

Ekspresja receptora CCR2 na komórkach jednojądrowych krwi obwodowej chorych z alergią atopową: odniesienie do apoptozy

Expression of CCR2 receptors on peripheral blood mononuclear cells from patients with atopic allergy: relation to apoptosis

JANINA ŁUCJA GRZEGORCZYK^{1/}, MACIEJ CHAŁUBIŃSKI^{2/}, ANETA GRZELAK^{1/}, MARZANNA JARZĘBSKA^{2/},
MAREK L. KOWALSKI^{2/}

^{1/}Zakład Laboratoryjnej Immunologii Medycznej Katedry Endokrynologii i Chorób Metabolicznych UM w Łodzi

^{2/}Klinika Immunologii, Reumatologii i Alergii Katedry Immunologii UM w Łodzi

Summary

Introduction. Immune cells reaching the inflammatory site secrete chemokines such as CC family chemokines (MCP-1,2,3,4, MIP-1 alpha and RANTES) and eotaxin, which are engaged in the signal transmission: cell-cell and cell-matrix. It has been shown that signals transmitted through CCR2 receptor lead to the decrease of inflammatory cells progenitors' proliferation, but, on the other hand, can increase their survival

Aim of the study. The aim of the study was to compare CCR2 expression on PBMCs (lymphocytes and monocytes) in allergic patients and healthy donors in the context of cell apoptosis.

Material and methods. Mononuclear cells were isolated from peripheral blood of 10 patients with asthma and/or allergic rhinitis and 9 healthy non-atopic donors without any symptoms of airway disease. CCR2 expression and apoptosis were analyzed using flow cytometer. MCP-1 and IL-2 concentrations were analyzed in supernatants using ELISA method.

Results. In allergic patients, CCR2 expression on PBMCs and on monocytes was significantly higher than in healthy subjects. PHA and LPS increased CCR2 expression on PBMCs and lymphocytes after 48 hours of incubation and this enhancement was significantly higher in allergic patients than in healthy donors. The percentage of apoptotic PBMCs in non-stimulated as well as LPS-induced cultures was significantly higher in allergic patients as compared to healthy subjects. The correlation between CCR2 expression and apoptosis of non-stimulated PBMCs has been observed.

Conclusion. CCR2 receptor may be involved in the pathogenesis of allergic inflammation.

Key words: CCR-2, chemokines, MCP-1, IL-2, allergy, apoptosis

Streszczenie

Wprowadzenie. Napływające – do miejsca toczącego się zapalenia – komórki są źródłem wielu mediatorów, w tym chemokin z rodziny CC-, np. MCP-1,-2,-3,-4; MIP-1 alfa, MIP-1 beta, RANTES czy eotaksyny, które poprzez receptory CCR biorą udział w przekazywaniu sygnałów komórka-komórka i komórka-macierz. Stwierdzono, że sygnały przekazywane przez receptor CCR2 z jednej strony ograniczają proliferację komórek progenitorowych, z drugiej zaś nasila się przeżywalność tych komórek.

Cel pracy. Porównanie ekspresji receptora CCR2 na komórkach jednojądrowych krwi obwodowej (limfocytach i monocytych) chorych z alergią atopową i osób zdrowych w odniesieniu do apoptozy.

Materiał i metody. Komórki jednojądrowe izolowano z krwi obwodowej od 10. chorych na atopową astmę oskrzelową i/lub alergiczny nieżyt nosa oraz 9. osób zdrowych bez cech atopii i innych schorzeń ze strony układu oddechowego. U wszystkich badanych oznaczono ekspresję receptora CCR2 oraz apoptozę. Badania wykonano techniką cytometrii przepływowej z zastosowaniem przeciwciał monoklonalnych habCCR2/RPE oraz zestawu AnnexinV/FITC i PI dla oceny apoptozy. Ponadto, w nadsączach pozyskanych po hodowli komórek – met. ELISA – oznaczono stężenie MCP-1 oraz IL-2.

Wyniki. U chorych stwierdzono istotnie wyższy odsetek komórek CCR2+ w pełnej puli oraz monocytach w porównaniu ze zdrowymi. Po 48 godz. hodowli w obecności PHA lub LPS, obserwowano istotny wzrost komórek CCR2+ w pełnej puli oraz populacji limfocytów chorych z alergią atopową w porównaniu ze zdrowymi. Po 48 godz. hodowli spontanicznej jak również stymulowanej LPS – u chorych wykazano istotnie wyższy odsetek komórek wykazujących wczesną apoptozę w porównaniu ze zdrowymi. Wykazano istotną korelację pomiędzy ekspresją receptora CCR2 i apoptozą komórek jednojądrowych badanych pacjentów.

Wnioski. Receptory CCR2 mogą brać udział w rozwoju zapalenia alergicznego.

Słowa kluczowe: receptor CCR2, alergja, chemokiny, IL-2, MCP-1, apoptoza

© Alergia Astma Immunologia, 2007, 12(4): 210-220

www.mediton.pl/aa

Nadesłano / received: 10.12.2007

Zakwalifikowano do druku / accepted: 08.01.2008

Adres do korespondencji / Address for correspondence

Janina Łucja Grzegorzczak
Zakład Laboratoryjnej Immunologii Medycznej Katedry Endokrynologii i Chorób Metabolicznych UM, ul. Pomorska 251, 92-213 Łódź
tel. (42) 675 73 09, fax (42) 678 22 92, e-mail: nina_grzegorzczak@op.pl

