

Milena DRAŹKIEWICZ¹
 Jerzy SZCZEKLIK²
 Barbara ŚLUSARCZYK-BALICKA²
 Lidia GACKOWSKA³
 Izabela KUBISZEWSKA³
 Karina SZABŁOWSKA¹
 Piotr KOPIŃSKI¹

¹Katedra i Zakład Genoterapii,
 CM UMK
 p.o. kierownika:
 Dr med. Piotr Kopiński

²Klinika Chorób Wewnętrznych
 i Środowiskowych CM UJ, Kraków,
 kierownik:
 Prof. dr hab. med. Jerzy Szczeklik

³Katedra i Zakład Immunologii
 CM UMK, Bydgoszcz
 Kierownik: Prof. dr hab. med.
 Jacek Michalkiewicz

Słowa kluczowe:

- czynnik martwicy nowotworu- α
- samoistne włóknienie płuc
- sarkoidoza
- makrofagi pęcherzykowe
- limfocyty pęcherzykowe

Key words:

- tumor necrosis factor- α
- idiopathic pulmonary fibrosis
- sarcoidosis
- alveolar macrophages
- alveolar lymphocytes

Praca została sfinansowana
 ze środków projektu Ministerstwa
 Nauki i Szkolnictwa Wyższego
 nr N401 15931 / 3591

Ekspresja czynnika martwicy guza-alfa (TNF- α) i receptora TNF typu 1 w dolnych drogach oddechowych w sarkoidozie i samoistnym włóknieniu płuc (IPF)

Wprowadzenie: Czynnik martwicy nowotworu- α (Tumor Necrosis Factor- α , TNF- α) jest wydzielany przez liczne komórki odczynu zapalnego, głównie aktywowane monocyty i makrofagi. Odgrywa zasadniczą rolę w patomechanizmach śródmiąższowych chorób płuc (interstitial lung diseases, ILD) powikłanych włóknieniem. **Metody:** Stężenie TNF- α badano testem ELISA w płynie z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego (bronchoalveolar lavage, BAL) u chorych z sarkoidozą (n=27) i z IPF (n=9). Do oceny ekspresji TNFR1 (CD120a) oraz wewnątrzkomórkowej ekspresji TNF- α w komórkach BAL użyto immunofluorescencji pośredniej i cytometrii przepływowej. Wyniki odniesiono do rezultatów badania cytoimmunologicznego BAL i danych klinicznych chorych. **Wyniki:** Stwierdzono znamienne wzrost stężenia TNF- α w dolnych drogach oddechowych w IPF ($1,05 \pm 0,4$ vs $0,33 \pm 0,03$ pg/ml w grupie kontrolnej; mediana \pm SEM; $p < 0,05$), a zwłaszcza w sarkoidozie ($1,33 \pm 0,4$ vs $0,33 \pm 0,03$ pg/ml w grupie kontrolnej; mediana \pm SEM; $p < 0,05$). Stadium sarkoidozy nie miało wpływu na uzyskane wyniki. Niespodziewanie znamienne niski poziom ekspresji TNFR1 na powierzchni limfocytów BAL obserwowano w sarkoidozie ($2,9 \pm 0,73\%$ w porównaniu z $6,25 \pm 0,55\%$ w grupie kontrolnej, $p < 0,05$). Odsetek limfocytów dodatnich z CD120a ujemnie korelował z całkowitą liczbą limfocytów BAL (R Spearman = $-0,7$; $p = 0,002$). **Wnioski.** Stężenie TNF- α w dolnych drogach oddechowych wzrosło znamienne w badanych chorobach grupy ILD. W sarkoidozie, w porównaniu z grupą kontrolną, obserwowano znamienne niski poziom ekspresji TNFR1 na powierzchni limfocytów BAL, co może chronić te komórki przed apoptozą indukowaną przez miejscowo wysokie stężenia TNF.

Expression of tumour necrosis factor alpha (TNF- α) and TNF receptor type 1 in lower airways in sarcoidosis and idiopathic pulmonary fibrosis (IPF)

