans* έχει αποτελέσει ένα καλό μοντέλο οργανισμού για τη μελέτη πολύπλοκων βιολογικών φαινομένων (Kimble and Simpson 1997). Η αξία του οργανισμού αυτού για τέτοιες μελέτες προέρχεται κατά ένα μέρος από την εξαιρετική απλότητα που τον χαρακτηρίζει σε ανατομικό και αναπτυξιακό επίπεδο.

Παρά τη μεγάλη απλότητά του όμως, δεν πρέπει να μας διαφύγει ότι το *C.elegans* ανήκει στα μετάρζωα, είναι πολυκύτταρος οργανισμός, οπότε διαθέτει παρόμοιους θεμελιώδεις μοριακούς και κυτταρικούς μηχανισμούς με τα θηλαστικά. Αυτή η ομοιότητα στο επίπεδο γονιδίων και βιοχημικών οδών επιτρέπει τη χρήση του νηματοειδούς αυτού σκόληκα ως ισχυρού μοντέλου για την κατανόηση βιολογικών διαδικασιών συμπεριλαμβανομένης της απόπτωσης.





Εικόνα 4

Το αποπτοσωματικό μοντέλο της ρύθμισης του κυτταρικού θανάτου

Στο νηματοειδές *C.elegans*, οι ρυθμιστές του κυτταρικού θανάτου CED-9, CED-4 και proCED-3 είναι παρόντες στα ζώντα κύτταρα ως ανενεργό, τριμοριακό σύμπλεγμα. Σε κύτταρα που προορίζονται να πεθάνουν, η πρωτεΐνη EGL-1 συνδέεται στην CED-9 και προκαλεί την αποσύνδεσή της από το σύμπλεγμα CED-4/proCED-3. Όταν απελευθερώνεται η CED-9, η πρωτεΐνη CED-4 ολιγομερίζεται, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της CED-3 με μια διαδικασία που δεν έχει διευκρινιστεί απόλυτα.

Στα θηλαστικά, έχει ταυτοποιηθεί ένα σύμπλεγμα που μοιάζει με το αποπτόσωμα και περιέχει τις πρωτεΐνες Bcl-xL, Apaf-1 και προκασπάση-9. Στην αποσύνδεση και αυτού του συμπλέγματος είναι πιθανόν να μεσολαβούν πρωτεΐνες που περιέχουν μόνο BH3 περιοχή, όπως οι πρωτεΐνες Bad, Bid και Bik.

Όπως προκύπτει από τις μελέτες που έχουν γίνει μέχρι σήμερα, τα στάδια του αποπτωτικού μηχανισμού και τα γονίδια που τα ελέγχουν έχουν διατηρηθεί στο γενετικό υλικό κατά την εξέλιξη από το νηματοειδές *C.elegans* στον άνθρωπο (Yuan 1996) (εικόνα 4).

1.2 ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΟΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΟΔΟΙ ΜΕΤΑΔΟΣΗΣ ΣΗΜΑΤΩΝ

Η πολυπλοκότητα του αποπτωτικού μηχανισμού οφείλεται στο γεγονός ότι οι ίδιες οδοί χρησιμοποιούνται και για τη μετάδοση σημάτων αύξησης και διαφοροποίησης. Για παράδειγμα, εξωκυτάρια σήματα, όπως τροφικοί παράγοντες και ορμόνες, καθώς και σήματα από γειτονικά κύτταρα, μπορούν τόσο να ενεργοποιήσουν όσο και να καταστείλουν τα προγράμματα θανάτου.

Η απόπτωση, όπως προκύπτει από τις μελέτες που έγιναν μέχρι σήμερα, επιτελείται σε τρία διαδοχικά στάδια. Αυτά είναι : α) ο προγραμματισμός σε θάνατο από εξωκυτάρια ή ενδοκυτάρια σήματα, β) η ολοκλήρωση του κυτταρικού θανάτου μέσω ενεργοποίησης των κασπασών και γ) η απομάκρυνση των διαλυμένων κυττάρων με φαγοκυττάρωση και η διάσπασή τους από τα λυσοσωματικά ένζυμα των φαγοκυττάρων (Sen 1992).

Για την ενεργοποίηση, επομένως, της αποπτωτικής διαδικασίας θα πρέπει το εξωκυτταριο σήμα να μεταφερθεί από την κυτταρική μεμβράνη στο κυτταρόπλασμα με τελικό αποδέκτη τον πυρήνα. Ένα συγκεκριμένο αποπτωτικό σήμα μπορεί να τροποποιηθεί, να ενισχυθεί ή ακόμη και να ανασταλεί υπό την επίδραση διαφόρων παραγόντων. Πολλές ορμόνες (όπως π.χ κυταροκίνες και παράγοντες ανάπτυξης) δρουν ως γενικοί ή ειδικοί (για συγκεκριμένο ιστό) παράγοντες επιβίωσης παρεμποδίζοντας έτσι την έναρξη της απόπτωσης. Αντίθετα, άλλοι ορμονικοί παράγοντες επάγουν ή ενισχύουν τις αποπτωτικές διαδικασίες, όπως για παράδειγμα τα γλυκοκορτικοειδή και ο παράγοντας νέκρωσης των όγκων TNF (Tumor Necrosis Factor) (Πίνακας 5) (εικόνες 5,6).

1.2.1 Βιοχημικοί και μοριακοί μηχανισμοί

Η διαδικασία του PCD περιλαμβάνει έναν επιγενετικό αναπρογραμματισμό του κυττάρου, ο οποίος επιφέρει μια ενεργειακά εξαρτώμενη αλυσίδα βιοχημικών μεταβολών. Αυτές οι μεταβολές οδηγούν σε ενδοκυτταρίες μορφολογικές αλλαγές, που έχουν ως αποτέλεσμα τον κυτταρικό θάνατο.



Μεταβολές στις ενδοκυττάριας και κυρίως στις ενδοπυρηνικές συγκεντρώσεις Ca^{2+} και Mg^{2+} είναι πιθανόν να σχετίζονται με την ενεργοποίηση της κατάτμησης του DNA από τις νουκλεάσες κατά τη διάρκεια του PCD (Nicotera and Rossi 1994). Η κατάτμηση του DNA είναι φαινόμενο που προηγείται του θανάτου του κυττάρου σε αντίθεση με τη νέκρωση, όπου η αποσύνθεση του DNA συμβαίνει μετά το θάνατο του κυττάρου, από την απελευθέρωση των λυσοσωμικών ενζύμων.

Τα περισσότερα αποπτωτικά κύτταρα απατούν σύνθεση RNA και πρωτεϊνών (Tomai and Core 1994, Thompson 1995). Είναι ευρέως γνωστή η καθυστέρηση ή η παρεμπόδιση της απόπτωσης μέσω αναστολής της μακρομοριακής σύνθεσης. Τα "ετοιμοθάνατα" κύτταρα εκφράζουν μεγάλες ποσότητες mRNA για διάφορα ένζυμα. Επιπρόσθετα, ενεργοποιούνται διάφορα ένζυμα αποδόμησης (degradative enzymes), ενώ οι ρυθμιστικές πρωτεΐνες διατηρούν τον έλεγχο της αποπτωτικής αλυσίδας αντιδράσεων (Ameisen 1996).

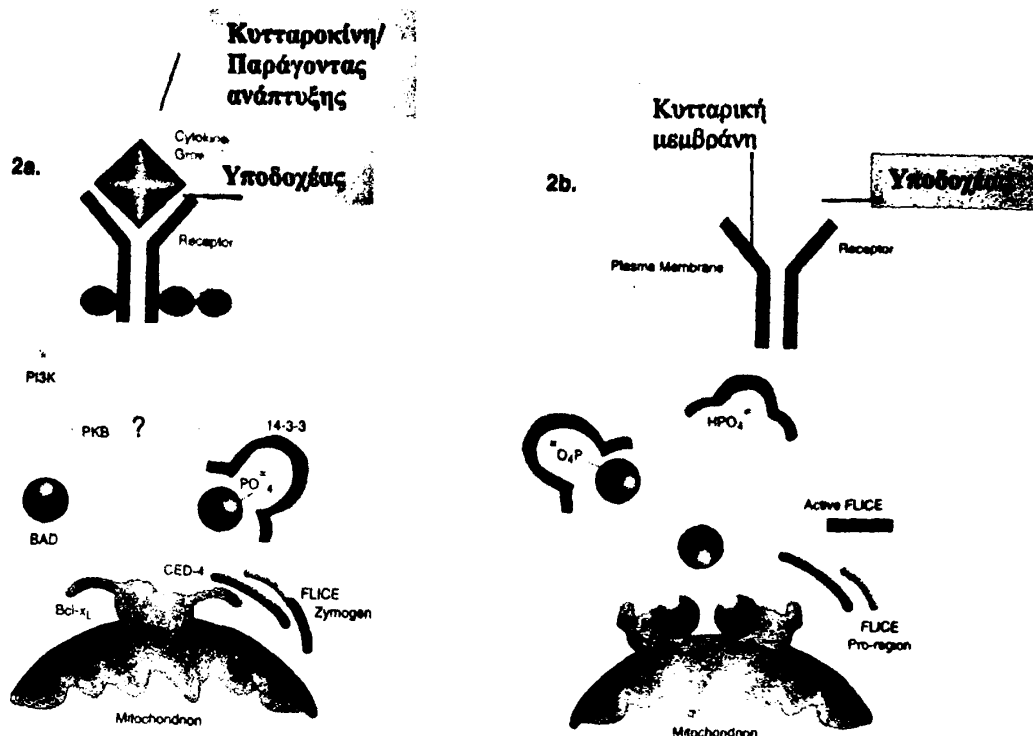
1.2.2 Μηχανισμός και ρύθμιση της απόπτωσης

Κύτταρα από πολυκύτταρους οργανισμούς αυτοκαταστρέφονται όταν έχουν παραχθεί σε αυξημένο αριθμό, όταν έχουν αναπτυχθεί με ακατάλληλο τρόπο, ή όταν έχουν υποστεί γενετική καταστροφή (Abbadie και συν. 1993, Catlin και συν. 1993, Coudounakis και συν. 1995, Haanen and Vermaes 1996, Roodman 1996). Η επιβίωσή τους εξαρτάται από τη συνεχή καταστολή αυτού του προγράμματος αυτοκτονίας με σήματα που προέρχονται από άλλα κύτταρα. Η απόπτωση αφορά συνήθως διάσπαρτα εξαιρουμένα κύτταρα σε έναν ιστό.

Υπάρχουν δύο κύριοι οδοί που οδηγούν σε απόπτωση: α) η θετική επαγωγή μέσω της σύνδεσης ενός προσδετικού μορίου (ligand) σε υποδοχέα της κυτταρικής μεμβράνης και β) η αρνητική επαγωγή με την απώλεια ενός κατασταλτικού σήματος, όπως για παράδειγμα με την ελάττωση μιας τροφικής ορμόνης (εικόνες 5,6).

Πολλές ορμόνες, κυτταροκίνες και παράγοντες ανάπτυξης, είναι γνωστό ότι δρουν ως γενικοί ή ειδικοί για κάθε ιστό παράγοντες επιβίωσης παρεμποδίζοντας την έναρξη της απόπτωσης. Αντίθετα, πολλοί ορμονικοί παράγοντες επάγουν ή ενισχύουν τις αποπτωτικές διαδικασίες (Πίνακας 5).

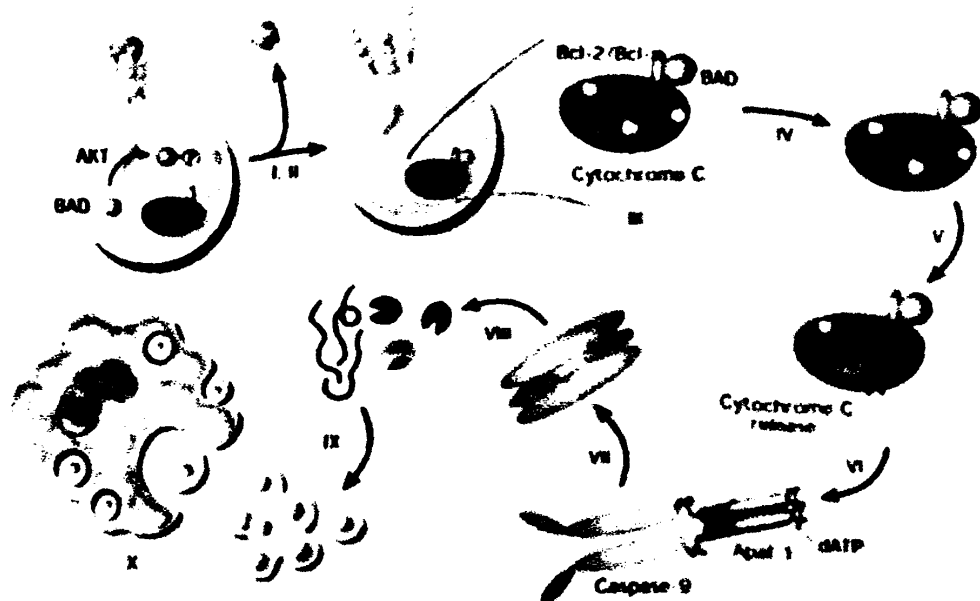




Εικόνα 5

Ενεργοποίηση της απόπτωσης από έλλειψη κυτταροκίνης

Στο σχήμα 2α φαίνεται το κύτταρο παρουσία κυτταροκίνης και στο 2β απουσία αυτής. Η αρνητική επαγωγή της απόπτωσης είναι μία πολύπλοκη διαδικασία μετάδοσης σημάτων με πολλά στάδια, κατά τα οποία είναι απαραίτητη η σύνθεση πρωτεϊνών. Στην περίπτωση αυτή, τα κύτταρα προγραμματίζονται να πεθάνουν όταν σταματούν να λαμβάνουν σήματα επιβίωσης από το περιβάλλον τους. Η αρνητική επαγωγή της απόπτωσης με την απώλεια κατασταλτικού σήματος αφορά τα μιτοχόνδρια. Η απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια στο κυτταρόπλασμα πυροδοτεί την ενεργοποίηση των κασπασών. Η διαπερατότητα της εξωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων παίζει σημαντικό ρόλο στην επαγωγή απόπτωσης μέσω αυτής της οδού. Οι πρωτεΐνες που ανήκουν στην οικογένεια Bcl-2 φαίνεται να ρυθμίζουν τη μεμβρανική διαπερατότητα για τα ιόντα και πιθανότατα και για το κυτόχρωμα c.



Εικόνα 6

Η απομάκρυνση μιας κυτταρικής που απαιτείται για την κυτταρική επιβίωση οδηγεί στα ακόλουθα αλληλοδιάδοχα γεγονότα:

- I. την απώλεια της δραστηριότητας της κινάσης AKT,
- II. την αποφωσφορυλκωση της πρωτεΐνης Bad ή άλλων ρυθμιστών της δράσης Bcl-2/Bcl-x,
- III. τη σύνδεση της πρωτεΐνης Bad στην πρωτεΐνη Bcl-x ή Bcl-2,
- IV. τη διαταραχή της φυσιολογικής λειτουργίας των μιτοχονδρίων,
- V. την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c,
- VI. τη σύνδεση του κυτοχρώματος c με τον Apaf-1 με επακόλουθη ενεργοποίηση της κασπάσης-9,
- VII. ενίσχυση του «καταρράκτη» των κασπασών,
- VIII. τη διάσπαση ζωτικών κυτταρικών πρωτεϊνών,
- IX. τη δημιουργία αποπτωτικών σωματιδίων των κυττάρων και τελικά
- X. την εξαφάνιση κάθε «ήχνους» των κυττάρων με την εγκόλιπωση των αποπτωτικών σωματιδίων από γειτονικά κύτταρα ή φαγοκύτταρα.

Πίνακας 5

Ορμονικοί παράγοντες που ρυθμίζουν την απόπτωση

ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ	ΠΙΘΑΝΟΙ ΠΡΟΑΓΩΓΕΙΣ
Τεστοστερόνη	Γλυκοκορτικοειδή
Οιστραδιόλη	Προγεστερόνη
Προγεστερόνη	Θυρεοειδικές ορμόνες
Παράγοντες ανάπτυξης (EGF, IGF-1, NGF, PDGF)	Ελάττωση παραγόντων ανάπτυξης
Ιντερλευκίνες	TGF-β
GH	TNF
Προλακτίνη	Fas ligand
Γοναδοτροφίνες	



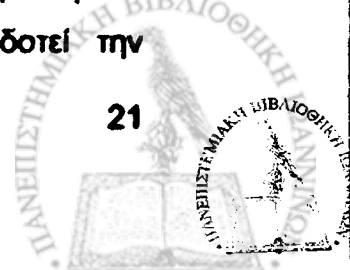
Παράγοντες όπως η ιονίζουσα ακτινοβολία ή τοξίνες που προκαλούν καταστροφή του DNA, ενεργοποιούν άμεσα την "κοινή οδό" επαγωγής αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου, μηχανισμός που προστατεύει τα κύτταρα από ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό ή ανάπτυξη και σχηματισμό νεοπλασμάτων (Hermeking 1994, Sheikh και συν. 1995).

Η θετική επαγωγή της απόπτωσης επιτυγχάνεται με κυτταρικούς υποδοχείς ή/και διαλυτά προσδετικά μόρια (ligands). Οι περισσότεροι από αυτούς τους «υποδοχείς θανάτου» έχουν δομικές ομοιότητες με την υπεροικογένεια υποδοχέα του TNF (tumor necrosis factor receptor superfamily). Με τη σύνδεση των προσδετικών μορίων σε τέτοιους υποδοχείς, όπως στον TNFR1 ή στον Fas, τα αποπτωτικά σήματα μεταβιβάζονται σε μόρια-προσαρμοστές (adaptor molecules) και οδηγούν στην ενεργοποίηση ενζύμων που έχουν δομική ομοιότητα με το μετατρεπτικό ένζυμο της Ιντερλευκίνης 1β (ICE, Interleukin-1β Converting Enzyme) (Lee και συν. 1995, Nagata 1996, Akcali και συν. 1996, Muller και συν. 1995, Pambizas and LeRoith 1997).

Όλες αυτές οι οδοί σημάτων ρυθμίζονται σε διάφορα επίπεδα. Στους υποδοχείς θανάτου μπορούν να συνδεθούν προσδετικά μόρια ή και ανταγωνιστικές πρωτεΐνες κυτάρων ή κών και να αναστείλουν τον κυτταρικό θάνατο μέσω των οδών σημάτων των TRADD και FADD και μέσω ανενεργοποίησης των ICE-like πρωτεασών (Wilson και συν. 1994, Rotonda και συν. 1996, Porter and Janicke 1997, Cryns and Yuan 1998).

Η «κοινή οδός» που επάγει τον κυτταρικό θάνατο περιλαμβάνει ομάδα πρωτεολυτικών ενζύμων που ονομάζονται κασπάσες. Τα ένζυμα αυτά ενεργοποιούν με τη σειρά τους διάφορα συστήματα ενζύμων και τελικά τις νουκλεάσες που προκαλούν κατάτμηση του χρωμοσωμικού DNA (Xue and Horvitz 1997, Cheng και συν. 1997). Άλλη σημαντική επίδραση των κασπασών είναι η μεταβολή της μιτοχονδριακής λειτουργίας, που οδηγεί σε ελάττωση της παραγωγής ενέργειας (Thornberry και συν. 1997). Το σύνολο αυτών των επιδράσεων οδηγεί στις χαρακτηριστικές φαινοτυπικές αλλαγές της απόπτωσης, τη δημιουργία μαλακής προσεκβολής (blebbing) στην κυτταρική μεμβράνη, τη συμπύκνωση του πυρήνα και την κατάτμηση του DNA.

Η αρνητική επαγωγή της απόπτωσης με την απώλεια κατασταλτικού σήματος αφορά τα μιτοχόνδρια (Green and Reed 1998). Η απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια στο κυτταρόπλασμα πυροδοτεί την



ενεργοποίηση των κασπασών (Liu και συν. 1996). Η διαπερατότητα της εξωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων παίζει σημαντικό ρόλο στην επαγωγή απόπτωσης μέσω αυτής της οδού. Οι πρωτεΐνες που ανήκουν στην οικογένεια Bcl-2 φαίνεται να ρυθμίζουν τη μεμβρανική διαπερατότητα για τα ιόντα και πιθανότατα και για το κυτόχρωμα c (Reed 1997). Παρόλο που οι πρωτεΐνες αυτές μπορούν από μόνες τους να σχηματίσουν διαύλους σε μεμβράνες, οι ουσιαστικοί μοριακοί μηχανισμοί μέσω των οποίων ρυθμίζουν τη διαπερατότητα των μιτοχονδρίων και την απελευθέρωση ουσιών δεν είναι απόλυτα διευκρινισμένοι. Κάποια από τα μέλη της οικογένειας Bcl-2 (αντι-αποπτωτικά), όταν υπερεκφράζονται, αναστέλλουν την απόπτωση, ενώ άλλα (προ-αποπτωτικά), στην ίδια περίπτωση, προκαλούν επαγωγή του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (Rheaume και συν. 1997, Hakem και συν. 1998, Kuida και συν. 1998). Η αναλογία αυτών των δύο ομάδων πρωτεϊνών είναι αυτή που καθορίζει κάθε φορά την ευαισθησία των κυττάρων στην επαγωγή απόπτωσης.

Η αρνητική επαγωγή της απόπτωσης είναι μία πολύπλοκη διαδικασία μετάδοσης σημάτων με πολλά στάδια, κατά τα οποία είναι απαραίτητη η σύνθεση πρωτεϊνών. Στην περίπτωση αυτή, τα κύτταρα προγραμματίζονται να πεθάνουν όταν σταματούν να λαμβάνουν σήματα επιβίωσης από το περιβάλλον τους (Jacobson και συν. 1997). Το γεγονός αυτό είναι πολύ σημαντικό αφού εμποδίζει την ανάπτυξη κυττάρων εκτός της κατάλληλης γι' αυτά περιοχής και εξαλείφει κύτταρα με λειτουργίες που δε συμβάλλουν στην επιβίωση του οργανισμού. Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται στους νευρώνες, οι οποίοι οδηγούνται αυτόματα σε απόπτωση όταν σταματούν να λαμβάνουν ηλεκτρικά ερεθίσματα ή όταν υποβληθούν σε στέρηση νευροτροφικών παραγόντων (Marsters και συν. 1999). Επίσης, εκτός από τα εξωτερικά σήματα, τα κύτταρα έχουν την ικανότητα να λαμβάνουν και εσωτερικά σήματα. Όταν συμβεί μια εσωτερική βλάβη η οποία δεν είναι δυνατόν να διορθωθεί, το κύτταρο οδηγείται σε απόπτωση. Παρόμοιος μηχανισμός παρατηρείται και όταν το κύτταρο λαμβάνει ταυτόχρονα αντιφατικά σήματα για κυτταρικό πολλαπλασιασμό ή διακοπή του κυτταρικού κύκλου (Jacobson και συν. 1997).

Κατά τη θετική επαγωγή της απόπτωσης (*instructive apoptosis*), οι μηχανισμοί σημάτων οδηγούν το κύτταρο άμεσα στο θάνατο. Αυτό πραγματοποιείται κατά την εξάλειψη των ενεργοποιημένων περιφερικών T-



κυττάρων που έχει ως αποτέλεσμα τη διατήρηση της ομοιόστασης των λεμφοκυττάρων στην περιφέρεια (Nagata 1997).

1.2.3 Ορμονική ρύθμιση της απόπτωσης

Η απόφαση ενός κυττάρου να υποστεί προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο μπορεί να επηρεαστεί από ποικίλα ερεθίσματα, όπως είναι: μια ιϊκή λοίμωξη, μεταβολικές διαταραχές (όπως απότομες μεταβολές στις συγκεντρώσεις Glc), η θερμότητα, η ακτινοβολία, οι τοξίνες, τα φάρμακα, οι κυτταροκίνες, οι στεροειδικές και οι πεπτιδικές ορμόνες (Van der Bosch και συν. 1992, Fletcher-Chiappini και συν. 1993, Jo και συν. 1993, Henriksen και συν. 1995, Iwahashi και συν. 1996, Cutolo και συν. 1996, Amsterdam και συν. 1997).

Στη ρύθμιση της απόπτωσης μεσολαβούν πολλοί παράγοντες σε πολλά επίπεδα του κυτταρικού μεταβολισμού και της κυτταρικής βιολογίας.

Πολλές ορμόνες, όπως οι κυτταροκίνες και παράγοντες ανάπτυξης, δρουν ως γενικοί ή ειδικοί για κάθε ιστό παράγοντες επιβίωσης παρεμποδίζοντας την έναρξη της απόπτωσης (εικόνες 5,6). Αντίθετα, κάποιοι παράγοντες ανάπτυξης και ορμόνες προκαλούν ή διευκολύνουν τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο κάτω από φυσιολογικές ή και παθολογικές συνθήκες (πίνακας 5). Αντίστροφα, η απόπτωση τροποποιεί τη λειτουργία και τη λειτουργική ακεραιότητα πολλών ενδοκρινών αδένων και κυττάρων που είναι ικανά να συνθέσουν και να εκκρίνουν ορμόνες. Επιπλέον, η παράταση της πρώιμης φυσιολογικής διαδικασίας του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου παίζει ρόλο-κλειδί στην παθογένεια ασθενειών που αφορούν ενδοκρινείς αδένες (Keiss and Gallaher 1998).

Το πιο σημαντικό είναι ότι, σύμφωνα με νέα δεδομένα, σε αυτοάνοσες ασθένειες του ενδοκρινικού συστήματος, όπως η αυτοάνοση θυρεοειδοπάθεια και ο ΣΔ τύπου 1, το ανοσολογικό σύστημα δεν έχει μόνο του την τελική "ευθύνη" της καταστροφής του οργάνου (Ανδρίκουλα και Τσατσούλης 2000, Ανδρίκουλα και Τσατσούλης 2001). Είναι πιο πιθανό ότι τα κύτταρα-στόχος (θυρεοειδικά ή β-κύτταρα των νησιδίων του παγκρέατος) "αυτοκτονούν" μέσω απόπτωσης (Arscott and Baker 1998, Foulis και συν. 1996, Chervonsky και συν. 1997).

Η κατανόηση του τρόπου με τον οποίο οι ορμόνες επηρεάζουν την επαγωγή αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου και αντίστροφα, του τρόπου με τον οποίο η απόπτωση επηρεάζει τη λειτουργία των ενδοκρινών αδένων είναι βασική



για την πρόληψη και αντιμετώπιση ασθενειών που αφορούν σε ιστούς του ενδοκρινικού συστήματος.

1.2.4 Γονίδια που σχετίζονται με την απόπτωση

Ο μεγάλος αριθμός των γονιδίων που σχετίζονται με τη ρύθμιση της απόπτωσης μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις μεγάλες κατηγορίες: α) *τα επαγωγικά*, όπως η οικογένεια των γονιδίων ICE που κωδικοποιούν το μετατρεπτικό ένζυμο Ιντερλευκίνης-1β ((Interleukin-1β Converting Enzyme) (Steller 1995), τα γονίδια ced-3, ced-4, bax, bcl-xS, bad κ.α, β) *τα ανασταλτικά*, όπως τα bcl-2, bcl-xL, bcl-w, bcl3 κ.α, και γ) *τους παράγοντες μεταγραφής c-myc, p53, p21/waf-1, c-fos, jun, cdc25 κ.α* (πίνακας 6).

Κεντρικό ρόλο στην απόπτωση παίζουν και τα γονίδια fas και fas ligand, τα οποία κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες Fas και Fas ligand (Nagata 1996). In vivo αλλά και in vitro μελέτες έδειξαν συμμετοχή των πρωτεϊνών Fas/Fas ligand στην κλωνική εξάλειψη αυτοαντιδρώντων T-κυττάρων σε περιφερικά λεμφικά όργανα και στην εξάλειψη ενεργοποιημένων T-κυττάρων μετά από την αντίδρασή τους με ξένα αντιγόνα (Crispe 1994) (εικόνα 2). Τελευταία διαπιστώθηκε έκφραση των πρωτεϊνών Fas/Fas ligand και σε θυροειδικά κύτταρα και πιθανολογείται η συμμετοχή της οδού Fas στην παθογένεια αυτοάνοσων θυροειδικών αλλά και άλλων παθήσεων του ενδοκρινικού συστήματος (Winqvist και συν. 1996, Chervonsky και συν. 1997, Mitsiades και συν. 1998).

Από τους πιο σημαντικούς τελεστές (effectors) της απόπτωσης είναι και η οικογένεια γονιδίων ICE (εικόνα 7). Η πρωτεΐνη ICE εμφανίζει ομολογία με την πρωτεΐνη CED3 (Cell Death protein 3) του νηματοειδούς σκώληκα *C. elegans* από τη μελέτη του οποίου προέκυψαν οι περισσότερες γνώσεις μας πάνω στην απόπτωση. Όταν τα γονίδια ced3 (cell death gene 3) ή ced4 (cell death gene 4) του *C.elegans* απενεργοποιούνται, τα κύτταρα, τα οποία φυσιολογικά πεθαίνουν κατά την ανάπτυξη, επιβιώνουν. Η υπερέκφραση του γονιδίου ICE διαπιστώθηκε ότι προκαλεί απόπτωση ινοβλαστών και νευρικών κυττάρων. Η αποπτωτική δράση του γονιδίου ICE αναστέλλεται από την έκφραση του bcl-2 και του γονιδίου ccrmA (cow-pox virus gene, Cytokine response modifier A). Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο ccrmA είναι ειδικός αναστολέας της πρωτεΐνης ICE. Επομένως, μπορούμε να υποθέσουμε ότι στην απόπτωση που παρατηρείται

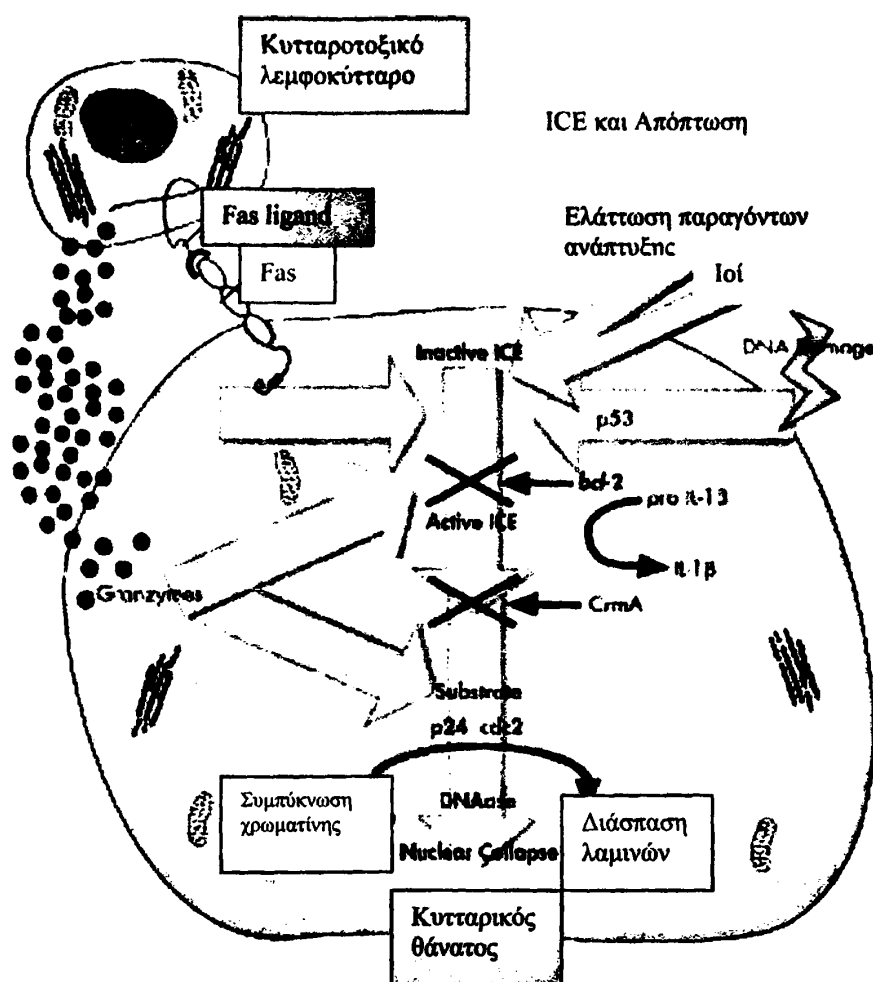


κατά την ανάπτυξη των σπονδυλωτών, η πρωτεΐνη ICE παίζει παρόμοιο ρόλο με αυτό της CED3 στην ανάπτυξη του *C.elegans* (Strobel και συν. 1996, Boudreau και συν. 1995, Pronk και συν. 1996). Ένα δυνητικό υπόστρωμα για τις πρωτεάσες ICE/CED3 κατά τη διαδικασία της απόπτωσης είναι η πολυ-ADP-ριβο-πολυμεράση PARP (poly-ADP-ribose polymerase), ένζυμο που σχετίζεται με την επιδιόρθωση του DNA και την προστασία της ακεραιότητας του γενώματος. Η πρωτεόλυση του ενζύμου PARP από ένα ένζυμο της οικογένειας ICE έχει ως αποτέλεσμα την μη επιδιόρθωση του DNA και την έναρξη της απόπτωσης (Tanaka και συν. 1984).

Εκτός όμως από τα παραπάνω γονίδια, που η έκφρασή τους προκαλεί ενεργοποίηση της απόπτωσης, ενδιαφέρον παρουσιάζουν και γονίδια των οποίων η έκφραση αναστέλλει τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, τα λεγόμενα ανασταλικά αποπτωτικά γονίδια.

Στην κατηγορία αυτή σημαντική θέση κατέχουν τα γονίδια που κωδικοποιούν μέλη της οικογένειας πρωτεϊνών Bcl-2 (Papizas and LeRoith 1997, Kumar 1997). Η οικογένεια των πρωτεϊνών Bcl-2 έχει έναν κεντρικό ρόλο στην ρύθμιση της απόπτωσης και συσχετίζεται με την παθογένεια πολλών ασθενειών. Μελέτες του γονιδίου bcl-2 αποκάλυψαν ότι αλληλεπιδρά και με ένα άλλο γονίδιο, που ονομάζεται bax και κωδικοποιεί την πρωτεΐνη Bax (Bcl-2 associated x protein). Η πρωτεΐνη αυτή, που ανήκει στην ίδια οικογένεια πρωτεϊνών με την Bcl-2, σχηματίζει ετεροδιμερή με αυτή. Η αναλογία των ετεροδιμερών Bcl-2/Bax καθορίζει την επιβίωση των κυττάρων ύστερα από ένα αποπτωτικό ερέθισμα, όπως για παράδειγμα ύστερα από την ελάττωση ενός παράγοντα ανάπτυξης. Συγκεκριμένα, σε αναστολή της έκφρασης του γονιδίου bcl-2, η διέγερση της απόπτωσης απαιτεί την έκφραση του γονιδίου bax. Όταν όμως συνεκφράζονται τα γονίδια bcl-2 και bax, η πρωτεΐνη Bax ενώνεται με την Bcl-2 και έτσι εξουδετερώνεται η δράση των γονιδίων αυτών στην απόπτωση. Η αποτυχία σύνδεσης της πρωτεΐνης Bax γύρω από την Bcl-2 προκαλεί την έναρξη της απόπτωσης, καθώς επίσης και τη δημιουργία Bax ομοδιμερών (Oltvai και συν. 1993) (εικόνα 8).

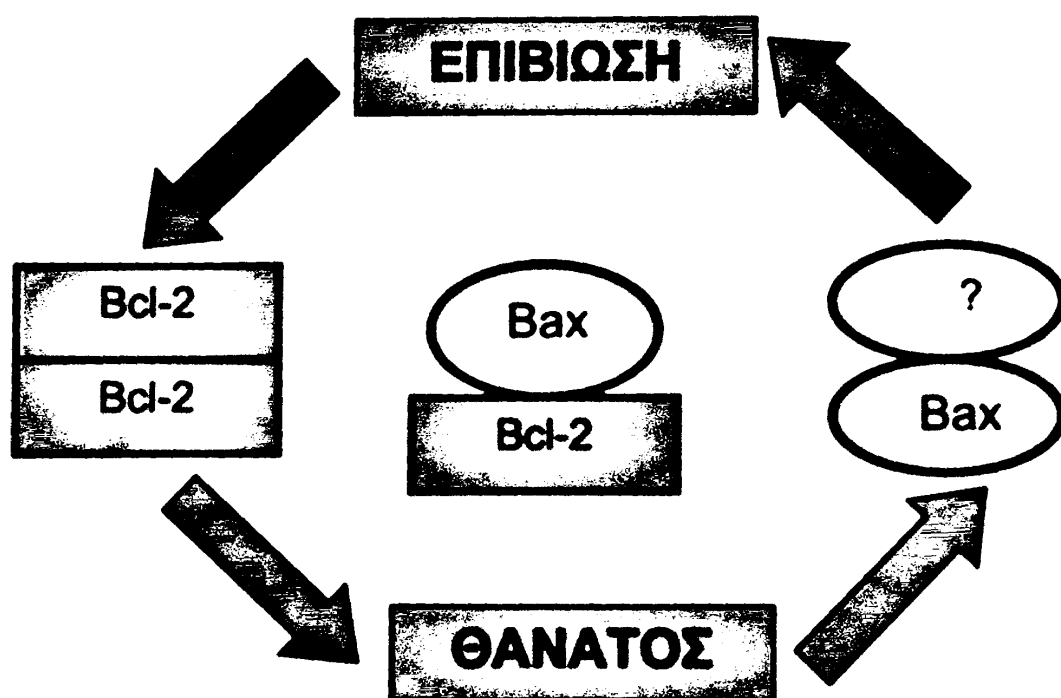
Το πρωτο-ογκογονίδιο c-myc και το γονίδιο p53 φαίνεται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στην απόπτωση. Το c-myc φαίνεται ότι μπορεί να διεγείρει τόσο τον πολλαπλασιασμό όσο και την απόπτωση, η επιλογή όμως ενός κυττάρου για την είσοδο σε μία από τις δύο πορείες καθορίζεται από άλλα σήματα,



Εικόνα 7

Συμμετοχή της οικογένειας ICE στην απόπτωση

Η οικογένεια πρωτεϊνών ICE (Interleukin-converting enzyme) παίζει κύριο ρόλο στην αποπτωτική διαδικασία. Οι πρωτεΐνες αυτές έχουν πολλαπλά υποστρώματα συμπεριλαμβανομένου του πρωταρχικού τους υποστρώματος, της IL-1 β . Η ενεργοποίηση των ενζύμων ICE ελέγχεται από την καταστροφή του DNA, την έλλειψη παραγόντων ανάπτυξης και από granzymes.



Εικόνα 8

Αλληλεπίδραση πρωτεϊνών Bcl-2/Bax

Η πρωτεΐνη Bcl-2 ομοδιμερίζεται ή σχηματίζει ετεροδιμερή με την πρωτεΐνη Bax με την οποία σχετίζονται στενά. Η αναλογία μεταξύ ομοδιμερών και ετεροδιμερών είναι αυτή που καθορίζει εάν τα κύτταρα θα εισέλθουν ή όχι στην αποπτωτική διαδικασία.

Πίνακας 6

Γονίδια που ενέχονται στον αποπτωτικό μηχανισμό

- **Επαγωγικά**
Γονίδια οικογένειας ICE
ced-3, ced-4
fas, fas ligand
bax, bak, bok, bik,
bcl-xS, bad, bid
bim, nip3, nix
- **Ανασταλτικά**
ced-9
bcl-2, bcl-xL, bcl-w
mcl-1, crmA, nrl-3
- **Παράγοντες μεταγραφής**
p53
p21/waf
c-myc
c-fos
jun
cdc25

Πίνακας 7

Οι υποδοχείς της οικογένειας TNF και τα αντίστοιχα προσδετικά μόρια που συνδέονται με αυτούς

Υποδοχέας (Receptor)	Άλλη ονομασία	Προσδετικό μόριο (Ligand)
Fas	CD95, APO-1	Fas ligand, CD95L, APO-1L
DR4	TRAIL-R1	TRAIL, APO-2L
DR5	TRAIL-R2	TRAIL, APO-2L
DR3	APO-3, WSL-1, TRAMP, LARD	APO-3L
DcR1	TRAIL-R3, TRID, LIT	TRAIL, APO-2L
DcR2	TRAIL-R4	TRAIL, APO-2L
TNFR1	---	TNF α , Lymphotoxin α
TNFR2	---	TNF α , Lymphotoxin α
LT- β R	---	Lymphotoxin β
CD40	---	CD40L, CD154, TRAP, gp39
CD30	---	CD30L
CD27	---	CD27L, CD70
NGF-R1	---	NGF



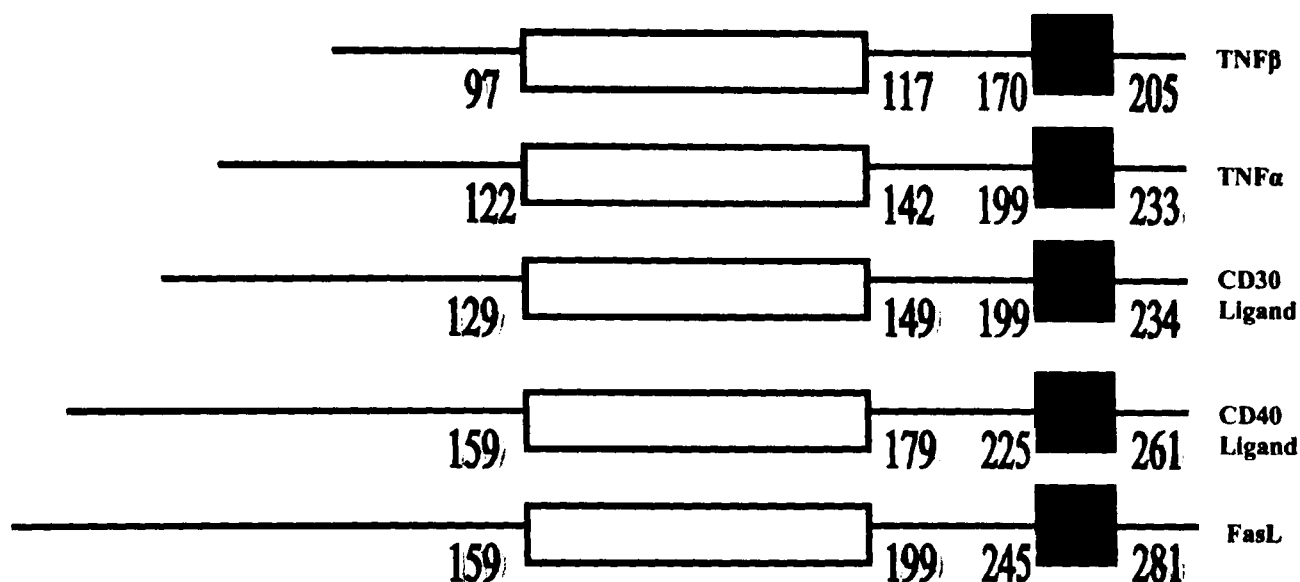
όπως η παρουσία αυξητικών παραγόντων. Η επαγωγή της απόπτωσης μέσω ενεργοποίησης του γονιδίου c-myc απαιτεί την παρουσία λειτουργικής πρωτεΐνης P53. Η συνεχής έκφραση του γονιδίου c-myc αυξάνει την ευαισθησία των κυττάρων στην απόπτωση που επάγεται από τις πρωτεΐνες θερμικού shock (heat shock proteins), την κυκλοεξιμίδη καθώς επίσης και από μια σειρά αντικαρκινικών παραγόντων (Hermeking and Eick 1994).

Το γονίδιο p53 χαρακτηρίζεται ως ογκοκατασταλτικό, γιατί η έκφρασή του και η παραγόμενη πρωτεΐνη P53 έχει την ικανότητα να διακόπτει τον πολλαπλασιασμό και να κατευθύνει το κύτταρο στη διαδικασία διαφοροποίησης. Μεταλλάξεις του γονιδίου p53 είναι συχνές σε κάποιους τύπους καρκίνου, όπως στον καρκίνο του μαστού. Ενώ ο φυσιολογικός τύπος της πρωτεΐνης P53 παρεμποδίζει την κυτταρική ανάπτυξη in vitro, η P53 πιστεύεται ότι δεν επηρεάζει άμεσα την επαγωγή της απόπτωσης σε πολλά είδη κυττάρων (Hermeking and Eick 1994, Hamington και συν. 1994). Μεταλλάξεις στο γονίδιο p53 μπορούν να προκαλέσουν «αθανασία» των κυττάρων με παρεμπόδιση της απόπτωσης και τελικά τη δημιουργία όγκων. Η πρωτεΐνη P21/WAF απεδείχθη σημαντικός καθωδικός τελεστής (downstream effector) της P53 και πιθανός αναστολέας των κυκλιν-εξαρτώμενων κινασών (Sheikh και συν. 1995).

1.2.5 Υπεροικογένεια υποδοχέων του Παράγοντα Νέκρωσης των Ογκων TNF

Οι υποδοχείς θανάτου που γνωρίζουμε μέχρι σήμερα είναι μέλη της υπερικογένειας του υποδοχέα του Παράγοντα Νέκρωσης των Ογκων TNF (Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily-TNFR) (πίνακας 7). Τα μέλη της οικογένειας αυτής χαρακτηρίζονται από την παρουσία παρόμοιων εξωκυττάρικων περιοχών, οι οποίες είναι πλούσιες σε κυστεΐνη (εικόνες 9,10). Οι υποδοχείς θανάτου αποτελούν υποομάδα της υπερικογένειας υποδοχέων TNFR, με μια ομόλογη κυτταροπλασματική περιοχή 80 αμινοξέων, η οποία ονομάζεται «περιοχή θανάτου» DD ("death domain") (Tartaglia και συν. 1993) και συμμετέχει στην απόπτωση. Οι περιοχές θανάτου επιτρέπουν στους υποδοχείς θανάτου να συνδεθούν με τον αποπτωτικό μηχανισμό, ενώ σε κάποιες περιπτώσεις είναι διαμεσολαβητές και σε λειτουργίες διαφορετικές από την απόπτωση, όπως στην

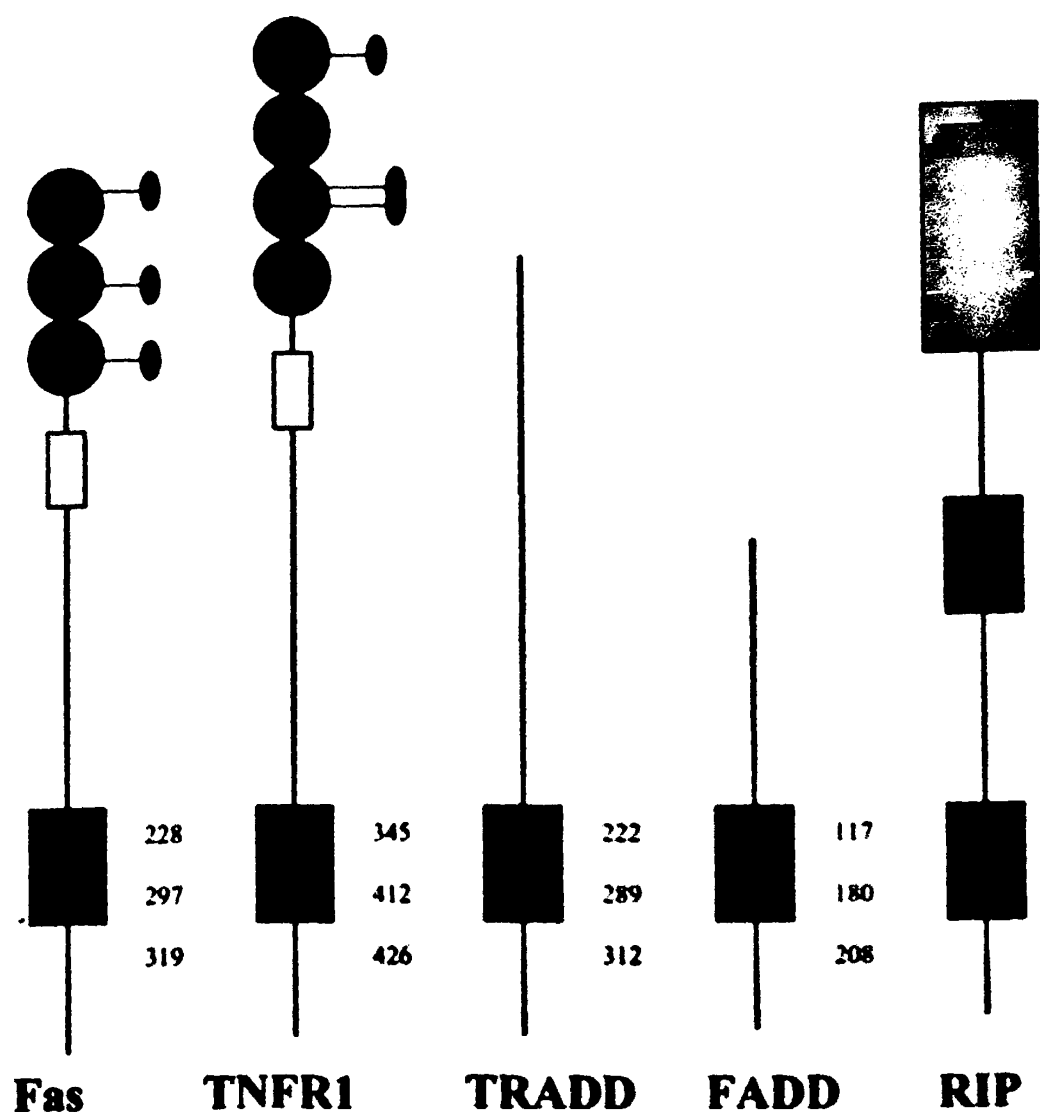




Εικόνα 9

Ομολογία μελών της οικογένειας TNF

Τα εικονιζόμενα μέλη της οικογένειας TNF (tumor necrosis factor) περιέχουν μία ομόλογη κυτταροπλασματική περιοχή 80 αμινοξέων, η οποία ονομάζεται «περιοχή θανάτου» DD (death domain).



Εικόνα 10

Ο υποδοχέας Fas και άλλες πρωτεΐνες με περιοχές θανάτου

Η «περιοχή θανάτου» DD του υποδοχέα Fas/Apo1/CD95 βρέθηκε και στον υποδοχέα TNFR1, στο μόριο-προσαρμοστή FADD (Fas-associated Death Domain) και στην πρωτεΐνη RIP (Fas Receptor Interacting Protein). Το μόριο FADD συνδέεται με τον υποδοχέα Fas/Apo1 μέσω των ομολόγων περιοχών θανάτου.

ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB (nuclear factor-κB). Είναι ακόμη γνωστό ότι κάποια μόρια-προσαρμοστές (adaptor molecules) περιέχουν και αυτά περιοχές θανάτου προκειμένου να μεταβιβάζουν σήματα από τους υποδοχείς θανάτου.

Στη διεθνή βιβλιογραφία μέχρι σήμερα, αναφέρονται οι υποδοχείς *Fas* /*CD95/Apo1* και ο τύπου 1 υποδοχέας του TNF ή *TNFR1* (TNF-receptor 1, αναφερόμενος και ως CD120a ή p55), ο *DR3* (death receptor 3) ο οποίος αναφέρεται και ως *Apo3*, *TRAMP*, *LARD* ή *WSL-1* (Ashkenazi and Dixit 1998). Άλλοι τέτοιοι υποδοχείς είναι ο *CAR1* (Brojatsch και συν. 1996), ο *DR4* (death receptor 4, αναφερόμενος και ως *TRAIL-R1*) (Pan και συν. 1997) και ο *DR5* (που αναφέρεται και ως *Apo2*, *TRAIL-R2*, *TRICK 2* ή *KILLER*) (Sheridan και συν. 1997) (πίνακας 7).

Ο ρόλος των υποδοχέων *Fas*, *TNFR1* και *DR3* είναι να μεταβιβάζουν τα αποπτωτικά σήματα μέσω του μορίου-προσαρμοστή *FADD/Mort 1* (Fas-associated Death Domain), που περιέχει «περιοχή θανάτου» (Boldin και συν. 1996) (εικόνα 10). Ο υποδοχέας *Fas* συνδέεται στο *FADD* άμεσα, ενώ οι *TNFR1* και *DR3* συνδέονται σ' αυτό έμμεσα μέσω ενός άλλου μορίου-προσαρμοστή που λέγεται *TRADD* (TNF-Receptor-associated Death Domain) (Hsu και συν. 1995). Επίσης, ο *FADD* περιέχει μια περιοχή θανάτου «death effector domain» (*DED*), που συνδέεται με ανάλογη περιοχή της κασπάσης-8 (Boldin και συν. 1996) (εικόνα 11). Ύστερα από τη μετάδοση του σήματος μέσω του *FADD*, ο ολιγομερισμός της κασπάσης-8, που είναι και γνωστή ως *FLICE* (FADD-like ICE) ή *MACH* οδηγεί στην ενεργοποίησή της μέσω αυτο-διάσπασης (Muzio και συν. 1998). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η κασπάση-8 να ενεργοποιεί καθοδικές (downstream) κασπάσες-τελεστές όπως είναι η κασπάση-9, οδηγώντας το κύτταρο στην απόπτωση. Μελέτες σε επίμυες, που δεν διαθέτουν το γονίδιο *FADD* (Zhang και συν. 1998), έδειξαν ότι αυτό το μόριο-προσαρμοστής είναι απαραίτητο για την επαγωγή της απόπτωσης μέσω των *Fas*, *TNFR1* και *DR3*.

α. Υποδοχέας θανάτου Fas (Fas Death Receptor)

Το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη *Fas* καταλαμβάνει κατά προσέγγιση 25kb στο μακρύ σκέλος του ανθρωπίνου χρωμοσώματος 10 (Liu και



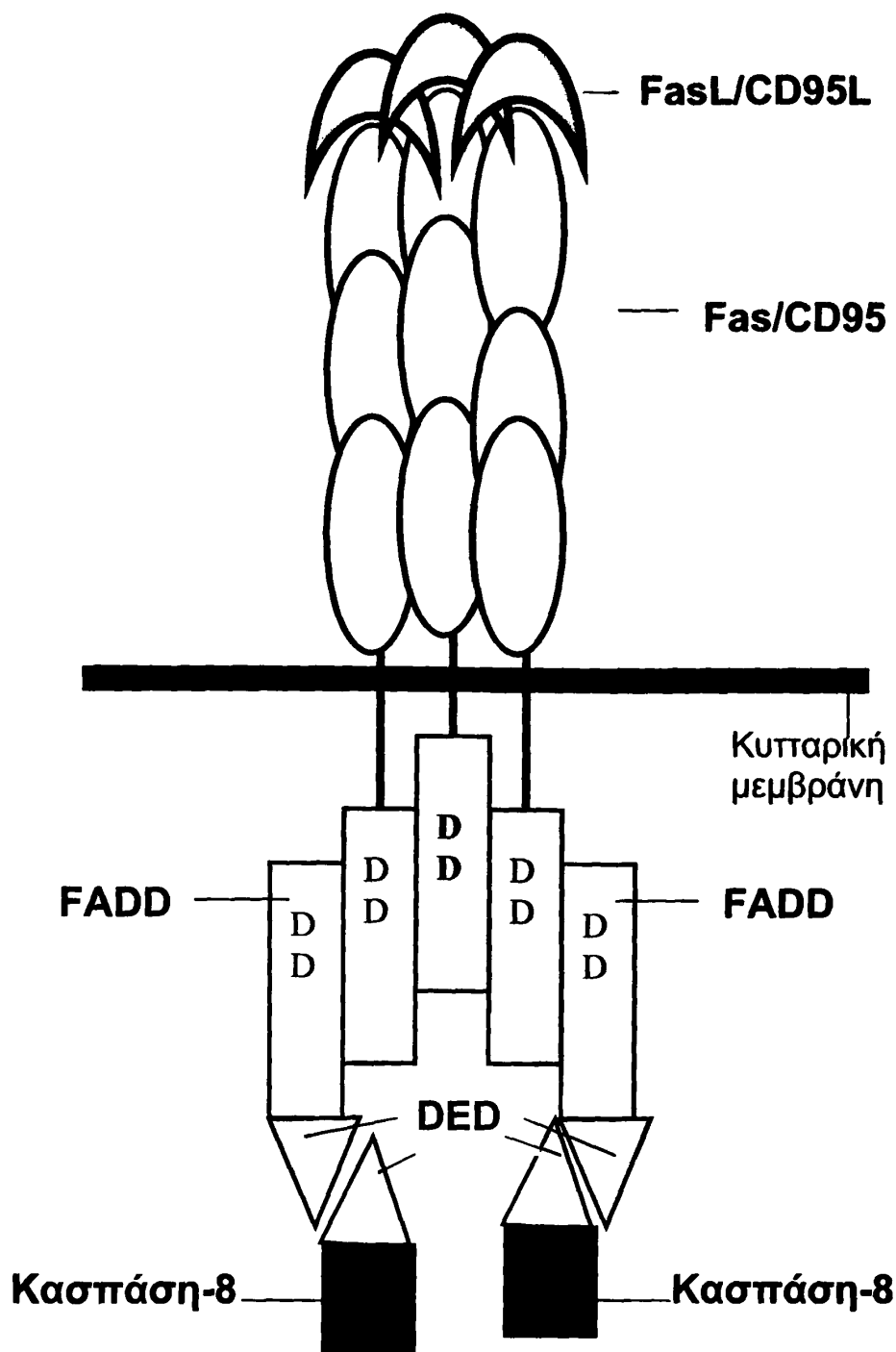
συν. 1995) και αποτελείται από εννέα εξόνια, τα οποία διαχωρίζονται από οκτώ ιντρόνια (εικόνα 12) (Behrmann και συν. 1994).

Το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 335 αμινοξέων. Αναφέρεται ότι η ώριμη πρωτεΐνη ξεκινά στο 17^ο αμινοξύ (Arg) σε σειρά από το εναρκτήριο κωδικόνιο, έτσι το ώριμο αντιγόνο Fas θα πρέπει να αποτελείται από 319 αμινοξέα με MB 36000. Περιέχει μία επέκταση (stretch) 17 μη φορτισμένων αμινοξέων που εκτείνεται από τη Leu-154 έως τη Val-170, και ακολουθείται από τρία βασικά αμινοξέα. Αυτές οι ιδιότητες συμβαδίζουν με αυτές που παρατηρούνται στο διαμεμβρανικό τμήμα πολλών πρωτεϊνών (Sabatini και συν. 1982) και υποδηλώνουν ότι το αντιγόνο Fas αποτελείται από μια εξωκυττάρια περιοχή 157 αμινοξέων, μια διαμεμβρανική περιοχή 17 αμινοξέων και μια κυτταροπλασματική περιοχή 145 αμινοξέων.

Επομένως, η πρωτεΐνη Fas είναι διαμεμβρανική πρωτεΐνη τύπου I με MB 45 kDa (Nagata 1994), η οποία διαθέτει μία σηματοδοτική αλληλουχία (signal sequence) στο αμινοτελικό της άκρο (N-terminus), ένα εξωκυττάριο τμήμα με τρεις πλούσιες σε κυστεΐνη υποπεριοχές, (subdomains), ένα υδρόφοβο διαμεμβρανικό τμήμα και μία κυτταροπλασματική ουρά στο καρβοξυτελικό της άκρο (C-terminus) (Itoh και συν. 1991). Οι ιδιότητες αυτές είναι χαρακτηριστικές μιας μεμβρανικής πρωτεΐνης τύπου 1 και ανευρίσκονται συχνά σε πολλούς υποδοχείς παραγόντων ανάπτυξης (Waterfield 1989).

Ο υποδοχέας Fas (μέλος 6 της υπεροικογένειας TNFR) εμφανίζει αξιοσημείωτη ομοιότητα στην εξωκυττάρια περιοχή του με την πρωτεΐνη NGFR (Nerve Growth Factor Receptor) (Johnson και συν. 1986), όπως και με τους υποδοχείς του TNF τύπου 1 και 2 (Schall και συν. 1990, Smith και συν. 1990), το B-κυτταρικό αντιγόνο CD40 (Stamenkovic και συν. 1989) και το T-κυτταρικό αντιγόνο OX40 (Mallett και συν. 1990). Οι παράγοντες TNFRs, NGFR και CD40 έχουν τέσσερις πλούσιες σε κυστεΐνη υποπεριοχές, ενώ τα αντιγόνα Fas και OX40 έχουν μόνο τρεις όμοιες υποπεριοχές. Επίσης, η κυτταροπλασματική περιοχή του αντιγόνου Fas εμφανίζει αξιοσημείωτη ομοιότητα με τις αντίστοιχες περιοχές των αντιγόνων TNFR τύπου 1 και CD40 (Itoh και συν. 1991) (εικόνα 9).

Η πρωτεΐνη Fas εκφράζεται σε διάφορους ιστούς (συμπεριλαμβανομένων των: θύμου αδένα, ήπατος, σπληνός, καρδιάς, πνευμόνων και θυρεοειδούς αδένα) και σε ποικιλία κυτταρικών τύπων, όπως είναι τα ενεργοποιημένα T- και B-λεμφοκύτταρα (Itoh και συν. 1991).



Εικόνα 11

Επαγωγή απόπτωσης μέσω αλληλεπίδρασης Fas-FasL

Μετά τη σύνδεση του Fas ligand/CD95L στον υποδοχέα Fas/CD95 και τον τριμερισμό του Fas, το αποπτωτικό σήμα μεταβιβάζεται μέσω του μορίου-προσαρμοστή FADD στην προκασπάση-8. Αυτή κατά την ενεργοποίησή της μετατρέπεται σε κασπάση-8 και ενεργοποιεί άλλες κασπάσες-τελεστές που οδηγούν τελικά το κύτταρο σε απόπτωση.
(FADD: Fas-associated Death Domain, DD: Death domain, DED: Death Effector Domain)

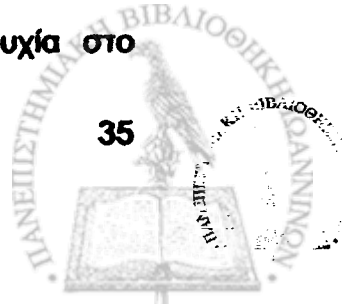
ΜΕΛΕΤΕΣ από διαφορετικές ερευνητικές ομάδες (Yonehara και συν. 1989, Trauth και συν. 1989, Itoh και συν. 1991) έδειξαν ότι ο υποδοχέας Fas επάγει αποπτωτικό θάνατο σε κύτταρα που τον εκφράζουν στην επιφάνειά τους, μετά από σύνδεσή του με anti-Fas αντίσωμα, ή το προσδετικό του μόριο FasL.

Όπως είναι γνωστό και για το σύστημα TNF, το προσδετικό μόριο FasL, (Banner και συν. 1993), είναι ομοτριμερές. Συνδέεται, δηλαδή, με τρεις υποδοχείς Fas (Smith και συν. 1994) (εικόνα 11) και επάγει τον τριμερισμό του υποδοχέα αυτού, ώστε να μεταδοθεί το αποπτωτικό σήμα. Η σύνδεση αυτή οδηγεί στη δημιουργία συμπλέγματος των περιοχών θανάτου (DD) των υποδοχέων. Ακολουθεί η σύνδεση του μορίου-προσαρμοστή FADD μέσω της δικής του περιοχής θανάτου (DD) με το σύμπλεγμα των περιοχών θανάτου (DDs) των υποδοχέων. Όπως αναφέρθηκε πιο πάνω, η πρωτεΐνη FADD διαθέτει και μια περιοχή, τη "death effector domain" (DED). Πρόκειται για τμήμα μιας περιοχής που ονομάζεται CARD (Caspase Activation and Recruitment Domain) και συναντάται σε διάφορες κασπάσες, όπως η κασπάση-2, -8, -9 και -10 (Hofmann και συν. 1997). Ο ολιγομερισμός της κασπάσης-8 μέσω του FADD οδηγεί σε ενεργοποίηση της ίδιας και των υπολοίπων κασπασών με κατάληξη τον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο.

β. Προσδετικό μόριο Fas Ligand

Το προσδετικό μόριο του υποδοχέα Fas, το μόριο Fas ligand (FasL) (γνωστό και ως CD95L, ή CD178) κωδικοποιείται από το γονίδιο fas ligand που βρίσκεται στο ανθρώπινο χρωμόσωμα 1 (Tumor Necrosis Factor Ligand Superfamily, member 6). Η πρωτεΐνη Fas Ligand, που κωδικοποιείται από το FasL mRNA (1909 bp), είναι διαμεμβρανική πρωτεΐνη τύπου II με MB 40 kDa και εκφράζεται σε κυτταροτοξικά T-κύτταρα ύστερα από ενεργοποίησή τους (Suda και συν. 1995) και σε κύτταρα ανοσολογικά προνομιούχων ιστών (immune-privileged tissues). Για την πρόκληση απόπτωσης είναι απαραίτητη η ενεργοποίηση της πρωτεΐνης Fas είτε μέσω anti-Fas αντισώματος είτε μέσω της πρωτεΐνης FasL (Yonehara και συν. 1989, Suda και συν. 1993) (εικόνες 2,3).

Το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 281 αμινοξέων με MB 31138. Τα πρώτα 77 αμινοξέα της πρωτεΐνης είναι πλούσια σε κατάλοιπα (residues) προλίνης. Παρόλο που λείπει μια σηματοδοτική αλληλουχία στο



αμινοτελικό άκρο (N-terminus), η πλούσια σε προλίνη περιοχή ακολουθείται από 22 υδρόφοβα αμινοξέα, τα οποία προφανώς λειτουργούν ως διαμεμβρανική «άγκυρα» (anchor). Η έλλειψη σηματοδοτικής αλληλουχίας και η παρουσία εσωτερικής υδρόφοβης περιοχής συνηγορούν στο ότι ο παράγοντας Fas Ligand είναι διαμεμβρανική πρωτεΐνη τύπου II. Η ονομαζόμενη εξωκυτάρια περιοχή, στο καρβοξυτελικό της άκρο, αποτελείται από 179 αμινοξέα (Suda και συν. 1993).

Η πρωτεΐνη Fas Ligand ανήκει κι αυτή στην υπεροικογένεια TNFR. Ο παράγοντας TNFα βρίσκεται, είτε ως τύπου II διαμεμβρανική πρωτεΐνη είτε ως διαλυτή κυτταροκίνη (Kriegler και συν. 1988). Τα προσδετικά μόρια των υποδοχέων CD40, CD27 και CD30 έχουν ταυτοποιηθεί ως τύπου II διαμεμβρανικές πρωτεΐνες σχετικές με τον TNF (Smith και συν. 1993). Η αλληλουχία αμινοξέων της πρωτεΐνης Fas Ligand εμφανίζει καθαρή ομοιότητα με τα μέλη αυτής της οικογένειας. Οι ομόλογες περιοχές περιορίζονται στην καρβοξυλική περιοχή, δηλαδή στην εξωκυτάρια περιοχή που αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα. Η κατά ζεύγη σύγκριση των παραπάνω πρωτεϊνών αποδεικνύει ότι ο παράγοντας Fas Ligand έχει μεγαλύτερη ομοιότητα προς τους TNFα, TNFβ και LTβ, παρά με τα προσδετικά μόρια των υποδοχέων CD40, CD27 και CD30. Παρά τη μεγάλη αυτή ομοιότητα, η πρωτεΐνη Fas Ligand δεν έχει ικανότητα σύνδεσης με τον υποδοχέα του TNF. Όπως και οι πρωτεΐνες TNFα και TNFβ (Smith και Baglioni 1987), έτσι και η πρωτεΐνη Fas Ligand λειτουργεί ως τριμερές.

Οι υποδοχείς Fas και FasL παίζουν σημαντικό ρόλο, κυρίως σε τρεις τύπους φυσιολογικής απόπτωσης: α) στην περιφερική εξάλειψη ενεργοποιημένων ώριμων T-κυττάρων κατά τη λήξη μιας ανοσολογικής αντίδρασης, β) στην καταστροφή κυττάρων-«στόχων» (όπως κύτταρα προσβεβλημένα από ιούς ή καρκινικά κύτταρα) μέσω των T-κυτταροτοξικών κυττάρων και των κυττάρων-φυσικών φονιάδων (NK), και γ) στην εξάλειψη κυττάρων φλεγμονής σε ανοσολογικά προνομιακούς ιστούς όπως είναι οι οφθαλμοί και οι όρχεις (Nagata and Golstein 1995, Nagata and Suda 1995) (εικόνες 2,3).

Παρόλο που αρχικά εθεωρείτο ότι ο FasL είναι ειδικός για τους λεμφικούς ιστούς, οι έρευνες έδειξαν συνεχή έκφρασή του σε ποικιλία μη λεμφικών ιστών, όπως η καρδιά και το πάγκρεας (French and Tschopp 1996).

Σε επίμυες αλλά και ανθρώπους με ελλείματα των υποδοχέων Fas και FasL (όπως οι μεταλλάξεις lpr και gld των υποδοχέων Fas και FasL αντίστοιχα σε



επίμυες) παρατηρήθηκε συσσώρευση περιφερικών λεμφοκυττάρων και ένα θανατηφόρο αυτοάνοσο σύνδρομο με μαζική διόγκωση λεμφαδένων. Επίσης, αυτοί οι δύο υποδοχείς εμπλέκονται και στην παθολογική καταστολή του ελέγχου που ασκεί το ανοσολογικό σύστημα (immune surveillance). Έχει παρατηρηθεί πρόσφατα η εξάλειψη ογκο-αντιδραστικών ανοσολογικών κυττάρων από κάποιους όγκους που εμφανίζουν συνεχή έκφραση FasL (Hahne και συν. 1996) (εικόνα 3).

Αυξημένη έκφραση FasL διαπιστώθηκε σε ποικίλες διαταραχές πολλαπλασιασμού (proliferative disorders) (Kato και συν. 1998) και καρκίνους (όπως σε καρκίνο οισοφάγου, ορθοπρωκτικό, ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα, σάρκωμα κ.α) (Lee και συν. 1998, Nakamoto και συν. 1999, O'Connell και συν. 1999).

γ. Διαλυτή μορφή υποδοχέα Fas (sFas)

Έχουν περιγραφεί τουλάχιστον οκτώ παραλλάγματα (variants) του Fas mRNA (full length Fas mRNA: 2755 bp) που προκύπτουν από εναλλακτικό μάτισμα (splicing) και κωδικοποιούν επτά διακριτές ισομορφές της πρωτεΐνης Fas. Οι ισομορφές, στις οποίες λείπει η διαμεμβρανική περιοχή, είναι ικανές για αρνητική ρύθμιση της απόπτωσης που επάγεται από την πλήρους μήκους ισομορφή 1 (εικόνα 12).

Οι Cheng και συν. (1994) περιέγραψαν αρχικά ένα Fas mRNA, στο οποίο λείπει ένα τμήμα 63 νουκλεοτιδίων και το οποίο κωδικοποιεί τη διαμεμβρανική περιοχή του υποδοχέα Fas. Αυτό το mRNA (γνωστό ως FasΔTM, 2692 bp), που προκύπτει από εναλλακτικό μάτισμα και εξάλειψη του εξονίου 6 (ισομορφή 2), κωδικοποιεί τη διαλυτή μορφή του Fas (sFas) (314 αμινοξέα, MB 26 kD) (εικόνα 12). Η διαλυτή πρωτεΐνη sFas έχει την ικανότητα να μπλοκάρει την anti-Fas-επαγόμενη απόπτωση in vitro και να μεταβάλλει την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων ως απάντηση σε αυτοαντιγόνα in vivo. Παρεμποδίζει, συνεπώς, την αλληλεπίδραση Fas-FasL και μπορεί να προστατέψει τα κύτταρα-στόχους από τη Fas-επαγόμενη απόπτωση (εικόνα 13).

Ένα χρόνο αργότερα, η ίδια ομάδα ερευνητών περιγράφει τρεις νέες μορφές Fas mRNA παραγόμενες από εναλλακτικό μάτισμα και συγκεκριμένα από εξάλειψη των εξονίων 3, 4, 6 και 7 (Liu και συν. 1995). Τα τρία νέα παραλλάγματα



του Fas mRNA (εικόνα 12), τα οποία ανιχνεύτηκαν με τη μέθοδο RT-PCR σε περιφερικά μονοπύρρηνα φυσιολογικού ατόμου, κωδικοποιούν μη λειτουργικά πολυπεπτίδια, εξαιτίας της μεταβολής στο αυθεντικό πλαίσιο ανάγνωσης του γονιδίου Fas (Fas authentic open reading frame).

Πιο αναλυτικά, η ισομορφή FasΔ(4,7) χαρακτηρίζεται από την εξάλειψη του εξονίου 4 (109 νουκλεοτίδια, από το νουκλεοτίδιο 529-GC TTA GAA έως το TGC ACC AA-637) και του εξονίου 7 (83 νουκλεοτίδια, από το νουκλεοτίδιο 763-TG AAG AGA έως το TTA AAT CCT-845). Το νέο πολυπεπτίδιο (ισομορφή 4) που κωδικοποιείται από αυτό το παράλλαγμα mRNA (2646 bp), αποτελείται από 149 αμινοξέα και έχει μοριακό βάρος 16646 Da.

Η ισομορφή FasΔ(3,4) χαρακτηρίζεται από εξάλειψη 247 νουκλεοτιδίων, από την αλληλουχία νουκλεοτιδίων 391-GT GAA AGG έως την αλληλουχία νουκλεοτιδίων TGC ACC AA-637, που αντιστοιχούν στα εξόνια 3 και 4. Αυτό το παράλλαγμα mRNA (2508 bp) κωδικοποιεί ένα πολυπεπτίδιο 103 αμινοξέων (ισομορφή 7) και έχει M.B 11434 Da.

Η ισομορφή FasΔ(3,4,6) χαρακτηρίζεται από εξάλειψη 310 νουκλεοτιδίων (εξόνια 3,4,6), των περιοχών, δηλαδή, που έχουν εξαλειφθεί στις ισομορφές FasΔTM και FasΔ(3,4). Το παράλλαγμα αυτό mRNA (2445 bp) κωδικοποιεί ένα πεπτίδιο 86 αμινοξέων (ισομορφή 6) με M.B 9389 Da.

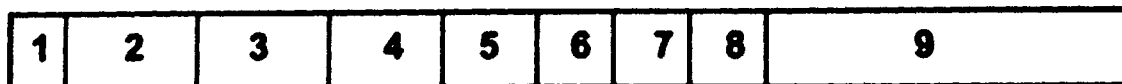
Από τα υπόλοιπα δύο παραλλάγματα, mRNA transcript variant 3 (2730 bp) και mRNA transcript variant 5 (2583 bp) προκύπτουν αντίστοιχα οι ισομορφές 3 (πολυπεπτίδιο 220 αμινοξέων) και 5 (πολυπεπτίδιο 132 αμινοξέων), οι οποίες περιέχουν βραχύτερο καρβοξυτελικό άκρο σε σύγκριση με την πλήρους μήκους ισομορφή 1.

Οι μελέτες έδειξαν ότι τα πολυπεπτίδια που κωδικοποιούνται από τις ισομορφές FasΔ(4,7), FasΔ(3,4) και FasΔ(3,4,6) διατηρούν το υδρόφοβο οδηγό πεπτίδιο του φυσιολογικού μορίου Fas, αλλά στις παραλλαγμένες αλληλουχίες αμινοξέων τους λείπει η υδρόφοβη διαμεμβρανική περιοχή, η οποία «αγκιστρώνει» τον υποδοχέα Fas στην κυτταρική μεμβράνη. Κατά συνέπεια, θα υπέθετε κανείς ότι τα παραπάνω πολυπεπτίδια θα μπορούσαν να εκκριθούν ως διαλυτές μορφές της πρωτεΐνης Fas. Παρόλα αυτά δεν διατηρούν τη διαμόρφωση της δομής στην εξωκυττάρια περιοχή της πρωτεΐνης Fas, όπως έχει παρατηρηθεί στην ισομορφή FasΔTM, η οποία μπορεί να συνδεθεί στον υποδοχέα Fas Ligand. Επιπλέον, τα παραπάνω πολυπεπτίδια δε διαθέτουν το



Εξόνια Fas

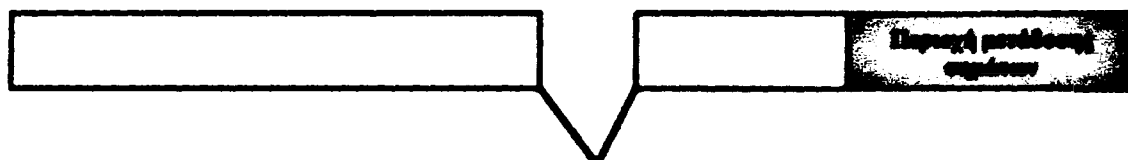
195 225 391 529 638 700 763 846 871



Fas πλήρους μήκους (full length)



FasΔTM



Εξάλειψη 700-763

FasΔ (4,7)



Εξάλειψη 529-637

Εξάλειψη 763-845

FasΔ (3,4)



Εξάλειψη 391-637

FasΔ (3,4,6)

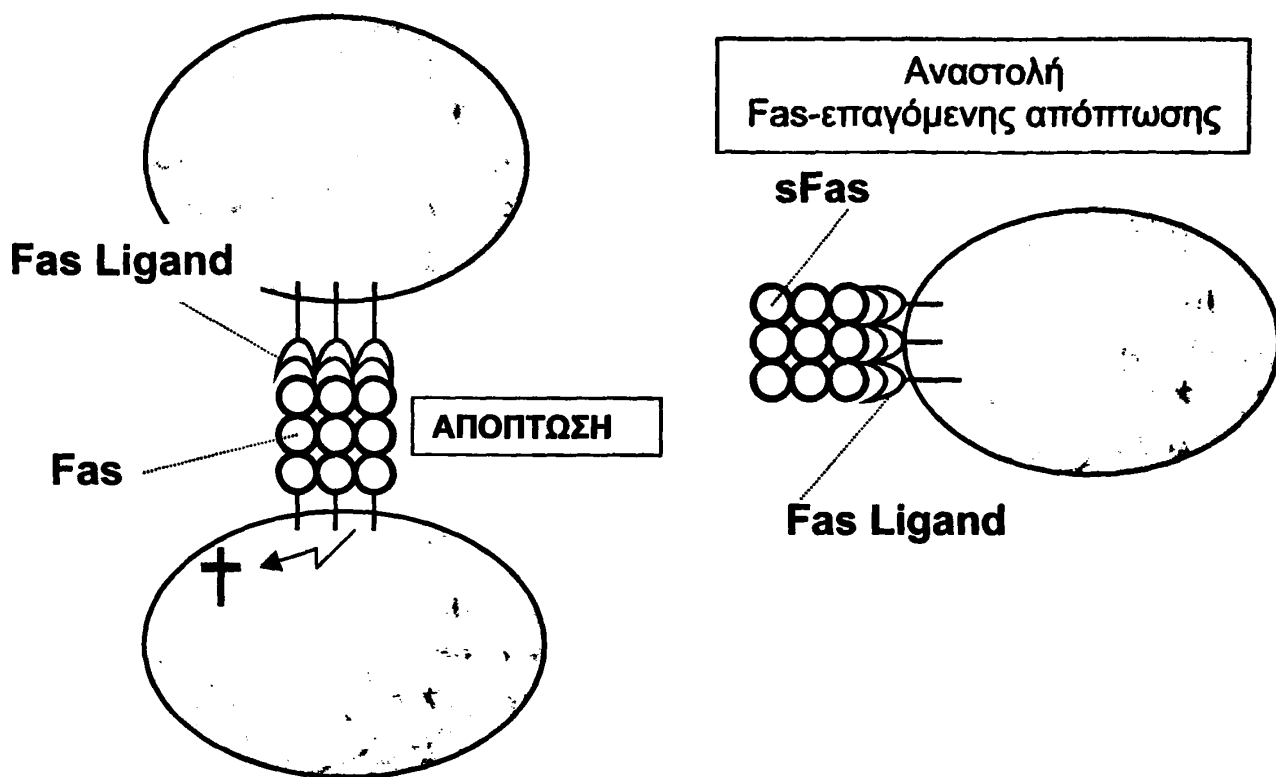


Εξάλειψη 391-637

Εξάλειψη 700-763

Εικόνα 12

Ισομορφές της πρωτεΐνης Fas



Εικόνα 13

Αναστολή Fas-επαγόμενης απόπτωσης μέσω διαλυτής πρωτεΐνης sFas

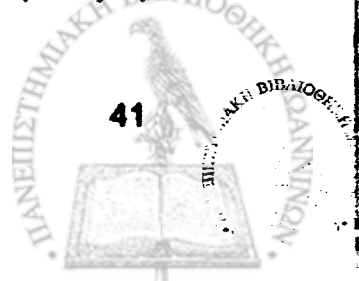
Στη διαλυτή πρωτεΐνη sFas, η οποία προκύπτει από εναλλακτικό μάτισμα του Fas mRNA, λείπει η διαμεμβρανική περιοχή του υποδοχέα Fas. Η διαλυτή αυτή πρωτεΐνη έχει την ικανότητα να μπλοκάρει την αλληλεπίδραση Fas-FasL, προστατεύοντας μ' αυτόν τον τρόπο τα κύτταρα-στόχους από τη Fas-επαγόμενη απόπτωση.

πτεπίδιο που αναγνωρίζεται από τα διαθέσιμα μονοκλωνικά αντισώματα, τα ειδικά για τον ανθρώπινο υποδοχέα Fas. Αυτοί είναι οι λόγοι που η ομάδα των Liu και συν. (1995) θεωρεί ότι δεν κατάφεραν να ανιχνεύσουν στη μελέτη τους τα παραπάνω πρωτεϊνικά προϊόντα με κυτταρομετρία ροής ή ανοσοκατακρήμνιση με τη χρήση τέτοιων αντισωμάτων.

Αντίθετα, με τη χρήση της μεθόδου RT-PCR, έγινε δυνατή η ανίχνευση των διαφόρων παραλλαγμάτων Fas mRNA σε περιφερικά μονοπύρρηνα κύτταρα του αίματος (PBMCs). Διαπιστώθηκε ότι μετά από διέγερση των PBMCs, αυξήθηκε η έκφραση του υποδοχέα Fas στην κυτταρική μεμβράνη (που κωδικοποιείται από το πλήρους μήκους Fas mRNA) ενώ ελαττώθηκε η έκφραση των ισομορφών που προκύπτουν από εναλλακτικό μάτισμα mRNA και ειδικά της διαλυτής μορφής FasΔTM. Κατά την άποψη των Liu και συν. αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι το εναλλακτικό μάτισμα κατέχει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου Fas. Οι τρεις ισομορφές (εκτός της FasΔTM) είναι παρούσες σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις και κωδικοποιούν μη λειτουργική πρωτεΐνη Fas, η οποία δεν μπορεί να συνδεθεί με τον υποδοχέα FasL. Είναι άγνωστος, λοιπόν, ο ρόλος τους, πιθανολογείται, όμως, ότι μπορεί να χρησιμεύουν ως διακόπτες (on/off switch) στη ρύθμιση της έκφρασης των άλλων δύο ισομορφών (Fas και FasΔTM).

Η διαλυτή πρωτεΐνη sFas βρέθηκε αυξημένη στον ορό ασθενών με Συστηματικό Ερυθηματώδη Λύκο (ΣΕΛ) και ανιχνεύτηκε και στο αρθρικό υγρό της προσβεβλημένης άρθρωσης σε ρευματοειδή αρθρίτιδα (Jodo και συν. 1997, Knipring και συν. 1997). Τα αυξημένα επίπεδα sFas συσχετίστηκαν από κάποιους ερευνητές με τα κλινικά και εργαστηριακά ευρήματα της νόσου (Jodo και συν. 1997), άλλες μελέτες, όμως, δεν επιβεβαίωσαν τα ευρήματα αυτά (Goel και συν. 1995, Knipring και συν. 1997). Τα αποτελέσματα των παραπάνω ερευνών αποτελούν ενδείξεις ότι η πρωτεΐνη sFas πιθανόν να αναστέλλει την απόπτωση των αυτοαντιδρώντων Τ-κυττάρων και να προκαλεί έξαρση της αυτοάνοσης φλεγμονώδους διεργασίας.

Αξιοσημείωτα αυξημένα επίπεδα sFas αναφέρθηκαν, ακόμη, σε ασθενείς με μυοκαρδίτιδα (Toyozaki και συν. 1998), τα οποία παρουσίασαν πτώση όταν οι ασθενείς εμφάνιζαν κλινική βελτίωση. Η ομάδα που διεξήγαγε τη μελέτη αυτή υποστηρίζει ότι η αύξηση των επιπέδων sFas πιθανόν αναστέλλει την απόπτωση των ενεργοποιημένων Τ-κυττάρων, οδηγώντας σε επίμονη κυτταροτοξική καταστροφή των μυοκυττάρων κατά τη μυοκαρδίτιδα.



Πρόσφατες μελέτες συσχετίζουν τα αυξημένα επίπεδα sFas με την παθογένεια αυτοάνοσων νοσημάτων του θυρεοειδούς αδένος, όπως η νόσος Graves και η θυρεοειδίτιδα Hashimoto (Shimaoka και συν. 1998, Hiromatsu και συν. 1999).

Οι Guillot και συν. (2001) διαπίστωσαν αυξημένα επίπεδα sFas σε διαβητικούς ασθενείς με νευροπάθεια, πιστεύουν, όμως, ότι η αύξηση αυτή οφείλεται στην απόπτωση των περιφερικών νευρικών κυττάρων που συμβαίνει σε αυτούς τους ασθενείς.

Δεδομένου του κυρίαρχου ρόλου του μορίου sFas στις αυτοάνοσες παθήσεις, η αφαίρεση της πρωτεΐνης sFas από τον ορό ασθενών, που πάσχουν για παράδειγμα από ΣΕΛ με πλασμαφαίρεση, θα μπορούσε να συντηρήσει τη φυσιολογική απόπτωση και να οδηγήσει σε ύφεση της αυτοάνοσης διεργασίας (Cheng και συν. 1994). Η αναστολή της Fas-επαγόμενης απόπτωσης *in vivo* με ανασυνδυασμένα μόρια sFas είναι πολύ πιθανόν να αποβεί κλινικά χρήσιμη σε καταστάσεις όπως οι προαναφερθείσες ασθένειες.

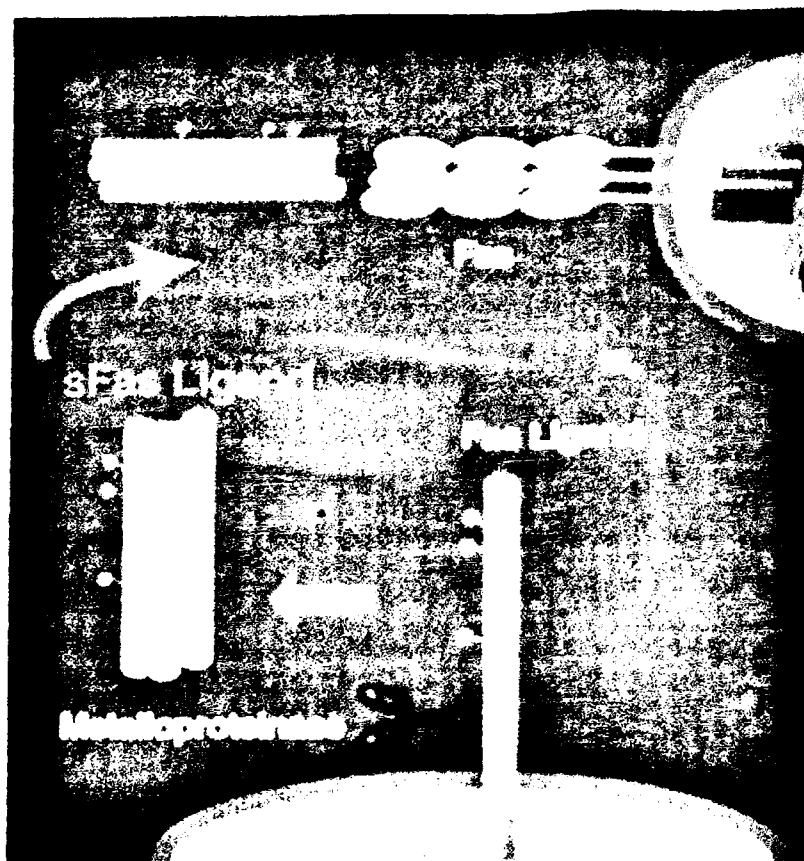
δ. Διαλυτή μορφή προσδετικού μορίου Fas Ligand (sFasL)

Η πρωτεΐνη FasL έχει κι αυτή διαλυτή μορφή (sFasL) με MB 26 kD, η οποία προκύπτει (όπως είναι γνωστό και για τον υποδοχέα TNF) από αποκοπή της πρωτεΐνης FasL από την κυτταρική μεμβράνη μέσω μιας μεταλλοπρωτεϊνάσης (Tanaka και συν. 1995) (εικόνα 14). Το μόριο sFasL έχει την ικανότητα επαγωγής απόπτωσης σε Fas-θετικά κύτταρα-στόχους (Takashi και συν. 1995, Hosaka και συν. 1998) μέσω σύνδεσης με τον υποδοχέα Fas.

Όπως η διαλυτή μορφή του παράγοντα TNF κυκλοφορεί στον ορό ασθενών με σηπτικό shock από βακτηριακές ενδοτοξίνες ή με καρκίνο (Beutler και Cerami 1986, Old 1987), κατά τον ίδιο τρόπο η παραγωγή της διαλυτής πρωτεΐνης sFasL μπορεί να συνοδεύει ανθρώπινες παθήσεις.

Διαπιστώθηκε αξιοσημείωτη αύξηση των επιπέδων της πρωτεΐνης sFasL στον ορό ασθενών με Τοξική Επιδερμική Νεκρόλυση (Viard et al, 1998), ασθενών με ρευματικά νοσήματα (Nozawa et al, 1997), LGL λευχαιμία (large granular lymphocytic leukemia) και NK λέμφωμα (natural killer cell lymphoma) (Sato et al, 1996). Διαπιστώθηκε, ακόμη, παράλληλα με την αύξηση των επιπέδων sFasL,





Εικόνα 14

Διαλυτή μορφή πρωτεΐνης Fas Ligand (soluble FasL)

Η διαλυτή πρωτεΐνη sFasL προκύπτει από αποκοπή της πρωτεΐνης FasL από την κυτταρική μεμβράνη μέσω μιας μεταλλοπρωτεΐνωσης. Η σύνδεση της sFasL με τον υποδοχέα Fas της κυτταρικής μεμβράνης οδηγεί το κύτταρο σε αποπτωτικό θάνατο.

αύξηση της ηπατικής δυσλειτουργίας (Taieb et al, 1998), καθώς και της καταστροφής των νεφρών (Ortiz et al, 1999; Sano et al, 1998). Η αύξηση της συγκέντρωσης της sFasL πρωτεΐνης στον ορό αναφέρεται και ως καλός δείκτης για θεραπεία σε ασθενείς με νόσο μοσχεύματος-έναντι- ξενιστή (Das et al, 1999; Tannapfel et al, 1999). Τα επίπεδα sFasL στον ορό αναφέρονται, επίσης, αξιοσημείωτα υψηλά στον ορό ασθενών με συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια (Toyozaki et al, 1998) ή ανεπάρκεια πολλαπλών οργάνων (Hori et al, 1999), καθώς και στο υγρό βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος ασθενών με οξύ τραύμα των πνευμόνων (Matute-Bello et al, 1999) σε σχέση με τα επίπεδα των φυσιολογικών ατόμων. Έχουν περιγραφεί, επίσης, υψηλές συγκεντρώσεις sFasL στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό ασθενών με σοβαρό εγκεφαλικό τραύμα (Ertel και συν. 1997), σε αιματολογικές διαταραχές (Hasegawa και συν. 1998) και λοιμώξεις από τον ιό HIV (Hosaka και συν. 1998).

Αντίθετα, τα επίπεδα sFasL στον ορό διαβητικών ασθενών με νευροπάθεια, στους οποίους διαπιστώθηκε αύξηση των επιπέδων sFas, δε διέφεραν από αυτά των φυσιολογικών ατόμων (Guillot et al 2001).

Ενεργή ανθρώπινη πρωτεΐνη sFasL ανιχνεύτηκε από την ομάδα των Tanaka και συν. (1995) σε ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα επιμολυμμένα με FasL cDNA, γεγονός που πιθανολογεί τη λειτουργία της πρωτεΐνης sFasL ως παθολογικού παράγοντα στη συστηματική ιστική καταστροφή. Σύμφωνα με τους ίδιους ερευνητές, είναι πιθανό ότι η μη φυσιολογική ή εκτεταμένη ενεργοποίηση των T-κυττάρων προκαλεί την παραγωγή της πρωτεΐνης sFasL, η οποία μπορεί να έχει δηλητηριώδεις (καταστροφικές) επιδράσεις στον άνθρωπο. Η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη sFasL θα αποτελέσει χρήσιμο εργαλείο για την εξέταση των παθολογικών επιδράσεων της σε ένα σύστημα ζωικού μοντέλου. Σε κάθε περίπτωση θα είναι ενδιαφέρουσα η διερεύνηση των επιπέδων της πρωτεΐνης sFasL στον ορό ασθενών με διάφορες παθήσεις.

ε. Μετάδοση αποπτωτικών σημάτων μέσω του υποδοχέα TNFR1

Οι πρωτεΐνες TNF-α και TNF-β αρχικά ταυτοποιήθηκαν ως παράγοντες με αντικαρκινική δράση, παραγόμενοι από ενεργοποιημένα μακροφάγα και λεμφοκύτταρα αντίστοιχα (Old 1985, Beutler και Cerami 1989). Στη συνέχεια

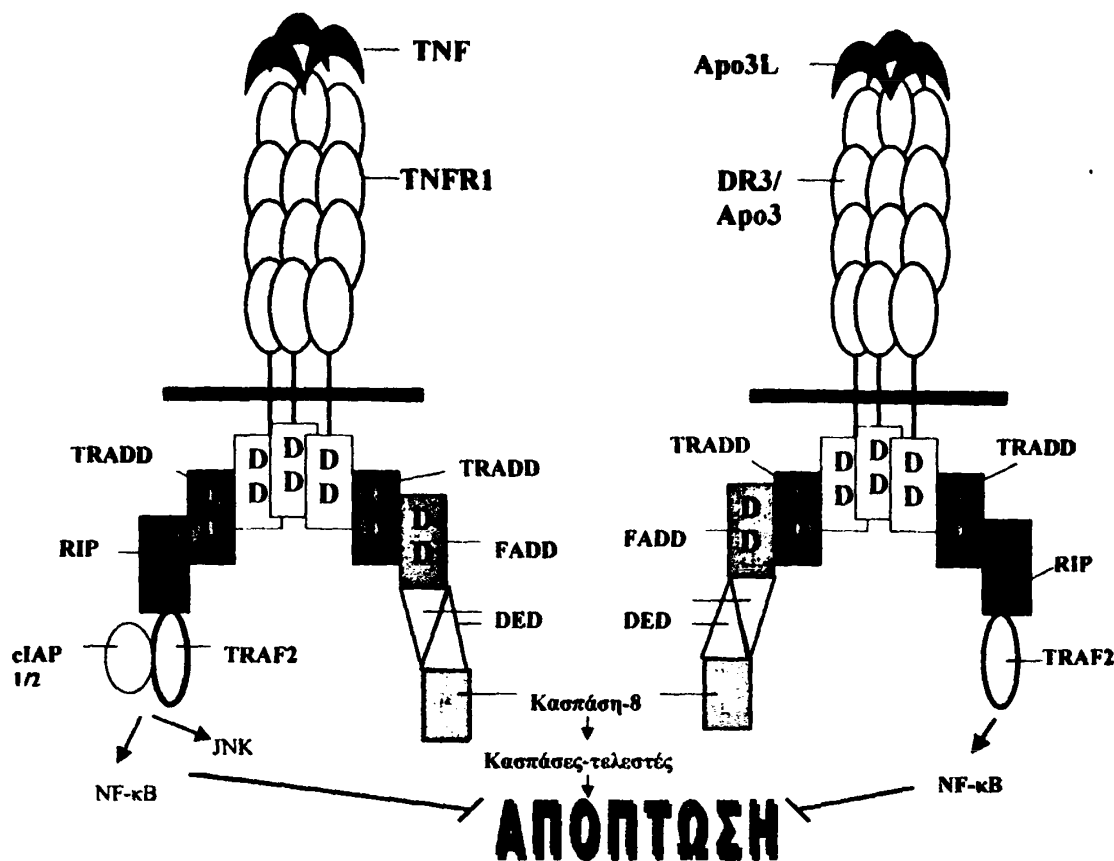


αποδόθηκαν στον παράγοντα TNF ποικίλες βιολογικές δραστηριότητες, όπως η προαγωγή της αύξησης, η αντιϊική και ανοσορυθμιστική δραστηριότητα (Suganman και συν. 1985, Beutler και Cerami 1989). Αυτές οι δραστηριότητες του παράγοντα TNF φαίνεται ότι εκδηλώνονται με την αλληλεπίδρασή του με τον υποδοχέα του στη μεμβράνη του κυττάρου (Hohmann και συν. 1989).