Badania finansowane przez Uniwersytet Medyczny w ramach tematu: 502-11-247

The study financed by the Medical University of Lodz: Project 502-11-247

Mechanisms involved in activation, development and dynamics of allergic airways inflammation have not been yet precisely identified and explained. Cells gathering at the place of allergic reaction are the source of various mediators – including CC family chemokines – participating, via CCR receptors, in transmitting signals cell-cell and cell-matrix. Strong activating and chemotactic activity in relation to basophils, eosinophils, monocytes and T-lymphocytes, but also neutrophils, characterizes MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1) [1,2,3]. There was also demonstrated that smooth muscle cells of human airways synthesize MCP-1 [4]. The ligand of this cytokine is CCL-2 and interaction between CCL-2 and CCR2 receptor is an important mechanism in T-lymphocytes differentiation and regulation of immunological response Th1/Th2 [5]. CCR2 receptor was identified on the surface of activated T-lymphocytes, memory cells and other cell types (macrophages, dendritic cells, or fibroblasts) [7]. In vitro studies demonstrated that CD4⁺ lymphocytes activated by antigen-loaded APCs, in the presence of CCL2 or TCR, synthesized more IL-4 than IFN-gamma. Activity in the presence of CCL2 was increased in T-lymphocytes population containing memory cells and previously activated T-cells expressing CCR2 receptor after several days activation with anti-CD3 and anti-CD28, but no “naïve” T-lymphocytes [8,9]. Receptors expression is regulated also by different “inflammatory” factors [10] and cytokines. In addition, for example, IL-2 induces and maintains CCR2 expression on T-lymphocytes, whereas cell activation by CD3 complex can inhibit CCR2 expression. The source of mediators influencing the expression of CCR2 are monocytes secreting IL-1 β , TNF α , IFN- γ , MCP-1 or PGE2. There was demonstrated that PGE2 stimulates MCP-1 release from mast cells [11].

Increased synthesis, release of cytokines and other allergic inflammatory mediators, caused by activation of cells gathered by chemotaxis at the place of allergic reaction, significantly influence their survival [12]. Previous own studies demonstrated escalation of apoptosis process of lymphocytes in patients with atopic allergy [13]. Reduction of apoptosis of monocytes isolated from peripheral blood of patients with atopic dermatitis, allergic rhinitis and/or bronchial asthma as compared with healthy controls was also demonstrated. Monocytes from allergic patients were insensitive to IL-4, which stimulated the cells from healthy people [14].

The aim of the study was to compare the expression of CCR2 receptor on mononuclear cells of peripheral blood of patients with atopic allergy and healthy volunteers, in relation to apoptosis.

Mechanizmy włączone w aktywację, rozwój i dynamikę zapalenia alergicznego dróg oddechowych nie są jeszcze dokładnie zidentyfikowane i wyjaśnione. Napływające do miejsca reakcji alergicznej komórki, są źródłem wielu mediatorów – w tym chemokin z rodziny CC – które poprzez receptory CCR biorą udział w przekazywaniu sygnałów komórka-komórka, komórka-macierz. Silnym aktywatorem i chemoatraktantem dla bazofili, eozynofili, monocytów i limfocytów T, ale także neutrofilii, jest MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1) [1,2,3]. Wykazano także, że komórki mięśni gładkich ludzkich dróg oddechowych syntetyzują MCP-1 [4]. Ligandem dla tej cytokiny jest CCL-2 a interakcja CCL-2 z receptorem CCR2 jest ważnym mechanizmem w różnicowaniu limfocytów T oraz regulowaniu odpowiedzi immunologicznej Th1/Th2 [5]. Obecność receptora CCR2 obserwowano na aktywowanych limfocytach T, komórkach pamięci oraz innych (makrofagi, komórki dendrytyczne czy fibroblasty) [7]. W badaniach in vitro wykazano, że limfocyty CD4⁺ aktywowane przez komórki APC „naładowane antygenem”, w obecności CCL2 lub TCR, syntetyzowały więcej IL-4 niż IFN-gamma. Aktywność w obecności CCL2 okazywała się być nasiloną w populacji limfocytów T zawierających komórki pamięci oraz uprzednio aktywowane komórki T na których wykazano ekspresję receptora CCR2 po kilku dniach aktywacji z anti-CD3 i anti-CD28 lecz nie „dziewiczych” limfocytów T [8,9]. Ekspresja receptorów jest regulowana także przez różne czynniki „zapalne” [10] i cytokiny. I tak np. IL-2 indukuje i podtrzymuje ekspresję CCR2 na limfocytach T, natomiast aktywacja komórek poprzez kompleks CD3 może powodować wyhamowanie ekspresji CCR2. Źródłem mediatorów powodujących zmiany ekspresji CCR2 są monocyty, które generują IL-1 β , TNF α , IFN- γ , MCP-1 czy PGE2. Wykazano, że PGE2 indukuje uwalnianie MCP-1 z komórek tucznych [11].

Wzmożona synteza, uwalnianie cytokin i innych mediatorów zapalenia alergicznego, spowodowane aktywacją nagromadzonych – w miejscu reakcji alergicznej na skutek zadziałania czynników chemotaktycznych – komórek, w istotny sposób wpływają na ich przeżywalność [12]. We wcześniejszych badaniach własnych wykazano nasilenie procesu apoptozy limfocytów u chorych z alergią atopową [13]. Wykazano też obniżenie apoptozy monocytów izolowanych z krwi obwodowej chorych na atopowe zapalenie skóry i alergiczne zapalenie błony śluzowej nosa i/lub astmę oskrzelową w porównaniu z grupą kontrolną osób zdrowych. Monocyty od chorych były niewrażliwe na IL-4, która komórki osób zdrowych pobudzała do tego procesu [14].

Celem pracy było porównanie ekspresji receptora CCR2 na komórkach jednojądrowych krwi obwodowej chorych z alergią atopową i osób zdrowych w odniesieniu do apoptozy.

MATERIAL AND METHODS

Patients

Mononuclear cells from peripheral blood were isolated in 10 patients with atopic bronchial asthma and/or allergic rhinitis – including 6 women and 4 men (mean age 32 ± 9 years). For at least 72h before blood collection, the patients did not take inhalational glucocorticosteroids, β_2 -adrenergic receptor agonists, and antihistaminic drugs. Control group consisted of 9 healthy people without atopy and other respiratory tract diseases (5 women and 4 men aged 23-56, mean 36 ± 13 years). Qualification of patients to the study was performed by a physician from hospital-based Centre for Treatment of Asthma and Allergic Diseases of the Chair of Immunology, Rheumatology, and Allergy of Medical University.

Skin prick tests for basic airborne allergens were positive for grass pollens and/or dust mite allergens in all studied patients. In controls, the tests were negative.

