

# Stężenie sCD30 i przeciwciał skierowanych przeciw aneksynie V w surowicy oraz onkoproteiny Bcl-2 w lizatach limfocytarnych chorych z alergią wziewną

## Serum concentration of sCD30, Annexin V auto-antibodies and Bcl-2 level in lymphocytes lysates obtained from patients with inhalant allergy

SŁAWOMIR ŻEGLEŃ, BARBARA ROGALA

Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych, Alergologii i Immunologii Klinicznej, Śląska Akademia Medyczna

### Streszczenie

**Wprowadzenie.** Znaczenie procesu apoptozy limfocytów T w przebiegu alergicznego zapalenia pozostaje niejasne. Antygen CD30, należący do nadrodziny receptorów związanych TNF, przekazuje sygnał apoptozy, stanowiąc istotny element regulacji długości życia komórki.

**Cel pracy.** Celem pracy była ocena stężenia sCD30 w surowicy chorych na różne choroby alergiczne oraz określenie zależności pomiędzy stężeniami sCD30, onkoproteiny Bcl-2 i przeciwciał skierowanych przeciw aneksynie V.

**Materiał i metody.** Badaniami objęto 52 chorych na okresowy, alergiczny nieżyt nosa i/lub astmę epizodyczną, uczulonych na pyłki traw i zbóż oraz 26 chorych na astmę oskrzelową przewlekłą, lekką uczulonych na roztocze kurzu domowego. 24 zdrowych osób stanowiło grupę kontrolną. Oznaczenia stężenia sCD30, Bcl-2 oraz przeciwciał anti-Annexin V dokonano metodą immunoenzymatyczną (DAKO – CD30, ELISA, Bender-MedSystems, Bcl-2 human ELISA, anti-Annexin V ELISA). TlgE oznaczono fluoroimmunoenzymatycznie (Pharmacia CAP System IgE FEIA).

**Wyniki.** Stężenie sCD30 w grupie chorych uczulonych na alergeny traw i zbóż było wyższe niż w grupie osób zdrowych (mediana, P – 17,0 U/mL vs K – 8,05 U/mL, AS<sub>1</sub> – 21,5 U/mL vs K – 8,05 U/mL, p<0,05). Stężenie sCD30 w surowicy chorych na astmę alergiczną, uczulonych na roztocza kurzu domowego, nie różniły się w porównaniu z grupą kontrolną (mediana, AS<sub>2</sub> – 10,3 U/mL vs K – 8,05 U/mL; p>0,05). Stężenie Bcl-2 w lizatach limfocytarnych chorych było porównywalne z wartościami w grupie kontrolnej (mediana, AT<sub>1</sub> 350 – U/mL vs K – 277,5 U/mL; p>0,05). Podobnie częstość występowania przeciwciał skierowanych przeciwko aneksynie V (*anti-Annexin V antibodies*) nie różniło się w grupie badanej i kontrolnej (odpowiednio: 47% i 54%). Nie stwierdzono zależności pomiędzy stężeniami badanych cząstek.

**Wnioski.** Cząsteczka sCD30 może odgrywać rolę w patomechanizmie chorób atopowych. Stężenie sCD30 w surowicy chorych na atopowe choroby alergiczne pozostaje bez związku z wartościami stężeń Bcl-2 i przeciwciał *anti-Annexin V*.

**Słowa kluczowe:** sCD30, Bcl-2, przeciwciała anti-Annexin V, alergia, apoptoza

### Summary

**Introduction.** The importance of apoptosis regulating factors in the pathophysiology of atopic disorders is still disputable. CD30 as an apoptosis regulating receptor is suspected to be involved in the immunocompetent cell survival rate that is increased during allergic inflammation.

**Aim of the study.** The aim of presented work was to evaluate the sCD30 molecule concentration in sera obtained from atopic patients and to analyse the relationship between the concentrations of sCD30 and anti-Annexin V antibodies and Bcl-2 oncoprotein.

**Material and methods.** 52 grass allergen-sensitive patients suffering from seasonal rhinitis and/or seasonal asthma, and 26 subjects with mild allergic asthma sensitised to house dust mite antigens were included into the trial. Control group consisted of 24 subjects without any signs of atopy. Immunoenzyme assay for sCD30, Bcl-2 and Anti-annexin V antibodies detection was used (DAKO CD30, ELISA, Bcl-2 Bender MedSystems, Bender MedSystems – anti-Annexin V ELISA). Fluoroimmunoenzyme method was employed for TlgE estimation.

**Results.** The sCD30 concentration was significantly increased in patients suffering from allergic rhinitis and/or seasonal asthma compared to healthy control (median, P – 17.0 U/mL vs K – 8.05 U/mL, AS<sub>1</sub> – 21.5 U/mL vs. K – 8.05 U/mL, p<0.05). Serum sCD30 concentrations in the asthmatic patients sensitised to house dust mite were not different from those noted in the control (median, AS<sub>2</sub> – 10.3 U/mL vs. K – 8.05 U/mL, p>0.05). Bcl-2 molecule concentration in lymphocyte lysates isolated from the atopic subjects was comparable with that determined in the control subjects (median, AT<sub>1</sub> 350 – U/mL vs. K – 277.5 U/mL; p>0.05). The prevalence of anti-Annexin V antibodies was comparable in control and atopic patients (47% vs. 54%, respectively). There was no relationship between the concentrations of the studied molecules.

**Conclusions.** sCD30 could be involved in pathophysiology of some sensitisations. There is no relationship between apoptosis-regulating molecules, such as anti-annexin V antibodies and Bcl-2, and sCD30 concentration.