Με τη σύνδεσή της πρωτεΐνης TNF στον αντίστοιχο υποδοχέα του TNFR1 (MB ~55kDa) ενεργοποιούνται οι μεταγραφικοί παράγοντες NF-κB και AP-1 (εικόνα 15), οι οποίοι με τη σειρά τους επάγουν την έκφραση προ-φλεγμονωδών και ανοσοτροποποιητικών γονιδίων (Tartaglia and Goeddel 1992). Η σύνδεση όμως των TNF και TNFR1 σε κάποια κύτταρα μπορεί να οδηγήσει σε απόπτωση, γεγονός το οποίο παρατηρείται σπάνια όταν αναστέλλεται η πρωτεϊνσύνθεση. Αυτό αποτελεί μια ένδειξη ότι προϋπάρχουν κυτταρικοί παράγοντες που μπορούν να καταστείλουν το αποπτωτικό ερέθισμα το οποίο πυροδοτείται από τον TNF.

Φαίνεται, λοιπόν, ότι η έκφραση τέτοιων κατασταλτικών πρωτεϊνών ελέγχεται μέσω των παραγόντων NF-κB και JNK/AP-1 (c-Jun N-terminal kinase), καθώς η αναστολή των οδών αυτών ευαισθητοποιεί τα κύτταρα στην επαγωγή της απόπτωσης μέσω του TNF (Tartaglia and Goeddel 1992) (εικόνα 15).

Ο TNF προκαλεί τον τριμερισμό του TNFR1 μετά τη σύνδεσή του σ' αυτόν (Smith και συν. 1994) και αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη σύνδεση των «περιοχών θανάτου» των υποδοχέων. Στη συνέχεια, το μόριο TRADD συνδέεται στις περιοχές αυτές με τη δική του «περιοχή θανάτου» (DD) λειτουργώντας, με αυτόν τον τρόπο, σαν διαμεσολαβητής μεταξύ του ενεργοποιημένου υποδοχέα και των σηματοδοτικών μορίων (Hsu και συν. 1995). Ο παράγοντας TRAF2 (TNFR-associated factor-2) με μοριακό βάρος 75kDa, ο οποίος συνδέεται με τον TNFR και την πρωτεΐνη RIP (Receptor-Interacting Protein) η οποία αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα, πυροδοτούν οδούς σημάτων οι οποίοι οδηγούν τελικά στην ενεργοποίηση των μεταγραφικών παραγόντων NF-κB και JNK/AP-1, ενώ η σύνδεση των πρωτεϊνών TRADD και FADD οδηγεί σε απόπτωση (Rothe και συν. 1995, Hsu και συν. 1996). Επίσης, είναι γνωστό ότι ο TRAF2 συνδέεται και με τις πρωτεΐνες cIAP-1 και cIAP-2 (cellular Inhibitor of Apoptosis Protein -1 and -2), οι οποίες ανήκουν σε μια οικογένεια πρωτεϊνών θηλαστικών και κών που εμφανίζουν αντι-αποπτωτική δραστηριότητα (Shu και συν. 1996) (εικόνα 15).



Εικόνα 15

Μεταγωγή προ-αποπτωτικών και αντι-αποπτωτικών σημάτων μέσω των υποδοχέων TNFR1 και DR3

Ο τριμερισμός του υποδοχέα TNFR1 που επάγεται μέσω του TNF οδηγεί στη συσσωμάτωση των περιοχών θανάτου DDs και στην προσέλκυση του μορίου-προσαρμοστή TRADD. Αυτό με τη σειρά του προσελκύει τις κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες με περιοχές θανάτου, τις FADD, TRAF2 και RIP που σχηματίζουν με τον TNFR1 ένα ενεργό σύμπλεγμα σηματοδότησης. Το σύμπλεγμα TNFR1-TRADD-FADD ενεργοποιεί την προκασπάση-8 σε κασπάση-8, η οποία προκαλεί την έναρξη της κασπασο-εξαρτώμενης απόπτωσης. Αντίθετα, η σύνδεση του μορίου TRADD με τις πρωτεΐνες TRAF2 και RIP έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των παραγόντων JNK και NF-κΒ και αναστολή της απόπτωσης.

Όπως αναφέρθηκε ήδη, το μόριο FADD συνδέει το σύμπλεγμα TNFR1-TRADD με την κασπάση-8, οδηγώντας το κύτταρο τελικά σε απόπτωση. Εκτός από το FADD, ο TNFR1 μπορεί να συνδεθεί και με ένα άλλο μόριο-προσαρμοστή που αναφέρεται ως *RAIDD* (RIP associated Ich-1/CED homologous protein with death domain) ή *CRADD* (Caspase and RIP adaptor with death domain). Το μόριο αυτό συνδέεται με την περιοχή θανάτου (DD) που διαθέτει, στην περιοχή θανάτου της πρωτεΐνης RIP και σε ανάλογη περιοχή της κασπάσης-2 επάγοντας με αυτή την τριπλή σύνδεση τον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο (Duan and Dixit 1997).

στ. Μετάδοση αποπτωτικών σημάτων μέσω του υποδοχέα DR3

Ο υποδοχέας DR3, ο οποίος εμφανίζει μεγάλη δομική ομοιότητα με τον υποδοχέα TNFR1 (Ashkenazi and Dixit 1998), κατά την υπερέκφρασή του πυροδοτεί αντιδράσεις παρόμοιες με τον TNFR1, όπως την ενεργοποίηση του παράγοντα NF-κΒ και την απόπτωση (εικόνα 15). Όπως και ο TNFR1, έτσι και ο DR3 ενεργοποιεί τον NF-κΒ, μέσω της σύνδεσης με τα μόρια TRADD, TRAF2 (TNF-Receptor Associated Factor-2) και RIP, ενώ την απόπτωση μέσω των πρωτεϊνών TRADD, FADD και της κασπάσης-8. Ο υποδοχέας DR3 συνδέεται με το προσδετικό μόριο APO3L, το οποίο σχετίζεται περρισσότερο με τον παράγοντα TNF (Marsters και συν. 1998). Το προσδετικό μόριο APO3L ενεργοποιεί τον παράγοντα NF-κΒ μέσω των πρωτεϊνών TRADD, TRAF2 και RIP, και πυροδοτεί την απόπτωση μέσω των μορίων TRADD, FADD αφού γίνει η σύνδεσή του με τον υποδοχέα DR3. Επομένως, το προσδετικό μόριο APO3L έχει μεγάλη ομοιότητα με τον TNF, αν και υπάρχουν αξιοσημείωτες διαφορές στην έκφραση αυτών των προσδετικών μορίων και των αντίστοιχων υποδοχέων τους. Για παράδειγμα, ο παράγοντας TNF εκφράζεται κυρίως σε ενεργοποιημένα μακροφάγα και λεμφοκύτταρα (Tartaglia and Goeddel 1992), ενώ ο APO3L εκφράζεται σε πολλούς ιστούς (Ashkenazi and Dixit 1998). Όμως, παρά την αλληλοεπικάλυψη των μηχανισμών μετάδοσης των σημάτων, οι αλληλεπιδράσεις APO3L-DR3 και TNF-TNFR1 έχουν πιθανότατα διαφορετικούς ρόλους.

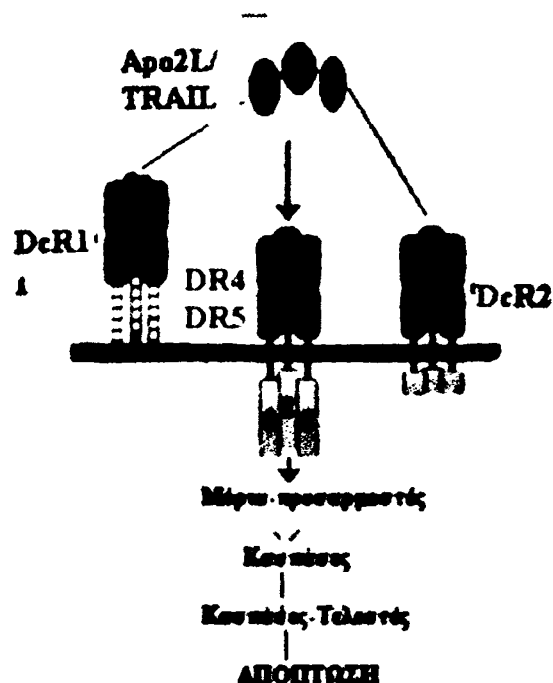
ζ. Μετάδοση αποπτωτικών σημάτων μέσω του μορίου TRAIL και των υποδοχέων του DR4 και DR5

Πρόσφατα ταυτοποιήθηκε ένα μέλος της οικογένειας TNF με τη μεγαλύτερη ομοιότητα ως προς το προσδετικό μόριο FasL. Το νέο αυτό μόριο, που ταυτοποιήθηκε από δύο ανεξάρτητες ομάδες ερευνητών, ονομάστηκε Aro2L ή TRAIL (TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand). Όπως και η πρωτεΐνη FasL, το μόριο TRAIL πυροδοτεί ταχέως την απόπτωση σε πολλές κυτταρικές σειρές (Wiley και συν. 1995). Αν και ο υποδοχέας Fas εκφράζεται κυρίως σε ενεργοποιημένα T-κύτταρα και NK κύτταρα, έχει διαπιστωθεί συνεχής έκφραση του μορίου TRAIL σε πολλούς ιστούς, καθώς και αύξηση της έκφρασής του κατά τον ίδιο τρόπο με τον υποδοχέα Fas, μετά από διέγερση των περιφερικών T-λεμφοκυττάρων του αίματος (Duan and Dixit 1997). Μια υποομάδα των T-κυττάρων αποκτά ευαισθησία στην TRAIL-επαγόμενη απόπτωση ύστερα από διέγερση μέσω της ιντερλευκίνης-2 (IL-2). Αυτό αποτελεί ένδειξη ότι το μόριο TRAIL παίζει ρόλο στην εξάλειψη των περιφερικών T-κυττάρων (Marsters και συν. 1996).

Έχουν ταυτοποιηθεί δύο νέοι υποδοχείς της οικογένειας TNFR, γνωστοί ως DR4 και DR5, στους οποίους συνδέεται το προσδετικό μόριο TRAIL. Όταν οι υποδοχείς αυτοί υπερεκφράζονται, πυροδοτούν την απόπτωση μέσω μιας οδού ανεξάρτητης του μορίου FADD, αλλά εξαρτώμενης από τις κασπάσες (Pan και συν. 1997, Sheridan και συν. 1997) (εικόνα 16).

Έχει διαπιστωθεί, όμως, και η ύπαρξη μηχανισμών που προστατεύουν τα κύτταρα από την επαγωγή της απόπτωσης μέσω του προσδετικού μορίου TRAIL. Μια μορφή προστασίας βασίζεται στη μοναδική ομάδα των λεγόμενων υποδοχέων «παγίδων» «Decoy Receptors» (DcRs), οι οποίοι ανταγωνίζονται τους DR4 και DR5 στη σύνδεσή τους με τον TRAIL (Golstein 1997) (εικόνα 16). Ο υποδοχέας DcR1 (που λέγεται και TRID, TRAIL-R3 ή LIT) είναι μια πρωτεΐνη της κυτταρικής επιφάνειας παρόμοια με τους DR4 και DR5, η οποία, όμως, στερείται της κυτταροπλασματικής περιοχής αυτών των υποδοχέων (Sheridan και συν. 1997). Ο υποδοχέας αυτός φαίνεται να λειτουργεί ως "παγίδα- ασφαλιστική δικλείδα", η οποία εμποδίζει το μόριο TRAIL να συνδεθεί στους αντίστοιχους





Εικόνα 16

Μετάδοση αποπτωτικών σημάτων μέσω των υποδοχέων DR4 και DR5 και τροποποίηση της οδού μετάδοσης από τους υποδοχείς DcR1 και DcR2.

Οι δύο νέοι υποδοχείς της οικογένειας TNFR που ταυτοποιήθηκαν, γνωστοί ως DR4 και DR5, συνδέονται με το προσδετικό μόριο TRAIL. Όταν οι υποδοχείς αυτοί υπερεκφράζονται, πυροδοτούν την απόπτωση μέσω μιας οδού ανεξάρτητης του μορίου FADD, αλλά εξαρτώμενης από τις κασπάσες. Έχει διαπιστωθεί, όμως, και η ύπαρξη των υποδοχέων «παγίδων» «Decoy Receptors» (DcRs), οι οποίοι ανταγωνίζονται τους DR4 και DR5 στη σύνδεσή τους με τον TRAIL. Ο υποδοχέας DcR1 είναι μια πρωτεΐνη της κυτταρικής επιφάνειας παρόμοια με τους DR4 και DR5, που στερείται, όμως, της κυταροπλασματικής περιοχής αυτών των υποδοχέων. Ο υποδοχέας DcR2, είναι ανάλογος με τους υποδοχείς DR4 και DR5, αλλά διαθέτει μια κυταροπλασματική περιοχή που μοιάζει με τις περιοχές θανάτου. Ο υποδοχέας αυτός δε διαθέτει τέσσερις από τις έξι θέσεις αμινοξέων που είναι απαραίτητες για την απόπτωση και την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ μέσω του υποδοχέα TNFR1 (Science 1998, 281, 1305-1308).

υποδοχείς θανάτου. Ο υποδοχέας DcR2 (που λέγεται και TRAIL-R4 ή TRUNDD) (Marsters και συν. 1997), είναι ανάλογος με τους υποδοχείς DR4 και DR5, αλλά διαθέτει μια κυτταροπλασματική περιοχή που μοιάζει με τις περιοχές θανάτου και έχει μήκος ίσο με το ένα τρίτο του μήκους μιας περιοχής θανάτου DD. Ο υποδοχέας DcR2 δεν διαθέτει τέσσερις από τις έξι θέσεις αμινοξέων που είναι απαραίτητες για την απόπτωση και την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ μέσω του υποδοχέα TNFR1 (Tartaglia και συν. 1993). Φαίνεται, όμως, ότι και αυτός λειτουργεί σαν «παγίδα» που ανταγωνίζεται με τους υποδοχείς DR4 και DR5 για τη σύνδεσή τους με το μόριο TRAIL. Τα γονίδια που κωδικοποιούν τους υποδοχείς DR4, DR5, DcR1 και DcR2 έχουν χαρτογραφηθεί όλα στο ανθρώπινο χρωμόσωμα 8p21-22, γεγονός που αποτελεί ένδειξη ότι προέρχονται όλα από ένα κοινό αρχέγονο γονίδιο (Marsters και συν. 1997).

η. Μελλοντικές προοπτικές

Είναι πράγματι ελκυστική η ιδέα να χρησιμοποιήσουμε ως στόχους τους υποδοχείς θανάτου για την επαγωγή απόπτωσης σε όγκους, καθώς οι υποδοχείς αυτοί έχουν άμεση πρόσβαση στο μηχανισμό των κασπασών. Σε αντίθεση με πολλούς χημειοθεραπευτικούς παράγοντες ή την ακτινοθεραπεία, οι υποδοχείς θανάτου πυροδοτούν την απόπτωση ανεξάρτητα από το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53 το οποίο άλλωστε είναι απενεργοποιημένο από μεταλλάξεις σε αρκετούς καρκίνους στον άνθρωπο. Παρόλα αυτά, είναι περιορισμένη η χρησιμότητα των πρωτεϊνών TNF και FasL εξαιτίας των τοξικών παρενεργειών τους. Η συστηματική χορήγηση κάποιων δόσεων TNF μπορεί να προκαλέσει σημαντική φλεγμονώδη αντίδραση που μοιάζει με σηπτικό shock, πιθανότατα από την επαγωγή έκφρασης προ-φλεγμονωδών γονιδίων στα μακροφάγα και τα ενδοθηλιακά κύτταρα μέσω ενεργοποίησης του NF-κΒ. Η ένεση anti-Fas αντισώματος σε επίμυες με όγκο μπορεί να είναι θανάσιμη, προφανώς εξαιτίας της επαγωγής απόπτωσης στα ηπατοκύτταρα που εκφράζουν έντονα τον υποδοχέα Fas. Κάποιες διαφορές μεταξύ των TNF ή Fas και του Apo2L δείχνουν ότι ο τελευταίος μπορεί να είναι πιο ασφαλής παράγοντας. Ένας λόγος είναι, ότι παρόλο που οι DR4 και DR5 όταν υπερεκφράζονται μπορούν να ενεργοποιήσουν τον NF-κΒ, ο παράγοντας TRAIL από μόνος του προκαλεί ασθενώς αυτή την αντίδραση και η ενεργοποίηση αυτή απαιτεί πολύ μεγαλύτερες δόσεις από τις



δόσεις του TNF (Thomberry and Lazebnik 1998). Επίσης, πολλοί ιστοί εμφανίζουν συνεχή έκφραση TRAIL mRNA. Άλλος ένας λόγος είναι επείδή οι DR4 και DR5 εκφράζονται σε φυσιολογικούς ιστούς και κάποιους τύπους καρκινικών κυττάρων, ενώ οι DcR1 και DcR2 εκφράζονται συχνά σε φυσιολογικούς ιστούς, αλλά σπάνια σε καρκινικά κύτταρα, γεγονός που όπως φαίνεται δίνει τη δυνατότητα στον TRAIL να επάγει απόπτωση σε καρκινικά κύτταρα, αλλά όχι σε φυσιολογικά. Οι αρχικές μελέτες σε επίμυες με καρκίνο υποστηρίζουν αυτή τη θεωρία. Παραμένει να διευκρινιστεί πλήρως ο βιολογικός ρόλος του TRAIL και η πιθανή χρήση της κυτταροκίνης αυτής ως θεραπευτικού παράγοντα για τον ανθρώπινο καρκίνο.

1.2.6 Κασπάσες - Οι «εκτελεστές» της απόπτωσης (Caspases = CysteinyI ASPartic acid proteASES)

Η ανακάλυψη της ομολογίας μεταξύ της CED-3 του *C. elegans* και του μετατρεπτικού ενζύμου της Ιντελευκίνης 1β (IL-1β converting enzyme, ICE), μιας κυστεϊνικής πρωτεάσης των θηλαστικών, αποτέλεσε την πρώτη ένδειξη ότι παρόμοιοι μηχανισμοί εμπλέκονται στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο σε διαφορετικούς οργανισμούς.

Κύριο συστατικό του αποπτωτικού μηχανισμού στα θηλαστικά είναι το πρωτεολυτικό σύστημα που αφορά μια οικογένεια πρωτεασών, που ονομάζονται κασπάσες.

Η απόπτωση ολοκληρώνεται σε δύο φάσεις: μια αρχική «δεσμευτική φάση» (initial commitment phase), η οποία ακολουθείται από μια «εκτελεστική» φάση (execution phase). Οι κασπάσες παίζουν κύριο ρόλο στην εκτελεστική φάση και είναι υπεύθυνες για πολλές από τις βιοχημικές και μορφολογικές μεταβολές που σχετίζονται με την απόπτωση. Έτσι, τα ένζυμα αυτά συμμετέχουν σε αλυσιδωτή αντίδραση που πυροδοτείται από προαποπτωτικά σήματα και οδηγεί στη διάλυση του κυττάρου. Επειδή γνωρίζουμε πολύ λίγα για τη ρύθμιση των κασπασών, η μελέτη ήδη γνωστών πρωτεολυτικών συστημάτων μπορεί να μας προσφέρει πολλά στοιχεία.

Το πρώτο μέλος της οικογένειας των κασπασών το οποίο ταυτοποιήθηκε είναι η πρωτεΐνη ICE ή κασπάση 1. Έχουν ταυτοποιηθεί 14 κασπάσες θηλαστικών μέχρι σήμερα με διαφορετικούς ρόλους στη φλεγμονή και στην



απόπτωση (Saikumar και συν. 1999) (πίνακας 8). Οι πρωτεΐνες αυτές χαρακτηρίζονται από σχεδόν απόλυτη ειδικότητα για το ασπαρτικό οξύ στη θέση P1. Όλες οι κασπάσες περιέχουν μια διατηρημένη πενταπεπτιδική αλληλουχία ενεργούς περιοχής Gln-Ala-Cys-X-Gly (όπου X=Arg, Gln, ή Gly).

Στην απόπτωση οι κασπάσες λειτουργούν είτε ως *εναρκτές «initiators»*, είτε ως *τελεστές «effectors»* της διαδικασίας διάλυσης του κυττάρου ως απάντηση σε προαποπτωτικά σήματα (εικόνα 15). Όπως και οι άλλες πρωτεάσες, οι κασπάσες συντίθενται ως ανενεργά προένζυμα και διαθέτουν 3 περιοχές : 1) μια προ-περιοχή (prodomain), ένα αμινοτελικό άκρο(-NH₂) που ποικίλλει σε μήκος (από 23 έως 216 αμινοξέα) και σε αλληλουχία αμινοξέων και το οποίο σχετίζεται με την ενεργοποίηση των προενζύμων, 2) μια μεγάλη υποομάδα (MB ~20 kD) και 3) μια μικρή υποομάδα (MB ~ 10 kD). Η ενεργοποίηση των προενζύμων οδηγεί σε συνένωση της μεγάλης και της μικρής υποομάδας, οι οποίες σχηματίζουν μ' αυτόν τον τρόπο ένα ετεροδιμερές. Από τη μελέτη των κασπασών 1 και 3 προκύπτει ότι δύο διμερή συνενώνονται και σχηματίζουν ένα τετραμερές με δύο καταλυτικές περιοχές, οι οποίες φαίνονται να λειτουργούν ανεξάρτητα μεταξύ τους (Wilson και συν. 1994, Rotonda και συν. 1996). Η ενεργοποίηση των κασπασών κατά την απόπτωση οδηγεί σε διάσπαση σημαντικών κυτταρικών υποστρωμάτων, όπως η πολυ-ADP-ριβοζο-πολυμεράση, οι κυτταροκερατίνες και λαμίνες, επιταχύνοντας τις δραματικές μορφολογικές μεταβολές της απόπτωσης.

Οι κασπάσες είναι από τις πιο ειδικές πρωτεάσες. Απαραίτητη προϋπόθεση για επαρκή κατάλυση είναι η αναγνώριση τεσσάρων τουλάχιστον αμινοξέων στο αμινοτελικό άκρο της περιοχής διάσπασης. Η τετραπεπτιδική χωροδιάταξη η οποία αναγνωρίζεται είναι διαφορετική για τους διάφορους τύπους κασπασών. Το γεγονός αυτό εξηγεί την ποικιλομορφία των βιολογικών τους λειτουργιών (Thornberry και συν. 1997). Επιπλέον, δεν διασπώνται όλες οι πρωτεΐνες με το συγκεκριμένο τετραπεπτίδιο, γεγονός που υποδηλώνει ότι στοιχεία τεταρτοταγούς δομής επηρεάζουν την αναγνώριση.

Η υψηλή ειδικότητα των κασπασών συμφωνεί με την παρατήρηση ότι στην απόπτωση δεν έχουμε αδιάκριτη πέψη πρωτεϊνών. Αντίθετα, επιλεγμένη ομάδα πρωτεϊνών διασπάται με συντονισμένο τρόπο, συνήθως σε μια μόνο περιοχή, κι αυτό έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια ή μεταβολή της λειτουργίας της πρωτεΐνης.



Οι κασπάσες μπορούν να υποδιαιρεθούν με βάση έναν αριθμό διαφορετικών κριτηρίων, όπως η φυλογενετική ανάλυση, η ειδικότητα υποστρώματος και/ή το μέγεθος της προ-περιοχής.

α. Ρόλος των κασπασών στην απόπτωση

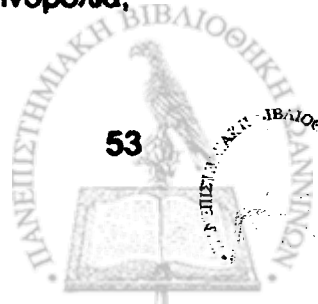
Γενετικές μελέτες, οι οποίες έγιναν σε οργανισμούς με έλλειψη των γονιδίων που κωδικοποιούν τις κασπάσες, συνέβαλαν στην κατανόηση του πολύπλοκου ρόλου τους στην απόπτωση και στην ανάπτυξη των ζωικών οργανισμών.

Υπάρχουν ενδείξεις ότι η κασπάση-1 (ICE) παίζει σημαντικό ρόλο στη φλεγμονή μέσω της ενεργοποίησης κυτταροκινών όπως η IL-1β και η IL-18, ενώ δεν φαίνεται να πυροδοτεί την απόπτωση κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, ούτε να παίζει ρόλο στην ανάπτυξη των οργανισμών.

Σε περιπτώσεις έλλειψης της κασπάσης-3 διαπιστώθηκε ελαττωμένη ανάπτυξη του εγκεφάλου των ζώων και πρόωμος θάνατος. Η λειτουργική κασπάση-3 είναι απαραίτητη για τη δημιουργία αποπτωτικών σωματιδίων, τη συμπύκνωση της χρωματίνης και την κατάτμηση του DNA σε όλους τους κυτταρικούς τύπους.

Φαίνεται ότι η κασπάση-8 είναι απαραίτητη για τον κυτταρικό θάνατο κατά την ανάπτυξη των θηλαστικών, καθώς η εξάλειψη του αντίστοιχου γονιδίου οδήγησε στο θάνατο του εμβρύου την 11η εβδομάδα και σε ανώμαλο σχηματισμό της καρδιάς (Varfolomeev και συν. 1998). Παρόμοιο αποτέλεσμα είχε και η έλλειψη της πρωτεΐνης FADD, που απαιτείται για την ενεργοποίηση της κασπάσης-8 (Zhang και συν. 1998, Varfolomeev και συν. 1998). Σε κύτταρα με έλλειψη κασπάσης-8 δεν προκαλείται κυτταρικός θάνατος με σήματα μελών της οικογένειας TNFR (Varfolomeev και συν. 1998, Juo και συν. 1998).

Η κασπάση-9 φαίνεται να έχει κεντρικό ρόλο στην απόπτωση που επάγεται από ενδοκυτάρια σήματα, όπως σε περίπτωση βλάβης του DNA από διάφορους παράγοντες (Hakem και συν. 1998). Επίσης, παίζει σημαντικό ρόλο και στην ανάπτυξη, καθώς η αδρανοποίηση του αντίστοιχου γονιδίου προκάλεσε αποπτωτική ανεπάρκεια σε αναπτυσσόμενους νευρώνες και κρανιοπροσωπικές ανωμαλίες. Τα κύτταρα με έλλειψη κασπάσης-9 είναι ανθεκτικά στην ακτινοβολία,



αλλά παραμένουν ευαίσθητα στην απόπτωση μέσω TNF- α ή Fas, καθώς διατηρούν την κασπάση-8, η οποία, όπως και η κασπάση-9, μπορεί να ενεργοποιήσει την κασπάση-3 (Hakem και συν. 1998, Kuida και συν. 1998) (εικόνα 17).

Έτσι, η κασπάση-8 είναι η κορυφαία κασπάση στην απόπτωση που επάγεται από υποδοχείς θανάτου, ενώ η κασπάση-9 στην απόπτωση που επάγεται από χημικές ουσίες ή stress. Όλες οι παραπάνω παρατηρήσεις δείχνουν ότι διαφορετικές οδοί μετάδοσης σημάτων θανάτου καταλήγουν στην ενεργοποίηση των ίδιων τελεστών-κασπασών. Πράγματι, η κασπάση-3 θεωρείται εκτελεστικό μόριο-κλειδί που ενεργοποιείται από αποπτωτικά ερεθίσματα είτε μέσω υποδοχέων από εξωγενή μόρια, είτε από το εσωτερικό του κυττάρου ύστερα από επίδραση φαρμάκων, τοξινών ή ακτινοβολίας (Sun και συν. 1999).

β. Τρόπος δράσης των κασπασών

Δεν είναι πλήρως κατανοητός ο τρόπος με τον οποίο συμμετέχουν οι κασπάσες στην απόπτωση. Από τις κασπάσες που έχουν ήδη ταυτοποιηθεί, μόνο για λίγες έχει απόλυτα διευκρινιστεί η σχέση τους με τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (Porter and Janicke 1997, Cryns and Yuan 1998).

Ένας τρόπος δράσης των κασπασών είναι η *απενεργοποίηση πρωτεϊνών που προστατεύουν το κύτταρο από την απόπτωση*. Παράδειγμα αποτελεί ο παράγοντας ICAD (Inhibitor of Caspase-Activated Dnase), ο οποίος είναι αναστολέας της νουκλεάσης CAD (caspase-activated deoxyribonuclease) που είναι υπεύθυνη για την κατάτμηση του DNA. Σε μη αποπτωτικά κύτταρα η νουκλεάση CAD είναι παρούσα ως ανενεργό σύμπλεγμα με τον παράγοντα ICAD. Κατά την απόπτωση, ο ICAD απενεργοποιείται από τις κασπάσες αφήνοντας την πρωτεΐνη CAD ελεύθερη να δράσει ως νουκλεάση (Enari και συν. 1998, Liu και συν. 1997) (εικόνα 18).

Άλλος τρόπος δράσης των κασπασών είναι η *άμεση καταστροφή κυτταρικών σκελετών*, όπως η πυρηνική lamina (Takahashi και συν. 1996, Orth και συν. 1996), που βρίσκεται κάτω από την πυρηνική μεμβράνη και συμβάλλει στην οργάνωση της χρωματίνης. Κατά την απόπτωση, οι λαμίνες (πρωτεΐνες που αποτελούν τη lamina) διασπώνται από τις κασπάσες σε μια μόνο περιοχή με αποτέλεσμα την καταστροφή της lamina και τη συμπύκνωση της χρωματίνης.

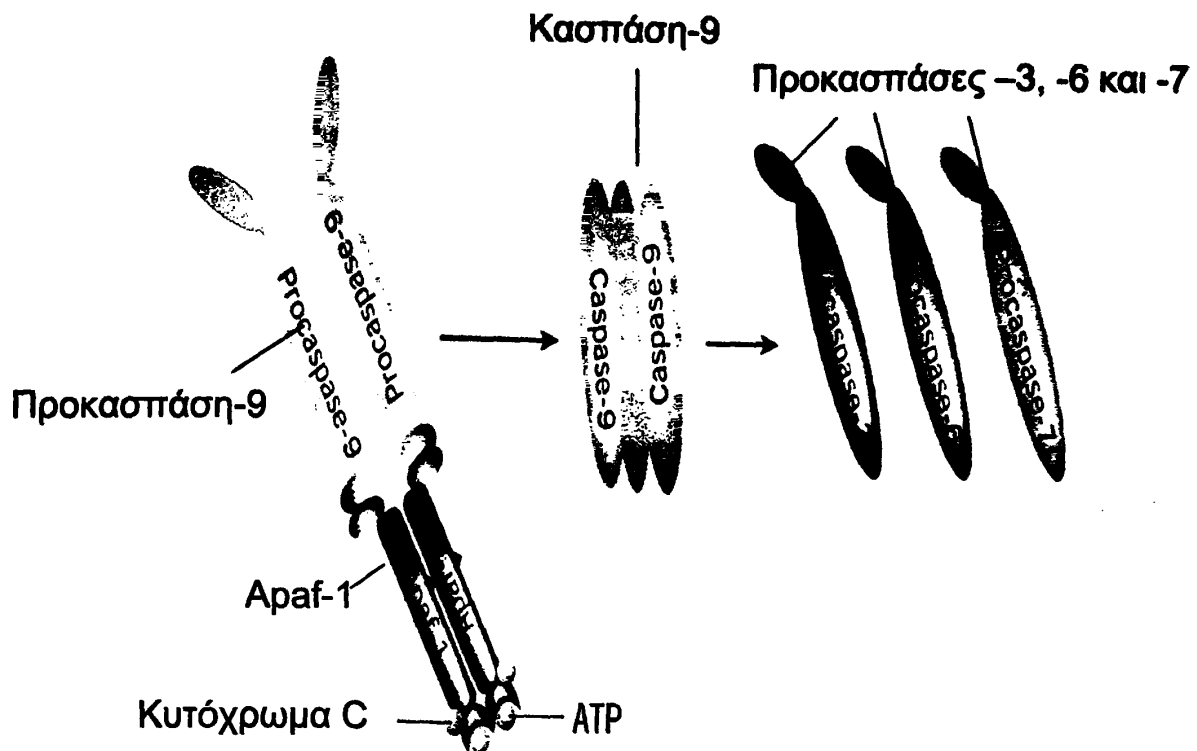


Επιπλέον, οι κασπάσες απορρυθμίζουν τη δράση των πρωτεϊνών με διαχωρισμό των ρυθμιστικών και καταλυτικών περιοχών τους, που έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια ή την απόκτηση κάποιας λειτουργίας. Παράδειγμα αποτελεί η απορρύθμιση της δράσης πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην επιδιόρθωση βλαβών του DNA (όπως η DNA-PKcs, DNA-dependent protein kinase catalytic site), στην ωρίμανση του m-RNA (όπως η U1-70K) και στην αντιγραφή του DNA (όπως ο παράγοντας αντιγραφής γ) (Cryns and Yuan 1998, Rheaume και συν. 1997). Παρόλο που η σχέση αυτών των διασπάσεων με τον κυτταρικό θάνατο δεν είναι πλήρως κατανοητή, είναι πιθανόν η δυσλειτουργία των ομοιοστατικών και επιδιορθωτικών μηχανισμών να διευκολύνει τη διάλυση του κυττάρου.

Όλα τα παραπάνω οδηγούν στο συμπέρασμα ότι οι κασπάσες συμμετέχουν στην απόπτωση με έναν τρόπο καλά οργανωμένης "στρατιωτικής επιχείρησης". Διακόπτουν τις συνδέσεις με γειτονικά κύτταρα, αναδιοργανώνουν τον κυτταροσκελετό, σταματούν την αντιγραφή και επιδιόρθωση του DNA, διακόπτουν το μάτισμα του RNA (splicing), καταστρέφουν το DNA και τον πυρηνικό σκελετό. Επίσης, προκαλούν την αποστολή σημάτων από τα κύτταρα, τα οποία οδηγούν στη δημιουργία αποπτωτικών σωματιδίων και σε φαγοκυττάρωση.

1.2.7 Μιτοχόνδρια

Πολλά από τα γεγονότα-κλειδιά της απόπτωσης, όπως η απελευθέρωση ενεργοποιητών των κασπασών (του κυτοχρώματος c, για παράδειγμα), οι μεταβολές στη μεταφορά ηλεκτρονίων, η απώλεια του διαμεμβρανικού δυναμικού των μιτοχονδρίων, η τροποποίηση της κυτταρικής οξειδοαναγωγής και η συμμετοχή προ- και αντι- αποπτωτικών Bcl-2 πρωτεϊνών, συμβαίνουν στα μιτοχόνδρια. Αν και η απόπτωση είναι ανεξάρτητη της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (δεν απαιτεί την ύπαρξη μιτοχονδριακού DNA), έχει αναγνωριστεί πλέον σε πολλά συστήματα ο κεντρικός ρόλος των μιτοχονδρίων σ' αυτή τη διαδικασία (Jacobson και συν. 1993).



Εικόνα 17

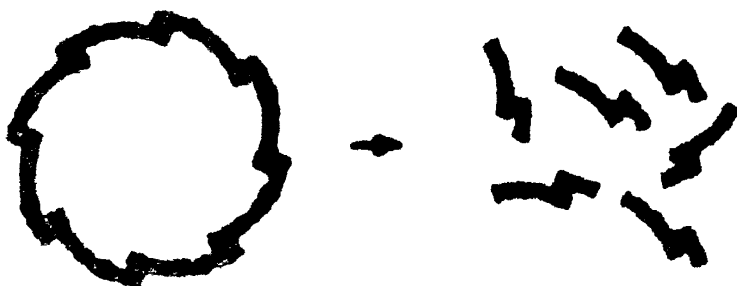
Ενεργοποίηση κασπασών

Η ενεργοποίηση της κασπάσης-9 προκαλείται ύστερα από τη δημιουργία συμπλέγματος μεταξύ Αραf-1 και κυτοχρώματος c. Στη συνέχεια η κασπάση-9 μπορεί να ενεργοποιήσει άλλες κασπάσες (-3,-6,-7) μέσω πρωτεολυτικής διάσπασης.

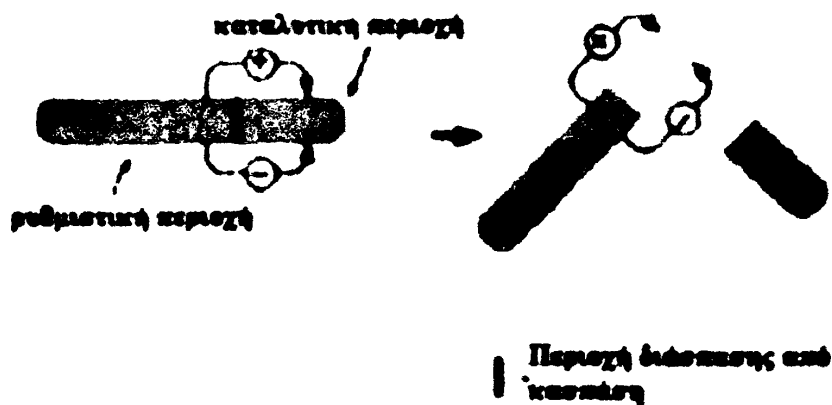
A. Απενεργοποίηση ανασταλέων της απόπτωσης



B. Καταστροφή κυτταρικών δομών



Γ. Απορρύθμιση πρωτεϊνικής δραστηριότητας



Εικόνα 18

Τρόποι δράσης των κασπασών

1. η απενεργοποίηση πρωτεϊνών που προστατεύουν το κύτταρο από την απόπτωση,
2. η άμεση καταστροφή κυτταρικών σκελετών, όπως η πυρηνική lamina, που βρίσκεται κάτω από την πυρηνική μεμβράνη και συμβάλλει στην οργάνωση της χρωματίνης, και
3. η απορρύθμιση της δράσης των πρωτεϊνών με διαχωρισμό των ρυθμιστικών και καταλυτικών περιοχών τους, που έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια ή την απόκτηση κάποιας λειτουργίας (Science 1996, 274, 990-992).

Πίνακας 8

Οι κασπάσες που είναι γνωστές μέχρι σήμερα			
Όνομα	Άλλες ονομασίες	Λειτουργία	MB
Κασπάση-1	ICE	Φλεγμονή	45
Κασπάση-2	ICH-1, Nedd-2	Τελεστής απόπτωσης	51
Κασπάση-3	CPP32, Yama, aporain, SCA-1, LICE	Τελεστής	32
Κασπάση-4	TX, ICH-2, ICErel-II	Τελεστής	43
Κασπάση-5	TY, ICErel-III	Τελεστής	48
Κασπάση-6	Mch2	Τελεστής	34
Κασπάση-7	Mch3, ICE-LAP3, CMH-1	Τελεστής	35
Κασπάση-8	FLICE, Mach, Mch5	Εναρκτής	55
Κασπάση-9	ICE-LAP6, Mch6	Εναρκτής	46
Κασπάση-10	FLICE-2, Mch4	Εναρκτής	55
Κασπάση-11	mICH-3, mCASP-11	Φλεγμονή, Τελεστής απόπτωσης	43
Κασπάση-12	mICH-4, mCASP-12	Τελεστής	50
Κασπάση-13	ERICE	Τελεστής	43
Κασπάση-14	MICE	Τελεστής	30



α. Πυροδότηση αποπτωτικού και μη αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου από τα μιτοχόνδρια

Είναι γνωστοί τουλάχιστον τρεις γενικοί μηχανισμοί πυροδότησης κυτταρικού θανάτου από τα μιτοχόνδρια, που πιθανόν σχετίζονται μεταξύ τους: 1) η διακοπή της μεταφοράς ηλεκτρονίων, της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και της παραγωγής ATP, 2) η απελευθέρωση πρωτεϊνών που ενεργοποιούν τις κασπάσες, όπως το κυτόχρωμα c, ο παράγοντας AIF (apoptosis-inducing factor) (εικόνα 17) και ενδομιτοχονδριακές κασπάσες και 3) η μετατροπή του κυτταρικού δυναμικού οξειδοαναγωγής.

Έχουν προταθεί δύο γενικοί μηχανισμοί απελευθέρωσης πρωτεϊνών από τα μιτοχόνδρια. Πρώτος μηχανισμός είναι η διαταραχή της ωσμωτικής ισορροπίας, το οίδημα του μιτοχονδρίου και η επακόλουθη ρήξη της εξωτερικής του μεμβράνης και δεύτερος μηχανισμός η διάνοιξη διαύλων στην εξωτερική μεμβράνη (χωρίς οίδημα του οργανιδίου), με αποτέλεσμα την απελευθέρωση κυτοχρώματος c από τον ενδομεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων στο κυτταρόπλασμα.

Το κυτόχρωμα c ενεργοποιεί τις κασπάσες συνδεδεμένο με τον παράγοντα Araf-1 και προκαλώντας τη συνένωση του Araf-1 με την προκασπάση-9 (Li και συν. 1997). Κατ' αυτόν τον τρόπο πυροδοτείται ενεργοποίηση της κασπάσης-9 και έναρξη της πρωτεολυτικής αντίδρασης-καταρράκτη (cascade) των κασπασών, η οποία οδηγεί στην απόπτωση (εικόνα 17).

Είναι αξιοσημείωτο ότι οι αναστολείς των κασπασών δεν εμποδίζουν την απελευθέρωση κυτοχρώματος c που επάγεται από διαφόρους αποπτωτικούς παράγοντες, όπως η UV ακτινοβολία ή η υπερέκφραση του γονιδίου bax (Bossy-Wetzel και συν. 1998, Vander Heiden και συν. 1997). Η απελευθέρωση κυτοχρώματος c "καταδικάζει" το κύτταρο σε θάνατο, είτε με έναν γρήγορο αποπτωτικό μηχανισμό (ενεργοποίηση των κασπασών μέσω Araf-1), είτε με μια βραδύτερη νεκρωτική διαδικασία, λόγω διακοπής της μεταφοράς ηλεκτρονίων και μείωσης του ATP.

Οι συνέπειες της απελευθέρωσης κυτοχρώματος c πιθανόν να εξαρτώνται από τον κυτταρικό τύπο. Στα κύτταρα με αφθονία κυτοχρώματος c μπορεί να γίνει



ενεργοποίηση των κασπασών και να συνεχιστεί η κατανάλωση οξυγόνου και η παραγωγή ATP, ενώ οι κασπάσες οδηγούν το κύτταρο σε απόπτωση. Σε κύτταρα, όμως, που περιέχουν μεγάλες ποσότητες ενδογενών αναστολέων των κασπασών, η απελευθέρωση του κυτοχρώματος c μπορεί να αποτύχει στο να οδηγήσει σε κασπάσο-εξαρτώμενη απόπτωση και εξαιτίας της απώλειας ηλεκτρονίων τα κύτταρα μπορεί να οδηγηθούν σε νέκρωση.

Από τα μιτοχόνδρια απελευθερώνονται και άλλοι διαμεσολαβητές της απόπτωσης, όπως η προκασπάση-3 (Mancini και συν. 1998). Ο παράγοντας AIF είναι άλλη μία πρωτεΐνη ενεργοποίησης των κασπασών (Apoptosis Inducing Factor), η οποία φαίνεται ότι ενεργοποιεί *in vitro* την προκασπάση-3 (Susin και συν. 1996, Susin και συν. 1997). Η δραστηριότητά της πρωτεΐνης αυτής αναστέλλεται από τον zVAD-fmk (Benzylloxy-valine-alanine-aspartate-O-methyl-fluoromethylketone), ένα συνθετικό γενικό αναστολέα των κασπασών, γεγονός που αυξάνει την πιθανότητα η πρωτεΐνη AIF να είναι άλλη μια κασπάση.

Είναι πλέον αποδεκτός ο κυρίαρχος ρόλος των μιτοχονδρίων στην αποπτωτική διαδικασία στους πολυκύτταρους οργανισμούς. Τα κύτταρα, όμως, δεν μπορούν να εξασφαλίσουν προστασία από τον αποπτωτικό θάνατο μόνο με την απώλεια μιτοχονδρίων, γιατί αυτά τα οργανίδια χρειάζονται και για τον επαρκή ενεργειακό μεταβολισμό, την παραγωγή λιπιδίων της μεμβράνης και την κυτταρική αύξηση. Ελλείμματα στην αποπτωτική οδό πέρα από τα μιτοχόνδρια (π.χ στις κασπάσες) είναι το ίδιο πιθανό να μην εξασφαλίσουν την επιβίωση και την ανάπτυξη των κυττάρων, εξαιτίας των επιδράσεων των μιτοχονδρίων.

1.2.8 Η οικογένεια πρωτεϊνών Bcl-2

Τα ανάλογα του ενζύμου CED-9 του *C.elegans* στα θηλαστικά ανήκουν στην οικογένεια των πρωτεϊνών Bcl-2. Σε αντίθεση με το ένζυμο CED-9, που έχει αποκλειστικά αντι-αποπτωτική δράση, τα μέλη της οικογένειας Bcl-2 μπορούν να έχουν τόσο προ-αποπτωτική όσο και αντι-αποπτωτική δράση (Reed 1998) (εικόνα 19).

Τα αντι-αποπτωτικά μέλη της οικογένειας (όπως οι πρωτεΐνες Bcl-2 και Bcl-xL) παρεμποδίζουν την ενεργοποίηση των κασπασών και κατ' επέκταση την απόπτωση. Οι πρωτεΐνες, όμως, αυτές, δεν δρουν μόνο με άμεση σύνδεση και απενεργοποίηση του παράγοντα Araf-1, αλλά και με σταθεροποίηση των



μιτοχονδριακών μεμβρανών και παρεμπόδιση της απελευθέρωσης του κυτοχρώματος c (εικόνα 20).

Η πρωτεΐνη Bcl-2 αρχικά ανακαλύφθηκε ως πρωτο-ογκογονίδιο και χαρακτηρίζεται από τη χρωμοσωμική αναδιάταξη t (14;18) στα λεμφώματα Β-κυτταρικής σειράς. Προκαλεί ογκογένεση με την καταστολή της απόπτωσης κυρίως, παρά με την διέγερση ταχείας κυτταρικής διαίρεσης.

Η υπερέκφραση των πρωτεϊνών Bcl-2 αναστέλλει την απόπτωση που πυροδοτείται από μία σειρά ερεθισμάτων, όπως ελάττωση των παραγόντων ανάπτυξης, θεραπεία με γλυκοκορτικοειδή, χημειοθεραπευτικούς παράγοντες, ή έλλειψη του παράγοντα NGF σε νευρώνες. Σε κάποιες μόνο κυτταρικές σειρές η πρωτεΐνη Bcl-2 φάνηκε να προστατεύει το κύτταρο από την απόπτωση που επάγεται μέσω των υποδοχέων TNFR ή Fas.

Τα γονίδια της οικογένειας Bcl-2 είτε αναστέλλουν την απόπτωση (όπως τα bcl-2, bcl-xL, bcl-w, mcl-1, nr13 και A1/Bfl-1) είτε την επάγουν (όπως τα bax, bak, bok, diva, bcl-xS, bik, bim, hlk, nlr3, nix, bad και bid) (Reed 1998). Μεταξύ των μελών της οικογένειας Bcl-2 υπάρχει ομολογία κατά τη μελέτη της αλληλουχίας των αμινοξέων και υπάρχουν μέχρι και τέσσερις περιοχές που διατηρούνται σταθερές και ονομάζονται BH: οι περιοχές BH1, BH2, BH3 και BH4. Στα προ-αποπτωτικά μέλη γίνεται φανερό ότι η BH3 περιοχή είναι απαραίτητη τόσο για το σχημασμό διμερών με άλλα μέλη, όσο και για την επαγωγή της απόπτωσης (Klekar and Thompson 1998) (εικόνα 19).

α. Προ-αποπτωτικές Bcl-2 πρωτεΐνες

Σύμφωνα με τα ερευνητικά δεδομένα, τα προ-αποπτωτικά μέλη της οικογένειας Bcl-2 προκαλούν έναρξη της απόπτωσης μέσω του σχηματισμού πόρων στις εξωτερικές μεμβράνες των μιτοχονδρίων και την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c στο κυτταρόπλασμα.

Τα περισσότερα μέλη της οικογένειας διαθέτουν καρβοξυτελικές υδροφοβικές μεμβrano-προσφύόμενες περιοχές που τους επιτρέπουν να εγκαθίστανται στις εξωτερικές μεμβράνες των μιτοχονδρίων. Τα μέλη στα οποία λείπουν τέτοιες περιοχές, όπως οι πρωτεΐνες Bad και Bid, είναι κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες, αλλά μπορούν να «μεταναστεύσουν» στα μιτοχόνδρια, καθώς έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν ετεροδιμερή με άλλα

μέλη της οικογένειας. Αυτές οι ετεροδιμερείς συνδέσεις και μετατοπίσεις ρυθμίζονται από τη φωσφορυλίωση και την πρωτεόλυση. Για παράδειγμα, η φωσφορυλίωση αναστέλλει τη σύνδεση της πρωτεΐνης Bad με τις πρωτεΐνες Bcl-2 και Bcl-xL, ενώ η διασπασμένη, μέσω κασπάσης-8, πρωτεΐνη Bid αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη Bax στη μιτοχονδριακή μεμβράνη. Τα περισσότερο μελετημένα προ-αποπτωτικά μέλη της οικογένειας είναι οι πρωτεΐνες Bax και Bid.

Η πρωτεΐνη Bax, η οποία είναι φυσιολογικά μια κυτταροπλασματική πρωτεΐνη, μετατοπίζεται προς τα μιτοχόνδρια ύστερα από έκθεση σε διάφορα αποπτωτικά ερεθίσματα ή stress (Hsu και συν. 1997). Διαπιστώθηκε ότι αλληλεπιδρά με μια πρωτεΐνη της εξωτερικής μεμβράνης και σχηματίζουν πόρους, απελευθερώνοντας με αυτόν τον τρόπο το κυτόχρωμα c. Δεν απαιτείται ενεργοποίηση των κασπασών ούτε για τη μετακίνηση της πρωτεΐνης, ούτε για το σχηματισμό πόρων.

Σε αντίθεση με την πρωτεΐνη Bax, η πρωτεΐνη Bid απαιτεί πρωτεόλυση μέσω της κασπάσης-8 για την προ-αποπτωτική της λειτουργία. Μετά τη διάσπασή της η πρωτεΐνη Bid «μεταναστεύει» από το κυτταρόπλασμα στα μιτοχόνδρια και απελευθερώνει το κυτόχρωμα c, αυξάνοντας εκλεκτικά τη διαπερατότητα της εξωτερικής μεμβράνης, πιθανόν λόγω της αλληλεπίδρασής της με την πρωτεΐνη Bax (Desagher και συν. 1999). Φαίνεται ότι μέσω της διάσπασης της Bid ενισχύονται τα καθοδικά εκτελεστικά γεγονότα της απόπτωσης που επάγεται μέσω υποδοχέων θανάτου. Οι πρωτεΐνες Bcl-2 και Bcl-xL δεν αναστέλλουν τη διάσπαση της Bid μέσω της κασπάσης-8, ούτε τη μετατόπισή της στα μιτοχόνδρια, παρεμποδίζουν, όμως, την απελευθέρωση κυτοχρώματος c μέσω Bid. Παρόλα αυτά, η απόπτωση εξελίσσεται μέχρι τέλους, καθώς υπάρχουν και άλλα εκτελεστικά βήματα που τίθενται σε λειτουργία μέσω της κασπάσης-8.

β. Αντι-αποπτωτικές Bcl-2 πρωτεΐνες

Τα αντι-αποπτωτικά μέλη της οικογένειας Bcl-2 που έχουν μελετηθεί πιο εκτεταμένα είναι οι **Bcl-2** και **Bcl-xL**, οι οποίες εντοπίζονται κυρίως στη εξωτερική



Αντι-αποπτωτικά μέλη της οικογένειας πρωτεϊνών Bcl-2



Bcl-2
Bcl-xL
Bcl-w
CED-9
Mcl-1

Προ-αποπτωτικά μέλη της οικογένειας πρωτεϊνών Bcl-2



Bax
Bak
Bok



Bcl-2



Bcl-xS



Bcl-2
Bcl-xL
EGL-1

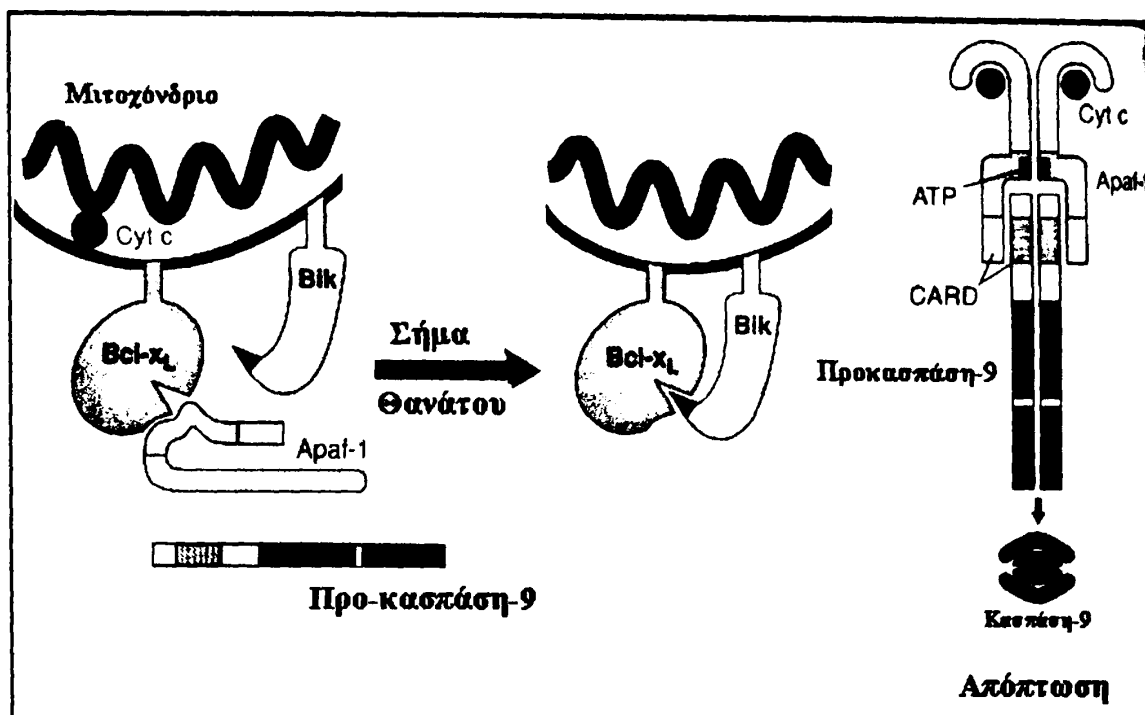


Bcl-2
Bcl-xL
Bcl-xS
Bcl-2
Bcl-xL
Bcl-xS
Bcl-2
Bcl-xL
Bcl-xS

Εικόνα 19

Η ευρύτερη οικογένεια πρωτεϊνών Bcl-2

Αναφέρονται τρεις υποοικογένειες: από αυτές η υποοικογένεια Bcl-2 προάγει την κυτταρική επιβίωση, ενώ οι υποοικογένειες Bax και BH3 διευκολύνουν την απόπτωση. Οι BH1, BH2, BH3 και BH4 είναι αλληλουχίες που διατηρούνται μεταξύ των μελών της οικογένειας. Η υποοικογένεια Bax μοιάζει με την υποοικογένεια Bcl-2, της λείπει όμως η λειτουργική περιοχή BH4. Όλες οι πρωτεΐνες που συγκρίνονται ανήκουν στα θηλαστικά (συνήθως στον άνθρωπο), με εξαίρεση την πρωτεΐνη NR-13 (κοτόπουλου), την CED-9 και EGL-1 (του νηματοειδούς *C. elegans*) και τις άκρες πρωτεΐνες BHRF1, LMW5-HL, ORF16, KS-Bcl-2 και E1B-19K (Am J Med 1999, 107, 489-506).



Εικόνα 20

Μοντέλο ρύθμισης του Apaf-1 από την οικογένεια Bcl-2

Η πρωτεΐνη Bcl-xL (ή άλλο αντι-αποπτωτικό μέλος της ίδιας οικογένειας) μπορεί να συνδεθεί με τον Apaf-1 και να εμποδίσει την ενεργοποίηση της προκασπάσης-9 (ή άλλης προκασπάσης-εναρκτή της απόπτωσης). Με την παρουσία κυτοχρώματος c και ATP ο Apaf-1 μπορεί να συνδεθεί στην προκασπάση-9 και να οδηγήσει στον διμερισμό και την αυτοκατάλυσή της (Science 1998, 281, 1322-1326).

μιτοχονδριακή μεμβράνη και λιγότερο στο ενδοπλασματικό δίκτυο και στις πυρηνικές μεμβράνες. Οι δύο αυτές πρωτεΐνες μπορούν να συνδεθούν με το μόριο-προσαρμοστή Araf-1 (που παρουσιάζει ομολογία με τη CED-4 του *C.elegans*) και να παρεμποδίσουν την ενεργοποίηση της κασπάσης-9 (ομόλογη της CED-3) (Hu και συν. 1998) (εικόνα 20). Ο κύριος τρόπος δράσης των πρωτεϊνών Bcl-2 και Bcl-xL φαίνεται να είναι μιτοχονδριακός. Στις περισσότερες περιπτώσεις φαίνονται να δρουν παρεμποδίζοντας τη μιτοχονδριακή διαπερατότητα και την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c, το οποίο απαιτείται για την ενεργοποίηση του παράγοντα Araf-1. Έχει διατυπωθεί η άποψη ότι οι μιτοχονδριακές δράσεις των πρωτεϊνών Bcl-2 και Bcl-xL εξαρτώνται από την ικανότητά τους να δημιουργούν διαύλους ιόντων, δεν υπάρχει όμως ένα ικανοποιητικό μοντέλο που να λαμβάνει υπόψη τις αντικρουόμενες δράσεις των πρωτεϊνών Bcl-2/Bcl-xL και Bax (Schendel και συν. 1998).

Αρχικά, διατυπώθηκε ότι οι πρωτεΐνες Bcl-2 και Bcl-xL ασκούν την προστατευτική τους δράση σχηματίζοντας ετεροδιμερή με προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες, όπως η Bax, αναστέλλοντας μ' αυτόν τον τρόπο την αποσταθεροποίηση των μεμβρανών από τις προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες (Olters και συν. 1998). Πειραματικά δεδομένα, όμως, διαφόρων ερευνών θέτουν την άποψη αυτή υπό αμφισβήτηση. Για παράδειγμα, κατά το σχηματισμό ετεροδιμερούς μεταξύ της Bcl-xL και ενός προ-αποπτωτικού μέλους (Bax, Bak ή Bik) προκαλείται απελευθέρωση του ετεροδιμερούς Araf-1-προκασπάσης από την Bcl-xL. Στη συνέχεια, ο παράγοντας Araf-1 οδηγεί την προκασπάση σε ενεργοποίηση μέσω αυτοδιάσπασης (εικόνα 20). Έτσι, η ενεργοποίηση των κασπασών σ' αυτήν την οδό εξαρτάται άμεσα από την κατάσταση διμερισμού των μελών της οικογένειας Bcl-2, και αυτή με τη σειρά της εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα προ-αποπτωτικών μελών (εικόνα 8).

1.3 ΘΥΡΕΟΕΙΔΗΣ ΑΔΕΝΑΣ

Ο θυρεοειδής αδένας είναι ο μεγαλύτερος ενδοκρινής αδένας του ανθρωπίνου σώματος. Η λειτουργία του είναι η έκκριση επαρκούς ποσότητας θυρεοειδικών ορμονών, κυρίως 3,5,3',5'-I-τετραϊώδοθυρονίνης (T4) και μικρότερη ποσότητα 3,5,3'-I-τριϊώδοθυρονίνης (T3).

Οι θυρεοειδικές ορμόνες προάγουν τη φυσιολογική αύξηση και ανάπτυξη και ρυθμίζουν έναν αριθμό ομοιοστατικών λειτουργιών, συμπεριλαμβανομένης της παραγωγής ενέργειας και θερμότητας. Επιπρόσθετα, τα παραθυλακιώδη κύτταρα του ανθρώπινου θυρεοειδούς αδένος εκκρίνουν *καλσιτονίνη*, που είναι σημαντική για την ομοιόσταση του ασβεστίου.

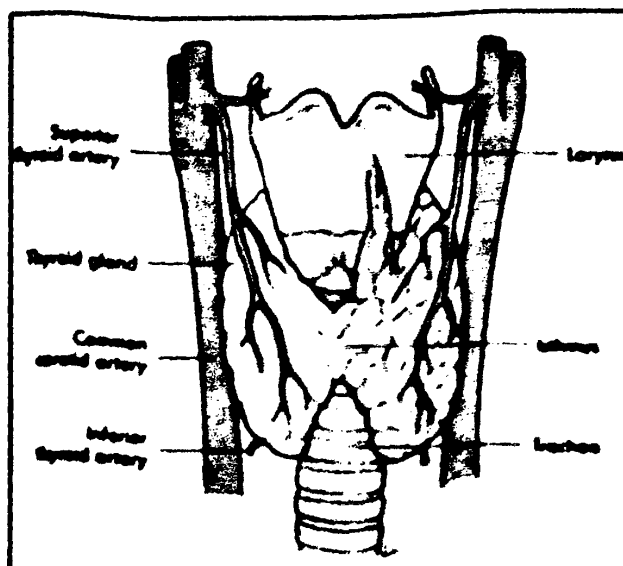
Καθώς, λοιπόν, ο θυρεοειδής αδένας ελέγχει το ρυθμό του μεταβολισμού σε πολλά όργανα και ιστούς, η υπο- ή υπερλειτουργία του αντιπροσωπεύουν τα συνηθέστερα ενδοκρινικά προβλήματα, έχουν εκτεταμένες εκδηλώσεις και απαιτούν συνήθως μακροχρόνια θεραπευτική αγωγή.

1.3.1 Ανατομία και ιστολογία του θυρεοειδούς αδένος

Ο φυσιολογικός θυρεοειδής ζυγίζει 15-25 gr. Στις γυναίκες είναι λίγο μεγαλύτερος και μεγαλώνει στην κύηση. Βρίσκεται μπροστά από την τραχεία και εκτείνεται πάνω από το μέσον του θυρεοειδή χόνδρου του λάρυγγα. Αποτελείται από *δεξιό (Δ)* και *αριστερό (Α)* λοβό ($\Delta > \text{Α}$) που συνδέονται με ένα κεντρικό τμήμα τον *ισθμό*. Στην πίσω επιφάνεια του αδένος ανευρίσκονται οι παραθυρεοειδείς αδένες (εικόνα 21).

Κάθε λοβός του θυρεοειδούς έχει μήκος περίπου 2,5-4 cm, πλάτος 1,5-2 cm και πάχος 1-1,5 cm. Περιβάλλεται από συνδετικό ιστό που προεκβάλλει διαφραγμάτια προς τα εντός και χωρίζεται σε *λόβια*. Κάθε λόβιο αποτελείται από 20-40 *θυλάκια*. Υπολογίζεται ότι ο φυσιολογικός θυρεοειδής περιέχει 3.000.000 θυλάκια, αριθμός που παραμένει σταθερός σε όλες τις ηλικίες. Τα θυλάκια έχουν μέγεθος από 50-500 μικρά. Το θυλάκιο αποτελεί τη μικρότερη πλήρη λειτουργική μονάδα του θυρεοειδούς. Έχει σχήμα σχεδόν σφαιρικό και αποτελείται από ένα στοίχο επιθηλιακών κυβοειδών κυττάρων, που περικλείουν στο κέντρο, αυλό γεμάτο με *ιξώδη θυρεοσφαιρίνη (κολλοειδές)*. Χαμηλό ύψος κυττάρων

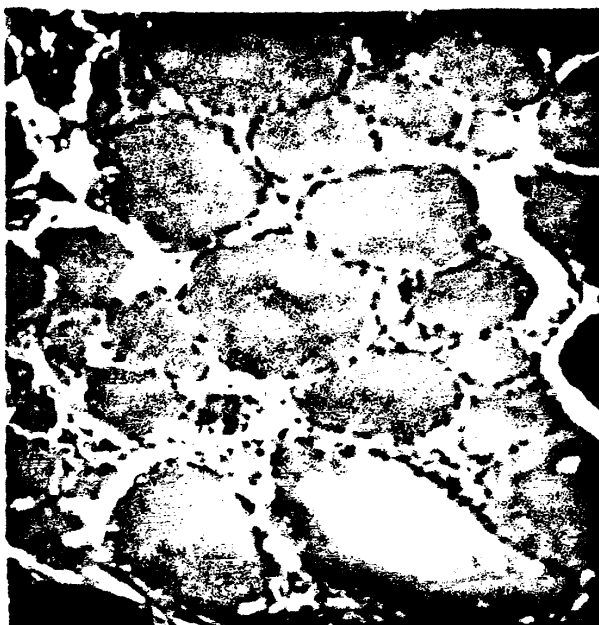




Εικόνα 21

Ανατομικές δομές του τραχήλου

Διακρίνεται ο θυρεοειδής αδένας, με τους δύο λοβούς και τον ισθμό, μπροστά από την τραχεία (Mosby's medical, Nursing and Allied Health Dictionary, 4th edition, 1994).



Εικόνα 22

Ιστολογική εικόνα φυσιολογικού θυρεοειδούς αδένα

Τα θυρεοειδικά θυλάκια επενδύονται από ένα απλό κυβοειδές επιθήλιο, το οποίο είναι υπεύθυνο για τη σύνθεση και έκκριση των ορμονών T₃ και T₄. Στο εσωτερικό τους παρατηρείται ένα σύμπλεγμα γλυκοπρωτεϊνης, η θυρεοσφαιρίνη ή κολλοειδές, το οποίο αποθηκεύει τις θυρεοειδικές ορμόνες πριν από την έκκρισή τους (χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης x 240) (Wheater PR, Burkitt HG, Daniels VG, Functional Histology, A Text and Colour Atlas, Churchill Livingstone, 2nd revised edition).

χαρακτηρίζει τα ημιαδρανοποιημένα θυλάκια, ενώ υψηλά κυλινδρικά κύτταρα υπάρχουν σε υπερλειτούργούντα αδένες (εικόνα 22).

1.3.2 Φυσιολογία του θυρεοειδούς αδένος

Από τα κύτταρα του θυρεοειδούς συντίθενται οι θυρεοειδικές ορμόνες θυροξίνη (T4) και τριϊωδοθυρονίνη (T3) κάτω από την επίδραση της θυρεοτροπίνης (TSH) που εκκρίνεται από την υπόφυση.

Η σύνθεση και ο ρυθμός παραγωγής των θυρεοειδικών ορμονών εξαρτάται από το ανόργανο ιώδιο, που προσλαμβάνεται από τα θυρεοειδικά κύτταρα από την κυκλοφορία, την ακεραιότητα των ενδοθυρεοειδικών ενζυμικών συστημάτων που είναι υπεύθυνα για την ορμονοσύνθεση και τη σύνθεση της θυρεοσφαιρίνης και από την καλή λειτουργία του άξονα: υποθάλαμος-υπόφυση-θυρεοειδής.

Τα ιόντα ιωδίου (I^-) που μεταφέρονται στα θυρεοειδικά κύτταρα οργανοποιούνται ταχέως. Η αντίδραση καταλύεται από το ένζυμο *θυρεοειδική υπεροξειδάση (TPO)*, μία πρωτεΐνη μοριακού βάρους 110 kDa που περιέχει αίμη και βρίσκεται στην κυτταρική μεμβράνη των θυλακιωδών κυττάρων (=μικροσωμιακό αντιγόνο). Αποτελείται από μια αλυσίδα 933 αμινοξέων με ένα δισουλφιδικό δεσμό, η ακεραιότητα του οποίου είναι απαραίτητη για την αντιγονικότητα του μορίου της. Η TPO καταλύει την αντίδραση οργανοποίησης του ανόργανου ιωδίου, όταν αυτό εισέρχεται ενδοκυττάρια παρουσία H_2O_2 , το οποίο παράγεται από το ένζυμο αναγωγάση NADPH του κυτοχρώματος c του θυρεοειδούς. Επίσης, καταλύει την αντίδραση σύνδεσης του ιωδίου με τις ρίζες τυροσίνης που είναι προσκολλημένες στο μόριο της θυρεοσφαιρίνης και τη σύνδεση των ιωδιωμένων τυροσινών για την παραγωγή των ορμονών T3 και T4.

Η *θυρεοσφαιρίνη (Tg)* είναι υδατοδιαλυτή γλυκοπρωτεΐνη (με 5496 αμινοξέα) μεγάλου μοριακού βάρους, που αποτελείται από δύο όμοιες υπομονάδες με MB 330 kDa η κάθε μία. Εκκρίνεται από τα θυλακιώδη κύτταρα, είναι το κυριότερο συστατικό του κολλοειδούς και αποτελεί πρόδρομο ουσία των θυρεοειδικών ορμονών. Η σύνθεσή της διεγείρεται από την TSH και ελέγχεται από το αντίστοιχο γονίδιο που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 8, κοντά στο c-myc ογκογονίδιο. Σε κάθε μόριο Tg περιέχονται 110 τυροσίνες, από τις οποίες μόνο οι 8 χρησιμοποιούνται στη σύνθεση των θυρεοειδικών ορμονών. Η αντιγονικότητα του μορίου της Tg εξαρτάται από το ποσοστό της ιωδίωσής της. Τα T και B



λεμφοκύτταρα αναγνωρίζουν διαφορετικούς επιτόπους στο μόριό της. Η Tg εισέρχεται στην κυκλοφορία σε ελάχιστα ποσά μέσω της λεμφικής οδού και χρησιμοποιείται σαν δείκτης παρακολούθησης των καρκινωμάτων του θυρεοειδούς. Τα επίπεδά της στο αίμα κυμαίνονται μέχρι 5ng/dl.

Όταν το ιώδιο συνδεθεί με τις ρίζες της τυροσίνης στη θυρεοσφαιρίνη προκύπτουν η μονοϊωδοτυροσίνη (MIT) και η διϊωδοτυροσίνη (DIT). Με τη σύζευξη δύο μορίων DIT παράγεται η T₄, ενώ με τη σύζευξη ενός μορίου MIT και ενός μορίου DIT παράγεται η T₃. Ο λόγος MIT/DIT εξαρτάται από το ποσόν του διαθέσιμου ιωδίου, γι' αυτό σε περιπτώσεις έλλειψης ιωδίου σχηματίζεται περισσότερο MIT από DIT, άρα και περισσότερη T₃ από ό,τι T₄.

Η ρύθμιση της έκκρισης των θυρεοειδικών ορμονών γίνεται μέσω της κυκλοφορούσης στο πλάσμα θυρεοειδοτρόπου ορμόνης TSH (*Thyroid-Stimulating Hormone*). Η TSH είναι γλυκοπρωτεΐνη, η οποία συντίθεται από βασεόφιλα κύτταρα του πρόσθιου λοβού της υπόφυσης και σπαιρίζεται από δύο υπομονάδες, α και β. Συνδέεται με ειδικό υποδοχέα στην κυτταρική μεμβράνη των θυρεοειδικών κυττάρων (TSH-Receptor, TSH-R), ο οποίος έχει μοριακό βάρος 87 kDa και αποτελείται από δύο υπομονάδες Α και Β, που συνδέονται με δισουλφιδικό δεσμό. Στη μεμβράνη των θυλακκωδών κυττάρων υπάρχουν σχετικά λίγοι υποδοχείς TSH-R (περίπου 1000 υποδοχείς/κύτταρο). Η σύνδεση της TSH στον υποδοχέα επάγει τη σύνθεση των θυρεοειδικών ορμονών αυξάνοντας το c-AMP και ενεργοποιώντας ενδοκυττάρια πρωτεϊνικές κινάσες.

Η σύνθεση και έκκριση της TSH εξαρτάται από την αρνητική παλίνδρομη δράση των θυρεοειδικών ορμονών που κυκλοφορούν στο αίμα και της εκλυτικής ορμόνης της θυρεοτροπίνης TRH (*Thyrotropin Releasing Hormone*). Η TRH είναι τριπεπτιδίο που παράγεται στον υποθάλαμο και μεταφέρεται μέσω του πυλαίου συστήματος στην υπόφυση. Εκεί συνδέεται με υποδοχείς των θυρεοτρόφων κυττάρων και προκαλεί αύξηση του ενδοκυττάριου cAMP και του Ca⁺⁺. Όταν αυξάνονται τα επίπεδα των θυρεοειδικών ορμονών στο αίμα, τότε μειώνεται η έκκριση της TSH και επακολούθως και η έκκριση των T₃ και T₄.

Οι θυρεοειδικές ορμόνες μετά την παραγωγή τους εναποθηκεύονται στο κολλοειδές συνδεδεμένες με την Tg. Η έκκρισή τους στο αίμα ρυθμίζεται από την TSH και γίνεται με πινोकύτωση σταγονιδίων κολλοειδούς από τα θυρεοειδικά κύτταρα, πρωτεόλυση της Tg από πρωτεάσες και πεπτιδάσες που παράγονται από τα λυσοσώματα και απελευθέρωση των T₄, T₃, MIT, DIT, πεπτιδίων και

αμινοξέων. Οι T3 και T4 απελευθερώνονται στην κυκλοφορία, οι MIT και DIT αποϊωδιώνονται και το I⁻ επαναχρησιμοποιείται. Τα φυσιολογικά επίπεδα της T4 στον ορό κυμαίνονται από 5-12 μg/dl, ενώ τα φυσιολογικά επίπεδα της T3 κυμαίνονται από 100-200 ng/dl. Στα φυσιολογικά άτομα το 80%-90% της ολικής T3 προέρχεται από την περιφερική μετατροπή της T4 με τη δράση του ενζύμου 5'-αποϊωδινάση και μόνο το 10-20% παράγεται από το θυρεοειδή. Το 45% της εκκρινόμενης T4 μετατρέπεται σε T3.

Για να εκδηλώσουν τη δράση τους, οι θυρεοειδικές ορμόνες εισέρχονται στα κύτταρα και μεταφέρονται στον πυρήνα, όπου συνδέονται με τους υποδοχείς των θυρεοειδικών ορμονών (thyroid receptor-TR) που βρίσκονται στη χρωματίνη. Υπάρχουν δύο είδη υποδοχέων TR για την T3, οι άλφα και οι βήτα, καθώς και υπότυποι αυτών, τρεις για τους α και δύο για τους β. Η ανταπόκριση των ιστών στις θυρεοειδικές ορμόνες εξαρτάται από τον αριθμό των TR που εκφράζονται στα κύτταρα του συγκεκριμένου ιστού.

Οι υποδοχείς TR ενεργοποιούνται με τη σύνδεση με την T3 και ενώνονται με το DNA σε στοιχεία απόκρισης στη δράση των θυρεοειδικών ορμονών (TRE- Thyroid Hormone Responsive Elements), δρώντας, έτσι, ως μεταγραφικοί παράγοντες των γονιδίων που είναι ευαίσθητα στη δράση της T3.

1.3.3 Εργαστηριακή διερεύνηση του θυρεοειδούς αδένος

α. Ορμονική διερεύνηση της θυρεοειδικής λειτουργίας

Καμία εξέταση δεν είναι από μόνη της επαρκής για την εκτίμηση του επιπέδου της θυρεοειδικής λειτουργίας, γι' αυτό απαιτείται ο προσδιορισμός περισσότερων της μιας εργαστηριακών παραμέτρων.

Η μέτρηση των ορμονών T3 και T4 γίνεται με μεθόδους στις οποίες χρησιμοποιούνται ραδιοϊσότοπα, όπως η ραδιοανοσοανάλυση (Radioimmunoassay-RIA), η ανοσοραδιομετρία (Immunoradiometric assay-IRMA) και η ανάλυση υποδοχέων (Receptor assay). Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί και άλλες αξιόλογες μέθοδοι, όπως η ανοσοενζυμική μέθοδος (ELISA), η φθόριοανοσοανάλυση (FIA) και η Χημειοφωταυγάζουσα ανοσοανάλυση (LIA), με μικρότερο κόστος, οι οποίες, όμως, στερούνται της μεγάλης ακρίβειας των ραδιοϊσοτοπικών μεθόδων.



Η sTSH (ευαίσθητη-sensitive TSH) θεωρείται η πιο ευαίσθητη παράμετρος για την εκτίμηση της κατάστασης της θυρεοειδικής λειτουργίας και συνιστάται σε όλους τους ασθενείς, καθώς πολλοί κλινικά ευθυρεοειδικοί ασθενείς παρουσιάζουν βιοχημικές ενδείξεις υπερ- ή υποθυρεοειδισμού. Τα φυσιολογικά της επίπεδα κυμαίνονται μεταξύ 0.4-4.8 mIU/ml.

Οι σύγχρονες μέθοδοι μέτρησης της sTSH, που χρησιμοποιούν μονοκλωνικά αντισώματα, έχουν δεκαπλάσια ευαισθησία από τις παλαιότερες και είναι: α) η ανοσοραδιομετρική (IRMA), β) η ενζυμική ανοσομέτρηση (EIA) και γ) η χημειοφωταύγεια, η οποία έχει τη μεγαλύτερη ευαισθησία.

β. Αντισώματα κατά θυρεοειδικών αντιγόνων

Υπάρχουν τρία αρκετά καλά μελετημένα αντιγόνα του θυρεοειδούς: η θυρεοειδική υπεροξειδάση (μικροσωματικό αντιγόνο, TPO), ο υποδοχέας της TSH (TSHR) και η θυρεοσφαιρίνη (Tg).

Για την ανίχνευση των αυτοαντισωμάτων κατά της υπεροξειδάσης (anti-TPO ή TPOAbs) πρόσφατα αναπτύχθηκαν μέθοδοι RIA και ELISA. Τα anti-TPO αντισώματα, αν και είναι το συχνότερο εύρημα σε όλες τις αυτοάνοσες θυρεοειδοπάθειες, δεν φαίνεται να αποτελούν τον εκλυτικό παράγοντα της νόσου, παίζουν, όμως, σημαντικό ρόλο στην παθογένεια. Γενικά τα anti-TPO αντισώματα χρησιμοποιούνται ως δείκτες των αυτοάνοσων θυρεοειδοπαθειών και ανιχνεύονται: α) σε 95% των ασθενών με θυρεοειδίτιδα Hashimoto (HT) και β) σε 80% των ασθενών με νόσο του Graves' (GD).

Στην πλειονότητά τους τα αντισώματα κατά του υποδοχέα της TSH (anti-TSH-R antibodies ή TRAbs, Thyrotropin Receptor Antibodies) προκαλούν διέγερση της θυρεοειδικής λειτουργίας ανεξάρτητα από τον υποθαλαμο-υποφύσιο-θυρεοειδικό άξονα, οπότε και αναφέρονται συχνά με τον όρο TSI (Thyroid Stimulating Immunoglobulins). Σε μερικές περιπτώσεις έχει διαπιστωθεί πως η σύνδεση TRAb στον υποδοχέα της TSH δεν οδηγεί σε υπερλειτουργία του θυρεοειδούς, οπότε τα αυτοαντισώματα θεωρείται πως έχουν ανασταλτική δράση και αναφέρονται με τον όρο TBII (Thyroid Binding Inhibitory Immunoglobulins). Τα αντισώματα TBII μπορούν να προκαλέσουν τη δημιουργία βρογχοκλήλης, χωρίς, όμως, υπερέκκριση θυρεοειδικών ορμονών. Με ραδιοανοσολογική μέθοδο και με βιοδοκιμασία, τα TSI ανιχνεύονται: α) σε 80-100% των ασθενών με GD και β) σε



15-20% των ασθενών με HT, ενώ τα TBII ανιχνεύονται: α) σε 80-90% των ασθενών με GD και β) σε 10-30% των ασθενών με HT.

Τα αντιθυρεοσφαιρινικά αντισώματα (anti-Tg) ανιχνεύονται στον ορό των ασθενών με έμμεσο ανοσοφθορισμό, παθητική αιμοσυγκόλληση, ραδιοανοσολογική μέθοδο (RIA) και ανοσοενζυμική μέθοδο ELISA. Τα TgAb ανευρίσκονται: α) σε ποσοστό 100% των ασθενών με HT, β) μέχρι και στο 67% των ασθενών με GD και γ) σε 10-15% των φυσιολογικών ηλικιωμένων ατόμων.

γ. Υπερηχογράφημα θυρεοειδούς αδένα

Η υπερηχοτομογραφία γενικά αποτελεί μια ασφαλή μέθοδο (δεν ακτινοβολείται ο ασθενής) και ευαίσθητη για ανακάλυψη αλλοιώσεων του θυρεοειδικού παρεγχύματος, με διακριτική ικανότητα 1-3 χιλιοστών. Θεωρείται αναγκαία εξέταση, καθώς τουλάχιστον το 50% των ασθενών έχει πολλαπλούς αψηλάφητους όζους. Το μειονέκτημα του υπερηχογραφήματος είναι η αδυναμία του να διαφοροδιαγνώσει με βεβαιότητα καλοήθεις από κακοήθεις όγκους του αδένα. Σαν όζος θεωρείται μία βλάβη που έχει διαστάσεις >6-8 mm (αναλυτικά η τεχνική στην παράγραφο 2.1.2 και τα χαρακτηριστικά ευρήματα παθήσεων του θυρεοειδούς στην παράγραφο 2.1.3) .

δ. Σπινθηρογράφημα θυρεοειδούς αδένα

Το σπινθηρογράφημα απεικονίζει την κατανομή του ραδιενεργού ιχνηθέτη σε ένα όργανο-στόχο του ανθρωπίνου σώματος σε δύο ή και τρεις διαστάσεις. Το πλεονέκτημα του σπινθηρογραφήματος είναι ότι μπορεί να δώσει ταχεία απάντηση μορφολογικού και λειτουργικού περιεχομένου για τον θυρεοειδή αδένα, με τη χρήση, είτε ραδιενεργού ιωδίου ^{123}I , είτε με τεχνητό $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Μία πλήρης μελέτη θα πρέπει να περιλαμβάνει τα παραπάνω και θα πρέπει να εκτιμάται πάντα με το ιστορικό του ασθενή, με τις *in vitro* και τις λοιπές διαγνωστικές δοκιμασίες.

Όταν ένας όζος προσλαμβάνει περισσότερο ισότοπο από τον γειτονικό φυσιολογικό ιστό, ή από τον σε καταστολή φυσιολογικό θυρεοειδικό ιστό, ονομάζεται «θερμός» ή «αυτόνομος λειτουργικός θυρεοειδικός» όζος (τοξικός ή



μη). Ως «ψυχρός» χαρακτηρίζεται ο όζος που, είτε υπολείπεται, είτε στερείται λειτουργίας και φυσικά δεν συγκεντρώνει ισότοπο.

ε. Παρακέντηση θυρεοειδούς αδένος με αναρρόφηση δια λεπτής βελόνης (FNA) και κυτταρολογική διάγνωση

Η βιοψία δια βελόνης πολλαπλών περιοχών του σώματος για διαγνωστικούς σκοπούς εισήχθη αρχικά από τους Martin και Ellis το 1930 (Martin and Ellis 1930), οπότε αποφεύχθησαν έτσι μη απαραίτητες διεγχειρητικές διαδικασίες: η ιστολογική-κυτταρολογική εξέταση προηγούνταν της χειρουργικής επέμβασης και συνέβαλλε στη σωστή διεξαγωγή της.

Η παρακέντηση με αναρρόφηση δια λεπτής βελόνης ενός θυρεοειδικού οζιδίου (fine-needle aspiration, FNA) έχει αποδειχθεί η καλύτερη μέθοδος για τη διαφοροδιάγνωση της καλοήθους από την κακοήγη θυρεοειδική νόσο (αναλυτικά η μέθοδος στην παράγραφο 2.1.2 και τα χαρακτηριστικά ευρήματα των θυρεοειδικών νόσων στην παράγραφο 2.1.3). Είναι διαγνωστικό εργαλείο-κλειδί για την προεγχειρητική επιλογή των οζιδίων που είναι σε κίνδυνο για κακοήθεια.

Οι διαγνωστικές ικανότητες και εφαρμογές της παραδοσιακής FNA του θυρεοειδούς έχουν επεκταθεί μέσω:

(1) της προσθήκης της ανοσοϊστοχημείας, για την ανίχνευση αντιγόνων σχετιζόμενων με τον καρκίνο και της κυτταρομετρίας για την ανάλυση του DNA του κυττάρου,

(2) της χρήσης σκληροθεραπείας με αιθανόλη για την αγωγή καλοήθων κυστικών αλλοιώσεων και

(3) της διαφοροδιάγνωσης μεταξύ θυρεοειδικών και παραθυρεοειδικών αλλοιώσεων και της ταυτοποίησης θυρεοειδικών καρκινικών μεταστάσεων σε αυχενικούς λεμφαδένες, με τη μέτρηση ειδικών για τον ιστό πρωτεϊνών (όπως η θυρεοσφαιρίνη ή παραθορμόνη) (Gharib 1996).

Η κυτταρολογική εξέταση (αναλυτικά στο κεφάλαιο 2.1.2) που βασίζεται σε υλικό FNA, είναι ένα εξαιρετικά αξιόπιστο διαγνωστικό εργαλείο για την εκτίμηση ενός οζιδίου του θυρεοειδούς αδένος, ενώ ταυτόχρονα προκαλεί την ελάχιστη δυσανεξία για τον ασθενή (Greenspan 1997). Η ευαισθησία αυτής της διαδικασίας ποικίλλει από 83-99% και η ειδικότητα από 70-90%, εξαρτώμενη από



την επάρκεια του λαμβανομένου δείγματος και την εμπειρία του κυτταρολόγου (Ridgway 1996).

Η βιοψία FNA υπό υπερηχογραφική καθοδήγηση επιτρέπει την εξέταση ακόμη και πολύ μικρών σε μέγεθος οζιδίων (έως 2 mm) (Yokozawa και συν. 1995) και οδηγεί σε μία περισσότερο ακριβή και επαρκή δειγματοληψία οζιδίων του θυρεοειδούς αδένος (Danese και συν. 1998, Carmesi και συν. 1998).

Παρόλα αυτά σε έναν αξιόλογο αριθμό περιστατικών (10-25%), η παραπάνω εξέταση είναι μη διαγνωστική, κυρίως εξαιτίας ανεπάρκειας του δείγματος ή παρουσίας ακαθόριστης κυτταρολογικής μορφολογίας, που αναφέρεται συνήθως ως θυλακιώδης νεοπλασία (Oertel 1996, Gharib και συν. 1984).

Αυτές οι περιοριστικές δυνατότητες της παρακέντησης FNA οδηγούν στην επιτακτική ανάγκη εξεύρεσης ευαίσθητων προεγχειρητικών διαγνωστικών τεχνικών. Θα ήταν ιδιαίτερης σημασίας εάν η κυτταρολογική διάγνωση με FNA μπορούσε να ισχυροποιηθεί με μια μοριακή ανάλυση.

στ. Μοριακή γενετική ανάλυση σε υλικό FNA θυρεοειδούς αδένος

Στη βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί δεδομένα για την κλινική σπουδαιότητα της μοριακής ανάλυσης σε υλικό παρακέντησης FNA. Η χρήση εξαιρετικά ευαίσθητων τεχνικών, όπως αυτές που βασίζονται στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και στην ανάστροφη μεταγραφή-PCR (RT-PCR) (αναλυτικά οι τεχνικές στην παράγραφο 2.3.2), οι οποίες επιτρέπουν τη γενετική ανάλυση βιολογικών δειγμάτων με μικρό αριθμό κυττάρων, έκανε φανερό ότι τα αναρροφήματα του θυρεοειδούς αδένος αποτελούν ανεκτίμητη *in vivo* πηγή γενετικού υλικού, επιτρέποντας μια περισσότερο ακριβή γενετική ανάλυση ανωμαλιών της θυρεοειδικής λειτουργίας στο μοριακό επίπεδο.

Η PCR είναι μια τεχνική που παρέχει τη δυνατότητα παραγωγής πολλών αντιγράφων ενός τμήματος DNA μεταξύ δύο περιοχών με γνωστές αλληλουχίες. Παρόλο που η μέθοδος PCR είναι μια σχετικά καινούργια τεχνική, βρήκε εκτεταμένες εφαρμογές στη διάγνωση γενετικών διαταραχών (Engelke et al. 1988), την ανίχνευση αλληλουχιών νουκλεϊκών οξέων παθογόνων οργανισμών σε κλινικά δείγματα (Kwok et al. 1987, Ou et al. 1988), τη γενετική ταυτοποίηση δειγμάτων στην Ιατροδικαστική (Higuchi et al. 1988), την ανάλυση μεταλλάξεων



σε ενεργοποιημένα ογκογονίδια (Fair et al. 1988), τη μοριακή κλωνοποίηση και την ανάλυση του DNA (Oste 1988).

Οι Winzer και συν. (1998) δημοσίευσαν μία μέθοδο που παρέχει τη δυνατότητα δύο διαφορετικών αποτελεσμάτων από την ίδια βιοψία FNA, της κυτταρολογικής διάγνωσης και πληροφοριών για την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων ενός όγκου. Η μέθοδος αυτή, που ονομάζεται αναρροφητική βιοψία-ανάστροφη μεταγραφή-αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (aspiration-biopsy RT-PCR, ABRP) μπορεί να οδηγήσει σε προεγχειρητική διάγνωση και να οδηγήσει σε μία περισσότερο ειδική θεραπευτική αγωγή. Η αξία της μοριακής ανάλυσης με FNA γίνεται φανερή και από άλλες δύο δημοσιεύσεις (Weiss και συν. 1996, Arduini και συν. 1997), στις περιπτώσεις αυτές, όμως, χρειάστηκαν δύο διαφορετικά δείγματα, ένα για κυτταρολογική και ένα για μοριακή ανάλυση.

Η ανάλυση με τη μέθοδο RT-PCR είναι μια πολύ ευαίσθητη τεχνική, ικανή να ανιχνεύει πολύ χαμηλά επίπεδα του mRNA. Αρχικά γίνεται απομόνωση του RNA. Από αυτό προκύπτει, μέσω ανάστροφης μεταγραφής, συμπληρωματικό DNA (cDNA) και στη συνέχεια μέσω αντίδρασης PCR ενισχύονται επιλεγμένες περιοχές των γονιδίων-στόχων. Η προσφορά της τεχνικής RT-PCR απεδείχθη ανεκτίμητη σε ποικίλα ερευνητικά προβλήματα, όπως για παράδειγμα σε μελέτες έκφρασης γονιδίων, ανάλυση RNA αλληλουχιών, διάγνωση λοιμωδών παραγόντων, διάγνωση γενετικών ασθενειών κ.α.

Έτσι, ογκογονίδια και/ή ογκοκατασταλτικά γονίδια, καθώς και γονίδια που σχετίζονται με κρίσιμες κυτταρικές λειτουργίες (όπως πολλαπλασιασμός, κυτταρικό θάνατο, διαφοροποίηση, προσκόλληση, αγγειογένεση και επιδιόρθωση DNA), μπορούν να αποτελέσουν στόχους για μοριακές διαγνωστικές προσεγγίσεις και παροχή κλινικά χρήσιμων πληροφοριών.

1.3.4 Οζώδης θυρεοειδική νόσος

α. Βρογχοκήλη

Ως βρογχοκήλη χαρακτηρίζεται η βραδέως αναπτυσσόμενη διόγκωση του θυρεοειδούς αδένα (αύξηση μεγέθους θυρεοειδούς >20g), η οποία προκύπτει από εκτεταμένο πολλαπλασιασμό επιθηλιακών κυττάρων με επακόλουθη



δημιουργία νέων θυλακίων διαφορετικής δομής και λειτουργίας (εικόνες 23 α,β και 24).

Η βρογχοκήλη διακρίνεται σε:

- 1) *ενδημική* (όταν η συχνότητα εμφάνισης στον πληθυσμό μιας περιοχής είναι άνω του 10%) ή *σποραδική* (όταν η συχνότητα εμφάνισης στον πληθυσμό μιας περιοχής είναι κάτω του 5%),
- 2) *διάχυτη* (ομοιόμορφη αύξηση των θυλακίων του θυρεοειδούς) ή *οζώδη* (ανομοιόμορφη αύξηση των θυλακίων, με δημιουργία όζων διαφορετικού μεγέθους και λειτουργικότητας),
- 3) *λειτουργική* ή *μη λειτουργική* και
- 4) *απλή, μη τοξική* (όταν η διόγκωση του θυρεοειδούς δε συνοδεύεται από υπερθυρεοειδισμό και δεν οφείλεται σε φλεγμονή ή νεοπλασία) ή *τοξική* (όταν ο ασθενής γίνεται θυρεοτοξικός).

Η οζώδης θυρεοειδική νόσος (μονοοζώδης ή πολυοζώδης βρογχοκήλη) είναι μετά τη διάχυτη βρογχοκήλη η πιο συχνή ενδοκρινική νόσος (Hanna et al 1999), καθώς υπολογίζεται ότι παγκοσμίως πάσχουν περίπου 600 εκατομμύρια άνθρωποι. Τα επιδημιολογικά στοιχεία ποικίλλουν ανάλογα με τη γεωγραφική περιοχή, τη μέθοδο ανίχνευσης και τα κριτήρια ορισμού των όζων.

Η ιωδοπενία θεωρείται παγκοσμίως ως ο πρωταρχικός αιτιολογικός παράγοντας της ενδημικής βρογχοκήλης (Delange και συν. 1968, Hetzel 1983), ενώ σε περιοχές με επάρκεια ιωδίου, ως κύρια αιτία της βρογχοκήλης θεωρείται η αυτοάνοση θυρεοειδίτιδα (Foley 1993). Επιδημιολογικές και μεταβολικές μελέτες, που διεξήχθησαν περισσότερα από 30 χρόνια πριν, έδειξαν ότι η βρογχοκήλη από ανεπάρκεια ιωδίου αποτελεί ενδημικό πρόβλημα στην Ελλάδα και ειδικότερα στην ορεινή περιοχή της Ηπείρου. Η επίπτωση της βρογχοκήλης σε παιδιά της σχολικής ηλικίας που κατοικούσαν σ' αυτή την περιοχή διαπιστώθηκε στο 40-60% (Malamos, Miras και συν. 1966, Malamos, Koutras και συν. 1966). Δεν υπάρχουν δεδομένα πανελληνίως για την τρέχουσα επάρκεια της διατροφής σε ιώδιο στην Ελλάδα, παρά μόνο στοιχεία που αφορούν την Αθήνα και το νησί της Κρήτης, περιοχές όπου το πρόβλημα της ανεπάρκειας σε ιώδιο φαίνεται ότι έχει εξαλειφθεί και η κύρια αιτία βρογχοκήλης είναι η αυτοάνοση θυρεοειδίτιδα (Doufas και συν. 1998). Σε μια μελέτη περίπου 4000 παιδιών σχολικής ηλικίας στη Βορειοδυτική Ελλάδα, η επίπτωση της κλινικά ανιχνεύσιμης βρογχοκήλης βρέθηκε 21%

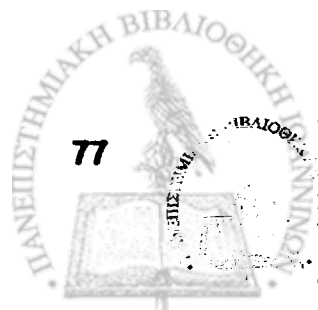


(Tsatsoulis και συν. 1996). Πρόσφατα διαπιστώθηκε ότι εξακολουθεί να υπάρχει ήπια ανεπάρκεια σε ιώδιο στην ίδια περιοχή, η οποία αποτελεί έναν από τους κύριους αιτιολογικούς παράγοντες βρογχοκήλης στα παιδιά αυτά, ενώ στα παιδιά με επαρκή πρόσληψη ιωδίου η αυτοάνοση θυρεοειδίτιδα αποτελεί συχνό εύρημα (Tsatsoulis και συν. 1999).

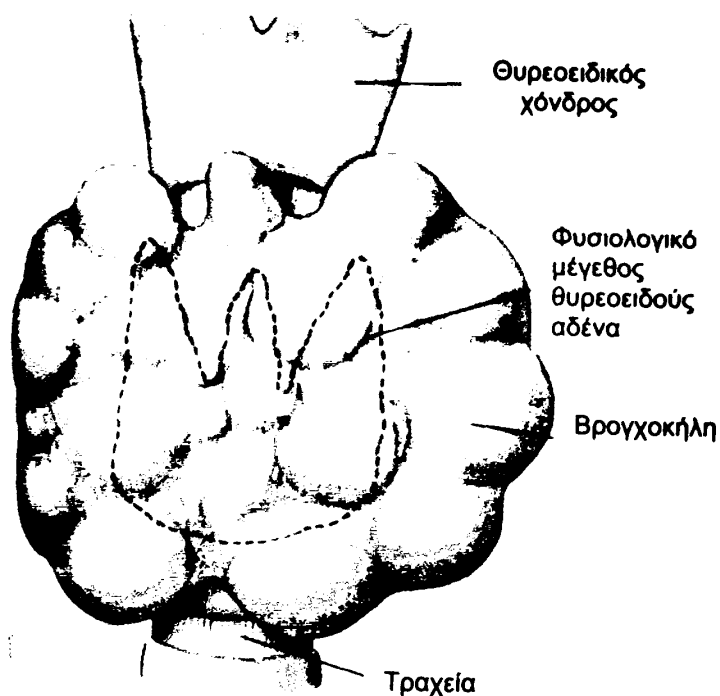
Κλινικά ανιχνεύσιμα θυρεοειδικά οζώδια εμφανίζονται στο 4-10% του πληθυσμού (γυναίκες:άνδρες 7:1). Η πλειοψηφία αυτών των οζιδίων είναι μη νεοπλασματικά, ενώ μόνο το 5-30% είναι κακοήγη και απαιτούν χειρουργική επέμβαση (Herpinus and Huysmans 1998). Ο κύριος σκοπός της βιοψίας FNA είναι να ταυτοποιήσει τα οζώδια που χρειάζονται χειρουργική επέμβαση και να ελαττώσει στο σύνολο τον αριθμό των θυρεοειδεκτομών σε ασθενείς με καλοήγη διαταραχή του θυρεοειδούς.