METHODS

The cells were isolated according to Boyüm's method [15] and CCR2 receptor expression was determined with monoclonal antibodies against the receptor (hmabCCR2/RPE – R&D System). The tests were performed immediately after cells isolation and after 48 hours of spontaneous culture, culture stimulated with PHA or LPS, and in 5 patients also with specific allergen.

Apoptosis was assessed using AnnexinV/FITC and PI (BioSource-Apoptosis Kit) [16].

On the basis of fixation of Annexin V to the cell and penetration of PI (propydyne iodide), individual stages of apoptosis were assessed. Receptor expression analysis and apoptosis assessment were performed in flow cytometer DAKO Galaxy with FlowMax software. Additionally – by ELISA – in supernatants obtained after 48 hours of culture, MCP-1 and IL-2 concentrations were determined with commercially available tests and manufacturer-suggested methodology.

Statistical analysis

Results were statistically evaluated with test z – of differences and test F – for variance; correlation was established on the basis of Spearman (r) coefficient. Level of statistical significance was accepted at $p \leq 0.05$.

MATERIAŁ I METODY

Pacjenci

Komórki jednojądrowe z krwi obwodowej wyizolowano od 10-ciu chorych na atopową astmę oskrzelową i/lub alergiczny nieżyt nosa – w tym 6 kobiet i 4 mężczyzn; średni wiek w tej grupie chorych wynosił 32 lata ± 9 . Chorzy na co najmniej 72h przed pobraniem krwi nie przyjmowali wziewnych glikokortykosteroidów, agonistów receptora β_2 -adrenergicznego oraz leków przeciw histaminowych. Grupę odniesienia stanowiło 9 osób zdrowych bez cech atopii i innych schorzeń ze strony układu oddechowego (w tym 5 kobiet i 4 mężczyzn w wieku 23-56 lat; średnio 36 lat ± 13). Kwalifikacja pacjentów do badań prowadzona była przez lekarza z Ośrodka Leczenia Astmy i Chorób Alergicznych (na bazie CSK) Kliniki Immunologii, Reumatologii i Alergii UM.

Testy skórne na podstawowe alergeny powietrzno-pochodne wykonane metodą nakłucia naskórka „prick” były dodatkowo na pyłki traw i/lub alergen roztoczy kurzu domowego u wszystkich badanych chorych. U zdrowych testy były ujemne.

METODY

Komórki izolowano metodą Boyüma [15] a ekspresję receptora CCR2 oznaczono przy zastosowaniu przeciwciał monoklonalnych skierowanych przeciwko receptorowi (hmabCCR2/RPE – R&D System). Badania wykonano bezpośrednio po wyizolowaniu komórek, a także po 48 godz. hodowli spontanicznej, stymulowanej PHA lub LPS, a u 5 chorych także swoistym alergenem.

Badania apoptozy wykonano z zastosowaniem zestawu AnnexinV/FITC i PI (BioSource-Apoptosis Kit) [16].

Na podstawie wiązania Annexiny V z komórką oraz wnikania do niej PI (jodku propydydy) oceniano poszczególne stadia apoptozy. Analizy ekspresji receptora oraz apoptozy dokonywano w cytometrii przepływowej DAKO Galaxy przy zastosowaniu oprogramowania FlowMax. Ponadto – metodą ELISA – w nadsączach pozyskanych po 48 godz. hodowli, oznaczono stężenie MCP-1 oraz IL-2 wykorzystując komercyjnie dostępne zestawy i metodologię wg ich producenta.

Analiza statystyczna

Wyniki poddano analizie statystycznej testem z – różnic oraz F dla wariancji; korelację wyznaczano w oparciu o współczynnik r – Spermmana. Za istotne statystycznie przyjmowano $p \leq 0,05$.

RESULTS

Comparison of CCR2 receptor expression on mononuclear cells (PBMCs)

In patients with atopic allergy (immediately after isolation) significantly higher proportion of cells expressing CCR2 in full pool of PBMCs [PBMC-CCR2(+)] and in monocytes [Mono-CCR2(+)] was found, as compared with healthy controls (fig.1).

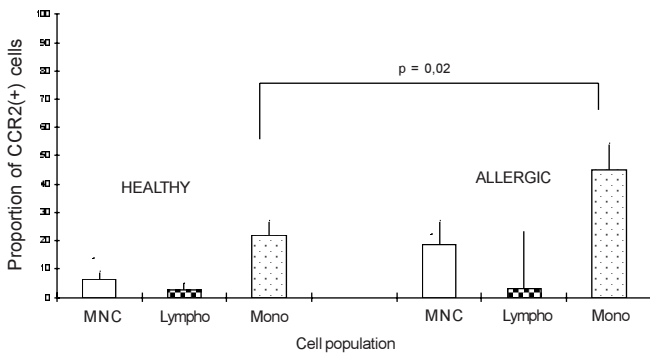


Fig. 1. The expression of CCR2 receptor on mononuclear cells of peripheral blood (MNC) in patients with atopic allergy and in healthy people, right after isolation (T0)

* $p < 0.05$

Following 48h of spontaneous culture, as well as in the presence of PHA or LPS, in patients with atopic allergy a significant increase of CCR2 expression on PBMCs was observed in comparison to healthy controls. Mean values were $17.93\% \pm 6.45$ as compared with $3.70\% \pm 0.99$; $p < 0.01$ – spontaneous cultures; $26.10\% \pm 7.18$ vs $6.25\% \pm 1.43$; $p < 0.01$ – in presence of PHA; $19.80\% \pm 5.55$ vs $3.43\% \pm 1.26$; $p < 0.01$ in the presence of LPS (fig. 2).