**Key words:** sCD30, Bcl-2, anti-Annexin V antibodies, allergy, apoptosis

© *Alergia Astma Immunologia*, 2006, 11(1): 35-41

www.mediton.pl/aai

Nadesłano: 15.03.2005

Zakwalifikowano do druku: 14.02.2006

**Adres do korespondencji / Address for correspondence**

Sławomir Żegleń

Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych, Alergologii i Immunologii

Klinicznej, Śląska Akademia Medyczna

41-800 Zabrze, ul. 3-go Maja 13-15

tel/fax. (32) 370 44 08

e-mail: slawekzeglen@poczta.onet.pl

Antygen CD30 należący do nadrodziny receptorów funkcjonalnie związanych z receptorem dla TNF (*Tumor necrosis factor*)/NGF (*nerve growth factor*) związany jest z przekazywaniem sygnału zaprogramowanej śmierci komórki. Jest to białko składające się z 595 aminokwasów, które tworzą trzy domeny: zewnątrzkomórkową, „przez”-błonową i wewnątrzkomórkową [1]. Pod wpływem błonowej cynkowo-zależnej metaloproteiny dochodzi do uwolnienia części zewnątrzkomórkowej – rozpuszczalnej formy CD30 – sCD30 [2]. sCD30 jest glikoproteiną o masie cząsteczkowej 85/88-kDa. Podwyższone stężenia sCD30, które korelowało z nasileniem objawów chorobowych, obserwowano w przebiegu chłoniaków, AILD (zespół angioimmunoblastycznej limfadenopatii z dysproteinemią, uogólnionego ziarniniaka Wegenera [3-6]. W przebiegu infekcji wirusowych (HIV, Epstein-Barr, WZWB), chorób układowych tkanki łącznej (SLE), pemfigoidzie, stwardnienia rozsianego, Zespołu Omen, choroby Gravesa-Basedowa, Hashimoto, Kawasaki oraz pierwotnej żółciowej marskości wątroby również obserwowano podwyższone stężenia sCD30 [7-15]. Stwierdzono także podwyższone wartości stężeń sCD30 w przebiegu atopowego zapalenia skóry [16-18], natomiast wyniki badań dotyczących alergii dróg oddechowych różnią się [19,20].

Istnieją dane wskazujące, iż apoptoza mediowana przez CD30 zachodzi przy współdziałaniu takich czynników jak kaspaza 1 i 3, nie prowadzi do aktywacji NF- $\kappa$ B czy c-Jun, natomiast jest całkowicie hamowana przez Bcl-2 [21]. Bcl-2 należy do białek wewnątrzkomórkowych strukturalnie związanych z błoną mitochondriów. Do ekspresji Bcl-2 dochodzi w komórkach T, B, hemopoetycznych, nabłonkowych, nabłonkowych zmienionych nowotworowo. Wraz z białkiem określonym mianem Bax tworzy heterodimer o właściwościach hamujących proces apoptozy [22].

Oprócz CD30 przekazującego sygnał apoptozy oraz jej inhibitora – Bcl-2, w pracy dokonano równoczesnego oznaczenia innej cząsteczki związanej z apoptozą – stężenia przeciwciał skierowanych przeciw aneksynie V (*anti-Annexin V antibodies*). Aneksyna V należy do rodziny białek cytoplazmatycznych strukturalnie związanych z zależnym od wapnia mechanizmem wiązania fosfolipidów. Struktura białkowa cząsteczki aneksyny jest dobrze poznana. Przy n-końcowej części białka znajduje się tzw. miejsce fosforylacji. Część c-końcowa to rdzeń składający się z czterech, złożonych z 70 aminokwasów, domen [23,24]. Białko to wykazuje powinowactwo do fosfolipidów, w tym szczególnie do fosfatydyloseryny [23,25]. Kompleks fosfatydyloseryny oraz aneksyny V znajdujący się na zewnątrz nietkniętej, w początkowej fazie apoptozy, błony komórkowej stymuluje wytwarzanie autoprotei przeciwciał antyfosfolipidowych. Obecność tych autoprotei stwierdzono w wielu stanach patologicznych: reumatoidalnym zapaleniu stawów, układowym toczeniu rumieniowatym, zakrzepicy żyłnej i tętniczej w przebiegu sa-

moistnych poronień [26-30]. Miano autoprotei skierowanych przeciw aneksynie V jest w części wynikiem nasilenia procesów zaprogramowanej śmierci komórki.

Celem pracy była ocena stężenia sCD30 w surowicy chorych na okresowy, alergiczny nieżyt nosa i astmę alergiczną oraz określenie zależności pomiędzy stężeniami sCD30 w surowicy krwi, onkoproteiny Bcl-2 w lizatach limfocytarnych oraz przeciwciał skierowanych przeciw aneksynie V w osoczu krwi chorych atopowych.

## MATERIAŁ I METODY

### Pacjenci

Badaniami objęto grupę 102 osób, w tym: 78 chorych atopowych (AT), w tym 35 kobiet, 43 mężczyzn w wieku od 15 do 62 lat (średnia wieku – 28,05±10,07) i wyróżniono grupy:

1. P – 35 chorych na okresowy, alergiczny nieżyt nosa (15 kobiet i 20 mężczyzn w wieku 17-50 lat, średnio 27,0±8,7) uczulonych na pyłki traw i zbóż. Objawy choroby kontrolowano stosowaniem leków antyhistaminowych drugiej generacji;
2. AS<sub>1</sub> – 17 chorych na astmę epizodyczną oraz sezonową, alergiczny nieżyt nosa (9 kobiet, 8 mężczyzn w wieku od 17-51 lat, średnio 25,3±9,2) uczulonych na pyłki traw i zbóż. Objawy choroby kontrolowano stosowaniem leków antyhistaminowych drugiej generacji oraz doraźnie b<sub>2</sub>-mimetykami krótko działającymi;
3. AS<sub>2</sub> – 26 chorych na astmę oskrzelową przewlekłą lekką uczulonych na roztozce kurzu domowego (11 kobiet i 15 mężczyzn, w wieku 17-62 lat, średnio 31,5±6,3) leczonych w ostatnim roku b<sub>2</sub>-mimetykami długodziałającymi, preparatami anty-leukotrienowymi i/lub steroidami wziewnymi w dawce nie przekraczającej 400mg/24h w przeliczeniu na budesonid;
4. AT<sub>1</sub> – podgrupa chorych atopowych, składa się z 21 osób uczulonych na pyłki traw i zbóż (chorzy, u których średnia stężeń sCD30 była znamienne wyższa niż w grupie kontrolnej). Jedenastu chorych tej grupy demonstrowało objawy okresowego, alergicznego nieżyty nosa (część grupy P). U dziesięciu, prócz nieżyty nosa, występowały okresowo objawy astmy epizodycznej (część grupy AS<sub>1</sub>). Grupa składała się z 13 mężczyzn i 8 kobiet, średnia wieku – 28,8±8. U tych chorych jednocześnie oznaczono stężenia sCD30, przeciwciał *anti-Annexin V* w osoczu/surowicy krwi oraz Bcl-2 w lizatach limfocytarnych;
5. 24 zdrowych osób nie wykazujących cech atopii – grupa kontrolna [K], 10 kobiet i 14 mężczyzn w wieku od 19 do 41 lat (średnia wieku – 28,7).