Στο μικροσκόπιο, η βρογχοκήλη χαρακτηρίζεται από συνδυασμούς μικρών υπερπλαστικών θυλακίων, από τα οποία τα μεγαλύτερα έχουν άφθονο κολλοειδές. Κάποια από τα οζώδια μπορεί να υποστούν κυστική εκφύλιση (εικόνα 24).

Συμπερασματικά, στις κυριότερες αιτίες βρογχοκήλης συμπεριλαμβάνονται η *κωδοπενία*, *βρογχοκηλογόνες ουσίες* (λίθιο, κυανούχα κ.α), η *δυσορμονογένεση* και μια *αυτοάνοση διεργασία*. Ανεξάρτητα από το γενεσιουργό αίτιο, η αρχή στην οποία στηρίζεται η παθογένεια της μη τοξικής βρογχοκήλης είναι ίδια. Στην προσπάθεια να διατηρηθεί η βιοσύνθεση των θυρεοειδικών ορμονών στα φυσιολογικά πλαίσια υπερεκκρίνεται TSH, που αρχικά προκαλεί διάχυτη υπερπλασία του θυρεοειδούς. Αν με την υπερπλασία αυτή παραμένουν φυσιολογικά τα επίπεδα έκκρισης των θυρεοειδικών ορμονών, τότε ο ασθενής είναι *ευθυρεοειδικός*. Αν, παρά την υπερπλασία, δεν επαρκούν τα επίπεδα των θυρεοειδικών ορμονών που εκκρίνονται, ο ασθενής γίνεται *υποθυρεοειδικός*. Μετά την αρχική διάχυτη υπερπλασία του θυρεοειδούς, η επιμονή της βρογχοκηλογόνου δράσης οδηγεί σε κατά τόπους εμφάνιση υπερπλασίας (εστιακή ή οζώδης). Με την πάροδο των ετών αναπτύσσεται σε πολλές περιπτώσεις αυτονομία των όζων και ο ασθενής μπορεί να γίνει *υπερθυρεοειδικός*.



A



B

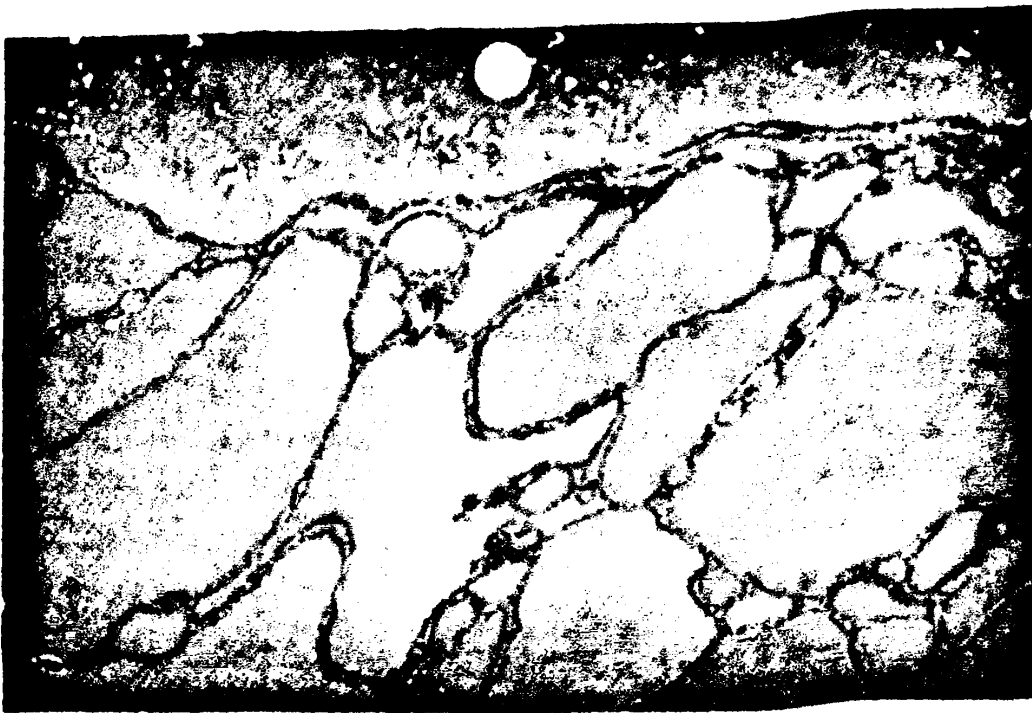


Εικόνες 23 Α και Β

Διόγκωση θυρεοειδούς αδένος στην οξώδη βρογγοκήλη

(Mosby's medical, Nursing and Allied Health Dictionary, 4th edition, 1994).

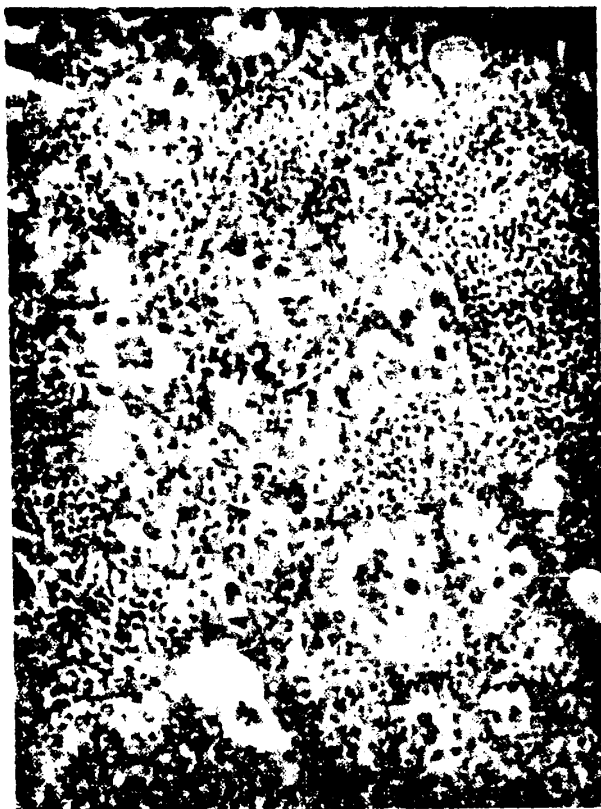




Εικόνα 24

Ιστολογική εικόνα βρογχοκήλης

Στη βρογχοκήλη ο αριθμός των θυρεοειδικών θυλακίων έχει αυξηθεί και τα επιθηλιακά κύτταρα είναι μεγάλα και κυλινδρικά. Στη συγκεκριμένη εικόνα διακρίνεται περιοχή της βρογχοκήλης πλούσια σε κολλοειδές. Τα επιθηλιακά κύτταρα που επενδύουν τα θυλάκια είναι επίπεδα. Σε ένα μεγάλο θυλάκιο έχει προκληθεί αιμορραγία, όπως φαίνεται στο επάνω τμήμα της εικόνας (χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης x 60) (Curran RC, Colour atlas of Histopathology, Harvey Miller Publishers, Oxford University Press, 3rd revised edition).



Εικόνα 25

Ιστολογική εικόνα θυρεοειδίτιδας Hashimoto

Διακρίνονται θυλάκια με ελάχιστο κολλοειδές, υπαλειφόμενα από οξύφιλα κύτταρα (κύτταρα Hürthle) (χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης, μεγέθυνση x 100, Άτλας και εγχειρίδιο των παθήσεων του θυρεοειδούς με FNA βιοψία, Δεληγιώργη-Πολίτη 2000).

β. Θυρεοειδίτιδα Hashimoto (ΗΤ)

Οι θυρεοειδίτιδες αποτελούν ετερογενή ομάδα φλεγμονωδών διαταραχών του θυρεοειδούς διαφορετικής αιτιοπαθογένειας (από αυτοάνοση μέχρι και λοιμώδη) και ξεχωριστών κλινικών χαρακτηριστικών.

Η θυρεοειδίτιδα Hashimoto, όπως ονομάζεται η χρόνια λεμφοκυτταρική θυρεοειδίτιδα, χαρακτηρίζεται ιστολογικά από διήθηση του θυρεοειδούς αδένα από λεμφοκύτταρα και πλασματοκύτταρα, ίνωση, καταστροφή των θυλακίων και εξαφάνιση του κολλοειδούς (εικόνα 25).

Πρόκειται για αγνώστου αιτιολογίας αυτοάνοση καταστροφή του θυρεοειδούς. Η επικρατούσα έως τα τελευταία χρόνια άποψη ήταν ότι οφείλεται σε μια διαταραχή της κυτταρικής ανοσίας, που εκδηλώνεται με μια γενετική ανωμαλία στη λειτουργία των Τ-κατασταλτικών κυττάρων. Έτσι τα Τ-βοηθητικά κύτταρα δεν καταστέλλονται επαρκώς, με αποτέλεσμα να ενεργοποιούν και να συνεργάζονται με τα Β-λεμφοκύτταρα για παραγωγή αντιθυρεοειδικών αυτοαντισωμάτων.

-Η ΗΤ είναι η πιο συχνή απία υποθυρεοειδισμού. Στην αρχική φάση της νόσου οι ασθενείς είναι ευθυρεοειδικοί, ενώ ο υποθυρεοειδισμός εμφανίζεται αργότερα, με την εξέλιξη της νόσου.

Η διόγκωση του θυρεοειδούς είναι ανώδυνη και συνήθως έχει μέση διάρκεια 2-4 χρόνια προτού διαγνωσθεί. Μερικές φορές παρατηρείται ασυμμετρία των λοβών. Ο αδένας είναι συμπαγής, όχι σκληρός και συμφύεται χαλαρά με τον περιβάλλοντα συνδετικό ιστό. Συχνά προβάλλουν όζοι στην επιφάνεια ή σπάνια ανευρίσκονται στον περιβάλλοντα συνδετικό ιστό.

Στους ασθενείς αυτούς ανιχνεύονται υψηλά επίπεδα αντιθυρεοειδικών αντισωμάτων (αντιμικροσωματικών και αντιθυρεοσφαιρικών). Προσβάλλονται άτομα της ίδιας οικογένειας, κυρίως αυτά με HLA-DR5 και HLA-BW30, και συχνότερα γυναίκες μέσης ηλικίας. Συχνά συνυπάρχει με άλλα αυτοάνοσα νοσήματα, όπως Σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1, νόσο του Addison, ρευματοειδή αρθρίτιδα, λεύκη, αλωπεκία κ.α.

1.4 Fas-FasL-ΕΠΑΓΟΜΕΝΗ ΑΠΟΠΤΩΣΗ ΚΑΙ ΘΥΡΕΟΕΙΔΗΣ ΑΔΕΝΑΣ

Ασθένειες του ενδοκρινικού συστήματος όπως η θυρεοειδίτιδα Hashimoto (HT), η νόσος Graves' (GD) και ο Σακχαρώδης Διαβήτης, θεωρούνται πλέον ότι έχουν αυτοάνοση αιτιολογία (Andrikoula and Tsatsoulis 2001, Ανδρίκουλα και Τσατσούλης 2001). Πρόσφατα, οι ασθένειες αυτές, όπως και άλλα αυτοάνοσα νοσήματα συσχετίστηκαν με διαταραχές της Fas-επαγόμενης απόπτωσης. Έχουν διαπιστωθεί μεταλλάξεις των Fas και FasL, αλλά μόνο σε λίγους ασθενείς με αυτοάνοσα νοσήματα, ενώ πιο συχνή φαίνεται η δυσλειτουργία της οδού Fas (εικόνα 26) και η παραγωγή διαλυτών παραγόντων, όπως οι πρωτεΐνες sFas και sFasL (Mountz και συν. 1999) (εικόνες 13,14).

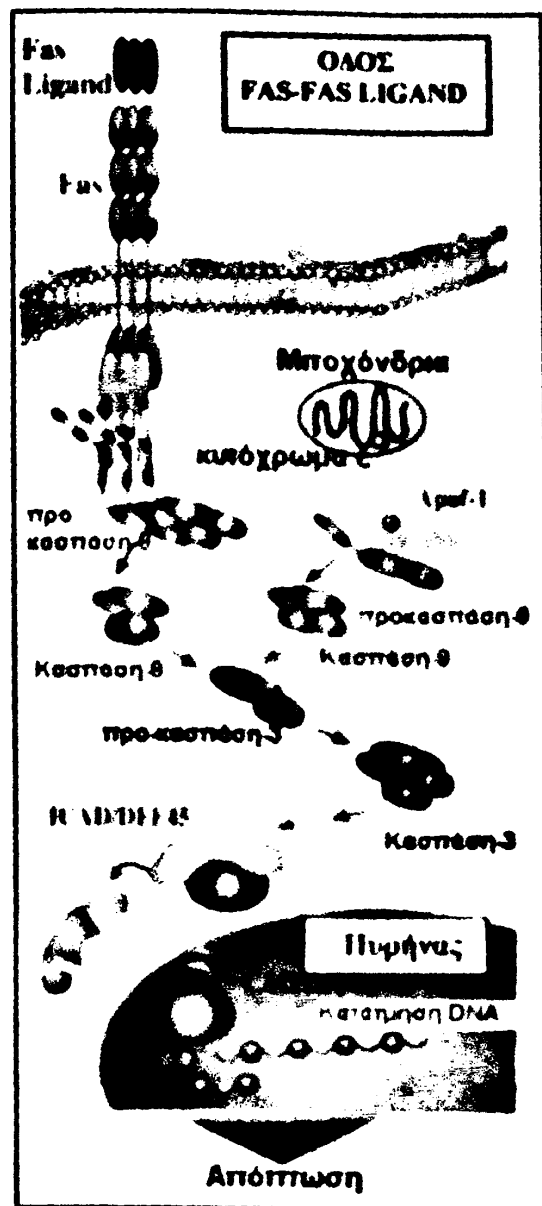
1.4.1 Συμβολή απόπτωσης στην παθογένεια αυτοάνοσων θυρεοειδικών νόσων

Η θυρεοειδική αυτοάνοση νόσος (autoimmune thyroid disease, AITD) αντιπροσωπεύει ένα φάσμα καταστάσεων που παρουσιάζουν αξιοσημείωτη κλινική επικάλυψη: στο ένα άκρο βρίσκεται η GD, που χαρακτηρίζεται από υπερθυρεοειδισμό και στο άλλο άκρο η HT, που χαρακτηρίζεται από βαθμιαία καταστροφή του θυρεοειδούς αδένα και επακόλουθο υποθυρεοειδισμό. Αυτές οι καταστάσεις οφείλονται σε μια αυτοάνοση διαδικασία με κυκλοφορούντα αυτοαντισώματα έναντι του υποδοχέα της TSH, τα οποία είναι υπεύθυνα για την κλινική εκδήλωση της GD και με αντισώματα έναντι της θυρεοσφαιρίνης ή της θυρεοειδικής υπεροξειδάσης, τα οποία αποτελούν δείκτες αυτοανοσίας για τη HT και για τη GD (Weetman και McGregor 1994).

Οι ακριβείς μηχανισμοί με τους οποίους η αυτοάνοση διαδικασία οδηγεί σε υπερπλασία των θυλακίων στη GD, ή σε θάνατο των θυρεοειδικών κυττάρων στην HT, δεν έχουν διευκρινιστεί πλήρως, παρουσιάζονται συνεχώς, όμως, νέα στοιχεία, καθώς η απόπτωση έχει γίνει μείζον αντικείμενο έρευνας.

Έχουν αναπτυχθεί ποικίλες τεχνικές για την ανίχνευση της απόπτωσης στο θυρεοειδή αδένα (Mirakian και συν. 2002). Η πρώτη οριστική παρατήρηση ότι τα θυρεοειδικά κύτταρα ασθενών με HT υφίστανται αποπτωτικό θάνατο





Εικόνα 26

Οδός Fas-Fas Ligand

Το προσδετικό μόριο FasL είναι ομοτριμερές, δηλαδή συνδέεται με τρεις υποδοχείς Fas και επάγει τον τριμερισμό του ώστε να μεταδοθεί το αποπτωτικό σήμα. Η σύνδεση αυτή οδηγεί στη δημιουργία συμπλέγματος των περιοχών θανάτου (DD) των υποδοχέων. Ακολουθεί η σύνδεση του μορίου-προσαρμοστή FADD μέσω της δικής του περιοχής θανάτου (DD) με το σύμπλεγμα των περιοχών θανάτου (DDs) των υποδοχέων. Η πρωτεΐνη FADD διαθέτει και μια άλλη περιοχή, τη "death effector domain" (DED). Πρόκειται για τμήμα μιας περιοχής που ονομάζεται CARD (Caspase Activation and Recruitment Domain) και συναντάται σε διάφορες κασπάσες, όπως η κασπάση-2, -8, -9 και -10. Ο ολιγομερισμός της κασπάσης-8 μέσω του FADD οδηγεί σε ενεργοποίηση της ίδιας και των υπολοίπων κασπασιών με κατάληξη τον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο.

επιτεύχθηκε με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (Kotani και συν. 1995). Η μορφολογική εξέταση τόσο με το ηλεκτρονικό, όσο και με το οπτικό μικροσκόπιο θεωρείται σημαντική τεχνική για την ανάδειξη των κλασσικών χαρακτηριστικών της απόπτωσης (προσεκβολές μεμβράνης, συμπύκνωση πυρήνα κ.α). Εξίσου αξιόπιστη είναι και η τεχνική DNA laddering για την ανάδειξη του ολιγονουκλεοσωματικής κατάτμησης του DNA. Στις μελέτες της απόπτωσης στο θυρεοειδή αδένα συνέβαλαν σημαντικά και πρόσφατα ανεπτυγμένες μέθοδοι, όπως η τεχνική TUNEL, η κυτταρομετρία ροής, η χρήση της αννεξίνης V, η μελέτη της έκφρασης προ- και αντι-αποπτωτικών γονιδίων με ανοσοϊστοχημεία και RT-PCR κ.α (Mirakian και συν. 2002). Καθώς κάθε μέθοδος από αυτές έχει τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματά της, για κάθε εξειδικευμένη μελέτη σχετικά με την απόπτωση, συνιστάται η χρήση περισσότερων της μιας τεχνικών.

Απόπτωση μπορεί να προκληθεί *in vitro* σε θυρεοειδικά κύτταρα κάτω από ποικίλλες συνθήκες καλλιέργειας: με στέρηση TSH και ορού (Dremier και συν. 1994), προσθήκη κυτταροκινών (Kawakami και συν. 1996, Bretz και συν. 1999), άμεση έκθεση σε H_2O_2 (Riou και συν. 1999) και με περίσσεια ιωδίου (Feldkamp και συν. 1999, Vitale και συν. 2000). Ακόμη, η απόπτωση επάγεται και από την απώλεια των φυσιολογικών αλληλεπιδράσεων ιντεγρίνης-φιμπρονεκτίνης (anoikis) (Di Matola και συν. 2000) και αναστέλλεται από την TSH (Li και συν. 1999, Sato και συν. 1999).

Σε φυσιολογικούς θυρεοειδείς αδένες φαίνεται ότι υπάρχει ένα βασικό επίπεδο απόπτωσης, που συμβάλλει στην ανανέωση των κυττάρων και τη διατήρηση των κυτταρικών πληθυσμών (Tanimoto και συν. 1995, Kotani και συν. 1995, Hammond και συν. 1997). Η απόπτωση περιγράφηκε για πρώτη φορά στο θυρεοειδή αδένα σε επίμυες στους οποίους χορηγήθηκε ιώδιο μετά από πρόκληση δημιουργίας βρογχοκήλης (Mahmoud και συν. 1986). Στη συνέχεια διαπιστώθηκε ότι τα θυρεοειδικά κύτταρα οδηγούνται σε απόπτωση όταν απουσιάζουν οι αυξητικοί παράγοντες και ειδικά με την ελάττωση της TSH (Dremier και συν. 1994). Αντίθετα, τα μετασχηματισμένα κύτταρα FRTL-5 απαιτούν παρουσία ορού για τον πολλαπλασιασμό τους και όχι της ορμόνης TSH (Di Jeso και συν. 1995).

Το κεντρικό παθογενετικό γεγονός στην ανάπτυξη αυτοάνοσων ενδοκρινικών νόσων είναι η ανοσολογική καταστροφή των ενδοκρινικών κυττάρων. Η θυρεοειδίτιδα Hashimoto προκαλείται από κυτταροτοξική



καταστροφή των θυρεοειδικών θυλακιωδών κυττάρων. Με παρόμοιο μηχανισμό πιστεύεται ότι προκαλείται και η νόσος του Addison (καταστροφή επινεφριδιακών κυττάρων που οδηγεί σε επινεφριδιακή ανεπάρκεια) (Winqvist και συν. 1996), καθώς και ο Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 1 (καταστροφή β-κυττάρων, ανεπαρκής παραγωγή ινσουλίνης και υπεργλυκαιμία) (Foulis και συν. 1996, Ανδρικούλα και Τσατσούλης 2001). Συγκεκριμένα, διαπιστώθηκε απόπτωση β-κυττάρων τόσο σε ζωικά μοντέλα με διαβήτη, όσο και σε ανθρώπους με ΣΔ τύπου 1, ενώ επίμυες στους οποίους παρεμποδίστηκε η Fas-επαγόμενη κυτταροτοξική καταστροφή των β-κυττάρων, δεν ανέπτυξαν τη νόσο (Chervonsky και συν. 1997). Είναι, λοιπόν, πολύ πιθανό η απόπτωση μέσω της οδού Fas (εικόνα 26) να είναι σημαντική και στην παθογένεια της ΑΙΤΔ.

Πρέπει να επισημανθεί ότι ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος ρυθμίζεται σε πολλούς ιστούς και ειδικά σε ενδοκρινικούς, από ορμόνες του φύλου (Vinatier και συν. 1996, McCloskey και συν. 1996). Στο θυρεοειδή υπάρχει λειτουργικός υποδοχέας οιστρογόνων· είναι, επομένως, πολύ πιθανόν οι ορμόνες αυτές να μπορούν να τροποποιήσουν τις αποπτωτικές οδούς στο θυρεοειδή και να συμβάλλουν έτσι στην αυξημένη επίπτωση ΑΙΤΔ σε γυναίκες. Μπορούμε, ακόμη, να υποθέσουμε ότι η μεταβολή του μεγέθους του θυρεοειδούς σε καταστάσεις όπως η υπερπλασία κατά την εγκυμοσύνη, οφείλεται σε ελαττωμένη απόπτωση σε συνδυασμό με αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Rasmussen και συν. 1989). Σύμφωνα με τα παραπάνω, η θυρεοειδική αύξηση και η ανανέωση των κυττάρων πρέπει να σχετίζονται με τη ρύθμιση της απόπτωσης.

Με ανοσοϊστοχημικές μελέτες σε τομές θυρεοειδικού ιστού διαπιστώθηκε αυξημένος αριθμός αποπτωτικών θυλακιωδών κυττάρων σε ΗΤ και καρκίνο θυρεοειδούς (Okayasu και συν. 1995). Τα περισσότερα αποπτωτικά κύτταρα ανιχνεύονται σε περιοχές ρήξης θυλακίων στην περιφέρεια διηθητικών λεμφοκυττάρων, ενώ σε άθικτα θυλάκια πέρα από τα λεμφοκυτταρικά βλαστικά κέντρα τα αποπτωτικά κύτταρα είναι λίγα (Kolani και συν. 1995, Hammond και συν. 1997). Στη GD, όπου είναι πιο ήπια η διήθηση λεμφοκυττάρων, ο αριθμός των αποπτωτικών κυττάρων είναι ελαττωμένος (Tanimoto και συν. 1995). Όλα αυτά συγκλίνουν στην άποψη ότι στην ιστική καταστροφή της ΗΤ λόγω απόπτωσης διαμεσολαβεί το ανοσολογικό σύστημα. Δεν έχουν διευκρινιστεί απόλυτα, όμως, οι μηχανισμοί αυτής της διαμεσολάβησης.

Πολλές μελέτες στη διεθνή βιβλιογραφία αναφέρουν αυξημένους αριθμούς αποπτωτικών πυρήνων σε θυρεοειδείς αδένες ασθενών με HT σε σχέση με τους αδένες των φυσιολογικών ατόμων (Hammond και συν. 1997, Giordano και συν. 1997, Mitsiades και συν. 1998). Οι ελάχιστες διαφορές στο ποσοστό ανίχνευσης στις μετρήσεις που έγιναν από την ομάδα των Kotani και συν. (1995) και από άλλους ερευνητές θα μπορούσαν να αποδοθούν στα διαφορετικά κλινικά στάδια των θυρεοειδικών καταστάσεων.

Με τη μέθοδο TUNEL, σε συνδυασμό με την οπτική μικροσκοπία, διαπιστώθηκε ότι η επώαση θυρεοειδικών κυττάρων για 24 ώρες με το εμπορικό CH11 Fas αγωνιστικό IgM αντίσωμα δεν οδήγησε τα κύτταρα αυτά στην απόπτωση, γεγονός που φανερώνει την αντίστασή τους σ' αυτή τη μορφή κυτταρικού θανάτου (Arscott και συν. 1997). Η IFN γ αποδείχθηκε ότι είχε ευοδωτική επίδραση στην επαγωγή απόπτωσης από το παραπάνω αντίσωμα, μόνο, όμως, υπό την παρουσία κυκλοεξαμίδιου, γεγονός που υποδηλώνει ότι ένας ασταθής αναστολέας ήταν υπεύθυνος για την αντίσταση των θυρεοειδικών κυττάρων στην απόπτωση (Arscott και συν. 1997). Ο αναστολέας αυτός χαρακτηρίστηκε στη συνέχεια ως FAP-1 (Myc και συν. 1999). Οι Stassi και συν. (2000) αναφέρουν ότι η IFN- γ είχε την ίδια ευοδωτική επίδραση στην επαγωγή απόπτωσης από το αγωνιστικό αντίσωμα Fas, όχι μόνο σε θυρεοειδικά κύτταρα HT, αλλά και σε μη τοξική βρογχοκήλη (NTG), ενώ τα θυρεοειδικά κύτταρα από ασθενείς με GD δεν επηρεάστηκαν.

Με την τεχνική της κυτταρομετρίας ροής, μετρήθηκαν αξιοσημείωτα υψηλότερες υποδιπλοειδικές κορυφές (peaks), που αντιπροσωπεύουν υψηλά ποσοστά απόπτωσης σε θυρεοειδείς με HT σε σύγκριση με θυρεοειδείς ασθενών με GD και NTG (Hammond και συν. 1997).

Σύμφωνα με πρόσφατα ερευνητικά δεδομένα, τα T CD8⁺-κύτταρα εμφανίζουν κυτταροτοξική δράση έναντι κυττάρων-στόχων όχι μέσω νέκρωσης ή φλεγμονώδους καταστροφής, αλλά μέσω απόπτωσης (Ridgway και συν. 1994). Ο αποπτωτικός μηχανισμός ενεργοποιείται μέσω υποδοχέων της κυτταρικής τους μεμβράνης, είτε από προσδεδετικά μόρια που βρίσκονται στην κυτταρική μεμβράνη των λεμφοκυττάρων, είτε από διαλυτούς παράγοντες (Lowin και συν. 1994) (εικόνα 3). Η διαδικασία αυτή στοχεύει στην καταστροφή κυττάρων με ενδοκυττάριους οργανισμούς (όπως π.χ κυττάρων προσβεβλημένων από ιούς) ή στην καταστροφή νεοπλαστικών κυττάρων (Ridgway και συν. 1994, Lowin και



συν. 1994). Ο ρόλος, βέβαια, του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου στη διατήρηση των φυσιολογικών κυτταρικών πληθυσμών είναι διαφορετικός, προκαλείται, όμως, με κοινό μηχανισμό (Thompson 1995).

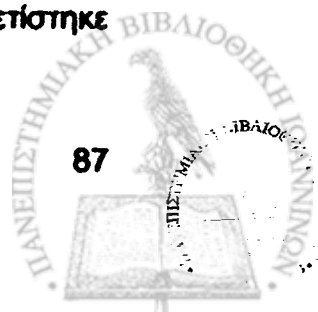
Στην απόπτωση που προκαλείται με μεσολάβηση του ανοσολογικού συστήματος συμμετέχουν υποδοχείς όπως ο TNF R1, ο Fas, ο DR3 και ο DR4, καθώς και διαλυτοί παράγοντες όπως ο TNF και οι perforins (Itoh και συν. 1991, Smith και συν. 1994, Bellgrau και συν. 1995, Chinnaiyan και συν. 1996, Pan και συν. 1997, Tamura και συν. 1998).

Οι Watanabe και συν. (1997) διεπίστωσαν αυξημένες συγκεντρώσεις διαλυτών CD8 μορίων (sCD8) στον ορό θυρεοειδικών ασθενών με ενεργό GD, καθώς και αυξημένη την αναλογία των sCD8 ως προς τον αριθμό των CD8 κυττάρων. Τα ευρήματα, όμως, δεν ήταν τα ίδια και για τη HT. Οι συγκεντρώσεις στον ορό των sCD8 συσχετίστηκαν με τα επίπεδα των αντισωμάτων anti-TSHR και των θυρεοειδικών ορμονών στον ορό των ασθενών με GD. Σύμφωνα με τα ευρήματα αυτά, οι πρωτεΐνες sCD8 οδηγούνται «σε αντίθετες κατευθύνσεις» στη GD και στη HT και πιθανότατα αντιπροσωπεύουν κάθε φορά τις διεργασίες της συγκεκριμένης νόσου.

1.4.2 Έκφραση προ-αποπτωτικών και αντι-αποπτωτικών γονιδίων στο θυρεοειδή αδένα

Έχουν χρησιμοποιηθεί ποικίλλες μέθοδοι για την εκτίμηση της έκφρασης των σχετιζόμενων με την απόπτωση υποδοχέων και των προσδετικών μορίων τους στα θυρεοειδικά κύτταρα και στα ενδοθυρεοειδικά λεμφοκύτταρα.

Υπάρχουν ενδείξεις ότι η έκφραση των πρωτεϊνών Fas και FasL στα παραπάνω κύτταρα και η λειτουργικότητά τους μπορούν να καθορίσουν την ευαισθησία αυτών των κυττάρων να υφίστανται απόπτωση ή/και τη δυνατότητά τους να «αυτοκτονούν» ή/και να οδηγούν άλλα κύτταρα στο θάνατο (Stassi και συν. 2001). Πρόσφατα, έχουν ενοχοποιηθεί και άλλα ζεύγη υποδοχέων-προσδετικών μορίων, όπως το ζεύγος TRAIL-R/TNF για το θάνατο των θυρεοειδικών κυττάρων στην AITD (Bretz και Baker 2001). Απροσδόκητα, ο ρόλος της έκφρασης των αντι-αποπτωτικών μελών της οικογένειας πρωτεϊνών Bcl-2 δεν προσέλκυσε το ενδιαφέρον στον ίδιο βαθμό, παρόλο που συσχετίστηκε



η ελαττωμένη έκφρασή τους με το θάνατο των θυρεοειδικών κυττάρων κατά τη HT (Palazzo και συν. 2000).

Το σύστημα Fas-FasL παραμένει το περισσότερο μελετημένο ζεύγος υποδοχέα-προσδετικού μορίου στην επαγωγή απόπτωσης στην ΑΙΤD. Εξακολουθεί παρόλα αυτά, να υπάρχει διάσταση απόψεων σχετικά με το ακριβές επίπεδο έκφρασης αυτών των μορίων στα θυρεοειδικά κύτταρα και τα ενδοθυρεοειδικά λεμφοκύτταρα, καθώς και με το ρόλο της λειτουργικότητάς τους στην απόπτωση κατά τη θυρεοειδική αυτοανοσία.

Μια από τις αρχικές δημοσιεύσεις σχετικά με το ρόλο των πρωτεϊνών Fas και FasL στη θυρεοειδική παθοφυσιολογία προκάλεσε έντονη διαμάχη όσον αφορά την έκφραση και το ρόλο τους στο φυσιολογικό θυρεοειδικό ιστό. Συγκεκριμένα το 1997, οι Giordano και συν. υποστήριξαν ότι η πρωτεΐνη FasL είναι παρούσα, ενώ η πρωτεΐνη Fas απουσιάζει σε ιστούς που χρησιμοποίησαν ως ομάδα ελέγχου (controls) στη μελέτη τους για τη HT. Στη συνέχεια, όμως, άλλες μελέτες από διάφορες ομάδες ερευνητών, με τη χρήση ποικίλων εργαστηριακών τεχνικών, κατέληξαν στο αντίθετο συμπέρασμα, ότι δηλαδή η πρωτεΐνη FasL απουσιάζει (Batteux και συν. 1999, Mitsiades και συν. 1998, Mitsiades και συν. 1999, Hiromatsu και συν. 1999), ενώ η πρωτεΐνη Fas εκφράζεται σε φυσιολογικά θυρεοειδικά θυλακιώδη κύτταρα (παρόλο που αυτά ανθίστανται στην Fas-επαγόμενη απόπτωση κάτω από φυσιολογικές συνθήκες) (Mitsiades και συν. 1998, Tanimoto και συν. 1995, Kawakami και συν. 1996, Arscott και συν. 1997, Mitsiades και συν. 2000). Για τη μελέτη των Giordano και συν. (1997) δημιουργήθηκαν ερωτήματα, σχετικά με την ειδικότητα του αντισώματος για την ανίχνευση της πρωτεΐνης FasL (κλώνος 33, Transduction Laboratories) (Baker και Bretz 2000), καθώς και με το γεγονός ότι οι ιστοί που χρησιμοποιήθηκαν ως ομάδα ελέγχου προέρχονταν από ασθενείς με NTG (οπότε δεν μπορούν να θεωρηθούν ως φυσιολογικοί) (Mitsiades και συν. 1998, Mitsiades και συν. 1999, Baker 1999). Με βάση την ίδια μελέτη, ο θυρεοειδής αδένας θεωρήθηκε ως ανοσολογικά προνομιούχος ιστός (immune-privileged), όπως οι ιστοί των οφθαλμών και των όρχεων λόγω της έκφρασης FasL. Στην πραγματικότητα, όμως, ο φυσιολογικός θυρεοειδικός ιστός δεν έχει τέτοια ιδιότητα, αντίθετα, αποτελεί συχνά στόχο αυτοάνοσης καταστροφής.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί σε προηγούμενες μελέτες, παρά την επαρκή έκφραση του υποδοχέα Fas στα φυσιολογικά θυρεοειδικά κύτταρα, αυτά



ανθίστανται στη Fas-επαγόμενη απόπτωση. Είναι, λοιπόν, πιθανό ότι η αυξορρύθμιση του ζεύγους υποδοχέα-προσδετικού μορίου δεν επαρκεί για την πυροδότηση μαζικής απώλειας κυττάρων του παρεγχύματος και θα πρέπει να ενισχύεται από μειορρύθμιση ενδοκυττάρικων αναστολέων. Αυτό φαίνεται από την ιδιότητα του αναστολέα της πρωτεϊνοσύνθεσης κυκλοεξιμιδίου να ευαισθητοποιεί τα φυσιολογικά κύτταρα στην Fas-επαγόμενη απόπτωση (Arscott και συν. 1997).

α. Έκφραση πρωτεΐνης Fas στις θυρεοειδικές παθήσεις

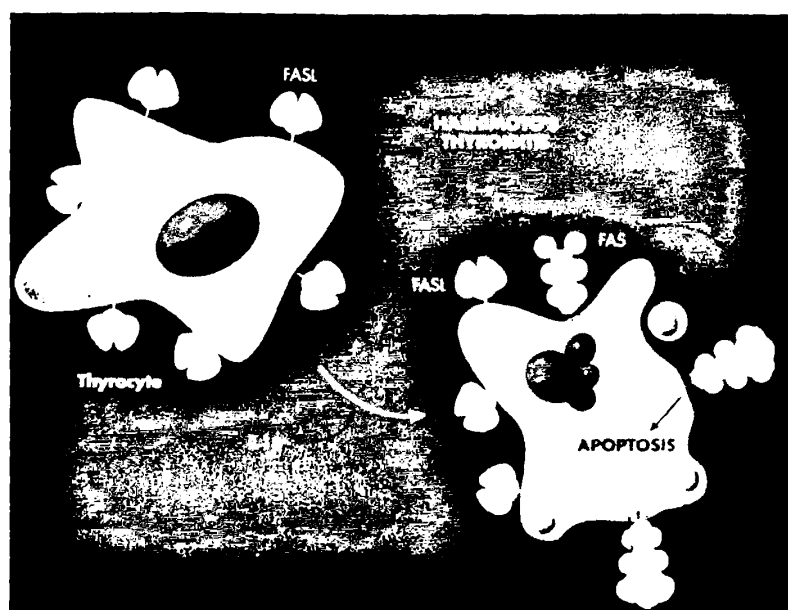
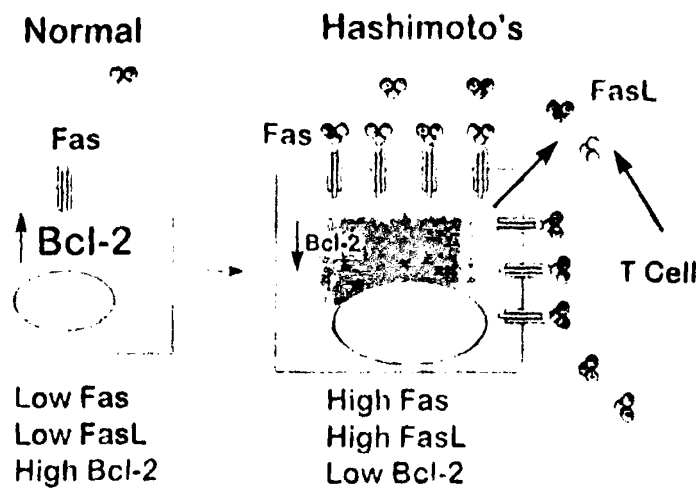
Η χρώση για την πρωτεΐνη Fas βρέθηκε αυξημένη σε θυρεοειδικά κύτταρα ασθενών με HT σε προηγούμενες μελέτες (Tanimoto και συν. 1995, Hammond και συν. 1997, Giordano και συν. 1997, 2001, Mitsiades και συν. 1998, Stassi και συν. 2000) με τη χρήση της ανοσοϊστοχημείας σε τομές παραφίνης, της κυτταρομετρίας, της ανοσοαποτύπωσης, της ανάστροφης μεταγραφής-αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (RT-PCR) και μεθόδων προστασίας από RNAάσες (RNA protection assays) (Πίνακας 9, εικόνα 27).

-Στις περισσότερες μελέτες της GD διαπιστώθηκε ότι τα θυρεοειδικά κύτταρα ήταν θετικά για Fas in situ ή/και in vitro (Tanimoto και συν. 1995, Arscott και συν. 1997, Hiromatsu και συν. 1999, Stassi και συν. 2000).

Στην πολυοζώδη βρογχοκήλη, η έκφραση Fas έτεινε να είναι αρνητική σε ανοσοϊστοχημικές μελέτες (Hammond και συν. 1997, Giordano και συν. 1997, Stassi και συν. 2000), ήταν, όμως, κατά κύριο λόγο θετική όταν τα κύτταρα απομονώθηκαν (Arscott και συν. 1997, Giordano και συν. 2001).

Τα φυσιολογικά κύτταρα έχει αποδειχθεί ότι εκφράζουν Fas, τόσο με in situ μελέτες (Tanimoto και συν. 1995, Mitsiades και συν. 1998, Hiromatsu και συν. 1999), καθώς και in vitro με κυτταρομετρία ροής (Kawakami και συν. 1996, Hiromatsu και συν. 1999), με RT-PCR, κυτταροχημικές μεθόδους σε καλλιεργημένα κύτταρα και ανοσοαποτύπωση (Arscott και συν. 1997, Stokes και συν. 1998) (εικόνα 27).

Οι Kawakami και συν. (1996) έδειξαν (με κυτταρομετρία ροής) επαγωγή της έκφρασης Fas σε θυρεοειδικά κύτταρα μέσω IFN-γ και IL-1β, καθώς και αναστολή αυτής της επαγωγής από την ορμόνη TSH. Η ομάδα των Giordano και συν. (1997) αναφέρει ανίχνευση έκφρασης Fas μετά από προσθήκη μόνο IL-1β,



Εικόνα 27

Τα φυσιολογικά θυρεοειδικά κύτταρα εμφανίζουν χαμηλή έκφραση Fas και FasL και υψηλή έκφραση Bcl-2. Στη θυρεοειδίτιδα Hashimoto παρατηρείται αυξορρύθμιση του Fas, που επάγεται από την IL-1β και υψηλή έκφραση FasL. Επίσης, παρατηρείται ελάττωση της έκφρασης Bcl-2, η οποία θα μπορούσε να διευκολύνει την απόπτωση των θυρεοειδικών κυττάρων στη νόσο αυτή.

ενώ οι Hiromatsu και συν. (1999) έδειξαν επαγωγή της έκφρασης Fas από την IFN-γ και αναστολή της από την TSH.

Αντίθετα, η χρώση για την πρωτεΐνη Fas στα ενδοθυρεοειδικά λεμφοκύτταρα διαπιστώθηκε ασθενής στα δείγματα HT (Mitsiades και συν. 1998, Giordano και συν. 2001) με *in situ* αλλά και με *in vitro* τεχνικές, και αυξημένη στα δείγματα GD (Giordano και συν. 2001). Η ομάδα των Stassi και συν. (1999), με την τεχνική της κυτταρομετρίας ροής, έδειξαν υψηλά επίπεδα Fas σε απομονωμένα ενδοθυρεοειδικά λεμφοκύτταρα από αδένες με HT και αναφέρουν ότι ένας αξιόλογος αριθμός αυτών των κυττάρων υφίστανται αποπτωτικό θάνατο μέσω αγωνιστικού Fas αντισώματος.

Οι παραπάνω διαφορές μεταξύ των αποτελεσμάτων πιθανόν να οφείλονται στη χρήση *in vitro* έναντι *in situ* μεθόδων, καθώς ο τεχνικός χειρισμός των θυρεοειδικών ιστών μπορεί να επηρεάζει την έκφραση των αποπτωτικών γονιδίων (Stassi και συν. 2001), ενώ και η χρήση διαφορετικών αντισωμάτων μπορεί να είναι ένας επιπλέον παράγοντας που επτείνει τις διαφορές.

β. Έκφραση πρωτεΐνης Fas Ligand στις θυρεοειδικές παθήσεις

Η πρωτεϊνική ανίχνευση FasL έδωσε αντιφατικά αποτελέσματα ανάλογα με τα χρησιμοποιούμενα κάθε φορά αντισώματα (Rymaszewski και συν. 1997). Μετά την πρώτη παρατήρηση έκφρασης FasL (Giordano και συν. 1997) σε θυρεοειδικά κύτταρα HT και NTG, διατυπώθηκαν διαφορετικές απόψεις σχετικά με την αξιοπιστία των χρησιμοποιούμενων αντιδραστηρίων (Stokes και συν. 1998, Strater και συν. 2001), που επιβράδυνε την πρόοδο της έρευνας σ' αυτό το πεδίο. Πρόσφατες μελέτες με περισσότερο κατάλληλα αντιδραστήρια, με τη χρήση της ανοσοϊστοχημείας (Mitsiades και συν. 1998), της ανοσοαποτύπωσης (Stassi και συν. 2000, Giordano και συν. 2001), της κυτταρομετρίας και της RT-PCR (Giordano και συν. 2001), έδειξαν αυξημένη έκφραση FasL σε θυρεοειδικά κύτταρα HT σε σύγκριση με φυσιολογικά κύτταρα του αδένα (Πίνακας 10, εικόνα 27). Αυτό θα μπορούσε να αποτελεί επιβεβαίωση της αρχικής υπόθεσης ότι υπάρχει κάποιος υποκείμενος αυτοκρινικός μηχανισμός θανάτου του αυτοάνοσου θυρεοειδικού κυττάρου σ' αυτή την παθολογική κατάσταση (Giordano και συν. 1997).



Η έκφραση του μορίου FasL στα θυρεοειδικά κύτταρα διερευνήθηκε στη συνέχεια από πολλούς ερευνητές με τη χρήση ευρείας ποικιλίας αντισωμάτων και τεχνικών (Williams 1997, Stokes και συν. 1998), με αποτέλεσμα το θέμα αυτό να γίνει αντικείμενο παγκόσμιας αντιπαράθεσης.

Στην πρόσφατη διεθνή βιβλιογραφία αναφέρεται έκφραση FasL τόσο σε GD όσο και σε πολυοζώδη βρογχοκήλη *in situ* και *in vitro* (Hiromatsu και συν. 1999, Stassi και συν. 2000, Giordano και συν. 2001). Αντίθετα, σε φυσιολογικά δείγματα δε διαπιστώθηκε συνεχής έκφραση FasL, αλλά ασθενώς θετική τόσο με ανοσοϊστοχημικές μεθόδους και RT-PCR (Stokes και συν. 1998, Hiromatsu και συν. 1999, Mitsiades και συν. 1998, Mitsiades και συν. 2000) όσο και με ανοσοαποτύπωση (Mitsiades και συν. 2000) (εικόνα 27).

Τα ενδοθυρεοειδικά λεμφοκύτταρα στη HT εκφράζουν χαμηλότερα επίπεδα FasL σε σχέση με τα αντίστοιχα θυρεοειδικά κύτταρα (Mitsiades και συν. 1998, Stassi και συν. 1999, Giordano και συν. 2001) (εικόνα 27). Αυτό συνηγορεί με την άποψη ότι τα FasL-θετικά ενδοθυρεοειδικά λεμφοκύτταρα ελάχιστα συμβάλλουν στην καταστροφή θυρεοειδικών κυττάρων στην HT. Αντίθετα, με κυτταρομετρία ροής και ανοσοαποτύπωση διαπιστώθηκε ότι τα λεμφοκύτταρα στη GD εκφράζουν υψηλότερα επίπεδα FasL (Giordano και συν. 2001).

Σε μια προσπάθεια να εξηγήσουν κάποια από αυτά τα αντικρουόμενα ευρήματα, οι Phelps και συν. (2000) προτείνουν ότι η έκφραση FasL στα θυρεοειδικά κύτταρα μπορεί να είναι ένα παροδικό φαινόμενο.

γ. Επίπεδα διαλυτής μορφής της πρωτεΐνης Fas στις θυρεοειδικές παθήσεις

Η διαλυτή μορφή της πρωτεΐνης Fas βρέθηκε αυξημένη στον ορό ασθενών με αυτοάνοσα νοσήματα (ΣΕΛ, ΡΑ) (Jodo και συν. 1997, Knipping και συν. 1997, Goel και συν. 1995) και η αύξηση αυτή συσχετίστηκε, από κάποιους μόνο ερευνητές (Jodo και συν. 1997) με τα κλινικά και εργαστηριακά ευρήματα της νόσου, ενώ δεν επιβεβαιώθηκε από άλλους (Goel και συν. 1995, Knipping και συν. 1997). Τα αίτια των αντιφατικών ευρημάτων αυτών των μελετών μπορεί να σχετίζονται, είτε με τις διαφορετικές τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε μελέτη, είτε με διαφορές στην ενεργότητα της νόσου στους ασθενείς που εξετάστηκαν κάθε φορά. Από τους παραπάνω, αλλά και από άλλους ερευνητές



(Toyozaki και συν. 1998), διατυπώθηκε η άποψη ότι τα αυξημένα επίπεδα sFas ευθύνονται για την αναστολή της απόπτωσης των ενεργοποιημένων T-κυττάρων και την έξαρση της αυτοάνοσης φλεγμονώδους διεργασίας.

Τα τελευταία χρόνια δημοσιεύθηκαν μελέτες για τα επίπεδα της πρωτεΐνης sFas σε αυτοάνοσες θυρεοειδικές παθήσεις (Shimaoka και συν. 1998, Hiromatsu και συν. 1999). Διαπιστώθηκαν, λοιπόν, με την ανοσοενζυμική μέθοδο ELISA, αυξημένα επίπεδα sFas σε θυρεοτοξικούς ασθενείς με GD. Τα επίπεδα sFas εμφάνιζαν μείωση όταν οι ασθενείς γίνονταν ευθυρεοειδικοί, μετά από αγωγή με αντιθυρεοειδικά φάρμακα για 6-8 εβδομάδες, σε σύγκριση με ασθενείς που δεν έλαβαν θεραπεία. Επιβεβαιώθηκε συσχέτιση των επιπέδων sFas με τα επίπεδα της ορμόνης FT4 και των anti-TSHR αντισωμάτων (Shimaoka και συν. 1998). Τα παραπάνω ευρήματα επιβεβαιώθηκαν αργότερα και από άλλη ομάδα ερευνητών (Hiromatsu και συν. 1999), οι οποίοι διεπίστωσαν και αυτοί, ότι η πρωτεΐνη sFas ήταν αυξημένη σε θυρεοτοξικούς ασθενείς με GD, ελαττωμένη σε ασθενείς με GD σε αποδρομή, καθώς και σε ευθυρεοειδικούς με HT. Αντίθετα, τα επίπεδα της πρωτεΐνης ήταν φυσιολογικά σε υποθυρεοειδικούς ασθενείς με HT και θυρεοτοξικούς με υποκλινική θυρεοειδίτιδα. Οι ίδιοι ερευνητές ανέφεραν αξιοσημείωτη συσχέτιση των επιπέδων sFas με τα επίπεδα των anti-TSHR αντισωμάτων, αλλά όχι με κλινικές παραμέτρους, όπως οι συγκεντρώσεις των ορμονών FT3, FT4, TSH ή τα επίπεδα των anti-TPO ή anti-Tg.

Παρόλο που στο παρελθόν διαπιστώθηκε εξάρτηση των επιπέδων sFas από την ηλικία των φυσιολογικών ατόμων που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη, κάτι τέτοιο δε βρέθηκε και στους ασθενείς με GD. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι η παρατηρούμενη αύξηση της πρωτεΐνης sFas σ' αυτούς τους ασθενείς δεν οφείλεται στην αύξηση της ηλικίας.

Σε θυρεοειδείς αδένες ασθενών με GD σπάνια ανιχνεύεται απόπτωση, παρά την διαπιστωμένη έκφραση Fas και FasL στα θυρεοειδικά τους κύτταρα (Hiromatsu και συν. 1999). Η υπερέκφραση της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2, η μειορρύθμιση της έκφρασης Fas από τη διέγερση του υποδοχέα της TSH (Kawakami και συν. 1996) και η παρουσία ενός ασταθούς πρωτεϊνικού αναστολέα (Arscott και συν. 1997), έχουν αναφερθεί ως υπεύθυνοι παράγοντες για την αναστολή της Fas-επαγόμενης απόπτωσης στα θυρεοειδικά κύτταρα. Οι Hiromatsu και συν. (1999) με τη μελέτη τους και την ανίχνευση sFas mRNA με RT-PCR, προτείνουν την τοπική παραγωγή της διαλυτής πρωτεΐνης sFas από τα



θυρεοειδικά κύτταρα ως επιπλέον πιθανό μηχανισμό αναστολής της Fas-επαγόμενης απόπτωσης στα κύτταρα αυτά. Η ομάδα αυτή αναφέρει, επίσης, ρύθμιση της παραγωγής sFas σε καλλιέργειες θυρεοειδικών κυττάρων από την IL-1β και τον παράγοντα TNF-α.

Δεν έχει εξακριβωθεί αν τα αυξημένα επίπεδα sFas στον ορό οφείλονται στην αυξημένη παραγωγή sFas από τα θυρεοειδικά κύτταρα και τα διηθητικά λεμφοκύτταρα, ή οφείλονται στον αυξημένο αριθμό αυτών των κυττάρων. Η επαγωγή της παραγωγής sFas μέσω των κυτταροκινών της φλεγμονής φαίνεται να υποστηρίζει την πρώτη εκδοχή, είναι, όμως, πιθανή και η δεύτερη εκδοχή καθώς η υπερπλασία του θυρεοειδούς αδένος είναι κύριο χαρακτηριστικό της GD.

δ. Έκφραση πρωτεΐνης Bcl-2 στις θυρεοειδικές παθήσεις

Η *in situ* και *in vitro* έκφραση αντι-αποπτωτικών γονιδίων στα θυρεοειδικά κύτταρα έχει μελετηθεί με ανοσοϊστοχημεία, με τεχνικές ανοσοϋπεροξειδάσης και φθορισμού και με ανάλυση ανοσοαποτύπωσης. Οι μελέτες του γονιδίου *bcl-2* στο θυρεοειδή έχουν επικεντρωθεί στο ρόλο του στη νεοπλασία και έδειξαν υπερέκφρασή του σε προχωρημένα καρκινώματα (Pollina και συν. 1996, Manetto και συν. 1997, Moore και συν. 1998).

Ανοσοϊστοχημικά, η έκφραση της πρωτεΐνης Bcl-2 βρέθηκε επανειλημμένως να είναι ελαττωμένη στα θυρεοειδικά κύτταρα σε HT (Hammond και συν. 1997, Mitsiades και συν. 1998) σε σύγκριση με φυσιολογικά δείγματα, ή δείγματα από μη αυτοάνοσες θυρεοειδικές παθήσεις (εικόνα 27). Ελαττωμένη χρώση παρατηρήθηκε κυρίως κοντά στις περιοχές λεμφοκυτταρικής διήθησης. Ελαττωμένη έκφραση Bcl-2 στα θυρεοειδικά κύτταρα και ισχυρή έκφραση στα ενδοθυρεοειδικά λεμφοκύτταρα σε HT επιβεβαιώθηκε πρόσφατα από τη μελέτη των Giordano και συν. (2001) με ανοσοαποτύπωση και με κυτταρομετρία ροής.

Ο ρόλος της Bcl-2-εξαρτώμενης αποπτωτικής διαδικασίας στη νόσο Graves' (Labat-Moleur και συν. 1999) διερευνήθηκε με τη μέθοδο TUNEL σε θυρεοειδικούς ιστούς από ασθενείς που χειρουργήθηκαν για την παραπάνω ασθένεια. Σε περιστατικά με υψηλό ποσοστό απόπτωσης διαπιστώθηκαν τα τυπικά ιστολογικά χαρακτηριστικά ενεργού GD. Σε περιστατικά με μη ανιχνεύσιμη απόπτωση, διαπιστώθηκαν χαρακτηριστικά παλινδρόμησης της νόσου, ενώ υπήρχαν και ενδιάμεσες περιπτώσεις, όπου περιοχές «πλούσιες» σε απόπτωση



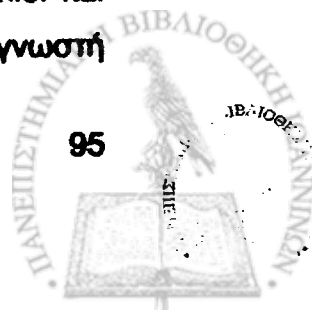
εναλλάσσονταν με περιοχές αποδρομής της νόσου, όπου δε διαπιστώθηκε απόπτωση. Σύμφωνα με τις έρευνες αυτές, η έναρξη της αποπτωτικής διαδικασίας αντιστοιχεί σε απώλεια της κυτταρικής προσκολλητικότητας, μείωση της έκφρασης της Bcl-2 και μετατόπιση της προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bax από το σύστημα Golgi στα μιτοχόνδρια. Παρά τις προηγούμενες αυτές ανοσοϊστοχημικές μελέτες, η έκφραση Bcl-2 βρέθηκε, επίσης, ελαττωμένη, αλλά μόνο στις περιοχές ενεργότητας της νόσου και απόπτωσης (Hammond και συν. 1997, Labat-Moleur και συν. 1999), αλλά τα ευρήματα αυτά δεν επιβεβαιώθηκαν σε επακόλουθη μελέτη (Giordano και συν. 2001).

Είναι ενδιαφέρον, το ότι η έκφραση αυτής της πρωτεΐνης δε διαπιστώθηκε (με κυτταρομετρία ροής) να ρυθμίζεται από την IFN- γ ή την IL-1 β (Kawakami και συν. 1996).

1.4.3 Αναστολείς της οδού Fas-Fas Ligand

Η ικανότητα του Fas να επάγει απόπτωση μπορεί να εκτιμηθεί με τη χρήση μονοκλωνικού anti-Fas αντισώματος, που συνδέεται στον αντίστοιχο υποδοχέα και ενεργοποιεί την οδό αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου (Shimazaki και συν. 1998). Όπως αναφέρθηκε και πιο πριν, ενεργοποίηση αυτής της οδού διαπιστώθηκε σε θυρεοειδικά κύτταρα μόνο μετά την επίδραση κυτταροκινών της φλεγμονής (Kawakami και συν. 1996, Giordano και συν. 1997), που επάγουν προφανώς την έκφραση του υποδοχέα Fas. Φαίνεται, δηλαδή, ότι η παρουσία του υποδοχέα Fas από μόνη της δεν αρκεί πάντοτε για την πρόκληση αποπτωτικού θανάτου (Owen-Schaub και συν. 1994).

Έχουν ταυτοποιηθεί διάφοροι αναστολείς της οδού Fas, οι οποίοι θα μπορούσαν να παρεμποδίσουν την απόπτωση στα θυρεοειδικά κύτταρα. Η Fas-σχετιζόμενη φωσφατάση-1 (FAP-1 ή PTP-BAS) είναι μια φωσφατάση πρωτεΐνης τυροσίνης, που φαίνεται να αλληλεπιδρά με το καρβοξυλικό άκρο του Fas και παρεμβάλλεται στη μεταγωγή σημάτων στο μόριο-προσαρμοστή FADD (Yanagisawa και συν. 1997). Ακόμη, ταυτοποιήθηκε μια οικογένεια ιικών αναστολέων πρωτεϊνών (Inhibitory of Apoptosis Proteins, IAPs), οι οποίες συνδέονται με το FADD, παρεμβάλλοντας στην αλληλεπίδρασή του με την περιοχή FLICE και παρεμποδίζουν την ενεργοποίηση των κασπασών (Imler και συν. 1997, Hu και συν. 1997). Αυτή η πρωτεΐνη-αναστολέας της FLICE (γνωστή



ως FLIP ή I-FLICE) αναστέλλει την επαγωγή απόπτωσης μέσω του Fas ή των άλλων υποδοχέων θανάτου (Immler και συν. 1997).

1.4.4 Βρογχοκήλη και απόπτωση

Ελάχιστες είναι οι μελέτες της συμβολής της απόπτωσης στη δημιουργία βρογχοκήλης και στην πλειοψηφία τους αφορούν σε ζωικά μοντέλα στα οποία προκλήθηκε η δημιουργία βρογχοκήλης με τη χορήγηση βρογχοκηλογόνων ουσιών.

Πρόσφατα, διερευνήθηκε ο ρόλος του αποπτωτικού θανάτου και του συστήματος Fas-FasL στην ανάπτυξη και υποστροφή πειραματικής βρογχοκήλης σε επίμυες (Tamura και συν. 1998). Η βρογχοκήλη προκλήθηκε στα ζώα αυτά μέσω ελάττωσης του κυκλοφορούντος ιωδίου και μέσω χορήγησης του βρογχοκηλογόνου 6-προπυλ-2-θειουρακίλη (PTU). Τα κυριότερα ευρήματα (με *in situ* υβριδισμό και κυτταρομετρία ροής) ήταν: α) αυξημένος αριθμός αποπτωτικών κυττάρων κατά την ανάπτυξη της βρογχοκήλης και το πρώιμο στάδιο της υποστροφής, β) αύξηση της έκφρασης Fas στο στάδιο της ανάπτυξης της βρογχοκήλης και στο πρώιμο στάδιο της υποστροφής, αλλά ελαττωμένη έκφραση Fas στο όψιμο στάδιο της υποστροφής και γ) συνεχής έκφραση FasL σε όλα τα στάδια ανάπτυξης και υποστροφής της βρογχοκήλης. Είναι, λοιπόν, πιθανό η έκφραση του Fas να χρησιμεύει ως περιοριστικός παράγοντας στην επαγωγή απόπτωσης μέσω Fas.

Όπως διαπιστώθηκε σε επίμυες μετά από χορήγηση βρογχοκηλογόνων ουσιών, η νέκρωση και η απόπτωση συνυπάρχουν στο θυρεοειδή αδένα κατά την ανάπτυξη και υποστροφή της βρογχοκήλης. Στη μελέτη τους οι Mutaku και συν. (2002) αναφέρουν ότι η νέκρωση σχετίζεται με την οξειδωτική κατάσταση των κυττάρων, ενώ η απόπτωση επάγεται κατά την υποστροφή της βρογχοκήλης που προκαλείται με χορήγηση ιωδίου.

Υψηλές ποσότητες ιωδίου αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό FRTL-5 κυττάρων και επάγουν κυτταροτοξικότητα *in vivo* και *in vitro*, πιθανόν μέσω εκσεσημασμένης παραγωγής ελευθέρων ριζών. Σε καλλιέργειες θυρεοειδικών κυττάρων μελετήθηκε ο ρόλος του ιωδίου στην πρόκληση Fas-επαγόμενη απόπτωσης. Διαπιστώθηκε ότι οι χαμηλές συγκεντρώσεις ιωδίου ήταν ικανές να αναστείλλουν την απόπτωση, ενώ οι υψηλές συγκεντρώσεις ιωδίου προκαλούσαν



αύξηση του ποσοστού της Fas-επαγόμενης απόπτωσης (Feldkamp και συν. 1999).

Είναι κατανοητό ότι στον έλεγχο της μάζας του θυρεοειδούς αδένα παίζει σημαντικό ρόλο η ισορροπία κυτταρικού πολλαπλασιασμού-προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Στην παραπάνω μελέτη διαπιστώθηκε ότι στο στάδιο ανάπτυξης της βρογχοκήλης, η ισορροπία διαταράσσεται, υπερτερεί ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και αυξάνεται ο αριθμός των θυρεοειδικών κυττάρων. Αντίθετα, ο ελαττωμένος αριθμός θυρεοειδικών κυττάρων κατά το πρώιμο και όψιμο στάδιο της υποστροφής πιθανόν να οφείλεται σε αυξημένη επαγωγή απόπτωσης και ελαττωμένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Χρειάζονται παρόλα αυτά περισσότερες έρευνες για να διευκρινιστεί πλήρως ο ρόλος της απόπτωσης και του συστήματος Fas-FasL στη βρογχοκήλη, και να διερευνηθούν οι παράγοντες που επηρεάζουν τον προγραμματισμένο θάνατο των θυρεοειδικών κυττάρων σε τέτοιους ασθενείς.

1.4.5 Θυρεοειδίτιδα Hashimoto και απόπτωση

Στη HT διαπιστώνεται ανοσολογική αντίδραση σε θυρεοειδικά αντιγόνα και λεμφοκυτταρική διήθηση του θυρεοειδούς (Bagnasco και συν. 1989), καταστροφή θυρεοειδικών θυλακιδωτών κυττάρων και κλινικός υποθυρεοειδισμός (Weetman and McGregor 1994).

Όπως φαίνεται από την ύπαρξη anti-TPO (Bermann και συν. 1993) και anti-Tg αντισωμάτων (DeGroot and Quintans 1989), η HT συνδέεται με ανοσολογικές αντιδράσεις Β-κυττάρων. Εξίσου σημαντικός είναι και ο ρόλος των Τ-κυττάρων, τα οποία στην πλειοψηφία τους είναι CD8, γεγονός που φανερώνει κυτταροτοξική δραστηριότητα έναντι των θυρεοειδικών κυττάρων (Weetman and McGregor 1994).

Εξαιτίας των παραπάνω ευρημάτων, οι περισσότερες μελέτες της παθογένειας της AITD εστιάζονταν μέχρι πρόσφατα στο ανοσολογικό σύστημα. Προέκυψε, έτσι, η υπόθεση ότι ανωμαλίες του ανοσολογικού συστήματος διευκολύνουν αντιθυρεοειδικές ανοσολογικές αντιδράσεις και οδηγούν στην εκδήλωση HT. Επιπλέον, η συσχέτιση της HT με στοιχεία του συστήματος μείζονος ιστοσυμβατότητας (HLA DR3 κλπ) στηρίζει την άποψη ότι στον άνθρωπο υπάρχει γενετική προδιάθεση που οδηγεί σε ανοσολογική αντίδραση



Πίνακας 9

Βιβλιογραφικά δεδομένα για την έκφραση της πρωτεΐνης Fas στα θυρεοειδικά κύτταρα

Νόσος	Τεχνική	Έκφραση	Βιβλιογραφία
Hashimoto	Ανοσοϊστοχημεία	αυξημένη αυξημένη θετική αυξημένη αυξημένη αυξημένη	Tanimoto και συν. 1995 Hammond και συν. 1997 Giordano και συν. 1997 Mitsiades και συν. 1998 Stassi και συν. 2000 Giordano και συν. 2001
	Κυτταρομετρία ροής	θετική θετική/ αυξημένη	Giordano και συν. 1997 Giordano και συν. 2001
	Ανοσοαποτύπωση RT-PCR RNAse protection	αυξημένη	Giordano και συν. 2001
Νόσος Graves	Ανοσοϊστοχημεία	θετική αρνητική θετική θετική αρνητική	Tanimoto και συν. 1995 Hammond και συν. 1997 Hiromatsu και συν. 1999 Stassi και συν. 2000 Giordano και συν. 2001
	Ανοσοαποτύπωση RT-PCR RNAse protection Κυτταροχημεία	θετική	Arscott και συν. 1997
	Κυτταρομετρία ροής	θετική	Hiromatsu και συν. 1999
Πολυοζώδης βρογχοκήλη	Ανοσοϊστοχημεία	αρνητική αρνητική αρνητική	Hammond και συν. 1997 Giordano και συν. 1997 Stassi και συν. 2000
	Κυτταρομετρία ροής	αρνητική θετική	Giordano και συν. 1997 Giordano και συν. 2001
	RT-PCR RNAse protection	θετική θετική	Arscott και συν. 1997 Giordano και συν. 2001
	Ανοσοαποτύπωση Κυτταροχημεία	θετική	Arscott και συν. 1997
Φυσιολογικός θυρεοειδής	Ανοσοϊστοχημεία	θετική μέτρια θετική	Tanimoto και συν. 1995 Mitsiades και συν. 1998 Hiromatsu και συν. 1999
	Κυτταρομετρία ροής	θετική θετική	Kawakami και συν. 1996 Hiromatsu και συν. 1999
	RT-PCR RNAse protection Ανοσοαποτύπωση Κυτταροχημεία	θετική θετική θετική	Arscott και συν. 1997 Stokes και συν. 1998



Πίνακας 10

Βιβλιογραφικά δεδομένα για την έκφραση της πρωτεΐνης Fas Ligand στα θυρεοειδικά κύτταρα

Νόσος	Τεχνική	Έκφραση	Βιβλιογραφία
Hashimoto	Ανοσοϊστοχημεία	θετική θετική/ αυξημένη	Giordano και συν. 1997 Mitsiades και συν. 1998
	Κυτταρομετρία ροής RT-PCR	θετική θετική/ αυξημένη	Giordano και συν. 1997 Giordano και συν. 2001
	Ανοσοαποτύπωση	θετική/ αυξημένη θετική/ αυξημένη	Stassi και συν. 2000 Giordano και συν. 2001
	RNAse protection	θετική/αυξημένη	Giordano και συν. 2001
Νόσος Graves	Ανοσοϊστοχημεία	κυρίως θετική	Hiromatsu και συν. 1998
	RT-PCR	αρνητική κυρίως θετική	Stokes και συν. 1998 Hiromatsu και συν. 1998
	Ανοσοαποτύπωση	θετική	Stassi και συν. 2000
	RNAse protection	αρνητική	Stokes και συν. 1998
Πολυοζώδης βρογχεκτική	Ανοσοϊστοχημεία	θετική	Giordano και συν. 1997
	Κυτταρομετρία ροής RT-PCR	θετική θετική	Giordano και συν. 1997 Giordano και συν. 2001
	RNAse protection	θετική	Giordano και συν. 2001
	Ανοσοαποτύπωση	θετική θετική	Giordano και συν. 1997 Stassi και συν. 2000
Φυσιολογικός θυρεοειδής	Ανοσοϊστοχημεία	αρνητική ελάχιστη ακανόνιστη	Stokes και συν. 1998 Mitsiades και συν. 1998 Hiromatsu και συν. 1998
	RT-PCR	αρνητική ελάχιστη ακανόνιστη	Stokes και συν. 1998 Mitsiades και συν. 2000 Hiromatsu και συν. 1998
	RNAse protection	αρνητική	Stokes και συν. 1998
	Ανοσοαποτύπωση	ελάχιστη	Mitsiades και συν. 2000



έναντι του θυρεοειδούς αδένος (Weetman and McGregor 1994).

Με μια πιο προσεκτική ανάλυση των αποτελεσμάτων από τις διάφορες έρευνες, θα διαπιστώσουμε στοιχεία που δείχνουν ότι το ανοσολογικό σύστημα από μόνο του δεν είναι ικανό να προκαλέσει κλινική εκδήλωση της νόσου και ειδικά υποθυρεοειδισμό. Για παράδειγμα, διαπιστώθηκαν θυρεοειδικά αυτοαντισώματα σε μεγάλο ποσοστό ατόμων (κυρίως άνω των 50) που δεν εμφάνιζαν βρογχοκήλη ή υποθυρεοειδισμό (Weetman and McGregor 1984). Αρχικά, θεωρήθηκε ότι οι ασθενείς αυτοί παρουσίαζαν ένα διαφορετικό τύπο ανοσολογικής αντίδρασης που δεν οδηγεί σε καταστροφή θυρεοειδικών κυττάρων (Weetman and McGregor 1994). Ελάχιστα είναι, όμως, τα ανοσολογικά χαρακτηριστικά που τους διαχωρίζουν από ασθενείς με HT, ή που συσχετίζουν την ανοσολογική αντίδρασή τους με την ανάπτυξη υποθυρεοειδισμού (Pfeiffer και συν. 1991, Szabolcs και συν. 1995). Πολλές μορφές θυρεοειδίτιδων (όπως αυτή που εμφανίζεται μετά τον τοκετό) είναι αυτοπεριοριζόμενες και δεν οδηγούν πάντα σε υποθυρεοειδισμό (Singer 1991). Επιπλέον, ασθενείς με GD ή καρκίνο του θυρεοειδούς εμφανίζουν anti-TPO αντισώματα, όπως και οι ασθενείς με HT, χωρίς, όμως, στοιχεία θυρεοειδικής καταστροφής (Bergman και συν. 1993). Τέλος, η πλειοψηφία των ατόμων με γενετική προδιάθεση για AITD, δεν αναπτύσσουν αυτοανοσία (DeGroot and Quintans 1989). Υπάρχουν, επομένως, πολλαπλές ενδείξεις ότι η ανοσολογική αντίδραση έναντι του θυρεοειδούς, δε συνδέεται απόλυτα με την εκδήλωση αυτοάνοσης νόσου, ειδικά στην περίπτωση της χρόνιας θυρεοειδίτιδας.

Οι ασθενείς με AITD παρουσιάζουν ποικιλότητα στον T-κυτταρικό υποδοχέα και στα γονίδια των ανοσοσφαιρινών μεταξύ διαφορετικών ατόμων (Davies και συν. 1991, McIntosh and Weetman 1997). Η ποικιλότητα αυτή δείχνει ότι δεν υπάρχει μία μοναδική ανοσολογική αντίδραση στο θυρεοειδή αδένος ασθενών με HT ή GD. Άλλοι ερευνητές έδειξαν ότι τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για τη δημιουργία anti-TPO αυτοαντισωμάτων ποικίλλουν και είναι παρόμοια με αυτά που προκαλούν τη δημιουργία αντισωμάτων σε εξωγενή αντιγόνα (McIntosh and Weetman 1997, McLachlan and Rapoport 1995). Διαπιστώθηκαν πολλαπλοί επίτοποι στην TPO που αναγνωρίζονται από αυτοαντισώματα ασθενών (Arscott και συν. 1996, Mastricht και συν. 1992), αλλά και πολλαπλοί ισότυποι των αντισωμάτων, που συνδέονται με έναν επίτοπο. Όλα αυτά δείχνουν ότι σε



θυρεοειδίτιδα δεν υπάρχει μια συγκεκριμένη ανοσολογική αντίδραση έναντι του θυρεοειδούς ή των αντιγόνων του.

Από μελέτες σε επίμυες με θυρεοειδίτιδα φαίνεται ότι η κυτταρική ανοσία παίζει πρωταρχικό ρόλο στην εκδήλωση της νόσου, καθώς η φλεγμονή του θυρεοειδούς μπορεί να μεταφερθεί παθητικά από ένα ζώο σε άλλο μέσω Τ-λεμφοκυττάρων, αλλά όχι μέσω αντιθυρεοειδικών αντισωμάτων (Okayasu 1985, Maron και συν. 1983). Επιπλέον, απεδείχθη ότι η θυμ-κτομή προλαμβάνει την εκδήλωση της νόσου (Okayasu 1985). Τ-κύτταρα από ζώα με θυρεοειδίτιδα εμφάνισαν κυτταροτοξική δραστηριότητα έναντι θυρεοειδικών κυττάρων *in vitro* (Crompters και συν. 1983), ενώ CD8 κύτταρα άρχισαν να πολλαπλασιάζονται ως αντίδραση στη θυρεοσφαιρίνη (Canonica και συν. 1985). Παρά τις έντονες κυτταρικές ανοσολογικές αντιδράσεις σχεδόν κανένα από τα ζώα με θυρεοειδίτιδα δεν εμφάνισε υποθυρεοειδισμό.

Τα παραπάνω ευρήματα δείχνουν ότι ακόμα και η ανάπτυξη ανοσολογικής αντίδρασης έναντι του θυρεοειδούς δεν οδηγεί υποχρεωτικά σε θυρεοειδίτιδα. Το συμπέρασμα αυτό οδήγησε στη διερεύνηση και άλλων πιθανών παραγόντων που ενέχονται στην παθογένεια αυτοάνοσης νόσου σ' αυτόν τον αδένα. Σημαντικός μπορεί να είναι ο ρόλος παραγόντων που μεταβάλλουν την ευαισθησία των θυρεοειδικών θυλακιωδών κυττάρων στις ανοσολογικές αντιδράσεις.

Όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω, θυρεοειδικά θυλάκια από δείγματα ιστών με ΗΤ εμφάνισαν έντονη χρώση για Fas και FasL και υψηλό ποσοστό απόπτωσης (30,3%), σε αντίθεση με τα δείγματα από τους μάρτυρες που εμφάνισαν μέτρια χρώση για Fas, ελάχιστη ή καθόλου χρώση για FasL και χαμηλό ποσοστό απόπτωσης. Η ανοσοϊστοχημική χρώση για Bcl-2 ήταν έντονη στα φυσιολογικά και ασθενής στα θυρεοειδικά θυλάκια ασθενών με ΗΤ. Τα διηθητικά λεμφοκύτταρα έδωσαν ασθενή χρώση για την FasL και ισχυρή για την Bcl-2 πρωτεΐνη (εικόνα 27). Φαίνεται, λοιπόν, από αυτά τα αποτελέσματα ότι τα θυρεοειδικά κύτταρα στη ΗΤ υφίστανται απόπτωση με αυξορρύθμιση των πρωτεϊνών Fas και FasL και μειορρύθμιση της Bcl-2 πρωτεΐνης. Τα λεμφοκύτταρα δε φαίνονται να συμμετέχουν άμεσα σ' αυτή τη διαδικασία με το δικό τους μόριο FasL, αλλά παρέχουν το κατάλληλο περιβάλλον κυτταροκινών, που οδηγεί σε αυξορρύθμιση των μορίων Fas και FasL και στην απόπτωση (Mitsiades και συν. 1998).

Οι Stassi και συν. (1999) προσπάθησαν να διερευνήσουν το ρόλο των διηθητικών Τ-λεμφοκυττάρων (ITL) στη ΗΤ. Διαπίστωσαν, ότι σε αντίθεση με τα θυρεοειδικά κύτταρα, που εκφράζουν μεγάλες ποσότητες FasL, τα ITL δεν εκφράζουν αξιοσημείωτες ποσότητες. Όσα, όμως, από τα ITL βρέθηκαν κοντά σε θυρεοειδικά θυλάκια με έκφραση FasL, αυτά ήταν αποπτωτικά. Σύμφωνα, λοιπόν, με αυτά τα δεδομένα, τα ITL δε φαίνονται να σχετίζονται άμεσα με το θάνατο των θυρεοειδικών κυττάρων κατά τη ΗΤ. Αντίθετα, η αυτοκρινική-παρακρινική αλληλεπίδραση Fas-FasL είναι πιθανότατα σημαντικός μηχανισμός στην αυτοάνοση θυρεοειδική καταστροφή.



1.5 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση του ρόλου της αποπτωτικής οδού Fas-Fas Ligand και της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2 στη μη τοξική βρογχοκήλη (NTG) και στη θυρεοειδίτιδα Hashimoto (HT). Η παθογένεια και των δύο αυτών θυρεοειδικών παθήσεων έχει συσχετιστεί πρόσφατα με το φαινόμενο της απόπτωσης. Οι περισσότεροι ασθενείς με οξώδη θυρεοειδική νόσο (αυτοάνοσης ή μη αιτιολογίας) υποβάλλονται, για διαγνωστικούς σκοπούς, σε παρακέντηση δια λεπτής βελόνης (FNA) του θυρεοειδούς αδένα. Η εξέταση αυτή προκαλεί ελάχιστη δυσανεξία στον ασθενή, ενώ, ταυτόχρονα με τη διαγνωστική αξία του, το υλικό FNA μπορεί να χρησιμεύσει και για τη μελέτη του ρόλου της απόπτωσης *in vitro* στις παραπάνω θυρεοειδικές παθήσεις.

Για την επίτευξη του παραπάνω στόχου:

- 1) Θα μελετηθεί με ανοσοκυταροχημική τεχνική η έκφραση των πρωτεϊνών Fas και Bcl-2 στα θυρεοειδικά κύτταρα, σε υλικό FNA από ασθενείς με NTG και ασθενείς με HT,
- 2) Θα υπολογιστούν με τη μέθοδο ELISA τα επίπεδα των διαλυτών μορφών των πρωτεϊνών Fas και FasL στον ορό ασθενών και των δύο ομάδων (NTG και HT) και φυσιολογικών ατόμων, τα οποία θα αποτελέσουν την ομάδα ελέγχου, και
- 3) Θα ανιχνευθεί με την τεχνική RT-PCR, η έκφραση των Fas mRNA και FasL mRNA σε υλικό FNA από ασθενείς και των δύο ομάδων, ενώ ως ομάδα ελέγχου θα χρησιμοποιηθούν δείγματα περιφερικού αίματος.

Οι προϋπάρχουσες τεχνικές μελέτης της απόπτωσης στο θυρεοειδή αδένα (όπως η τεχνική TUNEL, η κυταρομετρία ροής, η χρήση της αννεξίνης V, η ανοσοϊστοχημεία και η RT-PCR) έχουν δείξει διαφορές στην έκφραση των παραπάνω πρωτεϊνών σε ασθενείς με θυρεοειδικές παθήσεις σε σχέση με φυσιολογικά άτομα, καθώς και μεταξύ τους ανάλογα με το είδος της πάθησης. Οι τεχνικές, αυτές, όμως έχουν πραγματοποιηθεί σε θυρεοειδικό ιστό που ελήφθη από ασθενείς που υποβλήθηκαν σε χειρουργική επέμβαση θυρεοειδούς. Το γεγονός αυτό δεν μας επιτρέπει να γνωρίζουμε τον τρόπο ρύθμισης του

αποπτωτικού θανάτου in vivo και στην πλειοψηφία των ασθενών με θυρεοειδικές παθήσεις, που αντιμετωπίζονται συντηρητικά.

Η κατανόηση των αποπτωτικών μηχανισμών στο θυρεοειδή αδένα είναι πιθανόν να έχει στο μέλλον διαγνωστική, αλλά και θεραπευτική αξία. Παράγοντες που επάγουν την απόπτωση θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την εξάλειψη κυττάρων σε περιοχές με ανεπαρκή κυτταρικό θάνατο, όπως για παράδειγμα στην οξώδη βρογχοκήλη. Αντίστροφα, παράγοντες που δρουν ως αναστολείς της απόπτωσης είναι πιθανόν να μας προσφέρουν αξιόλογες θεραπευτικές δυνατότητες σε καταστάσεις με εκτεταμένη απόπτωση, όπως στη θυρεοειδίτιδα Hashimoto.

Μέρος δεύτερο

Πειραματικό



ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ

2.1 Έκφραση πρωτεϊνών Fas και Bcl-2 σε θυρεοειδικά κύτταρα

2.1.1 Ασθενείς

Στη μελέτη συμπεριλήφθηκαν συνολικά 25 ασθενείς (2 άνδρες και 23 γυναίκες), οι οποίοι ταξινομήθηκαν σε δύο ομάδες με βάση τα ευρήματα που θα αναφερθούν στη συνέχεια (παράγραφος 2.1.2). Αναλυτικά εξετάστηκαν:

- 1) 20 ασθενείς με μη τοξική μονοοζώδη ή πολυοζώδη βρογχοκήλη (NTG) ηλικίας 19-74 ετών.
- 2) 3 ασθενείς με βρογχοκήλη θυρεοειδίτιδας Hashimoto (HT) στην ενεργό φάση της νόσου, ηλικίας 43-60 ετών, και
- 3) 2 ασθενείς με βρογχοκήλη θυρεοειδίτιδας Hashimoto (HT) στη χρόνια φάση της νόσου, ηλικίας 48 και 72 ετών αντίστοιχα.

Δημιουργήθηκε ξεχωριστό αρχείο για κάθε ασθενή και καταγράφηκαν όλα τα σχετικά κλινικά, εργαστηριακά και κυτταρολογικά στοιχεία. Κανένας από τους ασθενείς δεν υποβλήθηκε στο παρελθόν σε χειρουργική επέμβαση θυρεοειδούς αδένα ή ραδιενεργό κώδιο.

2.1.2 Μέθοδοι

α. Υπερηχογράφημα θυρεοειδούς αδένα

Τα υπερηχογραφήματα του θυρεοειδούς αδένα των ασθενών έγιναν από τους ακτινολόγους του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων τους οποίους και ευχαριστώ.

Οι μετρήσεις του αδένα γίνονται στα σημεία που ο κάθε λοβός εμφανίζει το μέγιστο μέγεθός του κατά τις τρεις διαστάσεις:

- κεφαλουραία (μήκος)
- προσθιοπίσθια (βάθος)
- εγκάρσια (εύρος)

Οι δύο πρώτες εκτιμώνται σε οβελιαία τομή του λοβού, ενώ η τρίτη μετράται σε εγκάρσια τομή.

Το μέγεθος του κάθε λοβού σε ενήλικο άτομο είναι:

- 5-8 cm στην κεφαλουραία διάμετρο
- 1-2 cm στην οπισθοπρόσθια διάμετρο
- 2-4 cm στην εγκάρσια διάμετρο

Οι μετρήσεις κυμαίνονται ανάλογα με την ηλικία, το ύψος, το βάρος, το φύλο και τη γενική κατασκευή του ατόμου. Ο μέσος όγκος του κάθε λοβού του θυρεοειδούς κυμαίνεται από 12-40 cm³.

Η πιο αξιόπιστη από όλες τις διαστάσεις του αδένος φαίνεται να είναι η προσθιοπίσθια (βάθος) και η οποία δεν πρέπει να ξεπερνά τα 2 cm (Αβραμίδης, Ενδοκρινολογία, τόμος Α, κεφ.6).

Η διαδικασία της εξέτασης είναι η εξής:

- Ο ασθενής εξετάζεται σε ύπτια θέση με την κεφαλή σε υπερέκταση ή σε καθεστηκυία θέση όταν η κεφαλή των υπερήχων έχει μικρό μέγεθος. Για το σκοπό αυτό τοποθετείται μαξιλάρι κάτωθεν των ώμων του, ώστε να γίνει υπερέκταση της αυχενικής περιοχής. Η υπερέκταση γίνεται για την καλύτερη ανάδειξη του κάτω πόλου των 2 λοβών.
- Ο αδένας εξετάζεται προσεκτικά τόσο σε εγκάρσιες, όσο και επιμήκεις τομές.
- Ο κάθε λοβός εξετάζεται χωριστά ξεκινώντας συνήθως με εγκάρσιες τομές από τον άνω πόλο και συνεχίζοντας προς το μέσο τμήμα του λοβού και τον κάτω πόλο του. Μπορεί να ζητηθεί από τον ασθενή να κάνει καταποτικές κινήσεις, ώστε με την άνοδο του αδένος να απεικονιστεί ο κάτω πόλος καλύτερα. Στις επιμήκεις τομές εξετάζονται προσεκτικά το έξω, το μέσο και το έσω τμήμα του κάθε λοβού.
- Στη συνέχεια εξετάζεται ο ισθμός του θυρεοειδούς, τόσο σε εγκάρσιες, όσο και σε επιμήκεις τομές. Φυσιολογικά το πάχος του δεν ξεπερνά το 1 cm.
- Τέλος, θα πρέπει να εξετάζεται προσεκτικά η περιοχή της καρωτίδας και της σφαγίτιδας για πιθανή ανεύρεση διογκωμένων τραχηλικών λεμφαδένων.

Το φυσιολογικό παρέγχυμα του θυρεοειδούς αδένος εμφανίζεται ομοιογενές με σχετικά αυξημένη ηχογένεια (στικτές συμμετρικές πυκνές ηχοανακλαστικές επιφάνειες). Η ηχογένειά του σε σχέση με τους μύς που τον περιβάλλουν είναι μεγαλύτερη, ενώ αυτοί απεικονίζονται υποηχοϊκότεροι. Εμφανώς μικρότερη είναι



η ηχογένειά του και από την ηχογένεια του λήπους και της προτραχειακής περιτονίας που τον περιβάλλουν.

Ως όζος θεωρείται μία βλάβη που έχει διαστάσεις άνω των 6-8 mm. Όταν ανευρεθεί ένας ή περισσότεροι όζοι, θα πρέπει προσεκτικά να ερευνηθούν:

- η εσωτερική υφή (συμπαγής, κυστική ή μικτή μορφή)
- οι διαστάσεις του
- η ηχογένειά του
- τα όριά του
- η παρουσία περιφερικής άλω, το πάχος της και η συμμετρικότητά της
- η εμφάνιση και η μορφή των αποτιτανώσεων του
- σημεία πιθανής διήθησης των παρακείμενων ανατομικών μορφών

Στη μη τοξική βρογχοκλήλη, η ηχογένεια των όζων είναι ίδια με το φυσιολογικό παρέγχυμα, ενώ το 25% είναι υπερηχοϊκοί και σπάνια μικτής ηχογένειας ή υποηχοϊκοί. Μπορεί αν εμφανίζουν περιφερική άλω και σαφή όρια ή τα όριά τους να είναι ασαφή. Οι αποτιτανώσεις είναι στικτές, διάσπαρτες ή σαν το κέλυφος του αυγού. Το 25% των όζων εμφανίζει κεντρική νεκρωτική εκφυλιστική διεργασία που μπορεί να φαίνεται σαν κύστη, ενώ οι αληθινές κύστες είναι σπανιότατες. Έτσι οι κύστες του θυρεοειδούς παριστάνουν αναγεννητικούς όζους, δεν έχουν αληθινό επιθήλιο και περιέχουν αιμορραγικό, σοκολατοειδές ή ξανθοχρωματικό υγρό.

Τα αδενώματα του θυρεοειδούς, είναι συχνά καλοήγη νεοπλασμάτα με σαφή κάψα περιφερικά, εμφανίζονται ως μονήρεις όζοι και διακρίνονται σε θυλακιώδη και μη θυλακιώδη. Τα θυλακιώδη έχουν ίδια ηχογραφικά χαρακτηριστικά με τους όζους της οξώδους βρογχοκλήλης. Τα μη θυλακιώδη είναι μονήρεις υποηχοϊκοί όζοι με ομαλά όρια, δεν εμφανίζουν αποτιτανώσεις και δεν θέτουν υποψία για κακοήθεια (Αβραμίδης, Ενδοκρινολογία, τόμος Α, κεφ.6).

Στη θυρεοειδίτιδα Hashimoto υπερηχοτομογραφικά παρατηρούνται:

- διάχυτη διόγκωση του θυρεοειδούς αδένος στο υπερτροφικό στάδιο της νόσου
- ηχοδομή αδρή ομοιογενή ή ανομοιογενή σε ένα παρέγχυμα που ολόκληρο απεικονίζεται παθολογικό υποηχοϊκό και λοβώδες
- συχνά ευδιάκριτοι ή μόλις διακρινόμενοι όζοι μέσα στο παθολογικό υποηχοϊκό παρέγχυμα
- ελάττωση του όγκου του αδένος με την πρόοδο της νόσου

- επιμήκεις υπερηχογενείς γραμμώσεις διαφόρου μήκους στους 2 λοβούς μεταξύ των υποηχοϊκών περιοχών, που πιθανόν οφείλονται στην κατά τόπους θυρεοειδική ίνωση

β. Δοκιμασίες θυρεοειδικής λειτουργίας

Η μέτρηση των επιπέδων FT4, FT3 και TSH και των αντισωμάτων anti-TPO στον ορό, που απαιτούνται για την κλινική διάγνωση της θυρεοειδικής νόσου (παράγραφος 1.3.3 α και β), πραγματοποιήθηκε στο Βιοχημικό Εργαστήριο του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων, υπό την επίβλεψη της Δρ. Χρυσούλας Καλογερά, την οποία και ευχαριστώ.

Ελήφθησαν 5 ml αίματος από κάθε ασθενή μετά από ολονύχτια νηστεία. Έγινε φυγοκέντρηση των δειγμάτων στη φυγόκεντρο *Labofuge GL, Heraeus* σε 1800 rpm (στροφές το λεπτό) για 20 λεπτά και μεταφορά κάθε δείγματος ορού σε μικροφυγοκεντρικό σωλήνα χωρητικότητας 2 ml (eppendorf).

Τα επίπεδα των ορμονών FT4, FT3 και TSH στους ορούς των ασθενών προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο της χημιοφωταύγειας (chemiluminescent microparticle immunoassay, CMIA) με τη χρήση των πακέτων υλικών ARCHITECT free T4, free T3 και TSH Reagent kits (ABBOTT Laboratories, Illinois, USA, Cat No 6C50, 6c51, 6C52). Ως φυσιολογικές τιμές έχουν καθοριστεί: για την ορμόνη FT4 τιμές από 0,7 έως 1,85 ng/dl, για την FT3 από 0,72 έως 1,43 ng/ml και για την TSH από 0,35 έως 4,94 μIU/ml.

Τα επίπεδα των αντισωμάτων anti-TPO προσδιορίστηκαν με ανοσομετρική μέθοδο (IMMULITE 2000 anti-TPO Ab assay, EURO/Diagnostic Products Corporation, Gwynedd, UK, Cat No L2KTO2), στην οποία χρησιμοποιείται ανθρώπινη TPO υψηλής καθαρότητας. Ως φυσιολογικά επίπεδα αντισωμάτων anti-TPO στον ορό έχουν οριστεί επίπεδα χαμηλότερα από 35 IU/ml.

γ. Παρακέντηση θυρεοειδούς αδένος με αναρρόφηση δια λεπτής βελόνης (FNA)

Η παρακέντηση με αναρρόφηση δια λεπτής βελόνης (FNA) ενός θυρεοειδικού οζιδίου έχει αποδειχθεί η καλύτερη μέθοδος για τη



διαφοροδιάγνωση της καλοήθους από την κακοήγη θυρεοειδική νόσο, παρά την ύπαρξη σημαντικών μεθόδων διερεύνησης, όπως ο σπινθηρογραφικός έλεγχος και η υπερηχοτομογραφία (παράγραφος 1.3.3ε).

Η διαδικασία παρακέντησης FNA των θυρεοειδικών οζιδίων, όπως πραγματοποιείται στο Ενδοκρινολογικό εξωτερικό ιατρείο του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων από τον Καθηγητή κ. Αγαθοκλή Τσατσούλη, είναι η ακόλουθη:

- Ο ασθενής τοποθετείται σε ύπτια θέση με έκταση του αυχένα, υποβοηθούμενος με χαμηλό μαξιλάρι, ώστε οι μύες του αυχένα να είναι χαλαροί.
- Η ψηλάφηση του αδένος γίνεται στην ανατομική αύλακα που σχηματίζεται μεταξύ τραχείας και στερνοκλειδομαστοειδούς. Ο ασθενής καταπίνει, για να προκληθεί η κίνηση του θυρεοειδούς με τα άλλα ανατομικά στοιχεία του λαιμού και ψηλαφάται με ένα ή δύο δάκτυλα, κατά προτίμηση με τον ιατρό να στέκεται στην αντίθετη πλευρά του λοβού που πρέπει να παρακεντηθεί.
- Το δέρμα άνω του οζιδίου καθαρίζεται με αθυλική αλκοόλη.
- Ο αδένος ή όζος ακινητοποιείται πάνω στην τραχεία.
- Μία βελόνη 23- ή 25-G (gauge) και σχετικά μικρού μήκους (1,5-3 εκ.) προσαρμοσμένη σε σύριγγα των 10 ml μίας χρήσεως ή πιστόλι βιοψίας (Cameco Ltd, London, UK) εισέρχεται εντός του οζιδίου και εφαρμόζεται αρνητική πίεση μέχρι 10 ml, ενώ βέβαια το σημείο εισόδου παραμένει σταθερό. (εικόνα 28).
- Πριν αφαιρεθεί η βελόνη με τη σύριγγα από τον όζο, αφήνεται το έμβολο για να καταργηθεί η αρνητική πίεση.

Μετά την απόσυρση αποσυνδέεται η βελόνη από τη σύριγγα. Η σύριγγα γεμίζει με αέρα, επανασυνδέεται με τη βελόνη και γίνεται έγχυση του υλικού βιοψίας που περιέχεται στη βελόνη επάνω σε τέσσερις αντικειμενοφόρους πλάκες, εάν είναι αρκετό το υλικό. Από τις πλάκες αυτές, οι δύο χρησιμοποιούνται για κυτταρολογική εξέταση και διάγνωση της θυρεοειδικής διαταραχής και οι άλλες δύο για την ανοσοκυτταροχημική μελέτη που περιγράφεται παρακάτω. Οι αντικειμενοφόροι πλάκες που πρόκειται να βαφτούν με χρώση Παπανικολάου εμβαπτίζονται αμέσως σε αλκοόλη 95%, ενώ αυτές που θα βαφτούν με MGG, καθώς και αυτές που θα χρησιμοποιηθούν για την ανοσοκυτταροχημική μελέτη, αφήνονται να ξηρανθούν στον αέρα.

- Εάν το υλικό στη σύριγγα είναι αρκετό (συνήθως σε αιμορραγική εκφύλιση όζου), εκπλένεται πολλές φορές με τη βελόνα σε μικρή ποσότητα οινόπνεύματος 50%, που μπορεί να φυγοκεντρηθεί, είτε για κυτταρολογική επίστρωση, είτε για να εγκλειστεί σε παραφίνη για ιστολογική εξέταση.
- Αν ο όζος είναι κυστικός, γίνεται απόπειρα να αναρροφηθεί όλο το υγρό και μετά ψηλαφάται πιθανή συμπαγής περιοχή και γίνεται προσπάθεια λήψεως υλικού από τα τοιχώματα της κύστεως. Το υγρό μέσα σε αλκοόλη αποστέλλεται προς φυγοκέντρωση, για κυτταρολογική επίστρωση, είτε για να εγκλειστεί σε παραφίνη για ιστολογική εξέταση.
- Για να θεωρηθεί επαρκές για διάγνωση το υλικό που λαμβάνεται θα πρέπει να περιλαμβάνει 5-6 ομάδες καλά διατηρημένων και καλά ορατών θυλακιωδών κυττάρων και κάθε ομάδα να περιέχει 10 ή περισσότερα κύτταρα (Bakhos και συν. 2000) (εικόνα 29B).
- Στην οζώδη βρογχοκήλη λόγω της ποικιλομορφίας που παρουσιάζουν ιστολογικά οι όζοι, πρέπει να λαμβάνεται υλικό από περισσότερους όζους και να γίνονται περισσότερες λήψεις, οπότε τα επιχρίσματα παρουσιάζουν ανομοιογενή κυτταρικό πληθυσμό.

δ. Κυτταρολογική εξέταση

Η κυτταρολογική εξέταση ρουτίνας των δειγμάτων FNA πραγματοποιήθηκε από τους κυτταρολόγους του Παθολογοανατομικού Εργαστηρίου στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων, τους οποίους και ευχαριστώ.

Στη βιοψία FNA (παράγραφος 1.3.3 ε) εξετάζονται μικρά ιστικά τμήματα (μικροβιοψίες) και κύτταρα από τον ιστό, τα οποία λαμβάνονται με λεπτή βελόνη και:

- είτε μονιμοποιούνται σε αλκοόλη 95% και χρωματίζονται με αιματοξυλίνη-ηωσίνη ή με τη μέθοδο Παπανικολάου,
- είτε αφήνονται στον αέρα για να ξεραθούν και χρωματίζονται με May-Grünwald-Giemsa (MGG).