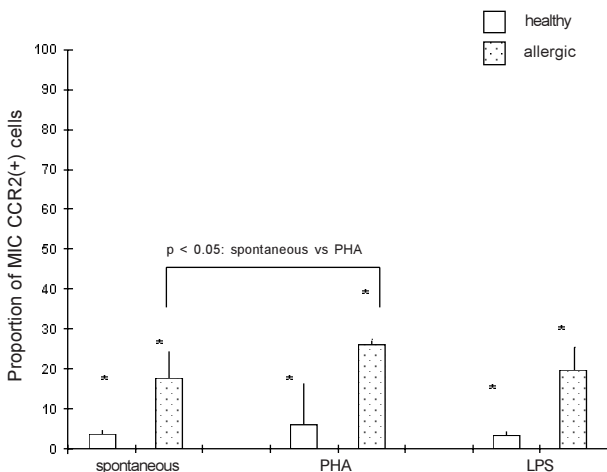


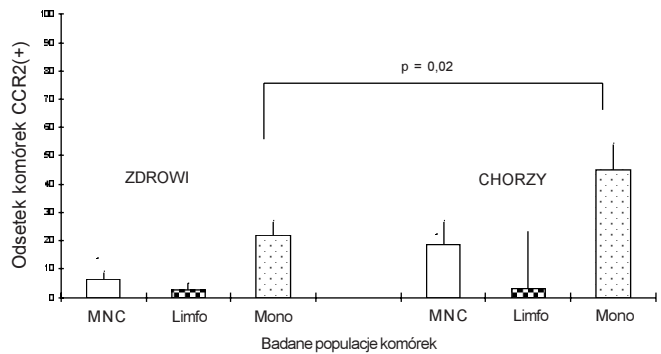
Fig. 2. The expression of CCR2 receptor after 48 hours of mononuclear cells (MNC) culture

- spontaneous, PHA, LPS
- ZD – healthy volunteers
- AA – patients with atopic bronchial asthma and/or allergic rhinitis
- * $p < 0.05$ – statistical significance of differences between studied groups of patients

WYNIKI

Porównanie ekspresji receptora CCR2 na komórkach jednojądrowych (PBMC)

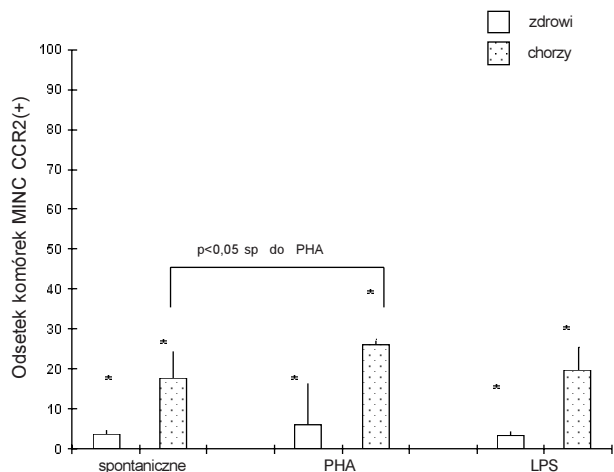
U chorych z alergią atopową (bezpośrednio po wyizolowaniu), wykazano istotnie wyższy odsetek komórek wykazujących ekspresję CCR2 w pełnej puli PBMC [PBMC-CCR2(+)] oraz monocytach [Mono-CCR2(+)] w porównaniu ze zdrowymi (ryc.1).



Ryc.1. Ekspresja receptora CCR2 na komórkach jednojądrowych krwi obwodowej (MNC) chorych z alergią atopową i osób zdrowych – bezpośrednio po wyizolowaniu (T0)

* $p < 0,05$

Po 48 h hodowli spontanicznej oraz w obecności PHA lub LPS, u chorych z alergią atopową obserwowano istotne nasilenie ekspresji CCR2 na komórkach PBMC w porównaniu ze zdrowymi. Średnie wartości wynosiły: $17,93\% \pm 6,45$ wobec $3,70\% \pm 0,99$; $p < 0,01$ – hodowle spontaniczne; $26,10\% \pm 7,18$ wobec $6,25\% \pm 1,43$; $p < 0,01$ – w obecności PHA; $19,80\% \pm 5,55$ wobec $3,43\% \pm 1,26$; $p < 0,01$ w obecności LPS (ryc. 2).



Ryc.2. Ekspresja receptora CCR2 po 48 godz. hodowli komórek jednojądrowych (MNC)

- spontaniczna, PHA, LPS
- ZD – zdrowi
- AA – chorzy na atopową astmę oskrzelową i/lub alergiczny nieżyt nosa
- * $p < 0,05$ – istotność statystyczna pomiędzy badanymi grupami pacjentów

In lymphocytes population (Li), the proportion of [Li-CCR2(+)] also increased in the patients group as compared with healthy controls, both in spontaneous culture, and in the presence of PHA or LPS. Mean values were: $10.44\% \pm 6.24$ vs $1.21\% \pm 0.31$; $p < 0.01$; (spontaneous cultures); $18.86\% \pm 8.13$ vs $2.50\% \pm 0.44$; $p < 0.01$ – in the presence of PHA; $18.07\% \pm 6.0$ vs 1.09 ± 0.49 ; $p < 0.01$ – in the presence of LPS.

In patients with atopy, significant increase in proportion of [Li-CCR2(+)] was also demonstrated following PBMCs culture in the presence of specific allergen in spontaneous culture: $30.68\% \pm 12.91$ vs $3.37\% \pm 1.20$; $p < 0.05$ (fig. 3) [1].

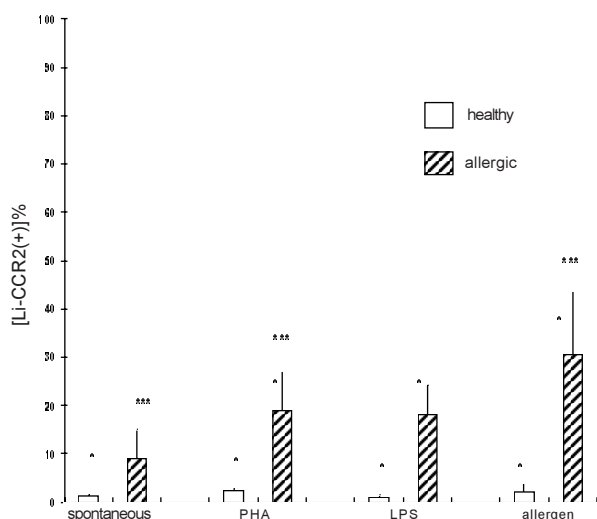


Fig. 3. The expression of CCR2 receptor after 48 hours of mononuclear cells (MNC) culture in lymphocyte pool

* $p < 0.05$ sick people vs healthy volunteers

*** $p < 0.05$ stimulated vs non-stimulated cells

In monocytes population significant increase of CCR2+ cells was seen in patients with atopic allergy, as compared to healthy controls. The increase concerned cells from spontaneous culture and PHA, but no LPS. Mean proportion of (MoCCR2+) equalled, respectively: $37.01\% \pm 5.92$ vs $15.18\% \pm 3.86$; $p < 0.01$ and $45.97\% \pm 9.84$ vs $22.01\% \pm 6.94$; $p < 0.05$ (fig. 4).