Kryteria włączenia: 1/ Uzyskanie pisemnej zgody chorego na badanie; 2/ Astma epizodyczna (wg kryteriów GINA 2004, 31); 3/ Astma oskrzelowa przewlekła lekka (wg kryteriów GINA 2004, 30); 4/ Okresowy alergiczny nieżyt nosa; 5/ Dodatni wynik testów skórnych; 6/ Całkowite

stężenie IgE powyżej 100 kU/L; 7/ Stężenie alergenowo-swoistej IgE powyżej 2 klasy (> 0,7 kU/L).

Kryteria wyłączenia: 1/ Współistnienie innych chorób poza należącymi do kręgu atopii; 2/ Astma o średnio-ciężkim i ciężkim przebiegu (kryteria GINA 2004); 3/ Ujemny wynik testów skórnych; 4/ Całkowite stężenie IgE poniżej 100 kU/L; 5/ Stężenie alergenowo-swoistej IgE poniżej 2 klasy (< 0,7 kU/L); 6/ Współistnienie innych chorób poza okresowym alergicznym nieżytem nosa i astmą oskrzelową; 7/ Chorzy, u których stosowano kortykoterapię systemową w okresie krótszym niż 6 miesięcy poprzedzającym badanie; 8/ Chorzy poddani swoistej immunoterapii w okresie krótszym niż 3 lata poprzedzające badania.

**Metody badań**

Całkowite stężenie IgE (cIgE) w surowicy krwi oznaczono, stosując metodę fluoroimmunoenzymatyczną Pharmacia CAP System IgE FEIA firmy Pharmacia. Oznaczeń dokonano, stosując metodę immunoenzymatyczną przy użyciu zestawów:

- DAKO CD30 (Ki-1 Antigen) ELISA do ilościowego oznaczania rozpuszczalnej formy antygenu CD30 w surowicy krwi,
- Bender MedSystems – anti-Annexin V ELISA przeznaczonego do ilościowego oznaczania stężenia przeciwciał skierowanych przeciw aneksynie V w surowicy lub osoczu krwi ludzkiej,
- Bender MedSystems – Bcl-2 ELISA przeznaczonego do ilościowego oznaczania stężenia Bcl-2 w lizatach limfocytarnych krwi obwodowej. Izolacji limfocytów dokonywano poprzez dodanie do badanej próbki krwi preparatu Gradisol (wirówka, 2000 obrotów/min).

**Analiza statystyczna danych**

W przypadku stężeń przeciwciał anti-Annexin V zastosowano test dla cechy jakościowej – test chi<sup>2</sup>, porównując częstość występowania oznaczalnych (tj. powyżej lub równych 1,8 ng/mL) stężeń przeciwciał *anti-Annexin V* w grupach kontrolnej i badanej. W przypadku sCD30, Bcl-2, TIgE zastosowano testy nieparametryczne (U Manna-Whitney’a) dla niezależnych prób losowych. W ocenie związków pomiędzy danymi zastosowano test korelacji rang Spearmana. Przyjęto poziom istotności p<0.05 jako znamiennej statystycznie.

**WYNIKI**

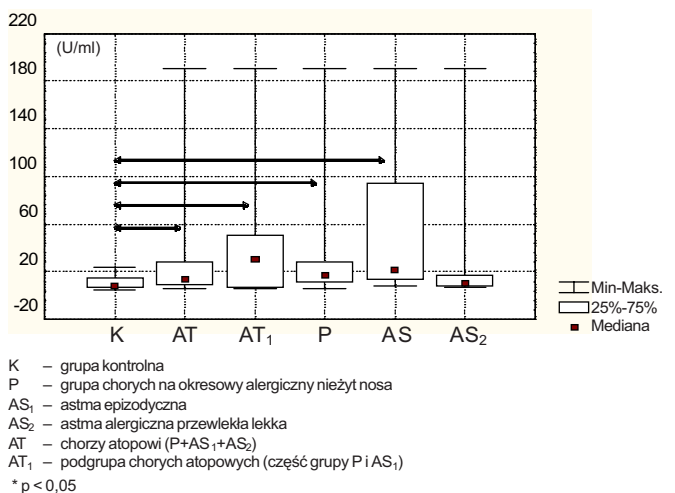
**Ocena stężenia sCD30 w badanych grupach**

Stężenie sCD30 w grupie chorych atopowych było znamiennej wyższe w porównaniu z grupą osób zdrowych (mediana, AT – 14,8 U/mL vs K – 8,05 U/mL, p<0,05; test U Manna-Whitney’a), podobnie jak i w podgrupie badanej (mediana, AT<sub>1</sub> – 18,0 U/mL vs K – 8,05 U/mL test U Manna-Whitney’a, p<0,05).

Stężenie sCD30 w grupie chorych na okresowy, alergiczny nieżyt nosa oraz astmę epizodyczną było także znamiennej statystycznie wyższe niż w grupie osób zdrowych (mediana, P – 17,0 U/mL vs K – 8,05 U/mL, AS<sub>1</sub> – 21,5 U/mL vs K – 8,05 U/mL, p<0,05; test U Manna-Whitney’a).

Nie stwierdzono znamiennej różnicy pomiędzy obiema postaciami alergii pyłkowej (mediana, P – 17,0 U/mL vs AS<sub>1</sub> – 21,5 U/mL, p>0,05; test U Manna-Whitney’a).

Wartości stężeń sCD30 w surowicy chorych na astmę alergiczną przewlekłą lekką (uczulonych na roztocza kurzu domowego) nie różniły się znamiennej w porównaniu z grupą osób zdrowych (mediana, AS<sub>2</sub> – 10,3 U/mL vs K – 8,05 U/mL; p>0,05, test U Manna-Whitney’a), natomiast były znamiennej niższe niż te obserwowane u chorych z sezonowym alergicznym nieżytem nosa (mediana, AS<sub>2</sub> – 10,3 U/mL vs P – 17,0 U/mL) i astmą sezonową (vs AS<sub>2</sub> – 10,3 U/mL vs AS<sub>1</sub> – 21,5 U/mL; test U Manna-Whitney’a, p<0,05).