Στην εξέταση καταγράφεται το σχήμα, το μέγεθος των κυττάρων, το μέγεθος του πυρήνα συγκριτικά με ένα σταθερό μέγεθος, συνήθως το μέγεθος του λεμφοκυττάρου, η σχέση πυρήνα-κυτταροπλάσματος, η υφή και η κατανομή





Εικόνα 28

Παρακέντηση θυρεοειδούς αδένος δια λεπτής βελόνης (FNA)

Ο ασθενής τοποθετείται σε ύπτια θέση με έκταση του αυχένα, υποβοηθούμενος με χαμηλό μαξιλάρι, ώστε οι μύες του αυχένα να είναι χαλαροί. Η ψηλάφηση του αυχένα γίνεται στην ανατομική αύλακα που σχηματίζεται μεταξύ τραχείας και στερνοκλειδομastoειδούς. Ο αδένος ή όζος ακινητοποιείται πάνω στην τραχεία. Ο ιατρός στέκεται στην αντίθετη πλευρά του λοβού που πρέπει να παρακεντηθεί. Μια βελόνη προσαρμοσμένη σε πιστόλι βιοψίας εισέρχεται εντός του οζιδίου και εφαρμόζεται αρνητική πίεση, ενώ βέβαια το σημείο εισόδου παραμένει σταθερό.

της χρωματίνης, οι χρωστικές ιδιότητες αυτής, η υπερχρωμασία, τα πυρήνια, η πυρηνική μεμβράνη, οι πτυχές, τα έγκλειστα και οι μιτώσεις. Επίσης καταγράφεται η σύσταση του κυτταροπλάσματος, οι χρωστικές ιδιότητές του, η περιεκτικότητά του σε κοκκία διαφόρων χρωστικών, καθώς και η σαφήνεια ή ασάφεια της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Τα παραπάνω χαρακτηριστικά είναι βασικά για τη διάγνωση της καλοήθειας ή κακοήθειας του υλικού από τον όζο του θυρεοειδούς αδένος και ειδικότερα της παθολογικής αλλοίωσης. Μεγάλη σημασία έχει η αρχιτεκτονική των μικροβιοψιών, όπου τα κύτταρα διατάσσονται σε ταπήτια (σε ένα επίπεδο), αδενικούς σχηματισμούς, θηλές, θυλάκια, παράλληλα σε δέσμες κλπ. Πολύ υποβοηθητικό, επίσης, στη διάγνωση της αλλοίωσης είναι το υπόστρωμα της βλάβης που αποσπάται με την αναρρόφηση, όπως είναι το κολλοειδές, τα φλεγμονώδη κύτταρα και τα συνδετικογενή στοιχεία (Δεληγιώργη-Πολίτη, 2000) (εικόνες 29,30).

Στην παρούσα μελέτη, τα επιχρίσματα FNA επεξεργάστηκαν είτε με ξήρανση στον αέρα και χρώση με May-Grünwald-Giemsa (MGG), είτε με άμεση μονιμοποίηση σε 95% αιθανόλη και χρώση με τη μέθοδο Παπανικολάου.

Τα υλικά που ελήφθησαν με την παρακέντηση FNA ταξινομήθηκαν σύμφωνα με τα σχετικά ποσά κολλοειδούς και κυτταρικότητας, καθώς και τα επικρατούντα κυτταρικά στοιχεία, ενώ καταγράφηκε και η παρουσία μακροφάγων και λεμφοκυττάρων.

ε. Ανοσοκυτταροχημεία

Για να μελετηθεί η έκφραση της αποπτωτικής πρωτεΐνης Fas (παράγραφος 1.4.2 α) και της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2 (παράγραφος 1.4.2 δ) στα θυρεοειδικά κύτταρα των ασθενών επιλέξαμε τη μέθοδο της ανοσοκυτταροχημείας.

Η τεχνική της ανοσοκυτταροχημείας πλακιδίου προσφέρεται για την απεικόνιση της κυτταρικής κατανομής ενός μορίου με τη χρήση σημασμένων αντισωμάτων. Συνήθως χρησιμοποιείται η έμμεση τεχνική, όπου το αντίσωμα κατά του υπό διερεύνηση μορίου δεν είναι σημασμένο και η ανίχνευσή του γίνεται με ένα δεύτερο, σημασμένο αντίσωμα. Η έμμεση τεχνική είναι πιο ευαίσθητη



εξαιτίας της ενίσχυσης του σήματος που παρέχει η χρήση περισσότερων του ενός αντισωμάτων.

Η παρούσα ανοσοκυταροχημική μελέτη πραγματοποιήθηκε στο Χωρέμειο Ερευνητικό Εργαστήριο του Νοσοκομείου Παίδων «Αγία Σοφία» στην Αθήνα, στο τμήμα που διευθύνει η Καθηγήτρια Παιδιατρικής κ. Τζωρτζάτου-Σταθοπούλου και υπό την επίβλεψη του Δρ. Γεώργιου Τσάγκαρη, τους οποίους και ευχαριστώ ιδιαίτερα.

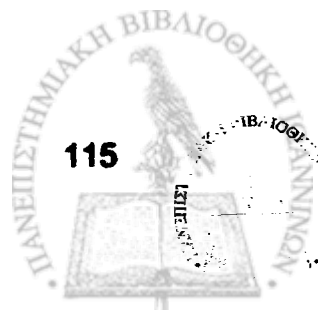
Χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της βιοτίνης-στρεπταβιδίνης-αλκαλικής φωσφατάσης με τη χρήση του πακέτου υλικών Sandon Kwik kit (Universal Streptavidin/Biotin Immunoalkaline Phosphatase Detection System, IMMUNON) στην συσκευή ανοσοϊστοχημείας τύπου Sequenza 2 (Sandon Inc., Pittsburgh, PA, USA).

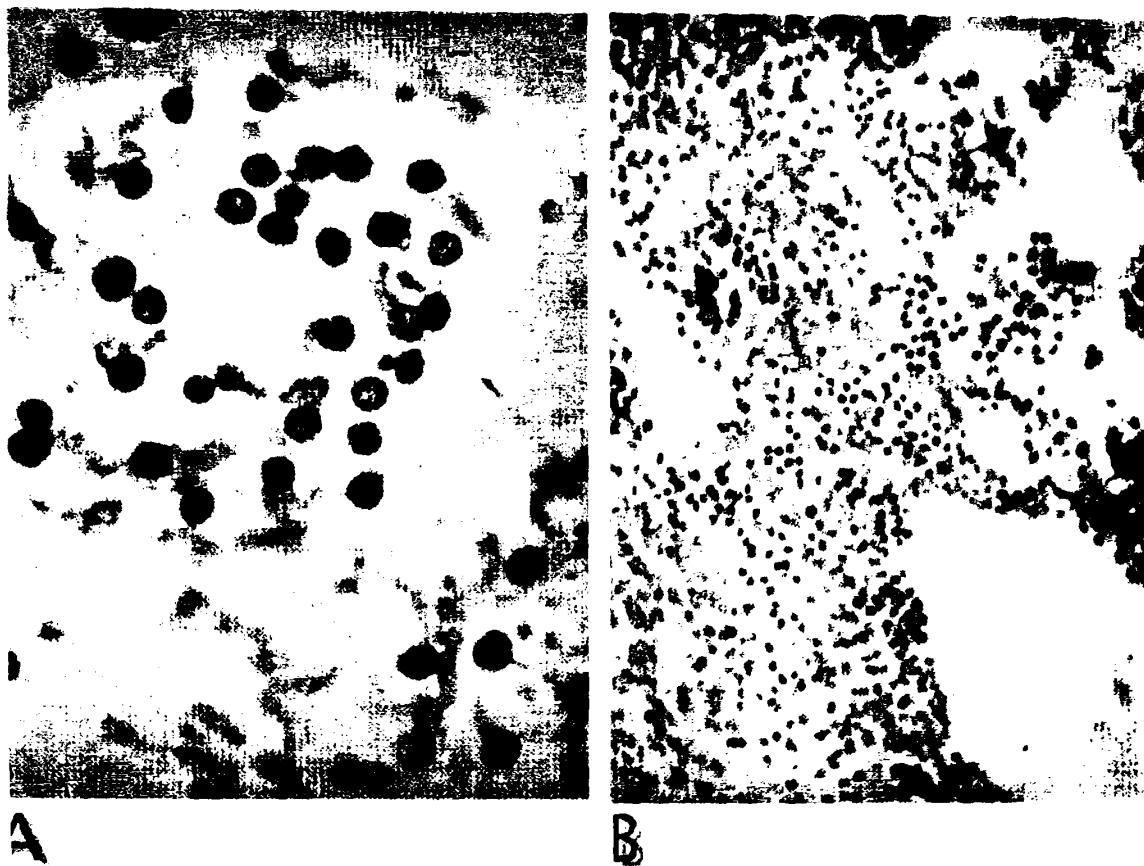
Τα πρωτογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

- 1) για την ανίχνευση του αντιγόνου Fas ο κλώνος C-20 (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA, Cat No sc-715-G) και
- 2) για την ανίχνευση του αντιγόνου Bcl-2 ο κλώνος 100/D5 (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA, Cat No sc-509).

Προετοιμασία

- Το υλικό της παρακέντησης FNA του θυρεοειδούς επιστρώνεται στις αντικειμενοφόρους πλάκες, οι οποίες παραμένουν για ξήρανση στον αέρα.
- Κάθε πλάκα περιτυλίσσεται χωριστά σε αλουμινόχαρτο και διατηρούνται όλες στους -80°C μέχρι να γίνει η επεξεργασία τους.
- Σε κάθε πλάκα χαράσσεται ο αντίστοιχος κωδικός αριθμός με υαλογράφο, για να παραμείνει αναλλοίωτος κατά τη διαδικασία.
- 24 ώρες πριν την εφαρμογή της ανοσοκυταροχημικής τεχνικής οι πλάκες αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου να στεγνώσουν κατά τη διάρκεια της νύχτας (overnight).
- Πριν από την επεξεργασία των δειγμάτων, έγινε έλεγχος των αντισωμάτων σε διαφορετικά θετικά δείγματα ελέγχου από μυελό ασθενών με ογκολογικές παθήσεις, στους οποίους έχει διαπιστωθεί έκφραση των αντίστοιχων γονιδίων (Fas ή Bcl-2) με άλλες τεχνικές (π.χ PCR). Στα αρνητικά δείγματα ελέγχου





Εικόνα 29

FNA βιοψία ασθενών με οζώδη βρογχοκήλη

λ. Παρατηρείται μέτρια κυτταροβρίθεια, ομοιόμορφα θυλακικά κύτταρα διατασσόμενα σε θυλάκιο και ερυθρά αιμοσφαίρια στο υπόστρωμα (χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης, μεγέθυνση x 250).

ι. Κολλοειδής οζώδης βρογχοκήλη. Παρατηρείται μέτρια κυτταροβρίθεια, ομοιόμορφα θυλακικά κύτταρα διατασσόμενα σε θυλάκια, υπόστρωμα από ροδίζον κολλοειδές και ερυθρά αιμοσφαίρια (χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης, μεγέθυνση x 100).

(Άτλας και Εγχειρίδιο παθήσεων του θυρεοειδούς με FNA βιοψία, Δεληγιώργη-Πολίτη 2000)



Εικόνα 30

FNA βιοψία ασθενούς με θυρεοειδίδα Hashimoto

Διακρίνεται ομάδα στύπων οξύφιων κυττάρων με ανισομεγέθεις μεγάλους υπερχρωματικούς πυρήνες και όφθονο ηωσινόφιλο κυτταρόπλασμα. Στο υπόστρωμα παρατηρούνται πολλά ώριμα λεμφοκύτταρα και ερυθρά (χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης, μεγέθυνση x 400) (Ατλας και Εγχειρίδιο παθήσεων του θυρεοειδούς με FNA βιοψία, Δεληγιώργη-Πολίτη 2000)

παραλήφθηκε η προσθήκη του πρωτογενούς αντισώματος. Ο έλεγχος των αντιδραστηρίων έγινε με τη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι των κ αλύσεων της ανοσοσφαιρίνης.

Πρωτόκολλο εκτέλεσης

1. Το μονιμοποιητικό διάλυμα *ZAMBONI'S Fixative* (Ylem, Rome, Italy) αφήνεται για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (Room Temperature, RT).
2. Στη συνέχεια, οι αντικειμενοφόροι πλάκες εμβυθίζονται στο μονιμοποιητικό διάλυμα για 10 λεπτά και εκπλένονται δύο φορές σε διάλυμα *Tris-Buffered saline* (pH 7.6) (διάρκεια κάθε πλύσης 10 λεπτά).
3. Σε κάθε πλάκα προστίθεται 1 σταγόνα *Tris-Buffered saline* και στη συνέχεια αυτή τοποθετείται κατάλληλα στις κυψελίδες του οργάνου, με ιδιαίτερη προσοχή να μη στεγνώσει.
4. Ακολουθεί προσθήκη 100 μl *Protein Blocking Agent* σε κάθε αντικειμενοφόρο πλάκα και επώασή της για 10 λεπτά σε RT.
5. Στη συνέχεια σε κάθε πλάκα προστίθενται 100μl *μονοκλωνικό αντίσωμα* στην κατάλληλη αραιώση και ο χρόνος επώασης καθορίζεται από το είδος του αντισώματος. Στη συγκεκριμένη περίπτωση οι πλάκες επωάζονται με τα αντισώματα Fas ή Bcl-2 για μία ώρα σε RT. Επειδή το αντίσωμα δεν παρέχεται αραιωμένο, πριν από τη χρήση του αραιώνεται 1:10 σε *Tris-Buffered saline*.
6. Στη συνέχεια οι πλάκες εκπλένονται με *Tris-Buffered saline* για 5 λεπτά.
7. Ακολουθεί προσθήκη σε κάθε πλάκα 100μl του βιοτινυλιωμένου δευτέρου αντισώματος (*Biotinylated Secondary Antibody*) και επώαση για 7-10 λεπτά σε RT.
8. Οι πλάκες εκπλένονται με *Tris-Buffered saline* για 5 λεπτά.
9. Στη συνέχεια σε κάθε πλάκα προστίθενται 100μl διαλύματος στρεπταβιδίνης-βιοτίνης-αλκαλικής φωσφατάσης (*Kwik Streptavidin Alkaline Phosphatase Reagent*) και οι πλάκες επωάζονται για 7 λεπτά.
10. Ακολουθεί νέα έκπλυση των πλακών με *Tris-Buffer* για 5 λεπτά.
11. Στη συνέχεια παρασκευάζεται η χρωστική *Fast Red* λίγα λεπτά πριν από τη χρήση της ως ακολούθως:
Σε 4 ml dH₂O προστίθενται 4 σταγόνες *Tris-Buffer concentrate* και 1 ταμπλέτα *fast red*. Από το μίγμα αυτό προστίθενται σε κάθε πλακάκι 4 σταγόνες και ακολουθεί επώαση των πλακών με το παραπάνω διάλυμα για 20 λεπτά.



12. Αφού γίνει νέα έκπλυση των πλακών με Tris-Buffered saline για 5 λεπτά, σε κάθε πλάκα προστίθενται 2 σταγόνες χρωστικής αιματοξυλίνης και ακολουθεί επώαση για 1 λεπτό.

13.Γίνεται εκ νέου έκπλυση με Tris-Buffered saline για 5 λεπτά.

14.Ακολουθεί τοποθέτηση των αντικειμενοφόρων πλακών εκτός των κυψελίδων του οργάνου και σε όρθια θέση για να στεγνώσουν.

15.Κάθε πλάκα καλύπτεται με μονιμοποιητικό υλικό (*glycerol gelatin*) και καλυπτρίδες (*microscopic glass cover slips, STEPS, Germany*).

στ. Εκτίμηση της ανοσοαντιδραστικότητας

Η ανοσοαντιδραστικότητα για τις πρωτεΐνες Fas και Bcl-2 εκτιμήθηκε από δύο παρατηρητές, το Δρ Γεώργιο Τσάγκαρη του Χωρέμειου Ερευνητικού Εργαστηρίου και την κυτταρολόγο Μαρία Μπάφα του Παθολογοανατομικού εργαστηρίου του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων.

Η παρατήρηση και φωτογράφιση των αντικειμενοφόρων πλακών έγινε σε μικροσκόπιο Nikon (*Microflex HFX-DX System with photomicrographic attachment, Nikon Corp., Japan*). Τα θετικά κύτταρα εμφανίζουν ερυθρό χρώμα, το οποίο είναι ορατό στην κυτταρική μεμβράνη, όταν το κύτταρο εκφράζει την πρωτεΐνη Fas (παράγραφος 1.2.5 α) και στο κυτταρόπλασμα όταν εκφράζει την πρωτεΐνη Bcl-2 (παράγραφος 1.2.8).

Ελέγχθησαν τουλάχιστον 5 πεδία (μεγέθυνση x 200) από κάθε αντικειμενοφόρο πλάκα, τα οποία επιλέχθησαν έτσι ώστε, κάθε ένα να περιλαμβάνει 5-6 ομάδες καλά ορατών θυλακωδών κυττάρων, και κάθε ομάδα να περιέχει 10 ή περισσότερα κύτταρα.

Δημιουργήθηκε ένα πρωτόκολλο έκφρασης των πρωτεϊνών Fas και Bcl-2, με βάση το ποσοστό των θετικών κυττάρων στο σύνολο των μετρηθέντων κυττάρων κάθε πεδίου. Έτσι, ο βαθμός έκφρασης 1 περιλαμβάνει δείγματα στα οποία εμφανίζεται θετική χρώση σε λιγότερα από 20% των κυττάρων κατά οπτικό πεδίο (κ.ο.π). Ο βαθμός 2 περιλαμβάνει δείγματα με 20-50% θετικά κύτταρα κ.ο.π και ο βαθμός 3 δείγματα με θετική χρώση σε περισσότερα από 50% των κυττάρων κ.ο.π. Με τον τρόπο αυτό κατηγοριοποιήθηκε η έκφραση κάθε πρωτεΐνης σε 3 επίπεδα (βαθμοί 1,2 και 3).



2.1.3 Αποτελέσματα

Πριν την εφαρμογή της ανοσοκυτταροχημικής τεχνικής, έγινε ταξινόμηση των ασθενών σε δύο κύριες ομάδες: την ομάδα της μη τοξικής βρογχοκήλης (παράγραφος 1.3.4 α) και την ομάδα της θυρεοειδίτιδας Hashimoto (παράγραφος 1.3.4 β). Η ταξινόμηση αυτή βασίστηκε στην κλινική εξέταση, το υπερηχογράφημα του θυρεοειδούς (παράγραφος 2.1.2 α), στις δοκιμασίες θυρεοειδικής λειτουργίας (FT3, FT4, TSH, anti-TPO) (παράγραφος 2.1.2 β) και στην κυτταρολογική εξέταση των δειγμάτων FNA (παράγραφος 2.1.2 δ). Τα ευρήματα αυτών των εξετάσεων περιγράφονται αναλυτικά στη συνέχεια.

α. Υπερηχογραφικά ευρήματα

Η μέθοδος εξέτασης του θυρεοειδούς αδένα με υπερήχους περιγράφεται αναλυτικά στην παράγραφο 2.1.2 α.

Τα υπερηχογραφικά ευρήματα του θυρεοειδούς συνηγορούσαν για:

- 1) οζώδη βρογχοκήλη σε 20 ασθενείς (1 άνδρα και 19 γυναίκες) ηλικίας 19-74 ετών, και
- 2) θυρεοειδίτιδα Hashimoto σε 5 ασθενείς (1 άνδρα και 4 γυναίκες) ηλικίας 43-72 ετών.

Στα υπερηχογραφήματα των ασθενών με οζώδη βρογχοκήλη διαπιστώθηκαν ένα ή περισσότερα από τα παρακάτω ευρήματα:

- ένας (μονήρης) ή πολλοί όζοι
- αιμορραγία
- ίνωση
- αποτιτανώσεις

Σε 6 ασθενείς της ίδιας ομάδας (ηλικίας 20-72 ετών) διαπιστώθηκε κεντρική νεκρωτική εκφυλιστική διεργασία στον κυρίαρχο όζο, με τη μορφή κύστης, που σε 3 από αυτούς περιείχε αιμορραγικό υγρό (εικόνα 31), σε 2 σκολατοειδές και σε 1 ασθενή ξανθοχρωματικό υγρό.

Στους 5 ασθενείς με *θυρεοειδίτιδα Hashimoto* διαπιστώθηκαν υπερηχοτομογραφικά τα εξής:

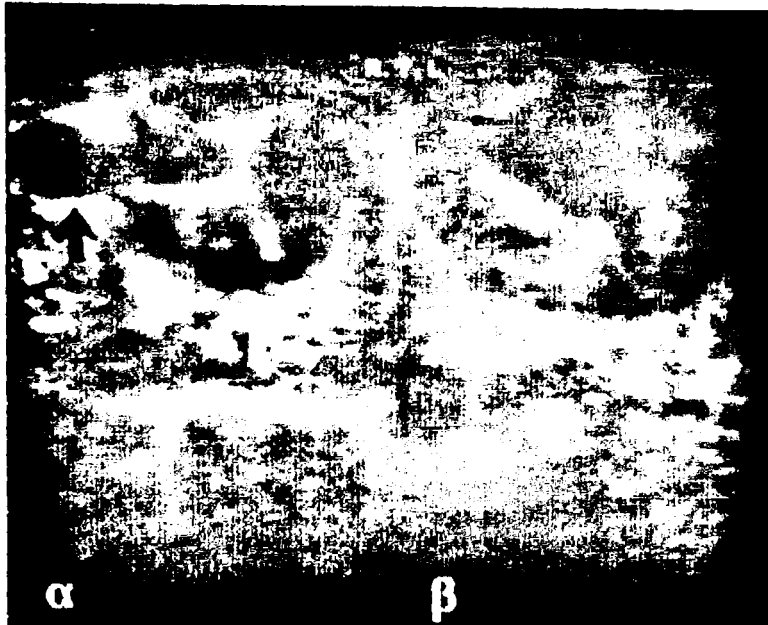
- διάχυτη διόγκωση του θυρεοειδούς αδένα
- ηχοδομή αδρή ομοιογενής ή ανομοιογενής, σε ένα παρέγχυμα που ολόκληρο απεικονίζεται παθολογικό υποηχοϊκό και λοβώδες
- ευδιάκριτοι ή μόλις διακρινόμενοι όζοι μέσα στο παθολογικό υποηχοϊκό παρέγχυμα (εικόνα 32)
- επιμήκεις υπερηχογενείς γραμμώσεις διαφόρου μήκους στους 2 λοβούς μεταξύ των υποηχοϊκών περιοχών, που πιθανόν οφείλονται στην κατά τόπους θυρεοειδική ίνωση.

β. Δοκιμασίες θυρεοειδικής λειτουργίας

Η μέτρηση των επιπέδων των ορμονών FT4, FT3 και TSH και των αντισωμάτων έναντι της θυρεοειδικής υπεροξειδάσης (anti-TPO) στον ορό του αίματος των 25 ασθενών έγινε όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.1.2 β. Στην ίδια παράγραφο αναφέρονται και οι φυσιολογικές τιμές αυτών των ορμονών και των αντισωμάτων.

Με βάση τα αποτελέσματα των παραπάνω μετρήσεων, οι ασθενείς ταξινομήθηκαν σε τρεις ομάδες, που περιγράφονται στην παράγραφο 2.1.1. Ο υποκλινικός υποθυρεοειδισμός (ενεργός φάση της νόσου) καθορίστηκε από ήπια αύξηση των επιπέδων TSH στον ορό (5-10 $\mu\text{IU/ml}$) παρουσία φυσιολογικών επιπέδων FT4 και FT3, ενώ ο κλινικός υποθυρεοειδισμός καθορίστηκε από την παρουσία χαμηλών επιπέδων FT4 και FT3 και υψηλών επιπέδων TSH ($>20 \mu\text{IU/ml}$). Οι ασθενείς που κατατάχθηκαν στη τρίτη ομάδα του κλινικού υποθυρεοειδισμού (χρόνια φάση της νόσου), ήταν ευθυρεοειδικοί υπό αγωγή με θυροξίνη κατά τη στιγμή της παρούσας μελέτης.

Συγκεκριμένα, τα επίπεδα των ορμονών FT4 και TSH και των αντισωμάτων anti-TPO ήταν εντός των φυσιολογικών ορίων στους 20 ασθενείς με NTG (όπως αυτά καθορίζονται στην παράγραφο 2.1.2) και στους 2 ασθενείς στη χρόνια φάση της HT (Πίνακας 11). Αντίθετα, οι ασθενείς με HT στην ενεργό φάση είχαν υψηλά επίπεδα ορμόνης TSH ($7,98 \pm 5,45 \mu\text{IU/ml}$, mean $\pm$ SD) και θετικά anti-TPO αντισώματα ($703,66 \pm 463,94 \text{ IU/ml}$) (Πίνακας 12).



Εικόνα 31

Υπερηχογράφημα θυρεοειδούς αδένος ασθενούς με οξώδη βρογχοκήλη

- α. *Εγκάρσια τομή δεξιού λοβού:* διακρίνονται 2 όζοι, ο ένας μικρός, υποηχοϊκός (μαύρο βέλος), ο δεύτερος μεγαλύτερος, με εκφυλιστική αιμορραγική διαδικασία και διαφράγματα (λευκό βέλος).
- β. *Επιμήκης τομή:* ο όζος με αιμορραγική εκφύλιση



Εικόνα 32

Υπερηχογράφημα θυρεοειδούς αδένος ασθενούς με θυρεοειδίδα Hashimoto

Επιμήκης τομή αριστερού λοβού: παθολογικό, σχετικά υποηχοϊκό παρέγχυμα, μόλις διακρινόμενοι μικροί όζοι και επιμήκεις υπερηχογενείς γραμμώσεις που παριστάνουν τη θυρεοειδική ίνωση και λεμφοκυτταρική διήθηση.

γ. Κυτταρολογικά ευρήματα

Τα δείγματα ελήφθησαν με παρακέντηση του θυρεοειδούς αδένος και αναρρόφηση δια λεπτής βελόνης (FNA) από ασθενείς με οζώδη βρογχοκήλη. Σε κάθε ασθενή, παρακεντήθηκε ο κυρίαρχος ή μονήρης ψηλαφητός όζος (συνήθως > 2 cm σε διάμετρο), ενώ στην περίπτωση της κυστικής εκφύλισης, αναρροφήθηκε αρχικά το υγρό και στη συνέχεια ελήφθησαν κυτταρικά στοιχεία από το συμπαγές τμήμα του όζου (αναλυτική περιγραφή της μεθόδου στην παράγραφο 2.1.2 δ).

Με βάση τα κυτταρολογικά ευρήματα έγινε κατάταξη των ασθενών με μη τοξική βρογχοκήλη (NTG) σε τρεις ομάδες:

- 1) 9 ασθενείς (1 άνδρα και 8 γυναίκες) με κολλοειδή οζώδη βρογχοκήλη ηλικίας 25-74 ετών,
- 2) 6 ασθενείς (γυναίκες) με κυστική εκφύλιση όζου θυρεοειδούς ηλικίας 20-72 ετών,
- 3) 5 ασθενείς (γυναίκες) με αδενωματώδη όζο ηλικίας 19-45 ετών.

Η κυτταρολογική εξέταση επιβεβαίωσε και τη διάγνωση της θυρεοειδίτιδας Hashimoto σε 5 ασθενείς (1 άνδρα και 4 γυναίκες) ηλικίας 43-72 ετών.

Αναλυτικά, τα κύρια κυτταρολογικά ευρήματα στους 20 ασθενείς με οζώδη βρογχοκήλη ήταν:

- μικρή κυτταροβρίθεια
- θυλακικά κύτταρα μικρά σε μέγεθος, ελεύθερα ή σε μικρούς σωρούς ή ταπήτια, με ομοιόμορφους στρογγυλούς πυρήνες, στο μέγεθος του λεμφοκυττάρου ή και ανομοιογενή με μεγάλους πυρήνες (σε λήψη υλικού από περισσότερους όζους)
- υπόστρωμα με άφθονο κολλοειδές, ερυθροκύτταρα, σιδηροφάγα ιστιοκύτταρα και γιγαντοκύτταρα τύπου ξένου σώματος, λόγω των εκφυλιστικών αλλοιώσεων και της αιμορραγίας (εικόνα 33)

Τα ευρήματα σε υλικό από περιοχές υπερπλασίας ήταν τα εξής:

- μεγαλύτερη κυτταροβρίθεια
- λίγο ή καθόλου κολλοειδές
- συνωστισμό των κυττάρων, τα οποία είχαν μεγαλύτερους πυρήνες με πυρήνα και ανισοκαρύωση (εικόνα 34).



Πίνακας 11

Η έκφραση των πρωτεϊνών Fas and Bcl-2 (βαθμοί 1-3) σε ασθενείς με NTG σε σχέση με τα κυτταρολογικά ευρήματα και τις δοκιμασίες θυρεοειδικής λειτουργίας

Κωδικός	Φύλο (Α/Θ)	Ηλικία (χρόνια)	TSH (μIU/ml)	Anti-TPO (IU/ml)	Πρωτεΐνη Fas (βαθμός)	Πρωτεΐνη Bcl-2 (βαθμός)	Κυτταρολογικά ευρήματα
1	Θ	60	0,8	8	-	1	Κολλοειδής όζος
2	Θ	45	0,6	22,6	1	1	•
3	Θ	45	0,66	26,5	1	1	•
4	Α	53	0,61	33,3	1	1	•
5	Θ	25	0,35	6	1	1	•
6	Θ	45	0,76	34	1	1	•
7	Θ	74	1,26	30,9	1	-	•
8	Θ	32	0,3	13,2	1	1	•
9	Θ	49	0,19	28	1	1	•
10	Θ	50	1,47	15,1	2	1	Κυστική εκφύλιση
11	Θ	20	0,96	24,3	2	1	•
12	Θ	70	1,24	20,7	1	1	•
13	Θ	72	0,65	18,3	2	1	•
14	Θ	65	1,35	14,8	1	1	•
15	Θ	45	0,58	27	2	1	•
16	Θ	45	0,86	82,7	1	3	Αδενωματώδης όζος
17	Θ	19	0,44	9	1	2	•
18	Θ	40	1,13	5,5	1	3	•
19	Θ	25	0,4	11,9	1	3	•
20	Θ	39	0,4	7,4	1	2	•



Εικόνα 33

FNA βιοψία ασθενούς με κολλοειδή οζώδη βρογχοκήλη

Παρατηρείται υπερπλασία με υπέρμετρη άθροιση κολλοειδούς, ταπήτιο θυλακικών κυττάρων και ελεύθεροι, μικροί, γυμνοί ατροφικοί πυρήνες (χρώση MGG, μεγέθυνση x 200).



Εικόνα 34

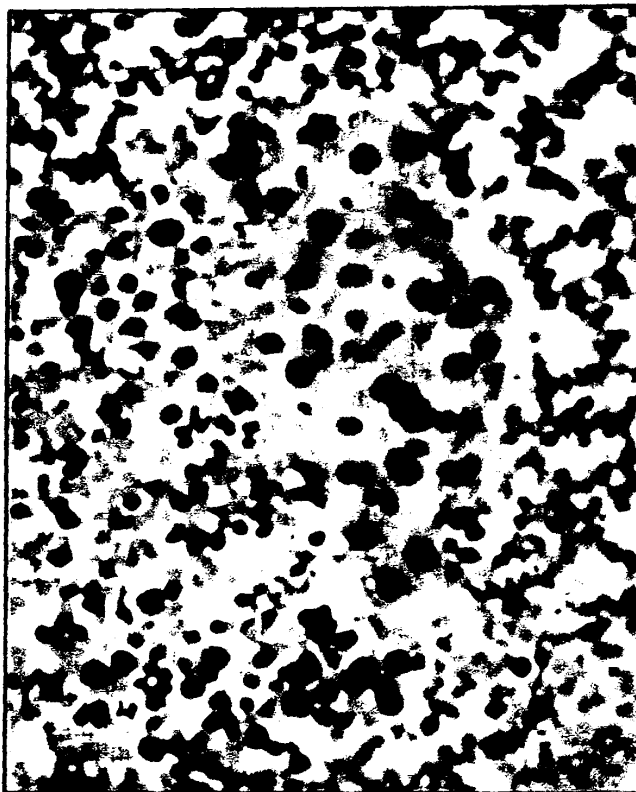
FNA βιοψία ασθενούς με υπερπλασία κυτταρικού τύπου

Διακρίνονται ανώμαλες σθροίσεις καλά διατηρημένων θυλακικών κυττάρων με αρκετό κυτταρόπλασμα, ενώ στο υπόστρωμα υπάρχει μόνο αίμα (χρώση MGG, μεγέθυνση x 250).

Πίνακας 12:

Η έκφραση των πρωτεϊνών Fas και Bcl-2 (βαθμοί 1-3) σε ασθενείς με HT σε σχέση με τις δοκιμασίες θυρεοειδικής λειτουργίας

Αριθμός	Φύλο (Α/Θ)	TSH (μIU/ml)	Anti-TPO (IU/ml)	Ηλικία (έτη)	Πρωτεΐνη Fas (βαθμός)	Πρωτεΐνη Bcl-2 (βαθμός)
1	Θ	2,5	942	49	3	1
2	Θ	8,06	1000	60	3	1
3	Θ	13,4	169	43	3	1
4	Θ	0,65	18,3	72	2	1
5	A	0,6	22,6	48	2	1



Εικόνα 35

FNA βιοψία ασθενούς με θυρεοειδίδα Hashimoto

Παρατηρούνται θυλακικά κύτταρα με οξύφιλη μεταβολή (κύτταρα Hürthle) και άφθονα λεμφοκύτταρα (χρώση MGG, μεγέθυνση x 200).

Στις περιπτώσεις αυτές η εικόνα μοιάζει με θυλακιώδες νεόπλασμα, από το οποίο είναι πολλές φορές δύσκολη η διαφορική διάγνωση.

Τα επιχρίσματα FNA στις 5 περιπτώσεις *θυρεοειδίτιδας Hashimoto* παρουσίαζαν:

- επιθηλιακά θυλακιώδη κύτταρα
- μικρά και μεγάλα λεμφοκύτταρα
- άτυπα μεταπλαστικά κύτταρα με χαρακτηριστικές ογκοκυττάρων (κύτταρα Hürthle) σε ταπήτια, σωρούς ή θυλάκια
- πλασματοκύτταρα και εκφυλισμένα κύτταρα
- απουσία κολλοειδούς (εικόνα 35)

δ. Έκφραση πρωτεϊνών Fas και Bcl-2

Στις αντικειμενοφόρους πλάκες με το υλικό FNA που ελήφθη από τους 25 ασθενείς, εφαρμόστηκε η ανοσοκυταροχημική τεχνική της βιοτίνης-στρεπταβιδίνης-αλκαλικής φωσφατάσης, με τη χρήση των αντισωμάτων anti-Fas (κλώνος C-20) και anti-Bcl-2 (κλώνος 100/D5). Δημιουργήθηκε ένα πρωτόκολλο έκφρασης των πρωτεϊνών Fas και Bcl-2 στα θυρεοειδικά κύτταρα, με την ταξινόμηση της έκφρασης κάθε πρωτεΐνης σε τρεις κατηγορίες (παράγραφος 2.1.2). Η έκφραση των παραπάνω πρωτεϊνών σε άλλα είδη κυττάρων (π.χ λεμφοκύτταρα), τα οποία διακρίνονται μορφολογικά από τα θυρεοειδικά θυλακιώδη κύτταρα δεν αξιολογήθηκε.

Α. Μη τοξική βρογχοκήλη (NTG)

Έκφραση πρωτεΐνης Fas. Διαπιστώθηκε μικρού βαθμού έκφραση της πρωτεΐνης Fas στα θυρεοειδικά θυλακιώδη κύτταρα των 20 ασθενών με NTG (Πίνακας 11, εικόνα 36). Συγκεκριμένα, σε 13 από τους 20 ασθενείς (ποσοστό 65%) (8 με κολλοειδείς και 5 με αδενωματώδεις όζους) ο δείκτης έκφρασης ήταν γενικά χαμηλός (βαθμός 1), γεγονός που σημαίνει ότι ποσοστό μικρότερο από 20% των κυττάρων κατά οπτικό πεδίο (κ.ο.π.) που ελέγχθηκε παρουσίασε θετική χρώση για την πρωτεΐνη Fas (εικόνες 37-39). Από τα 6 δείγματα όζων με κυστική εκφύλιση, τα 4 εμφάνισαν μέτρια επίπεδα έκφρασης της παραπάνω πρωτεΐνης (βαθμός 2), δηλαδή το 20-50% των κυττάρων κ.ο.π. παρουσίασε θετική χρώση. Η κυτταρολογική εξέταση των επιχρισμάτων από τους όζους αυτούς έδειξε, επίσης,



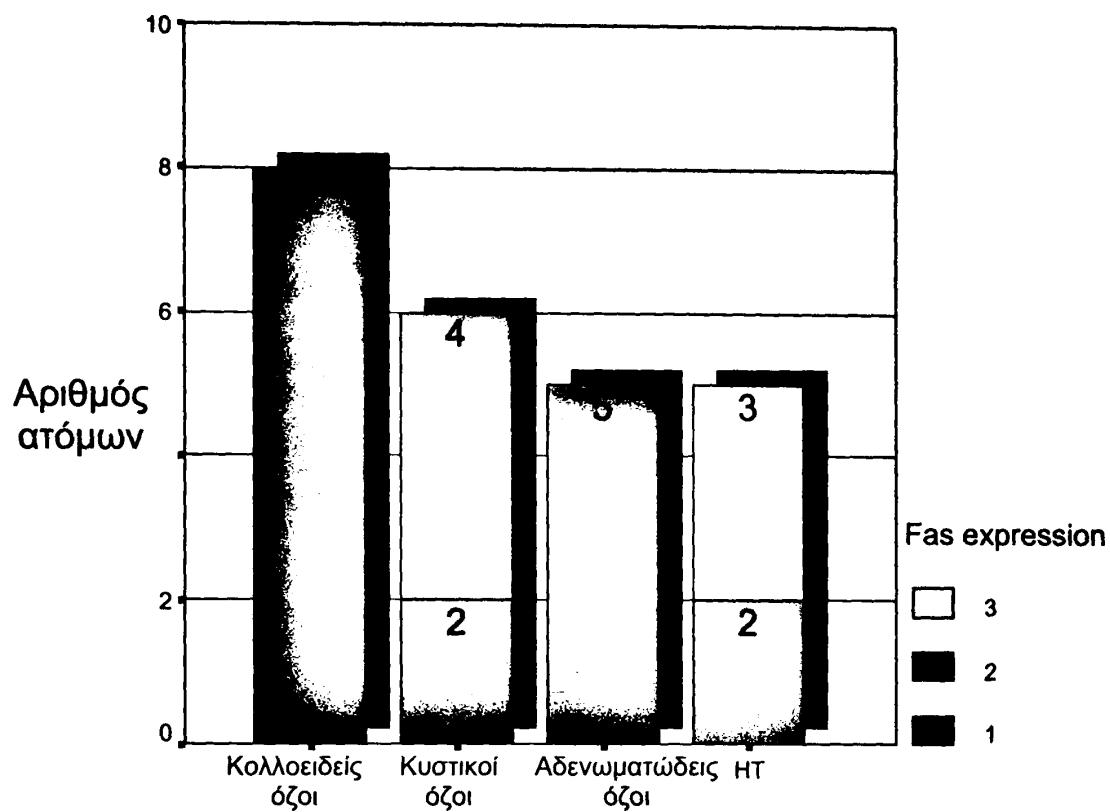
την παρουσία λεμφοκυττάρων. Σε ένα δείγμα από κολλοειδή όζο δεν έγινε αξιολόγηση της έκφρασης Fas, γιατί το υλικό θεωρήθηκε ανεπαρκές (αναλυτικά τα κριτήρια στην παράγραφο 2.1.2).

Έκφραση πρωτεΐνης Bcl-2. Η έκφραση της πρωτεΐνης Bcl-2 παρουσίασε διαφορές μεταξύ των διαφορετικών υποομάδων οξείων (Πίνακας 11, εικόνα 40), όπως αυτές καθορίστηκαν με βάση τα κυτταρολογικά ευρήματα (παράγραφος 2.1.3). Ειδικότερα, ο δείκτης έκφρασης της πρωτεΐνης Bcl-2 ήταν χαμηλός (βαθμός 1) στα 14 από τα δείγματα FNA, δηλαδή σε 8 κολλοειδείς όζους και 6 όζους με κυστική εκφύλιση (ποσοστό 70% των ασθενών με NTG). Αντίθετα, τα 5 δείγματα από μονήρεις αδενωματώδεις όζους παρουσίασαν υψηλό δείκτη έκφρασης της ίδιας πρωτεΐνης. Αναλυτικά, 2 δείγματα χαρακτηρίστηκαν με βαθμό 2, δηλαδή 20-50% των κυττάρων κ.ο.π. παρουσίασε θετική χρώση για την πρωτεΐνη Bcl-2 (εικόνα 41) και τρία δείγματα με βαθμό 3 (θετική χρώση σε >50% των κυττάρων κ.ο.π.) (εικόνα 42,43). Σε 1 από τα 9 δείγματα κολλοειδών όζων δεν έγινε αξιολόγηση της έκφρασης Bcl-2, γιατί το υλικό θεωρήθηκε ανεπαρκές (αναλυτικά τα κριτήρια στην παράγραφο 2.1.2).

B. Θυρεοειδίτιδα Hashimoto (HT)

Έκφραση πρωτεΐνης Fas. Τα δείγματα FNA των 5 ασθενών με HT παρουσίασαν υψηλό δείκτη έκφρασης της πρωτεΐνης Fas (Πίνακας 12, εικόνα 36). Συγκεκριμένα, δείγματα από τους 2 ασθενείς με χρόνια HT χαρακτηρίστηκαν με βαθμό 2, γεγονός που σημαίνει ότι το ποσοστό των κυττάρων κ.ο.π. που εμφανίζουν θετική χρώση για την πρωτεΐνη Fas είναι 20-50%, ενώ τα δείγματα των 3 ασθενών με ενεργό HT χαρακτηρίστηκαν με βαθμό 3, γεγονός που σημαίνει ότι το αντίστοιχο ποσοστό είναι μεγαλύτερο από 50% (εικόνες 44-46).

Έκφραση πρωτεΐνης Bcl-2. Ο δείκτης έκφρασης της πρωτεΐνης Bcl-2 ήταν χαμηλός στα θυρεοειδικά κύτταρα και των 5 ασθενών με HT (βαθμός 1) (Πίνακας 12, εικόνα 47).



Εικόνα 36

Βαθμός έκφρασης πρωτεΐνης Fas κατά ομάδα ασθενών

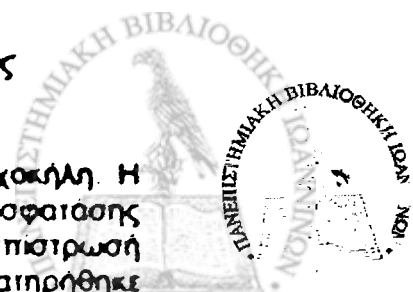
Κάθε ένας από τους τρεις βαθμούς έκφρασης της πρωτεΐνης Fas αντιπροσωπεύεται από διαφορετικό χρώμα. Κάθε μπάρα αντιπροσωπεύει το συνολικό αριθμό των ατόμων της αντίστοιχης ομάδας. Οι αριθμοί που αναγράφονται στο άνω τμήμα κάθε μπάρας αντιπροσωπεύουν τον αριθμό των ατόμων με τον αντίστοιχο βαθμό έκφρασης της πρωτεΐνης.

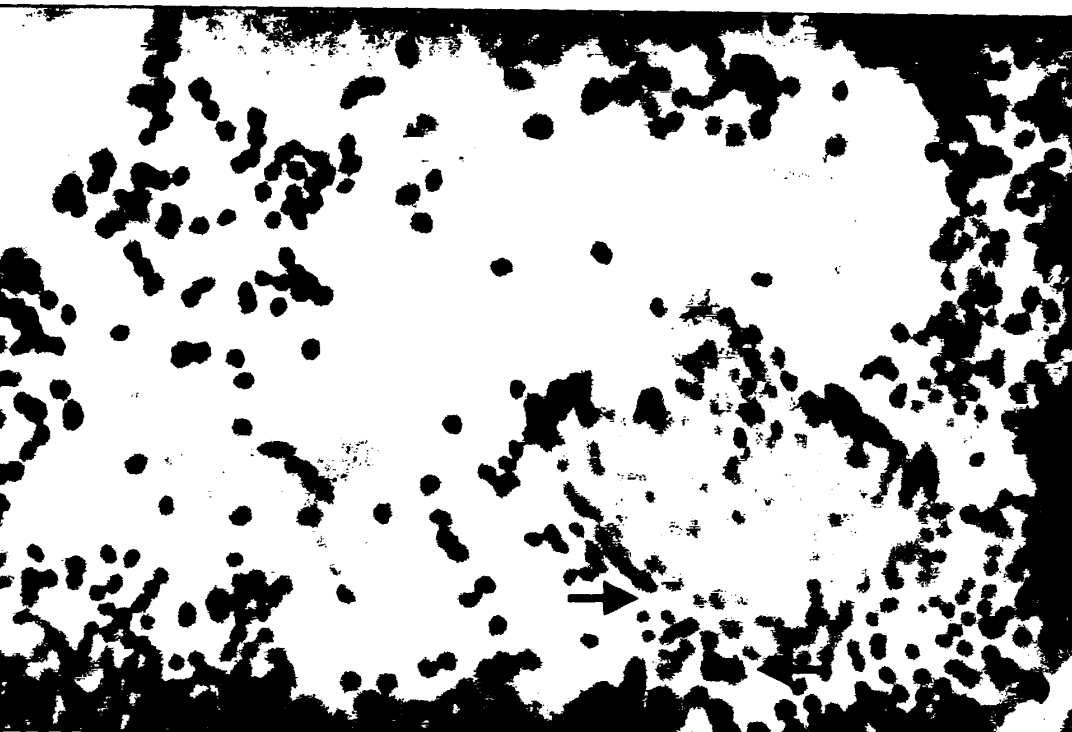


ΕΙΚΟΝΑ 37

Έκφραση πρωτεΐνης Fas (βαθμός 1) σε θυρεοειδικά κύτταρα κολλοειδούς
αξιδούς βρογχοκήλης

Κόνες αυτές προέρχονται από βιοψία FNA ασθενούς με κολλοειδή αξίδη βρογχοκήλη. Η
οκυτταροχημική χρώση έγινε με την τεχνική βιοτίνης-στρεπταβιδίνης-αλκαλικής φωσφατάσης
η χρήση μονοκλωνικού anti-Fas αντισώματος στα επιχρίσματα FNA μετά από επιστρώση
σε πιακίδια και ξήρανση στον αέρα (μεγέθυνση x 400). Στο δείγμα αυτό παρατηρήθηκε
η χρώση στην κυτταρική μεμβράνη (μαύρα βέλη) σε ποσοστό κυττάρων <20%.

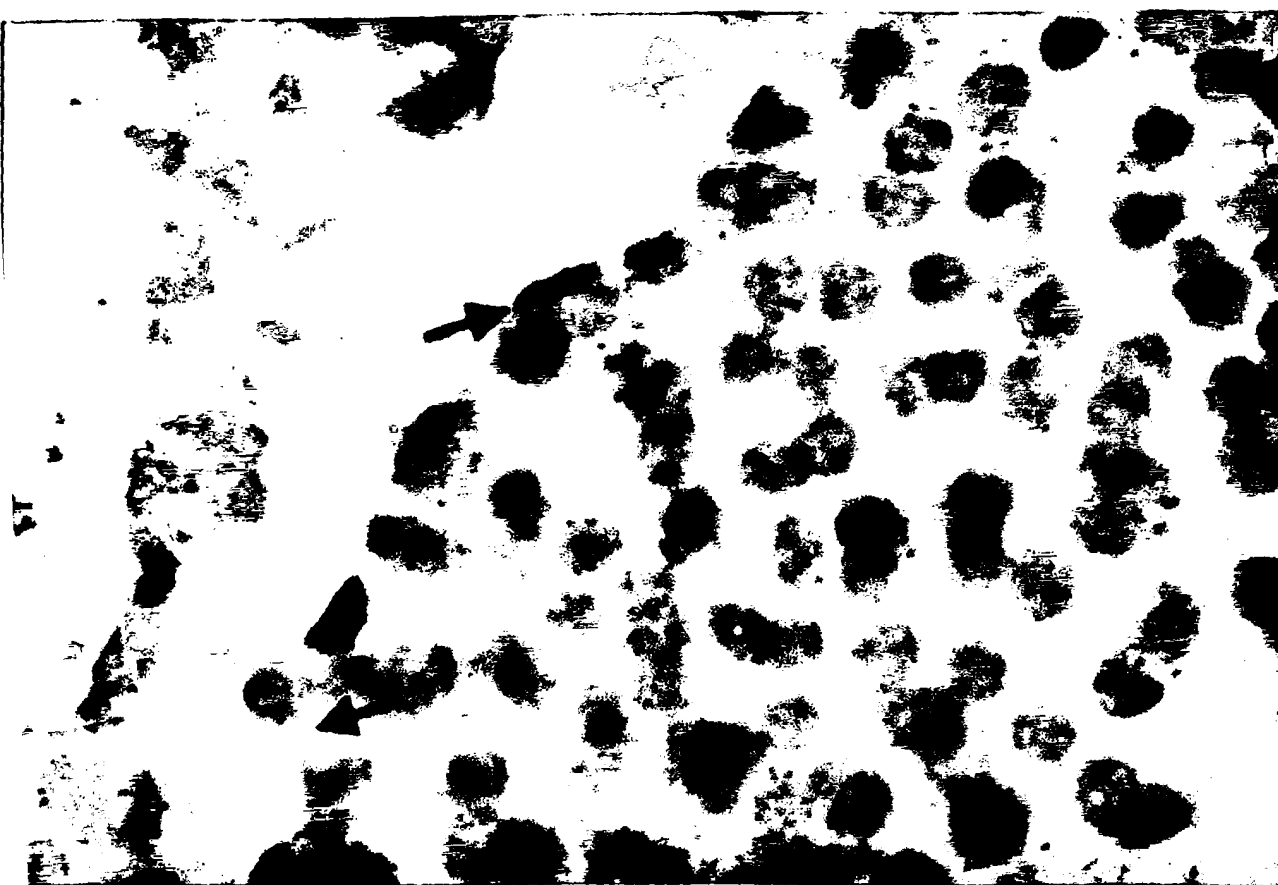
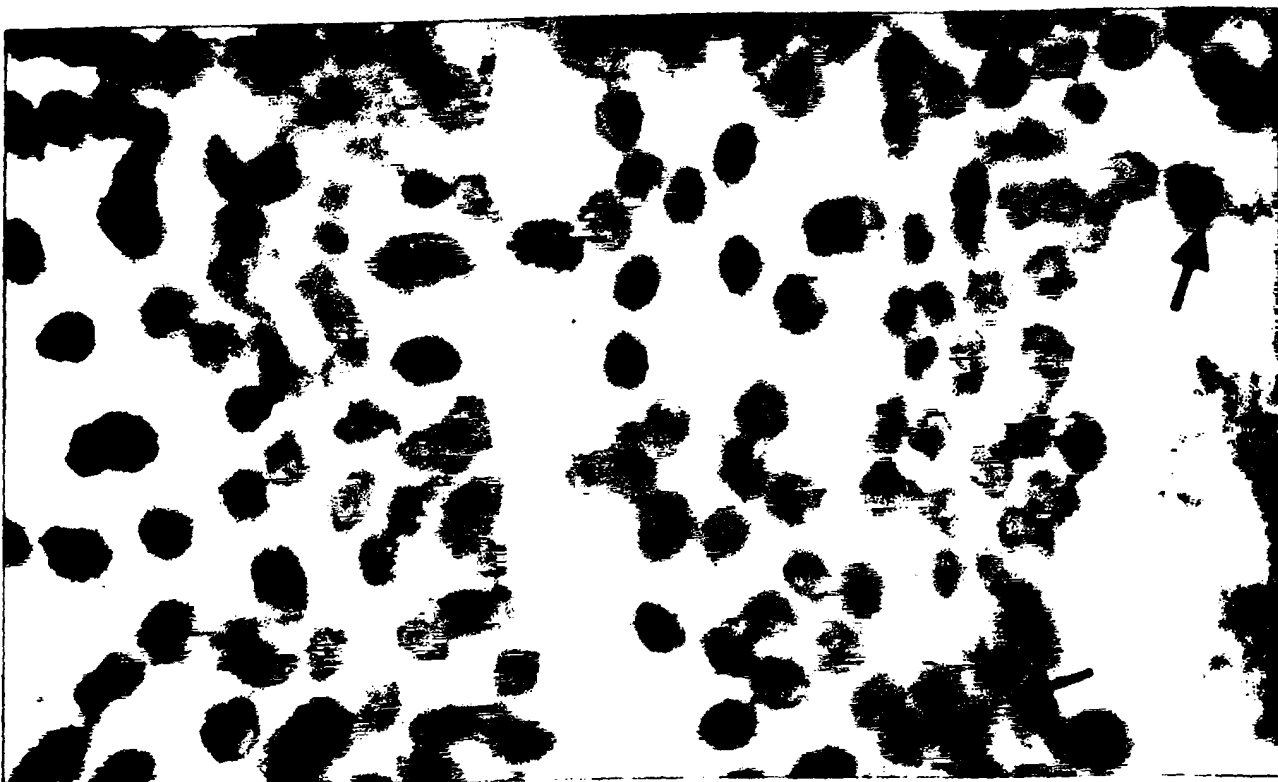




Εικόνα 38

*Έκφραση πρωτεΐνης Fas (βαθμός 1) σε θυρεοειδικά κύτταρα
αδενωματώδους βρογχοκήλης*

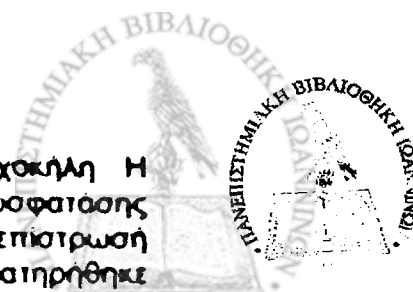
Η εικόνα αυτή προέρχεται από βιοψία FNA ασθενούς με αδενωματώδη βρογχοκήλη. Η ανοσοκυταροχημική χρώση έγινε με την τεχνική βιοτίνης-στρεπταβιδίνης-αλκαλικής φωσφατάσης με τη χρήση μονοκλωνικού anti-Fas αντισώματος στα επιχρίσματα FNA, μετά από επίστρωση σε πλακίδια και ξήρανση στον αέρα (Α: μεγέθυνση x200). Σε κάθε δείγμα παρατηρήθηκε ανοσοχρώση στην κυτταρική μεμβράνη (μαύρα βέλη) σε ποσοστό κυτάρων <20% κ.ο.π (βαθμός έκφρασης 1) (παράγραφοι 2.1.2 στ και 2.1.3 δ)

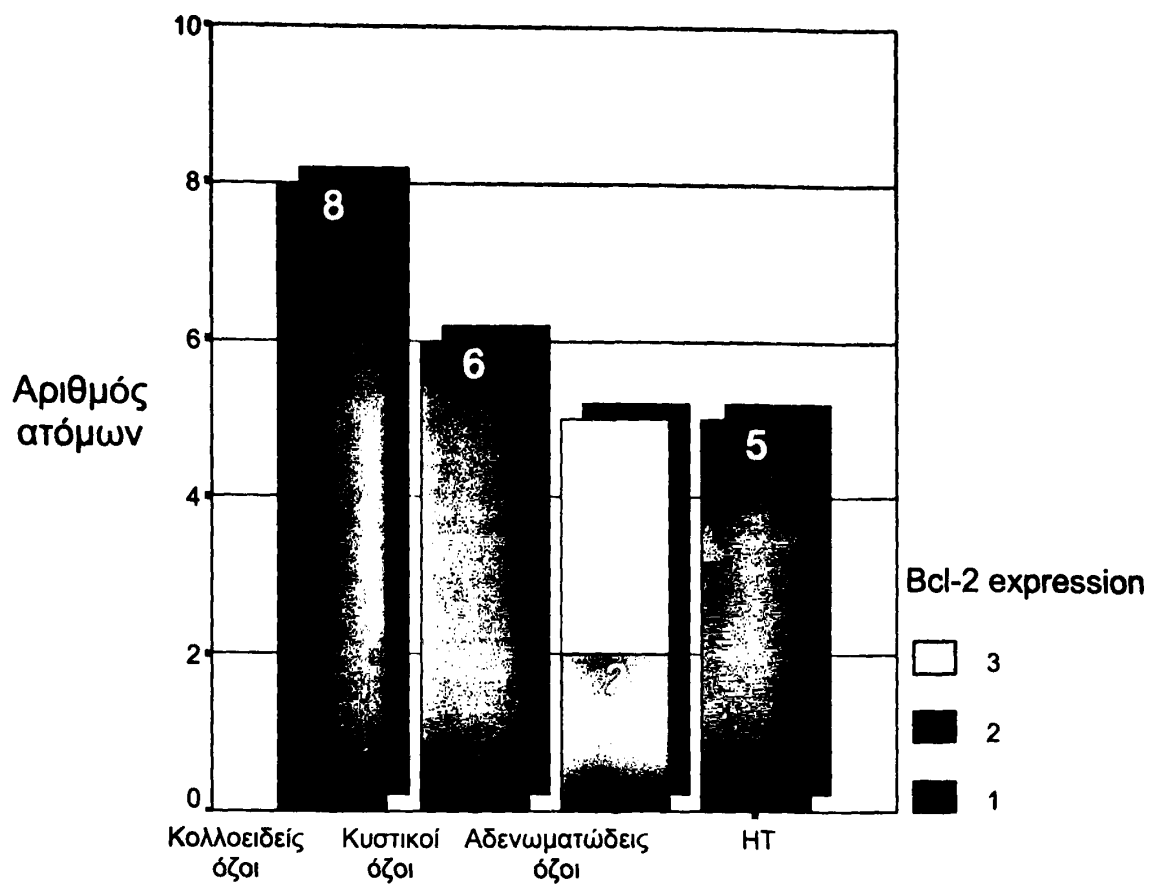


Εικόνα 39

Εκφραση πρωτεΐνης Fas (βαθμός 1) σε θυρεοειδικά κύτταρα
αδενωματώδους βρογχοκλήλης

Οι εικόνες αυτές προέρχονται από βιοψία FNA ασθενών με αδενωματώδη βρογχοκλήλη. Η οκυτταροχημική χρώση έγινε με την τεχνική βιοτίνης-στρεπταβιδίνης-αλκαλικής φωσφατάσης ή χρήση μονοκλωνικού anti-Fas αντισώματος στα επιχρίσματα FNA, μετά από επίστρωση σε πλακίδια και ξήρανση στον αέρα (Α μεγέθυνση x400). Σε κάθε δείγμα παρατηρήθηκε ή χρώση στην κυτταρική μεμβράνη (μαύρα βέλη) σε ποσοστό κυττάρων <20% κ.ο.π. (Αναμνηστικό 1) (πρωτόκολλο 212/99, π. 212/1).

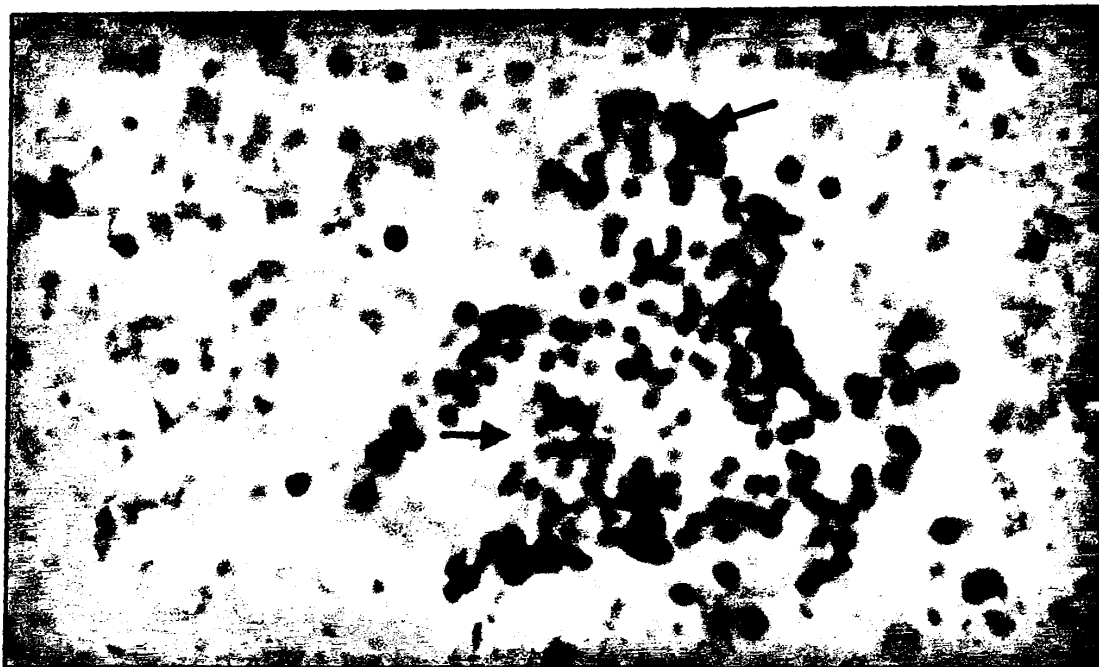




Εικόνα 40

Βαθμός έκφρασης πρωτεΐνης Bcl-2 κατά ομάδα ασθενών

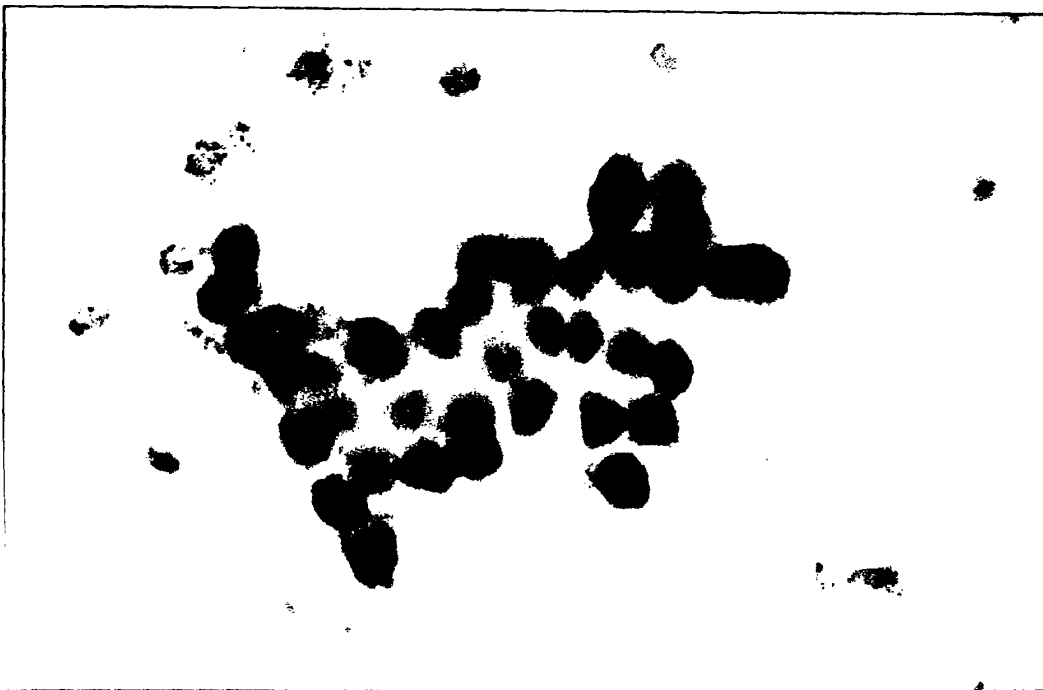
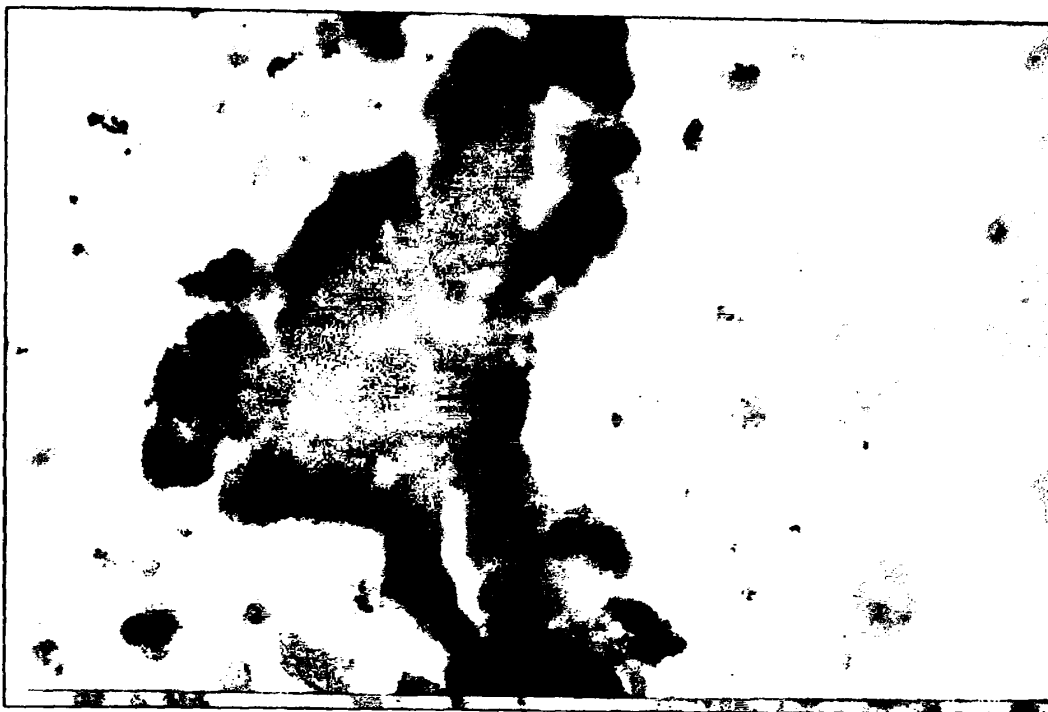
Κάθε ένας από τους τρεις βαθμούς έκφρασης της πρωτεΐνης Bcl-2 αντιπροσωπεύεται από διαφορετικό χρώμα. Κάθε μπάρα αντιπροσωπεύει το συνολικό αριθμό των ατόμων της αντίστοιχης ομάδας. Οι αριθμοί που αναγράφονται στο άνω τμήμα κάθε μπάρας αντιπροσωπεύουν τον αριθμό των ατόμων με τον αντίστοιχο βαθμό έκφρασης της πρωτεΐνης.



Εικόνα 41

**Έκφραση πρωτεΐνης Bcl-2 (βαθμός 2) σε θυρεοειδικά κύτταρα
αδενωματιώδους βρογχοκήλης**

Οι εικόνες αυτές προέρχονται από βιοψία FNA ασθενών με αδενωματιώδη βρογχοκήλη. Η ανοσοκυταροχημική χρώση έγινε με την τεχνική βιοτίνης-στρεπταβιδίνης-αλκαλικής φωσφατάσης και τη χρήση μονοκλωνικού anti-Bcl-2 αντισώματος στα επηχρίσματα FNA, μετά από επίστρωση τους σε πλακίδια και ξήρανση στον αέρα (Α. μεγέθυνση $\times 200$). Σε κάθε δείγμα παρατηρήθηκε θετική χρώση στο κυτταρόπλασμα (μαύρα βέλη) σε ποσοστό κυτάρων 20-50% κ.ο.π (βαθμός έκφρασης 2) (παράγραφοι 2.1.2 στ και 2.1.3 δ)



Εικόνα 42

Έκφραση πρωτεΐνης Bcl-2 (βαθμός 3) σε θυρεοειδικά κύτταρα
αδενωματώδους βρογχοκήλης

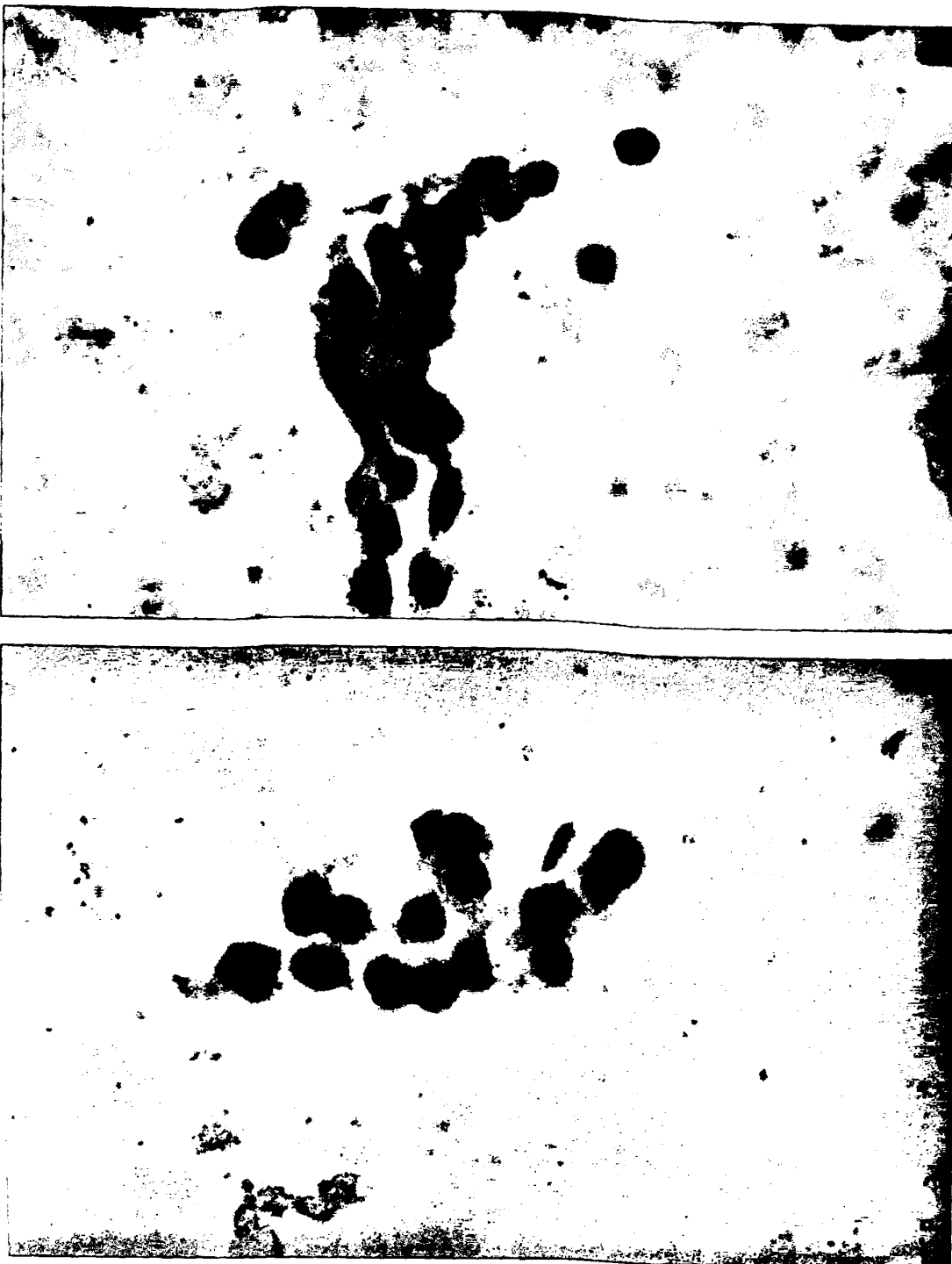
Οι εικόνες αυτές προέρχονται από βιοψία FNA ασθενών με αδενωματώδη βρογχοκήλη. Η ιστοκυτταροχημική χρώση έγινε με την τεχνική βιοτίνης-στρεπταβιδίνης-αλκαλικής φωσφατάσης με χρήση μονοκλωνικού anti-Bcl-2 αντισώματος στα επιχρίσματα FNA, μετά από επίστρωση σε πλακίδια και ξήρανση στον αέρα (Α: μεγέθυνση x400). Σε κάθε δείγμα παρατηρήθηκε η χρώση στο κυτταρόπλασμα σε ποσοστό κυττάρων >50% κ.ο.π (βαθμός έκφρασης 3) (άγραφοι 2.1.2 στ και 2.1.3 δ)



Εικόνα 43

**Εκφραση πρωτεΐνης Bcl-2 (βαθμός 3) σε θυρεοειδικά κύτταρα
αδενωματώδους βρογχοκήλης**

Οι εικόνες αυτές προέρχονται από βιοψία FNA ασθενών με αδενωματώδη βρογχοκήλη. Η ανοσοκυτταροχημική χρώση έγινε με την τεχνική βιοΐνης-στρεπταβιδίνης-αλκαλικής φωσφατάσης και τη χρήση μονοκλωνικού anti-Bcl-2 αντισώματος στα επιχρίσματα FNA, μετά από επιστροφή τους σε πλακίδια και ξήρανση στον αέρα (Α μεγέθυνση $\times 400$). Σε κάθε δείγμα παρατηρήθηκε θετική χρώση στο κυτταρόπλασμα σε ποσοστό κυτάρων $>50\%$ κ.ο.π (βαθμός έκφρασης 3) (παράγραφοι 2.1.2 στ και 2.1.3 δ)

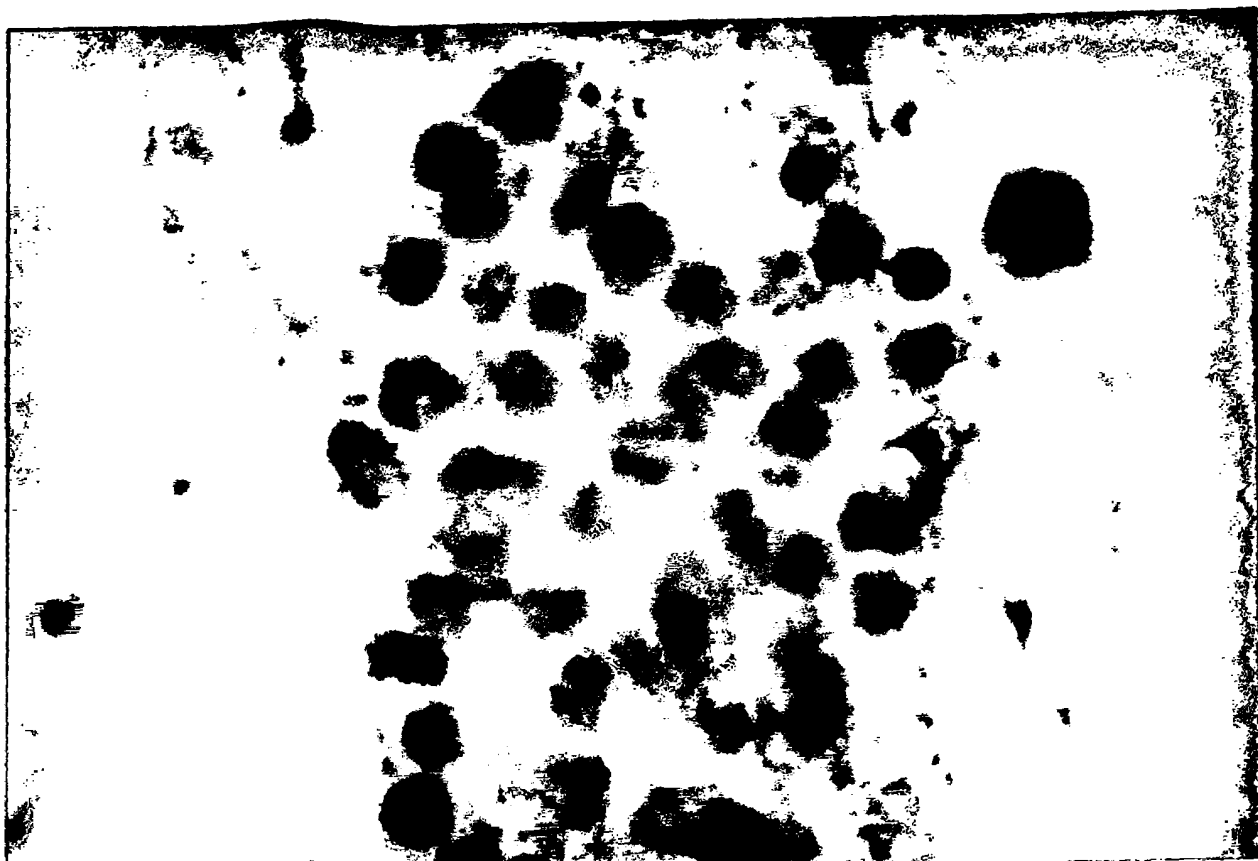


Εικόνα 44

Έκφραση πρωτεΐνης Fas (βαθμός 3) σε θυρεοειδικά κύτταρα θυρεοειδίτιδας Hashimoto

Οι εικόνες αυτές προέρχονται από βιοψία FNA ασθενών με θυρεοειδίτιδα Hashimoto. Η σοκυτταροχημική χρώση έγινε με την τεχνική βιοτίνης-στρεπταβιδίνης-αλκαλικής φωσφατάσης με τη χρήση μονοκλωνικού anti-Fas αντισώματος στα επιχρίσματα FNA, μετά από επίστρωση σε πλακίδια και ξήρανση στον αέρα (Α: μεγέθυνση x400). Σε κάθε δείγμα παρατηρήθηκε κή χρώση στην κυτταρική μεμβράνη σε ποσοστό κυττάρων >50% κ.ο.π (βαθμός έκφρασης 3) (ράβδοι 2.1.2 στ και 2.1.3 δ)

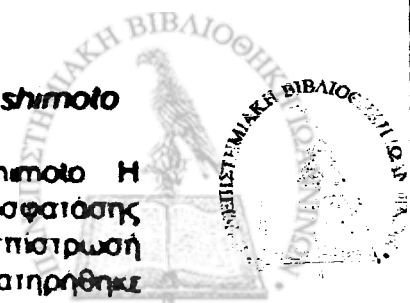


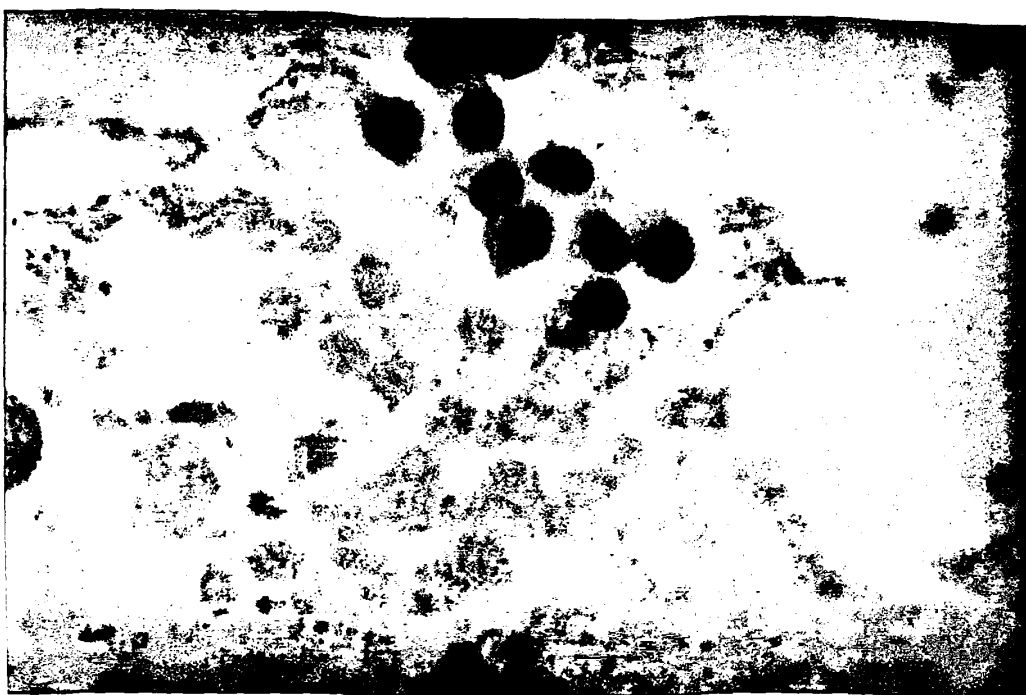


Εικόνα 45

φράση πρωτεΐνης Fas (βαθμός 3) σε θυροειδικά κύτταρα θυροειδίτιδας Hashimoto

Οι εικόνες αυτές προέρχονται από βιοψία FNA ασθενών με θυροειδίτιδα Hashimoto. Η οκυτταροχημική χρώση έγινε με την τεχνική βιοτίνης-στρεπταβιδίνης-αλκαλικής φωσφατάσης ή χρήση μονοκλωνικού anti-Fas αντισώματος στα επιχρίσματα FNA, μετά από επιστρώση σε πλακίδια και ξήρανση στον αέρα (Α. μεγέθυνση $\times 400$). Σε κάθε δείγμα παρατηρήθηκε η χρώση στην κυτταρική μεμβράνη σε ποσοστό κυττάρων $>50\%$ κ ο π (βαθμός εκτίμησης 3).



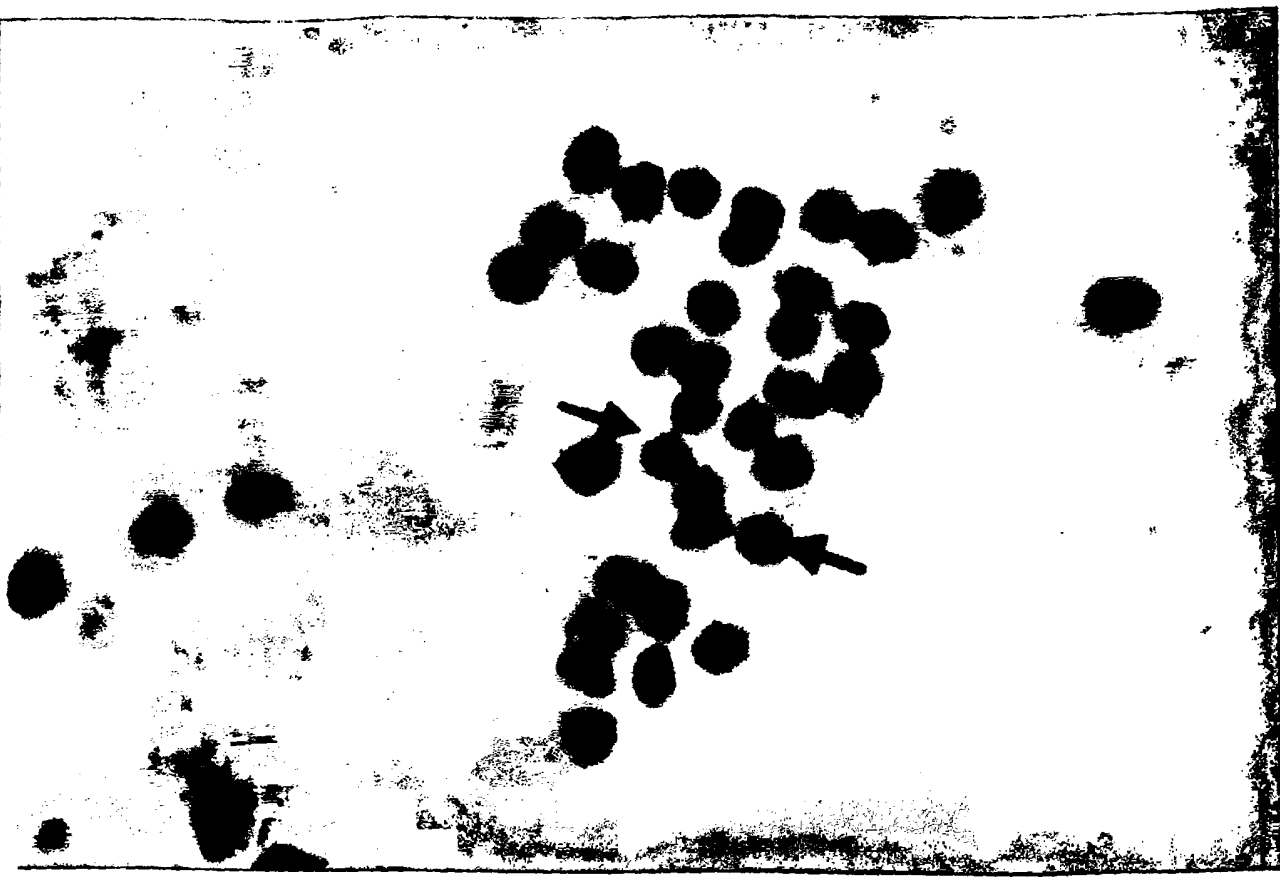


Εικόνα 46

Έκφραση πρωτεΐνης Fas (βαθμός 3) σε θυρεοειδικά κύτταρα θυρεοειδίτιδας Hashimoto

Οι κόκκοι αυτοί προέρχονται από βιοψία FNA ασθενών με θυρεοειδίτιδα Hashimoto. Η κυτταροχημική χρώση έγινε με την τεχνική βιοτίνης-στρεπταβιδίνης-αλκαλικής φωσφατάσης (A) χρήση μονοκλωνικού anti-Fas αντισώματος στα επιχρίσματα FNA, μετά από επίστρωση σε πλακίδια και ξήρανση στον αέρα (Α: μεγέθυνση x400). Σε κάθε δείγμα παρατηρήθηκε χρώση στην κυτταρική μεμβράνη σε ποσοστό κυττάρων >50% κ.ο.π (βαθμός έκφρασης 3) (γραφ. 2.1.2 στ και 2.1.3 δ)

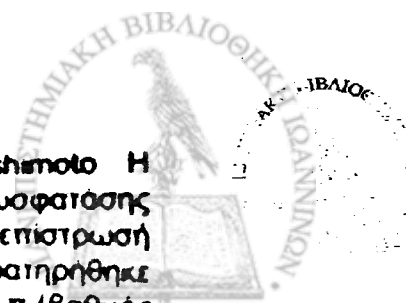




Εικόνα 47

Εκφραση πρωτεΐνης Bcl-2 σε κύτταρα θυρεοειδίτιδας Hashimoto

Εικόνες αυτές προέρχονται από βιοψία FNA ασθενούς με θυρεοειδίτιδα Hashimoto. Η ανοσοκυτταροχημική χρώση έγινε με την τεχνική βιοτίνης-στρεπταβιδίνης-αλκαλικής φωσφατάσης με τη χρήση μονοκλωνικού anti-Bcl-2 αντισώματος στα επιχρίσματα FNA, μετά από επίστρωση σε πλακίδια και ξήρανση στον αέρα (μεγέθυνση x 400). Στο δείγμα αυτό παρατηρήθηκε χρώση στην κυτταρική μεμβράνη (μαύρα βέλη) σε ποσοστό κυττάρων <20% και ο π. (Bcl-2) (πρωτεΐνη 2.1.2) σε ποσοστό 2.1.2.



2.2 Υπολογισμός επιπέδων των διαλυτών πρωτεϊνών sFas και sFas Ligand στον ορό

2.2.1 Ασθενείς

Στη μελέτη μας συμπεριλήφθηκαν συνολικά 87 ασθενείς, οι οποίοι ταξινομήθηκαν σε τρεις ομάδες:

- 1) Στην πρώτη ομάδα συμπεριλήφθηκαν 73 ασθενείς (16 άνδρες και 57 γυναίκες) ηλικίας 18-84 ετών με *μη τοξική* μονοοζώδη ή πολυοζώδη βρογχοκήλη (NTG).
- 2) Στη δεύτερη ομάδα συμπεριλήφθηκαν 5 ασθενείς (1 άνδρας και 4 γυναίκες) ηλικίας 15-65 ετών, με *θυρεοειδίτιδα Hashimoto (HT)* στην αρχική ενεργό φάση της νόσου. Οι ασθενείς αυτοί χαρακτηρίστηκαν ως υποκλινικά υποθυρεοειδικοί, με υψηλά επίπεδα anti-TPO αντισωμάτων και αυξημένη λεμφοκυτταρική διήθηση στην κυτταρολογική εξέταση των δειγμάτων FNA.
- 3) Στην τρίτη ομάδα συμπεριλήφθηκαν 9 ασθενείς (2 άνδρες και 7 γυναίκες) ηλικίας 17-77 ετών, με HT στη χρόνια, ανενεργό φάση της νόσου (κλινικά υποθυρεοειδικοί υπό αγωγή υποκατάστασης με θυροξίνη).

Ταυτόχρονα, στη μελέτη συμπεριλήφθηκαν και 36 φυσιολογικά άτομα (15 άνδρες και 21 γυναίκες) ηλικίας 20-65 ετών, που αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου.

Η ταξινόμηση των ασθενών σε ομάδες βασίστηκε στην κλινική εξέταση, στο υπερηχογράφημα του θυρεοειδούς αδένος, στις δοκιμασίες θυρεοειδικής λειτουργίας (επίπεδα FT3, FT4, TSH, anti-TPO) και στην κυτταρολογική εξέταση των δειγμάτων FNA. Η αναλυτική περιγραφή των μεθόδων γίνεται στην παράγραφο 2.1.2, ενώ η αναφορά των ευρημάτων κάθε εξέτασης που οδηγούν στην κλινική διάγνωση περιλαμβάνεται στην παράγραφο 2.1.3.

2.2.2 Μέθοδοι

α. Υπερηχογράφημα θυρεοειδούς αδένος

Η μέθοδος περιγράφεται αναλυτικά στην παράγραφο 2.1.2 α.

β. Συλλογή δειγμάτων

Τα δείγματα ορού αίματος ελήφθησαν από τους ασθενείς και τους υγιείς μετά από ολονύχτια νηστεία.



Έγινε φυγοκέντρωση των δειγμάτων στη φυγόκεντρο *Labofuge GL, Heraeus* σε 1800 rpm (στροφές το λεπτό) για 20 λεπτά και μεταφορά κάθε δείγματος ορού αίματος σε δύο μικροφυγοκεντρικούς σωλήνες χωρητικότητας 2 ml (erpendorfs), από τους οποίους ο ένας αποθηκεύτηκε στους -20°C μέχρι τον προσδιορισμό των επιπέδων sFas και sFasL, ενώ ο άλλος χρησιμοποιήθηκε για τις δοκιμασίες θυρεοειδικής λειτουργίας.

γ. Δοκιμασίες θυρεοειδικής λειτουργίας

Η μέτρηση των επιπέδων των ορμονών FT4, FT3, TSH και των αντισωμάτων anti-TPO έγινε όπως αναφέρθηκε ήδη στην παράγραφο 2.1.2 β.

δ. Κυτταρολογική εξέταση υλικού FNA θυρεοειδούς

Η μέθοδος περιγράφεται αναλυτικά στην παράγραφο 2.1.2 δ.

ε. Ανοσοπροσροφητικός προσδιορισμός συνδεδεμένος με ένζυμο (ELISA)

Αρχή της μεθόδου

Η ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) είναι μία τεχνική ευρέως χρησιμοποιούμενη τόσο για διαγνωστικούς όσο και για ερευνητικούς σκοπούς. Επιτρέπει τον ποσοτικό ή ημιποσοτικό προσδιορισμό διαλυτών ουσιών ή την ανίχνευση ειδικών αντισωμάτων σε βιολογικά υγρά και βασίζεται στην ειδική αντίδραση αντιγόνου-αντισώματος. Αναλόγως της εφαρμογής, των αντιδραστηρίων και της ευαισθησίας που επιδιώκεται, η μέθοδος παρουσιάζει πληθώρα παραλλαγών. Τα βασικά βήματα που χαρακτηρίζουν τη μέθοδο σε όλες τις παραλλαγές της είναι: α) η πρόσδεση και ακινητοποίηση αντιγόνου ή αντισώματος σε στερεή επιφάνεια (=immunosorbent), β) η χρήση ιχνηθετημένων με ένζυμο αντιγόνου ή αντισώματος (=enzyme-linked), και γ) η χρήση χρωμογόνων υποστρωμάτων που μετά από αντίδραση με το ένζυμο επιτρέπουν την ποσοτικοποίηση της αντίδρασης αντιγόνου-αντισώματος.

Στα τέλη της δεκαετίας του 1960 ο Στρατής Αβραμέας (Pasteur Institute, Paris, France) παρουσίασε συζεύγματα (conjugates) ενζύμου-αντισώματος, τα οποία διατηρούν τόσο την εξειδίκευση αντιγόνου του συγκεκριμένου αντισώματος, όσο και την ενεργότητα και εξειδίκευση υποστρώματος του συγκεκριμένου ενζύμου. Αυτά χρησιμοποιήθηκαν αργότερα για την ανάπτυξη της τεχνικής της ELISA (Avrameas 1969).

ELISA τύπου «sandwich»

Στη μέθοδο αυτή χρησιμοποιούνται δύο αντισώματα που αναγνωρίζουν διαφορετικούς επιτόπους του αντιγόνου. Το πρώτο, ειδικό αντίσωμα (Ab1) ακινητοποιείται στην στερεά επιφάνεια και στη συνέχεια αντιδρά με το αντιγόνο (Ag) που βρίσκεται σε διάλυμα σε άγνωστη συγκέντρωση. Ακολουθεί η προσθήκη του δεύτερου αντισώματος που είναι συνδεδεμένο με ένζυμο (Ab2*). Η ποσότητα του δεύτερου αντισώματος που θα προσδεθεί, είναι ανάλογη της ποσότητας του αντιγόνου που έχει προσδεθεί στο Ab1. Μετά την προσθήκη κατάλληλου υποστρώματος, η ενζυμική αντίδραση που ανιχνεύεται είναι ανάλογη της ποσότητας του αντιγόνου που έχει συνδεθεί με το ακινητοποιημένο αντίσωμα.

Η εφαρμογή της τεχνικής sandwich ELISA επιτρέπει περιορισμό των φαινομένων διασταυρούμενης αντίδρασης (cross reactivity) και αύξηση της ευαισθησίας (ειδικής) ανίχνευσης του αντιγόνου, με την προϋπόθεση, βέβαια, ότι χρησιμοποιούνται πλήρως χαρακτηρισμένα αντισώματα, πολυκλωνικά ή μονοκλωνικά.

Υλικά

- Φυγόκεντρος (Labofuge GL, Heraeus)
- Επιτραπέζιος αναδευτήρας (Edmund Bühler SM 25, Tübingen, Germany)
- Αυτόματο φωτόμετρο ειδικό για πλακίδια 96 φρεατίων (Automated microplate reader LP 400, Sanofi Diagnostics Pasteur)
- Συσκευή πλυσίματος πλακιδίων (προαιρετική)
- Πολυκάναλη πιπέτα
- Απεσταγμένο νερό



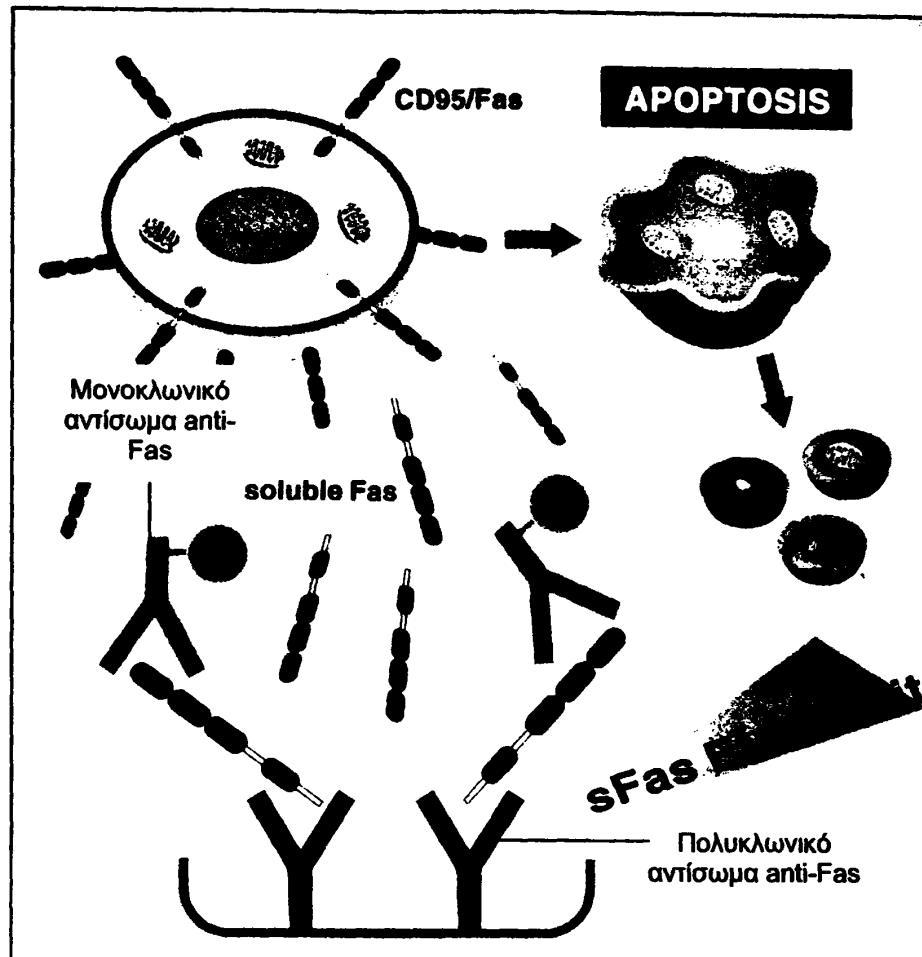
- **Στερεά επιφάνεια:** Συνήθως χρησιμοποιούνται πλακίδια 96 (8 x 12) μικροφρεατίων με 5 mm βάθος x 8 mm διάμετρο περίπου από πολυπροπυλένιο ή πολυστυρένιο.
- **Ένζυμα:** Χρησιμοποιούνται κυρίως η ραφανδική υπεροξειδάση (HRP), η αλκαλική φωσφατάση και η β-γαλακτοσιδάση (β-gal).
- **Υποστρώματα:** Χρησιμοποιούνται τέτοια υποστρώματα, ώστε τα προϊόντα τους να είναι διαλυτά και έγχρωμα, για να επιτρέπουν ακριβείς μετρήσεις της οπτικής πυκνότητας. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε TMB (3,3',5,5'-τετραμεθυλο-βενζιδένιο).
- **Ρυθμιστικά διαλύματα:**
 - 1) PBS (phosphate buffered saline)+Tween 0.1% (για το πλύσιμο των πλακιδίων ανάμεσα στο κάθε στάδιο της μεθόδου, ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια αντιγόνου-αντισωμάτων). Το Tween είναι απορρυπαντικό που βοηθάει στην έκπλυση των ουσιών που έχουν προσδεθεί μη ειδικά στα τοιχώματα των μικροφρεατίων, χωρίς να αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες (αντιγόνα, αντισώματα).
 - 2) PBS + Tween 0.1% + 0.4% καζείνη (ρυθμιστικό διάλυμα εργασίας). Στο διάλυμα αυτό γίνονται οι αρακώσεις όλων των αντισωμάτων και αντιγόνων. Η καζείνη χρησιμοποιείται ως παράγοντας μη ειδικής δέσμευσης κενών αντιγονικών θέσεων (blocking agent).