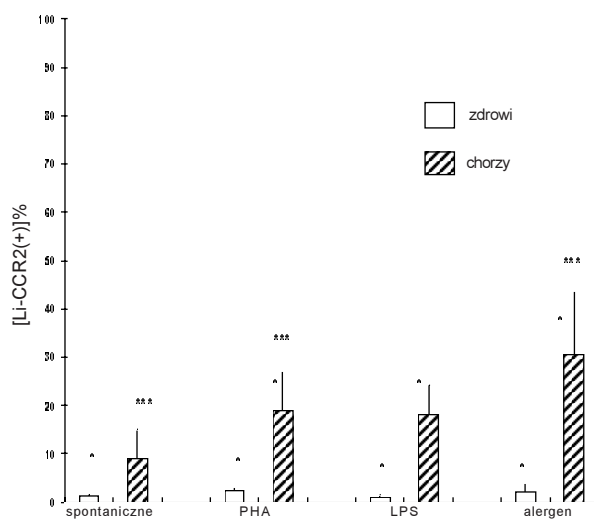
Apoptosis of PBMCs in patients with atopic allergy and in healthy people

In patients with allergy a significantly higher – as compared with healthy controls – proportion of PBMCs demonstrating necrotic changes was observed. Mean values were: $6.13\% \pm 1.65$ vs $2.76\% \pm 0.12$; $p < 0.05$ in atopics and controls respectively.

After 48h of spontaneous culture, in allergic patients the proportion of PBMCs demonstrating early apoptosis significantly increased – $13.69\% \pm 2.8$; $p < 0.05$ as compared to healthy controls – $6.62\% \pm 2.29$. Following PBMCs culture in the presence of LPS significant

W populacji limfocytów (Li), również odnotowano wzrost odsetka [Li-CCR2(+)] w grupie chorych w porównaniu ze zdrowymi zarówno po spontanicznej hodowli, jak również w obecności PHA lub LPS. Średnie wartości wynosiły: $10,44\% \pm 6,24$ wobec $1,21\% \pm 0,31$; $p < 0,01$; (hodowle spontaniczne); $18,86\% \pm 8,13$ wobec $2,50\% \pm 0,44$; $p < 0,01$ – w obecności PHA; $18,07\% \pm 6,0$ wobec $1,09 \pm 0,49$; $p < 0,01$ – w obecności LPS.

U chorych istotne zwiększenie odsetka [Li-CCR2(+)] wykazano także po hodowli PBMC w obecności swoistego alergenu w odniesieniu do hodowli spontanicznej: $30,68\% \pm 12,91$ wobec $3,37\% \pm 1,20$; $p < 0,05$ (ryc.3) [1].



Ryc. 3. Ekspresja receptora CCR2 po 48 godz. hodowli komórek jednojądrowych (MNC) w puli limfocytów

* $p < 0.05$ przy porównaniu zdrowi/chorzy

*** $p < 0.05$ przy porównaniu komórek niestymulowanych wobec stymulowanych

W populacji monocytów istotny wzrost komórek CCR2+ obserwowano u chorych z alergią atopową w porównaniu ze zdrowymi. Wzrost dotyczył komórek po hodowli spontanicznej i PHA, ale nie LPS. Średnio odsetek (MonoCCR2+) wynosił odpowiednio: $37,01\% \pm 5,92$ wobec $15,18\% \pm 3,86$; $p < 0,01$ oraz $45,97\% \pm 9,84$ wobec $22,01\% \pm 6,94$; $p < 0,05$ (ryc.4).

Apoptoza komórek PBMC u chorych z alergią atopową i osób zdrowych

Już bezpośrednio po izolacji komórek jednojądrowych u chorych z alergią zaobserwowano istotnie wyższy – w porównaniu ze zdrowymi – odsetek komórek PBMC wykazujących nekrozę. Średnie wartości wynosiły: $6,13\% \pm 1,65$ wobec $2,76\% \pm 0,12$; $p < 0,05$.

Po 48 h hodowli spontanicznej, u chorych odsetek PBMC wykazujących wczesną apoptozę istotnie wzrastał – $13,69\% \pm 2,8$; $p < 0,05$ w porównaniu ze zdrowymi – $6,62\% \pm 2,29$. Natomiast po hodowli PBMC w obecności LPS istotne różnice pomiędzy badanymi grupami doty-