Ryc. 1. Stężenia sCD30 w badanych grupach

**Ocena całkowitego stężenia IgE w badanych grupach**

Stwierdzono znamiennej statystycznie wyższe stężenia cIgE w grupie osób chorych w porównaniu z grupą kontrolną (mediana, AT – 226,5 kU/L vs K – 20,0 kU/L, AT<sub>1</sub> – 198,0 kU/L vs K – 20,0 kU/L oraz AS<sub>1</sub> – 286,5 kU/L, AS<sub>2</sub> – 284,5 kU/L, P – 200,0 kU/L vs K – 20,0 kU/L; test U Manna-Whitney’a, p<0,05). Nie odnotowano znamienych różnic pomiędzy poszczególnymi grupami chorych.

**Ocena zależności pomiędzy sCD30 a cIgE w badanych grupach**

Nie stwierdzono zależności pomiędzy sCD30 a cIgE w grupie osób chorych rozpatrywanych łącznie jak i wydzielonej podgrupie chorych atopowych (ATr<sub>S</sub> = -0,14; AT<sub>1</sub>r<sub>S</sub> = -0,23, p>0,05, test korelacji rang Spearmana).



Także w wydzielonych grupach badanych nie wykazano istotnej zależności pomiędzy stężeniem sCD30 a stężeniem IgE w surowicy ( $Pr_S = -0,19$ ; astma oskrzelowa  $AS_2r_S = 0,07$ ;  $p > 0,05$ , test korelacji rang Spearmana) z wyjątkiem grupy chorych na astmę epizodyczną ( $AS_1r_S = -0,65$ ;  $p < 0,05$ , test korelacji rang Spearmana). W obrębie tej grupy chorych stwierdzono aż u sześciu osób stężenia sCD30 wyższe od 50 U/mL, a u czterech sięgające 200 U/mL. Skrajnie wysokim wartościom stężeń cIgE w granicach 2000 U/mL (u 3 osób) towarzyszyły niskie (do 20 U/mL) wartości sCD30. Podobną zależność, jednak nie znamiennej statystycznie, zaobserwowano w grupie chorych na okresowy, alergiczny nieżyt nosa. Wartościom cIgE powyżej 1000 U/mL towarzyszyły niskie stężenia sCD30 (u 4 chorych).

Podobną tendencję obserwowano w grupie chorych na astmę alergiczną, skrajnie wysokim wartościom stężeń cIgE w granicach 1000 U/mL towarzyszyły stosunkowo niskie poziomy sCD30 (5 przypadków). Podobnie jak w poprzednim przypadku, zależność ta nie została potwierdzona statystycznie.

Tabela 1. Korelacja pomiędzy stężeniami sCD30 oraz cIgE w badanych grupach

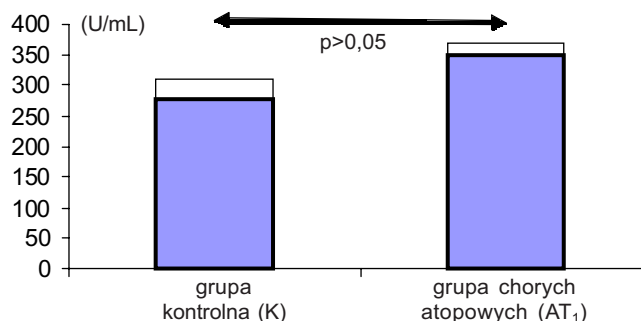
Badana grupa	Korelacja pomiędzy stężeniem sCD30 a stężeniem całkowitej IgE w poszczególnych grupach badanych		
	Liczebność grupy	Współczynnik korelacji rang Spearmana [ $r_S$ ]	poziom istotności
P	35	-0,19	$p > 0,05$
AS <sub>1</sub>	17	-0,65	$p < 0,05$
AS <sub>2</sub>	26	0,07	$p > 0,05$
AT (P+AS <sub>1</sub> +AS <sub>2</sub> )	78	-0,14	$p > 0,05$
AT <sub>1</sub>	24	-0,23	$p > 0,05$

Legenda:

- K – grupa kontrolna
- P – grupa chorych na okresowy alergiczny nieżyt nosa
- AS<sub>1</sub> – astma epizodyczna
- AS<sub>2</sub> – astma alergiczna przewlekła lekka
- AT – chorzy atopowi (P+AS<sub>1</sub>+AS<sub>2</sub>)
- AT<sub>1</sub> – podgrupa chorych atopowych (część grupy P i AS<sub>1</sub>)

### Stężenia Bcl-2 w lizatach limfocytarnych pochodzących od chorych atopowych. Zależność pomiędzy stężeniami sCD30 a Bcl-2

Stężenie Bcl-2 w lizatach limfocytów izolowanych od chorych było porównywalne z wartością oznaczeń przeprowadzonych w grupie kontrolnej (mediana, AT<sup>1</sup> 350 – U/mL vs K – 277,5 U/mL;  $p > 0,05$ , test U Manna-Whitney'a). Nie stwierdzono znamiennej korelacji pomiędzy stężeniem sCD30 a Bcl-2 u badanych chorych ( $r_{AT} = 0,28$ ;  $p > 0,05$ , test korelacji rang Spearmana).