Πρωτόκολλο εκτέλεσης

α) sFas (S) ELISA Kit

Με το πακέτο υλικών sFas (S) ELISA kit υπολογίστηκαν τα επίπεδα της πρωτεΐνης sFas με τη μέθοδο "sandwich" ELISA (εικόνα 48). Η συγκεκριμένη τεχνική, που περιέγραψαν αρχικά οι Seishima και συν. (1996), χρησιμοποιεί αντισώματα anti-Fas έναντι δύο διαφορετικών επιτόπων. Ένα από αυτά είναι πολυκλωνικό αντίσωμα και αναγνωρίζει το ενδοκυττάριο τμήμα της πρωτεΐνης Fas (No. 305-319 αμινοξέα), ενώ το άλλο είναι μονοκλωνικό αντίσωμα και αναγνωρίζει το εξωκυττάριο τμήμα της (No. 110-120 αμινοξέα) (Medical and Biological Laboratories Co., Ltd, Nagoya, Japan, Code No.5251, Cheng και συν. 1994, Knipping και συν. 1995, Goel και συν. 1995).





Εικόνα 48

Σχηματική αναπαράσταση της τεχνικής ELISA για τη μέτρηση των επιπέδων της διαλυτής πρωτεΐνης sFas στον ορό

Το πολυκλωνικό αντίσωμα anti-Fas με το οποίο είναι επενδεδυμένα τα φρεάτια αναγνωρίζει το ενδοκυττάριο τμήμα της πρωτεΐνης Fas, ενώ το ειδικό αντίσωμα της μεθόδου είναι μονοκλωνικό και αναγνωρίζει το εξωκυττάριο τμήμα της (παράγραφος 1.2.5 γ). Στο άνω τμήμα της εικόνας διακρίνουμε ένα κύτταρο που εκφράζει την πρωτεΐνη Fas και οδηγείται σε απόπτωση.

β) sFas Ligand ELISA Kit

Με το πακέτο υλικών sFas Ligand ELISA kit υπολογίστηκαν τα επίπεδα της πρωτεΐνης sFasL με τη μέθοδο "sandwich" ELISA (εικόνα 49). Η συγκεκριμένη τεχνική χρησιμοποιεί μονοκλωνικά αντισώματα anti-FasL έναντι δύο διαφορετικών επιτόπων: το αντίσωμα 4H9, με το οποίο είναι επενδεδυμένα τα μικροφρεάτια του πλακιδίου και το αντίσωμα 4A5, το οποίο είναι συζευγμένο με την υπεροξειδάση (Medical and Biological Laboratories Co., Ltd, Nagoya, Japan, Code No.5255) (Tanaka και συν. 1996, Sato και συν. 1996, Nozawa και συν. 1997).

Προετοιμασία διαλυμάτων:

Και για τα δύο η προετοιμασία των διαλυμάτων έγινε όπως προτείνουν οι κατασκευαστές των παραπάνω πακέτων υλικών. Αναλυτικότερα:

1. Διάλυμα πλύσης

Διαλύονται 100 ml συμπυκνωμένου διαλύματος πλύσης (Wash Concentrate 10x) σε 900 ml απεσταγμένου νερού. Αυτό το διάλυμα πλύσης είναι σταθερό για 2 εβδομάδες στους 4° C.

2. Διάλυμα σύζευξης

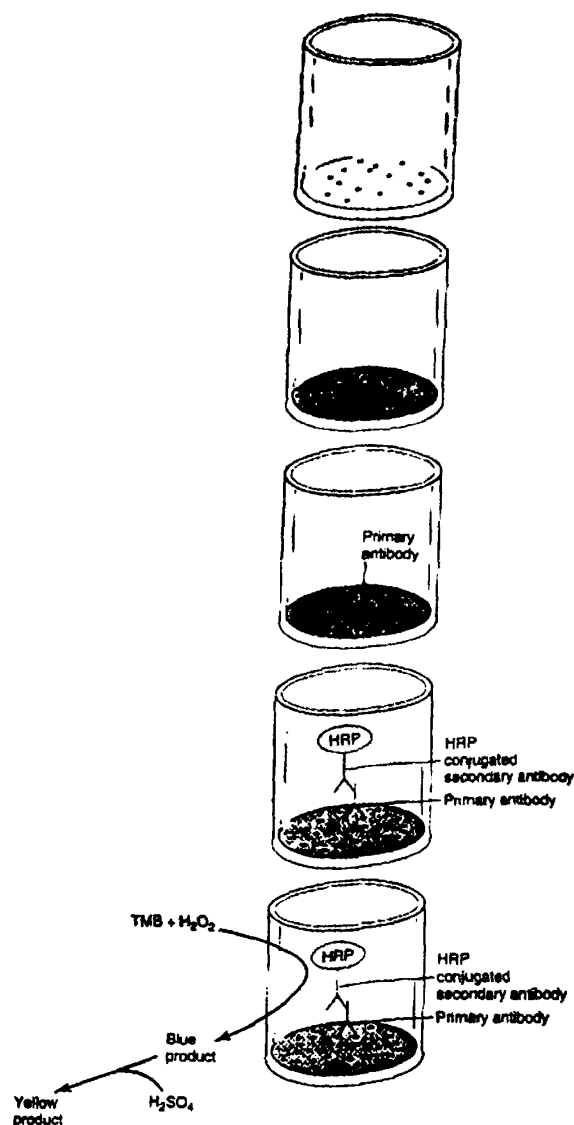
Το μονοκλωνικό anti-Fas ή antiFasL αντίσωμα, που είναι συζευγμένο με την υπεροξειδάση (conjugate reagent 101x 0.2ml), πρέπει να διαλύεται αμέσως πριν τη χρήση του, σε αναλογία 1:101 με το διαλύτη σύζευξης (conjugate diluent).

3. Διαλύματα αναφοράς

A) Γίνεται ανασύσταση του βαθμονομητή sFas (calibrator) (20ng) ή του βαθμονομητή sFasL (25 ng) με 100 μl απεσταγμένου νερού. Και στις δύο περιπτώσεις, ο βαθμονομητής χρησιμοποιήθηκε αμέσως μετά την ανασύστασή του, μπορεί, όμως, να διατηρηθεί για 2 εβδομάδες στους 4° C.

B) Ακολουθεί διάλυση του ανασυστάμενου βαθμονομητή sFas (200 ng/ml) 1:100 με το διαλύτη προσδιορισμού (assay diluent) με ακρίβεια για να γίνει το πρώτο διάλυμα αναφοράς, π.χ προσθήκη 10 μl του βαθμονομητή σε 990 μl διαλύτη προσδιορισμού. Η διάλυση του βαθμονομητή sFasL (250 ng/ml) γίνεται 1:50 με το διαλύτη προσδιορισμού, π.χ. με προσθήκη 20 μl του βαθμονομητή sFasL (250 ng/ml) σε 980 μl διαλύτη προσδιορισμού.





Εικόνα 49

Σχηματική απεικόνιση μικροφρεατίου και τυπική σειρά πειραματικών βημάτων της ELISA για τη μέτρηση της διαλυτής πρωτεΐνης sFasL

Ποσότητα δείγματος μεταφέρεται στο αντίστοιχο μικροφρεάτιο, στο οποίο έχει επιστρωθεί το αντισώμα anti-FasL 4H9. Μετά από απομάκρυνση της περίσσειας-μη δεσμευθέντος αντιγόνου και άλλων ουσιών, ακολουθεί προσθήκη του πρώτου, ειδικού αντισώματος (primary antibody) anti-FasL 4A5. Απομακρύνεται η περίσσεια αντισώματος και προστίθεται το κατάλληλο ενζυμικό υπόστρωμα. Η συγκεκριμένη ELISA χρησιμοποιεί αντίδραση υπεροξειδάσης (HRP), με υπόστρωμα 3,3',5,5'-τετραμεθυλοβενζιδένιο (TMB). Τέλος, προστίθεται όξινο διάλυμα διακοπής της αντίδρασης (H_2SO_4), ώστε να σταματήσει η ενζυμική αντίδραση και να σταθεροποιηθεί το αναπτυσσόμενο χρώμα (Switzer 1999, p.281, fig. 17-2, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης).

Γ) Το πρώτο διάλυμα αναφοράς διαλύεται κατά σειρά με το διαλύτη προσδιορισμού, έτσι ώστε να προκύψουν 7 παρόμοια διαλύματα με συγκεντρώσεις από 0 ng/ml έως 2 ng/ml για τη μέτρηση της πρωτεΐνης sFas και από 0 ng/ml έως 5 ng/ml για τη μέτρηση της πρωτεΐνης sFasL. Ο διαλύτης προσδιορισμού χρησιμοποιείται για το διάλυμα αναφοράς 0 ng/ml.

4. Υπόλοιπα διαλύματα

Για τη μέτρηση των επιπέδων sFas (έτοιμα προς χρήση από τον κατασκευαστή):

- Διαλύτης σύζευξης -Conjugate diluent (14ml)
- Διαλύτης προσδιορισμού-Assay diluent (30ml)
- Διάλυμα υποστρώματος -substrate reagent, TMB/H₂O₂
- Όξινο διάλυμα διακοπής της αντίδρασης- stop solution, 2NH₂SO₄ (18ml)

Για τη μέτρηση των επιπέδων sFasL (έτοιμα προς χρήση από τον κατασκευαστή):

- Διαλύτης σύζευξης -Conjugate diluent (14ml)
- Διαλύτης προσδιορισμού-Assay diluent (20ml)
- Διάλυμα υποστρώματος A -substrate A (TMB)
- Διάλυμα υποστρώματος B -substrate B (H₂O₂)
- Όξινο διάλυμα διακοπής της αντίδρασης- stop solution, 2NH₂SO₄ (18ml)

Σημείωση: Αμέσως πριν από το στάδιο ανάπτυξης του χρώματος, γίνεται ανάμιξη ίσων όγκων από τα διαλύματα υποστρώματος A και B. Το νέο διάλυμα που προκύπτει από την ανάμιξη αυτή φυλάσσεται στο σκοτάδι και χρησιμοποιείται σε χρόνο λιγότερο των 15 λεπτών, όπως προτείνεται από τον κατασκευαστή.

Προετοιμασία δειγμάτων:

- Για τη μέτρηση των επιπέδων του διαλυτού υποδοχέα Fas (sFas): γίνεται 1:5 αραιώση κάθε δείγματος στο διαλύτη προσδιορισμού (προσθήκη 50 μl δείγματος σε 200 μl διαλύτη προσδιορισμού), σε πλακίδιο 96 φρεατικών.
- Για τη μέτρηση των επιπέδων του διαλυτού υποδοχέα Fas Ligand (sFasL): γίνεται 1:2 αραιώση κάθε δείγματος σε διαλύτη προσδιορισμού (προσθήκη 100 μl δείγματος σε 100 μl διαλύτη προσδιορισμού), σε πλακίδιο 96 φρεατικών.

Διαδικασία:

1. Επώαση δειγμάτων. Το κάθε δείγμα μετράται δύο φορές. Μεταφέρονται 100 μl κάθε δείγματος (των υπό εξέταση ορών και των διαλυμάτων αναφοράς) στο

αντίστοιχο μικροφρεάτιο στο οποίο έχει επιστρωθεί το πολυκλωνικό αντίσωμα anti-Fas. Ακολουθεί επώαση για 60 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (20°-25° C) με ταυτόχρονη ανακίνηση (200 rpm περίπου).

2. *Πλύσεις* (απομάκρυνση της περίσσειας-μη δεσμευθέντος αντιγόνου και άλλων ουσιών). Αφαιρείται το περιεχόμενο των μικροφρεατίων, προστίθεται διάλυμα πλύσης και απομακρύνεται πλήρως από τα μικροφρεάτια. Το βήμα αυτό επαναλαμβάνεται 4 φορές με τη χρήση πολυπιπέτας.

3. *Επώαση διαλύματος σύζευξης* (δέσμευση των ειδικών θέσεων του αντιγόνου με το ειδικό αντίσωμα). Μεταφέρονται 100 μl διαλύματος σύζευξης σε κάθε μικροφρεάτιο και ακολουθεί επώαση για 60 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (20°-25° C) με ταυτόχρονη ανακίνηση (200 rpm περίπου).

4. *Πλύσεις* (απομάκρυνση της περίσσειας αντισώματος). Αφαιρείται το περιεχόμενο των μικροφρεατίων, προστίθεται διάλυμα πλύσης και απομακρύνεται πλήρως από τα μικροφρεάτια. Οι πλύσεις επαναλαμβάνονται 4 φορές με τη χρήση πολυπιπέτας.

5. *Επώαση υποστρώματος*. Προστίθενται 100 μl διαλύματος υποστρώματος σε κάθε μικροφρεάτιο και ακολουθεί επώαση για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (20° C-25° C) με ταυτόχρονη ανακίνηση (200 rpm περίπου).

6. *Διακοπή αντίδρασης*. Προστίθενται 100 μl διαλύματος όξινου διαλύματος διακοπής της αντίδρασης σε κάθε μικροφρεάτιο ώστε να σταματήσει η ενζυμική αντίδραση και να σταθεροποιηθεί το αναπτυσσόμενο χρώμα (εικόνα 49).

7. *Φωτομέτρηση*. Η φωτομετρική ανίχνευση προϊόντος της ενζυμικής αντίδρασης γίνεται σε μήκος κύματος 450 nm χρησιμοποιώντας ως μήκος κύματος αναφοράς τα 620 nm.

8. *Υπολογισμός*. Υπολογίζεται αρχικά η μέση τιμή απορρόφησης κάθε διαλύματος αναφοράς και κατασκευάζεται σε ημιλογαριθμικό χαρτί η αντίστοιχη καμπύλη αναφοράς, με την οπτική πυκνότητα (O.D 450 nm) στον κάθετο άξονα και την συγκέντρωση της πρωτεΐνης (σε ng/ml) στον οριζόντιο άξονα.

Λόγω του μεγάλου αριθμού των δειγμάτων, η αντίδραση ELISA επαναλήφθηκε τρεις φορές για τη μέτρηση sFas και τέσσερις φορές για τη μέτρηση sFasL. Σε κάθε επανάληψη της μεθόδου έγινε νέα καμπύλη (εικόνες 50-56). Για να γίνει επεξεργασία όλων των αποτελεσμάτων αποφασίστηκε η επιλογή μιας από τις τρεις ή τέσσερις καμπύλες, που οι τιμές της θα βρίσκονται μεταξύ των αντίστοιχων τιμών των υπολοίπων καμπυλών. Με βάση αυτή την καμπύλη



και την O.D 450 nm κάθε δείγματος, υπολογίζεται η αντίστοιχη συγκέντρωση της πρωτεΐνης (sFas ή sFasL). Από τις καμπύλες 1,2,3 (εικόνες 50-52) για τη μέτρηση των επιπέδων sFas, επιλέχθηκε η καμπύλη 1 (εικόνα 50), ενώ από τις καμπύλες 1,2,3,4 (εικόνες 53-56) για τη μέτρηση των επιπέδων sFasL επιλέχθηκε η καμπύλη 4 (εικόνα 56).

Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης (sFas ή sFasL) σε κάθε δείγμα υπολογίζεται, αφού η τιμή που προκύπτει από την καμπύλη αναφοράς, πολλαπλασιαστεί με τον παράγοντα αραίωσης του δείγματος σε κάθε μέτρηση ($\times 5$ για την πρωτεΐνη sFas και $\times 2$ για την πρωτεΐνη sFasL). Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, για τη μέτρηση των επιπέδων sFas το κατώτερο όριο ανίχνευσης της μεθόδου είναι 0,5 ng/ml και το ανώτερο 2 ng/ml, ενώ για τη μέτρηση των επιπέδων sFasL το κατώτερο όριο ανίχνευσης είναι 0,1 ng/ml και το ανώτερο 5 ng/ml.

Σημείωση:

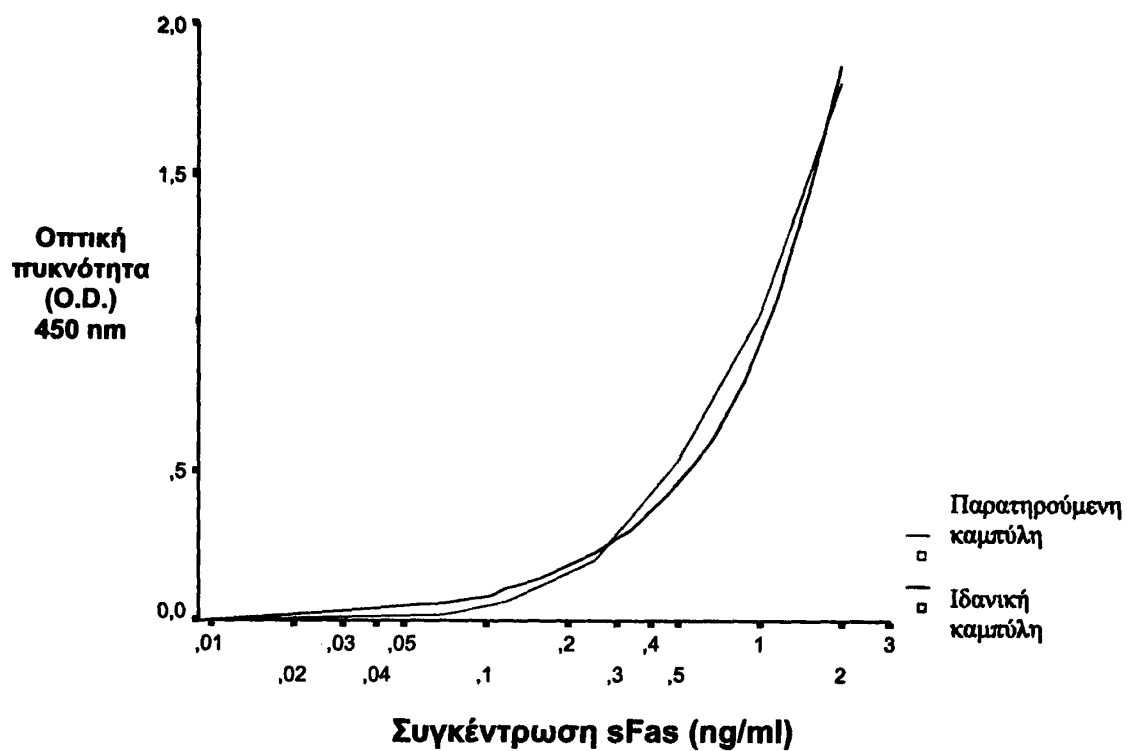
- Η χρήση πολυπιπέτας κρίνεται απαραίτητη σε κάθε πλύση και προσθήκη διαλύματος κατά τη διαδικασία του πειράματος.
- Όταν γίνεται η αντίδραση για τη μέτρηση sFasL δεν είναι απαραίτητη η ανακίνηση στα 200 rpm (βήματα 1, 3 και 5), όπως προτείνεται από τον κατασκευαστή.

στ. Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του προγράμματος στατιστικής ανάλυσης SPSS σε ηλεκτρονικό υπολογιστή. Η ανάλυση των επιπέδων sFas του ορού, καθώς και των ηλικιών των εξεταζόμενων ατόμων έγινε με τη χρήση της δοκιμασίας t-test. Η ανάλυση των επιπέδων sFasL μεταξύ των εξεταζόμενων ομάδων έγινε με τη δοκιμασία χ^2 .

Η συσχέτισή των επιπέδων sFas με άλλες παραμέτρους, όπως η ηλικία, το φύλο, τα επίπεδα TSH και anti-TPO αντισωμάτων έγινε με τη χρήση της απλής δοκιμασίας εξάρτησης (simple regression test). Στατιστικά σημαντική θεωρήθηκε κάθε διαφορά όπου η πιθανότητα λάθους ήταν $p < 0,05$.

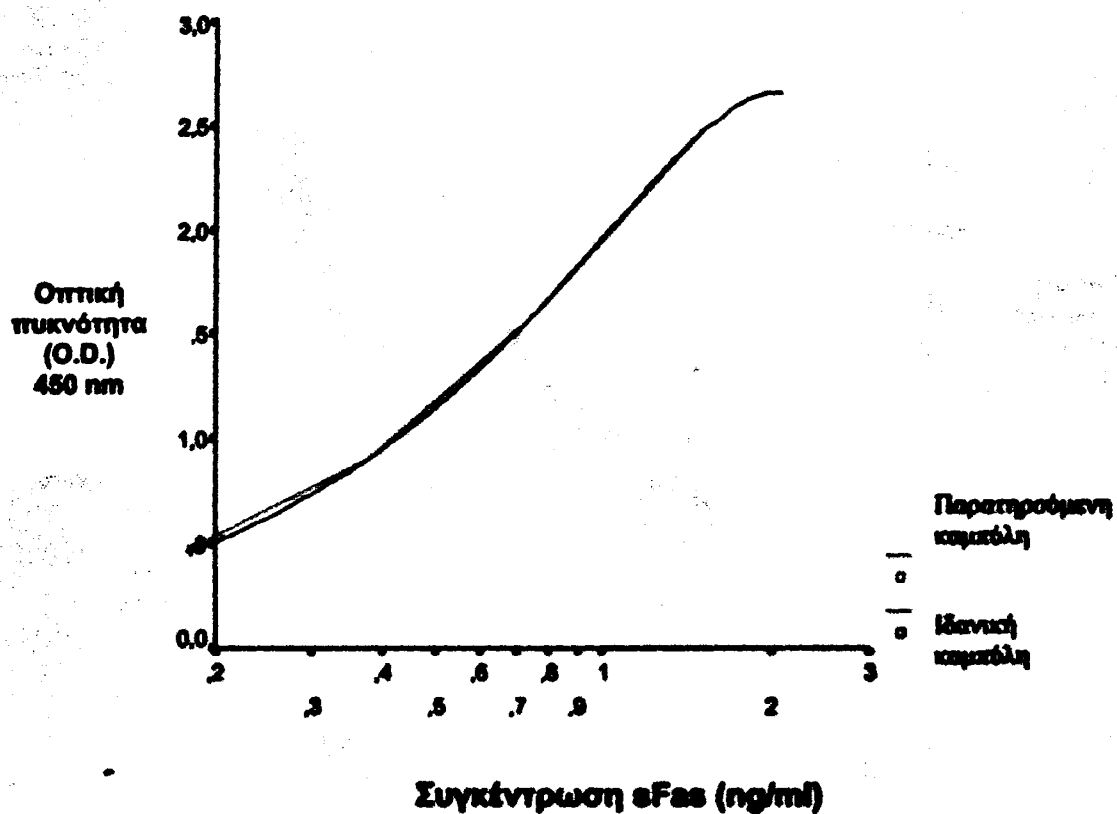
Rsq	d.f.	F	Sigf
0,992	5	610,18	0,000



Εικόνα 50

Καμπύλη αναφοράς 1 για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης της διαλυτής πρωτεΐνης sFas

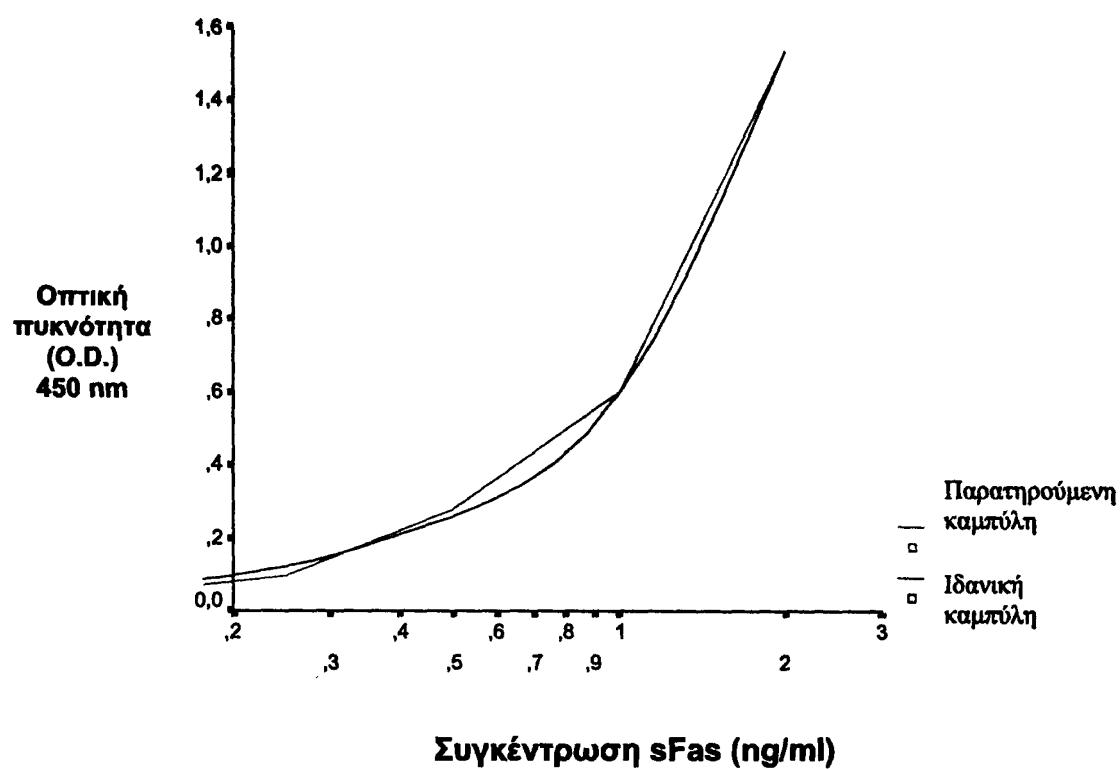
Rsq	d.f.	F	Sigf
0,999	4	2240,67	0,000



Εικόνα 51

Καμπύλη αναφοράς 2 για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης της διαλυτής πρωτεΐνης sFas

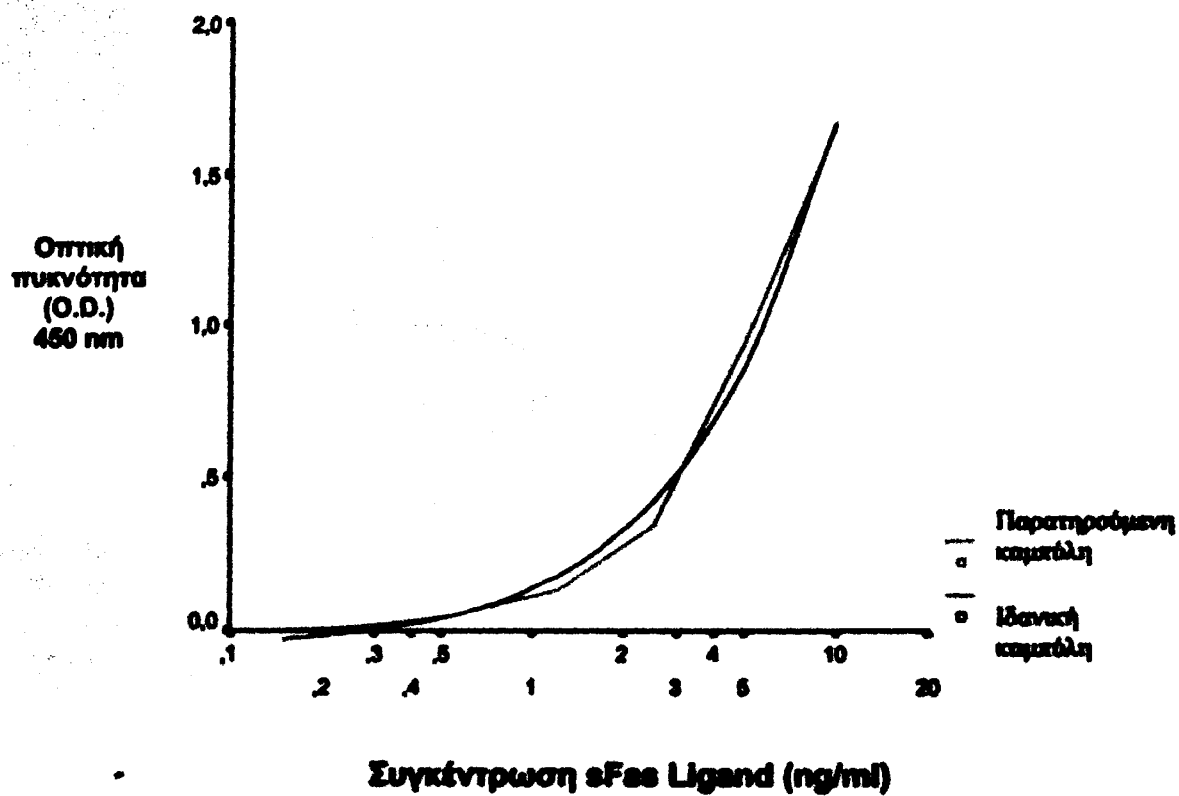
Rsq	d.f.	F	Sigf
0,999	5	3134,65	0,000



Εικόνα 52

Καμπύλη αναφοράς 3 για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης της διαλυτής πρωτεΐνης sFas

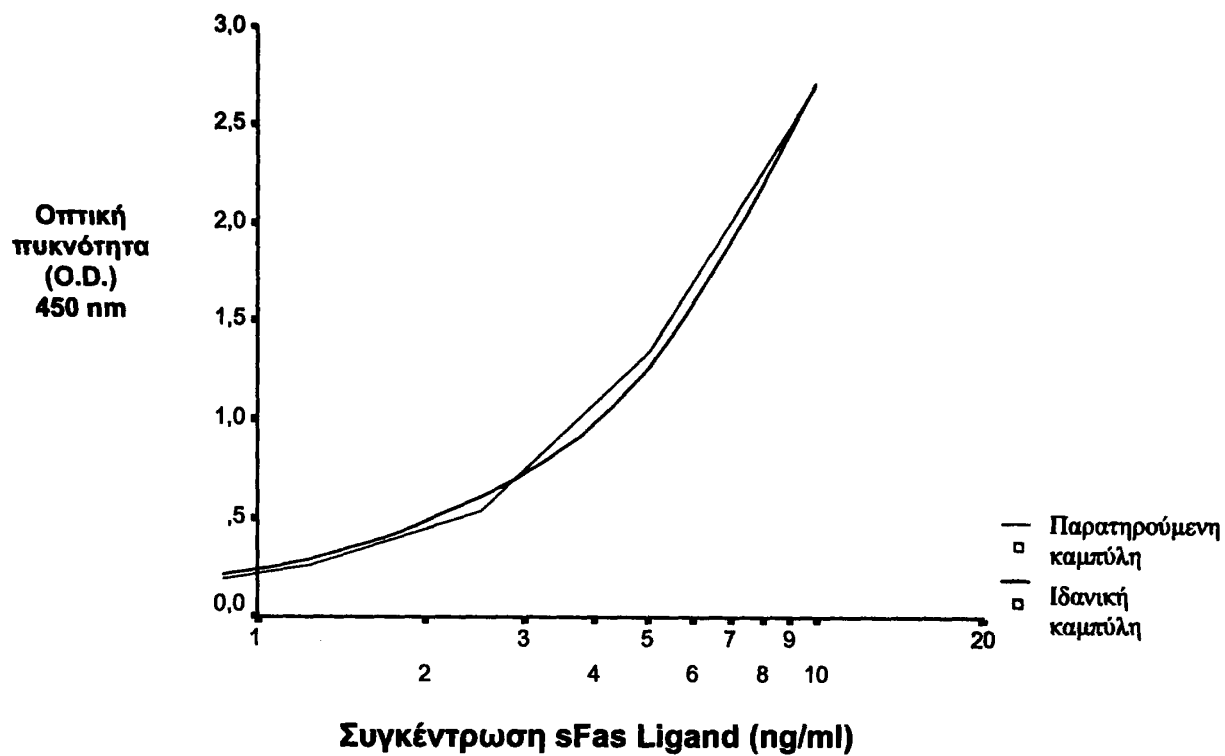
Req	d.f.	F	Sigf
0,993	5	373,07	0,000



Εικόνα 53

Καμπύλη αναφοράς 1 για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης της διαλυτής πρωτεΐνης sFas Ligand

Rsq	d.f.	F	Sigf
0,996	5	625,86	0,000

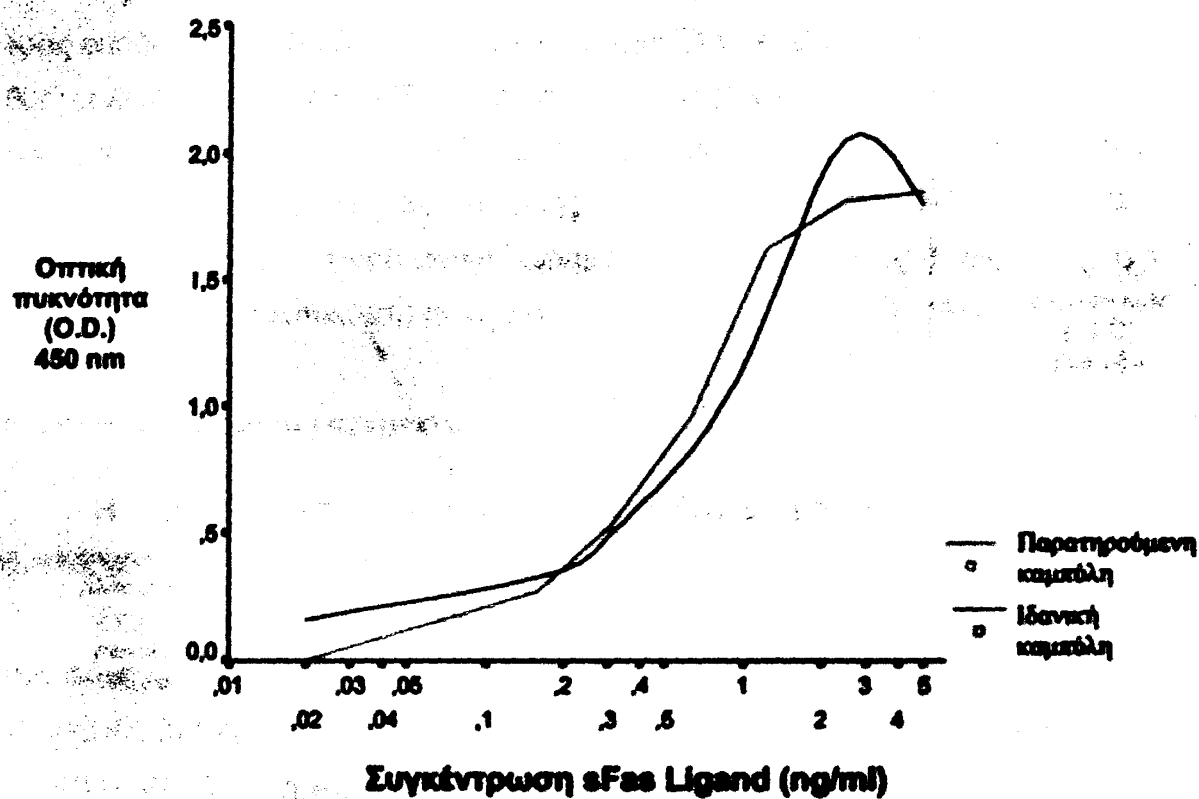


Εικόνα 54

Καμπύλη αναφοράς 2 για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης της διαλυτής πρωτεΐνης sFas Ligand

2.2.3 Αποτελέσματα

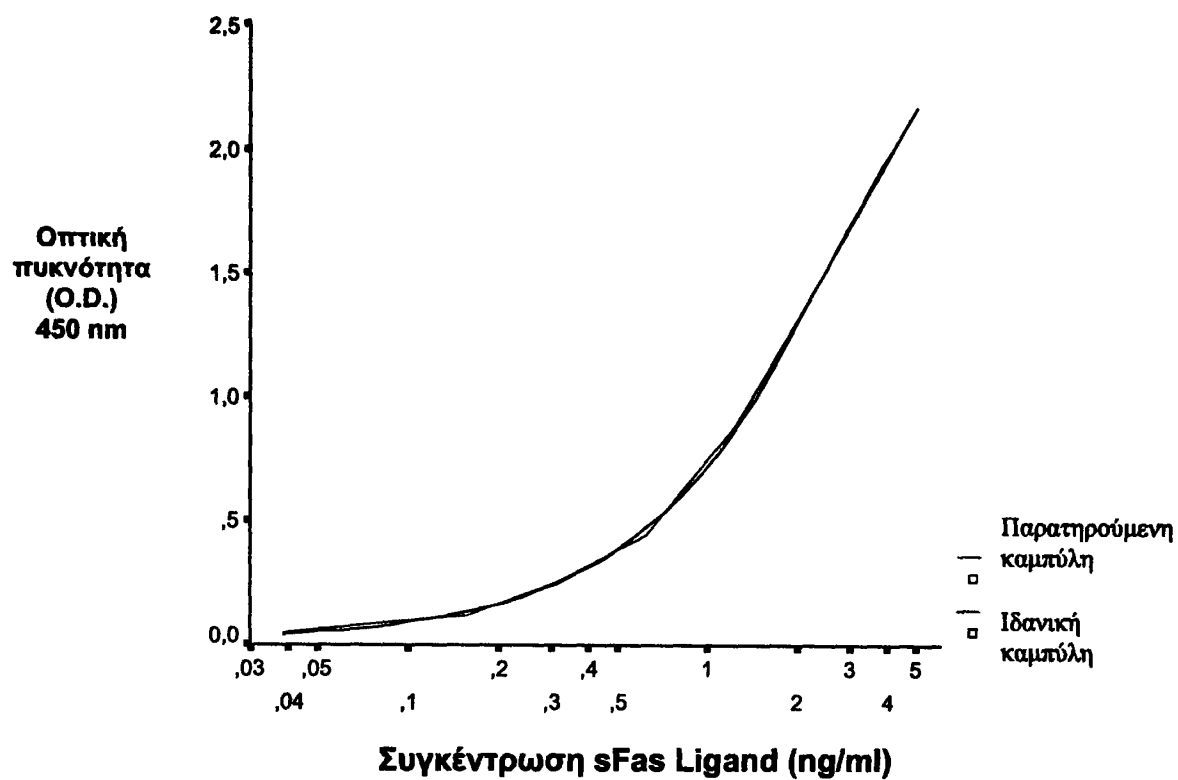
Req	d.f.	F	Sigf
0,951	4	38,47	0,002



Εικόνα 55

Καμπύλη αναφοράς 3 για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης της διαλυτής πρωτεΐνης sFas Ligand

Rsq	d.f.	F	Sigf
1,000	5	8593,41	0,000



Εικόνα 56

Καμπύλη αναφοράς 4 για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης της διαλυτής πρωτεΐνης sFas Ligand

2.2.3 Αποτελέσματα

Πριν την εφαρμογή της τεχνικής ELISA, έγινε ταξινόμηση των ασθενών σε τρεις ομάδες: σε ασθενείς με μη τοξική βρογχοκήλη (NTG), σε ασθενείς με ενεργό θυρεοειδίτιδα Hashimoto (HT) και σε ασθενείς με χρόνια HT. Όπως αναφέρθηκε ήδη (παράγραφος 2.2.1), η ταξινόμηση αυτή βασίστηκε στα υπερηχογραφικά ευρήματα, στις δοκιμασίες θυρεοειδικής λειτουργίας (επίπεδα FT4, FT3, TSH, anti-TPO) και στα κυτταρολογικά ευρήματα από τις βιοψίες FNA, τα οποία περιγράφονται αναλυτικά στη συνέχεια.

α. Υπερηχογραφικά ευρήματα

Η τεχνική μελέτης του θυρεοειδούς αδένα με υπερήχους περιγράφεται αναλυτικά στην παράγραφο 2.1.2.

Στο υπερηχογράφημα του θυρεοειδούς αδένα διαπιστώθηκαν ευρήματα που συνηγορούσαν για:

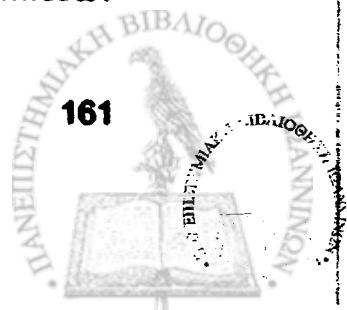
- 1) οξώδη βρογχοκήλη σε 73 ασθενείς (16 άνδρες και 57 γυναίκες) ηλικίας 18-84 ετών και
- 2) θυρεοειδίτιδα Hashimoto σε 14 ασθενείς (3 άνδρες και 11 γυναίκες) ηλικίας 15-77 ετών.

Αναλυτική περιγραφή των παραπάνω ευρημάτων που είναι χαρακτηριστικά κάθε πάθησης του θυρεοειδούς γίνεται στην παράγραφο 2.1.3.

β. Δοκιμασίες θυρεοειδικής λειτουργίας

Η μέτρηση των επιπέδων των ορμονών FT4, FT3, TSH και των αντισωμάτων anti-TPO στον ορό του αίματος των 87 ασθενών και των 36 υγίων ατόμων έγινε όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.1.2. Στην ίδια παράγραφο αναφέρονται και οι φυσιολογικές τιμές αυτών των ορμονών και των αντισωμάτων.

Με βάση τα αποτελέσματα των παραπάνω μετρήσεων, οι ασθενείς ταξινομήθηκαν σε τρεις ομάδες, που περιγράφονται στην παράγραφο 2.2.1. Ο υποκλινικός υποθυρεοειδισμός καθορίστηκε από ήπια αύξηση των επιπέδων TSH στον ορό (5-10 $\mu\text{IU/ml}$) παρουσία φυσιολογικών επιπέδων FT4 και FT3, ενώ ο κλινικός υποθυρεοειδισμός καθορίστηκε από την παρουσία χαμηλών επιπέδων



FT4 και FT3 και υψηλών επιπέδων TSH (>20 $\mu\text{IU/ml}$). Οι ασθενείς που κατατάχθηκαν στη τρίτη ομάδα (κλινικά υποθυρεοειδικοί), ήταν ευθυρεοειδικοί υπό αγωγή με θυροξίνη κατά τη στιγμή της παρούσας μελέτης.

Συγκεκριμένα, τα επίπεδα των ορμονών FT4 και TSH και των αντισωμάτων anti-TPO ήταν εντός των φυσιολογικών ορίων στους υγιείς και τους ασθενείς με NTG (όπως αυτά καθορίζονται στην παράγραφο 2.1.2). Αντίθετα, οι ασθενείς με HT στην ενεργό και τη χρόνια φάση είχαν υψηλά επίπεδα ορμόνης TSH ($7,79 \pm 8,35$ $\mu\text{IU/ml}$, mean $\pm$ SD) και θετικά anti-TPO αντισώματα ($781,55 \pm 977,16$ IU/ml).

γ. Κυτταρολογική εξέταση

Με βάση την κυτταρολογική εξέταση των δειγμάτων FNA, έγινε διάγνωση:

- 1) οζώδους βρογχοκήλης σε 73 ασθενείς (16 άνδρες και 57 γυναίκες) ηλικίας 18-84 ετών, και
- 2) θυρεοειδίτιδας Hashimoto σε 14 ασθενείς (3 άνδρες και 11 γυναίκες) ηλικίας 15-77 ετών.

Αναλυτική περιγραφή της μεθόδου γίνεται στην παράγραφο 2.1.2 και των χαρακτηριστικών κυτταρολογικών ευρημάτων κάθε θυρεοειδικής νόσου στην παράγραφο 2.1.3.

δ. Καθορισμός επιπέδων διαλυτής πρωτεΐνης sFas

Ο καθορισμός των επιπέδων της διαλυτής πρωτεΐνης sFas στον ορό των 87 ασθενών και των 36 υγιών ατόμων έγινε με την τεχνική ELISA και τη χρήση αντισωμάτων anti-Fas, ενώ η σύγκριση μεταξύ των διαφορετικών ομάδων έγινε με τη χρήση της δοκιμασίας t-test (παράγραφος 2.2.2).

Οι ασθενείς με μη τοξική βρογχοκήλη (NTG) παρουσίασαν αξιοσημείωτα αυξημένη συγκέντρωση της διαλυτής πρωτεΐνης sFas ($8,75 \pm 3,69$ ng/ml, mean $\pm$ SD), τόσο σε σύγκριση με τους υγιείς ($4,96 \pm 5,03$ ng/ml, $p < 0,05$, 95% Confidence Interval 1,86 έως 5,71) όσο και με τους ασθενείς με θυρεοειδίτιδα Hashimoto (HT), είτε αυτοί ήταν στην ενεργό φάση της νόσου ($1,48 \pm 0,6$ ng/ml, $p = 0,037$, 95% CI $-8,37$ έως $-6,34$), είτε στη χρόνια ($6,71 \pm 1,1$, $p = 0,025$, 95% CI $-8,37$ έως $-6,34$).



Τα χαμηλότερα επίπεδα πρωτεΐνης sFas βρέθηκαν στους ασθενείς στην ενεργό φάση της HT, σε σύγκριση με αυτούς στη χρόνια φάση της νόσου ($p < 0,05$, 95% CI 4,24 έως 6,22), τους υγιείς ($p = 0,004$, 95% CI -5,27 έως -1,70) και τους ασθενείς με NTG. Αντίθετα, δε διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα sFas μεταξύ των ασθενών με HT στη χρόνια φάση και των υγιών ατόμων (Πίνακας 13, εικόνες 57,58).

ε. Συσχέτιση επιπέδων sFas με φύλο και ηλικία

Η πιθανή εξάρτηση των επιπέδων sFas από το φύλο ή την ηλικία των εξεταζόμενων ατόμων διερευνήθηκε με τη χρήση της δοκιμασίας t-test (παράγραφος 2.2.2).

Τα άτομα κάθε ομάδας ταξινομήθηκαν ανάλογα με το φύλο τους και έγινε σύγκριση της συγκέντρωσης (στον ορό) της παραπάνω πρωτεΐνης μεταξύ ανδρών και γυναικών κάθε ομάδας. Όπως φαίνεται από τις επιμέρους συγκεντρώσεις sFas κατά ομάδα και φύλο (Πίνακας 13, εικόνα 59), δε διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ ανδρών και των γυναικών της αντίστοιχης ομάδας, κατά συνέπεια τα επίπεδα sFas δεν εξαρτώνται από το φύλο.

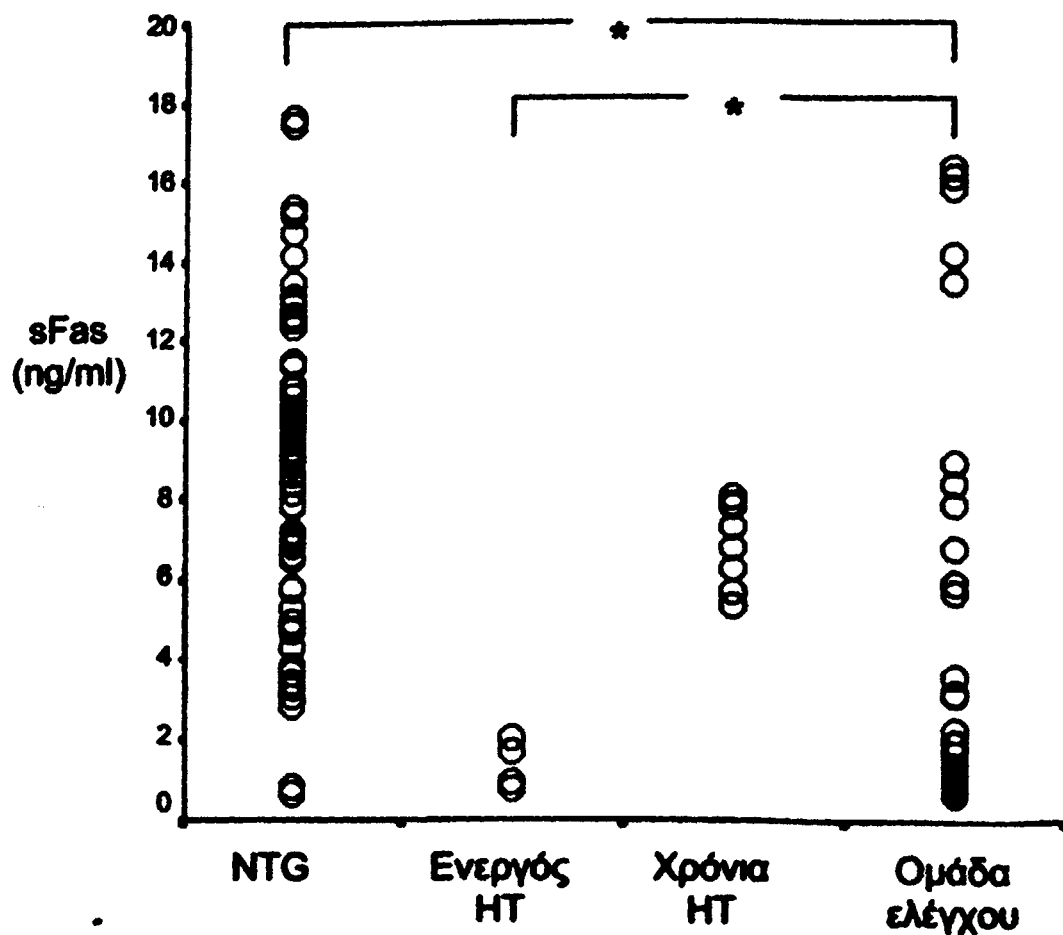
Η ηλικία των ασθενών με HT στην ενεργό φάση της νόσου ($37,33 \pm 20,7$ ετών, mean $\pm$ SD) και στη χρόνια ($44,2 \pm 19,0$ ετών) δε differed στατιστικά από την ηλικία των φυσιολογικών ατόμων ($41,41 \pm 14,48$ ετών). Οι ασθενείς, όμως, με NTG ήταν μεγαλύτεροι σε ηλικία από τους υγιείς ($51,15 \pm 16,31$ έναντι $41,41 \pm 14,48$ ετών, $p < 0,05$, 95% CI 3,38 έως 16,08). Δημιουργήθηκε, λοιπόν, το ερώτημα, εάν η διαφορά στη συγκέντρωση sFas των ασθενών με NTG σε σύγκριση με τα φυσιολογικά άτομα της ομάδας ελέγχου οφείλεται στη διαφορετική ηλικία τους. Δεν βρέθηκε, όμως, καμία εξάρτηση των επιπέδων sFas ορού από την ηλικία των υγιών ατόμων ($r = 0,043$, $p = 0,805$) (εικόνα 60), οπότε η αύξηση των επιπέδων sFas των ασθενών με NTG δεν μπορεί να αποδοθεί στη μεγαλύτερη ηλικία τους σε σχέση με τους υγιείς.

Πίνακας 13:

Δημογραφικά δεδομένα και επίπεδα sFas (mean $\pm$ SD) στα 2 φύλα κάθε ομάδας εξεταζόμενων ατόμων

	N	Θ/Α	Ηλικία (έτη)	sFas (ng/ml)	sFas (Θ/Α) (ng/ml)
NTG	73	57/16	51,15 $\pm$ 16,31 *	8,75 $\pm$ 3,69 *	8,64 $\pm$ 3,47 */9,53 $\pm$ 4,00*
ενεργός HT	5	4/1	37,33 $\pm$ 20,70	1,48 $\pm$ 0,60 *	1,42 $\pm$ 0,67*/1,71 *
χρόνια HT	9	7/2	44,20 $\pm$ 19,00	6,71 $\pm$ 1,10	6,36 $\pm$ 0,97/7,95 $\pm$ 0,12
Ομάδα ελέγχου	36	21/15	41,41 $\pm$ 14,48	4,96 $\pm$ 5,03	4,17 $\pm$ 4,85 /6,08 $\pm$ 5,24

- $p < 0,05$ έναντι των αντίστοιχων τιμών της ομάδας ελέγχου
- NTG: non-toxic goiter, μη τοξική βρογχοκήλη
- HT: Hashimoto's thyroiditis, θυρεοειδίτιδα Hashimoto

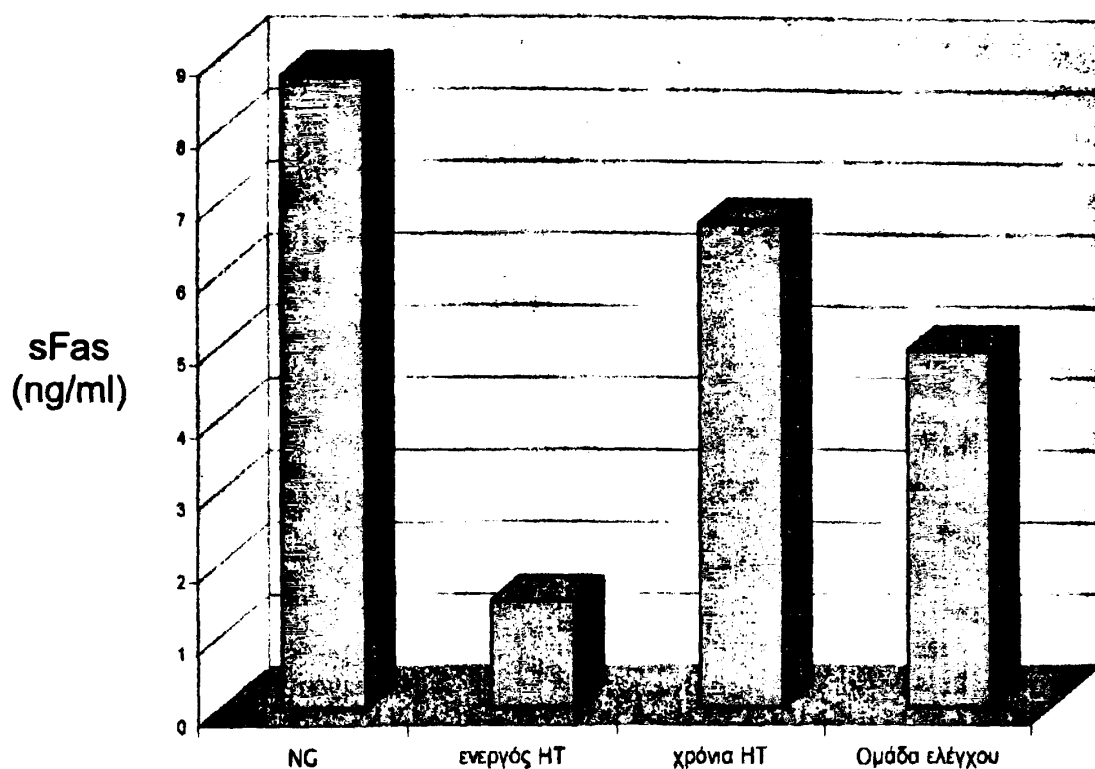


Εικόνα 57

Εξατομικευμένες τιμές πρωτεΐνης sFas στον ορό

Η συγκέντρωση sFas βρέθηκε υψηλότερη στα άτομα με μη τοξική βρογχίτιδα (NTG) και χαμηλότερη στους ασθενείς με θυρεοειδίδα Hashimoto (HT) στην ενεργό φάση σε σύγκριση με τα φυσιολογικά άτομα που αποτελούν την ομάδα ελέγχου. Αντίθετα, δε διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα sFas μεταξύ των ασθενών με HT στη χρόνια φάση και των υγιών ατόμων.

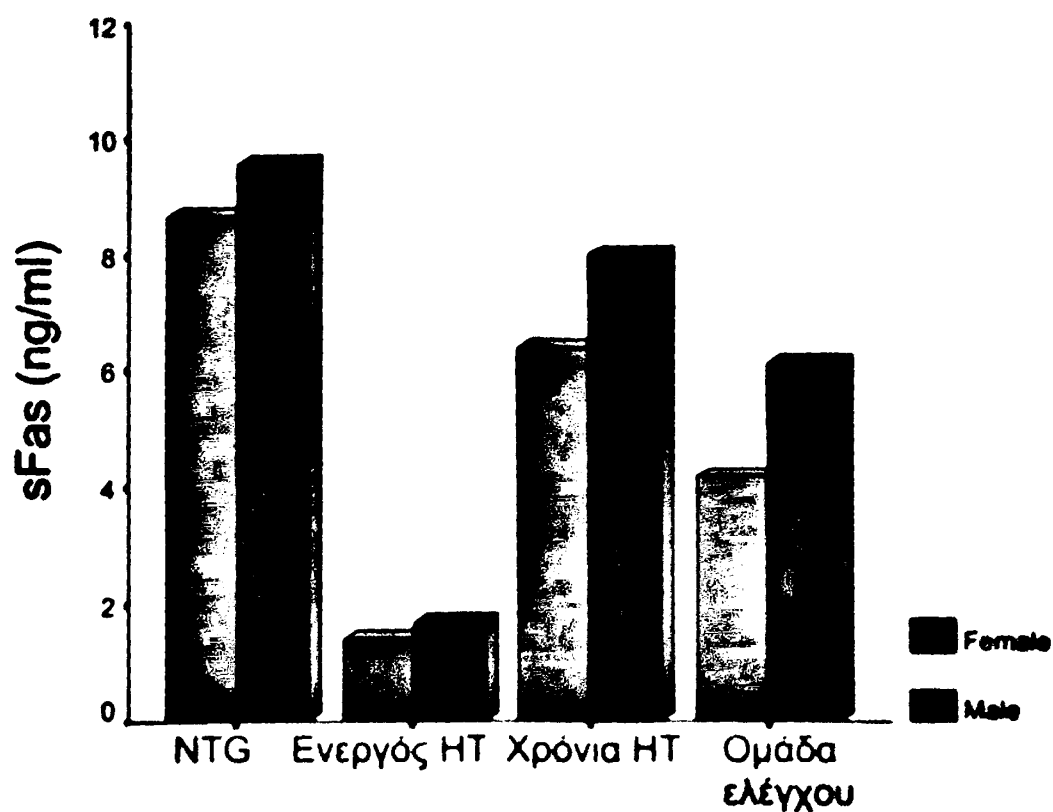
* $p < 0,05$



Εικόνα 58

Συγκέντρωση πρωτεΐνης sFas στον ορό

Κάθε μπάρα αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή των συγκεντρώσεων της πρωτεΐνης sFas στον ορό των ατόμων που ανήκουν στην αντίστοιχη ομάδα. Η συγκέντρωση sFas βρέθηκε υψηλότερη στα άτομα με μη τοξική βρογχοκήλη (NTG) και χαμηλότερη στους ασθενείς με θυρεοειδίτιδα Hashimoto (HT) στην ενεργό φάση σε σύγκριση με τα φυσιολογικά άτομα που αποτελούν την ομάδα ελέγχου. Αντίθετα, δε διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα sFas μεταξύ των ασθενών με HT στη χρόνια φάση και των υγιών ατόμων.

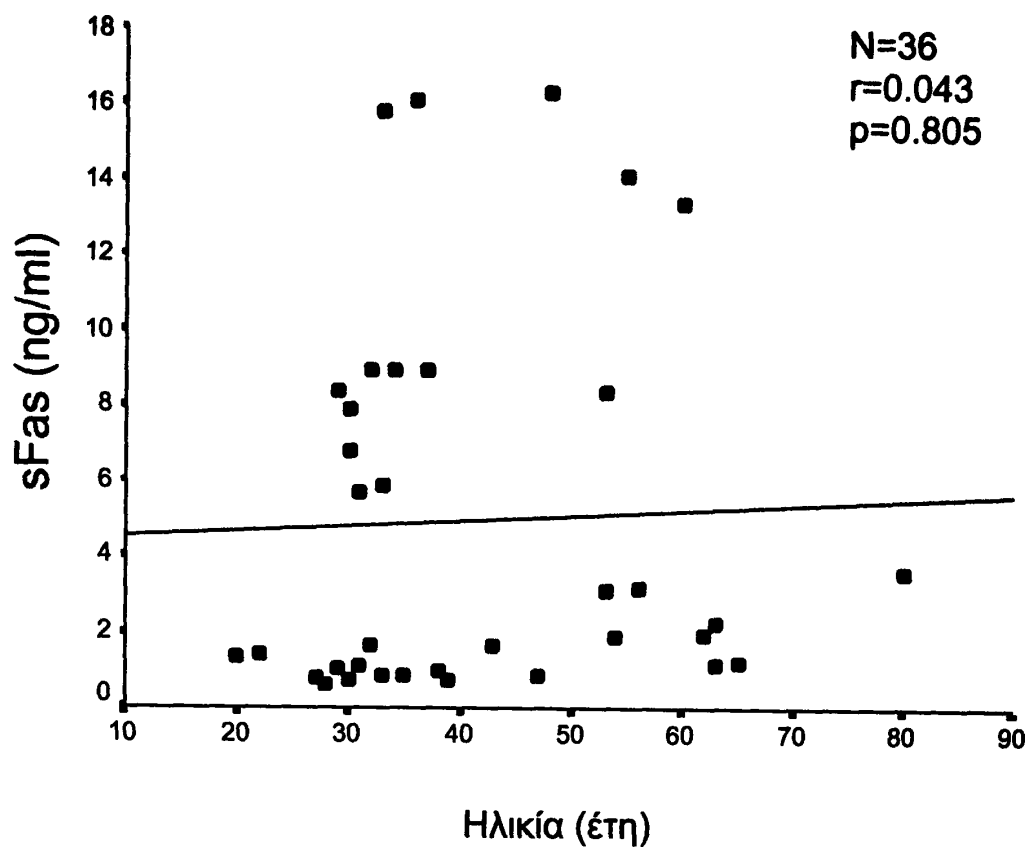


Εικόνα 59

Συγκέντρωση διαλυτής πρωτεΐνης sFas κατά φύλο και ομάδα

Κάθε μπάρα αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή της συγκέντρωσης sFas (σε ng/ml) κάθε φύλου και ομάδας εξεταζόμενων ατόμων. Δε διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα sFas μεταξύ ανδρών και γυναικών σε οποιαδήποτε από τις τέσσερις ομάδες.

- NTG: non-toxic goiter, μη τοξική βρογχοκήλη
- HT: Hashimoto's thyroiditis, θυρεοειδίτιδα Hashimoto



Εικόνα 60

Συσχέτιση επιπέδων sFas ορού με ηλικία

Δε διαπιστώθηκε σημαντική εξάρτηση των επιπέδων sFas του ορού από την ηλικία των 36 φυσιολογικών ατόμων, που αποτελούν την ομάδα ελέγχου ($r=0,043$, $p=0,805$).

στ. Συσχέτιση επιπέδων sFas ορού με κλινικές παραμέτρους

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, τα επίπεδα των ορμονών FT4 και TSH και των αντισωμάτων anti-TPO ήταν εκτός των φυσιολογικών ορίων (όπως αυτά καθορίζονται στην παράγραφο 2.1.2) μόνο στους 14 ασθενείς με HT (5 στην ενεργό και 9 στη χρόνια φάση της νόσου). Αποφασίστηκε, λοιπόν, να διερευνηθεί η πιθανή εξάρτηση των επιπέδων sFas από τις παραπάνω κλινικές παραμέτρους στη συγκεκριμένη ομάδα ασθενών.

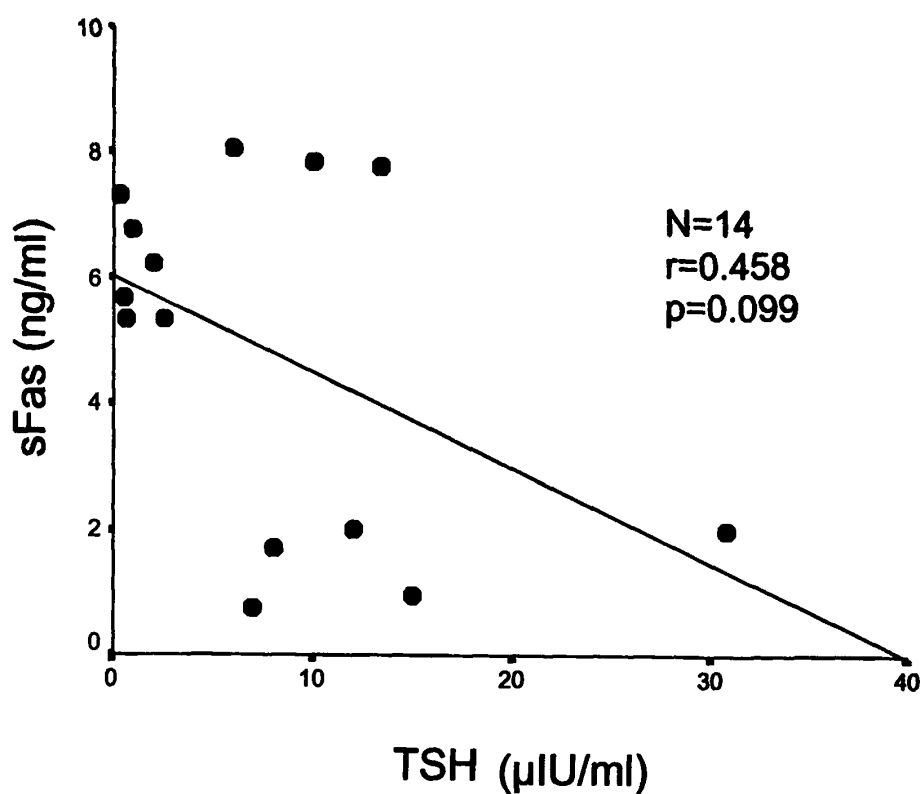
Με τη χρήση της δοκιμασίας t-test (παράγραφος 2.2.2), δε διαπιστώθηκε καμία στατιστικά σημαντική εξάρτηση μεταξύ των επιπέδων της διαλυτής πρωτεΐνης sFas και της ορμόνης TSH στον ορό ($r=0,458$ $p=0,099$) (εικόνα 61). Αντίθετα, διαπιστώθηκε αρνητική γραμμική εξάρτηση των επιπέδων sFas από τα επίπεδα των αντισωμάτων anti-TPO στον ορό των παραπάνω 14 ασθενών ($r=0,755$, $p=0,002$) (εικόνα 62).

ζ. Καθορισμός των επιπέδων της διαλυτής πρωτεΐνης sFasL

Ο καθορισμός των επιπέδων της διαλυτής πρωτεΐνης sFas Ligand στον ορό των 87 ασθενών και των 36 υγών ατόμων έγινε με την τεχνική ELISA και τη χρήση αντισωμάτων anti-FasL, ενώ η σύγκριση μεταξύ των διαφορετικών ομάδων έγινε με τη χρήση της δοκιμασίας χ^2 (παράγραφος 2.2.2).

Τα επίπεδα sFasL στην πλειοψηφία των ασθενών και υγών ατόμων βρέθηκαν χαμηλότερα από 0,12 ng/ml (που είναι το κατώτερο όριο ανίχνευσης της μεθόδου για την πρωτεΐνη sFasL) και θεωρούνται φυσιολογικά σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία (εικόνα 63). Αναλυτικά, τα παραπάνω αποτελέσματα αφορούν 61 ασθενείς με NTG, 4 με ενεργό HT, 9 με χρόνια HT και 34 φυσιολογικά άτομα.

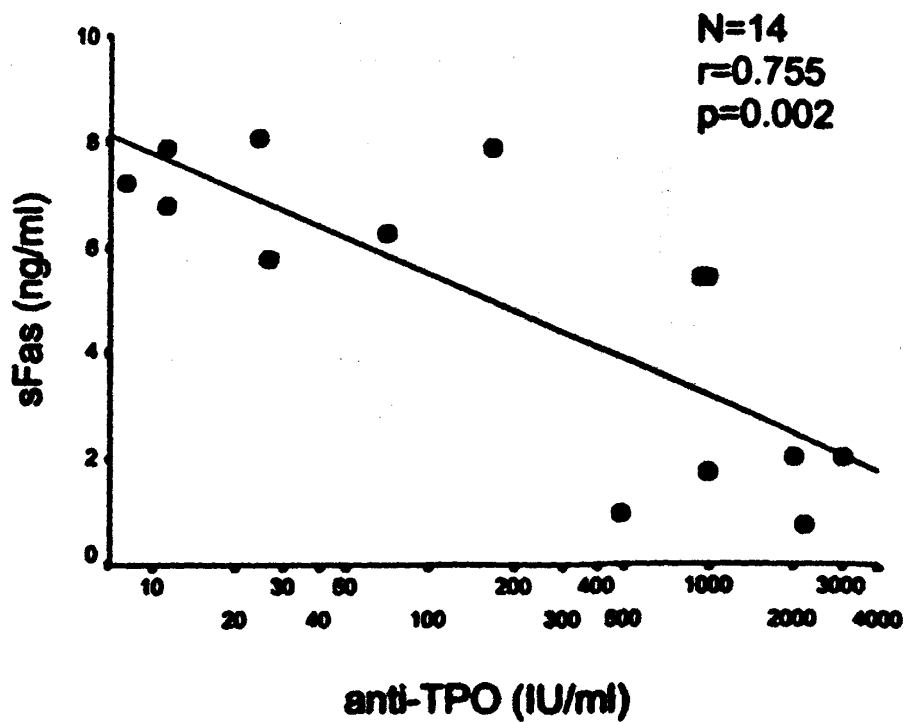
Επίπεδα sFasL υψηλότερα από 0,12 ng/ml διαπιστώθηκαν μόνο σε 12 από τους 73 ασθενείς (16,43%) με NTG, σε 1 από τους 5 ασθενείς (20%) με HT στην ενεργό φάση της νόσου και σε 2 από τους 36 υγιείς (5,55%). Από τη στατιστική ανάλυση αυτών των αποτελεσμάτων προκύπτει ότι σε σύγκριση με τα φυσιολογικά άτομα, δε διέφεραν τα επίπεδα sFasL, ούτε στους ασθενείς με NTG ($\chi^2=0,007$, $df=1$, 95% CI -0,034 έως 0,218), ούτε στους ασθενείς με HT στην ενεργό φάση της νόσου ($\chi^2=0,010$, $df=1$, 95% CI -0,062 έως 0,571).



Εικόνα 61

Συσχέτιση επιπέδων sFas με τα επίπεδα της ορμόνης TSH στον ορό

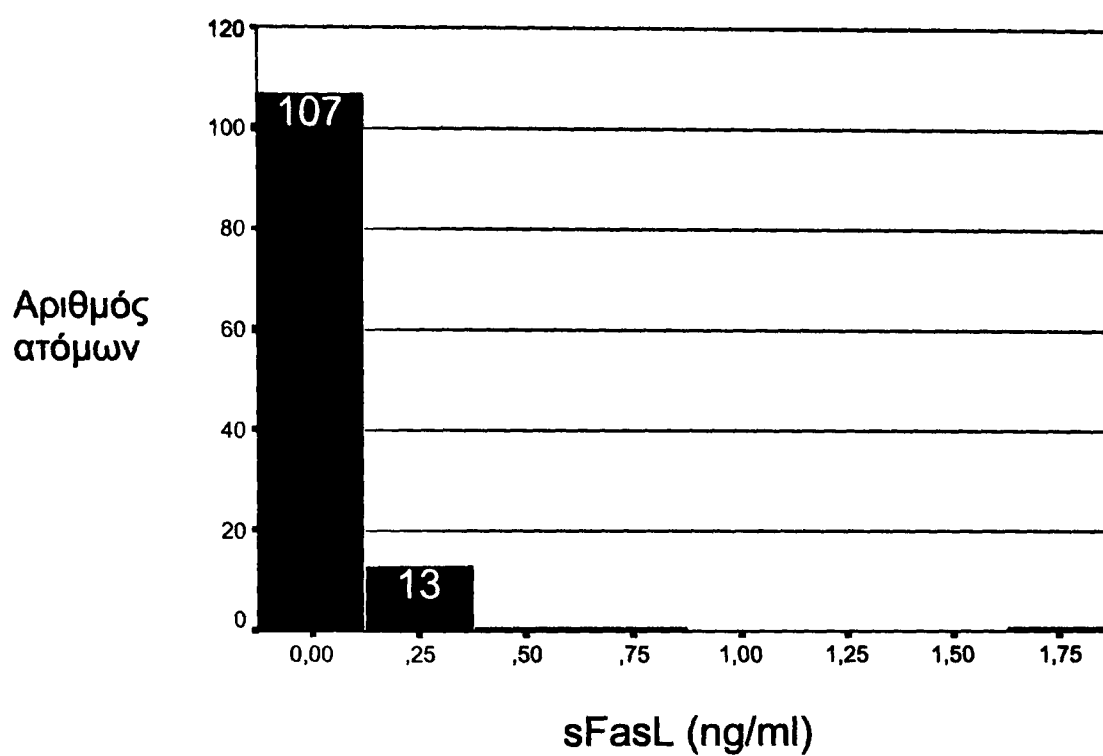
Δε διαπιστώθηκε σημαντική εξάρτηση των επιπέδων στον ορό της διαλυτής πρωτεΐνης sFas από τα αντίστοιχα επίπεδα της ορμόνης TSH στους 14 ασθενείς με θυρεοειδίτιδα Hashimoto (5 στην ενεργό και 9 στη χρόνια φάση της νόσου) ($r=0,458$ $p=0,099$).



Εικόνα 62

Συσχέτιση επιπέδων πρωτεΐνης sFas και αντισωμάτων anti-TPO

Διαπιστώθηκε αντίστροφη εξάρτηση των επιπέδων sFas από τα επίπεδα των αντισωμάτων anti-TPO στον ορό των 14 ασθενών με θυρεοειδίδα Hashimoto (5 στην ενεργό και 9 στη χρόνια φάση της νόσου) ($r=-0,755$, $p=0,002$).



Εικόνα 63

Ιστόγραμμα συγκέντρωσης πρωτεΐνης sFasL στον ορό των εξεταζόμενων ατόμων

Επίπεδα sFasL υψηλότερα από 0,12 ng/ml διαπιστώθηκαν 12 από τους 73 ασθενείς (16,43%) με NTG, σε 1 από τους 5 ασθενείς (20%) με HT στην ενεργό φάση της νόσου και σε 2 από τους 36 υγιείς (5,55%).

2.3 Ανίχνευση mRNA πρωτεϊνών Fas και Fas Ligand σε θυρεοειδικά κύτταρα

2.3.1 Ασθενείς

Στη μελέτη μας συμπεριλήφθηκαν συνολικά 23 ασθενείς: 1) 18 ασθενείς (2 άνδρες και 16 γυναίκες) ηλικίας 19-79 ετών, με απλή μη τοξική μονο- ή πολυοζώδη βρογχοκήλη (NTG) και 2) 5 ασθενείς (γυναίκες) ηλικίας 43-70 ετών με βρογχοκήλη θυρεοειδίτιδας Hashimoto (HT) στην ενεργό φάση της νόσου.

Η κλινική διάγνωση βασίστηκε στην κλινική εξέταση, το υπερηχογράφημα, στις δοκιμασίες θυρεοειδικής λειτουργίας (FT3, FT4, TSH) και στην κυτταρολογική εξέταση των δειγμάτων FNA. Στους ασθενείς με θυρεοειδίτιδα Hashimoto η διάγνωση βασίστηκε στην χαρακτηριστική υπερηχογραφική εικόνα που δίνει το θυρεοειδικό παρέγχυμα, την παρουσία anti-TPO αντισωμάτων και τον υποκλινικό υποθυρεοειδισμό. Δημιουργήθηκε ξεχωριστό αρχείο για κάθε ασθενή και καταγράφηκαν όλα τα σχετικά κλινικά και εργαστηριακά στοιχεία.

2.3.2 Μέθοδοι

α. Υπερηχογράφημα θυρεοειδούς αδένος

Η μέθοδος περιγράφεται αναλυτικά στην παράγραφο 2.1.2 α.

β. Συλλογή δειγμάτων

Ελήφθησαν 7 ml αίματος από κάθε ασθενή μετά από ολονύχτια νηστεία, από τα οποία:

- 1) τα 2 ml μεταφέρθηκαν σε σωληνάρια που περιέχουν 40 μl K₃EDTA 7,5%, για να ακολουθήσει διαχωρισμός των κυττάρων με Ficoll, και
- 2) τα υπόλοιπα 5 ml φυγοκεντρήθηκαν για τη λήψη ορού αίματος.

Η φυγοκέντρηση των δειγμάτων έγινε στη φυγόκεντρο *Labofuge GL, Heraeus* σε 1800 rpm (στροφές το λεπτό) για 20 λεπτά και ακολούθησε μεταφορά κάθε δείγματος σε μικροφυγοκεντρικό σωλήνα χωρητικότητας 2 ml (ependorfs), για να γίνουν οι δοκιμασίες θυρεοειδικής λειτουργίας.

γ. Δοκιμασίες θυρεοειδικής λειτουργίας

Η μέτρηση των επιπέδων των ορμονών FT4, FT3, TSH και των αντισωμάτων anti-TPO έγινε όπως αναφέρθηκε ήδη στην παράγραφο 2.1.2 β.

δ. Κυτταρολογική εξέταση υλικού FNA θυρεοειδούς

Η μέθοδος περιγράφεται αναλυτικά στην παράγραφο 2.1.2 δ.

ε. Υλικά

- Ψυχόμενη μικροφυγόκεντρος (Universal 16R, Hettich Zentrifugen)
- Φυγόκεντρος (Labofuge GL, Heraeus)
- Μικροφυγόκεντρος (ABBOTT Laboratories)
- Vortex
- Δοκιμαστικοί σωλήνες χωρητικότητας 10 ml
- Μικροφυγοκεντρικοί σωλήνες χωρητικότητας 2 ml (Eppendorfs)
- Κρυοσωλήνες (cryovials) χωρητικότητας 2 ml (PK-100, Self standing and round bottom, T309-2A, Simport Plastics, Quebec, Canada)
- Μικροφυγοκεντρικοί σωλήνες 0,2 ml (MicroAmp Reaction tubes with Cap, Perkin Elmer Applied Biosystems, California, USA, Part No N801-0540)
- Θερμοστατούμενος θάλαμος
- Υδατόλουτρο
- Συσκευή θερμοκυκλοποιητή Gene Amp PCR System 9700 (Perkin-Elmer Applied Biosystems, California, USA)
- Οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης
- Τροφοδοτικό EC 105 (E-C Apparatus Corporation, St Petersburg, Florida)
- Συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας Vilber Lourmat (Marne La Valle, Cedex 1, France)
- Ψηφιακή μηχανή KODAK digital science DC 120 και ηλεκτρονικός επεξεργαστής (Electrophoresis Documentation and Analysis System, KODAK Digital Science)



στ. Διαλύματα

Δίνονται οι συγκεντρώσεις των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν, ο τρόπος παρασκευής τους και οι συνθήκες αποθήκευσής τους:

> DEPC

Όλα τα διαλύματα του RNA περιέχουν DEPC (δαιθυλοπυρανθρακική ομάδα), γιατί είναι ισχυρός αναστολέας των ριβονουκλεασών.

> Απεσταγμένο-απιονισμένο νερό (dH₂O)

> Διάλυμα TBE (Tris-Borate)

Το διάλυμα παρασκευάζεται σε συγκέντρωση 10 φορές μεγαλύτερη (10x) και φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου. Το τελικό διάλυμα (1x) παρασκευάζεται λίγο πριν την ηλεκτροφόρηση με κατάλληλη αραίωση του διαλύματος (10x).

Αναλυτικά, για 1 lt ζυγίζονται:

- 108 g Tris Base
- 55 g βορικού οξέος
- 40 ml 0,5 M EDTA.

Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στο 8,0 και ο τελικός όγκος του ρυθμίζεται στο 1 lt με απιονισμένο νερό.

> Διάλυμα Βρωμιούχου Αιθιδίου : stock 10 mg/ml

Η διατήρηση του διαλύματος βρωμιούχου αιθιδίου γίνεται στους 4 ° C.

> G.L.B (ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης)

- 0,25% w/v κυανούν της βρωμοφαινόλης (bromophenol blue)
- (6x tyrell) 0,25% w/v κυανολικό ξυλένιο (xylene cyanol)
- 30% γλυκερόλη

Η διατήρηση του συγκεκριμένου ρυθμιστικού διαλύματος φόρτωσης γίνεται στους 4° C.

> Διάλυμα PBS (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων) (pH=7,4)

Για 1 lt ζυγίζονται:

- 8 g NaCl
- 0,2 g KCl
- 1,44 g Na₂HPO₄
- 0,24 g KH₂PO₄

Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στο 7,4 και ο τελικός όγκος του στο 1 lt με αποιονισμένο νερό. Το διάλυμα αυτό χρειάζεται αποστείρωση.

Η διατήρηση του διαλύματος αυτού γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου.

ζ. Απομόνωση RNA:

Η απομόνωση RNA απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή, γάντια και ξεχωριστά αποστειρωμένα διαλύματα, γιατί το μόριο είναι εξαιρετικά ευαίσθητο στη δράση των ριβονουκλεασών, που υπάρχουν παντού και ιδιαίτερα στα χέρια μας.

Α) Απομόνωση κυττάρων αίματος με διαχωρισμό FICOLL

1. Κάθε δείγμα αίματος (2 ml) μεταφέρεται σε δοκιμαστικό σωλήνα των 10 ml και προστίθεται ίσος όγκος ρυθμιστικού διαλύματος PBS (pH 7,4).
2. Σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα τοποθετείται μια υάλινη πιπέττα Pasteur και προστίθενται 2 ml Ficoll Hyraque για να γίνει ο διαχωρισμός.
3. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες φυγοκεντρούνται στις 1800 rpm για 20 λεπτά. Η φυγοκέντρηση σταματά χωρίς φρένο προκειμένου να μη διαταραχθούν οι κλίσεις πυκνότητας που έχουν σχηματιστεί από το Ficoll.
4. Μετά το τέλος της φυγοκέντρησης αφαιρείται με προσοχή η μεσαία φάση που περιέχει όλα τα μονοπύρηνια του αίματος.
5. Ακολουθεί προσθήκη 5-6 ml διαλύματος PBS, ανακίνηση και φυγοκέντρηση στις 2000 στροφές για 10 λεπτά.
6. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και προστίθενται 5 ml PBS στον ίδιο δοκιμαστικό σωλήνα.
7. Ακολουθεί νέα φυγοκέντρηση στις 2000 rpm για 10 λεπτά, και στη συνέχεια το υπερκείμενο απομακρύνεται.
8. Προστίθεται 1 ml PBS στον ίδιο δοκιμαστικό σωλήνα, και το μείγμα αναδεύεται στο Vortex.
9. Το εναιώρημα των κυττάρων μεταφέρεται σε μικροφυγοκεντρικό σωλήνα και φυγοκεντρείται για 3 λεπτά.
10. Μετά την απομάκρυνση του υπερκειμένου οι μικροφυγοκεντρικοί σωλήνες με τα εμπύρηνια κύτταρα (λεμφοκύτταρα και μονοκύτταρα) φυλάσσονται στους -70° C μέχρι να γίνει η απομόνωση του RNA.



- Οι φυγοκεντρήσεις στο στάδιο αυτό πραγματοποιήθηκαν στη φυγόκεντρο Labofuge GL, Heraeus.

B) Απομόνωση RNA από κύτταρα αίματος

Το αντιδραστήριο TriPure Isolation Reagent (Boehringer Mannheim Corporation, Mannheim, Germany, Cat No 1667 165, 200 ml) είναι ερυθρού χρώματος μονοφασικό διάλυμα φαινόλης και ισοθειοκυανιούχου γουανιδίνης. Επιτρέπει την απομόνωση του ολικού RNA, του DNA και των πρωτεϊνών από το ίδιο δείγμα με διαχωρισμό υγρής φάσεως ενός βήματος. Η διαδικασία αποτελεί μια βελτίωση της μεθόδου απομόνωσης RNA ενός βήματος που ανέπτυξαν οι Chomczynski και Sacchi (1987) (Sambrook και συν., τόμος 1ος, κεφ.7).

Το αντιδραστήριο TriPure Isolation Reagent διατηρείται στους -4°C και πρέπει να αποφεύγεται η έκθεσή του στο φως για χρονικό διάστημα ημερών. Επίσης, χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή κατά τη χρήση του, καθώς είναι τοξικό και μπορεί να προκαλέσει εγκαύματα κατά την επαφή του με το δέρμα. Συνιστάται η χρήση γαντιών, η προφύλαξη των ματιών και η αποφυγή εισπνοής των ατμών που προέρχονται από αυτό.

1. Τα κύτταρα που προέκυψαν από το δαιχωρισμό Ficoll επανακυρώνονται σε 1 ml TriPure.
2. Μετά από παραμονή για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (RT), προστίθενται 200 μl χλωροφορμίου, σχηματίζονται δύο φάσεις, από τις οποίες η επάνω φάση (υδατική) περιέχει το RNA.
3. Ακολουθεί παραμονή για 15 λεπτά σε RT και ανακίνηση με Vortex για 2 λεπτά.
4. Μετά από φυγοκέντρωση στις 15000 rpm για 15 λεπτά παρατηρούνται τρεις φάσεις στο errendorf. Από αυτές η επάνω φάση που περιέχει το RNA μεταφέρεται σε νέο μικροφυγοκεντρικό σωλήνα. Μπορεί να συμβεί αναστροφή φάσης και η υδατική φάση με το RNA να καταβυθιστεί. Το TriPure, όμως, περιέχει φαινόλη, η οποία προσδίδει κόκκινο χρώμα, οπότε μεταφέρεται πάντα η διαυγής φάση με το RNA.

5. Στη διαυγή φάση που περιέχει το RNA προστίθενται 0.5 ml ισοπροπανόλης και ακολουθεί ανάδευση.
 6. Το εναιώρημα παραμένει στους -20°C για 20 λεπτά.
 7. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 15000 rpm για 10 λεπτά και απομάκρυνση του υπερκείμενου.
 8. Το ίζημα εκπλένεται μία φορά με 1 ml 75% αιθανόλη/DEPC και γίνεται ανάδευση στο Vortex.
 9. Μετά από φυγοκέντρηση στις 10000 rpm για 5 λεπτά, το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα τοποθετείται στο θερμοστατούμενο θάλαμο (60°C) για να στεγνώσει.
 10. Τέλος, το ίζημα RNA επαναιωρείται σε 100 μl dH₂O/DEPC και το διάλυμα παραμένει για 15 λεπτά σε υδατόλουτρο στους 60°C για να γίνει καλή διάλυση.
- Οι φυγοκεντρήσεις στο στάδιο αυτό έγιναν στην ψυχόμενη μικροφυγόκεντρο (4°C).
 - Καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας αλλάζουμε συχνά γάντια για να αποφύγουμε την επιμόλυνση με τις ριβονουκλεάσες.

Γ) Απομόνωση RNA από υλικό FNA θυρεοειδούς αδένος

1. με TriPure Isolation Reagent:

Πρωτόκολλο εκτέλεσης

1. Τα δείγματα που λαμβάνονται από την παρακέντηση του θυρεοειδούς (FNA) τοποθετούνται σε σωλήνες cryovials χωρητικότητας 2 ml (PK-100, Self standing and round bottom, T309-2A, Simport Plastics, Quebec, Canada) και εμβυθίζονται αμέσως μετά σε υγρό άζωτο (-70°C) για λίγα δευτερόλεπτα. Στη συνέχεια διατηρούνται σε θερμοκρασία -80°C μέχρι να γίνει η απομόνωση RNA.
2. Σε κάθε δείγμα προστίθενται 200 μl TriPure Isolation Reagent και μετά την επαναιώρηση μεταφέρεται σε μικροφυγοκεντρικό σωλήνα.
3. Ακολουθεί νέα προσθήκη 200 μl TriPure, ανάμιξη με πιπέτα και παραμονή για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (RT).
4. Στο παραπάνω μίγμα προστίθενται 100 μl χλωροφορμίου, ακολουθεί ανάδευση στο Vortex και παραμονή για 3 λεπτά σε RT.



5. Γίνεται φυγοκέντρωση στις 15000 rpm για 15 λεπτά, και η υδατική φάση μεταφέρεται σε νέο μικροφυγοκεντρικό σωλήνα.
 6. Προστίθενται 250 μl ισοπροπυλική αλκοόλη και ακολουθεί ανάδευση στο Vortex.
 7. Μετά από νέα φυγοκέντρωση στις 15000 rpm για 15 λεπτά, το υπερκείμενο απομακρύνεται.
 8. Το ίζημα του RNA εκπλένεται με 500 μl διαλύματος 70% αιθανόλης.
 9. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 10000 rpm για 10 λεπτά, το υπερκείμενο απομακρύνεται και ο μικροφυγοκεντρικός σωλήνας τοποθετείται σε θερμοστατούμενο θάλαμο (60° C) ώστε να απομακρυνθεί όλη η αιθανόλη.
 10. Τέλος το ίζημα επαναιωρείται σε 50 μl dH₂O/DEPC.
- Οι φυγοκεντρήσεις στο στάδιο αυτό έγιναν στην ψυχόμενη μικροφυγόκεντρο (4° C).
 - Η ισοθειοκυανιούχος γουανιδίνη, που είναι συστατικό του Trizure Isolation Reagent, απελευθερώνει το RNA από τη σύνδεσή του με τις ριβοπρωτεΐνες και παράλληλα απενεργοποιεί τις ριβονουκλεάσες.

2. με το RNeasy mini kit (50)(QIAGEN, Maryland, USA, Cat No 74104):

Τα διαλύματα που παρέχονται από τον κατασκευαστή του συγκεκριμένου πακέτου υλικού (kit) είναι τα εξής:

- Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης RLT (45 ml).
- Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης RW1 (45 ml).

Και τα δύο διαλύματα RLT και RW1 περιέχουν ισοθειοκυανιούχο γουανιδίνη, γι' αυτό και χρειάζεται προσοχή κατά τη χρήση τους.

- Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης RPE (11 ml). Το διάλυμα αυτό αναμιγνύεται με 44 ml αιθανόλης 100% πριν από την έναρξη της τεχνικής.

Πρωτόκολλο εκτέλεσης

1. Στα δείγματα FNA προστίθενται 350 μl ρυθμιστικού διαλύματος λύσης (RLT Lysis buffer), γίνεται προσεκτική ανάμιξη για 2 λεπτά με τη βοήθεια πιπέτας και ανάδευση στο Vortex.

2. Ακολουθεί η προσθήκη 350 μ l 75% EtOH/DEPC και ανάδευση με πιπέτα και Vortex όπως προηγουμένως.
3. Το εναιώρημα που προκύπτει μεταφέρεται σε στήλη QIAamp (που περιλαμβάνεται στο πακέτο υλικών) η οποία είναι τοποθετημένη επάνω σε σωληνάριο των 2 ml.
4. Ακολουθεί σύντομη φυγοκέντρηση στις 10000 rpm για 15 δευτερόλεπτα.
5. Στη συνέχεια η στήλη μεταφέρεται σε καθαρό σωληνάριο των 2 ml, προστίθενται 700 μ l διαλύματος πλύσης (RW1 Wash buffer) και επαναλαμβάνεται σύντομη φυγοκέντρηση στις 10000 rpm για 15 δευτερόλεπτα.
6. Η στήλη μεταφέρεται σε καθαρό σωληνάριο των 2 ml και προστίθενται 500 μ l διαλύματος πλύσης με αιθανόλη (RPE Wash buffer with ethanol). Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 10000 rpm για 15 δευτερόλεπτα.
7. Η στήλη μεταφέρεται σε καθαρό σωληνάριο των 2 ml και γίνεται νέα έκπλυση με 500 μ l διαλύματος πλύσης με αιθανόλη RPE. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 10000 rpm για 2 λεπτά.
8. Η στήλη μεταφέρεται σε καθαρό σωληνάριο των 2 ml και γίνεται νέα φυγοκέντρηση στις 10000 rpm για 1 λεπτό για να απομακρυνθεί και το υπόλοιπο υγρό.
9. Ακολουθεί στέγνωμα του ιζήματος σε θερμοστατούμενο θάλαμο (60° C).
10. Η στήλη μεταφέρεται τέλος σε νέο μικροφυγοκεντρικό σωλήνα 2 ml. Προστίθενται 50 μ l dH₂O/DEPC, γίνεται φυγοκέντρηση στις 10000 rpm για 1 λεπτό και το δείγμα αποθηκεύεται στους -80° C μέχρι την επεξεργασία του.

η. Απομόνωση DNA από δείγμα αίματος με TriPure Isolation Reagent

Αφού μεταφερθεί η επάνω φάση με το RNA σε νέο μικροφυγοκεντρικό σωλήνα, ακολουθεί η απομόνωση του DNA.

1. Στη μεσαία και στην οργανική φάση προστίθενται 300 μ l αιθανόλη (EtOH) 100%.
2. Γίνεται ανάδευση και παραμονή για 2 λεπτά σε RT.
3. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 6000 rpm για 5 λεπτά και απομακρύνεται το υπερκείμενο που περιέχει φαινόλη, αιθανόλη και πρωτεΐνες.



4. Στη συνέχεια, προστίθεται 1 ml διαλύματος κτρικού νατρίου (NaCitrate 0,1 M σε 10% αιθανόλη), γίνεται ανακίνηση και επώαση για 30 λεπτά σε RT.
 5. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 4000 rpm για 5 λεπτά και απομάκρυνση του υπερκειμένου.
 6. Ακολουθούν τρεις πλύσεις με 1 ml διαλύματος NaCitrate. Η διαδικασία είναι η ίδια όπως στα βήματα 4 και 5.
 7. Τελικά γίνεται επανακώρηση σε 1,5 ml EtOH 75% και επώαση για 10-20 λεπτά σε RT.
 8. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 4000 rpm για 5 λεπτά, απομάκρυνση του υπερκειμένου, και το ίζημα παραμένει σε θερμοστατούμενο θάλαμο (60° C) μέχρι να στεγνώσει πλήρως. Η απομάκρυνση της αιθανόλης είναι απαραίτητη διότι είναι αναστολέας του ενζύμου Taq πολυμεράση.
 9. Η τελική επαναδιάλυση του ιζήματος του DNA γίνεται σε 400 μl διαλύματος NaOH 8mM.
- Οι φυγοκεντρήσεις στο στάδιο αυτό έγιναν στην ψυχόμενη μικροφυγόκεντρο (4° C).

θ. Μέθοδος αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην αντίδραση πολυμερισμού, όπου η θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση (Taq DNA polymerase του θερμοφιλού βακτηρίου *Thermus aquaticus*, Saiki et al 1988), πολυμερίζει το εκμαγείο DNA (template) (Sambrook και συν., τόμος 2^{ος}, κεφ.14). Εκτός από την (5' → 3') ενεργότητα επιμήκυνσης της πολυνουκλεοτιδικής αλυσίδας, οι DNA πολυμεράσες είναι γνωστό ότι παρουσιάζουν και μία επιδιορθωτική, (3' → 5') εξωνουκλεολυτική ενεργότητα (proofreading, editing). Όσο μεγαλύτερη είναι η επιδιορθωτική ενεργότητα, τόσο περισσότερο αξιόπιστο είναι το αποτέλεσμα της αντίδρασης PCR ως προς την αλληλουχία του τμήματος DNA που παράγεται.

Το μίγμα της αντίδρασης PCR πρέπει να περιέχει:

- 1) το ένζυμο DNA πολυμεράση,
- 2) το υπόστρωμα-εκμαγείο (DNA template),
- 3) τα τέσσερα τριφωσφορικά νουκλεοσίδια (dNTPs, δηλ. dATP, dCTP, dGTP, dTTP), που απαιτούνται ως υποστρώματα της DNA πολυμεράσης,

- 4) H₂O για τη ρύθμιση του τελικού όγκου της αντίδρασης,
- 5) δύο ολιγονουκλεοτίδια ως εκκινητές της αντίδρασης πολυμερισμού (oligonucleotide primers). Οι εκκινητές αυτοί έχουν αλληλουχίες συμπληρωματικές προς τις αλληλουχίες DNA που βρίσκονται αμέσως πριν (upstream) και αμέσως μετά (downstream) από την επιλεγόμενη περιοχή πολυμερισμού. Το πρώτο πριμοδοτικό μόριο (upstream) λειτουργεί ως εκκινητής σύνθεσης του κωδικεύοντος κλώνου (sense primer) και το δεύτερο (downstream) ως εκκινητής σύνθεσης του αντιπαράλληλου, μη κωδικεύοντος κλώνου (antisense primer).