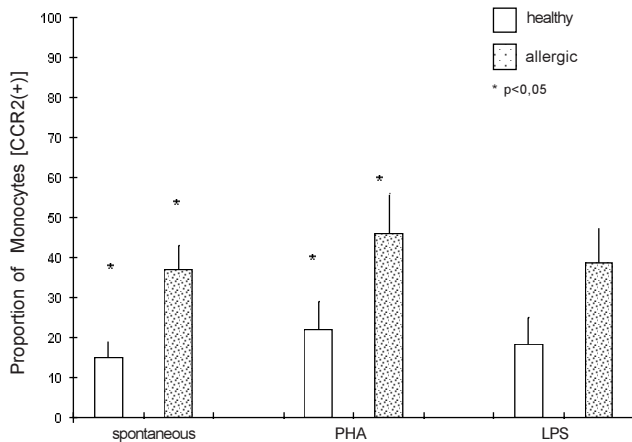
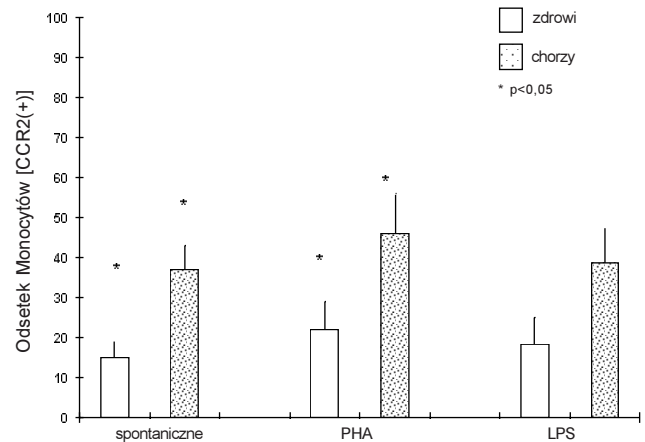


Fig. 4. The expression of CCR2 receptor after 48 hours of mononuclear cells (MNC) culture in monocyte pool

* $p < 0.05$ sick people vs healthy volunteers



Ryc.4. Ekspresja receptora CCR2 po 48 godz. hodowli komórek jednojądrowych (MNC) w puli monocytów

* $p < 0,05$ przy porównaniu zdrowi-chorzy

differences between groups concerned early apoptosis – $16.91\% \pm 3.97$ in patients vs $9.43\% \pm 2.42$ in controls; $p < 0.01$; total apoptosis – $26.18\% \pm 1.47$ vs 18.67 ± 2.05 ; $p < 0.01$. Following allergen, an increase in late apoptosis of PBMCs related to spontaneous was observed: $6.4\% \pm 2.58$ vs $3.59\% \pm 1.11$; $p = 0.05$.

Relation between CCR2 receptor expression and apoptosis

For this stage, statistical analysis based on the Spearman correlation coefficient (r) was used. Significant correlation in allergic patients ($r = 0.62$; $p = 0.02$) was demonstrated after 48h cells culture in the presence of PHA between CCR2 receptor expression and early and total apoptosis ($r = 0.56$; $p = 0.03$). In healthy controls, correlation between total apoptosis and CCR2 receptor expression was demonstrated already immediately after cells isolation ($r = 0.75$; $p = 0.05$) and following 48h of spontaneous culture for early ($r = 0.77$; $p = 0.04$) and total apoptosis ($r = 0.89$; $p = 0.01$).

MCP-1 and IL-2 concentration in supernatants after PBMC culture

In patients with atopic allergy, significantly lower – as compared to healthy controls – MCP-1 concentration (pg/mL) was demonstrated in supernatants following non-stimulated cells culture. Mean values were, respectively: 2156.83 ± 776.14 and 4970.87 ± 2659.04 ; $p < 0.05$. Following culture in the presence of PHA – in both groups – increased MCP-1 synthesis was observed. Mean 295.44% in relation to spontaneous in allergic patients; 152.12% in healthy controls; in supernatants after culture with LPS – 197.33% and 12.63% , respectively (fig. 5a).

In patients with atopic allergy, IL-2 concentration (pg/mL) – in supernatants after culture of non-stimulated cells – mean value equalled 50.02 ± 5.52 ; in healthy controls 29.77 ± 7.59 ; $p > 0.05$. IL-2 increase in

czyły wczesnej apoptozy – $16,91\% \pm 3,97$ u chorych wobec $9,43\% \pm 2,42$ u zdrowych; $p < 0,01$; całkowitej apoptozy – $26,18\% \pm 1,47$ wobec $18,67 \pm 2,05$; $p < 0,01$. Po alergicznym odnotowano zwiększenie apoptozy późnej PBMC w odniesieniu do spontanicznej: $6,4\% \pm 2,58$ wobec $3,59\% \pm 1,11$; $p = 0,05$

Zależność pomiędzy ekspresją receptora CCR2 a apoptozą

Do realizacji tego celu zastosowano analizę statystyczną w oparciu o wyznaczenie współczynnika korelacji – r Spermmana. U chorych istotną korelację ($r = 0,62$; $p = 0,02$) wykazano po 48 godz. hodowli komórek w obecności PHA pomiędzy ekspresją receptora CCR2, a apoptozą wczesną oraz całkowitą ($r = 0,56$; $p = 0,03$). Natomiast w grupie osób zdrowych korelację pomiędzy apoptozą całkowitą a ekspresją receptora CCR2 wykazano już bezpośrednio po wyizolowaniu komórek ($r = 0,75$; $p = 0,05$) oraz po 48 godz. hodowli spontanicznej dla apoptozy wczesnej ($r = 0,77$; $p = 0,04$) i całkowitej ($r = 0,89$; $p = 0,01$).

Stężenie MCP-1 i IL-2 w nadsączach po hodowli komórek PBMC

U chorych z alergią atopową stwierdzono istotnie niższe – w porównaniu ze zdrowymi – stężenie MCP-1 (pg/mL) w nadsączach po hodowli komórek niestymulowanych. Średnie wartości wynosiły odpowiednio $2156,83 \pm 776,14$ i $4970,87 \pm 2659,04$; $p < 0,05$. Po hodowli w obecności PHA – w obu grupach – obserwowano wzrost syntezy MCP-1. Średnio $295,44\%$ w odniesieniu do spontanicznej u chorych; u zdrowych $152,12\%$; w nadsączach po hodowli z LPS odpowiednio $197,33\%$ i $12,63\%$ (ryc.5a).

U chorych z alergią atopową stężenie IL-2 (pg/mL) – w nadsączach po hodowli komórek niestymulowanych – średnia wartość wynosiła $50,02 \pm 5,52$; u zdrowych $29,77 \pm 7,59$; $p > 0,05$. Natomiast przyrost IL-2 w nadsączach po

supernatants from PHA cultures – in patients, equalled 95.42% for spontaneous; in healthy controls 24.25%. Following cells culture in the presence of LPS decrease of IL-2 synthesis by 12.6% as compared with spontaneous was observed in allergic patients, whereas in healthy controls IL-2 increased by 42.28% (fig. 5b).