Introduction: Tumor necrosis factor- α (TNF- α) is secreted by many inflammatory cells, mostly by activated monocytes and macrophages. It plays an essential role in pathomechanisms of many interstitial lung diseases (ILD) associated with fibrosis. **Materials and methods:** BAL material was harvested from patients with sarcoidosis (n=27) and IPF (n=9). TNF- α levels in BAL supernatants were tested by ELISA assay. Immunofluorescence staining and flow cytometry were used to evaluate the BAL cell expression of TNFR1, as well as TNF- α intracellular expression. The results were related to patient BAL cytoimmunology and clinical data. **Results:** TNF- α levels in BAL supernatants were significantly increased in IPF (1.05 ± 0.4 vs 0.33 ± 0.03 pg/ml in controls; median \pm SEM; $p < 0.05$), and especially in sarcoidosis (1.33 ± 0.4 vs 0.33 ± 0.03 pg/ml in controls; median \pm SEM; $p < 0.05$). Interestingly, we found remarkable low TNFR1 (CD120a) expression on BAL lymphocytes in sarcoidosis ($2.9 \pm 0.73\%$ vs 6.25 ± 0.55 in controls; $p < 0.05$). Sarcoidosis radiological stage had no impact on the results. The percentage of TNFR1+ cells showed strong and reversible correlation with total count of BAL lymphocytes (R Spearman = -0.7 ; $p = 0.002$). **Conclusions:** TNF- α level was increased in analysed groups of ILD patients. In sarcoidosis, as compared to controls, low TNFR1 lymphocyte expression was found, the event that may reflect a protective mechanism from apoptotic death induced by locally high TNF concentrations.

Adres do korespondencji:

Dr med. Piotr Kopiński
 Katedra i Zakład Genoterapii CM UMK
 ul. Marii Skłodowskiej-Curie 9, 85-094 Bydgoszcz
 tel. + 52 155614; fax + 52 5853487
 e-mail: mpkopins@consoft.com.pl; kizgenoter@cm.umk.pl

Wprowadzenie

Czynnik martwicy nowotworu- α , plejotropowa cytokina o prozapalnym charakterze, oddziałuje wielokierunkowo na komórki docelowe, gdyż receptory TNF obecne są na powierzchni niemal każdej komórki jądrzastej [1]. Za jego sekrecję odpowiedzialne

są głównie makrofagi i monocyty, ale także limfocyty T i NK, granulocyty, mastocyty, komórki śródbłonka, fibroblasty, astrocyty i mioocyty mięśniówki gładkiej. Również komórki niektórych nowotworów wydzielają TNF (m.in. czerniaka, białaczek, raka sutki i jajnika) [2]. Warunkiem wywarcia efektu biologicznego jest przyłączenie go do jednego z powierzchniowych receptorów (typu 1 lub 2: TNFR1 lub TNFR2). W zależności od rodzaju aktywowanego receptora może dojść wówczas do przeciwnych reakcji, np. do apoptozy albo do proliferacji komórki docelowej [3].

TNF w zapaleniu wzmacnia cytotoxyczność makrofagów, komórek NK i eozynofiliów oraz pobudza czynność fagocytarną neutrofilów. Zwiększa ekspresję receptorów adhezyjnych śródbłonka (selektyny E, ICAM-1 oraz VCAM-1). Stimuluje syntezę i uwalnianie interleukiny-1, -6 i GM-CSF, a także leukotrienów, prostaglandyn i innych mediatorów zapalenia [4]. Efekt cytotoxyczny TNF zależy działania tej cytokiny na jej receptor typu 1, a także od indukcji kaskady kwasu arachidonowego i wewnątrzkomórkowej produkcji wolnych rodników, z następczym uszkodzeniem łańcucha oddechowego i błon komórkowych [5]. Ważna jest zależność od TNF indukcja syntazy NO (iNOS) w makrofagach i granulocytach obojętnochłonnych, zwłaszcza po stymulacji lipopolisacharydem (LPS) [6]. W sumie TNF- α indukuje, a następnie podtrzymuje zapalenie.

W sarkoidozie ekspresja układu TNF postępuje w miarę rozwoju odczynu zapalnego, a więc często u osób z przewlekłą postacią choroby [7]. Zaburzenia równowagi między ilością cytokiny i jej receptorów prowadzi do stałego, miejscowego napływu komórek zapalnych i w efekcie do tworzenia typowej ziarniny [8]. Makrofagi pęcherzykowe chorych z aktywną postacią sarkoidozy uwalniają zwiększone ilości TNF- α , zarówno spontanicznie, jak i po stymulacji LPS [9]. TNF- α w samistnym włóknieniu płuc prowadzi do uszkodzenia nabłonka pęcherzyków płucnych i śródbłonka naczyniowego w mechanizmach opisanych wyżej. Z czasem dochodzi do włóknienia śródmiąższu płuc – cytokina działa bezpośrednio lub poprzez tlenek azotu [4, 10].

W sumie uważa się, że nieleczeni chorzy zILD, u których występuje podwyższony poziom TNF, a także jego receptorów w dolnych drogach oddechowych, są bardziej narażeni na postęp choroby i na włóknienie płuc [7, 11, 12]. Dlatego, podobnie, jak w wielu innych chorobach zapalnych, strategię leczniczą, mającą na celu miejscowe hamowanie działania TNF coraz częściej wprowadzane są do leczenia tej grupy chorych [13].