➤ Με τη βοήθεια πριμοδοτικών μορίων (primers) η πολυμεράση συνθέτει νέες αλυσίδες DNA χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο προϋπάρχουσες αλυσίδες. Οι εκκινητές έχουν την ιδιότητα να αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA και να παρέχουν τα απαραίτητα 3'-OH τελικά άκρα για τη δράση του ενζύμου. Ο πολυμερισμός επαναλαμβάνεται πολλές φορές (κύκλους). Ο κάθε ένας από αυτούς περιλαμβάνει τρία βήματα, τα οποία πραγματοποιούνται σε διαφορετικές θερμοκρασίες σε θερμικό κυκλοποιητή.

Αναλυτικά, κατά τη διάρκεια ενός θερμικού κύκλου:

- Πρώτο βήμα είναι η θερμική αποδιάταξη του DNA (denaturation), κατά το οποίο όλα τα μόρια του DNA γίνονται μονόκλωνα, ώστε να επιλέξουν οι εκκινητές τα ζεύγη τους και να υβριδοποιηθούν στο δεύτερο βήμα.
- Δεύτερο βήμα είναι η πρόσδεση των πριμοδοτικών μορίων στις αντίστοιχες συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA template (annealing).
- Τρίτο είναι το βήμα της επιμήκυνσης του DNA (extension, elongation), κατά το οποίο επιτελείται η αντίδραση πολυμερισμού. Η συγκέντρωση των νέων μορίων αυξάνεται εκθετικά με κάθε κύκλο.

Ο βαθμός εξειδίκευσης μιας αντίδρασης PCR εξαρτάται από τους εξής παράγοντες:

- 1) τη συγκέντρωση των πριμοδοτικών μορίων,
- 2) την αναλογία των τεσσάρων δεοξυριβονουκλεοτιδίων,
- 3) τη θερμοκρασία πρόσδεσης (annealing),
- 4) τη διάρκεια των βημάτων κάθε κύκλου,
- 5) τον αριθμό των κύκλων, και
- 6) τη συγκέντρωση του MgCl₂.



Η θερμοκρασία του σταδίου πρόσδεσης (annealing) T_a είναι η κυριότερη παράμετρος που θα πρέπει να επιλέγεται κάθε φορά με βάση την ιδιαίτερη περίπτωση εφαρμογής. Αυτή υπολογίζεται με βάση το σημείο τήξης (melting point) T_m των πριμοδοτικών μορίων ως εξής:

$$T_a = T_m - 5\text{ }^{\circ}\text{C}$$

$$T_m = 2 (\text{αριθμός ζευγών AT}) + 4 (\text{αριθμός ζευγών GC})$$

Δηλαδή, η θερμοκρασία πρόσδεσης T_a επιλέγεται κατά κανόνα ως 5-10 $^{\circ}\text{C}$ μικρότερη των τιμών T_m των δύο πριμοδοτικών μορίων, ενώ οι δύο τιμές T_m δε θα πρέπει να διαφέρουν, κατά κανόνα, άνω των 5 $^{\circ}\text{C}$.

Βασική προϋπόθεση για την ολοκλήρωση της αντίδρασης είναι να επιτευχθούν οι βέλτιστες συνθήκες (optimization) για τα παραπάνω.

1. Μέθοδος ανάστροφης μεταγραφής-αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (RT-PCR)

Τό RNA μετατρέπεται σε συμπληρωματικό DNA (cDNA) με ανάστροφη μεταγραφή, αντίδραση που πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 42 $^{\circ}$ -60 $^{\circ}\text{C}$. Για να αποφευχθούν προβλήματα από τη δευτεροταγή δομή του RNA, συνιστάται θερμοκρασία 60 $^{\circ}\text{C}$. Στην περίπτωση αυτή, όμως, δημιουργούνται πολλαπλά αντίγραφα μόνο μικρού μήκους τμημάτων RNA, λόγω μερικής απενεργοποίησης του ενζύμου ανάστροφη μεταγραφάση. Εάν είναι επιθυμητή η αντιγραφή μεγάλου μήκους τμημάτων (>3kb), συνιστάται θερμοκρασία 42 $^{\circ}$ -48 $^{\circ}\text{C}$. Στη συγκεκριμένη μελέτη η αντίδραση της ανάστροφης μεταγραφής πραγματοποιήθηκε με επώαση των δειγμάτων RNA στους 60 $^{\circ}\text{C}$ για 30 λεπτά παρουσία του ενζύμου ανάστροφη μεταγραφάση AMV (πακέτο υλικών Titan One Tube RT-PCR kit, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany, Cat No 1 939 823).

Οι Powell et al (1987) περιέγραψαν πρώτοι μια συνδυασμένη τεχνική (γνωστή πλέον ως RT-PCR), στην οποία η ανάστροφη μεταγραφή (RT) συνδυάζεται με την αντίδραση PCR, δηλαδή τη δημιουργία πολλαπλών αντιγράφων του cDNA που προκύπτει από την αντίδραση αυτή (εικόνα 64).

Πρωτόκολλο εκτέλεσης

A) Στην παρούσα μελέτη επιλέξαμε από τη βιβλιογραφία 2 ζεύγη πριμοδοτικών μορίων (primers) για τις πρωτεΐνες Fas και Fas Ligand, τα οποία προμηθευτήκαμε από την εταιρεία Biospring (Frankfurt, Germany). Χρησιμοποιήσαμε, επίσης, ένα ζεύγος πριμοδοτικών μορίων β-ακτίνης (πακέτο υλικών Titan One Tube RT-PCR kit, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany, Cat No 1 939 823), για έλεγχο της απομόνωσης RNA στα δείγματα της μελέτης.

Ζεύγος πριμοδοτικών μορίων για το γονίδιο fas: (Hiromatsu et al, 1999)

A. Fas (sense) : 5'-AAGGAATGCACACTCACCAGC-3'

B. Fas (antisense): 5'-GACTCCAGCAATAGTGGTGAT-3'

Το πριμοδοτικό μόριο Fas-sense συνδέεται στα νουκλεοτίδια 809-829 και το μόριο Fas-antisense στα νουκλεοτίδια 1043-1063 (εικόνα 65). Με αυτό το ζεύγος ολιγονουκλεοτιδίων ανιχνεύεται τμήμα του mRNA που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη Fas (αναμενόμενο προϊόν PCR μεγέθους 255 bp), καθώς και τμήμα του mRNA που κωδικοποιεί τη διαλυτή πρωτεΐνη sFas (αναμενόμενο προϊόν PCR μεγέθους 192 bp).

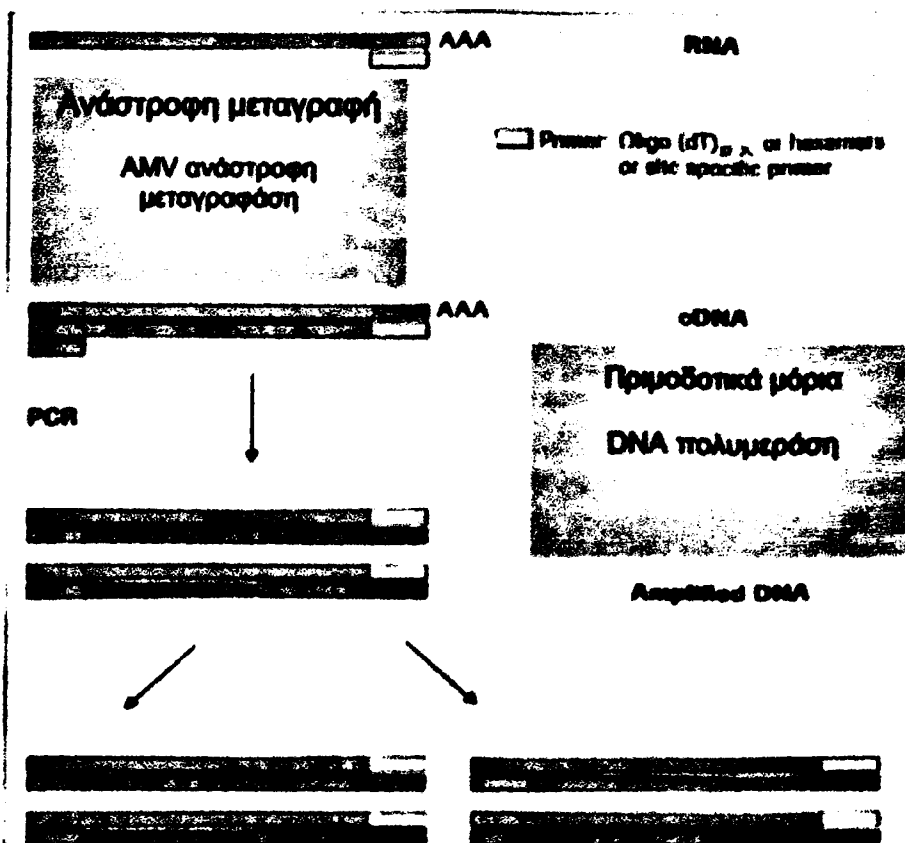
Ζεύγος πριμοδοτικών μορίων για το γονίδιο fas ligand: (Mitsiades et al, 1999)

A. Fas L (sense) : 5'-GTTTTTCATGGTTCTGGTTGCC-3'

B. FasL (antisense): 5'-GCCTCTAGTCTTCCTTTTCCATCC-3'

Το πριμοδοτικό μόριο FasL-sense συνδέεται στα νουκλεοτίδια 415-436 και το μόριο FasL-antisense στα νουκλεοτίδια 1409-1432 (εικόνα 66). Με αυτό το ζεύγος ολιγονουκλεοτιδίων ανιχνεύεται τμήμα του mRNA που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη Fas Ligand (αναμενόμενο προϊόν PCR μεγέθους 1018 bp).





Εικόνα 64

Σχηματική απεικόνιση των βημάτων της διαδικασίας RT-PCR

Το RNA μετατρέπεται σε cDNA με τη βοήθεια του ενζύμου ανάστροφη μεταγραφάση, ακολουθεί αποδιάταξη του μορίου cDNA, πρόσδεση των ακινητών στις συμπληρωματικές αλληλουχίες του cDNA και δημιουργία πολλαπλών αντιγράφων του επιλεγμένου τμήματος του cDNA.

1 cctaccgcg cgcaggccaa gttgctgaat caatggagcc ctccccaacc cgggcggtcc
 61 ccagcgaggc ttccttcca tctcctgac caccggggct ttctgtgagc tctctctga
 121 tctcgcgcaa gactgacaca cagggttca aagacgctc tggggagtga gggaagcgg
 181 ttacgagtga ctgggtgga gctcagggg cgggcactgg caggaacac accctgaggc
 241 cagccctggc tgcacaggcg gagctgctc tctcccgcg ggttgggtga cccgctcagt
 301 acggagtgg ggaagctct tcacttcgga ggattgctca acaaccatgc tggcatctg
 361 gaccctccta cctctggtc ttactgtgt tctagatta tctccaaaa gtgttaatgc
 421 ccaagtgact gacatcaact ccaagggatt ggaattgagg aagactgtta ctacagtga
 481 gactcagaac ttggaaggcc tgcacatga tggccaattc tgcataagc cctgtcctc
 541 aggtgaaagg aaagctaggg actgcacagt caatgggat gaaccagact gcgtgcctg
 601 ccaagaaggg aaggagtaca cagacaaagc ccattttct tccaaatga gaagatgat
 661 attgtgtgat gaaggacatg gcttagaagt ggaaataaac tgcacccgga ccagaatac
 721 caagtgcaga tgaatacaca acctttttg taacttact gtatgtgaac actgtgaccc
 781 ttgcacaaa tgtgaacatg gaatcatca aa ggaatgcaca ctaccagca acaccaagtg
 841 caaagaggaa ggatccagat ctaactggg gtggcttgt cttctctt tgcgaattc
 901 actaattgt tgggtgaaga gaaaggaagt acagaaaaca tgcagaaagc acagaaagga
 961 aaaccaaggt tctatgaat ctccaacctt aaatcctgaa acagtggcaa taaattatc
 1021 tgatgtgac ttgagtaaat atcaccac tattgctgga gtcatgacac taagtcaagt
 1081 taaaggctt gtgcgaaaga atggtgtcaa tgaagccaaa atagatgaga tcaagaatga
 1141 caatgtccaa gacacagcag aacagaaagt tcaactgctt cgtaattggc atcaactca
 1201 tggaaagaaa gaagcgtatg acacattgat taaagatctc aaaaaagcca atcttctac
 1261 tctgcagag aaaattcaga ctatcatct caaggacatt actagtact cagaaaattc
 1321 aaactcaga aatgaaatcc aaagcttgg ttagagtga aaacaacaaa ttcagttctg
 1381 agtatatgca attagtgtt gaaaagattc ttaatagctg gctgtaaaata ctgcttgg
 1441 tttactggg tacattttt cattattag cgtgaagag ccaacatatt ttagatttt
 1501 taatatctca tgattctgcc tcaaggatg tttaaactc agttgggaaa acaaaactca
 1561 tcaagagtaa atgcagtggc atgctaagta cccaaatagg agtgtatgca gaggatgaaa
 1621 gattaagatt atgctctggc atctaacata tgattctgta gtatgaatg aatcagtga
 1681 ttttagtaca aatgtctatc cacaggctaa cccactcta tgaatcaata gaagaagcta
 1741 tgacctttg ctgaaatata agttactgaa caggcaggcc acttgccctc taaattacct
 1801 ctgataatc tagagatttt accataattc taaactttg ttataactc gagaaatga
 1861 tatttatgta aagtatatg atttgatgc agaatttaa taaggctcta cctcaagac
 1921 cttgcacag ttattgggt tcatattata caatattca attgtgaatt cacatagaaa
 1981 acattaaat ataattgtg actattatat atgtgatgc atttactgg ctcaaaacta
 2041 cctactctt tctcaggcat caaaagcatt ttgagcagga gagtattact agagcttgc
 2101 caccctcca ttttgcctt ggtgctcctc ttaatggcct aatgcacccc caaacatgga
 2161 aatatacca aaaaatactt aatagtcac caaaaggcaa gactgcccct agaaattcta
 2221 gcctggttg gagatactaa ctgctctcag agaaagtagc ttgtgacat gtcatgaac
 2281 catgtttgca atcaaatg ataaataga ttctatttt tccccaccc ccgaaaatg
 2341 tcaataatg cccatgtaa accgtctaca aatggcagct tatacatagc aatggtaaaa
 2401 tcatcatctg gatttaggaa ttgctctgt catacccca agtttctaag atttaagatt
 2461 ctcttacta ctatctacg tttaaatatc ttgaaagt tgtattaaat gtgaattta
 2521 agaaalaata ttatattc tgaatgta aactgtgaag atagtataa actgaagcag
 2581 atacctggaa ccacctaaag aactccatt tatggaggat tttttgcc ctgtgttg
 2641 gaattataaa atagtgtaa aagtacgtaa ttaataatg ttttggtaa aaaaaaaaaa
 2701 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa

Εικόνα 65

Fas mRNA

Οι αλληλουχίες των νουκλεοτιδίων που είναι κλεισμένες σε πλαίσιο αντιστοιχούν στις αλληλουχίες των πριμοδοτικών μορίων για την ανίχνευση Fas mRNA



1 gagggttttc ccttagctat ggaactcta taagagagat ccagcttgcc tctcttgag
 61 cagtcagcaa cagggctccg tcttgacac ctacgctct acaggactga gaagaagtaa
 121 aacggtttgc tggggctggc ctgactcacc agctgccatg cagcagccct tcaattaccc
 181 atalcccag atctactggg tggacagcag tgcagctct ccttggggcc ctccaggcac
 241 agttcttcc tglccaacct ctgtgccag aaggccctgt caaaggaggc caccaccacc
 301 acopccacog ccaccactac cacttccgcc gccgcggcca ccctgcttc cactacogct
 361 gccacccctg aagaagagag ggaaccacag cacaggccctg tgtctcttg tgaattttt
 421 catggttctg gtgccccttg taggatggg cctggggatg ttacgctct tccacctaca
 481 gaaggagctg gcagaactcc gagagcttac cagccagatg cacacagcat catcttggg
 541 gaagcaata ggcaccccca gtccaccccc tgaaaaaaag gagctgagga aagtggccca
 601 ttaacaggc aagtcacact caaggttcat gctcttgaa tgggaagaca cctatggat
 661 tgtctgtct tctggagtg agtataaga ggttggctt gtatcaatg aaactgggt
 721 gtacttcta tcttcaaag tacttccg ggttcaact tgcacacac tgcctctgag
 781 ccacaaggc tactagagga actctaagta tcccaggat ctgtgatga tggaggggaa
 841 gatgatgag tactgcacta ctgggcagat gtggggccgc agcagctacc tgggggcagt
 901 gttaactct accagtgctg atcattata tgtcaactg tctagctct ctctggcaa
 961 tttagaggaa tctcagagct ttctggctt atataagct taagagaagc acttgggat
 1021 tcttccatt atgattctt gtacaggca ccgagaatgt tctatcagt gagggtctc
 1081 ttacatgat ttgaggtcaa gtaagaagac atgaaccaag tggacctga gccacaggg
 1141 ttcaaatgt ctgtagctc tcaactcacc taattttat gagccagaca aatggaggaa
 1201 tatagggaa gaacatagaa ctctgggctg ccatttgag agggagaagc atgaataagc
 1261 agctaccagg tgtctacac tcatctagt gctgagagt attaggcag attgaataag
 1321 acaccttta actacctct caaggtgggc ctgtacct caagggggac tgttticag
 1381 atacatggt gtgacctgag gatttaagg atggaaaagg aagactagag gcttgcataa
 1441 taagctaaag aggtcgaaag aggccaatgc ccactggca gcacttcac ttcaaatgc
 1501 atalctgag ccactggta aactaacaga taagcaagag agatgtttg gggactcatt
 1561 tcatcttaa cacagcatgt gtatttcag tgaattga ggggtgtgtg tgtgtgtg
 1621 tgtgtgtgt tgtgtatgac taagagaga atgtagata tgtgaagtac atattaggaa
 1681 aatatgggt gcatgtgtc aagatttga atgcttctg acaatcaact ctatagtc
 1741 ttaaaaatca ttgattgca gctactaat atgtttctt ataatataat aatatattat
 1801 gtatgtgtc attttgtga aatgaaaaca tgaataaaa agtatatgtt agtatcaaa
 1861 aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa

Εικόνα 66

Fas Ligand mRNA

Οι αλληλουχίες των νουκλεοτιδίων που είναι κλεισμένες σε πλαίσιο αντιστοιχούν στις αλληλουχίες των πριμοδοτικών μορίων για την ανίχνευση του FasL mRNA



Ζεύγος πριμοδοτικών μορίων ανθρώπινης β-ακτίνης:

A. act (sense) : 5'-CCA-AGG-CCA-ACC-GCG-AGA-AGA-TGA-C-3'

B. act (antisense) : 5'-AGG-GTA-CAT-GGT-GGT-GCC-GCC-AGA-C-3'

Με αυτό το ζεύγος ολιγονουκλεοτιδίων ανιχνεύεται τμήμα του mRNA που κωδικοποιεί την β-ακτίνη μεγέθους 587 bp.

B) Τα πειράματα της PCR πραγματοποιήθηκαν με τη συσκευή Gene Amp PCR System 9700 (Perkin-Elmer Applied Biosystems, California, USA) και το πακέτο υλικών Titan One Tube RT-PCR kit (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany, Cat No 1 939 823).

Στο σύστημα αντίδρασης RT-PCR ενός βήματος, τόσο η αντίδραση cDNA, όσο και η αντίδραση PCR πραγματοποιούνται με ένα ρυθμιστικό διάλυμα και ένα μίγμα ενζύμων, χωρίς να απαιτείται η προσθήκη αντιδραστηρίων μεταξύ της σύνθεσης cDNA και της αντίδρασης PCR. Πιο αναλυτικά, χρησιμοποιούνται:

- 1) το ένζυμο *ανάστροφη μεταγραφάση* AMV, το οποίο χρησιμεύει για τη σύνθεση της πρώτης αλυσίδας DNA, και
- 2) το μίγμα ενζύμων Expand High Fidelity, που αποτελείται από την *Taq DNA πολυμεράση* και την *Tgo DNA πολυμεράση*, μια πολυμεράση διορθωτικής ανάγνωσης και το οποίο χρησιμεύει για την αντίδραση PCR.

Τα πλεονεκτήματα της αντίδρασης RT-PCR ενός βήματος (one-step RT-PCR) είναι τα ακόλουθα:

- 1) Η ελαχιστοποίηση του απαιτούμενου χρόνου
- 2) Η ελάττωση του κινδύνου επιμόλυνσης

Όλη η αντίδραση γίνεται σε ένα σωλήνα, χωρίς να απαιτείται μεταφορά αντιδραστηρίων και χωρίς να ανοίγεται ο σωλήνας πολλές φορές.

- 3) Η βελτίωση της ευαισθησίας και ειδικότητας της σύνθεσης cDNA

Η αυξημένη απόδοση και αποτελεσματικότητα οφείλονται σε δύο χαρακτηριστικά της αντίδρασης RT-PCR ενός βήματος:

- στην αυξημένη θερμοκρασία στην οποία γίνεται η αντίδραση cDNA, με αποτέλεσμα να ελαχιστοποιούνται προβλήματα από τη δευτεροταγή δομή του RNA, και



- στη χρήση ολόκληρου του δείγματος cDNA ως εκμαγείου για την αντίδραση PCR.

Τα διαλύματα stock που παρέχονται από τον κατασκευαστή (πίνακας 14) διατηρήθηκαν στους -20°C .

Γ) Προσδιορισμός των βέλτιστων συνθηκών της αντίδρασης RT-PCR για τη μελέτη της έκφρασης των υποδοχέων Fas και FasL και της β-ακτίνης

Ως εκμαγείο RNA (template) χρησιμοποιήθηκε το RNA που απομονώθηκε από περιφερικά μονοπύρρηνα κύτταρα του αίματος (παράγραφος 2.3.3 ζ). Αφού πραγματοποιήθηκε αντίδραση RT-PCR με τους εκκνητές της β-ακτίνης στα δείγματα RNA κυττάρων αίματος (εσωτερικός μάρτυρας για έλεγχο απομόνωσης RNA) και στο δείγμα Control RNA του πακέτου υλικών (kit), τα προϊόντα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήγμα αгарόζης (παράγραφος 2.3.3 κ). Στη συνέχεια υπολογίστηκε, με το πρόγραμμα Scion Image Software, ο λόγος του σήματος β-ακτίνης κάθε δείγματος προς το σήμα β-ακτίνης του Control RNA, το οποίο είναι γνωστής συγκέντρωσης. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ίση ποσότητα μίγματος, χωρίς την προσθήκη προτύπου RNA.

Ο καθορισμός των βέλτιστων συνθηκών της αντίδρασης PCR για τα τρία ζεύγη των πριμοδοτικών μορίων (Fas, FasL και β-ακτίνης), πραγματοποιήθηκε με επαναλαμβανόμενες αντιδράσεις, στις οποίες ελέγχθηκαν οι σημαντικότερες μεταβλητές της αντίδρασης, όπως αναφέρονται στον πίνακα 15.

Πρωτόκολλο εκτέλεσης:

- 1) Σε κάθε μικροφυγοκεντρικό σωλήνα MicroAmp χωρητικότητας 0,2 ml προστίθενται 5 μl εκμαγείου RNA.
- 2) Παρασκευάζονται τα προκαταρκτικά μίγματα αντίδρασης - Μίγμα I και II, σε μικροφυγοκεντρικούς σωλήνες χωρητικότητας 2 ml, όπως φαίνεται στους πίνακες 16 και 17.
- 3) Σε κάθε μικροφυγοκεντρικό σωλήνα με τα 5 μl εκμαγείου RNA, προστίθενται 20 μl μίγματος I και 25 μl μίγματος II. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης είναι 50 μl για κάθε δείγμα.



Πίνακας 14:

Αντιδραστήρια που παρέχονται με το πακέτο υλικών Titan One Tube RT-PCR kit

Αντιδραστήριο	Συγκέντρωση
dH ₂ O ελεύθερο RNAασών	
Μίγμα dNTPs	10 mM (συνολικά)
Διάλυμα DTT	100 mM
Αναστολέας RNAασών	5 U/μl
Μίγμα πριμοδοτικών μορίων β-ακτίνης	20 μM (συνολικά)
Πριμοδοτικό μόριο 1 (sense) για Fas ή FasL	20 μM
Πριμοδοτικό μόριο 2 (antisense) για Fas ή FasL	20 μM
Ανθρώπινο Control RNA (K562 ολικό RNA με MS2 φορέα RNA)	2 pg/μl (συνολικά)
Ρυθμιστικό διάλυμα PCR με 7.5 mM MgCl ₂ και DMSO	5x
Διάλυμα MgCl ₂ (stock)	25 mM

Πίνακας 15:

Μεταβλητές της αντίδρασης RT-PCR που μελετήθηκαν για τον καθορισμό των βέλτιστων συνθηκών

Μεταβλητές της αντίδρασης	Εύρος τιμών
Ποσότητα RNA (template)	0,1μg-1 μg
Συγκέντρωση των πριμοδοτικών μορίων	0,2-0,8 μM κάθε ένα
Συγκέντρωση ιόντων μαγνησίου	1,5-3 mM
Θερμοκρασία σταδίου πρόσδεσης πριμοδοτικών μορίων (annealing)	45-66 ° C

Πίνακας 16:

Αντιδραστήρια που αποτελούν το Μίγμα I της αντίδρασης RT-PCR

Αντιδραστήριο (διαλύματα stock)	Όγκος για την αντίδραση β-ακτίνης	Όγκος για την αντίδραση Fas ή Fas Ligand	Τελική συγκέντρωση
Αποστειρωμένο νερό	10,5 µl	10,5	
Μίγμα dNTPs (10 mM κάθε dNTP)	4 µl	4 µl	0,2 mM
Διάλυμα DTT	2,5 µl	2,5 µl	5 mM
Αναστολέας RNAασών	1 µl	1 µl	5 U
Πριμοδοτικό μόριο 1 (forward)	-	1 µl	0,4 µM
Πριμοδοτικό μόριο 2 (reverse)	-	1 µl	0,4 µM
Μίγμα πριμοδοτικών μορίων β-ακτίνης	2 µl	-	0,4 µM (το κάθε ένα)
Συνολικός όγκος	20 µl	20 µl	

Πίνακας 17:

Αντιδραστήρια που αποτελούν το Μίγμα II της αντίδρασης RT-PCR

Αντιδραστήριο	Όγκος για την αντίδραση β-ακτίνης	Όγκος για την αντίδραση Fas ή Fas Ligand	Τελική συγκέντρωση
αποστειρωμένο νερό	14 µl	14 µl	
ρυθμιστικό διάλυμα PCR (5x)	10 µl	10 µl	1x
Μίγμα ενζύμων	1 µl	1 µl	
Συνολικός όγκος	25 µl	25 µl	

4) Μετά από σύντομη φυγοκέντρηση (short spin), τα δείγματα τοποθετούνται στον θερμοκυκλοποιητή στις βέλτιστες συνθήκες που προσδιορίστηκαν για κάθε ζεύγος πριμοδοτικών μορίων (Πίνακας 18). Με βάση τις συγκεκριμένες συνθήκες, η διάρκεια κάθε αντίδρασης RT-PCR είναι συνολικά 2 ώρες και 45 λεπτά.

Προφυλάξεις κατά την παρασκευή του μίγματος αντιδρώντων της PCR

- Η διεξαγωγή του πειράματος PCR γίνεται σε χώρους αποστειρωμένους και με γάντια τα οποία πρέπει να αλλάζονται συχνά. Επίσης, όλα τα αντικείμενα που χρησιμοποιούνται για την εκτέλεση του πειράματος πρέπει να είναι αποστειρωμένα. Επειδή η αντίδραση PCR μπορεί να δημιουργήσει αντίγραφα ακόμα και ενός μορίου DNA, πρέπει να λαμβάνονται προφυλάξεις να αποφευχθεί επιμόλυνση (contamination) του μίγματος της αντίδρασης με ξένα τμήματα DNA που μπορεί να χρησιμεύσουν ως εκμαγεία (templates).
- Κατά την προσθήκη των συστατικών του μίγματος, τα αντιδραστήρια φυλάσσονται σε θερμοκρασία 0-4° C.
- Ακολουθείται αυστηρά η αναγραφόμενη σειρά προσθήκης, με την οποία ελαχιστοποιούνται οι αντιδράσεις μη ειδικής πρόσδεσης μεταξύ DNA και εκκινητών.
- Το μίγμα των ενζύμων μεταφέρεται πάντοτε σε δοχείο πάγου και προστίθεται τελευταίο στο Μίγμα II της αντίδρασης χωρίς χρονοτριβή. Δεν απαιτείται χρόνος απόψυξης (το διάλυμα συντήρησης περιέχει 50% γλυκερόλη), ενώ το υπόλοιπο του όγκου του μίγματος φυλάσσεται αμέσως στον καταψύκτη φύλαξης (-20° C).



Πίνακας 18:

Βέλτιστες συνθήκες αντίδρασης RT-PCR για την ανίχνευση mRNAs των πρωτεϊνών Fas, FasL και β-ακτίνης

Κύκλοι	Θερμοκρασία	Χρόνος
1x	Επώαση 60° C	30 λεπτά
1x	Θερμική αποδιάταξη 94° C	2 λεπτά
10x	Θερμική αποδιάταξη 94° C	30 δευτερόλεπτα
	Στάδιο πρόσδεσης πριμ.μορκών	30 δευτερόλεπτα
	ανίχνευση Fas mRNA 55° C	
	ανίχνευση FasL mRNA 60° C	
	ανίχνευση mRNA β-ακτίνης 66° C	
	Επιμήκυνση 68° C	45 δευτερόλεπτα
25x	Θερμική αποδιάταξη 94° C	30 δευτερόλεπτα
	Στάδιο πρόσδεσης πριμ.μορκών	30 δευτερόλεπτα
	ανίχνευση Fas mRNA 55° C	
	ανίχνευση FasL mRNA 60° C	
	ανίχνευση mRNA β-ακτίνης 66° C	
	Επιμήκυνση 68° C	45 δευτερόλεπτα, με επιπρόσθετα 5 δευτερόλεπτα κατά κύκλο
1x	Τελική επιμήκυνση 68° C	7 λεπτά

κ. Ηλεκτροφόρηση DNA

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης είναι μια μέθοδος διαχωρισμού, αναγνώρισης και απομόνωσης τμημάτων DNA. Πραγματοποιείται σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης και βασίζεται στο ότι το DNA, ως ασθενές οξύ παρουσιάζει αρνητικό φορτίο σε ουδέτερο pH. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, όταν το DNA βρεθεί σε ηλεκτρικό πεδίο, να μετακινείται προς το θετικό πόλο (την άνοδο) (Sambrook και συν., τόμος 1^{ος} κεφ. 6).

Οι παράγοντες που επηρεάζουν την ταχύτητα μετακίνησης του DNA στην πηκτή αγαρόζης είναι:

1) *Το μέγεθος του τμήματος του DNA.*

Τα γραμμικά μόρια του DNA μετακινούνται στην πηκτή αγαρόζης με ρυθμούς αντιστρόφως ανάλογους του δεκαδικού λογαρίθμου των μοριακών βαρών τους.

2) *Η συγκέντρωση της αγαρόζης.*

Η μετακίνηση ενός μορίου DNA εξαρτάται από τη συγκέντρωση της αγαρόζης. Ένα γραμμικό μόριο DNA με δεδομένο μέγεθος έχει διαφορετική κινητικότητα διαμέσου πηκτών με διαφορετικές συγκεντρώσεις αγαρόζης. Χρησιμοποιούνται, έτσι, πηκτές αγαρόζης διαφορετικών συγκεντρώσεων προκειμένου να επιτευχθεί ο βέλτιστος διαχωρισμός τμημάτων DNA τα οποία έχουν παραπλήσιο μέγεθος.

3) *Η στερεοδιάταξη του DNA.*

Μόρια DNA του ίδιου MB αλλά διαφορετικής διαμόρφωσης έχουν διαφορετική κινητικότητα στην πηκτή της αγαρόζης, που εξαρτάται από το βαθμό υπερελίκωσης. Η σειρά αύξησης της κινητικότητας είναι: μόριο ανοιχτού κύκλου, ευθύγραμμο μόριο και, τέλος, μόριο κλειστού υπερσπειρωμένου κύκλου.

4) *Το ηλεκτρικό πεδίο.*

Η κινητικότητα του μορίου του DNA είναι ανάλογη της τάσης του πεδίου. Γενικά ισχύει, ότι όσο χαμηλότερη τάση εφαρμόζεται, τόσο καλύτερος διαχωρισμός επιτυγχάνεται.

5) *Η κατεύθυνση του ηλεκτρικού πεδίου*

6) *Η σύσταση σε βάσεις του DNA και η θερμοκρασία*

Η ηλεκτροφορητική συμπεριφορά του DNA σε πηκτή αγαρόζης (αντίθετα με ό,τι συμβαίνει σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου) δεν επηρεάζεται σημαντικά από τη



σύσταση σε βάσεις του DNA, ή τη θερμοκρασία στην οποία πραγματοποιείται η ηλεκτροφόρηση. Έτσι, σε πηκτές αгарόζης, οι σχετικές ηλεκτροφορητικές κινητικότητες τμημάτων DNA διαφορετικών μεγεθών δε μεταβάλλονται μεταξύ 4°-30°C. Γενικά, η ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης πραγματοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου.

7) Η παρουσία παρεμβαλλόμενων χρωστικών

Το βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr), μια φθορίζουσα χρωστική που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση DNA σε πηκτές αгарόζης και πολυακρυλαμιδίου (Sharp et al, 1973), ελαττώνει την ηλεκτροφορητική κινητικότητα του γραμμικού DNA κατά 15% περίπου.

Σημείωση: Επειδή είναι ισχυρό μεταλλαξογόνο και μέτρια τοξικό, το EtBr θα πρέπει να χρησιμοποιείται με ιδιαίτερα μεγάλη προσοχή (τα γάντια είναι απαραίτητα όταν κανείς δουλεύει με διαλύματα που περιέχουν αυτή την χρωστική). Τα stock διαλύματα του EtBr πρέπει να φυλάσσονται σε σωληνες περιτυλιγμένες με αλουμινόχαρτο σε θερμοκρασία 4° C.

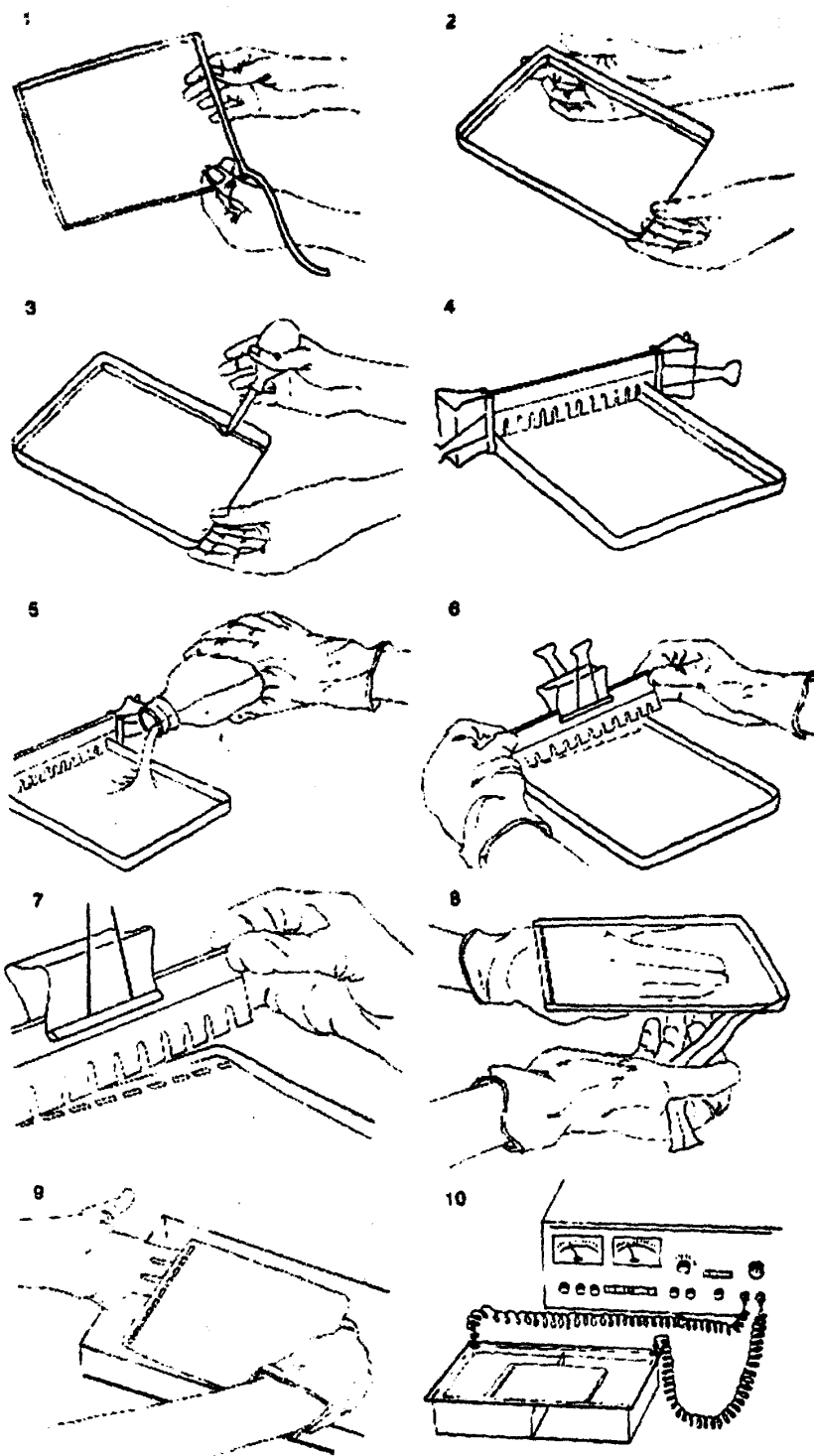
8) Η σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης

Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA επηρεάζεται από τη σύσταση και την ιοντική ισχύ του ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης. Ρυθμιστικά διαλύματα με μεγάλη ιοντική ισχύ οδηγούν σε αυξημένα επίπεδα θερμοκρασίας που επηρεάζουν την κινητικότητα του DNA και το πήγμα της αгарόζης. Αντίθετα, σε διαλύματα χαμηλής ιοντικής ισχύος δεν παρατηρείται μετακίνηση του DNA.

Μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφορα ρυθμιστικά διαλύματα ηλεκτροφόρησης, τα οποία περιέχουν EDTA (pH 8.0) και Tris-acetate (TAE), Tris-borate (TBE) ή Tris-phosphate (TPE) σε συγκέντρωση περίπου 50 mM με pH 7.5-7.8. Στη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκε το διάλυμα TBE 1x.

Παρασκευή πηκτής αгарόζης

- Επιλέγεται η συσκευή ηλεκτροφόρησης και τοποθετούνται οι αντίστοιχοι υποδοχείς και το κτένι για τη δημιουργία των φρεατίων εντός των οποίων θα φορτωθούν τα δείγματα.



Εικόνα 67

Διαδικασία παρασκευής πηκτής αгарόζης για οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης

- Σε 100 ml ρυθμιστικού διαλύματος TBE 1x σε μία κωνική φιάλη προστίθενται 1,5 g αγαρόζης (Agarose, SIGMA-Aldrich Co., St Louis, USA). Είναι σημαντικό το διάλυμα παρασκευής της πηκτής να είναι το ίδιο με το διάλυμα ηλεκτροφόρησης, καθώς ακόμη και μικρές διαφορές στην ιοντική ισχύ ή στο pH μπορούν να επηρεάσουν την κινητικότητα των τμημάτων DNA.
- Το περιεχόμενο της φιάλης διαλύεται πλήρως με βρασμό ή σε φούρνο μικροκυμάτων. Η αγαρόζη, όταν δεν έχει διαλυθεί πλήρως, δίνει την εντύπωση ύπαρξης μικρών «φακών» που επιπλέουν στο διάλυμα.
- Όταν η θερμοκρασία της πηκτής ελαττωθεί στους 60°C, στα 100 ml διαλύματος αγαρόζης προστίθενται 5 μl διαλύματος EtBr συγκέντρωσης 10 mg/ml.
- Στη συνέχεια γίνεται απόχυση της λειωμένης πηκτής στην αντίστοιχη θέση της συσκευής ηλεκτροφόρησης, στην οποία έχει τοποθετηθεί εκ των προτέρων κτένι για τη δημιουργία οδόντωσης φρεατίων. Η πηκτή θα πρέπει να έχει πάχος 3-5 mm.
- Μετά την πήξη της πηκτής, αφαιρείται το κτένι προσεκτικά υπό προσθήκη μικρού όγκου TBE στον κενό χώρο των φρεατίων. Προστίθεται το ρυθμιστικό διάλυμα 1x TBE μέχρι ύψους 0,5 cm πάνω από την επιφάνεια της πηκτής.
- Σε κάθε φρεάτιο μεταφέρουμε 20 μl προϊόντος της αντίδρασης RT-PCR και 3 μl ρυθμιστικού διαλύματος φόρτισης GLB (Promega, Madison, WI USA, Cat No G190A, 1 ml) (αναλογία ~ 1:6). Το GLB έχει μεγαλύτερο ειδικό βάρος από το νερό (λόγω της υψηλής συγκέντρωσης γλυκερόλης), με αποτέλεσμα το δείγμα DNA να κατακρατείται στον πυθμένα του φρεατίου και να εισχωρεί στην πηκτή της αγαρόζης μετά την εφαρμογή της διαφοράς δυναμικού. Επιπρόσθετος ρόλος του GLB είναι η παρακολούθηση της ηλεκτροφόρησης, λόγω των αρνητικά φορτισμένων χρωστικών που περιέχει, οι οποίες με την εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος κινούνται προς το θετικό πόλο με προβλεπόμενους ρυθμούς.
- Στα φρεάτια στη δεξιά και αριστερή πλευρά της πηκτής μεταφέρονται 5 μl μίγματος DNA με γνωστά MB (DNA ladder), όπως είναι τα: 1 kb DNA ladder (Promega, Madison, WI, USA, Cat No G571A, 500 μl) ή 100 bp DNA ladder (Promega, Madison, WI, USA, Cat No G210 A, 250 μl), με 5 μl H₂O και 5 μl GLB. Αυτό επιτρέπει τον καθορισμό των μεγεθών αγνώστων τμημάτων DNA.

- Στη συνέχεια εφαρμόζεται σταθερή τάση 90 Volt. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το Τροφοδοτικό EC 105, E-C Apparatus Corporation, St Petersburg, Florida). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου για χρονικό διάστημα που εξαρτάται από το μήκος της πηκτής και το μέγεθος του DNA. Στη συγκεκριμένη μελέτη η ηλεκτροφόρηση διαρκεί 1 ώρα και 40 λεπτά.
- Το τέλος της ηλεκτροφόρησης καθορίζεται από τη θέση των χρωστικών πάνω στην πηκτή. Η δεύτερη χρωστική του διαλύματος φόρτωσης, που είναι η χρωστική bromophenol blue θα πρέπει να έχει καλύψει περί τα 2/3 της απόστασης έως την άκρη του πήγματος.
- Στην παρούσα μελέτη η πηκτή παρατηρήθηκε στη συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας Vilber Lourmat (Marne La Valle, Cedex 1, France) προκειμένου να γίνουν ορατές οι ζώνες του DNA, οι οποίες φθορίζουν. Για καταχώρηση και επεξεργασία του αποτελέσματος, έγινε φωτογράφιση της πηκτής με ψηφιακή μηχανή KODAK digital science DC 120 και μεταφορά της εικόνας σε ηλεκτρονικό επεξεργαστή (Electrophoresis Documentation and Analysis System, KODAK Digital Science).
- Τα μοριακά βάρη των υπό μελέτη τμημάτων του DNA υπολογίστηκαν με βάση τα πρότυπα μοριακά βάρη που χρησιμοποιήθηκαν (1 kb DNA ladder και 100 bp DNA ladder, Promega, Madison, WI, USA) με τη βοήθεια ημιλογαριθμικού χαρτιού.

2.3.3 Αποτελέσματα

Αρχικά έγινε ταξινόμηση των ασθενών σε δύο ομάδες (παράγραφος 2.3.1). Όπως αναφέρθηκε ήδη (παράγραφος 2.2.1), η ταξινόμηση αυτή βασίστηκε στα υπερηχογραφικά ευρήματα, στις δοκιμασίες θυρεοειδικής λειτουργίας (επίπεδα FT4, FT3, TSH, anti-TPO) και στα κυτταρολογικά ευρήματα από τις βιοψίες FNA (παράγραφος 2.1.3).

α. Ανίχνευση των mRNAs για τις πρωτεΐνες Fas και FasL

Η ανίχνευση των mRNAs που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες Fas και FasL στα θυρεοειδικά κύτταρα πραγματοποιήθηκε με την αντίδραση RT-PCR. Για να



προσδιοριστούν οι βέλτιστες συνθήκες της αντίδρασης και οι απαιτούμενες συγκεντρώσεις των αντιδραστήρων, χρησιμοποιήθηκε αρχικά ως εκμαγείο το RNA που απομονώθηκε από περιφερικά μονοπύρρηνα του αίματος (παράγραφος 2.3.2).

Επιλέγησαν από τη βιβλιογραφία δύο ζεύγη πριμοδοτικών μορίων για την ανίχνευση των mRNAs των Fas και FasL αντίστοιχα και ένα ζεύγος πριμοδοτικών μορίων για την ανίχνευση του mRNA της β-ακτίνης (παράγραφος 2.3.2).

Πραγματοποιήθηκαν επαναλαμβανόμενες αντιδράσεις, στις οποίες μελετήθηκαν για κάθε ζεύγος πριμοδοτικών μορίων οι σημαντικότερες μεταβλητές της αντίδρασης (παράγραφος 2.3.2, Πίνακας 15). Η σειρά των αντιδράσεων RT-PCR που πραγματοποιήθηκαν για την ανίχνευση του Fas mRNA αναλύεται στην εικόνα 68. Η πορεία που ακολουθήθηκε ήταν παρόμοια και για την ανίχνευση FasL mRNA. Στις εικόνες ηλεκτροφόρησης που παρατίθενται στη συνέχεια απεικονίζονται ενδεικτικά προϊόντα αντιδράσεων RT-PCR, κατά τις οποίες ελέγχθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις εκμαγείου RNA (εικόνα 71 Α), διαφορετικές θερμοκρασίες σταδίου πρόσδεσης πριμοδοτικών μορίων (annealing) (εικόνα 69, 71 Β), διαφορετικές συγκεντρώσεις ιόντων Mg (εικόνα 69 Β), ή πριμοδοτικών μορίων (εικόνα 70).

Οι απαιτούμενες συγκεντρώσεις των αντιδραστήρων και οι βέλτιστες συνθήκες, οι οποίες επιλέγησαν για την ανίχνευση των mRNAs των πρωτεϊνών Fas και FasL, αναφέρονται στους πίνακες 16-18.

Αφού παρατηρήθηκαν με την ηλεκτροφόρηση τα αναμενόμενα προϊόντα (εικόνες 69,70), η αντίδραση RT-PCR επαναλήφθηκε χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο ολικό RNA το οποίο απομονώθηκε από υλικό παρακέντησης FNA του θυρεοειδούς. Λόγω μικρότερης περιεκτικότητας σε RNA των δειγμάτων FNA, στο μίγμα της αντίδρασης προστίθενται 10 μl κάθε δείγματος αντί για 5 μl και μειώνεται ανάλογα η συγκέντρωση του νερού (Πίνακας 19).

Στα δείγματα των ασθενών με HT, έγινε αρχικά έλεγχος της απομόνωσης RNA με την αντίδραση RT-PCR και εκκινητές β-ακτίνης. Στη συνέχεια, με το ζεύγος πριμοδοτικών μορίων Fas (sense) και Fas (antisense) διαπιστώθηκε έκφραση του mRNA που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη Fas (προϊόν 255 bp) και ίχνη έκφρασης mRNA που κωδικοποιεί τη διαλυτή πρωτεΐνη sFas (προϊόν 192 bp) (εικόνα 72).

Στους ασθενείς με NTG ανιχνεύτηκε mRNA για τη διαλυτή πρωτεΐνη sFas, όχι, όμως και για την πρωτεΐνη Fas (εικόνα 73 A).

Το mRNA που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη Fas Ligand ανιχνεύτηκε μόνο στους ασθενείς με HT (εικόνα 73 B).

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της αντίδρασης RT-PCR, επιβεβαίωσαν τα ευρήματα της ανοσοκυτταροχημικής τεχνικής σχετικά με την αυξορρύθμιση του υποδοχέα Fas στα θυρεοειδικά κύτταρα ασθενών με ενεργό HT. Στους ασθενείς με NTG, στους οποίους είχε διαπιστωθεί μειορρύθμιση της πρωτεΐνης Fas ανοσοκυτταροχημικά, δεν ανιχνεύτηκε Fas mRNA. Οι ασθενείς αυτοί είχαν υψηλά επίπεδα διαλυτής πρωτεΐνης sFas στον ορό τους, όπως διαπιστώθηκε με τη μέθοδο ELISA, γεγονός που επιβεβαιώθηκε και από την ανίχνευση sFas mRNA με την αντίδραση RT-PCR.

ΜΕΤΑΒΛΗΤΕΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ RT-PCR

- A. Αρχική ποσότητα εκμαγείου RNA (template)
- B. Θερμοκρασία σταδίου πρόσδεσης πριμοδοτικών μορίων
- Γ. Συγκέντρωση πριμοδοτικών μορίων στο τελικό μίγμα αντίδρασης
- Δ. Συγκέντρωση $MgCl_2$

Δοκιμή 1

- A. 1. 2,5 μ l δείγματος RNA
2. 5 μ l δείγματος RNA
3. 10 μ l δείγματος RNA
- B. 45° C
- Γ. 0,2 μ M
- Δ. 1,5 mM

Δοκιμή 2

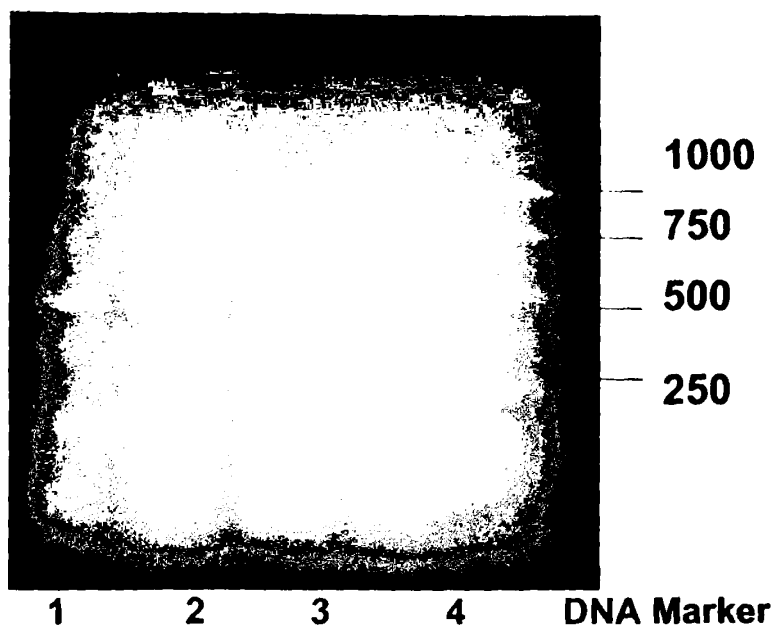
- A. (επιλογή) 5 μ l δείγματος RNA
- B. 45° C
- Γ. 0,2 μ M
- Δ. 1. 1,5 mM
2. 2,25 mM
3. 3 mM

Δοκιμή 3

- A. 5 μ l δείγματος RNA
- B. 1. 45° C
2. 55° C
3. 57° C
- Γ. 0,2 μ M
- Δ. (επιλογή) 1,5 mM

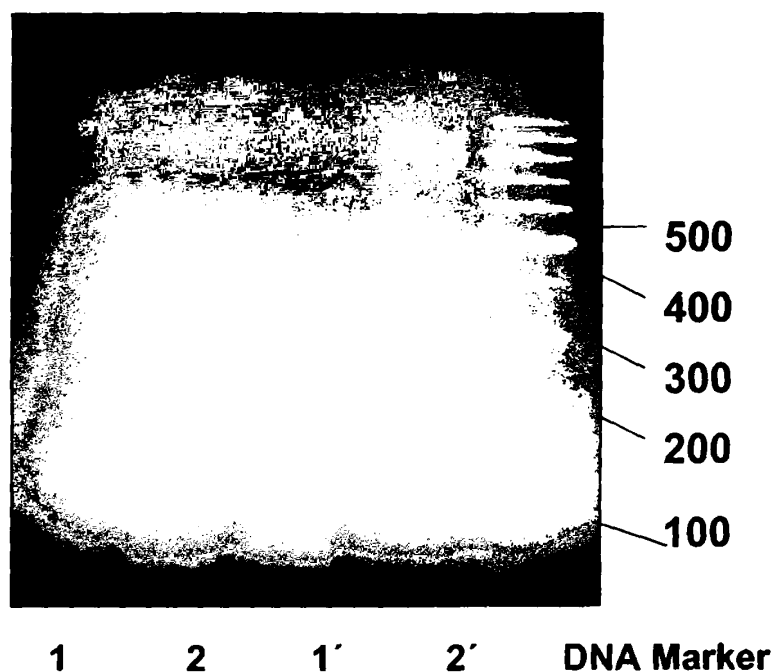
Δοκιμή 4

- A. 5 μ l δείγματος RNA
- B. (επιλογή) 55° C
- Γ. 1. 0,2 μ M
2. 0,4 μ M $\longrightarrow$ επιλογή
3. 0,8 μ M
- Δ. 1,5 mM

A

Εικόνα 68

αντιδράσεων που ακολουθήθηκε για την ανίχνευση του *Fas mRNA*

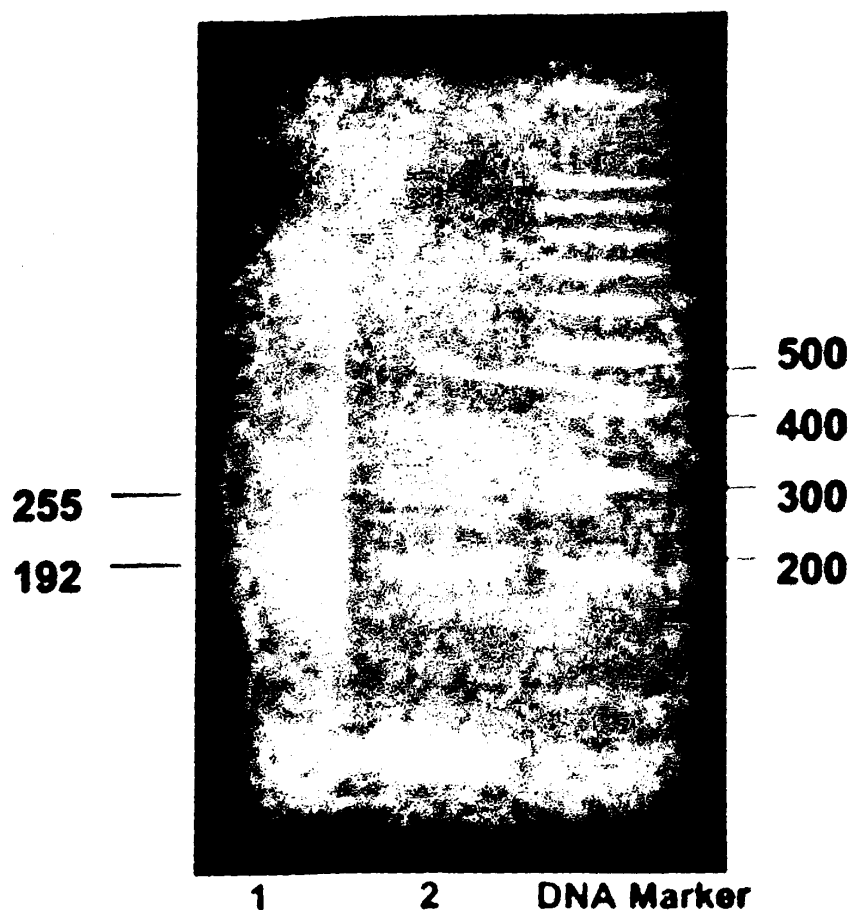
B

Εικόνα 69

RT-PCR που πραγματοποιήθηκαν για την ανίχνευση *Fas mRNA*

αντιστοιχούν σε προϊόντα αντίδρασης RT-PCR από 4 δείγματα:
5 μ l εκμαγείου RNA κυττάρων αίματος και θερμοκρασία σταδίου
δοτικών μορίων 45 ° C.

αντιστοιχούν σε προϊόντα αντίδρασης RT-PCR συγκέντρωσης MgCl_2 3 mM, ενώ
αντιστοιχούν σε προϊόντα αντίδρασης RT-PCR από τα ίδια αρχικά δείγματα,
με συγκέντρωση MgCl_2 1,5 mM.



Εικόνα 70

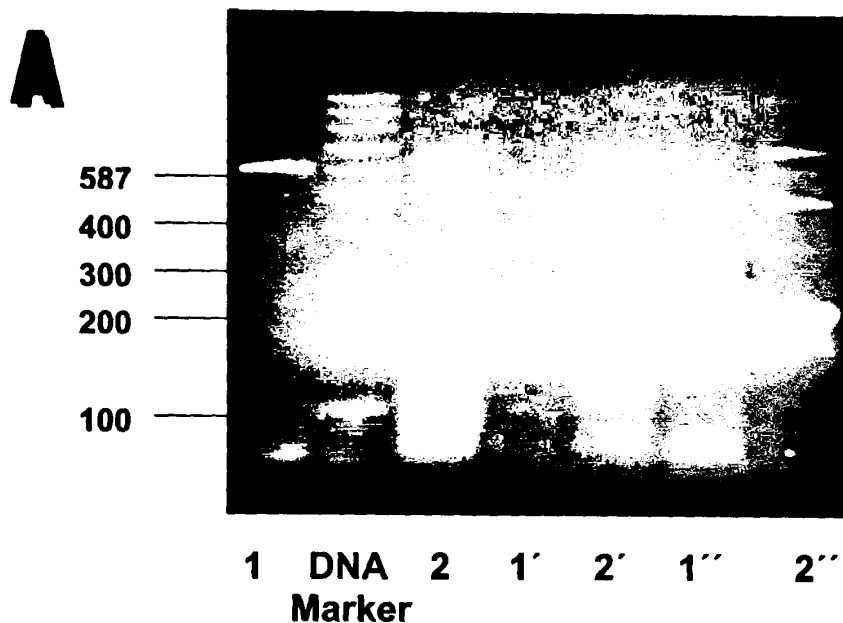
Βέλτιστες συνθήκες RT-PCR για την ανίχνευση Fas mRNA σε κύτταρα αίματος

Οι θέσεις 1 και 2 προέρχονται από το ίδιο αρχικό δείγμα RNA κυττάρων αίματος.

Θέση 1: θερμοκρασία σταδίου πρόσδεσης πριμοδοτικών μορίων 57 ° C.

Θέση 2: θερμοκρασία σταδίου πρόσδεσης πριμοδοτικών μορίων 55 ° C.

Τα αναμενόμενα προϊόντα της αντίδρασης RT-PCR για την ανίχνευση Fas mRNA είναι 255 bp, ενώ για την ανίχνευση sFas mRNA είναι 192 bp. Επιλέγεται ως βέλτιστη η θερμοκρασία σταδίου πρόσδεσης πριμοδοτικών μορίων 55 ° C



Εικόνα 71 Α

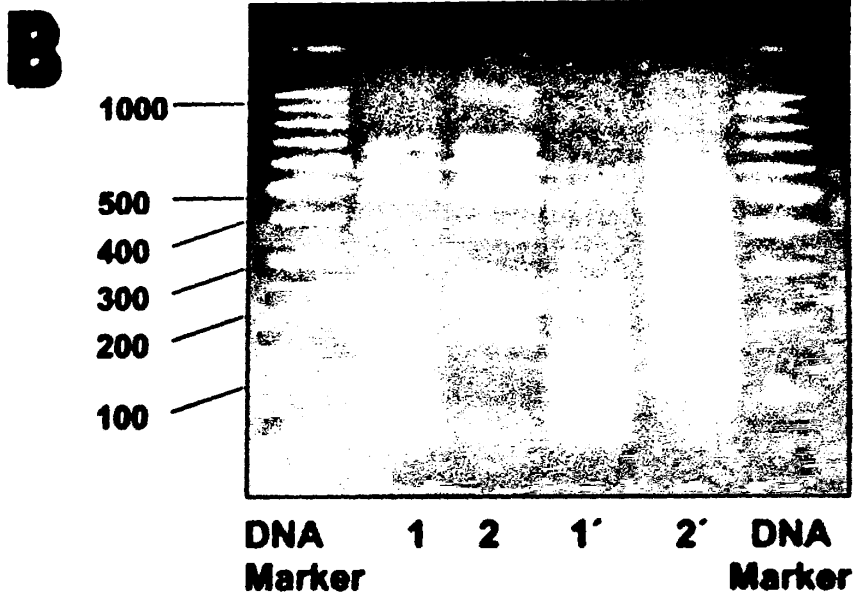
*Αντιδράσεις RT-PCR που πραγματοποιήθηκαν για την ανίχνευση FasL mRNA
σε κύτταρα αίματος*

A. Οι θέσεις αυτές αντιστοιχούν σε προϊόντα αντίδρασης RT-PCR από 2 δύο διαφορετικά δείγματα αρχικού RNA.

Θέσεις 1,2: έλεγχος απομόνωσης RNA με εκκινητές β-ακτίνης.

Θέσεις 1',2': 2,5 μl εκμαγείου RNA κυττάρων αίματος και θερμοκρασία σταδίου πρόσδεσης πριμοδοτικών μορίων 57 ° C.

Θέσεις 1''-2'': 5 μl εκμαγείου RNA κυττάρων αίματος και θερμοκρασία σταδίου πρόσδεσης πριμοδοτικών μορίων 57 ° C.



Εικόνα 71 Β

**Αντιδράσεις RT-PCR που πραγματοποιήθηκαν για την ανίχνευση FasL mRNA
σε κύτταρα αίματος**

Β. Οι θέσεις 1,1' και 2,2' προέρχονται από δύο διαφορετικά δείγματα αρχικού RNA από κύτταρα αίματος.

Θέσεις 1,2: θερμοκρασία σταδίου πρόσδεσης πριμοδοτικών μορίων 57 ° C.

Θέσεις 1',2': θερμοκρασία σταδίου πρόσδεσης πριμοδοτικών μορίων 66 ° C.

Πίνακας 19

Αντιδραστήρια RT-PCR από RNA θυρεοειδικών κυττάρων (λήψη με FNA)

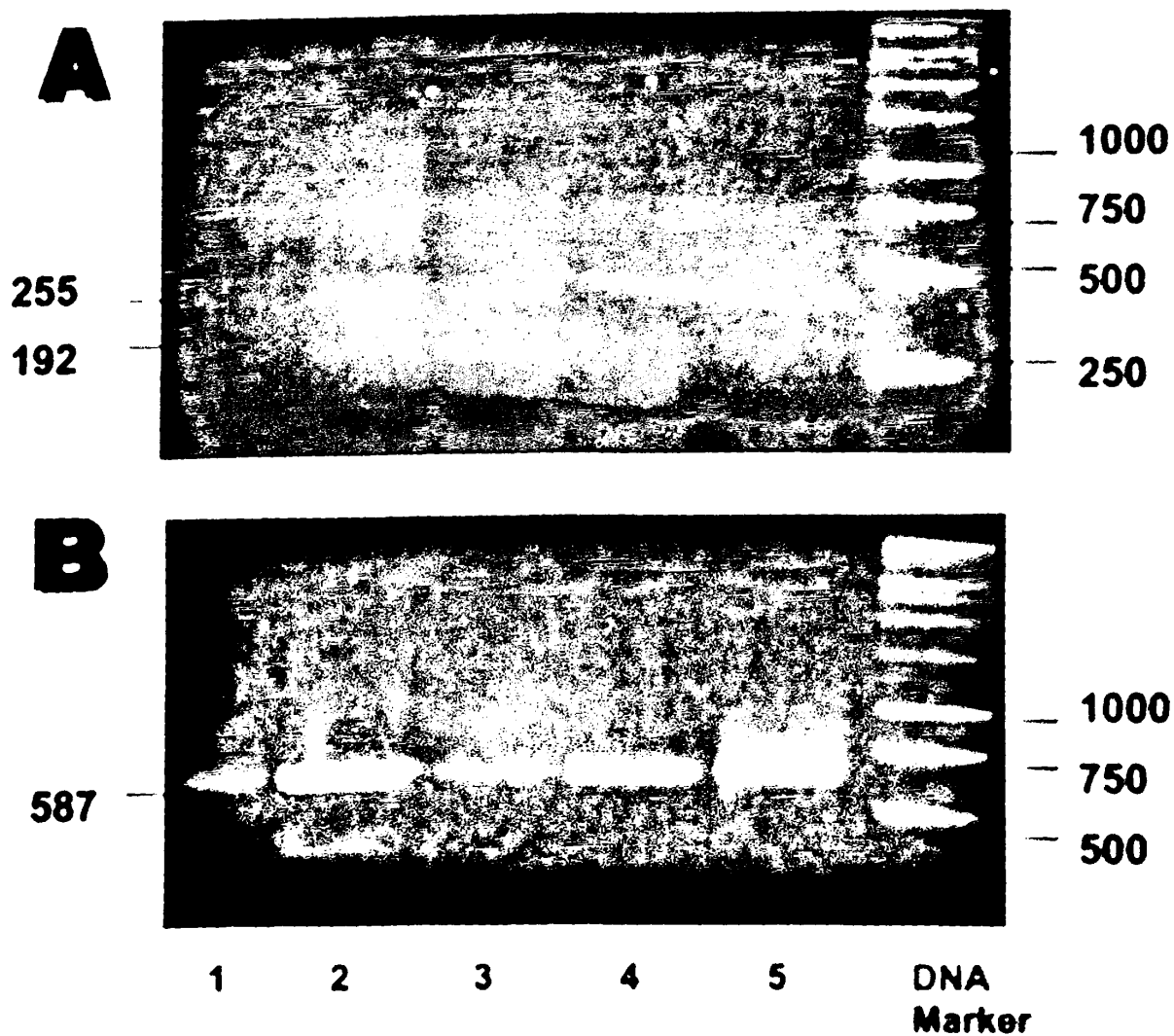
Μίγμα I

Αντιδραστήριο (διαλύματα stock)	Όγκος για την αντίδραση β-ακτίνης	Όγκος για την αντίδραση Fas ή Fas Ligand	Τελική συγκέντρωση
Αποστειρωμένο νερό	0,5 μ l	0,5	
Μίγμα dNTPs (10 mM κάθε dNTP)	4 μ l	4 μ l	0,2 mM
Διάλυμα DTT	2,5 μ l	2,5 μ l	5 mM
Αναστολέας RNAσών	1 μ l	1 μ l	5 U
Πριμοδοτικό μόριο 1 (forward)	-	1 μ l	0,4 μ M
Πριμοδοτικό μόριο 2 (reverse)	-	1 μ l	0,4 μ M
Μίγμα πριμοδοτικών μορίων β-ακτίνης	2 μ l	-	0,4 μ M (το κάθε ένα)
Συνολικός όγκος	10 μ l	10 μ l	

Μίγμα II

Αντιδραστήριο	Όγκος για την αντίδραση β-ακτίνης	Όγκος για την αντίδραση Fas ή Fas Ligand	Τελική συγκέντρωση
αποστειρωμένο νερό	14 μ l	14 μ l	
ρυθμιστικό διάλυμα PCR (5x)	10 μ l	10 μ l	1x
Μίγμα ενζύμων	1 μ l	1 μ l	
Συνολικός όγκος	25 μ l	25 μ l	

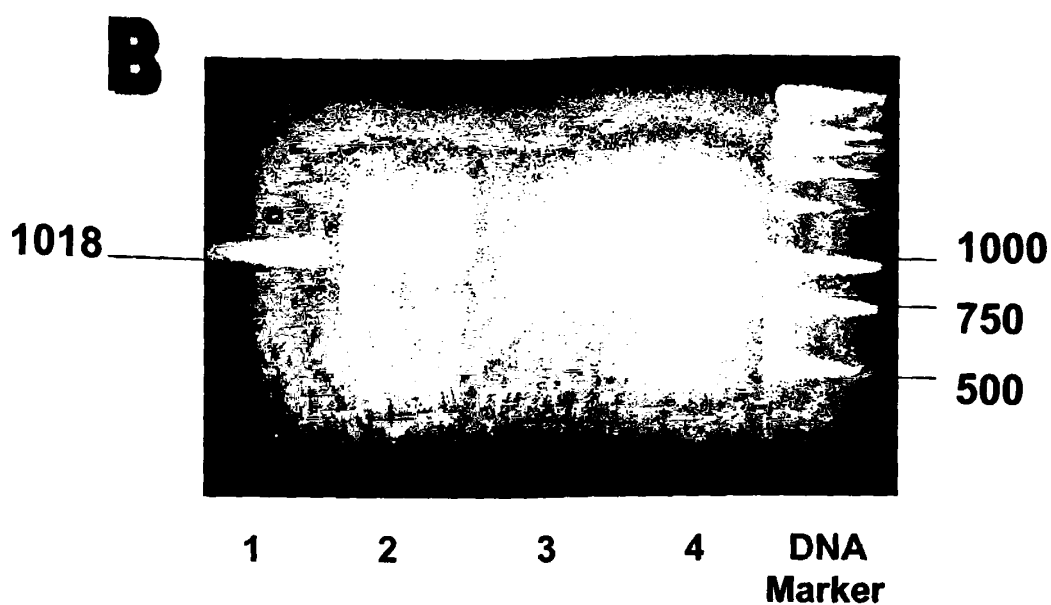
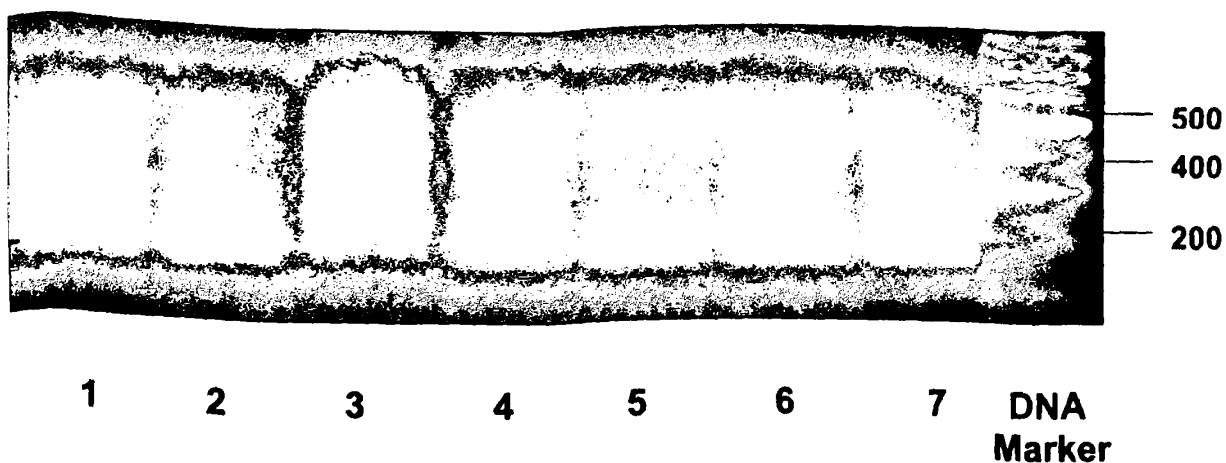




Εικόνα 72

Αντιδράσεις RT-PCR που πραγματοποιήθηκαν για την ανίχνευση *Fas* mRNA
σε δείγματα FNA

- A. Οι θέσεις 1,4,5 προέρχονται από δείγματα ασθενών με NTG, ενώ οι θέσεις 2,3 από δείγματα ασθενών με HT. Η θερμοκρασία σταδίου πρόσδεσης πριμοδοτικών μορίων ήταν 55 ° C για όλα τα δείγματα. Το αναμενόμενο προϊόν (255 bp) διακρίνεται στα δείγματα 2,3.
- B. Οι θέσεις 1-5 αντιστοιχούν σε αντιδράσεις ελέγχου απομόνωσης RNA με εκκνητίες β-ακτίνης (προϊόν 587 bp).



Εικόνα 73

Αντιδράσεις RT-PCR που πραγματοποιήθηκαν για την ανίχνευση Fas και FasL mRNA σε δείγματα FNA

Οι θέσεις 1-7 προέρχονται από δείγματα ασθενών με NTG (θερμοκρασία πρόσδεσης πριμοδοτικών μορίων 55° C). Το προϊόν της αντίδρασης είναι τμήμα DNA 192 bp.

Οι θέσεις 1,2 αντιστοιχούν σε δείγματα ασθενών με HT, η θέση 3 σε δείγμα ασθενούς με NTG και η θέση 4 σε δείγμα RNA από κύτταρα αίματος στο οποίο διαπιστώθηκε έκφραση FasL mRNA σε προηγούμενη αντίδραση RT-PCR. Από τα δείγματα FNA, το αναμενόμενο προϊόν (1018 bp) διακρίνεται σε αυτά που αντιστοιχούν σε ασθενείς με HT (θερμοκρασία πρόσδεσης πριμοδοτικών μορίων 60° C).

2.4 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Με βάση τα αποτελέσματα που προαναφέρθηκαν στα κεφάλαια 2.1-2.3, καταλήγουμε στα επιγραμματικά συμπεράσματα που αναφέρονται στη συνέχεια.

1) Στα δείγματα HT, η οποία έχει συσχετιστεί με αυξημένα επίπεδα απόπτωσης, διαπιστώθηκε:

Ανοσοκυτταροχημικά

- υψηλότερος δείκτης έκφρασης της πρωτεΐνης Fas στα θυρεοειδικά κύτταρα ασθενών με ενεργό HT (βαθμός 3), συγκριτικά με ασθενείς που ήταν στη χρόνια φάση της νόσου (βαθμός 2) και ασθενείς με NTG
- χαμηλός δείκτης έκφρασης της πρωτεΐνης Bcl-2 (βαθμός 1) στα θυρεοειδικά κύτταρα

Με την τεχνική RT-PCR

- έκφραση Fas και FasL mRNAs

Με τη μέθοδο ELISA

- ελαττωμένα επίπεδα διαλυτής πρωτεΐνης sFas στον ορό των ασθενών που ήταν στην ενεργό φάση της νόσου και φυσιολογικά στον ορό των ασθενών με χρόνια HT, συγκριτικά με φυσιολογικά άτομα.

2) Στα δείγματα NTG, η οποία έχει συσχετιστεί με χαμηλά επίπεδα απόπτωσης, διαπιστώθηκε:

Ανοσοκυτταροχημικά

- χαμηλότερος δείκτης έκφρασης της πρωτεΐνης Fas στα θυρεοειδικά κύτταρα σε κολλοειδείς και αδενωματώδεις όζους (βαθμός 1), συγκριτικά με κυστικούς όζους (βαθμός 2) και ασθενείς με HT
- χαμηλός δείκτης έκφρασης της πρωτεΐνης Bcl-2 σε κολλοειδή και κυστικά οζίδια (βαθμός 1), αλλά υψηλός σε αδενωματώδη οζίδια (βαθμός 3).

Με την τεχνική RT-PCR

- έκφραση sFas mRNA ενώ δεν ανιχνεύτηκε έκφραση Fas και FasL mRNAs,

Με ELISA

- αυξημένα επίπεδα sFas στον ορό συγκριτικά με τους ασθενείς με HT και φυσιολογικά άτομα

3) Στην πλειοψηφία ασθενών και υγιών ατόμων, με τη μέθοδο ELISA διαπιστώθηκε ότι τα επίπεδα της διαλυτής πρωτεΐνης sFasL στον ορό ήταν χαμηλά έως μη ανιχνεύσιμα και σύμφωνα με τα δεδομένα της βιβλιογραφίας θεωρήθηκαν φυσιολογικά.



Μέρος τρίτο

Συζήτηση



ΜΕΡΟΣ ΤΡΙΤΟ

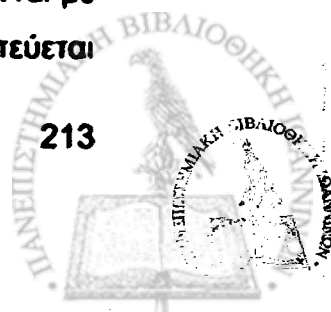
ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Μεταξύ των ασθενειών που έχουν συσχετιστεί τα τελευταία χρόνια με την απόπτωση συμπεριλαμβάνονται και οι παθήσεις του θυρεοειδούς αδένος (Andrikoula and Tsatsoulis 2001, review). Η οδός Fas-Fas Ligand έχει αναδειχθεί μία από τις κύριες οδούς επαγωγής απόπτωσης στο θυρεοειδή, παραμένουν, όμως, αδιευκρίνιστοι οι μηχανισμοί έναρξης και ρύθμισης αυτής της διαδικασίας προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου σε κάθε νόσο.

Ο υποδοχέας Fas είναι διαμεμβρανική πρωτεΐνη τύπου I με MB 45 kDa (Nagata 1994), η οποία αποτελείται από 335 αμινοξέα και κωδικοποιείται από το γονίδιο fas του ανθρώπινου χρωμοσώματος 10. Η πρωτεΐνη Fas διαθέτει μία σηματοδοτική αλληλουχία στο αμινοτελικό της άκρο, ένα εξωκυττάριο τμήμα με τρεις πλούσιες σε κυστεΐνη υποπεριοχές, ένα υδρόφοβο διαμεμβρανικό τμήμα και μία κυτταροπλασματική ουρά στο καρβοξυτελικό της άκρο (Itoh και συν. 1991). Το προσδετικό μόριο του υποδοχέα Fas, γνωστό ως Fas ligand (FasL), είναι διαμεμβρανική πρωτεΐνη τύπου II με MB 40 kDa και κωδικοποιείται από το γονίδιο Fas Ligand που βρίσκεται στο ανθρώπινο χρωμόσωμα 1. Για την πρόκληση απόπτωσης είναι απαραίτητη η ενεργοποίηση της πρωτεΐνης Fas είτε μέσω anti-Fas αντισώματος είτε μέσω της πρωτεΐνης FasL (Yonehara και συν. 1989, Suda και συν. 1993).

Η διεθνής βιβλιογραφία αναφέρει αντιφατικά αποτελέσματα σχετικά με την έκφραση των πρωτεϊνών Fas και Fas Ligand στα θυρεοειδικά κύτταρα, τα οποία προφανώς έγκεινται σε διαφορετικούς πειραματικούς τρόπους προσέγγισης βιολογικών και μη υλικών. Απαιτούνται, συνεπώς, περαιτέρω μελέτες για να διεκρινιστεί ο τρόπος ρύθμισης της έκφρασης του υποδοχέα Fas και του αντίστοιχου προσδετικού μορίου Fas Ligand (FasL) στα θυρεοειδικά κύτταρα (Andrikoula and Tsatsoulis 2001, review).

Οι περισσότερες μελέτες αφορούν το ρόλο της Fas-επαγόμενης απόπτωσης στην αυτοάνοση θυρεοειδική νόσο (AITD) (Thompson 1995, Baker 1999). Οι διαφορές στην έκφραση των πρωτεϊνών Fas και FasL συσχετίζονται με την ετερογένεια των φαινοτύπων που παρατηρούνται στην AITD και πιστεύεται



ότι καθορίζουν τα δύο διαφορετικά κλινικά σύνδρομα με τα οποία εκδηλώνεται αυτή η νόσος, τη θυρεοειδίτιδα Hashimoto (HT) και τη νόσο Graves' (GD).

Επιδημιολογικές και μεταβολικές μελέτες, που διεξήχθησαν περισσότερα από 30 χρόνια πριν, έδειξαν ότι η βρογχοκήλη από ανεπάρκεια ιωδίου αποτελεί ενδημικό πρόβλημα στην Ελλάδα, και ειδικότερα στην ορεινή περιοχή της Ηπείρου. Η επίπτωση της βρογχοκήλης σε παιδιά της σχολικής ηλικίας που κατοικούσαν σ' αυτή την περιοχή διαπιστώθηκε στο 40-60% (Malamos, Miras και συν. 1966, Malamos, Koutras και συν. 1966). Η πλειοψηφία αυτών των οζιδίων είναι μη νεοπλασματικά, ενώ μόνο το 5-30% είναι κακοήγη και απαιτούν χειρουργική επέμβαση (Hermus and Huysmans 1998). Ο κύριος σκοπός της βιοψίας FNA είναι να ταυτοποιήσει τα οζίδια που χρειάζονται χειρουργική επέμβαση και να ελαττώσει στο σύνολο τον αριθμό των θυρεοειδεκτομών σε ασθενείς με καλοήγη διαταραχή του θυρεοειδούς.

Ενώ έχουν δημοσιευτεί πολλές μελέτες σχετικά με το ρόλο της απόπτωσης στην ΑITD, είναι λίγες αυτές που διερευνούν το ρόλο της στην παθογένεια της μη τοξικής βρογχοκήλης. Οι περισσότερες εργασίες αφορούν επίμυες στους οποίους έχει προκληθεί η δημιουργία βρογχοκήλης με βρογχοκηλογόνες ουσίες, ή τομές θυρεοειδικού ιστού από ασθενείς που υποβλήθηκαν σε χειρουργική επέμβαση θυρεοειδούς. Η πλειοψηφία των ασθενών με οζώδη θυρεοειδική νόσο δεν χρήζει χειρουργικής αντιμετώπισης. Οι ασθενείς αυτοί υποβάλλονται για διαγνωστικούς λόγους σε παρακέντηση θυρεοειδούς αδένος δια λεπτής βελόνης (FNA), και το υλικό που λαμβάνεται αποστέλλεται για κυτταρολογική εξέταση.

Η μελέτη επομένως του δείγματος FNA που λαμβάνεται από τους παραπάνω ασθενείς, παράλληλα με τη διαγνωστική του αξία, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη διερεύνηση της έκφρασης αποπτωτικών δεικτών στα θυρεοειδικά τους κύτταρα.

Στο πρώτο στάδιο της παρούσας μελέτης, με την μεθοδολογία της ανοσοκυτταροχημείας και τη χρήση ειδικών μονοκλωνικών αντισωμάτων, μελετήθηκε η έκφραση της αποπτωτικής πρωτεΐνης Fas και της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2 στα θυρεοειδικά κύτταρα σε υλικό FNA από ασθενείς με οζώδη θυρεοειδική νόσο, είτε αυτοάνοσης (HT) είτε μη αυτοάνοσης αιτιολογίας (NTG). Από τα μέχρι τώρα βιβλιογραφικά δεδομένα είναι η πρώτη μελέτη που παρουσιάζει τις μεταβολές που θα αναφερθούν στη συνέχεια σε υλικό παρακέντησης FNA του θυρεοειδούς.

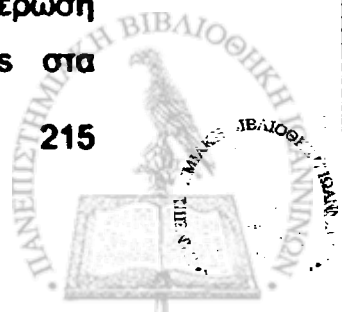


Η έκφραση της πρωτεΐνης Fas στην οξώδη θυρεοειδική νόσο

Ο δείκτης έκφρασης της πρωτεΐνης Fas ήταν υψηλότερος (βαθμός 3) σε δείγματα με ενεργό HT και σχετικά με αυτά χαμηλότερος (βαθμός 2) σε δείγματα χρόνιας HT (Andrikoula and Tsatsoulis 2001).

Σε παλαιότερες μελέτες, με τεχνικές όπως η κυτταρομετρία, η ανοσοαποτύπωση, η RT-PCR και η ανοσοϊστοχημεία σε τομές θυρεοειδικού ιστού, διαπιστώθηκε αυξημένη έκφραση Fas σε κύτταρα ασθενών με HT σε σύγκριση με ασθενείς με μη τοξική βρογχοκήλη (Non Toxic Goiter, NTG) (Hammond και συν. 1997, Giordano και συν. 2001, Mitsiades και συν. 1998, Stassi και συν. 2000). Σε καλλιέργειες κυττάρων ανθρώπινου γλοώματος, μετά από επίδραση με κυτταροκίνες όπως η INF- γ , η IL-1 β , ή ο TNF- α , διαπιστώθηκε αύξηση της έκφρασης Fas, επίσης, και αύξηση της ευαισθησίας των κυττάρων αυτών να οδηγούνται σε απόπτωση επαγόμενη από αντίσωμα anti-Fas (Weller και συν. 1994). Τα ευρήματα αυτά επιβεβαιώθηκαν αργότερα και σε καλλιέργειες θυρεοειδικών κυττάρων υγιών ατόμων ή ασθενών με GD (Kawakami και συν. 1996). Στή θυρεοειδίτιδα, πιθανή πηγή κυτταροκινών είναι τα λεμφοκύτταρα που διηθούν τον αδένα (Watson και συν. 1994). Άλλη ομάδα ερευνητών ανίχνευσε έκφραση Fas σε θυρεοειδικά κύτταρα ασθενών με NTG μόνο ύστερα από επίδραση με IL-1 β (Giordano και συν. 1997).

Σε συμφωνία με τα προηγούμενα αποτελέσματα, στην παρούσα μελέτη διευκρινίστηκε μια διαφορετική εικόνα όσον αφορά στην έκφραση της πρωτεΐνης Fas σε ασθενείς με NTG σε σύγκριση με αυτή της HT. Συγκεκριμένα, ανιχνεύτηκε πρωτεΐνη Fas σε όλους τους ασθενείς με NTG, αλλά σε χαμηλά επίπεδα (Andrikoula and Tsatsoulis 2001). Αναλυτικά, στους κολλοειδείς και αδενωματώδεις όζους, ο δείκτης έκφρασης της πρωτεΐνης Fas ήταν ο χαμηλότερος από όλες τις ομάδες ασθενών (βαθμός 1). Από την ομάδα, όμως, των κυστικών όζων 4 από τα 6 δείγματα παρουσίασαν σχετικά υψηλότερη έκφραση πρωτεΐνης Fas 2 σε σύγκριση με τους υπόλοιπους όζους της NTG (βαθμός 2). Στα παραπάνω 4 δείγματα των κυστικών όζων, η κυτταρολογική εξέταση έδειξε την παρουσία λεμφοκυττάρων. Αυτό οδηγεί στο εύλογο συμπέρασμα ότι η παρουσία των λεμφοκυττάρων, με την απελευθέρωση κυτταροκινών, ευθύνεται για την αυξημένη έκφραση του υποδοχέα Fas στα



θυρεοειδικά κύτταρα. Μεγαλύτερος αριθμός ασθενών και ο έλεγχος με *in vitro* πειράματα θα φωτίσει περισσότερο τη θεωρία αυτή, η οποία θα αποτελέσει ένα νέο κεφάλαιο της μελέτης μας.

Όπως δείχνουν παλαιότερες μελέτες, ενώ σε θυρεοειδείς αδένες με NTG ανιχνεύονται χαμηλά επίπεδα απόπτωσης, σε αδένες με θυρεοειδίτιδα Hashimoto διαπιστώνονται αυξημένα επίπεδα απόπτωσης, έως και 22%, στην περιφέρεια περιοχών διηθημένων με λεμφοκύτταρα (Kotani και συν. 1995, Hammond και συν. 1997, Giordano και συν. 1997, Hiromatsu και συν. 1999). Ο αριθμός των αποπτωτικών κυττάρων είναι ελαττωμένος σε άθικτα θυλάκια μακριά από τα βλαστικά κέντρα (Kotani και συν. 1995, Hammond και συν. 1997). Τα διαφορετικά επίπεδα απόπτωσης μεταξύ των δειγμάτων, αποδίδονται στη φάση της νόσου και/ή στην έκταση της λεμφοκυτταρικής διήθησης (Kotani και συν. 1995, Hammond και συν. 1997, Giordano και συν. 1997, Koga και συν. 1999, Tanimoto και συν. 1995). Ανοσοϊστοχημικές αναλύσεις επιβεβαίωσαν ότι αυτή η διαδικασία περιορίζεται κυρίως στα θυρεοειδικά κύτταρα, ενώ τα ενδοθυρεοειδικά λεμφοκύτταρα τείνουν να παραμείνουν άθικτα (Giordano και συν. 1997).

Στην άλλη μορφή AITD, τη GD, ανιχνεύονται χαμηλά επίπεδα απόπτωσης (0-5%), παρόλο που έχει διαπιστωθεί έκφραση των πρωτεϊνών Fas και FasL στα θυρεοειδικά κύτταρα ασθενών με τη νόσο αυτή (Hammond και συν. 1997, Hiromatsu και συν. 1999, Labat-Moleur και συν. 1999). Τα αποτελέσματα αυτά καθώς και τα υψηλότερα επίπεδα πρωτεΐνης Bcl-2 σε σύγκριση με αντίστοιχα κύτταρα ασθενών με HT (Hiromatsu και συν. 1999, Giordano και συν. 2001), συνηγορούν στο ότι στους θυρεοειδείς αδένες με GD κυριαρχεί ένα αντιαποπτωτικό περιβάλλον (*milieu*). Τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης FasL ήταν παρόμοια σε θυρεοειδικά κύτταρα ασθενών με GD, φυσιολογικών ατόμων και ασθενών με NTG. Αυτό φαίνεται να εξηγεί την έλλειψη ιστικής καταστροφής σ' αυτούς τους αδένες, καθώς πιστεύεται ότι τα θυρεοειδικά κύτταρα με την έκφραση FasL πιθανότατα προστατεύονται από τα αυτοαντιδρώντα λεμφοκύτταρα.

Η διαταραχή της ισορροπίας στην έκφραση των πρωτεϊνών Fas και FasL μπορεί να μετατρέψει έναν αρχικά προστατευτικό σε έναν δυνητικά καταστροφικό μηχανισμό, όπως συμβαίνει στη HT, όπου υπερεκφράζονται και οι δύο πρωτεΐνες (Giordano και συν. 1997). Έχει διατυπωθεί η άποψη ότι η ταυτόχρονη έκφρασή τους στην επιφάνεια γειτονικών θυρεοειδικών κυττάρων φαίνεται ότι πυροδοτεί την αμοιβαία (=fratricidal) απόπτωση των θυρεοειδικών κυττάρων. Ο μηχανισμός



αυτός αποδεικνύεται σημαντικός για την καταστροφή των θυρεοειδικών κυττάρων στη HT (Williams 1997).

Η έκφραση της πρωτεΐνης Fas Ligand στην οξώδη θυρεοειδική νόσο

Η έκφραση της πρωτεΐνης Fas ligand (FasL) αναφέρθηκε αρχικά μόνο σε ενεργοποιημένα T-κύτταρα που μετέχουν στην κυτταρική ανοσία, καθώς και σε κύτταρα ιστών, όπως είναι οι οφθαλμοί, οι όρχεις, ο εγκέφαλος και πλακούντας που χαρακτηρίζονται «ανοσολογικά προνομιούχοι» (immune-privileged) (Bellgrau και συν. 1995, Watanabe και συν. 1997, Griffith και συν. 1995). Τα κύτταρα των παραπάνω ιστών, προστατεύονται από τα κυτταροτοξικά T-κύτταρα μέσω της έκφρασης του μορίου FasL, της σύνδεσής του στον υποδοχέα Fas των λεμφοκυττάρων και της επαγωγής της απόπτωσης στα T-κύτταρα.

Στη δική μας μελέτη, η ανίχνευση του FasL mRNA με την τεχνική RT-PCR, έδωσε θετικά αποτελέσματα στους ασθενείς με HT, αλλά αρνητικά στους ασθενείς με NTG.

Στο παρελθόν, η πρωτεϊνική ανίχνευση του FasL στα θυρεοειδικά κύτταρα έδωσε αντίφατικά αποτελέσματα ανάλογα με τα χρησιμοποιούμενα κάθε φορά αντισώματα (Rymaszewski και συν. 1997). Μελέτη των Giordano και συν. (1997) έδειξε συνεχή έκφραση του FasL σε θυρεοειδικά κύτταρα από ιστούς τόσο με HT όσο και με NTG. Πρόσφατες μελέτες με ειδικά αντιδραστήρια και τη χρήση της ανοσοϊστοχημείας (Mitsiades και συν. 1998), της ανοσοαποτύπωσης (Stassi και συν. 2000, Giordano και συν. 2001), της FACS ανάλυσης και της RT-PCR (Giordano και συν. 2001) έδειξαν αυξημένη έκφραση FasL σε θυρεοειδικά κύτταρα HT σε σύγκριση με φυσιολογικά κύτταρα του αδένα. Αυτό θα μπορούσε να αποτελεί επιβεβαίωση της αρχικής υπόθεσης ότι υπάρχει κάποιος υποκείμενος αυτοκρινής μηχανισμός θανάτου του αυτοάνοσου θυρεοειδικού κυττάρου σ' αυτή την παθολογική κατάσταση (Giordano και συν. 1997). Στην πρόσφατη διεθνή βιβλιογραφία αναφέρονται αποτελέσματα σχετικά με την έκφραση του μορίου FasL και με *in situ* και με *in vitro* πειράματα σε GD και σε NTG (Hiromatsu και συν. 1999, Stassi και συν. 2000, Giordano και συν. 2001).

Εξαιτίας της έκφρασης Fas και FasL στα θυρεοειδικά κύτταρα προέκυψε η υπόθεση ότι ο κυτταρικός θάνατος θα μπορούσε να προκαλείται στιγμιαία σε γειτονικά θυρεοειδικά κύτταρα (Giordano και συν. 1997). Παρόλα αυτά, δεν έχει



παρατηρηθεί *in vivo* μαζική απόπτωση. Αντίθετα, φαίνεται ότι η απόπτωση και η καταστροφή του θυρεοειδούς επέρχονται σταδιακά (Tanimoto και συν. 1995, Kotani και συν. 1995, Hammond και συν. 1997). Οι ενδείξεις αυτές θέτουν υπό αμφισβήτηση την παραπάνω υπόθεση για αλληλοκαταστροφή γειτονικών θυρεοειδικών κυττάρων.

Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης είναι σε συμφωνία με την παλαιότερη μελέτη των Mitsiades και συν. (1998), οι οποίοι με τις τεχνικές ανοσοϊστοχημεία και RT-PCR, καταλήγουν στο ότι τα θυλακιώδη κύτταρα στη HT υφίστανται απόπτωση μέσω αυξορρύθμισης του Fas-FasL και μειορρύθμισης της Bcl-2. Αντίθετα, τα λεμφοκύτταρα δεν φαίνεται να μετέχουν στη διαδικασία με το δικό τους FasL, δημιουργούν, όμως, το κατάλληλο περιβάλλον κυτταροκινών για την αύξηση της έκφρασης Fas-FasL και την πυροδότηση της απόπτωσης.

Σε φυσιολογικά δείγματα έχει διαπιστωθεί με ανοσοϊστοχημικές μεθόδους και RT-PCR ασθενώς θετική και όχι συνεχής έκφραση FasL (Stokes και συν. 1998, Hiromatsu και συν. 1999, Mitsiades και συν. 1998, Mitsiades και συν. 2000), όσο και με ανοσοαποτύπωση (Mitsiades και συν. 2000).

Με βάση τη μελέτη των Giordano και συν. (1997), ο θυρεοειδής αδένας θεωρήθηκε αρχικά ως ανοσολογικά προνομιούχος ιστός (*immune-privileged*) όπως οι ιστοί των οφθαλμών και των όρχεων, λόγω της έκφρασης FasL. Από τις μελέτες, όμως, που ακολούθησαν καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι στην πραγματικότητα ο φυσιολογικός θυρεοειδικός ιστός δεν έχει τέτοια ιδιότητα, αντίθετα, αποτελεί συχνά στόχο αυτοάνοσης καταστροφής.

Ο ρόλος των διαλυτών πρωτεϊνών sFas και sFasL στην απόπτωση των θυρεοειδικών κυττάρων

Το ανθρώπινο γονίδιο *fas* αποτελείται από εννέα εξόνια και οκτώ ιντρόνια (Liu και συν. 1995). Πρόσφατες μοριακές μελέτες περιγράφουν ένα παράλλαγμα Fas mRNA, που προκύπτει κατά το εναλλακτικό μάτισμα από εξάλειψη του εξονίου 6, το οποίο κωδικοποιεί τη διαμεμβρανική περιοχή του υποδοχέα Fas. Κατά συνέπεια, το παράλλαγμα αυτό (Fas Δ TM) κωδικοποιεί ένα μόριο Fas χωρίς τη διαμεμβρανική του περιοχή, που κυκλοφορεί ως διαλυτή πρωτεΐνη και είναι γνωστό ως soluble Fas (sFas) (Cheng και συν. 1994, Liu και συν. 1995). Η πρωτεΐνη sFas μπορεί να συνδεθεί με το μόριο FasL παρεμποδίζοντας την



αλληλεπίδρασή του με τον υποδοχέα Fas και προστατεύοντας μ' αυτόν τον τρόπο τα κύτταρα από τη Fas-επαγόμενη απόπτωση (Cheng και συν. 1994).