Significant positive correlation was demonstrated between MCP-1 and IL-2 synthesis in spontaneous cultures ($r=0.17$; $p=0.01$), as well as following stimulation with PHA ($r=0.44$; $p=0.01$) and poor correlation following LPS ($r=0.19$; $p=0.01$).

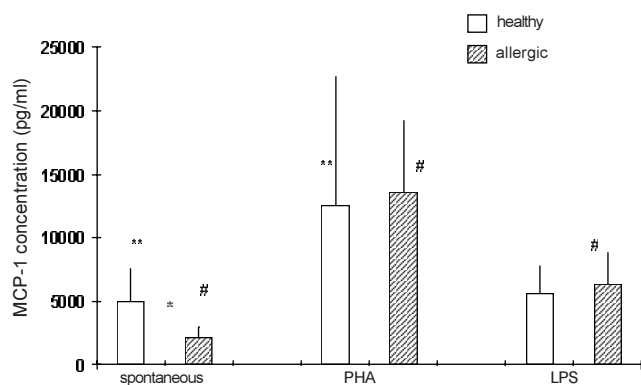


Fig. 5a. Cytokines concentration in supernatant after 48 hours of culture of mononuclear cells from healthy volunteers (ZD) and patients with atopic allergy (AA): MCP-1

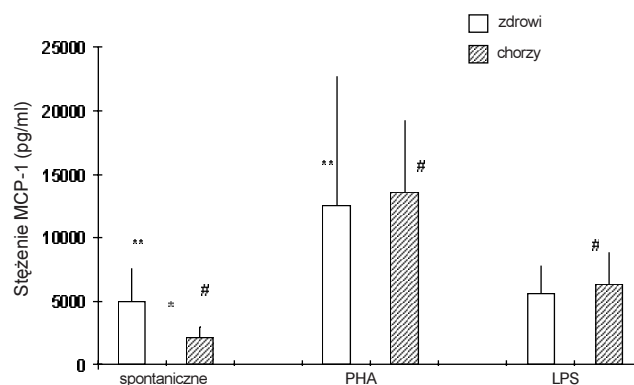
* $p<0.05$ between groups – spontaneous cultures

** $p<0.05$ PHA-stimulated vs PHA non-stimulated cells in healthy group

$p<0.05$ PHA or LPS-stimulated vs PHA or LPS non-stimulated cells in atopic group

hodowli komórek w obecności PHA – u chorych średnio wynosił 95,42% w odniesieniu do spontanicznej; u zdrowych 24,25%. Po hodowli komórek obecności LPS, u chorych stwierdzono zmniejszenie syntezy IL-2 o 12,6% w odniesieniu do spontanicznej; u zdrowych przyrost o 42,28% (ryc.5b).

Wykazano istotną dodatnią korelację pomiędzy syntezą MCP-1 a IL-2 w hodowlach spontanicznych ($r=0,17$; $p=0,01$), oraz po stymulacji PHA ($r=0,44$; $p=0,01$) i słabą po LPS ($r=0,19$; $p=0,01$).



Ryc.5a. Stężenie cytokin w nadsączach po 48 godz. hodowli komórek jednojądrowych zdrowych (ZD) i chorych z alergią atopową (AA) MCP-1

* $p<0,05$ dla porównania pomiędzy grupami – hodowle spontaniczne

** $p<0,05$ porównanie komórek niestymulowanych wobec stymulowanych PHA w grupie zdrowych

$p<0,05$ porównanie komórek niestymulowanych wobec stymulowanych PHA lub LPS w grupie chorych

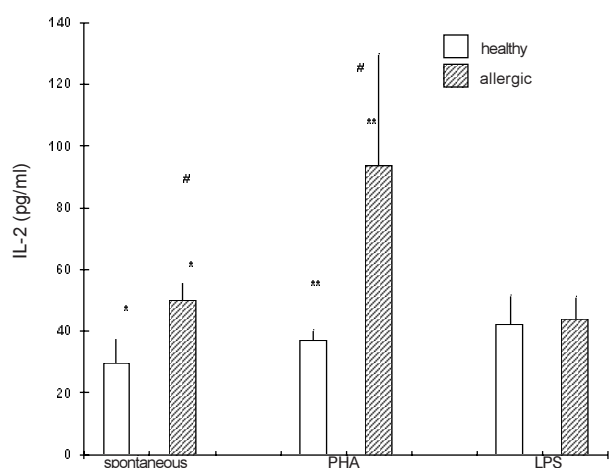
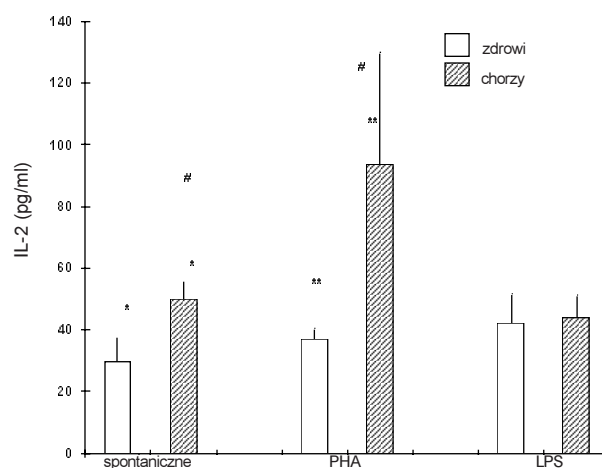


Fig. 5b. Cytokines concentration in supernatant after 48 hours of culture of mononuclear cells from healthy volunteers (ZD) and patients with atopic allergy (AA): IL-2

* $p<0.05$ between groups – spontaneous cultures

** $p<0.05$ PHA-stimulated vs PHA non-stimulated cells in healthy group

$p<0.05$ non-stimulated vs PHA or LPS stimulated cells in atopic group



Ryc.5b. Stężenie cytokin w nadsączach po 48 godz. hodowli komórek jednojądrowych zdrowych (ZD) i chorych z alergią atopową (AA) IL-2

* $p<0,05$ dla porównania pomiędzy grupami – hodowle spontaniczne

** $p<0,05$ porównanie komórek niestymulowanych wobec stymulowanych PHA w grupie zdrowych

$p<0,05$ porównanie komórek niestymulowanych wobec stymulowanych PHA lub LPS w grupie chorych

Relation between CCR2 receptor expression and MCP-1 / IL-2 synthesis

Significant correlation between CCR2 expression and MCP-1 synthesis was demonstrated in full pool of mononuclear cells (PBMC) following induction with PHA $r=0.33$; $p=0.03$.