Cel pracy

Celem niniejszej pracy było zbadanie ekspresji układu czynnika martwicy nowotworu- α (TNF- α) i jego receptora typu 1 w dolnych drogach oddechowych osób z wybranymi chorobami śródmiąższowymi płuc (sarkoidoza, IPF), w zestawieniu z wynikami cytoimmunologicznymi, otrzymanymi w drodze płukania oskrzelowo-pęcherzykowego (BAL) oraz z podstawowymi danymi klinicznymi chorych.

Materiał i metody Chorzy

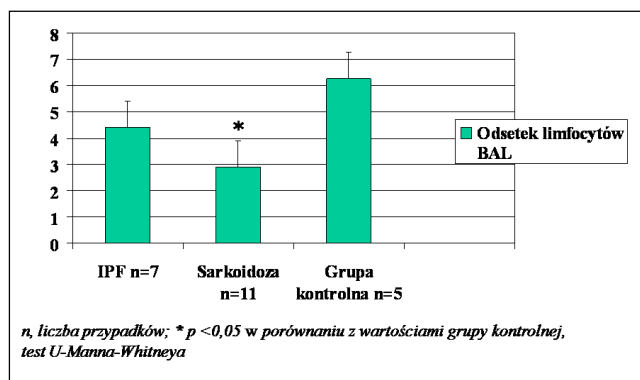
Płukanie oskrzelowo-pęcherzykowe (BAL) wykonano w celach diagnostycznych, u 36 chorych z podejrzeniem choroby śródmiąższowej płuc, u których postawiono ostateczne rozpoznanie sarkoidozy lub samoistnego włóknienia płuc. Do dnia wykonania BAL chorym nie podawano leków.

Sarkoidozę rozpoznano stwierdzając obecność niesierowaciejących ziarniników w badaniu histopatologicznym materiału z biopsji transbronchialnej. U chorych występował typowy obraz radiologiczny klatki piersiowej i/lub charakterystyczny obraz kliniczny [8]. Podzielono ich dodatkowo na podgrupy wg piśmiennictwa [14], zgodnie ze stwierdzonym w chwili badania BAL stadium radiologicznym choroby. W stadium I znajdowało się 13 chorych, w stadium II i III (z obecnością uchwytanych zmian miąższowych płuc), 14 chorych. IPF rozpoznano w oparciu o obraz histopatologiczny w biopsji płuc (typu zwyczajnego śródmiąższowego zapalenia pęcherzyków płucnych, usual interstitial pneumonia, UIP) u chorych z charakterystycznym obrazem klinicznym (w tym z typowymi zmianami w tomografii komputerowej wysokiej rozdzielczości) [15]. Inne przyczyny włóknienia płuc wykluczono.

Grupę kontrolną stanowiło 17 osób, diagnozowanych w kierunku choroby śródmiąższowej płuc, u których końcowa ocena kliniczna (uwzględniająca badanie przedmiotowe i badania dodatkowe, w tym radiogramy klatki piersiowej i testy czynnościowe płuc) wykluczyła odchylenie od normy w zakresie układu oddechowego [16].

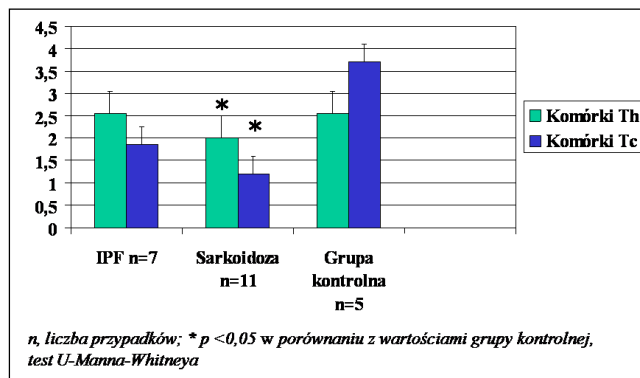
Podstawowe dane o badanych osobach zestawiono w tabeli I.

Komisja Bioetyczna Collegium Medicum UMK wyraziła zgodę na niniejsze badanie (KB nr 116/2006 z dnia 18 października 2006 roku).



Rycina 1

Ekspresja TNFR1 na limfocytach BAL i IPF i sarkoidozie.
TNFR1 expression on BAL lymphocytes in IPF and sarcoidosis.



Rycina 2

Ekspresja TNFR1 na limfocytach Th (CD4) i Tc (CD8) w materiale chorych z IPF i sarkoidozą.
TNFR1 expression on Th (CD4) and Tc (CD8) BAL cells in IPF and sarcoidosis.