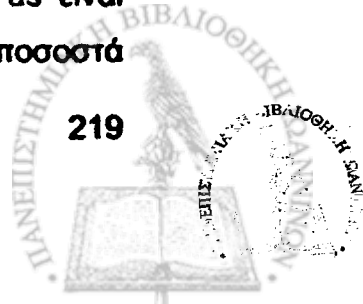
Σκοπός της εφαρμογής της τεχνικής ELISA ήταν η διερεύνηση των επιπέδων των διαλυτών πρωτεϊνών sFas και sFas Ligand στον ορό ασθενών με NTG και HT, καθώς και η σύγκρισή τους με τα αντίστοιχα επίπεδα των φυσιολογικών ατόμων.

Με βάση τα υπερηχογραφικά ευρήματα και τις δοκιμασίες θυρεοειδικής λειτουργίας, οι ασθενείς με HT ταξινομήθηκαν σε δύο υποομάδες: μία ομάδα ασθενών στην ενεργό φάση της νόσου με υποκλινικό υποθυρεοειδισμό και υψηλά επίπεδα αντισωμάτων anti-TPO και μία ομάδα ασθενών στη χρόνια φάση της νόσου, με μακροχρόνιο υποθυρεοειδισμό υπό αγωγή υποκατάστασης με θυροξίνη.

Η μελέτη αυτή έδειξε ότι, σε σύγκριση με τα φυσιολογικά άτομα, τα επίπεδα sFas στον ορό είναι υψηλότερα στους ασθενείς με NTG και χαμηλότερα στους ασθενείς με HT στην ενεργό φάση της νόσου. Αντίθετα, οι ασθενείς με χρόνια HT είχαν παρόμοια επίπεδα πρωτεΐνης sFas με τους υγιείς. Στους ασθενείς με HT, διαπιστώθηκε αντίστροφη εξάρτηση των επιπέδων sFas από τα επίπεδα των αντισωμάτων anti-TPO στον ορό. Από την άλλη πλευρά, δε διαπιστώθηκε εξάρτηση των ίδιων επιπέδων από τα επίπεδα TSH. Σε αντίθεση με προηγούμενη μελέτη στην οποία εφαρμόστηκε η ίδια τεχνική ELISA (Seishima και συν. 1996), τα αποτελέσματα αυτής της εργασίας δεν έδειξαν εξάρτηση των επιπέδων sFas από την ηλικία ή το φύλο των εξεταζόμενων ατόμων.

Παραμένει ακόμη υπό διερεύνηση εάν τα αυξημένα επίπεδα sFas είναι αποτέλεσμα της αυξημένης παραγωγής sFas στα θυρεοειδικά κύτταρα και ενδοθυρεοειδικά λεμφοκύτταρα, ή του αυξημένου αριθμού αυτών των κυττάρων. Παρόλο που η επαγωγή παραγωγής της πρωτεΐνης sFas από κυτταροκίνες (Hiromatsu και συν., 1999) φαίνεται να στηρίζει την πρώτη άποψη, είναι πιθανός και ο δεύτερος μηχανισμός, καθώς η υπερτροφία και η υπερπλασία των θυρεοειδικών κυττάρων είναι χαρακτηριστικά της NTG.

Επομένως, στο δεύτερο στάδιο της παρούσας μελέτης διαπιστώθηκε, για πρώτη φορά, ότι η συγκέντρωση της πρωτεΐνης sFas είναι αυξημένη σε ασθενείς με NTG, μια πάθηση που έχει συσχετιστεί με χαμηλή έκφραση του υποδοχέα Fas στα θυρεοειδικά κύτταρα. Αντίθετα, η συγκέντρωση της πρωτεΐνης sFas είναι μειωμένη στην ενεργό φάση της HT, που συσχετίζεται με υψηλά ποσοστά



απόπτωσης, ενώ επανέρχεται στα επίπεδα των φυσιολογικών ατόμων στη χρόνια φάση της νόσου, κατά την οποία τα θυρεοειδικά κύτταρα έχουν καταστραφεί μέσω απόπτωσης (Andrikoula και συν. 2002, υπό κρίση). Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με προηγούμενη μελέτη (Shimaoka και συν. 1998), στην οποία βρέθηκαν ελαττωμένα επίπεδα sFas σε ευθυρεοειδικούς ασθενείς με HT (που ήταν προφανώς στην ενεργό φάση της νόσου), αλλά φυσιολογικά επίπεδα της ίδιας πρωτεΐνης σε ασθενείς με HT που έχουν γίνει υποθυρεοειδικοί.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, στο πρώτο στάδιο της μελέτης αυτής διαπιστώσαμε με ανοσοκυτταροχημεία χαμηλό δείκτη έκφρασης του υποδοχέα Fas (βαθμός 1) στην επιφάνεια των θυρεοειδικών κυττάρων των ασθενών με NTG. Αντίθετα, ο δείκτης έκφρασης του υποδοχέα Fas βρέθηκε υψηλότερος στους ασθενείς με ενεργό HT (βαθμός 3), ενώ σε σύγκριση με αυτούς, ήταν χαμηλότερος στους ασθενείς με χρόνια HT (βαθμός 2) (Andrikoula και συν. 2001).

Από τα ευρήματα και των δύο τεχνικών (ELISA και ανοσοκυτταροχημείας), συμπεραίνουμε ότι υπάρχει αντίστροφη συσχέτιση των επιπέδων sFas στον ορό και του βαθμού έκφρασης της πρωτεΐνης Fas στα θυρεοειδικά κύτταρα (Andrikoula και συν. 2002, υπό κρίση).

Παλαιότερες πειραματικές μελέτες *in vitro*, έδειξαν ότι η ενεργοποίηση περιφερικών μονοπύρηνων κυττάρων του αίματος προκάλεσε αύξηση της έκφρασης του υποδοχέα Fas και ταυτόχρονη ελάττωση της έκφρασης της διαλυτής πρωτεΐνης sFas στα κύτταρα αυτά. Κατά συνέπεια, η διαφορική έκφραση των παραλλαγμάτων Fas mRNA, τα οποία προκύπτουν από το εναλλακτικό μάτισμα διαφαίνεται ότι επηρεάζει τη Fas-επαγόμενη αποπτωτική διαδικασία ρυθμίζοντας την παραγωγή της μεμβρανικής και της διαλυτής, εκκρινόμενης μορφής του υποδοχέα Fas (Liu και συν. 1995).

Επιπλέον, μετά από αυτές τις παρατηρήσεις, δημοσιεύτηκαν μελέτες στις οποίες διαπιστώθηκαν με τη μέθοδο ELISA διαφορετικά επίπεδα sFas στις δύο μορφές της AITD, οι οποίες συσχετίζονται και με διαφορετικά ποσοστά Fas-επαγόμενης απόπτωσης θυρεοειδικών κυττάρων. Συγκεκριμένα, τα επίπεδα sFas ήταν αυξημένα σε ασθενείς με GD, μία πάθηση που χαρακτηρίζεται από χαμηλά ποσοστά απόπτωσης θυρεοειδικών κυττάρων και ελαττωμένα σε ασθενείς με HT, η οποία αποδίδεται στα αυξημένα ποσοστά απόπτωσης (Hiromatsu και συν. 1999, Shimaoka και συν. 1998).



Η διαλυτή μορφή του προσδετικού μορίου του υποδοχέα Fas, γνωστή ως sFasL προκύπτει με αποκοπή της πρωτεΐνης FasL από την κυτταρική μεμβράνη μέσω μιας μεταλλοπρωτεϊνάσης (Tanaka και συν. 1995). Το μόριο sFasL (MB 26 kD) έχει την ικανότητα να επάγει την απόπτωση σε Fas-θετικά κύτταρα-στόχους (Suda και συν. 1995, Hosaka και συν. 1998), γι' αυτό θεωρείται ότι λειτουργεί ως παθολογικός παράγοντας στη συστηματική ιστική καταστροφή (Tanaka και συν. 1995). Πιστεύεται ότι η μη φυσιολογική ή εκτεταμένη ενεργοποίηση T-κυττάρων προκαλεί την παραγωγή της πρωτεΐνης sFasL, η οποία μπορεί να έχει δυσμενείς επιπτώσεις για τον άνθρωπο. Τα επίπεδα sFasL έχουν βρεθεί αυξημένα στον ορό ασθενών με αιματολογικά ή ρευματικά νοσήματα, με συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια ή ανεπάρκεια πολλαπλών οργάνων (Viard και συν. 1998, Sato και συν. 1996, Nozawa και συν. 1997, Toyozaki και συν. 1998, Horii και συν. 1999, Matute-Bello και συν. 1999), ενώ ταυτόχρονα με την αύξηση των επιπέδων sFasL, διαπιστώθηκε αύξηση της ηπατικής δυσλειτουργίας (Taieb και συν. 1998) και της καταστροφής των νεφρών (Ortiz και συν. 1999, Sano et al. 1998).

Για τη διερεύνηση των επιπέδων sFasL στον ορό των ασθενών με NTG και HT της παρούσας μελέτης, εφαρμόστηκε η τεχνική ELISA. Στην πλειοψηφία των ασθενών τα επίπεδα sFasL ήταν χαμηλότερα από 0.12 ng/ml, που ήταν το κατώτερο όριο ανίχνευσης της μεθόδου. Τα ευρήματά αυτά συμφωνούν με προηγούμενη μελέτη, όπου αναφέρονται μη ανιχνεύσιμα επίπεδα sFasL σε φυσιολογικά άτομα, αλλά και σε ασθενείς με επιπλοκές λόγω σακχαρώδους διαβήτη, στους οποίους διαπιστώθηκε αύξηση των επιπέδων sFasL (Guillot et al 2001).

Η έκφραση της πρωτεΐνης Bcl-2 στην οξώδη θυρεοειδική νόσο

Οι αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2 δεν είναι πλήρως αποδεκτό ότι μπλοκάρουν ειδικά τη Fas-επαγόμενη απόπτωση (Owen-Schaub και συν. 1994). Θεωρείται ότι μπλοκάρουν την απόπτωση που προκαλείται από ακτινοβολία, φάρμακα ή καταστροφή DNA (Sentman και συν. 1991, Dbaiibo και συν. 1997), γεγονός το οποίο πιθανολογεί το ρόλο της πρωτεΐνης Bcl-2 στην παθολογία του θυρεοειδούς και τη σχέση της με τη HT, τη GD και το θυρεοειδικό καρκίνο (Basolo και συν. 1997, Yang και συν. 1997). Σε διαφορετικές παθήσεις του θυρεοειδούς διαπιστώνονται διαφορές στην έκφραση Bcl-2, χωρίς όμως,

αυτή να ρυθμίζεται από τις TSH, IFN- γ , ή IL-1 β (Kawakami και συν. 1996). Σε θυρεοειδικούς καρκίνους η έκφραση της Bcl-2 φαίνεται να σχετίζεται με το βαθμό διαφοροποίησης των κυττάρων (Hockenberry και συν. 1991, Lombardi and Frigerio 1997).

Στην παρούσα μελέτη, διαπιστώθηκαν διαφορές στην έκφραση της πρωτεΐνης Bcl-2 μεταξύ των διαφορετικών υποομάδων των ασθενών με NTG. Τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης ήταν χαμηλά σε ασθενείς με κολλοειδή οζώδη βρογχοκήλη και σε ασθενείς με κυστική εκφύλιση όζου. Αντίθετα, τα επίπεδα έκφρασής της ήταν υψηλά σε μονήρεις αδενωματώδεις καλοήθεις όζους (Andrikoula et al 2001). Αυτή η διαφορετική έκφραση της πρωτεΐνης Bcl-2 μπορεί να σχετίζεται με διαφοροποίηση των όζων σε κολλοειδείς και αδενωματώδεις.

Σύμφωνα με τα δεδομένα της βιβλιογραφίας, η πρωτεΐνη Bcl-2 εκφράζεται σε φυσιολογικούς θυρεοειδείς αδένες και σε NTG, αλλά τα υψηλά επίπεδα έκφρασής της διαπιστώνονται σε GD (Hammond και συν. 1997, Giordano και συν. 1997, Koga και συν. 1999, Hiromatsu και συν. 1999) και σε κακοήγη νόσο του θυρεοειδούς (Hockenberry και συν. 1990, Basolo και συν. 1997, Lombardi και συν. 1997). Αντίθετα, ελαττωμένη έκφραση της πρωτεΐνης Bcl-2 παρατηρείται σε θυρεοειδικά κύτταρα HT (Kotani και συν. 1995, Hammond και συν. 1997, Mitsiades και συν. 1998). Η αιτία της ελαττωμένης έκφρασης αυτού του αντι-αποπτωτικού γονιδίου στη HT παραμένει ακόμα υπό διερεύνηση. Φαίνεται, ότι καθοριστικό ρόλο-κλειδί για την πορεία που θα ακολουθήσει το θυρεοειδικό κύτταρο παίζει ο λόγος της έκφρασης ανταγωνιστών θανάτου (Bcl-2, Bcl-XL, mcl-1) ως προς την έκφραση αγωνιστών θανάτου (Bax, Bak, Bad) τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθολογικές καταστάσεις. Επομένως, σύμφωνα με τα αποτελέσματα των παλαιότερων μελετών, τα θυρεοειδικά θυλακιώδη κύτταρα υφίστανται απόπτωση με αυξημένη ρύθμιση των πρωτεϊνών Fas και FasL και μειωμένη ρύθμιση της πρωτεΐνης Bcl-2.

Παλαιότερες ανοσοϊστοχημικές μελέτες αναφέρουν υψηλή έκφραση πρωτεΐνης Bcl-2 σε φυσιολογικούς θυρεοειδείς αδένες (Hammond και συν. 1997, Patel και συν. 2000). Σύμφωνα με την άποψη αυτή, τα δικά μας αποτελέσματα στηρίζουν την άποψη ότι η πρωτεΐνη Bcl-2 εμφανίζει μειωμένη ρύθμιση σε ασθενείς με κολλοειδείς όζους, όχι όμως και σε αυτούς με αδενωματώδεις όζους.



Συμπεράσματα-Μελλοντικές προοπτικές

Γίνεται σαφές, επομένως, ότι η λεπτή ισορροπία μεταξύ απόπτωσης και κυτταρικού πολλαπλασιασμού είναι σημαντική για τον έλεγχο της μάζας του θυρεοειδούς αδένος. Ο ρόλος της απόπτωσης και η συμμετοχή της οδού Fas έχει ήδη μελετηθεί σε ζωικά μοντέλα βρογχοκήλης κατά τα στάδια της δημιουργίας και της υποστροφής της (Tamura και συν. 1998, Riesco και συν. 1998). Τα κύρια ευρήματα αυτών των μελετών ήταν ο αυξημένος αριθμός αποπτωτικών κυττάρων παράλληλα με έναν αυξημένο αριθμό Fas-θετικών κυττάρων κατά την ανάπτυξη και το πρώιμο στάδιο υποστροφής της βρογχοκήλης καθώς και η συνεχής έκφραση του υποδοχέα FasL σε όλη τη διάρκεια του πειράματος (Tamura και συν. 1998). Αυτά τα ευρήματα υποδηλώνουν ότι η έκφραση του υποδοχέα Fas μπορεί να χρησιμεύσει ως περιοριστικός παράγοντας για την Fas-επαγόμενη απόπτωση.

Η μελέτη των Patel και συν (2000) αποκάλυψε υψηλά επίπεδα Bcl-2 ανοσοαντιδραστικότητας σε ζώα τόσο σε φυσιολογικούς θυρεοειδείς αδένες όσο και σε αδένες με βρογχοκήλη, επίπεδα που μειώθηκαν αξιοσημείωτα κατά την υποστροφή της βρογχοκήλης.

Υπάρχουν δυσκολίες για άμεσες συγκρίσεις μεταξύ των αποτελεσμάτων της μελέτης αυτής και των δεδομένων της βιβλιογραφίας που προέρχονται από πειραματόζωα. Η διαδικασία της δημιουργίας βρογχοκήλης είναι ταχύτερη στα πειραματόζωα από τον άνθρωπο όπως μελετήθηκε το φαινόμενο στα στάδια δημιουργίας και υποστροφής της βρογχοκήλης.

Συμπερασματικά, η μειωμένη γενικώς αποπτωτική δραστηριότητα μέσω Fas πιθανώς να διαταράσσει το ισοζύγιο κυτταρικού πολλαπλασιασμού-απόπτωσης των θυρεοειδικών κυττάρων και να συμβάλλει στην κυτταρική υπερπλασία που χαρακτηρίζει την ανθρώπινη βρογχοκήλη. Η διαφορετική έκφραση της ρυθμιστικής πρωτεΐνης Bcl-2 μπορεί να σχετίζεται με τη διαφοροποίηση των θυρεοειδικών όζων σε αδενωματώδεις και κολλοειδείς.

Αν και υπήρχαν ενδείξεις συνεχούς έκφρασης της πρωτεΐνης Fas σε φυσιολογικά θυρεοειδικά κύτταρα (Hiromatsu και συν. 1999, Mitsiades και συν. 1998), σε νεότερες μελέτες, όπως και στην παρούσα, δεν επιβεβαιώθηκε έκφραση αυτής της πρωτεΐνης σε θυρεοειδικά κύτταρα ασθενών με NTG ή GD (Hammond και συν. 1997, Blüher και συν. 1999). Τα διαφορετικά ευρήματα

σχετικά με την έκφραση της πρωτεΐνης Fas μπορεί να οφείλονται στην επιλογή των ασθενών που συμπεριλαμβάνονται σε κάθε μελέτη. Είναι γενικώς αποδεκτή η αυξημένη έκφραση Fas σε θυρεοειδείς με HT (Hammond και συν. 1997, Mitsiades και συν. 1998, Stassi και συν. 1999).

Η παθοφυσιολογική σημασία των ευρημάτων μας είναι δύσκολο να εξακριβωθεί, καθώς δεν έχουμε άμεσα δεδομένα για τις ίδιες παραμέτρους σε φυσιολογικούς θυρεοειδείς αδένες. Η δεοντολογία δεν επιτρέπει τη λήψη δειγμάτων FNA από φυσιολογικά άτομα, όπου δεν υπάρχει ένδειξη παρακέντησης.

Συμπερασματικά, στη NTG, πάθηση που έχει συσχετιστεί με χαμηλά ποσοστά απόπτωσης, η παρούσα μελέτη απέδειξε αυξημένα επίπεδα sFas, έκφραση sFas mRNA και μειορρύθμιση της έκφρασης του μεμβρανικού υποδοχέα Fas στα θυρεοειδικά κύτταρα. Αντίθετα, στη HT, πάθηση που έχει συσχετιστεί με υψηλά ποσοστά απόπτωσης, διαπιστώθηκε χαμηλή συγκέντρωση πρωτεΐνης sFas σε όσους ήταν στην ενεργό φάση της νόσου, έκφραση Fas mRNA και αυξορρύθμιση του μεμβρανικού υποδοχέα Fas. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης sFas φαίνεται ότι επανέρχεται στα φυσιολογικά επίπεδα κατά τη χρόνια φάση της νόσου, όταν έχει ήδη συμβεί ολοκληρωτική καταστροφή των θυρεοειδικών κυττάρων. Καταλήγουμε επομένως, στο συμπέρασμα ότι υπάρχει μια αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων sFas και της αποπτωτικής δραστηριότητας των θυρεοειδικών κυττάρων.

Αν ερμηνεύσουμε τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης λαμβάνοντας υπόψιν τη μελέτη των Liu και συν. (1995) για τη διαφορική έκφραση των παραλλαγμάτων Fas mRNA, καταλήγουμε στην παρακάτω υπόθεση: ότι τα αυξημένα επίπεδα sFas στη NTG υποδηλώνουν αυξημένη έκφραση του παραλλάγματος Fas mRNA το οποίο κωδικοποιεί τη διαλυτή πρωτεΐνη sFas, καθώς και ελαττωμένη έκφραση του υποδοχέα Fas στην επιφάνεια των θυρεοειδικών κυττάρων. Η αυξημένη συγκέντρωση της πρωτεΐνης sFas είναι πιθανό να οδηγεί σε αύξηση του αριθμού των θυρεοειδικών κυττάρων, καθώς παρεμποδίζει την αλληλεπίδραση Fas-FasL και τα προστατεύει από τη Fas-επαγόμενη απόπτωση. Αντίθετα, η ελαττωμένη συγκέντρωση sFas στη HT υποδηλώνει αυξημένη έκφραση του υποδοχέα Fas στην επιφάνεια των θυρεοειδικών κυττάρων, που οδηγεί στην καταστροφή τους μέσω Fas-επαγόμενης απόπτωσης. Συνεπώς, η διαφορική ρύθμιση της έκφρασης των



παραλλαγμάτων Fas mRNA στα θυρεοειδικά κύτταρα μπορεί να είναι ένας τρόπος ρύθμισης- αναστολής ή επαγωγής- της απόπτωσής τους.

Η εκτεταμένη ιστική καταστροφή που χαρακτηρίζει τη HT φαίνεται να είναι αποτέλεσμα της διαταραχής στην ισορροπία έκφρασης των πρωτεϊνών Fas και FasL και της ελαττωμένης έκφρασης της πρωτεΐνης Bcl-2 στα θυρεοειδικά κύτταρα. Και τα δύο αυτά γεγονότα επάγονται από προαποπτωτικές κυτταροκίνες που εκκρίνονται από διηθητικά μονοπύρρηνα κύτταρα. Η χαμηλή έκφραση FasL στα λεμφοκύτταρα είναι μια ένδειξη αφ'ενός μεν ότι αυτά μπορεί να μην είναι ικανά να προκαλούν σημαντική ιστική καταστροφή και αφ'ετέρου ότι τα ίδια τα θυρεοειδικά κύτταρα μπορεί να είναι οι κύριοι διαμεσολαβητές του δικού τους θανάτου, άποψη που μπορεί να μεταβάλει την επικρατούσα αντίληψη για το όργανο-στόχο στην οργανοειδική αυτοανοσία.

Σύμφωνα με τα δεδομένα της βιβλιογραφίας, φαίνεται ότι τα θυρεοειδικά κύτταρα εκφράζουν όλα τα συστατικά της οδού Fas, για να είναι, όμως, αυτά λειτουργικά απαιτείται η ταυτόχρονη επαρκής έκφραση και άλλων ομάδων μορίων στα θυρεοειδικά κύτταρα, καθώς, επίσης, και η παρουσία ειδικών κυττάρων και ευοδωτικών παραγόντων στο άμεσο περιβάλλον, όπως είναι για παράδειγμα οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες (Suda και συν. 1997). Η παρουσία, δηλαδή, του υποδοχέα Fas από μόνη της δεν αρκεί πάντοτε για την πρόκληση προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (Owen-Schaub και συν. 1994). Η δυσκολία επαγωγής της απόπτωσης σε θυρεοειδικά κύτταρα με τη χρήση αντισωμάτων ενισχύει την άποψη ότι υπάρχει ένας ασταθής αναστολέας (Arscott και συν. 1997), που όμως δεν έχει μέχρι τώρα ταυτοποιηθεί.

Κατά συνέπεια, ο θάνατος του θυρεοειδικού κυττάρου μπορεί να μην είναι συνέπεια της ενεργοποίησης της οδού Fas-FasL, αλλά να προκύπτει από μια περισσότερο σύνθετη διαταραχή της ισορροπίας έκφρασης προαποπτωτικών και αντιαποπτωτικών γονιδίων. Η διευκρίνιση του ρόλου αυτού του σύνθετου συμπλέγματος κυτταροκινών και ενδοκυττάρων ρυθμιστών, που καθορίζει την πορεία του θυρεοειδικού κυττάρου, θα επιτρέψει το σχεδιασμό νέων αποτελεσματικών θεραπευτικών στρατηγικών.

Αναμφισβήτητα, τα θυρεοειδικά κύτταρα στην αυτοάνοση καταστροφική θυρεοειδίτιδα πεθαίνουν με απόπτωση. Παρόλα αυτά, εξακολουθεί να υπάρχει διάσταση απόψεων σχετικά με την έκφραση και λειτουργία των προαποπτωτικών γονιδίων στο θυρεοειδή. Ειδικότερα, ο ακριβής ρόλος του συστήματος Fas/FasL



στην ευαισθησία ή τη «δολοφονική» ικανότητα των θυρεοειδικών κυττάρων παραμένει ακόμη αναπάντητο ερώτημα. Η διαθεσιμότητα περισσότερο ισχυρών και ειδικών αντισωμάτων θα διευκολύνει τη σωστή εκτίμηση όχι μόνο των προϊόντων των προ- και αντι-αποπτωτικών γονιδίων, αλλά και του καταρράκτη σημάτων που οδηγεί στο θάνατο του θυρεοειδικού κυττάρου.

Η παρούσα μελέτη αναδεικνύει την ανεκτίμητη αξία της παρακέντησης FNA, καθώς είναι μια εξέταση που μπορεί να πραγματοποιηθεί στο εξωτερικό ιατρείο, προκαλεί ελάχιστη δυσανεξία στον ασθενή, μπορεί να επαναληφθεί ακόμα και σε σύντομο χρονικό διάστημα, ενώ ταυτόχρονα δίνει τη δυνατότητα δύο διαφορετικών αποτελεσμάτων, της κυτταρολογικής διάγνωσης και πληροφοριών για την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων με τη χρήση της μοριακής ανάλυσης και της ανοσοϊστοχημείας. Η χρήση νέων τεχνικών μοριακής βιολογίας, όπως οι μικροσυστοιχίες (microarrays) έκφρασης cDNA θα αποκαλύψει την ενεργοποίηση σειρών γονιδίων που σχετίζονται με τις οδούς πρόκλησης αποπτωτικού θανάτου στα θυρεοειδικά κύτταρα. Ακόμη, η πρόσφατη εξέλιξη στις μεθοδολογίες μικροσκοπίας θα διευκολύνει τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεϊνών τόσο στην επιφάνεια όσο και στο εσωτερικό του κυττάρου.

Με τις παραπάνω τεχνικές, θα ήταν ενδιαφέρον να μελετηθούν οι διαφορές στην έκφραση προαποπτωτικών και αντιαποπτωτικών μορίων στα θυρεοειδικά κύτταρα πριν και μετά τη θεραπευτική αγωγή με θυροξίνη ή τη χορήγηση ραδιενεργού ιωδίου, ο ρόλος του οποίου διαφαίνεται σημαντικός στη ρύθμιση της αποπτωτικής διαδικασίας.

Συμπερασματικά, η ρύθμιση των οδών προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου στο θυρεοειδή μπορεί να μεταβάλει την έκφραση των θυρεοειδικών παθήσεων τροποποιώντας την ευαισθησία των θυρεοειδικών κυττάρων στην απόπτωση στην οποία, όπως έχει αποδειχθεί, μεσολαβεί το ανοσολογικό σύστημα.



Μέρος τέταρτο

Περίληψεις



ΠΕΡΙΛΗΨΗ

**Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΗΣ ΟΔΟΥ Fas-Fas Ligand
ΣΤΗΝ ΟΖΩΔΗ ΘΥΡΕΟΕΙΔΙΚΗ ΝΟΣΟ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΜΑΡΙΑ Ι. ΑΝΔΡΙΚΟΥΛΑ



ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Πρόσφατες μελέτες της διεθνούς βιβλιογραφίας έχουν αναδείξει τη συμβολή της απόπτωσης, ειδικότερα διαμέσου της οδού Fas-Fas Ligand και της ρυθμιστικής πρωτεΐνης Bcl-2 σε αυτοάνοσες θυρεοειδικές παθήσεις. Στην κατηγορία αυτή ανήκει η θυρεοειδίτιδα Hashimoto (HT), η οποία χαρακτηρίζεται από λεμφοκυτταρική διήθηση του θυρεοειδούς αδένα και καταστροφή θυρεοειδικών κυττάρων. Αντίθετα, έχουν δημοσιευτεί λίγες μελέτες του ρόλου των πρωτεϊνών Fas και Bcl-2 στην μη τοξική βρογχοκήλη (NTG). Η πάθηση αυτή χαρακτηρίζεται από εστιακή υπερπλασία θυρεοειδικών θυλακκωδών κυττάρων, αποτέλεσμα διαταραχής στην ισορροπία κυτταρικού πολλαπλασιασμού και προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Η πλειοψηφία των ασθενών με οξώδη θυρεοειδική νόσο, αυτοάνοσης (HT) ή μη αυτοάνοσης (NTG) αιτιολογίας, υποβάλλεται για διαγνωστικούς σκοπούς σε παρακέντηση δια λεπτής βελόνης (FNA) του θυρεοειδούς αδένα. Το υλικό που λαμβάνεται με αυτή την εξέταση, εκτός από τη διαγνωστική του αξία, μπορεί να χρησιμεύσει για την εκτίμηση του ρόλου της απόπτωσης in vivo στις θυρεοειδικές παθήσεις που δεν αποτελούν ένδειξη για χειρουργική επέμβαση του θυρεοειδούς.

Στο πρώτο στάδιο της μελέτης, σε δείγματα FNA από ασθενείς με NTG και HT, μελετήθηκε η έκφραση των πρωτεϊνών Fas και Bcl-2 με ανοσοκυτταροχημεία και τη χρήση ειδικών μονοκλωνικών αντισωμάτων. Στα δείγματα HT παρατηρήθηκε αυξορρύθμιση της πρωτεΐνης Fas, η οποία ήταν μεγαλύτερη στους ασθενείς που ήταν στην ενεργό φάση της νόσου σε σχέση με αυτούς που ήταν στη χρόνια φάση. Σε όλους, όμως, τους ασθενείς αυτούς διαπιστώθηκε μειορρύθμιση της πρωτεΐνης Bcl-2. Στα δείγματα NTG η έκφραση της πρωτεΐνης Fas ήταν χαμηλή, υποδηλώνοντας χαμηλή Fas-επαγόμενη αποπτωτική δραστηριότητα. Στην ίδια ομάδα ασθενών, η έκφραση της πρωτεΐνης Bcl-2 διαπιστώθηκε χαμηλή σε κολλοειδή και κυστικά, αλλά υψηλή σε αδενωματώδη οζίδια, υποδηλώνοντας πιθανό ρόλο της πρωτεΐνης αυτής στη διαφοροποίηση των θυρεοειδικών οζιδίων.



Στο δεύτερο στάδιο της μελέτης προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο ELISA τα επίπεδα των διαλυτών πρωτεϊνών sFas και sFasL στον ορό ασθενών με NTG, ασθενών με HT και φυσιολογικών ατόμων. Σε σχέση με τα φυσιολογικά άτομα, τα επίπεδα sFas βρέθηκαν αυξημένα στους ασθενείς με NTG, μια πάθηση που έχει συσχετιστεί με χαμηλά επίπεδα απόπτωσης. Αντίθετα, τα επίπεδα sFas ήταν ελαττωμένα σε ασθενείς με ενεργό HT, η οποία έχει συσχετιστεί με αυξημένη έκφραση πρωτεΐνης Fas στα θυρεοειδικά κύτταρα και υψηλά ποσοστά απόπτωσης. Οι ασθενείς με χρόνια HT είχαν παρόμοια επίπεδα sFas με τα φυσιολογικά άτομα. Τα επίπεδα sFasL ήταν χαμηλά έως μη ανιχνεύσιμα στην πλειοψηφία ασθενών και υγιών ατόμων και σε συμφωνία με τα δεδομένα της βιβλιογραφίας θεωρήθηκαν φυσιολογικά.

Στο τρίτο στάδιο της μελέτης, διερευνήθηκε με την τεχνική RT-PCR η έκφραση των Fas και FasL mRNAs στα θυρεοειδικά κύτταρα, σε δείγματα FNA από ασθενείς με NTG και HT. Σε συμφωνία με τα προηγούμενα ευρήματα, διαπιστώθηκε έκφραση Fas mRNA σε όλα τα δείγματα HT, ενώ δεν ανιχνεύτηκε στα δείγματα NTG. Αντίθετα, σ' αυτά διαπιστώθηκε έκφραση του mRNA που κωδικοποιεί τη διαλυτή πρωτεΐνη sFas. Επιπλέον, στα δείγματα HT διαπιστώθηκε και έκφραση FasL mRNA.

Κατά συνέπεια, είναι σαφές ότι η ρύθμιση της έκφρασης της πρωτεΐνης Fas συμβάλλει στην παθογένεια της βρογχοκήλης διαταράσσοντας τη φυσιολογική ισορροπία μεταξύ κυτταρικού πολλαπλασιασμού και απόπτωσης και ευνοώντας την πρώτη διαδικασία. Από την άλλη πλευρά, η πρωτεΐνη Bcl-2 φαίνεται να διαδραματίζει έναν ιδιαίτερο ρόλο στην ανάπτυξη αδενωματωδών οζιδίων και/ή στη διαφοροποίησή τους από κολλοειδή σε αδενωματώδη στην ανθρώπινη NTG. Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής υποδηλώνουν ότι τα επίπεδα της διαλυτής πρωτεΐνης sFas στον ορό είναι αντιστρόφως ανάλογα του βαθμού της έκφρασης της πρωτεΐνης Fas και συνεπώς και της Fas-επαγόμενης απόπτωσης των θυρεοειδικών κυττάρων. Η διαφορετική ρύθμιση της έκφρασης του παραλλάγματος και του πλήρους μήκους Fas mRNA φαίνεται ότι είναι ένας τρόπος ρύθμισης της απόπτωσης των θυρεοειδικών κυττάρων.

SUMMARY

THE ROLE OF APOPTOTIC FAS-FAS LIGAND PATHWAY IN NODULAR THYROID DISEASE

DOCTORATE THESIS

by Maria Andrikoula

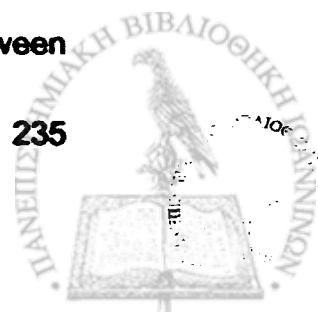


SUMMARY

Several recent studies have demonstrated the contribution of apoptosis, particularly through the Fas-Fas Ligand pathway and the regulatory protein Bcl-2 in autoimmune thyroid diseases, such as Hashimoto's thyroiditis (HT). This disease is characterized by lymphocyte infiltration of thyroid gland and destruction of thyroid cells. However, only a few studies have investigated the role of Fas and Bcl-2 proteins in non-toxic goiter (NTG). NTG is characterized by focal hyperplasia of thyroid follicular cells resulting from a disturbance in the balance between cell proliferation and cell death. The majority of patients with nodular thyroid disease of autoimmune (HT) or non autoimmune (NTG) origin, undergo FNA biopsy of thyroid gland for diagnostic reasons. Apart from their diagnostic value, FNA aspirates from the above patients may contribute to the evaluation of the role of apoptosis in vivo in thyroid diseases not requiring surgical intervention.

At the first stage of this study, FNA aspirates from patients with NTG and HT were examined for Fas and Bcl-2 expression by immunocytochemistry using specific monoclonal antibodies. HT samples showed an upregulation of Fas expression, which was higher in patients with active HT compared to those in the chronic phase of the disease. All samples with HT exhibited low expression of Bcl-2 protein. Conversely, Fas expression was low in NTG samples, indicating low Fas-mediated apoptotic activity. Bcl-2 protein expression was low in colloid and degenerative nodules, but high in adenomatous ones in NTG samples, suggesting that this protein may play a role in the differentiation of thyroid nodules.

To determine serum sFas and sFasL levels, we performed ELISA method in patients with NTG, those with HT and healthy individuals that were used as controls. Compared to normal controls, sFas levels were elevated in patients with NTG, a condition previously shown to be associated with low apoptotic levels. Conversely, sFas levels were found to be reduced in patients with active HT, which is associated with increased Fas protein expression on thyroid cells and high apoptotic rate. There was no difference found in serum sFas levels between



patients with chronic HT and normal controls. Serum levels of sFasL were low to undetectable in the majority of patients and healthy controls and were considered as normal according to the literature.

To further define the expression of Fas and FasL, we investigated the expression of Fas and FasL mRNAs by RT-PCR, in FNA samples from patients with NTG and HT. In agreement to the previous findings, Fas and FasL mRNA was detected only in HT samples. Conversely, NTG samples expressed sFas mRNA coding the soluble form of Fas protein.

Therefore, we conclude that the regulation of Fas protein may play a role in the pathogenesis of goiter by upsetting the normal equilibrium between thyroid cell proliferation and apoptosis in favor of the former process. On the other hand, regulation of expression of the anti-apoptotic Bcl-2 protein in adenomatous nodular goiter is different from that in colloid goiter. The latter protein may have a particular role in the development of adenomatous nodules and/or their differentiation from colloid nodules in human nodular goiter.

Our data also indicate that serum sFas levels are inversely related to the degree of Fas protein expression and consequently, of Fas-mediated apoptosis of thyrocytes. Thus, differential regulation of sFas mRNA and full length Fas mRNA expression on thyroid cells may be a way of regulation of thyroid cell apoptosis.



Μέρος πέμπτο

Βιβλιογραφία



ΜΕΡΟΣ ΠΕΜΠΤΟ

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Adams JM, Cory S (1998) The Bcl-2 Protein Family: Arbiters of Cell Survival. *Science* 281, 1322-1326

Andrikoula M and Tsatsoulis A (2001) The role of Fas-mediated apoptosis in thyroid diseases. *European Journal of Endocrinology* 144, 561-568.

Andrikoula M, Vartholomatos G, Tsangaris G, Bafa M, Tzortzatou-Stathopoulou F, Tsatsoulis A (2001) Fas and Bcl-2 protein expression in thyrocytes of patients with nodular goiter. *European Journal of Endocrinology* 145, 403-407.

Andrikoula M, Kolaitis N, Koutsoubas P, Kollos G, Vartholomatos G, Frangou-Lazaridis M, Tsatsoulis A. Soluble Fas levels are inversely related to the degree of Fas-mediated apoptosis in thyroid diseases (*submitted*).

Ανδρίκουλα Μ και Τσατσούλης Α (2000) Απόπτωση και Θυρεοειδής Αδένας: Ο ρόλος της οδού Fas-FasL στην παθογένεια θυρεοειδικών νόσων. *Ιατρική* 78(4), 328-336.

Ανδρίκουλα Μ και Τσατσούλης Α (2001) Ο ρόλος της απόπτωσης και της οδού Fas-Fas ligand στην παθογένεια του Σακχαρώδους Διαβήτη τύπου 1. *Αρχεία Ελληνικής Ιατρικής* 18(4), 349-353.

Ανδρίκουλα Μ και Βαρβολομάτος Γ (2001) Απόπτωση: ο κυτταρικός θάνατος προϋπόθεση για ζωή. *Αρχεία Ελληνικής Ιατρικής* 18(5):496-513.

Abbadie C, Kabrun N, Bouali E, Smardova J, Stehelin D, Vandebunder B, Enrietto P (1993) High levels of c-rel expression are associated with programmed cell death in the developing avian embryo and in bon marrow cells in vitro. *Cell* 75, 899-912

Adachi S, Cross AR, Babior BM, Gottlieb RA (1997) Bcl-2 and the outer mitochondrial membrane in the inactivation of cytochrome mediated apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 272(35), 21878-21882

Akali KC, Khan SA, Moulton BC (1996) Effect of decidualization on the expression of Bax and Bcl-2 in the rat uterine endometrium. *Endocrinology* 137, 3123-3131



- Amarante-Mendes GP, Finucane DM, Martin SJ, Cotter TG, Salvesen GS, Green DR (1998)** Anti-apoptotic oncogenes prevent caspase-dependent and independent commitment for cell death. *Cell Death Differentiation* 5, 298-306
- Ambrosini G, Adida C, Altieri DC (1997)** A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nature Medicine* 3, 917-921
- Ameisen JC (1996)** The origin of programmed cell death. *Science* 272, 1278-1279
- Amsterdam A, Dantes A, Selvaraj N, Aharoni D (1997)** Apoptosis in steroidogenic cells: structure-function analysis. *Steroids* 62, 207-211
- Arscott PL, Baker JR Jr (1998)** Apoptosis and thyroiditis. *Clinical Immunology and Immunopathology* 87, 207-217
- Arscott PL, Knapp J, Rymaszewski M, Bartron JL, Bretz JD, Thompson ND, Baker JR Jr (1997)** Fas(APO-1, CD95)-mediated apoptosis in thyroid cells is regulated by a labile protein inhibitor. *Endocrinology* 138, 5019-5027
- Arscott PL, Koenig RL, Kaplan MM, Glick GD, Baker JR Jr (1996)** Unique autoantibody epitopes in an immunodominant region of thyroid peroxidase. *Journal of Biological Chemistry* 271, 4966-4973
- Arturi F, Russo D, Giuffrida D, Ippolito A, Perrotti N, Vigneri R, Filetti S (1997)** Early diagnosis by genetic analysis of differentiated thyroid cancer metastases in small lymph nodes. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 82, 1638-1641
- Ashkenazi A, Dixit VM (1998)** Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281(5381), 1305-1308
- Atwood CS, Ikeda M, Vonnderhaar BK (1995)** Involution of mouse mammary glands in whole organ culture: a model for studying programmed cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 207, 860-867
- Avrameas S (1969)** Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde. Use of the conjugates for the detection of antigens and antibodies. *Immunochemistry* 6, 43-52
- Bagnasco M, Venuti D, Paolieri F, Torre G, Ferrini S, Canonica GW (1989)** Phenotypic and functional analysis at the clonal level of infiltrating T lymphocytes in papillary carcinoma of the thyroid : prevalence of cytolytic T cells with natural killer-like or lymphokine-activated killer activity. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 69, 832-836



- Baker JRJ (1999)** Dying (apoptosing) for a consensus on the Fas death pathway in the thyroid [editorial]. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 84,2593
- Baker JRJ and Bretz JD (2000)** Specificity questions concerning the clone 33 anti-Fas Ligand antibody. *Cell Death and Differentiation* 7, 8-9
- Bakhos R, Selvaggi SM, DeJong S, Gordon D, Pitale SU, Herrmann M, Wojcik E (2000)** Fine-Needle Aspiration of the Thyroid: Rate and Causes of Cytohistopathologic Discordance. *Diagnostic Cytopathology* 23 (4), 233-237
- Banner DW, D'Arcy A, Janes W, Gentz R, Schoenfeld HJ, Broger C, Loetscher H, Lesslauer W (1993)** Crystal structure of the soluble human 55kd TNF-receptor-human TNF β complex: implications for TNF receptor activation. *Cell* 73, 431-445
- Barinaga M (1996)** Forging a path to cell death. *Science* 273, 735-737
- Basolo F, Pollina L, Fontanini G, Fiore L, Pacini F, Baldanzi A (1997)** Apoptosis and proliferation in thyroid carcinoma: Correlation with Bcl-2 and p-53 protein expression. *British Journal of Cancer* 75, 537-541
- Batteux F, Tourneur L, Trebeden H, Charreire J, Chlocchia G (1999)** Gene therapy of experimental autoimmune thyroiditis by in vivo administration of plasmid DNA coding for Fas ligand. *Journal of Immunology* 162(1), 603-608
- Behl C, Widmann M, Trapp T, Holsboer F (1995)** 17-Beta estradiol protects neurons from oxidative stress-induced cell death in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 216, 473-482
- Behrmann I, Walczak H, Krammer PH (1994)** Structure of the human APO-1 gene. *European Journal of Immunology* 24, 3057-3062
- Bellgrau D, Gold D, Selawry H, Moore J, Franzusoff A, Duke RC (1995)** A role for CD95 ligand in preventing graft rejection. *Nature* 377, 630-632
- Bermann M, Magee M, Koenig RJ (1993)** Differential autoantibody responses to thyroid peroxidase in patients with Graves' disease and Hashimoto thyroiditis. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 77, 1098-1101
- Bernal J, Nunez J (1995)** Thyroid hormones and brain development. *European Journal of Endocrinology* 133, 390-398
- Beutler B and Cerami A (1986)** Cachectin and tumor necrosis factor as two sides of the same biological coin. *Nature* 320, 584-588



- Beutler B and Cerami A (1989)** The biology of cachectin/TNF-primary mediator of the host response. *Annual Reviews of Immunology* 7, 625-655
- Blobel GA, Orkin SH (1996)** Estrogen-induced apoptosis by inhibition of the erythroid transcription factor GATA-1. *Molecular and Cellular Biology* 16, 1687-1694
- Bluher M, Wallaschofski H Braverman LE, Paschke R (1999)** Fas and Fas ligand gene expression in autoimmune thyroiditis in BB/W rats. *European Journal of Endocrinology* 141, 506
- Boesen-de Cock JG, Tepper AD, de Vries E, van Blitterswijk WJ, Borst J (1999)** Common regulation of apoptosis signaling induced by CD95 and the DNA-damaging stimuli etoposide and gamma-radiation downstream from caspase-8 activation. *Journal of Biological Chemistry* 274, 14255-14261
- Boldin M, Goncharov T, Goltsev Y, Wallach D (1996)** Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1 and TNF receptor-induced cell death. *Cell* 85(6), 803-815
- Bolton ET and McCarthy BJ (1962)** A general method for the isolation of RNA complementary to DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 48, 1390
- Bossy-Wetzel E, Newmeyer DD, Green DR (1998)** Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization. *EMBO Journal* 17(1), 37-49
- Boudreau N, Sympson CJ, Werb Z, Bissel MJ (1995)** Suppression of ICE and apoptosis in mammary epithelial cells by extracellular matrix. *Science* 267, 891-893
- Bredesen DE (1995)** Neural apoptosis. *Annals of Neurology* 38(6), 839-851
- Brojatsch J, Naughton J, Rolls MM, Ziegler K, Young JA (1996)** CAR1, a TNFR-related protein, is a cellular receptor for cytopathic avian leukosis-sarcoma viruses and mediates apoptosis. *Cell* 87(5), 845-855
- Brunet CL, Gunby RH, Benson RS, Hickman JA, Watson AJ, Brady G (1998)** Commitment to cell death measured by loss of clonogenicity is separable of apoptotic markers. *Cell Death and Differentiation* 5, 107-115



- Bump NJ, Hackett M, Hugunin M, Seshagiri S, Brady K, Chen P, Ferenz C, Franklin S, Ghayur T, Li P et al (1995) Inhibition of ICE family proteases by baculovirus antiapoptotic protein p35. *Science* 269(5232), 1885-1888
- Canonica GW, Caria M, Bagnasco M, Cosulich ME, Giordano G, Moretta L (1985) Proliferation of T8-positive cytolytic T lymphocytes in response to thyroglobulin in human autoimmune thyroiditis: analysis of cell interactions and culture requirements. *Clinical Immunology and Immunopathology* 36, 40-48
- Carmeci C, Jeffrey RB, McDougall IR, Nowels KW, Weigel RJ (1998) Ultrasound-guided fine-needle aspiration biopsy of thyroid masses. *Thyroid* 8, 283-289
- Catlin EA, Mac Laughlin DT, Donahue PK (1993) Mullerian inhibiting substance: new perspectives and future directions. *Microscopy Research and Technique* 25, 121-133
- Ceccatelli S, Diana A, Villar MJ, Nicotera P (1995) Adrenocortical apoptosis in hypophysectomised rats is selectively reduced by ACTH. *Neuroreport* 6, 342-344
- Cheng EH, Kirsch DG, Clem RJ, Ravi R, Kastan MB, Bedi A, Ueno K, Hardwick JM (1997) Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases. *Science* 278, 1966-1968
- Cheng J, Zhou T, Liu C, Shapiro JP, Brauer MJ, Kiefer MC, Barr PJ, Mountz JD (1994) Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. *Science* 263, 1759-1762
- Chervonsky AV, Wang Y, Wong F, Visintin I, Flavell RA, Janeway CA Jr, Matis DA (1997) The role of Fas in autoimmune diabetes. *Cell* 89, 17-24
- Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Yu GL, Lyons RH, Garg M, Duan DR, Xing L, Gentz R, Ni J, Dixit VM (1996) Signal transduction by DR3, a death domain-containing receptor related to TNFR-1 and CD95. *Science* 274, 990-992
- Chomczynski P and Sacchi N (1987) Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Annals of Biochemistry* 162, 156-159
- Chun SY, Eisenhauer KM, Minami S, Billig H, Perlas E, Hsueh AJW (1996) Hormonal regulation of apoptosis in early antral follicles. FSH as a major survival factor. *Endocrinology* 137, 1447-1456



- Conrand B, Horritz HR (1998)** The C.elegans protein EGL-1 is required for programmed cell death and interacts with the Bcl-2-like protein CED-9. *Cell* 93, 519-529
- Coucovanis EC, Martin GR, Nadeau JH (1995)** Genetic approaches for studying programmed cell death during development of the laboratory mouse. *Methods in Cell Biology* 46, 387-440
- Creemers P, Rose NR, Kong YM (1983)** Experimental autoimmune thyroiditis. In vitro cytotoxic effects of T lymphocytes on thyroid monolayers. *Journal of Experimental Medicine* 157, 559-571
- Crispe IN (1994)** Fatal interactions: Fas-induced apoptosis of mature T cells. *Immunity* 1, 347-349
- Cryns V, Yuan J (1998)** Proteases to die for. *Genes and Development* 12(11), 1551-1570
- Cutolo M, Sulli A, Barone A, Seriole B, Accardo S (1996)** Sex hormones, proto-oncogene expression and apoptosis: their effects on rheumatoid synovial tissue. *Clinical and Experimental Rheumatology* 14, 87-94
- Danese D, Sciacchitano S, Farsetti A, Andreoli M, Pontecorvi A (1998)** Diagnostic accuracy of conventional versus sonography-guided fine-needle aspiration biopsy of thyroid nodules. *Thyroid* 8, 15-21
- Das H, Imoto S, Murayama T, Kajmoto K, Sugimoto T, Isobe T, Nagagawa T, Nishimura R, Koizumi T (1999)** Levels of soluble FasL and FasL gene expression during the development of graft-versus-host disease in DLT-treated patients. *British Journal of Haematology* 104(4), 795-800
- Davidson FF, Steller H (1998)** Blocking apoptosis prevents blindness in Drosophila retinal degeneration. *Nature* 391, 587-591
- Davies TF, Martin A, Concepcion ES (1991)** Evidence of limited variability of antigen receptors on intrathyroidal T cells in autoimmune thyroid disease. *New England Journal of Medicine* 325, 238-240
- Dbaibo GS, Perry DK, Gamard CJ, Platt R, Piorier GC, Obeid LM, Hannun YA (1997)** Cytokine response modifier A(Crma) inhibits ceramide formation in response to tumor necrosis factor (TNF)- α : CrmA and Bcl-2 target distinct components in the apoptotic pathway. *Journal of Experimental Medicine* 185: 481-490



Debatin KM and Kramer PH (1995) Resistance to APO-1 (CD95) induced apoptosis in T-ALL is determined by an anti-apoptotic program. *Leukemia* 9, 815-820

Degli Esposti M (1998) Apoptosis: who was first. *Cell Death and Differentiation* 5, 719

Degli Esposti M, McLennan H (1998) Mitochondria and cells produce reactive oxygen species in virtual anaerobic relevance to ceramide-induced apoptosis. *FEBS Letters* 430(3), 338-342

DeGroot LJ, Quintans J (1989) The causes of autoimmune thyroid disease. *Endocrine Reviews* 10, 537-562

Delange F, Thilly CH, Ermans AM (1968) Iodine deficiency: A permissive condition in the development of endemic goiter. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 28, 114-116

Δεληγιώργη-Πολίτη Ελένη (2000) Άτλας και εγχειρίδιο των παθήσεων του θυρεοειδούς αδένος με FNA βιοψία. Γραφικές τέχνες Δ. Τσιβεργιώτη. Άνω Ηλιούπολη

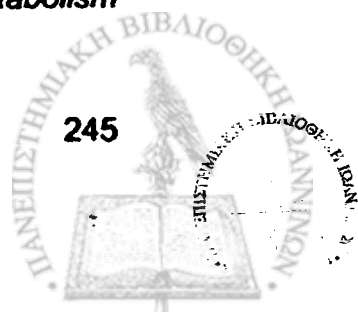
Desagher S, Osen-Sand A, Nichols A, Eskes R, Montessuit S, Lauper S, Maundrell K, Antonsson B, Martinou JC (1999) Bid-induced conformational change of bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *Journal of Cell Biology* 144, 891-901

Deveraux QL, Reed JC (1999) IAP family proteins-suppressors of apoptosis. *Genes and Development* 13, 239-252

Dianzani U, Bragardo M, DiFranco D, Alliaudi C, Scagni P, Buonfiglio D, Redoglia V, Bonisconi S, Corra A, Dianzani I, Ramenghi U (1997) Deficiency of the Fas apoptosis pathway without Fas gene mutations in paediatric patients with autoimmunity/lymphoproliferation. *Blood* 89, 2871-2879

Di Jeso B, Ulianich L, Racioppi L, D'Armiento F, Feliciello A, Pacifico F, Consiglio E, Formisano S (1995) Serum withdrawal induces apoptotic cell death in Ki-ras transformed but not in normal differentiated thyroid cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 214, 819-824

Di Matola T, Mueller F, Fenzi G, Rossi G, Bifulco M, Marzano LA, Vitale M (2000) Serum withdrawal-induced apoptosis in thyroid cells is caused by loss of fibronectin-integrin association. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 85, 1188-1193



- Dirami G, Ravindranath N, Kleinman HK, Dym M (1995)** Evidence that basement membrane prevents apoptosis of Sertoli cells in vitro in the absence of known regulators of Sertoli cell function. *Endocrinology* 136, 4439-4447
- Doufas AG, Mastorakos G, Hadjiioannou S, Tseleni-Balafouta S, Piperlingos G, Boukis MA, Karaiskos CS, Koutras DA (1998)** The predominant form of non-toxic goiter in Greece now is autoimmune thyroiditis. *Journal of Clinical Investigation* 21 (suppl 4): Abstract 123, 62
- Dremier S, Golstein J, Mosselmans R, Dumont JE, Garland P, Robaye B (1994)** Apoptosis in dog thyroid cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 200, 52-58
- Duan H, Dixit VM (1997)** RAIDD is a new «death» adaptor molecule. *Nature* 385(6611), 86-89
- Duke RC, Chervenak R, Cohen JJ (1983)** Endogenous endonuclease-induced DNA fragmentation: an early event in cell-mediated cytolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 80, 6361-6365
- Eguchi Y, Shimizu S, Tsujimoto Y (1997)** Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. *Cancer Research* 57(10), 1835-1840
- Eisenhauer KM, Chun S-Y, Billig H, Hsueh AJW (1995)** GH suppression of ovarian follicle apoptosis and partial neutralization by IGFBP. *Biology of Reproduction* 53, 13-20
- Ellis HM, Morritz HR (1986)** Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell* 44, 817-829
- Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S (1998)** A caspase activated DNAase that degrades DNA during apoptosis and its inhibitor ICAD. *Nature* 391(6662), 43-50
- Engelke DR, Hoener PA, Collins FS (1988)** Direct sequencing of enzymatically amplified human genomic DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 85(2), 544-548
- Ertel W, Keel M, Stocker R, Imhof HG, Leist M, Steckholzer U, Tanaka M, Trentz O, Nagata S (1997)** Detectable concentrations of Fas ligand in cerebrospinal fluid after severe head injury. *Journal of Neuroimmunology* 80 (1-2), 93-96
- Evans-Storms RB, Cidlowski JA (1995)** Regulation of apoptosis by steroid hormones. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 53, 1-8



- Farr CJ, Saiki RK, Erlich HA, McCormick F, Marshall CJ (1988) Analysis of RAS gene mutations in acute myeloid leukemia by polymerase chain reaction and oligonucleotide probes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 85(5), 1629-1633
- Feldkamp J, Pascher E, Schott M, Goretzki P, Seissler J, Scherbaum WA (2001) Soluble Fas is increased in hyperthyroidism independent of the underlying thyroid disease. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 86(9), 4250-4253.
- Feldkamp J, Pascher E, Perniok A, Scherbaum WA (1999) Fas-mediated apoptosis is inhibited by TSH and iodine in moderate concentrations in primary human thyrocytes in vitro. *Hormone and Metabolic Research* 31(6), 355-358
- Fisher GH, Rosenberg FJ, Sraus SE, Dale JK, Middleton LA, Lin AY, Strober W, Lenardo MJ, Puck JM (1995) Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell* 81, 935-946
- Fletcher-Chiappini SE, Compton MM, La Vole HA, Day EB, Witorsch RJ, Compton MM (1993) Glucocorticoid-prolactin interactions in Nb2 lymphoma cells: antiproliferative versus anticytolytic effects. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 202, 345-352
- Foley TP (1993) Goiter in adolescents. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* 22, 593-606
- Foulis AK (1996) The pathology of the endocrine pancreas in type 1(insulin-dependent) diabetes mellitus. *APMIS* 104, 161-167
- French LE, Tschopp J (1996) Constitutive fas ligand expression in several non-lymphoid mouse tissue: implications for immune-protection and cell turnover. *Behring Inst Mitt.* 97, 156-160
- Φριλίγγος Ε (2001) Βιοχημεία ΙΙΙ, Εργαστηριακές ασκήσεις ΠΣΕ. Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
- Geng YJ (1997) Regulations of programmed cell death or apoptosis in atherosclerosis. *Heart Vessels* 12(suppl), 76-80
- Gharib H (1996) Diagnosis of thyroid nodules by fine-needle aspiration biopsy. *Current Opinion in Endocrinology and Diabetes* 3, 433-438

- Gharib H, Goellner JR, Zinsmeister AR, Grant CS and Van Heerden JA (1984)** Fine-needle aspiration biopsy of the thyroid. The problem of suspicious cytologic findings. *Annals of Internal Medicine* 101, 25-28
- Giordano C, Stassi G, DeMaria R, Todaro M, Richiusa P, Papoff G, Ruberti G, Bagnasco M, Testi R, Galluzzo A (1997)** Potential involvement of Fas and its ligand in the pathogenesis of Hashimoto's thyroiditis. *Science* 275, 960-963
- Giordano TJ, Richiusa P, Bagnasco M, Pizzolanti G, Di Blasi F, Sbriglia MS, Mattina A, Pesce G, Montagna P, Capone F, Misiano G, Scorsone A, Pugliese A, Galluzzo A (2001)** Differential regulation of Fas-mediated apoptosis in both thyrocyte and lymphocyte cellular compartments correlates with opposite phenotypic manifestations of autoimmune disease. *Thyroid* 11, 233.
- Glucksmann A (1951)** Cell death in normal vertebrate ontogeny. *Biological Reviews* 26, 59-86
- Goel N, Ulrich UE, Clair WST, Fleming JA, Lynch DH, Seldin M (1995)** Lack of correlation between serum soluble Fas/Apo-1 levels and autoimmune disease. *Arthritis and Rheumatism* 38, 1738-1743
- Golstein P (1997)** Cell death: TRAIL and its receptors. *Current Biology* 7(12), R 750-753
- Goncharov T, Holtmann H, Lonai P, Wallach D (1998)** Targeted disruption of the mouse caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally. *Immunity* 9, 267-276
- Gould E, Wooley CS, McEwen BS (1991)** Adrenal steroids regulate postnatal development of the rat dentate gyrus: I. Effects of glucocorticoids on cell death. *Journal of Comparative Neurology* 313, 479-485
- Green GR, Reed JC (1998)** Mitochondria and apoptosis. *Science* 281, 1309-1312
- Greenspan FS (1997)** The role of fine-needle aspiration biopsy in the management of palpable thyroid nodules. *American Journal of Clinical Pathology* 108:S26-S30
- Griffith TS, Brunner T, Fletcher SM, Green DR, Ferguson TA (1995)** Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science* 270, 1189-1192



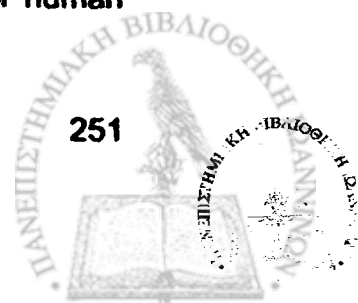
- Haanen C, Vermes I (1996)** Apoptosis: programmed cell death in fetal development. *European Journal of Obstetrics, Gynaecology and Reproductive Biology* 64, 129-133
- Hahne M, Rimoldi D, Schroter M, Romero P, Schreier M, French LE, Schneider P, Bornand T, Fontana A, Lienard D, Cerottini J, Tschopp J (1996)** Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: Implications for tumor immune escape. *Science* 274, 1363-1366
- Hakem R, Hakem A, Duncan GS, Henderson JT, Woo M, Soengas MS, Elia A, Kagi D, Khoo W, Potter J, Yoshida R, Kaufman SA, Lowe SW, Penninger JM, Mak T (1998)** Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways in vivo. *Cell* 94, 339-352
- Halevy O (1995)** Correlation of terminal cell cycle arrest of skeletal muscle with induction of p21 by MyoD. *Science* 267, 1018-1021
- Hammond LJ, Lowdell MW, Cerrano PG, Goode AW, Bottazzo GF, Mirakian R (1997)** Analysis of apoptosis in relation to tissue destruction associated with Hashimoto's autoimmune thyroiditis. *Journal of Pathology* 182, 138-144
- Hanada M, Aime-Sempe C, Sato T, Reed JC (1995)** Structure-function analysis of Bcl-2 protein. Identification. *Journal of Biological Chemistry* 270, 11962-11969
- Hanna FWF, Lazarus JH, Scanlon MF (1999)** Controversial aspects of thyroid disease. *British Medical Journal* 319, 894-899
- Harrington EA, Bennett MR, Fanidi A, Evan GE (1994)** c-Myc induced apoptosis in fibroblasts is inhibited by specific cytokines. *EMBO Journal* 13, 3286-3295
- Hasegawa D, Kojima S, Tatsumi E, Hayakawa A, Kosaka Y, Nakamura H, Sako M, Osuki Y, Nagata S, Sano K (1998)** Elevation of the serum Fas ligand in patients with hemophagocytic syndrome and Diamond-Blackfan anemia. *Blood* 91(8), 2793-2799
- Hengartner MO, Horvitz HR (1994)** C.elegans cell survival gene ced-9 encodes a functional homolog of the oncogene bcl-2. *Cell* 76, 665-676
- Henriksen K, Hakovirta H, Parvinen M (1995)** Testosterone inhibits and induces apoptosis in rat seminiferous tubules in a stage-specific manner: in situ quantification in squash preparations after administration of ethane dimethane sulfonate. *Endocrinology* 136, 3285-3291



- Hermeking H, Eick D (1994)** Mediation of c-Myc induced apoptosis by p53. *Science* 265, 2091-2093
- Hermus AdR, Huysmans DA (1998)** Treatment of benign nodular thyroid disease. *New England Journal of Medicine* 338, 1438-1447
- Hetzel BS (1983)** Iodine deficiency disorders (IDD) and their eradication. *Lancet* ii:1126-1129
- Higuchi R, von Beroldingen CH, Sensabaugh GF, Erlich HA (1988)** DNA typing from single hairs. *Nature* 332 (6164), 543-546
- Hiromatsu Y, Bednarczuk T, Soyejima E, Miyake I, Yang D, Fukazawa H, Nonaka K (1999)** Increased serum soluble Fas in patients with Grave's disease. *Thyroid* 9(4), 341-345
- Hiromatsu Y, Hoshino T, Yagita H, Koga M, Sakisaka S, Honda J, Damu Y, Kayagaki N, Okumura K, Nonaka K (1999)** Functional Fas Ligand Expression in Thyrocytes from Patients with Graves' Disease. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 84(8), 2896-2902
- Hirsch T, Marchetti P, Susin SA, Dallaporta B, Zamzami N, Marzo I, Geuskens M (1997)** The apoptosis-necrosis paradox. Apoptogenic proteases activated after mitochondrial permeability transition determine the mode of cell death. *Oncogene* 15, 1573
- Hockenberry DM, Nunez G, Milliman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ (1990)** Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 334, 348
- Hockenberry DM, Zutter M, Hickey W, Nahm M, Korsmeyer SJ (1991)** Bcl-2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 88, 6961-6965
- Hofmann K, Bucher P, Tschopp J (1997)** The CARD domain: a new apoptotic signalling motif. *Trends in Biochemical Science* 22:155-156
- Hofmann K, Tschopp J (1995)** The death domain motif found in Fas (Apo-1) and TNF receptor is present in proteins involved in apoptosis and axonal guidance. *FEBS Letters* 371, 321-323
- Hohmann HP, Remy R, Brockhaus M, van Loon APGM (1989)** Two different cell types have different major receptors for human tumor necrosis factor (TNF α). *Journal of Biological Chemistry* 264, 14927-14934



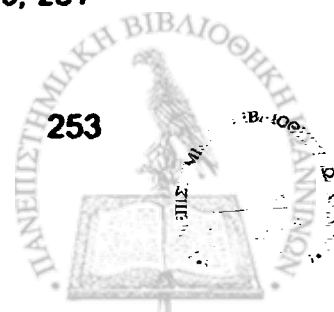
- Hori Y, Wada H, Mori Y, Shimura M, Hiroyama K, Nakasaki T, Nishii K, Tamaki S, Nishikawa M, Deguchi K, Minami N, Shiku H (1999) Plasma sFas and sFas ligand levels in patients with thrombocytopenic purpura and in those with disseminated intravascular coagulation. *American Journal of Haematology* 61(1), 21-25
- Hosaka N, Oyaizu N, Kaplan MH, Yagita H, Pahwa S (1998) Membrane and soluble forms of Fas (CD95) and Fas ligand in peripheral blood mononuclear cells and in plasma from human immunodeficiency virus-infected persons. *Journal of Infectious Diseases* 178(4), 1030-1039
- Hsu H, Huang J, Shu HB, Baichwal V, Goeddel DV (1996) TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF-receptor-1 signaling complex. *Immunity* 4(4), 387-396
- Hsu H, Xiong J, Goeddel DV (1995) The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-Kappa B activation. *Cell* 81(4), 495-504
- Hsu YT, Wolter KG, Youle RJ (1997) Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 94, 3668-3672
- Hsueh AJW, Billig H, Tsafirli A (1994) Ovarian follicle atresia. A hormonally controlled apoptotic process. *Endocrine Reviews* 15, 707-724
- Hu S, Vincenz C, Ni J, Gentz R, Dixit VM (1997) I-FLICE, a novel inhibitor of tumor necrosis factor receptor-1 and CD95-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 272, 17255-17257
- Hu Y, Benedict MA, Wu D, Inohara N, Nunez G (1998) Bcl-XL interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1-dependent caspase-9 activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 95, 4386-4391
- Imai Y, Kimura T, Murakami A, Yajima N, Sakamaki K, Yonehara S (1999) The CED-4-homologous protein FLASH is involved in Fas-mediated activation of caspase-8 during apoptosis. *Nature* 398, 777-785
- Irmeler M, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hofmann K, Steiner V, Bodmer JL, Schroter M, Burns K, Mattmann C, Rimoldi D, French LE, Tschopp J (1997) Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 388, 190-195
- Itoh N, Yonehara S, Ishii A, Yonehara M, Mizushima SI, Sameshima M, Hase A, Seto Y, Nagata S (1991) The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* 66, 233-243



- Iwahashi H, Hanafusa T, Eguchi Y, Nakajima H, Miyagawa J, Itoh N, Tomita K, Namba M, Kuwajima, Noguchi T, Tsujimoto Y, Matsuzawa Y (1996) Cytokine-induced apoptotic cell death in a mouse pancreatic beta-cell line: inhibition by Bcl-2. *Diabetologia* 39, 530-536
- Jacobson MD, Burnc Jr, King MP, Miyashita T, Reed JC, Raff MC (1993) Bcl-2 blocks apoptosis in cells lacking mitochondrial DNA. *Nature* 361(6410), 365-369
- Jacobson MD, Raff MC (1995) Programmed cell death and Bcl-2 protection in very low oxygen. *Nature* 374(6525), 814-816
- Jacobson MD, Weil M, Raff MC (1997) Programmed cell death in animal development. *Cell* 88(3), 347-354
- Jo T, Terada N, Saji F, Tanizawa O (1993) Inhibitory effects of oestrogen, progesterone, androgen and glucocorticoid on death of neonatal mouse uterine epithelial cells induced to proliferate by estrogen. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 46, 25-32
- Jodo S, Kobayashi S, Kayagaki N, Ogura N, Feng Y, Amasaki Y, Fujisaku A, Azuma M, Okumura K, Koike T (1997) Serum levels of soluble Fas/APO-1 (CD95) and its molecular structure in Systemic Lupus Erythematosus (SLE) and other autoimmune diseases. *Clinical and Experimental Immunology* 107(1), 89-95
- Johnson D, Lanahan A, Buck CR, Sehgal A, Morgan C, Mercer E, Bothwell M, Chao M (1986) Expression and structure of the human NGF receptor. *Cell* 47, 545-554
- Juo P, Kuo CJ, Yuan J, Blenis J (1998) Essential requirement for caspase-8/FLICE in the initiation of the Fas- induced apoptotic cascade. *Current Biology* 8, 1001-1008
- Kalams SA, Walker BD (1998) The critical need for CD4 help in maintaining effective cytotoxic T lymphocyte responses. *Journal of Experimental Medicine* 188, 2199-2204
- Kato K, Ohshima K, Ishihara S, Anzai K, Suzumiya J, Kikuchi M (1998) Elevated serum soluble Fas ligand in natural killer cell proliferative disorders. *British Journal of Haematology* 103(4), 1164-1166
- Kaufmann SH, Desnoyers S, Ottaviano Y, Davidson NE, Poirier GG (1993) Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase is an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Research* 53(17), 3976-3985



- Kawakami A, Eguchi K, Matsuoka N, Tsuboi M, Kawabe Y, Ishikawa N, Ito K, Nagataki S (1996) Thyroid-stimulating hormone inhibits Fas antigen-mediated apoptosis of human thyrocytes in vitro. *Endocrinology* 137, 3163-3169
- Kawakami A, Eguchi K, Matsuoka N, Tsuboi M, Kawabe Y, Ishikawa N et al (1996) Thyroid-stimulating hormone inhibits Fas antigen-mediated apoptosis of human thyrocytes in vitro. *Endocrinology* 137, 3163-3169
- Kayagaki N, Kawasaki A, Ebata T, Ohmoto H, Ikeda S, Inoue S, Yoshino K, Okumura K, Yagita H (1995) Metalloproteinase-mediated release of human Fas ligand. *Journal of Experimental Medicine* 182, 1777-1783
- Kelekar A, Thompson CB (1998) Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis. *Trends in Cell Biology* 8, 324-330
- Kerr JFR (1965) A histochemical study of hypertrophy and ischaemic injury of rat liver with special reference to changes in lysosomes. *Journal of Pathology and Bacteriology* 90, 419-435
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer* 26, 239-257
- Kless W, Gallaher B (1998) Hormonal control of programmed cell death/apoptosis. *European Journal of Endocrinology* 138, 482-491
- Kimble J, Simpson P (1997) The LIN-12/Notch signalling pathway and its regulation. *Annual Reviews of Cell and Developmental Biology* 13, 333-361
- Klockgether T, Robertson GS, Weller M, Schulz JB (1999) Adenovirus-mediated gene transfer of inhibitors of apoptosis protein delays apoptosis in cerebellar granule neurons. *Journal of Neurochemistry* 72, 292-301
- Knipping E, Krammer PH, Onel KB, Lehman TJA, Mysler E, Elkon KB (1995) Levels of soluble Fas/Apo-1/CD95 in systemic lupus erythematosus and juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism* 38, 1735-1737
- Koga M, Hiromatsu Y, Jimi A, Toda S, Koike N, Nonaka K (1999) Immunohistochemical analysis of Bcl-2, Bax and Bak expression in thyroid glands from patients with subacute thyroiditis. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 84, 2221
- Kotani T, Aratake Y, Hirai K, Fukazawa Y, Sato H, Ohtaki S (1995) Apoptosis in thyroid tissue from patients with Hashimoto's thyroiditis. *Autoimmunity* 20, 231-236



- Kriegler M, Perez C, DeFay K, Albert I, Lu SD (1988)** A novel form of human TNF/Cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell* 53, 45-53
- Kuida K, Haydar TF, Kuan CY, Gu Y, Taya C, Karasuyama H, Su MS, Rakic P, Flavell RA (1998)** Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9. *Cell* 94, 325-337
- Kumar S (1997)** The bcl-2 family of proteins and activation of the ICE-CED-3 family of proteases: a balancing act in apoptosis? *Cell Death and Differentiation* 4, 2-3
- Kwok S, Higuchi R (1989)** Avoiding false positives with PCR. *Nature* 339 (6221), 237-238
- Labat-Moleur F, Chabre O, Guillermet C, Chaffanjon P, Blumet-Rondeu F, Bauchet A, Franc B, Brambilla E, Bachelot I, Dumont JE, Negoescu A (1999)** Grave's-Basedow disease goiter: a model of Bax-Bcl-2 regulated apoptosis. *Thyroid* 9(5), 483-492
- Lang RA (1997)** Apoptosis in mammalian eye development: lens morphogenesis, vascular regression and immune privilege. *Cell Death and Differentiation* 4, 12-20
- Lavin M and Watters D (Eds) (1993)** Programmed cell death-the cellular and molecular biology of apoptosis. Chur. Switzerland: Harwood Academic Publications
- Lazebnik YA, Kaufmann SH, Desnoyers S, Poirier GC, Earnshaw WC (1994)** Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Journal of Biological Chemistry* 371(6495), 346-347
- Lee PP, Darcy KM, Shudo K and Ip MM (1995)** Interaction of retinoids with steroid and peptide hormones in modulating morphological and functional differentiation of normal rat mammary epithelial cells. *Endocrinology* 136, 1718-1730
- Lee SH, Jang JJ, Lee JY, Park WS, Kim CS, Kim SH, Yoo NJ (1998)** Immunohistochemical analysis of Fas ligand expression in sarcomas. Sarcomas express high level of FasL in vivo. *APMIS* 106(11), 1035-1040
- Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X (1997)** Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91(4), 479-489



- LI W, Liu X, Yanoff M, Cohen S, Ye X (1996) Cultured retinal capillary pericytes die by apoptosis after an abrupt fluctuation from high to low glucose levels. A comparative study with retinal capillary endothelial cells. *Diabetologia* 39, 537-547
- Li X, Miyagi E, Katoh R, Kawaoi A (1999) Thyrotropin prevents apoptosis by promoting cell adhesion and cell cycle progression in FRTL-5 cells. *Endocrinology* 140, 5962-5970
- Liu C, Cheng J, Mountz JD (1995) Differential expression of human Fas mRNA species upon peripheral blood mononuclear cell activation. *Biochemical Journal* 310, 957-963
- Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X (1996) Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP. *Cell* 86(1), 147-157
- Liu X, Zou H, Slaughter C, Wang X (1997) DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* 89(2), 175-184
- Liuzzi FJ, Tedeschi B (1991) Peripheral nerve regeneration. *Neurosurgery Clinics of North America* 2, 31-42
- Lombardi L, Frigerio S, Collini P, Pilotti S (1997) Immunocytochemical and immunoelectron microscopical analysis of Bcl-2 expression in thyroid oxyphilic tumors. *Ultrastructural Pathology* 21, 33-39
- Lowin B, Hahne M, Mattmann C, Tschopp J (1994) Cytolytic T-cell cytotoxicity is mediated through perforin and Fas lytic pathways. *Nature* 370, 650-652
- Mahmoud I, Colin I, Many MC, Denef JF (1986) Direct toxic effects of iodide in excess on iodine-deficient thyroid glands: Epithelial necrosis and inflammation associated with lipofuscin accumulation. *Experimental and Molecular Pathology* 44, 259
- Malamos B, Koutras DA, Kostamis P, Kralios AG, Rigopoulos G, Zerefos N (1966) Endemic goiter in Greece: Epidemiological and genetic studies. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 26, 688-695
- Malamos B, Miras K, Koutras DA, Kostamis P, Binopoulos D, Mantzos J, Levis G, Rigopoulos G, Zerefos N, Tassopoulos CN (1966) Endemic goiter in Greece: Metabolic studies. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 26, 696-704

- Mallett S, Fossum S, Barclay AN (1990)** Characterization of the MRC OX40 antigen of activated CD4 positive T lymphocytes-a molecule related to nerve growth factor receptor. *EMBO Journal* 9, 1063-1068
- Mancini M, Nicholson DW, Roy S, Thornberry NA, Peterson EP, Casciola-Rosen LA, Rosen A (1998)** The caspase-3 precursor has a cytosolic and mitochondrial distribution: implications for apoptotic signaling. *Journal of Cell Biology* 140(6), 1485-1495
- Manetto V, Lorenzini R, Cordon-Cardo C, Krajewski S, Rosai J, Reed JC, Eusebi V (1997)** Bcl-2 and Bax expression in thyroid tumors. An immunohistochemical and western blot analysis. *Virchows Archives* 430, 125-130
- Many MC, Mestdagh C, Hove MF, Denef JF (1992)** In vitro study of acute toxic effects of high iodide doses in human thyroid follicles. *Endocrinology* 131, 621-630
- Maron R, Zerubavel R, Friedman A, Cohen IR (1983)** T lymphocyte line specific for thyroglobulin produces or vaccinates against autoimmune thyroiditis in mice. *Journal of Immunology* 131, 2316-2322
- Marsters SA, Pitti RM, Sheridan JP, Ashkenazi A (1999)** Control of apoptosis signaling by Apo2 ligand. *Recent Progress in Hormone Research* 54, 225-234
- Marsters SA, Pitti RM, Donahue CJ, Ruppert S, Bauer KD, Ashkenazi A (1996)** Activation of apoptosis by Apo2 ligand is independent of FADD but blocked by CrmA. *Current Biology* 6(6), 750-752
- Marsters SA, Sheridan JP, Pitti RM, Brush J, Goddard A, Ashkenazi A (1998)** Identification of a ligand for the death-domain containing receptor Apo3. *Current Biology* 8(9), 525-528
- Marsters SA, Sheridan JP, Pitti RM, Huang A, Skubatch M, Baldwin D (1997)** A novel receptor for Apo2L/TRAIL contains a truncated death domain. *Current Biology* 7(12), 1003-1006
- Martin HE, Ellis E (1930)** Biopsy by needle puncture and aspiration. *Annals of Surgery* 92, 169-181
- Mastricht J, Koenig RJ, Kaplan MM, Arscott P, Thompson N, Baker JR Jr (1992)** Identification of localized autoantibody epitopes in thyroid peroxidase. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 75, 121-126



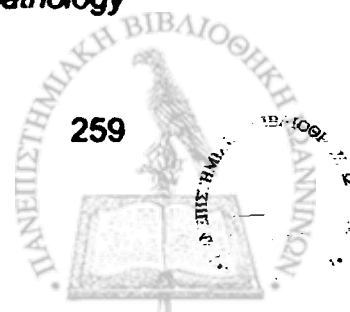
- Matute-Bello G, Liles WC, Steinberg KP, Kiener PA, Mongorin S, Chi EY, Jonas M, Martin TR (1999)** Soluble Fas ligand induces epithelial cell apoptosis in humans with acute lung injury (ARDS). *Journal of Immunology* 163(4), 2217-2225
- McCarthy NJ, Whyte MK, Gilbert CS, Evan GI (1997)** Inhibition of Ced-3/ICE-related proteases does not prevent cell death, DNA damage, or the Bcl-2 homologue Bak. *Journal of Cell Biology* 136, 215
- McCloskey DE, Armstrong DK, Jackisch C, Davidson NE (1996)** Programmed cell death in human breast cancer cells. *Recent Progress in Hormone Research* 51, 493-508
- McEwen BS (1994)** Corticosteroids and hippocampal plasticity. *Annals of New York Academy of Sciences* 746, 134-142
- McIntosh RS, Weetman AP (1997)** Molecular analysis of the antibody response to thyroglobulin and thyroid peroxidase. *Thyroid* 3, 471-487
- McLachlan SM, Rapoport B (1995)** Genetic and epitopic analysis of thyroid peroxidase (TPO) autoantibodies: markers of the human thyroid autoimmune response. *Clinical and Experimental Immunology* 101, 200-206
- Medema JP, Scaffidi C, Kischkel FC, Sherchenko A, Mann M, Krammer PH, Peter ME (1997)** FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *EMBO Journal* 16, 2794-2804
- Michna H, Nishino Y, Neef G, McGuire WL, Schneider MR (1992)** Progesterone antagonists tumor-inhibiting potential and mechanism of action. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 41, 339-348
- Migliorati G, Nicoletti I, D'Adamio F, Spreca A, Pagliacci MC, Riccardi C (1994)** Dexamethasone induces apoptosis in mouse natural killer cells and cytotoxic T lymphocytes. *Immunology* 81, 21-26
- Migliorati G, Nicoletti I, Nocentini G, Pagliacci MC, Riccardi C (1994)** Dexamethazone and interleukins modulate apoptosis of murine thymocytes and peripheral T-lymphocytes. *Pharmacological Research* 30, 43-52
- Mihich E. and Schimke RT (Eds) (1994).** Apoptosis. *Pezcoller Foundation Symposia* 5. New York: Plenum Press
- Milas L, Stephens LC, Meyn RE (1994)** Relation of apoptosis to cancer therapy. *In Vivo* 8, 665-673



- Mirakian R, Hammond LJ, Bottazzo GF (1998)** Pathogenesis of thyroid autoimmunity: the Bottazzo-Feldmann hypothesis [letter;comment]. *Immunology Today* 19, 97
- Mitsiades N, Poulaki V, Kotoula V, Mastorakos G, Tseleni-Balafouta S, Koutras DA, Tsokos M (1998)** Fas/Fas ligand up-regulation and Bcl-2 down-regulation may be significant in the pathogenesis of Hashimoto's thyroiditis. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 83(6), 2199-2203
- Mitsiades N, Poulaki V, Mastorakos G, Tseleni-Balafouta ST, Kotoula V, Koutras DA, Tsokos M (1999)** Fas Ligand expression in Thyroid Carcinomas: A Potential Mechanism of Immune Evasion. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 84(8), 2924-2932
- Moulton BC, Motz J, Serdoncillo C, Akcali KC, Khan SA (1997)** Progesterone withdrawal and RU-486 treatment stimulate apoptosis in specific uterine decidual cells. *Cell Death and Differentiation* 4, 76-81
- Moore D, Ohene-Fianco D, Garcia B, Chakrabati S (1998)** Apoptosis in thyroid neoplasms: relationship with p53 and bcl-2 expression. *Histopathology* 32, 35-42
- Mountz JD, Zhang HG, Hsu HC, Fleck M, Wu J, al-Maini MH et al (1999)** Apoptosis and Cell death in the Endocrine System. *Recent Progress in Hormone Research* 54, 235-269
- Mountz JD, Pierson MC, Zhou T, Cheng J, Elkon KB, Hasunuma T, et al (1995)** SFas expression in patients with autoimmune disease. *Arthritis and Rheumatism*, 38, S174
- Muller Y, Rocchi E, Lazaro JB, Clos J (1995)** Thyroid hormone promotes Bcl-2 expression and prevents apoptosis of early differentiating cerebellar granule neurons. *International Journal of Developmental Neuroscience* 13, 871-885
- Mutaku JF, Poma JF, Many MC, Denef JF, van den Hove MF (2002)** Cell necrosis and apoptosis are differentially regulated during goitre development and iodine-induced involution. *Journal of Endocrinology* 172, 375-386
- Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC, O'Rourke K, Shevchenko A, Ni J, Scaffidi C, Bretz JD, Zhang M, Gentz R, Mann M, Krammer PH, , Dixit VM (1996)** FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell* 85(6), 817-827



- Muzio M, Stockwell BR, Stennicke HR, Salvesen GS, Dixit VM (1998)** An induced proximity model for caspase-8 activation. *Journal of Biological Chemistry* 273(5), 2926-2930
- Myc A, Arscott PL, Bretz JD, Thompson NW, Baker Jr JR (1999)** Characterization of FAP-1 expression and function in thyroid follicular cells. *Endocrinology* 140, 5431
- Nagata S (1996)** Fas ligand and immune evasion. *Nature Medicine* 2, 1306
- Nagata S (1997)** Apoptosis by death factor. *Cell* 88(3), 355-365
- Nagata S, Golstein P (1995)** The Fas death factor. *Science* 267, 1449-1456
- Nagata S, Suda T (1995)** Fas and Fas ligand: lpr and gld mutations. *Immunology Today* 16, 39-43
- Nakamoto Y, Kaneko S, Buttner SW, Matsushita E, Kobayashi K (1999)** Inhibition of peripheral blood lymphocyte apoptosis by soluble fas ligand in patients with hepatocellular carcinoma. *Oncology Report* 6(4), 733-739
- Newmeyer D, Farschon DM, Reed JC (1994)** Cell-free apoptosis in *Xenopus* egg extracts: inhibition by Bcl-2 and requirement for an organelle fraction enriched mitochondria. *Cell* 79, 353
- Nicotera P, Rossi AD (1994)** Nuclear Ca^{2+} : physiological regulation and role in apoptosis. *Molecular and Cellular Biochemistry* 135, 89-98
- Nozawa K, Kayagaki N, Tokano Y, Yagita H, Okumura K, Hasimoto H (1997)** Soluble Fas (APO-1, CD95) and soluble Fas Ligand in rheumatic diseases. *Arthritis and Rheumatism* 40, 1126-1129
- O'Connell J, Bennett MW, O'Sullivan GC, Collins JK, Shanahan F (1999)** Resistance to Fas (APO-1/CD95)-mediated apoptosis and expression of Fas ligand in esophageal cancer: the Fas counterattack. *Diseases of the Esophagus* 12(2), 83-89
- Oertel YC (1996)** Fine-needle aspiration and the diagnosis of thyroid cancer. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* 25, 69-91
- Ohtsuka K, Hashimoto M (2000)** Serum levels of soluble Fas in patients with Graves' ophtalmopathy. *British Journal of Ophtalmology* 84, 103-106
- Okayasu I (1985)** Transfer of experimental autoimmune thyroiditis to normal syngeneic mice by injection of mouse thyroglobulin-sensitized T lymphocytes after activation with concanavalin A. *Clinical Immunology and Immunopathology* 36, 101-109



- Okayasu I, Saegusa M, Fujiwara M, Hara Y, Rose NR (1995)** Enhanced cellular proliferative activity and cell death in chronic thyroiditis and thyroid papillary carcinoma. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 121, 746-752
- Old LJ (1985)** Tumor Necrosis Factor (TNF). *Science* 230, 630-632
- Old LJ (1987)** Another chapter in the long history of endotoxin. *Nature* 330, 602-603
- Oltvai ZN, Millman CL, Korsmeyer SJ (1993)** Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74, 609-619
- Orth K, Chinnaiyan AM, Garg M, Froelich CJ, Dixit VM (1996)** The CED-3/ICE-like protease Mch2 is activated during apoptosis and cleaves the death substrate lamin A. *Journal of Biological Chemistry* 271(28), 16443-16446
- Ortiz A, Lorz C, Egido J (1999)** New kids in the block: the role of FasL and Fas in kidney damage. *Journal of Nephrology* 12(3), 150-158
- Oste C (1988)** Polymerase Chain Reaction. *Biotechniques* 6(2), 162-167
- Otter I, Conus S, Ravn U, Rager M, Olivier R, Monney L, Fabbro D, Borner C (1998)** The binding properties and biological activities of Bcl-2 and Bax in cells exposed to apoptotic stimuli. *Journal of Biological Chemistry* 273, 6110-6120
- Ou CY, Kwok S, Mitchell SW, Mack DH, Sninsky JJ, Krebs JW, Feorino P, Warfield D, Schochetman G (1988)** DNA amplification for direct detection of HIV-1 in DNA of peripheral blood mononuclear cells. *Science* 239 (4837), 295-297
- Owen-Schaub LB, Radinsky R, Kruzel E, Berry K, Yonehara S (1994)** Anti-Fas on non hematopoietic tumors : levels of Fas/APO-1 and bcl-2 are not predictive of biological responsiveness. *Cancer Research* 54, 1580-1586
- Palazzo FF, Hammond LJ, Goode AW, Mirakian R (2000)** Death of the autoimmune thyrocyte: is it pushed or does it jump? *Thyroid* 10, 561-572
- Pan G, O'Rourke K, Chinnaiyan AM, Gentz R, Ebner R, Ni J, Dixit VM (1997)** The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science* 276, 111-113
- Papassotiropoulos A, Ludwig M, Naib-Majani W, Roo GS (1996)** Induction of apoptosis and secondary necrosis in rat dorsal root ganglion cell cultures by oxidized low density lipoprotein. *Neuroscience Letters* 209, 33-36



- Parrizas M, LeRoith D (1997)** IGF-I inhibition of apoptosis is associated with increased expression of the bcl-xL gene product. *Endocrinology* 138, 1355-1358
- Patson PA, Gettins P, Beechem J, Schapira M (1991)** Mechanism of serpin action: evidence that C1 inhibitor function as a suicide substrate. *Biochemistry* 30, 8876-8882
- Paus R, Rosenbach T, Hass N, Czarnecki BM (1993)** Patterns of cell death: the significance of apoptosis for dermatology. *Experimental Dermatology* 2, 3-11
- Pfeiffer C, Murray J, Madri J (1991)** Selective activation of Th1- and Th2-like cells in vivo-response to human collagen IV. *Immunological Reviews* 123, 65-84
- Phelps E, Peiqing W, Bretz J, Baker JR (2000)** Thyroid cell apoptosis. A new understanding of thyroid autoimmunity. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* 29, 375
- Pollina L, Pacini F, Fontanini G, Vignati S, Bevilacqua G, Basolo F (1996)** Bcl-2, p53 and proliferating cell nuclear antigen expression is related to the degree of differentiation in thyroid carcinomas. *British Journal of Cancer* 73, 139-143
- Porter AG, Janicke RU (1997)** Death substrates come alive. *Bioessays* 19(6), 501-507
- Powell LM, Wallis SC, Pease RJ, Edwards YH, Knott TJ, Scott J (1987)** A novel form of tissue-specific RNA processing produces apolipoprotein B48 in intestine. *Cell* 50 (6), 831-840
- Pronk GJ, Ramer K, Amiri P, Williams LT (1996)** Requirement of an ICE-like protease for induction of apoptosis and ceramide generation by REAPER. *Science* 271, 808-810
- Rasmussen NG, Hornnes PJ, Hegedus L (1989)** Ultrasonographically determined thyroid size in pregnancy and postpartum: the goitrogenic effect of pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynaecology* 160, 1216-1220
- Ray CA, Black RA, Kronheim SR, Greenstreet TA, Sleath PR, Salvesen GS, Pickup DJ (1992)** Viral inhibition of inflammation: cowpox virus encodes an inhibitor of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Cell* 69(4), 597-604
- Reed JC (1998)** Bcl-2 family proteins. *Oncogene* 17, 3225-3236
- Reed J.C (1997)** Cytochrome c: can't live with it-can' live without it. *Cell* 91, 559-562



- Resnicoff M, D Abraham, Yutanawiboonchai W, Rotman HL, Kajstura J, Rubin R, Zoltick P, Baserga R (1995)** The IGF-I receptor protects tumor cells from apoptosis in vivo. *Cancer Research* 55, 2463- 2469
- Rheaume E, Cohen LY, Uhlmann F, Lazure C, Alam A, Hurwitz J, Sekaly RP, Denis F (1997)** The large subunit of replication factor C is a substrate for caspase-3 in vitro and is cleaved by a caspase-3-like protease during Fas-mediated apoptosis. *EMBO Journal* 16(21), 6346-6354
- Ridgway EC(1996)** Clinical evaluation of solitary thyroid nodules In: Braverman LE, Utiger RD (ed) Werner and Ingbar's: The Thyroid. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, p. 966
- Ridgway WM, Weiner HL, Fathman CG (1994)** Regulation of autoimmune response. *Current Opinion in Immunology* 6, 946-955
- Riou C, Tonoli H, Bernier-Valentin F, Rabilloud R, Fontlupt P, Rousset B (1999)** Susceptibility of differentiated thyrocytes in primary culture to undergo apoptosis after exposure to hydrogen peroxide:relation with level of expression of apoptosis regulatory proteins, Bcl-2 and Bax. *Endocrinology* 140, 1990-1997
- Roodman GD (1996)** Advances in bone biology: the osteoclast. *Endocrine Reviews* 17, 308-332
- Rothe M, Pan MG, Henzel WJ, Ayres TM, Goeddel DV (1995)** The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. *Cell* 83(7), 1243-1252
- Rotonda J, Nicholson DW, Fazil KM, Gallant M, Gareau Y, Labelle M, Peterson EP, Rasper DM, Ruel R, Vaillancourt JP, Thornberry NA, Becker JW (1996)** The three-dimensional structure of apopain/CPP32, a key model of apoptosis. *Nature Structural Biology* 3(7), 619-625
- Rubin LL (1997)** Neuronal cell death: when, why, and how. *British Medical Bulletin* 53, 617-631
- Rubin R, Baserga R (1995)** Biology of disease: IGF-I receptor. Its role in cell proliferation, apoptosis and tumorigenicity. *Laboratory Investigation* 73, 311-331
- Rymaszewski M, Arscott PL, Knapp J, Bretz JD, Thompson NW, Bartron J, Baker JRJr (1997)** An examination of Fas ligand expression on thyrocytes. *Thyroid* 7, 149



- Sabatini D, Krelbich G, Morimoto T, Adesnik M (1982).** Mechanisms for the incorporation of proteins in membranes and organelles. *Journal of Cell Biology* 92, 1-22
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988)** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239 (4839), 487-491
- Saikumar P, Dong Z, Weinberg IM, Venkatachalam MA (1998)** Mechanisms of cell death in hypoxia /reoxxygenation injury. *Oncogene* 17, 3341-3349
- Saikumar P, Dong Z, Mikhailov V, Denton M, Weinberg JM, Venkatachalam MA (1999)** Apoptosis: Definition, Mechanisms and Relevance to Disease. *American Journal of Medicine* 107, 489-506
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989).** Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Second Edition. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory
- Sano H, Assano K, Minatoguchi S, Hiraoka J, Fujisawa K, Wishigaki K, Yasuda N, Kumada H, Takemura M, Ohashi H, Seishima M, Fujiwara T, Fujiwara H (1998)** Plasma soluble fas and soluble fas ligand in chronic glomerulonephritis. *Nephron* 80(2), 153-161
- Sato K, Kimura F, Nakamura Y, Murakami H, Yoshida M, Tanaka M, Nagata S, Kanatani Y, Wakimoto N, Nagata N, Motoyoshi K (1996)** An aggressive nasal lymphoma accompanied by high levels of soluble FasL. *British Journal of Haematology* 94, 379-382
- Sato H, Abe Y, Noguchi M, Kurokawa K, Sakai H (1999)** Inhibitory effect of thyrotropic hormone on apoptosis induced by actinomycin D in a functioning rat thyroid cell line. *Endocrine Journal* 46, 309-315
- Scaife JF (1966)** The effect of lethal doses of x-irradiation on the enzymatic activity of mitochondrial cytochrome c. *Canadian Journal of Biochemistry* 44(4), 433-448
- Schall TJ, Lewis M, Koller KJ, Lee A, Rice GC, Wong GHW, Gatanaga T, Granger GA, Lentz R, Raab H, Kohr WJ, Goeddel DV (1990)** Molecular cloning and expression of a receptor for human tumor necrosis factor. *Cell* 61, 361-370
- Schendel SL, Montal M, Reed JC (1998)** Bcl-2 family proteins as ion-channels. *Cell Death and Differentiation* 5, 372-380



- Sen S (1992)** Programmed cell death: concept, mechanism and control. *Biological Review of the Cambridge Philosophical Society* 67, 287-319
- Sentman CL, Shutter JR, Hockenbery D, Kanagawa O, Korsmeyer SJ (1991)** Bcl-2 inhibits multiple forms of apoptosis but not negative selection in thymocytes. *Cell* 67, 879-888
- Seishima M, Takemura M, Saito K, Sano H, Minatoguchi S, Fujiwara H et al (1996)** Highly sensitive ELISA for soluble Fas in serum: increased soluble Fas in the elderly. *Clinical Chemistry* 42, 1911-1914.
- Sheikh MS, Rochefort H, Garcia M (1995)** Overexpression of p21 WAF1/CIP1 induces growth arrest, giant cell formation and apoptosis in human breast carcinoma cell lines. *Oncogene* 11, 1899-1905
- Sheridan JP, Marsters SA, Pitti RM, Gurney A, Skubatch M, Baldwin D, Ramakrishnan L, Gray CL, Baker K, Wood WI, Goddard AD, Godowski P, Ashkenazi A (1997)** Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science* 277(5327), 818-821
- Shimaoka Y, Hidaka Y, Okumura M, Takeoka K, Tada H, Amino N (1998)** Serum concentration of soluble Fas in patients with autoimmune thyroid diseases. *Thyroid* 8(1), 43-47
- Shimaoka Y, Hidaka Y, Okumura M, Takeoka K, Tada H, Amino N (1998)** Serum concentration of soluble Fas in patients with autoimmune thyroid diseases. *Thyroid* 8(1), 43-47
- Shimizu S, Eguchi Y, Kosaka H, Kamiike W, Matsuda H, Tsujimoto Y (1995)** Prevention of hypoxia-induced cell death by Bcl-2 and Bcl-XL. *Nature* 374 (6525), 811-813
- Shu HB, Takeuchi M, Goeddel DV (1996)** The Tumor Necrosis Factor receptor-2 signal transducers TRAF2 and c-IAP1 are components of the tumor necrosis factor redeptor-1 signaling complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 93(24), 13973-13978
- Simons M, Beinroth S, Gleichmann M, Liston P, Kornluk RG, MacKenzie AE, Bahr M, Xiang J, Chao DT, Korsmeyer SJ (1996)** Bax-induced cell death may not require interleukin 1 beta-converting enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 93(25), 14559-14563
- Singer PA (1991)** Thyroiditis. Acute, subacute, and chronic. *Medical Clinics of North America* 75, 61-77