Ryc. 2. Stężenie Bcl-2 (lizaty limfocytarne) w grupie kontrolnej (K) i w podgrupie badanej AT<sub>1</sub> (U Mann-Whitney'a)

### Stężenie przeciwciał skierowanych przeciwko aneksynie V (anti-Annexin V) u chorych atopowych. Zależność pomiędzy stężeniami przeciwciał anti-Annexin V a sCD30

Średnie stężenie przeciwciał skierowanych przeciwko aneksynie V (*anti-Annexin V antibodies*) było porównywalne ze stężeniem tych przeciwciał w grupie osób zdrowych (AT<sup>1</sup> – 1,5 ng/mL vs K – 1,9 ng/mL,  $p > 0,05$ , test U Manna-Whitney'a). Ze względu na fakt, iż otrzymany wynik zawarty był w granicach podwójnej wartości odchylenia standardowego traktowano stężenie przeciwciał jako cechę jakościową. W grupie kontrolnej u 13 spośród 24 (54,1%) osób wartość stężenia przeciwciał *anti-Annexin V* była wyższa od wartości określającej czułość metody (tzn. powyżej 1,8 ng/mL). W grupie osób chorych wartości powyżej 1,8 ng/mL stwierdzono u 10 chorych spośród 21 (47,6%). Nie stwierdzono różnicy częstości występowania oznaczalnego (tj. powyżej 1,8 ng/mL) stężenia przeciwciał *anti-Annexin V* pomiędzy grupą osób zdrowych a grupą badaną (test  $\chi^2$ ,  $p > 0,05$ ). Nie stwierdzono także istotnej zależności pomiędzy stężeniem sCD30 i przeciwciał *anti-Annexin V*, uwzględniając tylko chorych, u których stężenie *anti-Annexin V* było wyższe lub równe 1,8 ng/mL ( $r_{AT} = -0,25$ ;  $p > 0,05$ , test korelacji rang Spearmana).

## DYSKUSJA

W pracy stwierdzono znamienne wyższe stężenia molekuly sCD30 u chorych, u których rozpoznano okresowy, alergiczny nieżyt nosa i/lub astmę epizodyczną wywołaną alergenami pyłków tymotki łąkowej i żyta zwyczajnego. Stężenie sCD30 u chorych na astmę alergiczną, uczulonych na alergeny roztoczy kurzu domowego, nie różniło się od stężeń tego parametru obserwowanych w grupie osób zdrowych.

Wyniki te sugerują, iż stężenie sCD30 może odgrywać rolę w patofizjologii chorób alergicznych związanych z określonym rodzajem uczulenia.

Istnieją badania, które wskazują na wzrost stężenia sCD30 u chorych na atopowe zapalenie skóry [16,17-19]. Udowodniono dodatnią korelację pomiędzy stopniem nasilenia objawów choroby a stężeniem sCD30 w surowicy chorych [16,18,32]. Dane dotyczące alergii dróg oddechowych są sprzeczne. Z jednej strony nie obserwowano różnicy pomiędzy wartościami stężeń sCD30 oznaczanych u chorych na okresowy, alergiczny nieżyt nosa i/lub astmę oskrzelową oraz u osób zdrowych [19]. Z kolei Leonard [33] wykazał podwyższone stężenia sCD30 u chorych na astmę przewlekłą. W przeciwieństwie jednak do formy błonowej, której stopień ekspresji dodatnio korelował ze stopniem ciężkości choroby, stężenie cząsteczki rozpuszczalnej nie wykazywało takiej zależności. Wyniki uzyskane w cytowanej pracy cechują się dużą rozpiętością wartości zmiennej określającej stężenie sCD30 (przy średniej 29,75U/mL wartość SEM wynosiła 18,1). Podobny zakres wartości zmiennej cechuje wyniki niniejszej pracy. Obserwacje te wskazują, że istnieje duża osobnicza zmienność stężeń sCD30 w surowicy, co utrudnia jednoznaczną ocenę znaczenia tego parametru jako markera procesu chorobowego. Latza [20] w badaniu populacyjnym stwierdził wyższe stężenia sCD30 u chorych na atopowe choroby alergiczne w porównaniu z wartościami oznaczanymi u osób zdrowych. Przeprowadzono również ocenę wpływu leczenia (flutikazon, 1mg/dobę) chorych na astmę ciężkiego stopnia na zachowanie się sCD30, stwierdzając znamienne obniżenie się stężenia tego parametru po stosowanym leczeniu [34]. Stężenie sCD30 w surowicy krwi jest wypadkową trzech procesów:

1. ekspresji formy błonowej,
2. aktywności enzymu odpowiedzialnego za odszczepienie sCD30,
3. aktywnego wiązania już rozpuszczonego sCD30.

Regulacyjna rola receptora CD30 w przekazywaniu i regulacji procesów różnicowania i wzrostu komórek jest udowodniona. Stężenie sCD30 w chorobach atopowych nie jest wynikiem prostej zależności pomiędzy gęstością błonowego CD30 a stężeniem formy rozpuszczalnej.

Różnica w stężeniu sCD30 pomiędzy grupami chorych uczulonych na różne alergeny wziewne może być rezultatem odmiennego przebiegu klinicznego choroby, wynikającego z sezonowości i stopnia nasilenia ekspozycji alergenowej. U chorych z alergią na pyłki traw i zbóż oznaczano stężenie sCD30 w okresie szczytu narażenia na działanie uczulającego alergenu. Można ponadto z pewnym prawdopodobieństwem założyć, że różny rodzaj alergii warunkowany jest współdziałaniem różnych receptorów z nadrodziny dla TNF, gdyż w warunkach *in vitro* stymulacja komórek T oczyszczonym alergenem *Dermatophagoides pteronyssinus* powoduje przejściowy wzrost stopnia ekspresji Fas. Z kolei dodanie do hodowli komórek cytokin typu Th-2, takich jak IL-4, IL-5, GM-CSF powoduje zależne od dawki znamienne i swoiste obniżenie ekspresji mRNA (*messenger RNA*) dla receptora Fas [35].

W pracy wykazano ujemną korelację pomiędzy stężeniem sCD30 a całkowitym stężeniem IgE jedynie w grupie chorych na okresowy, alergiczny nieżyt nosa z towarzyszącymi objawami astmy w okresie nasilonej ekspozycji alergenowej. CD30L indukuje proliferację komórek B i stymuluje wydzielanie immunoglobulin IgE w obecności IL-4 i IL-5 w odpowiedzi na działanie alergenu [36]. Antygen CD30 ściśle reguluje przekazywany przez CD40 sygnał regulujący różnicowaniem i proliferacją nieswoistych komórek B [37]. Stwierdzono wzmożoną ekspresję mRNA dla CD30 w obrębie komórek jednojądrzastych krwi obwodowej i odnotowano znamienne dodatnią korelację ( $r=0,79$ ) z cIgE [38]. Należy jednak nadmienić, iż opisywana zależność dotyczyła jedynie chorych, u których stężenie IgE było wyższe niż 300 U/mL. W niniejszej pracy dokonano także podziału chorych według stężeń TIgE na chorych, u których stężenie było wyższe niż 200 kU/L, 300 kU/L, 500 kU/L oraz 1000 kU/L. Przeprowadzono analizę zależności pomiędzy stężeniem sCD30 a TIgE w odpowiednich podgrupach, nie stwierdzając znamiennej zależności w żadnym z wyróżnionych przedziałów. Te wyniki są zgodne z wynikami innych, którzy również zaprzeczają korelacji pomiędzy sCD30 i TIgE [34,39], a stwierdzona znamienne korelacja w grupie chorych na astmę sezonową ma, wg autorów, charakter przypadkowy.