Badania cytologiczne materiału BAL

Płukanie BAL wykonano zgodnie z zaleceniami *European Respiratory Society*, jak opisano to poprzednio [17]. Badanie cytologiczne wykonano tak, jak w poprzednich pracach zespołu [14]. W skrócie, żywotność komórek napywowych BAL oznaczono błękitem trypanu (0,2%). Całkowitą liczbę komórek w 1 ml płynu liczono w komorze Bürkera. Preparaty z cytowania (Sigma 4K15, 80 g, 5 min.) barwiono techniką *Maya-Grünwala-Giemsa* (MGG) i hematoksyliną-eozyną (HE). Wzór odsetkowy komórek BAL otrzymano, licząc średnią wartość z obliczeń w obu barwieniach. Do analizy nie kwalifikowano materiałów BAL z małym odzyskiem (<30% wyjściowej objętości użytego płynu), zawierających >5% nabłonków górnych dróg oddechowych lub znaczną domieszkę krwi (>90% erytrocytów) [18].

Badania immunologiczne materiału BAL

Ekspresję receptorów dla TNF typu 1 zbadano łącznie u 28 osób (9 chorych z IPF, 13 z sarkoidozą i u 6 osób grupy kontrolnej) techniką immunofluorescencji pośredniej. W skrócie, 50-150 x 10³ komórek BAL inkubowano z nasycającą ilością mysiego przeciwciała monoklonalnego anti-CD120a (Becton-Dickinson, nr kat. 559321; 30 min.), płukano w PBS, barwiono wtórną anti-mysią surowicą poliklonalną sprzężoną z izotiocyanianem fluoresceiny (FITC), ponownie płukano i inkubowano z 4 μ l monoklonalnego przeciwciała mysiego anti-CD4 lub anti-CD8 (oba sprzężone z czerwieńią fikoerytryny, Becton-Dickinson, nr kat. odpowiednio 345769 i 345773); wszystkie inkubacje w ciemności i temperaturze pokojowej. Komórki płukano i zawieszano w 250 μ l PBS z 2% formaldehydem, zbierano w cytometrze FAC-Scan (Becton-Dickinson) w ciągu 48 godzin. Jako ujemnej kontroli użyto próbki bez przeciwciała anti-CD120a, inkubowanej tylko z surowicą poliklonalną, sprzężoną z FITC. Dodatkowo, ze względu na zwykle niską ekspresję markera CD120a na powierzchni komórek BAL, w części przypadków sporządzono dodatkowe próbki kontrolne: z przeciwciałami anti-CD4 PE lub anti-CD8 PE.

Badanie stężenia TNF- α w nadszczach BAL techniką ELISA

Postępowano zgodnie z instrukcją producenta (R & D, Quantikine nr kat. DTA50). W skrócie, do studzienek 96-dółkowej polistyrenowej płytki opłaszczonej przeciwciałem monoklonalnym anti-TNF- α (nr kat. 890123) nakładano po 50 μ l roztworu RD1F (nr kat. 890541) i 200 μ l standardu lub materiału z pobranych próbek. Inkubację prowadzono 2 godziny w temperaturze pokojowej, płytki płukano buforem płuczającym, dodawano 200 μ l koniugatu anti-TNF- α (przeciwciała poliklonalne anti-TNF- α sprzężone z peroksydazą chrzanową, nr kat. 890124), inkubowano 2 godziny w temperaturze pokojowej i ponownie płukano. Następnie dodawano 200 μ l roztworu substratu (20 min. w ciemności i temperaturze pokojowej). Reakcję hamowano za pomocą 50 μ l roztworu „stop solution” (2M H₂SO₄, nr kat. 895032). Gęstość optyczną badano w ciągu 30 min. (dług. fali 490 nm). Sporządzano krzywą kalibracyjną, wyniki opracowano komputerowo przy użyciu programu „Genesis”.