- Singleton JR, Dixit VM, Feldman EL (1996) Type I IGF receptor activation regulates apoptotic proteins. *Journal of Biological Chemistry* 271, 31791-31794
- Sinowatz F, Amselgruber W, Plendl J, Kollé S, Neumüller C, Boos G (1995) Effects of hormones on the prostate in adult and aging men and animals. *Microscopy Research and Technique* 30, 282-292
- Slayden OD, Hirst JJ, Brenner RM (1993) Estrogen action in the reproductive tract of rhesus monkeys during antiprogestin treatment. *Endocrinology* 132, 1845-1856
- Smith RA, Baglioni C (1987) The active form of tumor necrosis factor as a trimer. *Journal of Biological Chemistry* 262, 6951-6954
- Smith CA, Davis T, Anderson D, Solam L, Beckmann MP, Jerzy R, Dower SK, Cosman D, Goodwin RG (1990) A receptor for tumor necrosis factor defines an unusual family of cellular and viral proteins. *Science* 248, 1019-1023
- Smith CA, Farrah T, Goodwin RG (1994) The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins. *Cell* 76, 959
- Smith CA, Gruss H-J, Davis T, Anderson D, Farrah T, Baker E, Sutherland GR, Brannan C, Copeland NG, Jenkins NA, Grabstein KH, Gliniak B, McAlister IB, Fanslow W, Alderson M, Falk B, Gimpel S, Gillis S, Din WS, Goodwin RG, Armitage RJ (1993) CD30 antigen, a marker for Hodgkin's lymphoma, is a receptor whose ligand defines an emerging family of cytokine with homology to TNF. *Cell* 73, 1349-1360.
- Smith MR, Xie T, Joshi I, Schilder RJ (1998) Dexamethasone plus retinoids decrease IL-6/IL-6 receptor and induce apoptosis in myeloma cells. *British Journal of Haematology* 102(4), 1090-1097
- Somerville MJ, Hunter AG, Aubry HL, Korneluk RG, MacKenzie AE, Surh LC (1997) Clinical application of the molecular diagnosis of spinal muscular atrophy: deletions of neuronal apoptosis inhibitor protein and survival motor neuron genes. *American Journal of Medical Genetics* 69, 159-165
- Stamenkovic I, Clark EA, Seed B (1989) A B-lymphocyte activation molecule related to the nerve growth factor and induced by cytokines in carcinomas. *EMBO Journal* 8, 1403-1410
- Stassi G, Di Liberto D, Todaro M, Zeuner A, Ricci-Vitiani L, Stoppacciaro A, Ruco L, Farina F, Zummo G, De Maria R (2000) Control of target cell survival in



thyroid autoimmunity by T helper cytokines via regulation of apoptotic proteins. *Nature Immunology* 1, 483

Stassi G, Todaro M, Bucchieri F, Stoppacciaro A, Farina F, Zummo G, Testi R, De Maria R (1999) Fas/Fas ligand-driven T cell apoptosis as a consequence of ineffective thyroid immunoprivilege in Hashimoto's thyroiditis. *Journal of Immunology* 162(1), 263-267

Steller H (1995). Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 267, 1445-1449

Stokes TA, Rymaszewski M, Arscott PL, Wang SH, Bretz JD, Bartron J, Baker JR (1998) Constitutive expression of FasL in thyrocytes. *Science* 279, 5359

Strater J, Walczak H, Hasel C, Melzner I, Lethauser F, Moller P (2001) CD95 ligand immunochemistry: a critical study on 12 antibodies. *Cell Death and Differentiation* 8, 273

Strobel T, Swanson L, Korsmeyer S, Cannistra SA (1996) Bax enhances paclitaxel-induced apoptosis through a p53-independent pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 93, 14094-14099

Suda T, Hashimoto H, Tanaka M, Ochi T, Nagata S (1997) Membrane Fas ligand kills human peripheral blood T lymphocytes and soluble Fas ligand blocks the killing. *Journal of Experimental Medicine* 186, 2045

Suda T, Okazaki T, Naito Y, Yokota T, Arai N, Ozaki S, Nakao K, Nagata S (1995) Expression of the Fas Ligand in cells of T cell lineage. *Journal of Immunology* 154, 3806-3813

Suda T, Takahashi T, Goldstein P, Nagata S (1993) Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 75, 1169-1178

Sugarman BJ, Aggarwal BB, Hass PE, Figari IS, Palladino MA Jr, Shepard HM (1985) Recombinant human tumor necrosis factor- α : effects on proliferation of normal and transformed cells in vitro. *Science* 230, 943-945

Susin SA, Zamzami N, Castedo M, Hirsch T, Marchetti P, Macho A, Daugas E, Geuskens M, Kroemer G (1996) Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *Journal of Experimental Medicine* 184(4), 1331-1341

Susin SA, Zamzami N, Castedo M, Daugas E, Wang HG, Geley S, Fassy F, Reed JC, Kroemer G (1997) The central executioner of apoptosis: multiple



connections between protease activation and mitochondria in Fas/APO-1/CD95- and ceramide-induced apoptosis. *Journal of Experimental Medicine* 186(1), 25-37

Suzuki A, Matsuzawa A, Iguchi T (1996) Down regulation of Bcl-2 is the first step in Fas-mediated apoptosis of male reproductive tract. *Oncogene* 13, 31-37

Suzuki A, Matsuzawa A, Iguchi T (1996) Down regulation of Bcl-2 is the first step in Fas-mediated apoptosis of male reproductive tract. *Oncogene* 13, 31-37

Szabolcs I, Bernard W, Horster FA (1995) Thyroid autoantibodies in hospitalized chronic geriatric patients: prevalence, effects of age, nonthyroidal clinical state and thyroid function. *Journal of American Geriatrics Society* 43, 670-673

Taleb J, Mathurin P, Poynard T, Gougerot-Pocidalo MA, Choleet-Martin S (1998) Raised plasma soluble Fas and Fas ligand in alcoholic liver disease. *Lancet* 351(9120), 1930-1931

Takahashi A, Alnemri ES, Lazebnik YA, Fernandes-Alnemri T, Litwack G, Moir RD et al (1996) Cleavage of lamin A by Mch2 alpha but not CPP32: multiple interleukin-1 beta-converting enzyme-related proteases with distinct substrate recognition properties are active in apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 93(16), 8395-8400

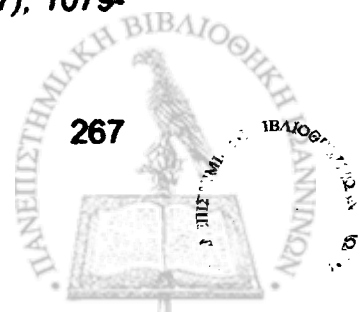
Tamura M, Kimura H, Koji T, Tominaga T, Ashizawa K, Kiriya T, Yokoyama N, Yoshimura T, Eguchi K, Nakane PK, Nagataki S (1998) Role of apoptosis of thyrocytes in a rat model of goiter. A possible involvement of Fas system. *Endocrinology* 139(8), 3646-53

Tanaka M, Suda T, Takahashi T et al (1995) Expression of the functional soluble form of human Fas ligand in activated lymphocytes. *EMBO Journal* 14, 1129-1135

Tanaka Y, Yoshihara K, Itaya A, Kamiya T, Koide SS (1984) Mechanism of the inhibition of Ca^{2+} , Mg^{2+} -dependent endonuclease of bull seminal plasma induced by ADP-ribosylation. *Journal of Biological Chemistry* 259(10), 6579-6585

Tanimoto C, Hirakawa S, Kawasaki H, Hayakawa N, Ota Z (1995) Apoptosis in thyroid diseases: a histochemical study. *Endocr J* 42, 193-201

Tannapfel A, Kohlhaw K, Ebel J, Hauss J, Liebert U, Berr F, Wittekind C (1999) Apoptosis and the expression of Fas and Fas ligand (FasL) antigen in rejection and reinfection in liver allograft specimens. *Transplantation* 67(7), 1079-1083



- Tartaglia LA, Ayres TM, Wong GH, Goeddel DV (1993)** A novel domain within the 55kd TNF receptor signals cell death. *Cell* 74(5), 845-853
- Tartaglia LA, Goeddel DV (1992)** Two TNF receptors. *Immunology Today* 13(5), 151-153
- Tata JR (1994)** Hormonal regulation of programmed cell death during amphibian metamorphosis. *Biochem Cell Biol* 72, 581-588
- Thompson CB (1995)** Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267, 1456-1462
- Thornberry N, Lazebnik Y (1998)** Caspases: enemies within. *Science* 281, 1312-1316
- Thornberry NA, Rano TA, Peterson EP, Rasper DM, Timkey T, Garcia-Calvo M, Nordstrom PA, Roy S, Vaillanourt JP, Chapman KT, Nicholson DW (1997)** A combinatorial approach defines specificities of members of caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 272(29), 17907-17911
- Thorne M, Schneider P, Hofmann K, Fickenscher H, Meinl E, Neipel F, Mattmann C, Burns K, Bodmer JL, Schroter M, Scaffidi C, Krammer PH, Peter ME, Tschopp J (1997)** Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature* 386, 517-521
- Tomei LD and Cope FO (Eds) (1994)** Apoptosis II: the molecular basis of apoptosis in disease. *Current Communications in Cell and Molecular Biology* 8. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Toyozaki T, Hiroe M, Saito T, Iijima Y, Takano H, Hiroshima K, Kohno H, Ishiyama S, Marumo F, Masuda Y, Ohwada H (1998)** Levels of soluble Fas in patients with myocarditis, heart failure of unknown origin, and in healthy volunteers. *American Journal of Cardiology* 81, 798-800
- Trauth BC, Klas C, Peters AMJ, Matzku S, Moller P, Falk W, Debatin K-M, Krammer PH (1989)** Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science* 245, 301-305
- Tsatsoulis A, Johnson EO, Andricula M, Kalogera C, Svarna E, Spyrou P, Seferiadis K, Tsolas O (1999)** Thyroid autoimmunity is associated with higher urinary iodine concentrations in an iodine-deficient area of Northwestern Greece. *Thyroid* 9 (3), 279-283



- Tsatsoulis A, Johnson EO, Sacharis K, Soucacos PK, Soucacos PN (1996)** An epidemiological survey on the prevalence of goiter among schoolchildren in Northwestern Greece. *European Journal of Internal Medicine* 7, 35-39
- Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E, Croce CM (1985)** Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 288, 1440-1443
- Uren AG, Coulson EJ, Vaux DL (1998)** Conservation of baculovirus inhibitor of apoptosis repeat proteins (BIRPs) in viruses, nematodes, vertebrates and yeasts. *Trends in Biochemical Science* 23(5), 159-162
- Van der Bosch J, Horn D, Ruller S, Schlaak M (1992)** Modulation of tumor cell susceptibility to cytokine-induced cell death by hormones, growth factors and cell density. *Journal of Cellular Physiology* 151, 395-404
- Vander Heiden MG, Chandel NS, Williamson EK, Schumacker PT, Thompson CB (1997)** Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. *Cell* 91(5), 627-637
- Varfolomeev EE, Schuchmann M, Luria V, Chiannilkulchai N, Beckmann JS, Mett IL, Brodianski VM, Kemper OC, Kollet O, Lapidot T, Soffer D, Sobe T, Avraham KB, Sun XM, MacFarlane M, Zhuang J, Wolf BB, Green DR, Cohen GM (1999)** Distinct caspase cascades are initiated in receptor-mediated and chemical-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 274, 5053-5060
- Viard I, Wehrli P, Bullani R, Schneider P, Holler N, Salomoy D, Hunziker T, Saurat JH, Tschopp J, French LE (1998)** Inhibition of toxic epidermal necrolysis by blockade of CD95 with human intravenous immunoglobulin. *Science* 282(5399), 490-493
- Vinatier D, Dufour P, Subtil D (1996)** Apoptosis: a programmed cell death involved in ovarian and uterine physiology. *European Journal of Obstetrics, Gynaecology and Reproductive Biology* 67, 85-102
- Vitale M, Di Matola T, D'Ascoli F, Salzano S, Bogazzi F, Fenzi G, Martino E, Rossi G (2000)** Iodide excess induces apoptosis in thyroid cells through a p53-independent mechanism involving oxidative stress. *Endocrinology* 141, 598-605
- Watanabe D, Suda T, Hashimoto H, Nagata S (1995)** Constitutive activation of the Fas ligand gene in mouse lymphoproliferative disorders. *EMBO Journal* 14, 12-18

- Watanabe FR, Brannan CI, Itoh N, Yonehara S, Copeland NG, Jenkins NA, et al (1992)** The cDNA structure, expression, and chromosomal assignment of the mouse Fas antigen. *Journal of Immunology* 148, 1274-1279
- Watanabe M, Amino N, Hochito K, Watanabe K, Kuma K, Iwatani Y (1997)** Opposite changes in serum soluble CD8 in patients at the active stages of Graves' and Hashimoto diseases. *Thyroid* 7(5), 743-747
- Watanabe-Fugunaga R, Brannan CI, Itoh N, Yonehara S, Copeland NG, Jenkins NA, Nagata S (1992).** The cDNA structure, expression and chromosomal assignment of the mouse Fas antigen. *Journal of Immunology* 148, 1274-1279
- Waterfield MD (1989)** Growth factor receptors. *British Medical Bulletin* 45, 541-553
- Watson PF, Pickerill AP, Davies R, Weetman AP (1994)** Analysis of cytokine gene expression in Grave's disease and multinodular goiter. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 79, 355-360
- Weetman AP, McGregor AM (1994)** Autoimmune thyroid disease: further developments in our understanding. *Endocrine Reviews* 15, 788-830
- Weetman AP, McGregor AM (1984)** Autoimmune thyroid disease. *Endocrine Reviews* 5, 309-337
- Weiss M, Baruch B, Keydar I, Wreschner DH (1996)** Preoperative diagnosis of thyroid papillary carcinoma by reverse transcriptase polymerase chain reaction of the muc1 gene. *International Journal of Cancer* 66, 55-59
- Weller M, Frei K, Groscurth P, Krammer PH, Yonekawa Y, Fontana A (1994)** Anti-Fas/APO-1 antibody-mediated apoptosis of cultured human glioma cells, induction and modulation of sensitivity by cytokines. *Journal of Clinical Investigation* 94, 954-964
- Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, Din WS, Huang CP, Nicholl JK, Sutherland GR, Smith TD, Rauch C, Smith CA et al (1995)** Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* 3(6), 673-682
- Williams N (1997)** Thyroid disease: A case of cell suicide? [news;comment]. *Science* 275, 926



- Wilson KP, Black JA, Thomson JA, Kim EE, Griffith JP, Navia MA, Murcko MA, Chambers SP, Aldape RA, Raybuck SA et al (1994)** Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme. *Nature* 370(6487), 270-275
- Wimalasena J, Meehan D, Cavallo C (1991)** Human epithelial ovarian cancer cell steroid secretion and its control by gonadotropins. *Gynaecologic Oncology* 41, 56-63
- Winqvist O, Soderbergh A, Kampe O (1996)** The autoimmune basis of adrenocortical destruction in Addison's disease. *Molecular Medicine Today* 2, 282-289
- Winzer R, Schmutzler C, Jakobs TC, Ebert R, Rendl J, Reiners C, Jakob F, Kohrle J (1998)** Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction Analysis of thyrocyte-relevant genes in fine-needle aspiration biopsies of the human thyroid. *Thyroid* 8, 981-987
- Wolozin B, Iwasaki K, Vito P, Ganjel JK, Lacana E, Sunderland T, Zhao B, Kusiak JW, Wasco W, D'Adamio L (1996)** Participation of presenilin 2 in apoptosis: enhanced basal activity conferred by an Alzheimer mutation. *Science* 274, 1710-1713
- Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME (1995)** Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases of apoptosis. *Science* 270, 1326-1331
- Xu DG, Crocker SJ, Doucet JP, St-Jean M, Tamai K, Hakim AM, Ikeda JE, Liston P, Thompson CS, Korneluk RG, MacKenzie A, Robertson GS (1997)** Elevation of neuronal expression of NAIP reduces ischemic damage in the rat hippocampus. *Nature Medicine* 3, 997-1004
- Xue D, Horvitz HR (1997)** *Caenorhabditis elegans* CED-9 protein is a bifunctional cell death inhibitor. *Nature* 390(6657), 305-308
- Xue D, Horvitz HR (1995)** Inhibition of the *Caenorhabditis elegans* cell-death protease CED-3 by a CED-3 cleavage site in baculovirus p35 protein. *Nature* 377(6546), 248-251
- Yanagisawa J, Takahashi M, Kanki H, Yano-Yanagisawa H, Tazunoki T, Sawa E, Nishitoba T, Kamishohara M, Kobayashi E, Kataoka S, Sata T (1997)** The molecular interaction of Fas and FAP-1: a tripeptide blocker of human Fas interaction with FAP-1 promotes Fas-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 272, 8539-8545



- Yang T, Namba H, Hara T, Takmura N, Nagayama Y, Fukata S, Ishikawa N, Kuma K, Ito K, Yamashita S (1997)** P53 induced by ionizing radiation mediates DNA end -joining activity, but not apoptosis of thyroid cells. *Oncogene* 14, 1511-1519
- Yokozawa T, Miyauchi A, Kuma K, Sugawara M (1995)** Accurate and simple method of diagnosing thyroid nodules by the modified technique of ultrasound-guided fine needle aspiration biopsy. *Thyroid* 5, 141-145
- Yonehara S, Ishii A, Yonehara M (1989)** A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. *Journal of Experimental Medicine* 169, 1747-1756
- Yuan J (1996)** Evolutionary conservation of a genetic pathway of programmed cell death. *Journal of Cell Biochemistry* 60, 4-11
- Zhang J, Cado D, Chen A, Kabra NH, Winoto A (1998)** Fas-mediated apoptosis and activation-induced T-cell proliferation are defective in mice lacking FADD/Mort 1. *Nature* 392, 296-300
- Zou H, Henzel WJ, Lin X, Lutschg A, Wang X (1997)** Apaf-1, a human rotein homologous to C.elegans CED-4, participates to the dependent activation of caspase-3. *Cell* 90, 405-413



Μέρος έκτο

Γλωσσάριο Απόπτωσης



ΜΕΡΟΣ ΕΚΤΟ

ΓΛΩΣΣΑΡΙΟ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ

A

- A1** Μέλος της οικογένειας πρωτεϊνών Bcl-2 γνωστή και ως πρωτεΐνη BFL-1. Η πρωτεΐνη A1 εκφράζεται σε αιμοποιητικούς ιστούς, παρατείνει την επιβίωση του κυττάρου και επιπρέπει τη διαφοροποίηση των κυττάρων του μυελού.
(*J Immunol* 1993, 151:1979-1988; *Blood* 1996, 87:983-992)
- A20** Το γονίδιο A20 είναι υπεύθυνο για την πρωτογενή αντίδραση που επάγεται από κυτταροκίνες (cytokine-inducible primary response gene) και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που αναστέλλει την απόπτωση.
(*J Biol Chem* 1990, 265:14705-14708; *J Immunol* 1995, 154:1699-1706)
- AIF** Apoptosis inducing factor. Παράγοντας επαγωγής της απόπτωσης, ο οποίος απελευθερώνεται από τα μιτοχόνδρια, έχει πρωτεολυτικές ιδιότητες και ενεργοποιεί τις κασπάσες.
(*FEBS Lett* 1998, 427:198-202)
- AKT** Γνωστή και ως πρωτεϊνική κινάση B ή PKB. Η AKT είναι μια κινάση σερίνης-θρεονίνης, η οποία παρεμποδίζει την απόπτωση των νευρώνων.
(*Science* 1997, 275:628-630)
- ALG-2** Apoptosis-linked gene-2. Προ-αποπτωτικό γονίδιο που κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη σύνδεσης με το ασβέστιο (Ca^{++}), η οποία απαιτείται για τον κυτταρικό θάνατο μέσω του T-κυτταρικού υποδοχέα και του υποδοχέα Fas. Το γονίδιο ALG-2 σχετίζεται επίσης με την επιβίωση των νευρώνων.
(*Science* 1996, 271:521-525)

- ALG-3** Apoptosis-linked gene-3. Γονίδιο της νόσου Alzheimer που προστατεύει τα κύτταρα PC12 από την απόπτωση που επάγει το γλουταμικό οξύ.
(*J Biol Chem* 1996, 271:31025-31028)
- Annexin-V** Πρωτεΐνη που συνδέεται με την φωσφατιδυλσερίνη και χρησιμοποιείται για την ανίχνευση των αποπτωτικών κυττάρων.
- Apaf-1** Apoptosis protease activating factor-1. Ανθρώπινη πρωτεΐνη ομόλογη με την πρωτεΐνη CED-4 του *C. elegans*. Ο παράγοντας Apaf-1 συμμετέχει με την κασπάση-9 (Apaf-3) στην ενεργοποίηση της κασπάσης-3 που εξαρτάται από το κυτόχρωμα c και οδηγεί το κύτταρο σε απόπτωση.
(*Cell* 1997, 90:405-413)
- Apaf-2** Apoptosis protease activating factor-2. Είναι ο παράγοντας-2 ενεργοποίησης αποπτωτικών πρωτεασών, γνωστός και ως κυτόχρωμα c.
- Apaf-3** Apoptosis protease activating factor-3. Είναι ο παράγοντας-3 ενεργοποίησης αποπτωτικών πρωτεασών γνωστός και ως κασπάση-9 (πρωτεΐνη ομόλογη της πρωτεΐνης ced3 του *C. elegans*).
(*J Biol Chem* 1996, 271:16720-16724)
- APO-1** Υποδοχέας θανάτου γνωστός και ως Fas ή CD95, μέλος της οικογένειας TNF. Η σύνδεσή του με την πρωτεΐνη APO-1L/FasL/CD95L επάγει την απόπτωση.
(*J Biol Chem* 1992, 267:10709-10715)
- APO-1L** Προσδετικό μόριο του υποδοχέα Fas/Apo1/CD95, γνωστό και ως Fas ligand ή CD95 ligand. Η πρωτεΐνη Apo1L είναι μέλος της οικογένειας TNF και επάγει την απόπτωση συνδεδεμένη με την πρωτεΐνη Fas.
(*Cell* 1993, 75:1169-1178)
- APO-2** Υποδοχέας θανάτου μέλος της οικογένειας TNF.
(*Curr Biol* 1998, 8:113-116)
- APO-2L** Προσδετικό μόριο του υποδοχέα Apo2, γνωστός και ως TRAIL. Η πρωτεΐνη APO-2L είναι μέλος της οικογένειας TNF και επάγει την απόπτωση. (*J Biol Chem* 1996, 271:2687-12690)



- APO-3** Υποδοχέας θανάτου γνωστός και ως DR3, WSL-1, TRAMP or LARD, μέλος της οικογένειας TNF.
(*Curr Biol* 1996, 6:1669-1676)
- APO-3L** Προσδεδικό μόριο του υποδοχέα Apo-3. Η πρωτεΐνη Apo-3L είναι μία διαμεμβρανική τύπου II πρωτεΐνη με 249 αμινοξέα που επάγει την απόπτωση και την ενεργοποίηση του παράγοντα NF-κΒ.
(*Curr Biol* 1998 8:525-528)
- Apopain** Άλλη ονομασία για την κασπάση-3.
(*Nat Struct Biol* 1996, 3171:619-625)
- Apoptosis** Ελληνική λέξη που σημαίνει την πτώση των φύλλων από τα δέντρα. Περιγράφει τις κοινές μορφολογικές μεταβολές που χαρακτηρίζουν τη διαδικασία κυτταρικής αυτο-καταστροφής.
(*Br J Cancer*, 1972, 26:239-245)
- Apoptosome** Αποπτώσωμα. Είναι το σύμπλεγμα του οποίου η δημιουργία παίζει κυρίαρχο ρόλο στην ενεργοποίηση της απόπτωσης και αποτελεί στα θηλαστικά το ομόλογο του νηματοειδούς *C.elegans*. Αποτελείται από την Ced-4 πρωτεΐνη, τον παράγοντα Araf-1, το κυτόχρωμα c (που ελευθερώνεται από τα μιτοχόνδρια), τη δεοξυτριφωσφορική αδενοσίνη και την προ-κασπάση 9.
(*Science* 1998, 281: 1317-1322)
- ARC** Apoptosis Repressor with Caspase recruitment domain. Αναστολέας της απόπτωσης με «περιοχή επιστράτευσης των κασπασών», ο οποίος εκφράζεται αρχικά στους σκελετικούς μύες και στον καρδιακό ιστό και εμποδίζει την απόπτωση.
(*Proc Natl Acad Sci USA* 1998, 95:5156-5160)

B

- Bad** Bcl-xL/Bcl-2 associated death promoter. Υποκινητής θανάτου. Η πρωτεΐνη Bad συμμετέχει στο σχηματισμό ετεροδιμερών με τις πρωτεΐνες Bcl-xL και Bcl-2, παρεκτοπίζοντας την πρωτεΐνη Bax και επάγοντας μ'αυτόν τον τρόπο τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο.
(*Cell* 1995, 80:285-291)

- Bag** Bcl-2 associated athanogene 1. Πρωτεΐνη που συνδέεται με την πρωτεΐνη Bcl-2 και παρέχει προστασία από τον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο.
(*Cell* 1995, 80: 279-284)
- Bak** Bcl-2 antagonist/killer. Φονική πρωτεΐνη-ανταγωνιστής της Bcl-2. Είναι προ-αποπτωτικό μέλος της οικογένειας πρωτεϊνών Bcl-2.
(*Genomics* 1997, 44: 195-200)
- Bax** Bcl-2 associated x protein. Πρωτεΐνη x που συνδέεται με την πρωτεΐνη Bcl-2. Είναι προ-αποπτωτικό μέλος της οικογένειας πρωτεϊνών Bcl-2.
(*Cell* 1993, 74: 609-619)
- Bax α** Μία από τις ισομορφές της πρωτεΐνης Bax (21 kDa) που επάγει την απόπτωση.
- Bax β** Μία από τις ισομορφές της πρωτεΐνης Bax (24 kDa) που επάγει την απόπτωση.
- Bax γ** Μία από τις ισομορφές της πρωτεΐνης Bax.
- Bax Ω** Πρωτεΐνη που προκύπτει από εναλλακτικό μάτισμα του mRNA της πρωτεΐνης Bax.
(*J Biol Chem* 1998, 273:11930-11936)
- Bcl-2** B-cell lymphoma 2. Μέλος της οικογένειας πρωτεϊνών Bcl-2 που αναστέλλει την απόπτωση.
- Bcl-W** Μέλος της οικογένειας πρωτεϊνών Bcl-2 που προάγει την επιβίωση του κυττάρου.
(*Oncogene* 1996, 13:665-675)
- Bcl-x β** Μια ισομορφή της πρωτεΐνης Bcl-x που αναστέλλει την απόπτωση.
(*Biochem Biophys Res Commun* 1998, 248:147-152)
- Bcl-xL** Μακριά μορφή (long) της πρωτεΐνης Bcl-x. Γονίδιο που σχετίζεται με το γονίδιο bcl-2 και λειτουργεί ως κυρίαρχος ρυθμιστής του αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου. Η πρωτεΐνη Bcl-xL αναστέλλει τον κυτταρικό θάνατο.
(*Cell* 1993, 74:597-608)



- Bcl-xS** Βραχεία μορφή (short) της πρωτεΐνης Bcl-x, προ-αποπτωτική (οι περιοχές BH1 και BH2 εξαλείφονται κατά το εναλλακτικό μάτισμα (splicing)).
- Bfl-1** Ομόλογη πρωτεΐνη της Bcl-2, που απομονώθηκε από εμβρυϊκό ήπαρ ανθρώπου. Η Bfl-1, γνωστή και ως A1, είναι αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη.
(*Oncogene* 1995, 11:1693-1698)
- BH1** Bcl-2 homolog domain-1.
(*Adv Exp Med Biol* 1996, 406:99-112)
- BH2** Bcl-2 homolog domain-2.
(*Adv Exp Med Biol* 1996, 406:99-112)
- BH3** Bcl-2 homolog domain-3.
(*Adv Exp Med Biol* 1996, 406:99-112)
- BH4** Bcl-2 homolog domain-4.
(*Adv Exp Med Biol* 1996, 406:99-112)
- Bi-1** Bax inhibitor-1. Πρωτεΐνη που αναστέλλει την απόπτωση η οποία επάγεται από την πρωτεΐνη Bax.
(*Mol Cell* 1998, 1:337-346)
- Bid** BH-3 Interacting Domain Death agonist. Η πρωτεΐνη Bid επάγει, μέσω των ICE-like πρωτεασών, την απόπτωση.
(*Genes Dev* 1996, 10:2859-2869)
- Bik** Bcl-2 interacting killer. Η πρωτεΐνη Bik, γνωστή και ως BP4, Bip1 και NBK, διαθέτει περιοχή BH3 και είναι προ-αποπτωτική.
(*Oncogene* 1995, 11:1921-1928)
- Blm** Μέλος της οικογένειας πρωτεϊνών Bcl-2 που επάγει την απόπτωση.
(*EMBO J* 1998, 17:384-395)
- Bip-1** Άλλη ονομασία της πρωτεΐνης Bik.
- BIR motif** Επαναλαμβανόμενη αλληλουχία IAP baculovirus, που συμμετέχει στην αναστολή της απόπτωσης.
- Blk** Bik-like killer protein. Η πρωτεΐνη Blk, που βρίσκεται σε επίμυες, διαθέτει την περιοχή BH3, αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες Bcl-2 και Bcl-XL και είναι δυνητικός επαγωγέας αποπτωτικού θανάτου.
(*J Biol Chem* 1998, 273:7783-7786)



- Bok** Bcl-2 related ovarian killer. Η πρωτεΐνη Bok είναι προ-αποπτωτική πρωτεΐνη της οικογένειας Bcl-2 με περιορισμένη έκφραση σε αναπαραγωγικούς ιστούς, η οποία σχηματίζει ετεροδιμερή επιλεκτικά με αντι-αποπτωτικά μέλη της οικογένειας Bcl-2.
(*Proc Natl Acad Sci USA 1997, 94:12401-12406*)
- BP4** Άλλη ονομασία της πρωτεΐνης Bik.
- C**
- ciAP** Cellular inhibitor of apoptosis protein 1. Ένα από τα μόρια που προσελκύονται προς την κυταροπλασματική περιοχή του υποδοχέα TNFRII μέσω της σύνδεσής του με τους παράγοντες TRAF1 και TRAF2.
(*Proc Natl Acad Sci USA 1996, 93: 13973-13978*)
- ciAP2** Cellular inhibitor of apoptosis protein 2. Ένα από τα μόρια που προσελκύονται προς την κυταροπλασματική περιοχή του υποδοχέα TNFRII μέσω της σύνδεσής του με τους παράγοντες TRAF1 και TRAF2.
(*Proc Natl Acad Sci USA 1996, 93: 13973-13978*)
- CAD** A caspase-activated DNAase. Η πρωτεΐνη (DNAάση) CAD, που βρίσκεται σε επίμυες, είναι ομόλογη των πρωτεϊνών CPAN ή DFF40 του ανθρώπου και ενεργοποιείται από τις κασπάσες.
(*Nature 1998, 391:43-50*)
- Calpain** Είναι ενδοκυττάρια κυστεϊνική πρωτεάση που συντίθεται ως ανενεργό προένζυμο και ενεργοποιείται με αυτοκατάλυση σε παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων Ca^{++} . Μέχρι σήμερα είναι άγνωστος ο ακριβής ρόλος της κατά τη διάρκεια της απόπτωσης.
(*Cell Death Differentiation 1995, 2:195*)
- CAML** Calcium-modulator and cyclophilin ligand. Η πρωτεΐνη CAML επάγει την ενεργοποίηση του παράγοντα NF-AT και συνδέεται στο μόριο TACI, το οποίο είναι μέλος της υπεροικογένειας υποδοχέων του TNF.
(*Nature 1994, 371:355-358, Science 1997, 278:138-141*)



- CAP-1** CD40-associated protein-1. Η πρωτεΐνη CAP-1 συνδέεται ειδικά στην κυτταροπλασματική περιοχή του υποδοχέα CD40 και περιέχει μια καρβοξυτελική περιοχή με ισχυρή ομολογία ως προς την αλληλουχία αμινοξέων με τους παράγοντες TRAF1 και TRAF2.
(*FEBS Lett* 1995, 358:113-118)
- CARD** Caspase activation and recruitment domain. Περιοχή επιστράτευσης και ενεργοποίηση κασπασών.
- CARDIAK** CARD-containing interleukin-1 β converting enzyme (ICE) associated kinase. Η κινάση CARDIAK μπορεί να ενέχεται στην οδό σημάτων NF- κ B/JNK και στη δημιουργία της προφλεγμονώδους κυταροκίνης IL-1 β μέσω ενεργοποίησης της κασπάσης-1.
(*Curr Biol* 1998, 8:885-888)
- CAS** Cellular apoptosis susceptibility protein. Παίζει ρόλο στην απόπτωση που επάγεται από τοξίνες ή τον παράγοντα TNF- α .
(*Proc Natl Acad Sci USA* 1995, 92:10427-10431)
- Caspase** CysteinyI aspartic acid-protease. Η κασπάση είναι η αντίστοιχη στον άνθρωπο ονομασία της πρωτεΐνης ICE/CED3 του *C.elegans*.
(*Cell* 1996, 87:171)
- Caspase-1** CysteinyI aspartic acid-protease-1. Η κασπάση-1 είναι γνωστή και ως ICE και είναι ομόλογη της πρωτεΐνης CED3 του νηματοειδούς *C.elegans*. (*Nature* 1992, 356:768-774)
- Caspase-2** CysteinyI aspartic acid-protease-2. Η κασπάση-2 είναι γνωστή και ως Ich-1 και Nedd2.
(*Cell* 1994, 78:739-750)
- Caspase-3** CysteinyI aspartic acid-protease-3. Η κασπάση-3 είναι γνωστή και ως CPP32, Yama, Apopain, SCA-1 και LICE.
(*J Biol Chem* 1994, 269:30761-30764)
- Caspase-4** CysteinyI aspartic acid-protease-4. Η κασπάση-4 είναι γνωστή και ως ICErel-II, TX και ICH-2.
(*EMBO J* 1995, 14:1914-1922)
- Caspase-5** CysteinyI aspartic acid-protease-5. Η κασπάση-5 είναι γνωστή και ως ICErel-III και TY.
(*J Biol Chem* 1995, 270:15870-15876)

- Caspase-6** Cysteiny l aspartic acid-protease-6. Η κασπάση-6 είναι γνωστή και ως Mch-2. (*Cancer Res* 1995, 55:2737-2742)
- Caspase-7** Cysteiny l aspartic acid-protease-7. Η κασπάση-7 είναι γνωστή και ως Mch-3, ICE-LAP-3 και CMH-1. (*Cancer Res* 1995, 55:6045-6052)
- Caspase-8** Cysteiny l aspartic acid-protease-8. Η κασπάση-8 είναι γνωστή και ως FLICE, Mach-1 και Mch5. (*Cell* 1996, 85:817-827)
- Caspase-9** Cysteiny l aspartic acid-protease-9. Η κασπάση-9 είναι γνωστή και ως ICE-LAP-6, Mch6 και Apaf-3. (*J Biol Chem* 1996, 271:16720-16724)
- Caspase-10** Cysteiny l aspartic acid-protease-10. Η κασπάση-10 είναι γνωστή και ως FLICE-2 και Mch4. (*J Biol Chem* 1997, 272:6578-6583)
- Caspase-11** Cysteiny l aspartic acid-protease-11. Κασπάση-11. (*FEBS Lett* 1997, 403:61-69)
- Caspase-12** Cysteiny l aspartic acid-protease-12. Κασπάση-12. (*FEBS Lett* 1997, 403:61-69)
- Caspase-13** Cysteiny l aspartic acid-protease-13. Η κασπάση-13, που είναι γνωστή και ως ERICE, έχει την ικανότητα ενεργοποίησης της πρωτεΐνης FLICE. (*J Biol Chem* 1998, 273:15702-15707)
- Casper** Επαγωγέας της απόπτωσης γνωστός ως FLIP, ο οποίος σχετίζεται με το μόριο FADD και τις κασπάσες. (*Immunity* 1997, 6:751-763)
- CD40** Μέλος της υπερικογένειας υποδοχέων του TNF που ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό των Β-λεμφοκυττάρων, την παραγόμενη τάξη ανοσοσφαιρινών και την απόπτωση. (*FEBS Lett* 1995, 352:113-118)
- CD40L** CD40 ligand. Το προσδετικό μόριο CD40L είναι γνωστός και ως CD154 και TRAP. (*Eur J Immunol* 1992, 22:3191-3194)
- CD95** Υποδοχέας θανάτου, μέλος της οικογένειας υποδοχέων του TNF, γνωστός και ως Fas ή Apo1. (*Science* 1989, 245:301)



- CD95L** Προσδετικό μόριο του υποδοχέα CD95, γνωστός και ως FasL ή Apo1L.
(*Science* 1995, 267:1449)
- CED-1** *Caenorhabditis Elegans* Cell Death Gene. Γονίδιο κυτταρικού θανάτου του νηματοειδούς *C.elegans*.
(*Brain Pathol* 1996, 6:411-425)
- CED-3** *Caenorhabditis Elegans* Cell Death Gene. Γονίδιο κυτταρικού θανάτου του νηματοειδούς *C.elegans*. Η πρωτεΐνη CED-3 επάγει την απόπτωση και είναι ομόλογη της κασπάσης-9/Apaf-3 και της κασπάσης-3.
(*J Biol Chem* 1994, 269:30761-30764)
- CED-4** *Caenorhabditis Elegans* Cell Death Gene. Γονίδιο κυτταρικού θανάτου του νηματοειδούς *C.elegans*. Η πρωτεΐνη CED-4 είναι ενεργοποιητής του κυτταρικού θανάτου και ομόλογη του παράγοντα Apaf-1.
(*Cell* 1997, 90:405-413)
- CED-4L** Η μακρύτερη μορφή της πρωτεΐνης CED-4 που αναστέλλει την απόπτωση.
- CED-4S** Η βραχεία μορφή της CED4 που επάγει την απόπτωση.
(*Brain Pathol* 1996, 6:411-425)
- CED-9** *Caenorhabditis Elegans* Cell Death Gene. Γονίδιο κυτταρικού θανάτου του νηματοειδούς *C.elegans*. Η πρωτεΐνη CED-9 ανήκει στην οικογένεια Bcl-2 και είναι γνωστή και ως πρωτεΐνη -9 του κυτταρικού θανάτου.
(*Cell* 1994, 76:665-676)
- Ceramide** Είναι σύμπλοκο λιπίδιο του κυτταροπλάσματος και της πλασματικής μεμβράνης, που παράγεται από τη διάσπαση της σφιγγομυελίνης από σφιγγομυελινάσες, διαδικασία που ενισχύεται κατά την TNF και Fas-επαγόμενη απόπτωση. Φαίνεται ότι το λιπίδιο αυτό δρα ως δευτερεύων αγγελιοφόρος, που μπορεί να επάγει την απόπτωση με την ενεργοποίηση κάποιων κινασών.

- CIDE** Νέα οικογένεια ενεργοποιητών του κυτταρικού θανάτου με ομολογία ως προς την υπομονάδα 45kDa του παράγοντα κατάτμησης του DNA DFF.
(*EMBO J* 1998, 17:2526-2533)
- CLARP** Μια πρωτεΐνη με περιοχή «death effector domain» που αλληλεπιδρά με την κασπάση-8 και ρυθμίζει την απόπτωση.
(*Proc Natl Acad Sci USA* 1997, 94:10717-10722)
- CPAN** Caspase Activated Nuclease. Νουκλεάση που ενεργοποιείται από τις κασπάσες. Η CPAN είναι επίσης γνωστή ως DFF40, μια υπομονάδα του DFF, που προκαλεί κατάτμηση του DNA. Η CPAN είναι ομόλογη της πρωτεΐνης CAD των επιμύων. (*Curr Biol* 1998, 8:537-540)
- CPP32** Επίσης γνωστή ως κασπάση-3.
(*Biol Chem* 1994, 269:30761-30764)
- CRADD** Caspase and RIP adaptor with death domain. Το μόριο CRADD συμμετέχει στη μετάδοση αποπτωτικών σημάτων μετά από διέγερση του υποδοχέα TNF-R1.
(*Cancer Res* 1997, 57:615-619)
- CrmA** Cytokine response modifier A. Η πρωτεΐνη CrmA είναι ιικό προϊόν που αναστέλλει την απόπτωση.
(*Nature* 1993, 364:806)
- Cytochrome c** Ένας μεταφορέας ηλεκτρονίων στην κυτταρική αναπνευστική αλυσίδα, ο οποίος παίζει σημαντικό ρόλο στην απόπτωση.
(*Cell* 1996, 86:147)

D

- D4-GDI** GDP-Dissociation Inhibitor for Ras-related Rho family GTPase. Η D4-GDI είναι υπόστρωμα για την κασπάση-3.
(*Eur J Immunol* 1998, 28:296-304)
- DAP kinase** Death associated protein kinase. Η DAP κινάση είναι διαμεσολαβητής στην επαγωγή απόπτωσης μέσω IFN- γ .
(*Mol Cell Biol* 1998, 8:1642-1651)



- DAP-1** Death associated protein-1. Η DAP-1 είναι μια πρωτεΐνη 15kDa διαμεσολαβητής στην επαγωγή απόπτωσης μέσω IFN-γ.
(*Genes Dev* 1995, 9:15-30)
- DAP-3** Death associated protein-3. Η DAP-3 είναι διαμεσολαβητής στην επαγωγή απόπτωσης μέσω IFN-γ.
(*J Biol Chem* 1995, 270:27932-27936)
- DAP-5** Death associated protein-5. Η DAP-5 είναι διαμεσολαβητής στην επαγωγή απόπτωσης μέσω IFN-γ.
(*Mol Cell Biol* 1997, 17:1615-1625)
- Daxx** Η Daxx είναι πρωτεΐνη που συνδέεται στον υποδοχέα Fas. Η υπερέκφρασή της ενισχύει την Fas-επαγόμενη απόπτωση.
(*Cell* 1997, 89:1067-1076)
- DcR-1** Decoy receptor-1. Ο DcR-1 είναι υποδοχέας του TRAIL που αναστέλλει την μετάδοση αποπτωτικών σημάτων μέσω αυτού του μορίου. Ο DcR-1 είναι επίσης γνωστός ως TRID, LIT και TRAIL-R3.
(*Science* 1997, 277:815-818)
- DcR-2** Decoy receptor-2. Ο DcR-2 είναι υποδοχέας του TRAIL που περιέχει μια μη λειτουργική περιοχή θανάτου και λειτουργεί ως ανασταλτικός υποδοχέας του TRAIL. Ο DcR-2 είναι επίσης γνωστός και ως TRAIL-R4.
(*Curr Biol* 1997, 7:1003-1006)
- DD** Death Domain. Περιοχή θανάτου.
(*Cell* 1996, 85:817)
- Death Effector Filaments**
Κυτταροπλασματικές δομές που προσελκύουν («επιστρατεύουν») τις κασπάσες και πυροδοτούν την απόπτωση.
(*J Cell Biol* 1998, 141:1243-1253)
- DED** Death Effector Domain.
(*J Biol Chem* 1996, 271:4961)
- DEV** Υπολείμματα αμινοξέων (Asp-Glu-Val-Asp) της περιοχής διάσπασης της κασπάσης-3 στο ένζυμο πολυ-ADP-ριβοζο-πολυμεράση.

- DEVD-AFC** Ένα τετραπεπτίδιο Asp-Glu-Val-Asp συζευγμένο στην 7-αμινο-4-τριφλουορομεθυλ-κουμαρίνη, φθορισμομετρικό υπόστρωμα για εξέταση της ενζυμικής δραστηριότητας των κασπάσων.
- DEVD-CHO** Asp-Glu-Val-Asp-αλδεΐδη. Η DEVD-CHO είναι συνθετικός αναστολέας της κασπάσης-3.
- DEVD-FMK** Asp-Glu-Val-Asp-O-μεθυλ-φλουορομεθυλκετόνη. Η DEVD-FMK είναι συνθετικός αναστολέας της κασπάσης-3.
- DEVD-pNA** Συνθετικό τετραπεπτίδιο (Asp-Glu-Val-Asp) συζευγμένο στην παρα-νιτροανιλίνη (pNA), ένα χρωματομετρικό υπόστρωμα για εξέταση της ενζυμικής δραστηριότητας των κασπάσων.
- DEVD-AMC** Asp-Glu-Val-Asp- και Αμινο-4-μεθυλ-κουμαρίνη. Η DEVD-AMC είναι ένα φθορίζον υπόστρωμα της κασπάσης-3.
- DFF** DNA Fragmentation Factor. Ο παράγοντας κατάτμησης του DNA DFF είναι ένα ετεροδιμερές της πρωτεΐνης DFF45 (45kDa) με την πρωτεΐνη DFF40 (40kDa).
- DFF40** Υπομονάδα του παράγοντα DFF με MB 40 kDa. Ο DFF40 είναι ενεργό συστατικό του DFF και πυροδοτεί την κατάτμηση του DNA κατά τη διάρκεια της απόπτωσης.
(*Proc Natl Acad Sci USA 1998, 95:8561-8466*)
- DFF45** Υπομονάδα του παράγοντα DFF με MB 45 kDa. Ο DFF45 είναι γνωστός και ως ICAD. Κατά τη διάρκεια της απόπτωσης, η κασπάση-3 διασπά τον DFF45, ο οποίος αποσυνδέεται στη συνέχεια από τον DFF40.
(*Cell 1997, 89:175-184*)
- DISC** Death inducing signaling complex. Σηματοδοτικό σύμπλεγμα επαγωγής θανάτου. Ο όρος χρησιμοποιήθηκε πρωταρχικά για την περιγραφή του συμπλέγματος του υποδοχέα Fas/CD95 και των συνδεδεμένων με αυτόν πρωτεϊνών που πυροδοτούν την απόπτωση. Τώρα πλέον αναφέρεται στο σύμπλεγμα πρωτεϊνών επαγωγής της απόπτωσης και όχι σε εξειδικευμένη δομή μέσα στο κύτταρο.
(*Cell 1996, 85:817*)



- DNA-PK** DNA-dependent protein kinase. Η DNA-εξαρτώμενη πρωτεϊνική κινάση DNA-PK συμμετέχει στην επιδιόρθωση των διπλών σπασιμάτων της έλικας του DNA.
- DNA-PKcs** DNA-dependent protein kinase catalytic site. Η DNA-PKcs είναι μια καταλυτική περιοχή της κινάσης DNA-PK.
(*J Exp Med* 1996, 183:1957)
- DP5** Neuronal death protein. Πρωτεΐνη κυτταρικού θανάτου των νευρώνων. Το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη DP5 είναι γονίδιο επαγωγής του κυτταρικού θανάτου.
(*J Biol Chem* 1997, 272:18842-18848, *Brain Res Mol Brain Res* 1998, 54:316-320)
- DR-3** Death Receptor-3. Ο υποδοχέας θανάτου-3 είναι μέλος της οικογένειας υποδοχέων του TNF, γνωστός και ως Apo-3, WSL-1, TRAIL ή LARD.
(*Science* 1996, 274:990-92)
- DR-4** Death Receptor-4. Ένας από τους υποδοχείς του TRAIL, που είναι γνωστός και ως TRAIL-R1.
(*Science* 1997, 276:111-113)
- DR-5** Death Receptor-5. Ένας από τους υποδοχείς του TRAIL, που είναι γνωστός και ως TRAIL-R2.
(*Immunity* 1997, 7:821-830)

E

- ERICE** A FLICE-activatable caspase. Κασπάση ενεργοποιητής της FLICE, γνωστή και ως κασπάση-13.
(*J Biol Chem* 1998, 273:15702-15707)

Endothelial

- IL-8** Ιντερλευκίνη-8. Η IL-8, που είναι χημειοτακτικός παράγοντας που προσελκύει τα ουδετερόφιλα, μπορεί, επίσης, να επάγει την απόπτωση.
(*Biochem Biophys Res Comm* 1998, 243:407-411)



F

- FADD** Fas-associated Death Domain. Το μόριο-προσαρμοστής FADD, γνωστό και ως MORT-1, προσελκύει την κασπάση-8 ή την κασπάση-10 να συνδεθούν στους ενεργοποιημένους υποδοχείς Fas ή TNFR-1.
(*Cell* 1995, 81:505-512)
- FAF-1** Fas-associated Factor-1. Ο παράγοντας FAF-1 που συνδέεται στον υποδοχέα Fas μπορεί να επάγει την απόπτωση.
- FAP-1** Fas-associated phosphatase-1. Η FAP-1 είναι φωσφατάση πρωτεΐνης τυροσίνης που συνδέεται με τον υποδοχέα Fas.
(*Science* 1995, 268:411-415)
- Fas** Ο υποδοχέας θανάτου Fas, που είναι γνωστός και ως CD95 ή APO-1, είναι μέλος της οικογένειας υποδοχέων του TNF και επάγει την απόπτωση.
(*Cell* 1991, 66:233-243)
- FasL** Fas Ligand. Ο FasL, γνωστός και ως CD95L ή APO-1L, είναι το προσδετικό μόριο του υποδοχέα Fas.
(*Cell* 1993, 75:1169-1178)
- FLAME-1** FADD-like anti-apoptotic molecule. Το μόριο FLAME-1 είναι αντι-αποπτωτικό μόριο, αναστολέας της Fas/TNF-R1-επαγόμενης απόπτωσης, γνωστό και ως FLIP.
(*J Biol Chem* 1997, 272:18542-18545)
- FLASH** FLICE-Associated Huge protein. Η πρωτεΐνη FLASH είναι ομόλογη της πρωτεΐνης CED-4 του *C.elegans* και σχετίζεται με την ενεργοποίηση της κασπάσης-8 κατά τη Fas-επαγόμενη απόπτωση.
(*Nature* 1999, 398: 777-785)
- FLICE** FADD-like ICE. Ο παράγοντας FLICE είναι γνωστός και ως κασπάση-8.
(*Cell* 1996, 85:817-827)
- FLICE-2** FADD-like ICE-2. Ο παράγοντας FLICE-2 είναι γνωστός και ως κασπάση-10.
(*J Biol Chem* 1997, 272:6578-6583)



FLIP FLICE inhibitory protein. Η πρωτεΐνη FLIP, η οποία ρυθμίζει την απόπτωση, είναι πρωτεΐνη-αναστολέας της κασπάσης-8 (FLICE). Είναι γνωστή και ως I-FLICE, CASH, CLARP, FLAME-1, Casper ή MRIT.
(*Nature* 1997, 388:190-195)

G

GITR Glucocorticoid-induced TNF receptor family related gene. Ο παράγοντας GITR είναι μέλος της οικογένειας υποδοχέων του TNF, ο οποίος αναστέλλει την απόπτωση που επάγεται από τον T-κυτταρικό υποδοχέα (TCR).
(*Proc Natl Acad Sci USA* 1997, 94:6216-6221)

Granzyme A Πρωτεάση σερίνης που εντοπίζεται στα κοκκία των κυτταροτοξικών T-κυτάρων και των κυτάρων-φυσικών φονέων (NK cells) και συμμετέχει στην επαγωγή της απόπτωσης σε κύτταρα-στόχους.
(*J Immunol* 1988, 141:3471-3477)

Granzyme B Πρωτεάση σερίνης που απελευθερώνεται από τα κοκκία των κυτταροτοξικών T-κυτάρων και των κυτάρων-φυσικών φονέων (NK cells) και συμμετέχει στην επαγωγή της απόπτωσης σε κύτταρα-στόχους. Είναι γνωστή και ως CTL proteinase-1, fragmentin-2 και RNKP-1. Έχει την ίδια ειδικότητα υποστρώματος με τις κασπάσες και θεωρείται ότι επάγει την απόπτωση είτε μιμούμενη τη δράση των κασπασών είτε με την ενεργοποίηση αυτών.
(*J Immunol* 1988, 141:3471-3477)

H

Hdaxx Human homologue to murine Daxx. Η πρωτεΐνη Hdaxx του ανθρώπου, που είναι ομόλογη της πρωτεΐνης Daxx των ποντικών, συνδέεται στην περιοχή θανάτου DD του υποδοχέα Fas/CD95.
(*J Cell Sci* 1998, 111:2029-2041)

- HIAP1** Human inhibitor of apoptosis protein 1. Η πρωτεΐνη-αναστολέας της απόπτωσης HIAP1, γνωστή και ως c-IAP2, είναι μέλος της οικογένειας πρωτεϊνών IAP και αναστέλλει την απόπτωση.
(*Cell* 1995, 83:1243-1252)
- HILP** Human IAP-like protein. Η πρωτεΐνη HILP, γνωστή και ως XIAP ρυθμίζει τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο καθοδικά της Bcl-xL και του κυτοχρώματος c.
(*Mol Cell Biol* 1998, 18:608-615)
- HrK** A product of harakiri. Η πρωτεΐνη HrK είναι μέλος της οικογένειας Bcl-2 και ενεργοποιεί την απόπτωση.
(*EMBO J* 1997, 16:1686-1694)
- I**
- IAPs** Inhibitor of apoptosis proteins. Οικογένεια πρωτεϊνών-αναστολέων της απόπτωσης, στην οποία ανήκουν οι πρωτεΐνες NAIP, c-IAP1, c-IAP2, X-IAP και survivin. (*J Virol* 1993, 67:2168-2174)
- IB** Inhibitor of NF-κB. Αναστολέας του παράγοντα NF-κB.
- ICAD** Inhibitor of caspase-activated Dnase. Η πρωτεΐνη ICAD των ποντικών (αναστολέας της DNάσης που ενεργοποιείται από κασπάσες) είναι ομόλογη της ανθρώπινης πρωτεΐνης DFF45.
(*Nature* 1998, 391:43-50)
- ICE** Interleukin-1β converting enzyme. Το μετατρεπτικό ένζυμο της ιντερλευκίνης 1β (ICE) είναι γνωστό και ως κασπάση-1.
(*Science* 1992, 256:97-100)
- ICE-LAP3** ICE-like apoptotic protease 3. Η αποπτωτική πρωτεάση-3 ICE-LAP3 είναι γνωστή και ως κασπάση-7.
(*J Biol Chem* 1996, 271:1621-1625)
- ICE-LAP6** ICE-like apoptotic protease 6. Η αποπτωτική πρωτεάση-6 ICE-LAP6 είναι γνωστή και ως κασπάση-9.
(*J Biol Chem* 1996, 271:16720-16724)
- ICErel II** ICE/CED-3-related protease. Η πρωτεάση ICErel II είναι γνωστή και ως κασπάση-4.
(*J Biol Chem* 1995, 270: 15870-15876)



- ICErel III** ICE/CED-3-related protease. Η πρωτεάση ICErel III είναι γνωστή και ως κασπάση-5.
(*J Biol Chem* 1995, 270: 15870-15876)
- Ich-1** ICE and CED-3 homologue-1. Ομόλογη πρωτεΐνη των ICE και CED-3, γνωστή και ως κασπάση-2.
(*Cell* 1994, 78:739-750)
- Ich-1L** Προέρχεται από εναλλακτικό μάτισμα της Ich-1. Η πρωτεΐνη Ich-1L αποτελείται από 435 αμινοξέα και επάγει την απόπτωση.
- Ich-1s** Προέρχεται από εναλλακτικό μάτισμα της Ich-1. Η πρωτεΐνη Ich-1s αποτελείται από 312 αμινοξέα και αναστέλλει την απόπτωση.
- Ich-2** ICE and CED-3 homologue-2. Ομόλογη πρωτεΐνη των ICE και CED-3, γνωστή και ως κασπάση-4.
(*J Biol Chem* 1995, 270:15250-15256)
- IETD** Ile-Glu-Thr-Asp. Η αλληλουχία των αμινοξέων αντιστοιχεί σε μια από τις περιοχές διάσπασης της κασπάσης-8 (αμινοξέα 172-175) στην ανενεργό πρόδρομη κασπάση-3.
- IETD-AFC** Ένα τετραπεπτίδιο, Ile-Glu-Thr-Asp, συζευγμένο στην 7-αμινο-4-τριφλουορομεθυλ-κουμαρίνη, ένα φθορισμομετρικό υπόστρωμα για εξέταση (assay) της ενζυμικής δραστηριότητας της κασπάσης-8 like.
- IETD-AMC** Ile-Glu-Thr-Asp-7-αμινο-4-μεθυλ κουμαρίνη. Το IETD-AMC είναι ένα φθορίζον υπόστρωμα για την κασπάση-8.
- IETD-CHO** Ile-Glu-Thr-Asp-αλδεϋδη. Το IETD-CHO είναι συνθετικός αναστολέας της κασπάσης-8.
- IETD-FMK** Ile-Glu-Thr-Asp-O-μεθυλ-φθοριομεθυλκετόνη. Το IETD-FMK είναι συνθετικός αναστολέας της κασπάσης-8 like.
- IETD-pNA** Συνθετικό τετραπεπτίδιο (Ile-Glu-Thr-Asp), συζευγμένο στην παρανιτροανιλίνη (pNA). Είναι χρωματομετρικό υπόστρωμα για την εξέταση δραστηριότητας του ενζύμου caspase-8 like.
- IEX-1L** Αναστολέας της απόπτωσης. Συμμετέχει στην επιβίωση του κυττάρου στην οποία μεσολαβεί ο παράγοντας NF-κΒ.
(*Science* 1998, 281:998-1001)

- I-FLICE** Inhibitor of FLICE. Ο αναστολέας της πρωτεΐνης FLICE, I-FLICE, είναι γνωστός και ως CASH, CLARP, FLIP και FLAME-1.
(*J Biol Chem* 1997, 272:17255-17257)
- IGIF** Interferon-gamma-inducing factor. Ο παράγοντας επαγωγής της IFN-γ, γνωστός και ως IL-18, ενισχύει την κυτταροτοξικότητα στην οποία μεσολαβεί ο FasL.
(*Nature* 1995, 378:88-91)
- IKK** IκB κινάση.
(*Cell* 1997, 91:243-252)
- ITA** Inhibitor of T-cell apoptosis. Ο αναστολέας της απόπτωσης των T-κυττάρων ITA είναι μέλος της οικογένειας πρωτεϊνών IAP.
(*DNA Cell Biol* 1996, 15:981-988)
- J**
- JNK** c-Jun N-terminal kinase. Η κινάση JNK ανήκει στην ευρεία οικογένεια της MAP κινάσης. Πρόσφατα, έγινε φανερό ότι η αλληλεπίδραση μεταξύ της πρωτεΐνης Daxx και του υποδοχέα CD95 μπορεί να οδηγήσει σε απόπτωση μέσω της οδού JNK με τρόπο που ρυθμίζεται από την πρωτεΐνη Bcl-2. Ο υποδοχέας TNF-R1 μπορεί, επίσης, να ενεργοποιήσει την οδό JNK μέσω της πρωτεΐνης TRAF2 χωρίς όμως να οδηγεί σε απόπτωση.
(*Genes Dev* 1993, 7(11):2135)
- K**
- Ku p70** Υπομονάδα (70 kDa) του αυτοαντιγόνου Ku. Η πρωτεΐνη Ku p70 είναι συστατικό της ενεργοποιημένης DNA-PK.
- Ku p80** Υπομονάδα (80 kDa) του αυτοαντιγόνου Ku. Η πρωτεΐνη Ku p80 είναι συστατικό της ενεργοποιημένης DNA-PK.



L

- Lamin A** Δομική πρωτεΐνη του πυρηνικού φακέλου που υποβοηθά στη διατήρηση της μορφής του πυρήνα.
(*Proc Natl Acad Sci USA* 1986, 83:6450-6454)
- Lamin B** Δομική πρωτεΐνη του πυρηνικού φακέλου που υποβοηθά στη διατήρηση της μορφής του πυρήνα.
- LARD** Lymphocyte-associated receptor of death. Ο υποδοχέας θανάτου LARD, γνωστός και ως DR3, WSL-1, TRAMP και APO-3, είναι υποδοχέας του παράγοντα Apo-3L.
(*Proc Natl Acad Sci USA* 1997, 94:4615-4619)
- LBR** Chromatin and Lamin Binding Protein. Πρωτεΐνη που συνδέεται στη χρωματίνη και τις λαμίνες της εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης και υφίσταται πρωτεόλυση κατά τα όψιμα στάδια της απόπτωσης.
(*J Cell Sci* 1998, 111:1441-1451)
- LIT** Lymphocyte inhibitor of TRAIL. Ο λεμφοκυτταρικός αναστολέας του υποδοχέα TRAIL (LIT) είναι γνωστός και ως TRID, DcR-1 και TRAIL-R3.
(*J Immunol* 1998, 160:3-6)
- LKLF** Lung Kruppel-like factor. Ο παράγοντας LKLF είναι ένας μεταγραφικός ρυθμιστής της φάσης εφησυχασμού και της επιβίωσης των μονοθετικών T κυττάρων.
(*Science* 1997, 277:1986-1990)
- Lymphotoxin** Λεμφοτοξίνη, γνωστή και ως TNF-β.
(*Cell* 1993, 72:847-856).

M

- MACH** MORT-associated CED-3 Homologue. Ομόλογη πρωτεΐνη της CED-3 στα θηλαστικά, γνωστή και ως κασπάση-8.
(*Cell* 1996, 85:803-815)

- MADD** Mitogen activated kinase activating death domain. Το μόριο MADD αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα TNF-R1 και ενεργοποιεί την δραστικότητα της MAP κινάσης.
(*J Biol Chem* 1997, 272:12069-12075)
- Mch2** Mammalian CED-3 homologue 2. Ομόλογη πρωτεΐνη της CED-3 στα θηλαστικά, γνωστή και ως κασπάση-6.
(*Cancer Res* 1995, 55:2737-2742)
- Mch3** Mammalian CED-3 homologue 3. Ομόλογη πρωτεΐνη της CED-3 στα θηλαστικά, γνωστή και ως κασπάση-7.
(*Cancer Res* 1995, 55:6045-6052)
- Mch4** Mammalian CED-3 homologue 4. Ομόλογη πρωτεΐνη της CED-3 στα θηλαστικά, γνωστή και ως κασπάση-10.
(*Proc Natl Acad Sci USA* 1996, 93:7464-7469)
- Mch5** Mammalian CED-3 homologue 5. Ομόλογη πρωτεΐνη της CED-3 στα θηλαστικά, γνωστή και ως κασπάση-8.
(*Proc Natl Acad Sci USA* 1996, 93:14486-14481)
- Mch6** Mammalian CED-3 homologue 6. Ομόλογη πρωτεΐνη της CED-3 στα θηλαστικά, περιέχει μια περιοχή CARD και είναι γνωστή και ως κασπάση-9.
(*J Biol Chem* 1996, 271:16720-16724)
- Mcl-1** Myeloid cell leukemia 1. Μέλος της οικογένειας πρωτεϊνών Bcl-2, η Mcl-1 είναι μιτοχονδριακή πρωτεΐνη που ενισχύει τη βιωσιμότητα του κυττάρου κάτω από αποπτωτικές συνθήκες.
- MIAP** Mouse inhibitor of apoptosis protein. Η πρωτεΐνη-αναστολέας της απόπτωσης MIAP είναι στους επίμυες το ομόλογο της ανθρώπινης πρωτεΐνης XIAP.
(*Cell* 1995, 83:1243-1252)
- MORT** Μόριο-προσαρμοστής που περιέχει περιοχή θανάτου, γνωστός και ως FADD.
(*J Biol Chem* 1995, 270:7795-7798)
- MRIT** Mach-Related Inducer of Toxicity. Η πρωτεΐνη MRIT αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες Bcl-xL και FLICE και είναι, επίσης, γνωστή ως FLIP, CASH, FLAME-1, CLARP, Casper και I-FLICE.
(*Proc Natl Acad Sci USA* 1997, 94:11333-11338)



Mtd Μέλος της οικογένειας πρωτεϊνών Bcl-2 που διαθέτει τις περιοχές BH1, BH2, BH3 και BH4. Ενεργοποιεί την απόπτωση σε απουσία ετεροδιμερών με τις πρωτεΐνες Bcl-2 και Bcl-xL.
(*J Biol Chem* 1998, 273:8705-8710)

N

NAIP Neuronal apoptosis inhibitory protein. Πρωτεΐνη-αναστολέας της απόπτωσης νευρώνων, μέλος της οικογένειας IAP.
(*Cell* 1995, 80:167-178)

NBK Natural Born Killer. Η πρωτεΐνη NBK επάγει την απόπτωση και είναι γνωστή και ως Bik, BP4 και Bip1.
(*Mol Cell Biol* 1996, 16:5857-5864)

Nedd2 Neural Precursor Cell Expressed, Developmentally Down-Regulated 2. Είναι το γονίδιο που κωδικοποιεί την κασπάση-2 στους επίμυες.

NF-κB Nuclear factor of immunoglobulin k locus in B cells. Ο παράγοντας NF-κB ενεργοποιεί την μεταγραφή γονιδίων σε πολλούς ιστούς.

NGF Nerve Growth Factor. Ο NGF είναι αυξητικός παράγοντας των νευρώνων.

NGFR Nerve Growth Factor Receptor. Ο NGFR είναι υποδοχέας του νευροτροφικού παράγοντα NGF.
(*Cell* 1986, 47:545-554)

O

OPG Osteoprotegerin. Είναι ένας υποδοχέας του TRAIL.
(*J Biol Chem* 1998, 273:14363-14367)

OX-40 Μέλος της οικογένειας του αυξητικού παράγοντα των νευρώνων NGF, που εκφράζεται σε ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα και είναι γνωστός και ως CD 134.

P

- P53** Η πρωτεΐνη P53 είναι προϊόν του ομώνυμου ογκοκατασταλτικού γονιδίου και επάγει την απόπτωση.
- PARP** Poly (ADP ribose) polymerase. Ένζυμο επιδιόρθωσης του DNA, το οποίο διασπάται από τις κασπάσες κατά την αποπτωτική διαδικασία.
- PCD** Programmed Cell Death. Προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος. Άλλη ονομασία της απόπτωσης.
- Perforin** Πρωτεΐνη που εκκρίνεται κυρίως από κυτταροτοξικά Τ-κύτταρα ή NK κύτταρα -φυσικούς φονείς και δημιουργεί πόρο στην κυτταρική μεμβράνη διευκολύνοντας την μεταφορά της πρωτεάσης σερίνης granzyme στα κύτταρα-στόχους.
(*J Immunol* 1989, 143:4267-4274)
- PFP** Pore-Forming Protein. Άλλη ονομασία της πρωτεΐνης perforin.
(*Immunogenetics* 1989, 30:452-457)
- PI** Propidium Iodide. Το ιωδιούχο προπίδιο είναι χρωστική του DNA για τον αποκλεισμό των νεκρωτικών κυττάρων. Σε συνδυασμό με αννεξίνη-V FITC, το ιωδιούχο προπίδιο διακρίνει τα πρώιμα αποπτωτικά από τα όψιμα αποπτωτικά ή τα νεκρωτικά κύτταρα.
- PS** Phosphatidylserine. Η φωσφατιδυλοσερίνη είναι ένα λιπίδιο που μετατοπίζεται στην κυτταρική επιφάνεια όταν τα κύτταρα εισέρχονται στην αποπτωτική διαδικασία και μπορεί να ανιχνευτεί με τη βοήθεια της αννεξίνης-V.

R

- RAIDD** RIP-associated Ich-1/CED homologous protein with death domain. Η πρωτεΐνη RAIDD είναι ένα μόριο-προσαρμοστής με περιοχή θανάτου DD.
(*Nature* 1997, 385:86-89)
- RANK** Receptor Activates NF-κB. Η πρωτεΐνη RANK αλληλεπιδρά με παράγοντες που συνδέονται στον υποδοχέα του TNF, τον



παράγοντα NF-κB και την κινάση JNK (*J Biol Chem* 1998, 273:20551-20555)

RICK Πρωτεϊνική κινάση που διαθέτει περιοχή «επιστράτευσης» κασπασών (caspase recruitment domain), αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη CLARP και ρυθμίζει την Fas-επαγόμενη απόπτωση.

(*J Biol Chem* 1998, 273:12296-12300)

RIP Receptor Interacting Protein. Η πρωτεΐνη RIP διαθέτει περιοχή θανάτου DD και σχετίζεται τόσο με την επαγωγή όσο και με την αναστολή της απόπτωσης. Συνδεόμενη στον υποδοχέα Fas ενεργοποιεί τις κασπάσες και επάγει την απόπτωση. Συνδεόμενη στον υποδοχέα TNFR1 μαζί με το μόριο TRADD ενεργοποιεί τις κασπάσες, μπορεί, όμως, να ενεργοποιήσει τον NF-κB μέσω του μορίου TRAF2.

(*Cell* 1995, 81:513-523)

RIP2 Receptor Interacting Protein-2. Η πρωτεΐνη RIP2 ενεργοποιεί τον παράγοντα NF-κB, αλλά είναι και κινάση επαγωγής του κυτταρικού θανάτου.

(*J Biol Chem* 1998, 273:16968-16975)

S

SCA-1 SREBP Cleavage Activity. Άλλη ονομασία για την κασπάση-3.

(*J Biol Chem* 1995, 270:18044-18050)

SCA-2 SREBP Cleavage Activity 2. Άλλη ονομασία για την κασπάση-7/Mch3.

(*Proc Natl Acad Sci USA* 1996, 93:5437-5442)

sFas Soluble Fas. Διαλυτή μορφή του υποδοχέα Fas, στην οποία λείπει η διαμεμβρανική περιοχή του υποδοχέα και η οποία προκύπτει από εναλλακτικό μάτισμα (mRNA splicing).

(*Science* 1994, 263:1759-1762)

sFas L Soluble Fas Ligand. Διαλυτή μορφή του υποδοχέα Fas Ligand, η οποία προκύπτει από τη αποκοπή του υποδοχέα Fas Ligand από την κυτταρική μεμβράνη μέσω μεταλλοπρωτεϊνών.

(*EMBO J* 1995, 14:1129-1135)

- Sphingomyelinase** Η σφιγγομυελινάση είναι ένζυμο που υδρολύει το σύμπλοκο λιπίδιο σφιγγομυελίνη στο σύμπλοκο λιπίδιο ceramide.
(*Cell* 1994, 77:325)
- SREBP-1** Sterol Regulatory Element Binding Protein-1. Μία βασική πρωτεΐνη «έλικα-θηλιά-έλικα-φερμουάρ λευκίνης» (helix-loop-helix-leucine zipper) που ελέγχει τη μεταγραφή του γονιδίου το οποίο κωδικοποιεί τον υποδοχέα της χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών (LDL).
(*Cell* 1993, 75:187-197)
- SREBP-2** Sterol Regulatory Element Binding Protein-2. Μία βασική πρωτεΐνη «έλικα-θηλιά-έλικα-φερμουάρ λευκίνης» (helix-loop-helix-leucine zipper) που ενεργοποιεί τη μεταγραφή μέσω της σύνδεσης στο ρυθμιστικό στοιχείο των στεροειδών.
(*Proc Natl Acad Sci USA* 1993, 90:11603-11607)
- Survivin** Αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη, μέλος της οικογένειας των πρωτεϊνών-αναστολέων της απόπτωσης IAPs.
(*Nature Med* 1997, 3: 917-921)
- T**
- TACI** Transmembrane activator. Ο διαμεμβρανικός ενεργοποιητής TACI είναι μέλος της υπεροικογένειας TNF και αλληλεπιδρά με το μόριο CAML.
- TIAR** RNA binding protein related to TIA-1. Πρωτεΐνη σύνδεσης στο RNA, που είναι, όπως και η πρωτεΐνη TIA-1, επαγωγέας (τελεστής) της απόπτωσης. Κατά τη Fas-επαγόμενη απόπτωση, η πρωτεΐνη TIAR παρουσιάζει ταχεία μετατόπιση από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα.
- TNF** Tumor Necrosis Factor. Παράγοντας Νέκρωσης των Όγκων.
- TNFR1** Tumor Necrosis Factor Receptor 1. Ο υποδοχέας 1 του TNF είναι πρωτεΐνη με MB 55 kDa, γνωστή και ως p55 ή CD120a.
- TNFR2** Tumor Necrosis Factor Receptor 2. Ο υποδοχέας 2 του TNF είναι πρωτεΐνη με MB 75 kDa, γνωστή και ως p75 ή CD120b.



- Toso** Μόριο της κυτταρικής επιφάνειας που είναι ειδικός ρυθμιστής της Fas-επαγόμενης απόπτωσης στα T-κύτταρα.
(*Immunity* 1998, 8:461-471)
- TR2L** Η πρωτεΐνη TR2L αναστέλλει την κυτταροτοξική αντίδραση του παράγοντα TNF.
(*Biochem Biophys Res Commun* 1996, 227:266-272)
- TRADD** TNF Receptor 1 associated death domain. Μόριο που διαθέτει περιοχή θανάτου και συνδέεται στον υποδοχέα 1 του TNF.
(*Cell* 1995, 81:495-504)
- TRAF-1** TNF Receptor Associated Factor-1. Ο παράγοντας TRAF-1 είναι μεταγωγέας σημάτων ο οποίος συνδέεται στην κυτταροπλασματική περιοχή του υποδοχέα 2 του TNF.
(*Cell* 1994, 78:681-692)
- TRAF-2** TNF Receptor Associated Factor-2. Ο παράγοντας TRAF-2 είναι διαμεσολαβητής στην CD30-επαγόμενη ενεργοποίηση του παράγοντα NF-κB. (*Proc Natl Acad Sci USA* 1996, 93:14053-14058)
- TRAF-3** TNF Receptor Associated Factor-3. Ο παράγοντας TRAF-3 αλληλεπιδρά με την κυτταροπλασματική περιοχή του υποδοχέα CD30.
(*Proc Natl Acad Sci USA* 1996, 93:14053-14058)
- TRAF-4** TNF Receptor Associated Factor-4. Ο παράγοντας TRAF-4 αλληλεπιδρά με την κυτταροπλασματική περιοχή του υποδοχέα της λεμφοτοξίνης.
(*Am J Pathol* 1998, 152:1549-1561)
- TRAF-5** TNF Receptor Associated Factor-5. Ο παράγοντας TRAF-5 είναι μέλος της οικογένειας TRAF και διαμεσολαβητής στη μετάδοση σημάτων μέσω του υποδοχέα CD40.
(*Proc Natl Acad Sci USA* 1996, 93:9437-9442)
- TRAF-6** TNF Receptor Associated Factor-6. Ο παράγοντας TRAF-6 είναι διαμεσολαβητής στη μετάδοση σημάτων μέσω του υποδοχέα CD40. (*J Biol Chem* 1996, 271:28745-28748)

- TRAIL** TNF-related apoptosis-inducing ligand. Το προσδετικό μόριο TRAIL, γνωστό και ως Apo2L, είναι μέλος της οικογένειας TNF που επάγει την απόπτωση.
(*Immunity* 1995, 3:673-682)
- TRAIL-R1** TRAIL-Receptor 1. Ο υποδοχέας 1 του TRAIL είναι γνωστός και ως DR4 και APO-2.
(*Immunity* 1997, 7:831-836)
- TRAIL-R2** TRAIL-Receptor 2. Ο υποδοχέας 2 του TRAIL είναι γνωστός και ως DR5. (*Immunity* 1997, 7:821-830)
- TRAIL-R3** TRAIL-Receptor 3. Ο υποδοχέας 3 του TRAIL είναι γνωστός και ως DcR1, TRID και LIT.
(*J Exp Med* 1997, 186:1165-1170)
- TRAIL-R4** TRAIL-Receptor 4. Ο υποδοχέας 4 του TRAIL είναι γνωστός και ως DcR2.
(*Curr Biol* 1997, 7:1003-1006)
- TRAMP** TNF Receptor Apoptosis-Mediating Protein. Η πρωτεΐνη TRAMP είναι υποδοχέας-διαμεσολαβητής της απόπτωσης με ομολογία ως προς τον TNFR1 και τον Fas, γνωστή και ως DR3, APO-3, WSL και LARD.
(*Immunity* 1997, 6:79-88)
- TRANCE** TNF-Related Activation-induced Cytokine. Η κυτταροκίνη TRANCE είναι μέλος της οικογένειας TNF, η οποία εκφράζεται κυρίως στα T-κύτταρα.
(*J Biol Chem* 1997, 272:25190-25194)
- TRAP** TNF-Related Activation Protein. Η πρωτεΐνη TRAP είναι μέλος της υπεροικογένειας TNF, γνωστή και ως CD40 ligand και CD154.
(*Eur J Immunol* 1992, 22:3191-3194)
- TRICK2** TRAIL Receptor Inducer of Cell Killing 2. Υποδοχέας του TRAIL, ο οποίος προέρχεται από εναλλακτικό μάτισμα (splicing) και μεταδίδει κυταροτοξικά σήματα από τον TRAIL.
(*Curr Biol* 1997, 7:693-696)
- TRID** TRAIL Receptor without an Intracellular Domain. Είναι υποδοχέας του TRAIL χωρίς ενδοκυττάρια περιοχή, ο οποίος είναι



ανταγωνιστικός υποδοχέας-παγίδα (decoy receptor) γνωστός και ως DcR1, TRAIL-R3 και LIT.

(*Science* 1997, 277:815-818)

TRIP TRAF Interacting Protein. Η πρωτεΐνη TRIP είναι συστατικό των σηματοδοτικών συμπλεγμάτων TNFR- και CD30-TRAF, η οποία αναστέλλει την TRAF-2-επαγόμενη ενεργοποίηση του παράγοντα NF-κB.

(*J Exp Med* 1997, 185:1275-1285)

TRUNDD TRAIL Receptor with a Truncated Death Domain. Είναι υποδοχέας του TRAIL που παίζει ανασταλτικό ρόλο στην απόπτωση.

(*FEBS Lett* 1998, 424:41-45)

TUNEL Terminal Deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick-End Labeling. Είναι μέθοδος ανίχνευσης αποπτωτικών κυττάρων, που βασίζεται στην κατάτμηση του DNA κατά την απόπτωση.

TWEAK Εκκρινόμενο προσδετικό μόριο της οικογένειας TNF που επάγει ασθενώς την απόπτωση.

(*J Biol Chem* 1997, 272:32401-32410)

TX Πρωτεάση TX. Άλλη ονομασία για την κασπάση-4.

(*EMBO J* 1995, 14:1914-1922)

TY Πρωτεάση TY. Άλλη ονομασία για την κασπάση-5.

(*J Biol Chem* 1995, 270:15870-15876)

V

VEID Val-Glu-Ile-Asp, υπολείμματα αμινοξέων που αντιστοιχούν σε μία από τις περιοχές διάσπασης της κασπάσης-6 στη λαμίνη A.

VEID-AFC Ένα συνθετικό τετραπεπτίδιο (Val-Glu-Ile-Asp), συζευγμένο στην 7-αμινο-4-τριφθοριομεθυλο-κουμαρίνη. Είναι φθορισμομετρικό υπόστρωμα για την εξέταση της ενζυμικής δραστηριότητας της κασπάσης-6.

VEID-AMC Val-Glu-Ile-Asp-7-αμινο-4-μεθυλο-κουμαρίνη. Η VEID-AMC είναι ένα φθορίζον υπόστρωμα για την κασπάση-6.

- VEID-CHO** Val-Glu-Ile-Asp-αλδεϋδη. Η VEID-CHO είναι ένας συνθετικός αναστολέας της κασπάσης-6.
- VEID-FMK** Val-Glu-Ile-Asp-O-μεθυλο-φθοριομεθυλκετόνη. Η VEID-FMK είναι ένας συνθετικός αναστολέας της κασπάσης-6.
- VEID-pNA** Ένα συνθετικό τετραπεπτίδιο, Val-Glu-Ile-Asp, συζευγμένο στην παρα-νιτροανιλίνη (pNA). Είναι ένα χρωματομετρικό υπόστρωμα για την εξέταση της ενζυμικής δραστηριότητας του κασπάση-6-like ενζύμου.

W

- WSL-1** Υποδοχέας με περιοχή θανάτου DD, ο οποίος μεσολαβεί στην επαγωγή αποπτωτικών σημάτων και είναι γνωστός και ως APO3, DR3, TRAMP και LARD.
(*Nature* 1996, 384:372-375)

X

- XIAP** X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein. Η πρωτεΐνη XIAP, γνωστή και ως HILP, είναι μέλος της οικογένειας IAP και αναστέλλει την απόπτωση.
(*EMBO* 1998, 17:2215-2223)

Y

- Yama** Άλλη ονομασία για την κασπάση-3.
(*J Biol Chem* 1994, 269:30761-30764)

Z

- ZIP kinase** Κινάση σερίνης-θρεονίνης που μεσολαβεί στην επαγωγή αποπτωτικών σημάτων.
(*Mol Cell Biol* 1998, 18:1642-1651)
- ZVAD-FMK** Βενζυλοξυ-Βαλίνη-Αλανίνη-Ασπαρτικό-O-μεθυλο-φθοριομεθυλκετόνη. Η ZVAD-FMK είναι συνθετικός αναστολέας των κασπασών.



Μέρος έβδομο

Δημοσιεύσεις



CLINICAL STUDY

Fas and Bcl-2 protein expression in thyrocytes of patients with nodular goiter

M Andrikoula, G Vartholomatos¹, G T Tsangaris¹, M Bafa², F Tzortzatou-Stathopoulou¹ and A Tsatsoulis

[Division of Endocrinology, Department of Medicine, University of Ioannina, 45 110 Ioannina, Greece, ²Molecular Biology Unit, Laboratory of Haematology and ³Laboratory of Cytology, University Hospital of Ioannina, 45 110 Ioannina, Greece and ¹University Research Institute for the Study and Treatment of Childhood Genetic and Malignant Diseases, University of Athens, 'Aghia Sophia' Children's Hospital, 11527 Athens, Greece (Correspondence should be addressed to A Tsatsoulis. Email: atsatsoulis@cc.uoi.gr)

Abstract

Objective: The relative expression of the apoptotic protein Fas and the anti-apoptotic protein Bcl-2 were investigated in thyrocytes from patients with non-toxic nodular goiter (NTG, $n = 20$) and Hashimoto's thyroiditis (HT, $n = 5$), who underwent fine-needle aspiration biopsy for diagnostic reasons. On the basis of the clinical and cytological findings, the patients with NTG were sub-classified into the group of those with colloid nodules ($n = 9$), degenerative nodules ($n = 6$) and adenomatous nodules ($n = 5$).

Methods: Fine-needle biopsy aspirates were examined by immunocytochemistry for Fas and Bcl-2 expression, using specific monoclonal antibodies. For the evaluation of Fas and Bcl-2 immunoreactivity, an expression index, based on the number of cells with positive staining, was used. grade 1 included samples with positive staining in <20% of cells; grade 2 included samples with 20–50% positive cells, and grade 3 included samples with >50% positive cells.

Results: Fas protein expression was generally low (grade 1) in patients with nodular goiter, in contrast to patients with HT, in whom high expression was detected (grade 3). Only in aspirates from degenerative nodules (four out of six), and in which lymphocytes were also present, was Fas expressed at an intermediate level (grade 2). On the other hand, Bcl-2 protein was differentially expressed among the nodule subtypes. It was low in colloid and degenerative nodules (grade 1) but high in adenomatous ones (grades 2 and 3). Bcl-2 expression was also low in patients with HT (grade 1). **Conclusion:** It is concluded that in comparison to HT, where there is up-regulation of Fas and down-regulation of Bcl-2 protein, Fas expression is low in human goiter, indicating low apoptotic activity. The regulation of Bcl-2 protein differs between adenomatous and colloid nodules, suggesting that this protein may play a role in the differentiation of thyroid nodules.

European Journal of Endocrinology 145 403–407



The role of Fas-mediated apoptosis in thyroid disease

M Andrikoula and A Tsatsoulis

Division of Endocrinology, Department of Medicine, University of Ioannina Medical School, Ioannina 45110, Greece

(Correspondence should be addressed to A Tsatsoulis: Email: atsatsou@cc.uoi.gr)

Abstract

Recent evidence has emphasized the importance of apoptosis in the maintenance of tissue homeostasis and the pathogenesis of malignant and immune diseases. Autoimmune thyroid diseases such as Hashimoto's thyroiditis and Graves' disease, as well as other autoimmune endocrine diseases, have been associated with dysregulation of apoptotic signaling pathways. In particular, dysfunction of the Fas apoptotic pathway or production of soluble factors including soluble Fas and soluble Fas ligand may be involved in the pathogenesis of these disorders. On the other hand, malignant thyroid cells may avoid Fas-mediated suicide possibly by expression of inhibitors of apoptosis and evade the immune system by inducing apoptosis on infiltrating lymphocytes. The delicate balance between cell proliferation and cell death through the Fas pathway may also play an important role in the control of thyroid cell mass and goitrogenesis. This review analyzes the current evidence on the role of Fas-mediated apoptosis in the pathogenesis of thyroid diseases including Hashimoto's thyroiditis, Graves' disease, thyroid cancer and goiter. However, the exact mechanisms involved in the regulation of apoptosis in thyroid disease remain unclear. Further investigation is needed.

European Journal of Endocrinology 144 561-568



Απόπτωση και θυρεοειδής αδένας Ο ρόλος της οδού Fas/FasL στην παθογένεια θυρεοειδικών νόσων

Μ. Ανδρίκουλα, Α. Τσατσούλης
Ενδοκρινολογική Μονάδα, Τομέας Παθολογίας, Πανεπιστημικό Νοσοκομείο Ιωαννίνων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ Η απόπτωση ή προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος είναι φυσιολογική μορφή κυτταρικού θανάτου, χάρη στην οποία γίνεται συνεχής ανανέωση των ιστών με ταυτόχρονη διατήρηση της σταθερότητας των ιστολογικών διαμερισμάτων. Η διαταραχή αυτής της ισορροπίας κυτταρικού πολλαπλασιασμού-προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου οδηγεί σε νόσους διαφόρων συστημάτων, συμπεριλαμβανομένου του ενδοκρινικού συστήματος. Τα τελευταία χρόνια πιστεύεται ότι ασθενείς του ενδοκρινικού συστήματος όπως η νόσος του Graves, η θυρεοειδίτιδα Hashimoto και ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1 έχουν αυτοάνοση αιτιολογία. Φαίνεται όμως, ότι εκτός από το ανοσοτικό σύστημα είναι σημαντικός και ο ρόλος της απόπτωσης στην παθογένεια των παραπάνω διαταραχών. Πρόσφατα, οι νόσοι του θυρεοειδή αδένος, όπως και άλλα αυτοάνοσα νοσήματα, έχουν συσχετιστεί με την πρόκληση απόπτωσης μέσω της οδού Fas. Έχουν διαπιστωθεί διαφορές στην έκφραση του υποδοχέα Fas και του αντίστοιχου προσδέματος FasL στα θυρεοειδικά κύτταρα ασθενών με διαφορετικές παθήσεις του θυρεοειδή αδένος, που συσχετίστηκαν με αντίστοιχες διαφορές στους αριθμούς των αποπτωτικών κυττάρων. Τα στοιχεία, όμως, που προκύπτουν από τις έρευνες που έγιναν μέχρι σήμερα είναι αντιφατικά και παραμένει έτσι αδιευκρίνιστος ο ρόλος των Fas/FasL. Στην παρούσα ανασκόπηση παρουσιάζονται τα μέχρι σήμερα δεδομένα από τη διεθνή βιβλιογραφία που συσχετίζουν την απόπτωση μέσω της οδού Fas με παθήσεις του θυρεοειδή αδένος, όπως η νόσος του Graves, η αυτοάνοση θυρεοειδίτιδα, η πολυαξώδης βρογχεκτική και τα θυρεοειδικά καρκινώματα. Η μελέτη της αλληλεπίδρασης Fas/FasL σε άτομα ασθενείς θα συμβάλει στην κατανόηση των τρόπων ρύθμισης της συγκεκριμένης αποπτωτικής οδού με κλινικές εφαρμογές στην αντιμετώπιση των θυρεοειδικών νοσημάτων. Η ρύθμιση των αποπτωτικών οδών στο θυρεοειδή μπορεί να μεταβάλει την έκφραση θυρεοειδικών νόσων, τροποποιώντας την ευαισθησία των θυρεοειδικών κυττάρων στην επαγόμενη από αυτοάνοση απόπτωση.

Λέξεις ευρετηρίου: Απόπτωση, θυρεοειδής αδένος, βρογχεκτική, αυτοάνοση θυρεοειδίτιδα, καρκίνος θυρεοειδός.

Αλληλογραφία: Α. Τσατσούλης, Ενδοκρινολογική Μονάδα, Τομέας Παθολογίας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, 451 10 Ιωάννινα

Apoptosis and thyroid gland The role of Fas/FasL pathway in the pathogenesis of thyroid diseases

M. Andrikoula, A. Tsatsoulis
Department of Medicine Endocrine Unit, University Hospital of Ioannina, Greece

ABSTRACT Apoptosis or programmed cell death is a physiological form of cell death that enables continuous renewal of tissues by cell division while maintaining the steady-state level of the various histological compartments. An imbalance between cell proliferation and programmed cell death contributes to the pathogenesis of diseases of various systems including the endocrine system. Recently diseases of the endocrine system such as Hashimoto thyroiditis, Grave's disease and diabetes mellitus type 1 are considered to be autoimmune in origin. New data suggest that besides the autoimmune system, apoptosis plays also a critical role in the pathogenesis of these disorders. Most recently, diseases of thyroid gland like other autoimmune disorders, have been associated with apoptosis induced by Fas/Fas ligand. The differences in Fas and FasL expression on thyrocytes from patients with various thyroid diseases have been associated with differences in the number of thyroid apoptotic cells. Data from various studies were controversial and did not manage to determine the role of Fas/FasL in thyroid diseases. This review summarizes the available evidence regarding the role of Fas-induced apoptosis in thyroid diseases such as Grave's disease, autoimmune thyroiditis, multinodular goiter and thyroid carcinomas. Further investigation of Fas/FasL interaction in these patients will contribute to the understanding of the regulation of apoptotic pathways in thyrocytes. The regulation of programmed cell death pathways in the thyroid may alter the expression of thyroid diseases by modifying the susceptibility of thyroid cells to immune-mediated apoptosis.

Key words: Apoptosis, thyroid gland, goiter, autoimmune thyroiditis, thyroid cancer.

Corresponding author: A. Tsatsoulis, Endocrine Unit, Department of Medicine, University of Ioannina, GR-451 10 Ioannina, Greece

Απόπτωση Ο κυτταρικός θάνατος προϋπόθεση για τη ζωή

Η απόπτωση είναι η μορφή του κυτταρικού θανάτου που παρατηρείται όταν ο θάνατος είναι επιθυμητό ή προγραμματισμένο γεγονός. Είναι ο πρώτος χαρακτηρισμός ενός ενεργητικά ρυθμιζόμενου μηχανισμού κυτταρικού θανάτου στα θηλαστικά, που διαφέρει μορφολογικά και βιοχημικά από τη νέκρωση. Η απόπτωση ή προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος είναι ένα στερεοτυπικό πρόγραμμα κυτταρικής «αυτοκτονίας», με το οποίο οι πολυκυτταρικοί οργανισμοί εξαλείφουν γηρασμένα, κατεστραμμένα ή μολυσμένα κύτταρα. Τα προϊόντα των γονιδίων, που ελέγχουν τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, αναγνωρίστηκαν και μελετήθηκαν καλύτερα στο νηματοειδή σκώληκα *C.elegans*. Το ενδιαφέρον των ερευνητών για τον έλεγχο της απόπτωσης γίνεται όλο και μεγαλύτερο, καθώς αναγνωρίστηκε ο ζωτικός ρόλος της στη φυσιολογική ανάπτυξη, την ομοιόσταση των ιστών και την άμυνα έναντι παθογόνων μικροοργανισμών. Ταυτόχρονα, έγινε αντιληπτό ότι η διαταραχή της ισορροπίας κυτταρικού πολλαπλασιασμού-προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου μπορεί να οδηγήσει στον καρκίνο, καθώς και σε αυτοάνοσα και εκφυλιστικά νοσήματα. Ο αποπτωτικός μηχανισμός είναι εξαιρετικά πολύπλοκος και δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως. Στην ανασκόπηση αυτή παρουσιάζονται τα δεδομένα, που υπάρχουν μέχρι σήμερα στη διεθνή βιβλιογραφία, για τις οδούς μετάδοσης των αποπτωτικών σημάτων από τους διάφορους υποδοχείς θανάτου στα πρωτεολυτικά ένζυμα που είναι γνωστά ως κασπάσες και οδηγούν στην κατάτμηση του DNA και τη λύση του κυττάρου. Η κατανόηση των μοριακών και κυτταρικών χαρακτηριστικών της αποπτωτικής διαδικασίας θα επιτρέψει την ανάπτυξη και εφαρμογή περισσότερο δραστικών και δυνητικά αποτελεσματικών θεραπευτικών στρατηγικών, στις οποίες βασικό ρόλο θα έχει η επαγωγή ή αναστολή του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, ανάλογα με την περίπτωση.

ΑΡΧΕΙΑ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ 2001,
18(5):496-513
ARCHIVES OF HELLENIC MEDICINE
2001, 18(5):496-513

Μ. Ανδρίκουλα,¹
Γ. Βαρθολομάτος²

¹Ενδοκρινολογικό Τμήμα,
Τομέας Παθολογίας, Ιατρική Σχολή,
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
²Αιματολογικό Εργαστήριο-Μονάδα
Μοριακής Βιολογίας, Πανεπιστημιακό
Νοσοκομείο Ιωαννίνων, Ιωάννινα

Apoptosis: Cell death necessary for life

Abstract at the end of the article

Λέξεις ευρετηρίου

Απόπτωση

Κασπάσες

Νέκρωση

Υποδοχείς θανάτου

Υποβλήθηκε 31.5.2000
Εγκρίθηκε 12.1.2001

ΑΠΟΠΤΩΣΗ ΚΑΙ ΖΩΗ

ABSTRACT

Apoptosis: Cell death necessary for life

M. ANDRIKOULA,¹ G. VARTHOLOMATOS²

¹Division of Endocrinology, Department of Internal Medicine, University of Ioannina, Medical School,

²Laboratory of Hematology, Unit of Molecular Biology,

University Hospital of Ioannina, Ioannina, Greece

Archives of Hellenic Medicine 2001, 18(5):496-513

Apoptosis is the form of cell death observed when death is a desirable or programmed event. It is the first characterization of an actively regulated mechanism of cell death in mammalian cells, with structural features different from those of necrosis. Apoptosis or programmed cell death is a stereotypic program of cell suicide which multicellular organisms use for the deletion of redundant, damaged or infected cells. Gene products which control programmed cell death have been identified and studied most completely in the nematode *C. elegans*. The control of apoptosis has gained the interest of a great number of scientists, as its vital role in physiological development, in tissue homeostasis and in defense against pathogens was recognized. It became understood that the imbalance between cell proliferation and programmed cell death can lead to cancer and to autoimmune and degenerative diseases. The apoptotic mechanism is rather complicated and the process remains unclear. This review summarizes data from research on signalling pathways through death receptors to proteolytic enzymes, result in DNA fragmentation and cell lysis. The understanding of the molecular components and cellular features of the apoptotic machinery will enable the development and application of more effective therapeutic strategies in which either the induction or the inhibition of programmed cell death will be of critical importance.

Key words: Apoptosis, Caspases, Death receptors, Necrosis



**Ο ρόλος της απόπτωσης
και της οδού Fas-Fas ligand
στην παθογένεια
του σακχαρώδους διαβήτη
τύπου 1**

**Μ. Ανδρίκουλα,
Α. Τσατσούλης**

*Ενδοκρινολογική Μονάδα, Τμήμα Παθολογίας
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα*

Λέξεις κλειδιά
Απόπτωση
Αυτοανοσία
Διαβήτης τύπου
Fas-Fas ligand
Ινσουλίνη

ABSTRACT

**The role of apoptosis and the Fas-Fas ligand pathway in the pathogenesis
of type 1 diabetes**

M. ANDRIKOULA, A. TSATSOULIS

*Endocrine Unit, Department of Medicine, University of Ioannina, Ioannina, Greece
Archives of Hellenic Medicine 2001, 18(4):349-353*

The central pathogenic event in the development of autoimmune endocrine diseases is the immune-mediated destruction of the specific endocrine cell. In the case of autoimmune type 1 diabetes the cytotoxic destruction of the pancreatic islet β -cells occurs through apoptosis leading to inadequate insulin secretion and hyperglycemia. Immune-mediated apoptosis specifically triggered through Fas, is believed to be central to the pathogenesis of autoimmune diabetes because this apoptotic mechanism destroys islet β -cells in both animal models of diabetes and the human type 1 disease. On the other hand, animals engineered to prevent Fas mediated cytotoxicity of islet cells do not develop the disease. Thus, apoptosis signaled through the Fas pathway appears to play an important role in the pathogenesis of autoimmune diabetes. The regulation of this pathway in the islet cells may alter the clinical expression of the disease.

Key words: Apoptosis, Autoimmunity, Fas, Fas ligand, Insulinitis, Type 1 diabetes