W niniejszej pracy badano stężenie przeciwciał skierowanych przeciwko aneksynie V. Oceniono ponadto zależność pomiędzy stężeniem tych przeciwciał a stężeniem sCD30. Opierając się na słusznym założeniu, że procesy hiperergiczne są związane z przedłużoną żywotnością komórek, należałoby oczekiwać, iż przeciwciała *anti-Annexin V* będą u osób chorych na choroby alergiczne występować rzadziej lub w mniejszym stężeniu. Oznaczalne stężenia przeciwciał stwierdzono jednak u połowy zarówno badanych, jak i zdrowych osób, nie wykazując różnicy w częstości występowania przeciwciał *anti-Annexin V* pomiędzy chorymi a grupą osób zdrowych. Ważny jest jednak fakt, że apoptoza i związany z nią proces przenoszenia fosfatydyloseryny na zewnątrz błony komórkowej dotyczą, oprócz limfocytów, również innych komórek, np. monocytów, komórek mięśni gładkich naczyń, komórek endotelialnych. Stąd ewentualna różnica w częstości ich występowania pomiędzy osobami zdrowymi a chorymi mogłaby wynikać z zaburzenia apoptozy różnych populacji komórek, niekoniecznie limfocytów. Bardziej istotne dla niniejszej pracy byłoby stwierdzenie istotnej zależności pomiędzy przeciwciałami *anti-Annexin V* a sCD30.

Aneksyna V stanowi użyteczny marker apoptozy komórek jednojądrzastych. Znane są nieliczne prace oceniające ekspresję kompleksu fosfatydyloseryna/aneksyna V w przebiegu chorób alergicznych. Granulocyty pochodzące z płukania oskrzelikowo-pęcherzykowego zwierząt z wywołaną doświadczalnie astmą oskrzelową, poddane działaniu aneksyną V/jodkiem propidyny, wykazywały wzmożoną przeżywalność [40]. Za pomocą metody

z zastosowaniem aneksyny V/jodku propidyny udowodniono istnienie zaburzenia apoptozy eozynofili u chorych na astmę [41,42]. Defekt apoptozy odpowiedzialny za prze-wleknięcie się reakcji hiperergicznym prawdopodobnie dotyczy bardzo nielicznej subpopulacji komórek T Dane dotyczące sygnału wewnątrzkomórkowego wywołwanego stymulacją CD30 są niejednoznaczne.

W doświadczeniach przeprowadzonych na myszach transgenicznych limfocyty T, wykazujące nadmierną ekspresję antygeny CD30, ulegają zaprogramowej śmierci komórkowej, przy jednoczesnej stymulacji antygeny CD30 i TCR. Apoptoza mediowana przez CD30 zachodzi przy współdziałaniu takich czynników, jak kaspaza 1 i 3, nie prowadzi do aktywacji NF- $\kappa$ B czy c-Jun, natomiast jest całkowicie hamowana przez Bcl-2. Aby zbadać, czy apoptoza mediowana przez CD30 ulega modelowaniu przez Bcl-2, transgeniczne myszy CD30+ skrzyżowano z transgenicznym szczepem myszy o symbolu Bcl-2-25 Wehi, którego limfocyty T wykazują nadmierną ekspresję Bcl-2. Komórki T otrzymane z transgenicznych szczepów CD30+/Bcl-2+ wykazywały całkowitą oporność na apoptozę mediowaną przez receptor CD30 [21]. Dokonano także oceny ekspresji Bcl-2 w obrębie eozynofili pochodzących z płucociny osób chorych na atopową astmę oskrzelową. Stwierdzono dodatnią korelację pomiędzy ilością eozynofili Bcl-2+ a stopniem nasilenia objawów chorobowych i stężeniem IL-5 i ECP [43]. Stosowanie steroidów powodowało wzmożenie ekspresji Bcl-2 w biopatach pochodzących od chorych [44]. Nie stwierdzono obecności w warunkach patologicznych stymulującego wpływu IL-5 i GM-CSF na ekspresję Bcl-2 [45]. W niniejszej pracy dokonano analizy stężenia Bcl-2 uwolnionego po lizie limfocytów izolowanych z krwi obwodowej oraz oceny zależności stężenia tej onkoproteiny w liza-

tach limfocytarnych i sCD30 w surowicy krwi. Stężenia Bcl-2 były porównywalne u osób chorych i zdrowych. Nie stwierdzono ponadto znamiennej zależności pomiędzy sCD30 a Bcl-2. Wy tłumaczeniem może być fakt, iż opisywana zależność – hamowanie mediowanej przez CD30 apoptozy poprzez Bcl-2 – opisywana jest głównie w badaniach na zwierzętach doświadczalnych. U ludzi hamowanie zaprogramowanej śmierci limfocytów może zachodzić przy udziale innych inhibitorów. Możliwe także jest, iż ewentualne zahamowanie apoptozy limfocytów T mediowane przez CD30 ma inną alternatywną dla Bcl-2 ścieżkę. Dowodem na istnienie różnych dróg przekazywania sygnału apoptozy przez ten sam receptor należący do nadrodziny dla TNF jest przykład receptora Fas (CD95). Aktywacja Bcl-2 blokuje apoptozę stymulowaną nieswoiście, np. poprzez deksametazon, natomiast tylko częściowo prowadzi do zahamowania tego procesu, wówczas gdy elementem przekazującym jest receptor Fas. Bcl-2 zapobiega apoptozie głównie poprzez protekcję mitochondriów. Bardzo prawdopodobne jest, iż w przypadku CD30 również istnieje kilka alternatywnych dróg aktywacji czy hamowania apoptozy. Przytoczone dane dotyczące antygeny Fas oraz wyniki uzyskane w niniejszej pracy, tzn. brak zależności pomiędzy sCD30 a Bcl-2 dowodzi, iż hamowanie apoptozy limfocytów w przebiegu chorób z kręgu atopii zachodzi w innym niż Bcl-2 – zależnym mechanizmie.