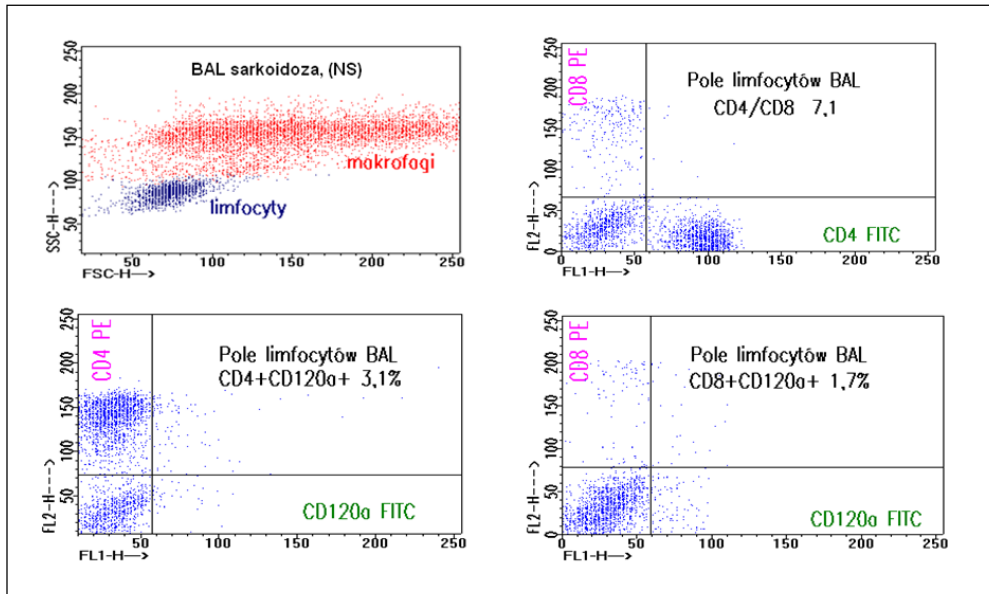


Tabela I

Badane grupy osób - podstawowe dane kliniczne.

Tested groups - Basic clinical data

Grupa	Wiek [Lata]*	VC [%] **	FEV1/VC % **	MEF 75% **	MEF 50% **	MEF 25% **	Odzysk płynu BAL %
Sarkoidoza I	38,8 ± 10,2	97,6 ± 3,0	84 ± 1,9	94 ± 5,9	89 ± 8,0	67 ± 6,4	58 ± 1,9
Sarkoidoza II + III	46,0 ± 13,5	92 ± 3,2	81 ± 2,1	84 ± 5,3	64 ± 5,7 #	56 ± 4,9	53 ± 2,3
IPF	55,3 ± 16,8	75,5 ± 5,7 #	88 ± 4,7	114 ± 11,2	74 ± 19,6	65 ± 14,3	48 ± 2,9
Kontrola	35,8 ± 14,0	105,5 ± 5,1	86 ± 4,7	87,5 ± 4,5	90 ± 7,2	68,5 ± 6,9	56,5 ± 2,6

* Wyniki podano jako średnią ± błąd standardowy (SD); **Wyniki podano jako odsetek wartości należnej; #p<0,05 w porównaniu z grupą kontrolną

Tabela II

Stężenie TNF-α w nadsączach BAL.

TNF-α levels in BAL supernatants.

Grupa	N	Średnia [pg/ml]	Mediana [pg/ml]	SEM [pg/ml]	Zakres [pg/ml]	Poziom p
Sarkoidoza stadium I	13	1,77	1,33	0,43	0,32-5,34	< 0,05
Sarkoidoza stadium II+III	14	2,29	1,29	0,67	0,3-9,19	< 0,05
Sarkoidoza razem	27	2,03	1,31	0,4	0,3-9,19	< 0,05
IPF	9	1,63	1,05	0,49	0,8-0,44	< 0,05
Grupa kontrolna	7	0,32	0,31	0,01	0,3-0,35	-

N, liczba chorych

Tabela III

Wyniki cytologiczne materiału BAL.

Wartość stosunku CD4/CD8.

BAL cytological data. CD4/CD8 ratio.

Grupa		Całkowita liczba komórek BAL [10 ⁹ /ml]	Makrofagi	Limfocyty	Neutrofile	Eozynofile	CD4/CD8
Sarkoidoza	%	451 ± 64	60 ± 2,8	37 ± 2,9*	1,1 ± 0,5	0,4 ± 0,3	8,1 ± 0,7*
IPF	%	375 ± 108	52,5 ± 6,6	17,1 ± 7,4	9,0 ± 4,5*	5,0 ± 0,5*	0,9 ± 0,3
Grupa kontrolna	%	125 ± 33	84,5 ± 2,7	13,3 ± 2	0,3 ± 0,6	0 ± 0,1	2,3 ± 0,4

* p<0,05 w porównaniu z wartościami grupy kontrolnej, test U-Manna-Whitneya

Metody statystyczne

Stosowano program Statistica 6.0. Wyniki przedstawiono jako medianę ± błąd standardowy średniej (SEM) chyba, że zaznaczono inaczej. Testem U Manna-Whitneya porównano nierówne liczbowo grupy o nieparametrycznym rozkładzie zmiennych. Korelacja R Spearmana służyła do badania związku między zmiennymi.

Wyniki

Wyniki testu ELISA zebrano w tabeli II. Zwraca uwagę znaczny wzrost stężenia TNF-α w sarkoidozie i IPF w porównaniu z grupą kontrolną, nieraz wielokrotnie. W sarkoidozie stężenie TNF-α było znacznie podwyższone w obu wyodrębnionych podgrupach, ale między nimi nie było istotnych różnic.

Wyniki cytologiczne i immunologiczne BAL zestawiono w tabeli II; są zgodne z piśmiennictwem [8,16,17]. Na rycinach I i II przedstawiono wyniki ekspresji receptora TNF typu 1 na limfocy-

tach BAL w przebadanych grupach niepalących chorych, osobno na komórkach Th i na komórkach Tc; odniesiono je do danych grupy kontrolnej. Wyniki przedstawiono jako odsetek wszystkich limfocytów. Zwraca uwagę niski poziom ekspresji receptorów typu 1 dla TNF na powierzchni limfocytów pęcherzykowych we wszystkich analizowanych grupach z tym, że najniższy, znamieny statystycznie spadek ekspresji TNFR1 zaobserwowano u chorych z sarkoidozą, zwłaszcza w subpopulacji komórek Tc. Znamienne obniżenie wartości odsetkowej CD8+CD120+ w porównaniu z grupą kontrolną dotyczyło także IPF. Niską ekspresję CD120a zaobserwowano także na makrofagach pęcherzykowych, niezależnie od przebadanej grupy: z reguły wykrywano poniżej 5% dodatnich makrofagów, w pojedynczych przypadkach w ogóle nie wykazano dodatniego barwienia (wyników nie przedstawiano).

Odsetek limfocytów dodatnich z CD120a silnie ujemnie korelował z całkowitą liczbą limfocytów BAL (test Spearmana, $r_s = -0,71$; $p=0,002$). Nie było korelacji między ekspresją TNFR1 a innymi parametrami cytoimmunologicznymi BAL, ani korelacji między stężeniem TNF- α a ekspresją jego receptora na komórkach BAL.

Dyskusja

Wyniki otrzymane w niniejszej pracy potwierdzają pogląd o wzmożonej ekspresji TNF- α w materiale z dolnych dróg oddechowych pacjentów z sarkoidozą [19], będącej prawdopodobnie przejawem wzmożonej aktywności sekrecyjnej makrofagów pęcherzykowych. Wg piśmiennictwa stężenie TNF- α w tej chorobie jest wysokie, a przy tym znamienne wyższe u chorych z aktywnym przebiegiem choroby, niż w podgrupie z jej postacią nieaktywną [3,20,21]. Stężenie TNF w materiale BAL może mieć w sarkoidozie znaczenie prognostyczne [13].

W niniejszej pracy stężenie TNF- α analizowano w podgrupach sarkoidozy, zdefiniowanych na podstawie kryteriów radiologicznych i może właśnie dlatego nie wykazano istotnych różnic pomiędzy wynikami w poszczególnych podgrupach: aktywny postępujący, jak i przewlekły niepostępujący przebieg sarkoidozy może wystąpić zarówno u chorych w I, jak i w późniejszych (II i III) stadiach choroby [8].

Stężenie TNF w stadium I sarkoidozy nie tylko nie było wyższe niż w stadiach II+III, ale nawet osiągało wartości nieznamienne niższe. Jako komentarz może posłużyć praca *Armstronga* i wsp., którzy wykazali słabsze uwalnianie TNF- α przez makrofagi w warunkach spoczynkowych oraz po stymulacji LPS w I stadium sarkoidozy w porównaniu z późniejszymi stadiami [22].

W IPF, w porównaniu z grupą kontrolną wykazano podwyższone stężenie TNF- α w materiale BAL. Wyniki te są interesujące wobec nie do końca zdefiniowanej roli TNF w patogenezie IPF [23]. Uważa się, że wysoka ekspresja TNF- α w dolnych drogach oddechowych w tej chorobie odzwierciedla szczególne zagrożenie postępującym włóknieniem [24]. Obok makrofagów, dodatkowym źródłem TNF mogą być neutrofile, obecne w wysokim odsetku w BAL chorych z IPF (tabela III) i mające swój udział we włóknieniu płuc [25].

Badania ekspresji układu TNF zwróciły uwagę badaczy na receptory tej cytokiny w materiale BAL [26]. W niniejszej pracy wykazano, że odsetek limfocytów i makrofagów pęcherzykowych dodatnich z TNFR1 jest nieoczekiwanie niski. Szczególnie niska ekspresja TNFR1 wystąpiła w obu grupach chorych na powierzchni komórek Tc (CD8+CD120a+), przy czym należy pamiętać, że w sarkoidozie odsetek limfocytów Tc (CD8) jest w BAL zwykle niższy, niż w grupie kontrolnej, ale w IPF jest prawidłowy lub podwyższony. Znamienne niższa w IPF wartość odsetka CD8+CD120a+ może odzwierciedlać większą oporność komórek Tc na apoptozę indukowaną przez TNF i odpowiadać niedawnym doniesieniom o niekorzystnym udziale limfocytów cytotoksycznych w patogenezie tej choroby [27].