Podsumowując, cząsteczka sCD30 – pochodna systemu receptorowego CD30/CD30L – odgrywa rolę w patomechanizmie chorób atopowych. Stężenie sCD30 w surowicy krwi chorych na choroby alergiczne z kręgu atopii jest zależne od rodzaju uczulającego alergenu i pozostaje bez związku z wartościami stężeń Bcl-2 i przeciwciał *anti-Annexin V*, czynnikami związanymi z procesem zaprogramowanej śmierci komórek.

## Piśmiennictwo

1. Durkop H, Latza U, Hummel M, Eitelbach F, Seed B, Stein H. Molecular cloning and expression of a new member of the nerve growth factor receptor family that is characteristic for Hodgkin's disease. *Cell* 1992; 68: 421-427.
2. Hansen HP, Kisseleva T, Kobarg J, Horn-Lohrens O, Havsteen B, Lemke H. A zinc metalloproteinase is responsible for the release of CD30 on human tumor cell lines. *Int. J. Cancer*. 1995; 63: 750-756.
3. Nadali G, Vinante F, Chilosi M, Pizzolo G. Soluble molecules as biological markers in Hodgkin's disease. *Leuk. Lymphoma* 1997; 26: 99-105.
4. Wang G, Hansen H, Tatsis E, Csernok E, Lemke H, Gross WL. High plasma levels of the soluble form of CD30 activation molecule reflect disease activity in patients with Wegener's granulomatosis. *Am. J. Med.* 1997; 102: 517-523.
5. Zanotti R, Trolese A, Ambrosetti A, Nadali G, Visco C, Ricetti MM, Benedetti F, Pizzolo G. Serum levels of soluble CD30 improve International Prognostic Score in predicting the outcome of advanced Hodgkin's lymphoma. *Ann. Oncol.* 2002; 13: 1908-1914.
6. Biswas P, Mantelli B, Delfanti F, Ferrarini M, Poli G, Lazzarin A. CD30 ligation differentially affects CXCR4-dependent HIV-1 replication and soluble CD30 secretion in non-Hodgkin cell lines and in gamma delta T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 2003; 33: 3136-3145.
7. Caligaris D, Cappio F, Bertero MT, Converso M, Stacchini A, Vinante F, Romagnani S, Pizzolo G. Circulating levels of soluble CD30, a marker of cells producing Th2 type cytokines, are increased in patients with systemic lupus erythematosus and correlate with disease activity. *Clin. Exp. Rheumatol.* 1995; 13: 339-343.
8. De-Paoli P, Zanussi S, Simonelli C, Bortolin MT, D'Andrea M, Crepaldi C, Talamini R, Comar M, Giacca M, Tirelli U. Effects of subcutaneous interleukin 2 therapy on CD4 subsets and in vitro cytokine production in HIV+ subjects. *J. Clin. Invest.* 1997; 100: 2737-2743.
9. De-Pita O, Frezzolini A, Cianchini G, Ruffelli M, Teofoli P, Puddu P. T helper 2 involvement in the pathogenesis of bullous pemphigoid: role of soluble CD30 (sCD30). *Arch. Dermatol. Res.* 1997; 289: 667-670.
10. Fattovich G, Vinante F, Giustina G, Morosato L, Alberti A, Ruol A, Pizzolo G. Serum levels of soluble CD30 in chronic hepatitis B virus infection. *Clin. Exp. Immunol.* 1996; 103: 105-110.
11. Krams SM, Cao S, Hayashi M, Villanueva JC, Martinez OM. Elevations in IFN gamma, IL 5, and IL 10 in patients with the autoimmune disease primary biliary cirrhosis: association with autoantibodies and soluble CD30. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1996; 80: 311-320.