Poprzednio wykazaliśmy [16,17], że apoptoza limfocytów i makrofagów pęcherzykowych w śródmiąższowych chorobach płuc zdarza się rzadko. Szczególnie mało (znacznie poniżej 1%) komórek zapalnych BAL wchodzi w apoptozę w sarkoidozie, a więc w chorobie z najniższą, spośród przebadanych tu grup, ekspresją TNFR1 na powierzchni limfocytów. Tak więc, pomimo wysokiego stężenia TNF- α , w pojedynczych przypadkach wielokrotnie przekraczającego wyniki uzyskane u osób zdrowych, limfocyty BAL chorych z sarkoidozą (a także IPF) nie wchodzi w apoptozę – są nadal czynne w progresji choroby. Jak wykazaliśmy, receptory dla TNF występują w IPF na powierzchni limfocytów w nieco wyższym odsetku, niż w sarkoidozie, a właśnie w IPF apoptoza limfocytów pęcherzykowych zdarza się nieco częściej [Kopiński, niepublikowane dane].

Słuszność tego rozumowania potwierdza dodatkowo analiza statystyczna wyników niniejszej pracy: odsetek limfocytów BAL jest ujemnie, statystycznie znamienne skorelowany z ekspresją TNFR1 na powierzchni tych komórek. Limfocytoza BAL zależy zaś - jak wiadomo - między innymi od podatności tych komórek na proces apoptozy [28].

Ważnym powodem niskiej ekspresji TNFR1 (a także TNFR2) na powierzchni komórek BAL jest nasilony proces złuszczenia receptorów z powierzchni komórek do otoczenia. Poziom obu

rozpuszczalnych postaci receptorów dla TNF jest w śródmiąższowych chorobach płuc wysoki [20]. Podwyższony poziom rozpuszczalnych postaci tych receptorów w supernatancie BAL może mieć istotne znaczenie prognostyczne w sarkoidozie, zwłaszcza w I stadium choroby [22]. Rozpuszczalne formy receptorów, konkurując o cytokinę z receptorami powierzchniowymi, mogą działać ochronnie, broniąc tkankę płucną przed uszkodzeniem przez nadmierne ilości TNF, pojawiające się wILD w miarę przechodzenia zapalenia w proces przewlekły [20].

Podsumowując, stężenie TNF- α w dolnych drogach oddechowych wzrosło znamienne w sarkoidozie, a w mniejszym stopniu w IPF. W obu chorobach, w porównaniu z grupą kontrolną, obserwowano znamienne niższą ekspresję receptorów typu 1 dla TNF (CD120a) na powierzchni limfocytów BAL (zwłaszcza na limfocytach cytotoksycznych), tak więc komórki odczynu zapalnego były same zabezpieczone przed apoptozą, pomimo miejscowo obecnych wysokich stężeń TNF- α . Możliwe, że niska ekspresja TNFR1 na komórkach cytotoksycznych BAL jest szczególnie niekorzystna u chorych z IPF.