12. McMillan SA, McDonnell GV, Douglas JP, Droogan AG, Hawkins SA. Elevated serum and CSF levels of soluble CD30 during clinical remission in multiple sclerosis. *Neurology* 1998; 51: 1156-1160.
13. Okumura M, Hidaka Y, Kuroda S, Takeoka K, Tada H, Amino N. Increased serum concentration of soluble CD30 in patients with Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1997; 82: 1757-1760.
14. Rizzardi GP, Barcellini W, Tambussi G, Lillo F, Malnati M, Perrin L, Lazzarin A. Plasma levels of soluble CD30, tumour necrosis factor (TNF) alpha and TNF receptors during primary HIV 1 infection: correlation with HIV 1 RNA and the clinical outcome. *AIDS* 1996; 10: 45-50.
15. Vagliasindi C, Spinozzi F, Sensi L, Radicioni M, De Rosa O, Solinas L, Vaccaro R, Bertotto A. Soluble CD30 serum antigen in Kawasaki disease. *Acta. Paediatr.* 1997; 86: 317-318.
16. Caproni M, Bianchi B, D'Elisio MM, De-Carli M, Amedei A, Fabbri P. In vivo relevance of CD30 in atopic dermatitis. *Allergy* 1997; 52: 1063-1070.
17. Bottari V, Frezzolini A, Ruffeli M, Puddu P, Fontana L, De Pita O. Cyclosporin A (CyA) reduces sCD30 serum levels in atopic dermatitis: a possible new immune intervention. *Allergy* 1999; 54: 507-510.
18. Di Lorenzo G, Gangemi S, Merendino RA, Minciullo PL, Cannavo SP, Martinelli N, Mansueto P, Rini GB, Corrocher R, Pacor ML. Serum levels of soluble CD30 in adult patients affected by atopic dermatitis and its relation to age, duration of disease and Scoring Atopic Dermatitis. *Mediators Inflamm.* 2003; 12: 123-125.
19. Dummer W, Brocker EB, Bastian BC. Elevated serum levels of soluble CD30 are associated with atopic dermatitis, but not with respiratory atopic disorders and allergic contact dermatitis. *Br. J. Dermatol.* 1997; 137: 185-187.
20. Latza U, Davis S, Wilhelm D, McKnight B, Seyfarth M, Stein H. Soluble cytokine receptor CD30 in atopic disorders: a case-control study. *Clin. Exp. Allergy* 1999; 29: 97-104.
21. Chiarle R, Podda A, Prolla G, Podack ER, Thorbecke GJ, Inghirami G. CD30 overexpression enhances negative selection in the thymus and mediates programmed cell death via a Bcl-2-sensitive pathway. *J. Immunol.* 1999; 163:194-205.
22. Reed JC, Miyashita T, Takayama S, Wang HG, Sato T, Krajewski S, Aime-Sempe C, Bodrug S, Kitada S, Hanada M. BCL-2 family proteins: regulators of cell death involved in the pathogenesis of cancer and resistance to therapy. *J. Cell Biochem.* 1996; 60: 23-32.
23. Andree HA, Reutelingsperger CP, Hauptmann R, Hemker HC, Hermens WT, Willems G.M. Binding of vascular anticoagulant alpha (VAC alpha) to planar phospholipid bilayers. *J. Biol. Chem.* 1990; 265:4923-4928.
24. Dubois T, Oudinet JP, Mira JP, Russo-Marie F. Annexins and protein kinases C. *Biochim. Biophys. Acta.* 1996; 1313: 290-294.
25. Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J. Immunol.* 1992; 148: 2207-2216.
26. Kaburaki J, Kuwana M, Yamamoto M, Kawai S, Ikeda Y. Clinical significance of anti-annexin V antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *Am. J. Hematol.* 1997; 54: 209-213.
27. Ogawa H, Zhao D, Dlott JS, Cameron GS, Yamazaki M, Hata T, Triplett DA. Elevated anti-annexin V antibody levels in antiphospholipid syndrome and their involvement in antiphospholipid antibody specificities. *Am. J. Clin. Pathol.* 2000; 114: 619-628.
28. Reutelingsperger CP, van Heerde WL. Annexin V, the regulator of phosphatidylserine-catalyzed inflammation and coagulation during apoptosis. *Cell Mol. Life Sci.* 1997; 53: 527-532.
29. Rodriguez-Garcia MI, Fernandez JA, Rodriguez A, Fernandez MP, Gutierrez C, Torre-Alonso JC. Annexin V autoantibodies in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 1996; 55: 895-900.
30. Roubey RA. Update on antiphospholipid antibodies. *Curr. Opin. Rheumatol.* 2000; 12: 374-378.
31. GINA 2002. Światowa strategia rozpoznawania, leczenia i prewencji astmy. *Medycyna Praktyczna* 2002, 6. Raport NHLBI/WHO. Uaktualniona (2002 r.) wersja dokumentu opublikowanego w styczniu 1995 roku. Global Initiative for Asthma, National Institutes of Health. National Heart, Lung, and Blood Institute.
32. Folster-Holst R, Henseler T, Wehde J, Lemke H, Weichenthal M, Christophers E, Hansen HP. Soluble CD30 plasma concentrations correlate with disease activity in patients with atopic dermatitis. *Acta Derm. Venereol.* 2002; 82: 245-248.
33. Leonard C, Tormey V, Faul J, Burke CM, Poulter LW. Allergen-induced CD30 expression on T cells of atopic asthmatics. *Clin. Exp. Allergy* 1997; 27: 780-786.
34. Purello-D'Ambrosio F, Gangemi S, Ruello G, Marotta G, Merendino RA. Effect of fluticasone propionate on soluble CD30 release in patients with severe allergic asthma. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 2000; 10: 283-285.
35. Spinozzi F, Agea E, Fizzotti M. Role of T-helper type 2 cytokines in down-modulation of Fas mRNA and receptor on the surface of activated CD4(+) T cells: molecular basis for the persistence of the allergic immune response. *FASEB J* 1998; 12: 1747-1753.
36. Shanebeck KD, Maliszewski CR, Kennedy MK, Picha KS, Smith CA, Goodwin RG, Grabstein KH. Regulation of murine B cell growth and differentiation by CD30 ligand. *Eur. J. Immunol.* 1995; 25: 2147-2153.
37. Cerutti A, Schaffer A, Shah S, Zan H, Liou HC, Goodwin RG, Casali P. CD30 is a CD40 inducible molecule that negatively regulates CD40 mediated immunoglobulin class switching in non antigen selected human B cells. *Immunity* 1998; 9: 247-256.
38. Esnault S, Benbernou N, Lavaud F, Guenounou M. Spontaneous CD30 mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells from atopic patients with high IgE serum levels. *Clin. Exp. Immunol.* 1996; 106: 67-72.
39. Bengsston A, Holm M, Back O, Fransson J, Scheynius A. Elevated serum levels of soluble CD30 in patients with atopic dermatitis (AD). *Clin. Exp. Immunol.* 1997; 109: 533-537.
40. Turlej RK, Fievez L, Sandersen CF, Dogne S, Kirschvink N, Lekeux P, Bureau F. Enhanced survival of lung granulocytes in an animal model of asthma: evidence for a role of GM-CSF activated STAT5 signalling pathway. *Thorax* 2001; 56: 696-702.
41. Blaylock MG, Sexton DW, Walsh GM. Ligation of CD45 and the isoforms CD45RA and CD45RB accelerates the rate of constitutive apoptosis in human eosinophils. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1999; 104:1244-1250.
42. Peacock CD, Misso NL, Watkins DN, Thompson PJ. PGE 2 and dibutyryl cyclic adenosine monophosphate prolong eosinophil survival in vitro. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1999; 104:153-162.
43. An-Soo J, Inseon-SC, Soong L, Jeong-Pyeong S, Seung-Won Y, Chang-Soo P. Bcl-2 expression in sputum eosinophils in patients with acute asthma. *Thorax*, 2000; 55: 370-374.
44. Druilhe A, Wallaert B, Tsicopoulos A, Lapa e Silva JB, Tillie-Leblond I, Tonnel AB, Pretolani M. Apoptosis, proliferation, and expression of Bcl-2, Fas, and Fas Ligand in bronchial biopsies from asthmatics. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1998; 19: 747-757.
45. Dibbert B, Daigle I, Braun D, Schranz C, Weber M, Blaser K, Zangemeister-Wittke U, Akbar AN and Simon HU. Role for Bcl-x<sub>L</sub> in delayed eosinophil apoptosis mediated by Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor and Interleukin-5, *Blood* 1998; 92: 778-783.