Piśmiennictwo

1. **Juszczynski J, Warzocha K.** Czynniki martwicy nowotworów: Przekazywanie sygnału wewnątrzkomórkowego, molekularne mechanizmy ekspresji i udział w patogenezie chorób zapalnych i chłoniaków. Część I. *Acta Haematol Pol* 2002; 33:191-199.
2. **Robak T.** *Biologia i farmakologia cytokin.* Warszawa-Lódź, PWN 1995: 255-262.
3. **Kieszko R, Krawczyk P, Chocholska S, Bojarska-Junak A, Jankowska O, Król A, Roliński J, Milanowski J.** Tumor necrosis factor receptors (TNFRs) on T lymphocytes and soluble TNFRs in different clinical courses of sarcoidosis. *Respir Med* 2007; 101: 645-54.
4. **Kelly M, Kolb M, Bonniaud P, Gauldie J.** Re-evaluation of fibrogenic cytokines in lung fibrosis. *Curr Pharm Des* 2003; 9: 39-49.
5. **Horinouchi H, Wang CC.** TNF-alpha gene and protein expression in alveolar macrophages in acute and chronic hyperoxia-induced lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996; 14: 548-555.
6. **Ordas MC, Costa MM, Roca FJ, Lopez-Castejon G, Mulero V, Meseguer J, Figueras A, Novoa B.** Turbot TNF-alpha gene: Molecular characterization and biological activity of the recombinant protein. *Mol Immunol* 2007; 44:389-400.
7. **Baughman RP, Iannuzzi M.** Tumor necrosis factor in sarcoidosis and its potential for targeted therapy. *BioDrugs* 2003; 17: 425-431.
8. *Sarcoidosis.* Ed. by Drent M, Costabel U. *ERS European Respiratory Monographs* 2005; Vol. 10, Monograph 32.
9. **Losa Garcia JE, Rodriguez F M, Martin de Cabo M R, Garcia Salgado MJ, Losada JP, Villaron LP, Lopez AJ, Arellano JLP.** Evaluation of inflammatory cytokine secretion by human alveolar macrophages. *Mediators of Inflammation* 1999; 8: 43-51.
10. **Gharaee-Kermani M, Phan SH.** Molecular mechanisms of and possible treatment strategies for idiopathic pulmonary fibrosis. *Curr Pharm Des* 2005; 11: 3943-3971.
11. **Frankel SK, Cosgrove GP, Cha SI, Cool CD, Wynes MW, Edelman BL, Brown KB, Riches DWH.** TNF- Sensitizes Normal and Fibrotic Human Lung Fibroblasts to Fas-Induced Apoptosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006; 34: 293-304.
12. **Ziegenhagen MW, Fitschen J, Martinet N, Schlaak M, Müller-Quernheim J.** Serum level of soluble tumor necrosis factor receptor II (75 kDa) indicates inflammatory activity of sarcoidosis. *J Intern Med* 2000; 248: 33-41.
13. **Chciałkowski A, Targowski T, Bajera I, Jahnz-Rózyk K.** Czynniki martwicy nowotworów-a badania kliniczne I i II fazy. *Pol Merkuriusz Lek* 1997; 2: 396-399.
14. **Chłap Z, Czarnobilska E, Kopiński P, Gil K, Jedynak U.** Cytoimmunologic atlas of bronchoalveolar lavage (BAL). Ed. *Med Prakt*, Kraków 2000.
15. **Selman M, Thannicka VJ, Prado A, Zisman DA, Martinez FJ, Lynch JP.** Idiopathic pulmonary fibrosis: pathogenesis and therapeutic approaches. *Drugs* 2004; 64: 405-30.
16. **Kopiński P, Śladek K, Szczeklik J, Soja J, Szlubowski A, Lackowska B, Balicka-Ślusarczyk B, Plato M, Szpechciński A.** Expression of insulin-like growth factor-I (IGF-I) in the lower airways immune cells. Evaluation of its possible role as an antiapoptotic agent. *Fol Hist Cytobiol* 2006; 44: 249-258.
17. **Szczeklik J, Trojan J, Kopiński P, Soja S, Szlubowski A, Dziedzina S, Iwaniec T, Woś M.** Apoptosis in bronchoalveolar lavage lymphocytes (L-BAL) in pneumoconioses. *Przeł Lek* 2004, 61: 235-240.
18. **Kopiński P, Szczeklik J, Lackowska B, Soja J, Szlubowski A, Nalepa P, Jedynak U, Śladek K.** Flow cytometric characteristics of alveolar lymphocytes (AL) obtained by bronchoalveolar lavage (BAL) in the control group - proposal of normal value range of AL subsets in nonsmokers. *Central Eur J Immunol* 2004, 29: 63-72.
19. **Fehrenbach H, Zissel G, Goldmann T, Tschering T, Vollmer E, Pabst R, Müller-Quernheim J.** Alveolar macrophages are the main source for tumor necrosis factor-alpha in patients with sarcoidosis. *Eur Respir J* 2003; 21: 421-8.
20. **Dai H, Guzman J, Baomin Ch, Costabel U.** Production of soluble tumor necrosis factor receptors and tumor necrosis factor-a by alveolar macrophages in sarcoidosis and extrinsic allergic alveolitis. *Chest* 2005; 127: 251-256.

21. **Zheng L, Teschler H, Guzman J, Hübner K, Striz I, Costabel U.** Alveolar macrophage TNF-alpha release and BAL cell phenotypes in sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152: 1061-6.
22. **Armstrong L, Foley NM, Millar AB.** Inter-relationship between tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and TNF soluble receptors in pulmonary sarcoidosis. *Thorax* 1999; 54: 524-30.
23. **Krein PS, Winston BW.** Roles for Insulin-Like Growth Factor I and Transforming Growth Factor-I in Fibrotic Lung Disease. *Chest* 2002; 122:289S-293S.
24. **Prado A, Selman M.** Molecular mechanisms of pulmonary fibrosis. *Front Biosci* 2002; 1: 1743-61.
25. **Homolka I, Ziegenhagen MW, Gaede KI, Entzian P, Zissel G, Müller-Quernheim J.** Systemic immune cell activation in a subgroup of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respiration* 2003; 70: 262-269.
26. **Nakayama T, Hashimoto S, Amemiya E, Horie T.** Elevation of plasma-soluble tumour necrosis factor receptors (TNF-R) in sarcoidosis. *Clin Exp Immunol* 1996; 104: 318-324.
27. **Papiris SA, Kollintza A, Karatza M, Manali E D, Sotiropoulou CH, Milic-Emili J, Roussos Ch, Daniil Z.** CD8 T lymphocytes in bronchoalveolar lavage in idiopathic pulmonary fibrosis. *J Inflammation* 2007; 4: 14.
28. **Pabst R, Tschernig T.** Lymphocyte dynamics: caution in interpreting BAL numbers. *Thorax* 1997; 52: 1278-80.