In relation to IL-2 synthesis, similar relationship was observed in spontaneous cultures in full pool of PBMC ($r=0.30$; $p=0.01^*$) and in monocytes ($r=0.54$ $p<0.01$). Following induction with LPS, a weak negative correlation was present: for PBMC $r= (-)0.09$; $p=0.049^*$; for monocytes $r=(-)0.14$; $p=0.01$.

DISCUSSION

Chemokines play an important role in pathogenesis of allergic inflammation. Chemokines from CC family (such as MCP-1, RANTES) strongly activate mast cells and basophils [17], and MCP-1 is also a potent chemoattractant for mononuclear cells.

The cells transported in bloodstream are recipients, carriers, and transmitters of signals reaching the site of allergic inflammation. Therefore, the cells isolated from peripheral blood of patients may constitute the source of information on inflammatory process activity in effector organs.

Results of the present study indicate that an important element in transmitting cell-cell signals are also CCR2 receptors, which increased expression was observed on mononuclear cells PBMC (full pool) of patients with atopic allergy as compared with healthy persons, already immediately following isolation from peripheral blood.

There was demonstrated that, in PBMC pool, the highest proportion of CCR2(+) cells constituted monocytes. Following 48h culture, both without, and in presence of PHA, LPS and specific allergen Der p I or grass pollens, the increase in CCR2(+) expression was observed on lymphocytes. Proportional increase in MCP-1 (CCR2 ligand) synthesis after cells culture in the presence of PHA or LPS was significantly higher in patients in comparison to healthy controls. MCP-1 chemokine is responsible mainly for inflow of monocytes/macrophages to the site of active „inflammatory” reaction. It is also a chemoattractant for basophils and eosinophils and induces degranulation of these cells. Both basophils and eosinophils are the source of mediators, cytokines influencing its synthesis by lymphocytes, which directs TH1/Th2 polarization and antibodies production. The ligand of MCP-1 is CCL2 and the receptor – CCR2. Experimental studies in mice demonstrated that CCL2/ (CCR2) deficiency leads not only to synthetic defect of Th2 cytokines, participating in antibodies production, but also interferon- γ [18]. It was demonstrated that CCR2

Zależność pomiędzy ekspresją receptora CCR2 a syntezą MCP-1 i IL-2

Wykazano istotną korelację pomiędzy ekspresją CCR2 a syntezą MCP-1 w pełnej puli komórek jednojądrowych (PBMC) po indukcji PHA $r=0,33$; $p=0,03$.

W odniesieniu do syntezy IL-2 taką zależność obserwowano w hodowlach spontanicznych w odniesieniu do pełnej puli PBMC – ($r=0,30$; $p=0,01^*$) oraz monocytów – ($r=0,54$ $p<0,01$). Natomiast po indukcji komórek LPS, była słaba korelacja ujemna: dla PBMC $r= (-)0,09$; $p=0,049^*$; dla monocytów $r=(-)0,14$; $p=0,01$.

DYSKUSJA

Istotny udział w mechanizmie zapalenia alergicznego mają chemokiny. Chemokiny –CC- (np. MCP-1, RANTES) silnie aktywują komórki tuczne i bazofile [17], a MCP-1 jest również silnym chemoatraktantem dla komórek jednojądrowych.

Przenoszone drogą krążenia komórki, są odbiorcą, nośnikiem i przekaźnikiem sygnałów docierających do miejsca toczącego się zapalenia alergicznego. Tak więc wyizolowane z krwi obwodowej pacjentów komórki, stanowią mogą źródło informacji o aktywności procesu zapalnego w narządach efektorowych.

Przedstawiane wyniki badań wskazują, że istotnym elementem przekazywania sygnałów komórka-komórka są także receptory CCR2, których nasiloną ekspresją zaobserwowano na komórkach jednojądrowych PBMC (pełna pula) chorych z alergią atopową w porównaniu z osobami zdrowymi już bezpośrednio po wyizolowaniu z krwi obwodowej.

Wykazano, iż w puli PBMC najwyższy odsetek komórek CCR2(+) stanowią monocyty. Natomiast po 48 godz. hodowli zarówno bez, jak i w obecności PHA, LPS oraz swoistego alergenu Der p I lub pyłków traw, nasilenie ekspresji CCR2(+) obserwowano na limfocytach. Stwierdzono też, że procentowy przyrost syntezy MCP-1 (liganda dla CCR2) po hodowli komórek w obecności PHA lub LPS był istotnie wyższy u chorych w porównaniu ze zdrowymi. Chemokina MCP-1 odpowiada głównie za napływ monocytów/makrofagów do miejsca toczącej się reakcji „zapalnej”. Jest również chemoatraktantem dla bazofili oraz eozynofili, indukując degranulację tych komórek. Zarówno bazofile jak i eozynofile są źródłem mediatorów, cytokin wpływających na syntezę tychże przez limfocyty, ukierunkowując polaryzację Th1/Th2 i wytwarzanie przeciwciał. Ligandem dla MCP-1 jest CCL2, a receptorem CCR2. W badaniach na myszach udowodniono, że niedobór CCL2/ (CCR2) prowadzi nie tylko do defektu syntezy cytokin Th2 włączonych w syntezę przeciwciał, ale także interferonu- γ [18]. Wykazano, że receptory CCR2 mogą aktywować kinazy JAK i latentne for-

receptors could activate JAK kinases and latent forms of STAT, which may lead to cytokines receptors aggregation [19,20]. In atopic patients PHA significantly increased IL-2 synthesis in comparison to healthy controls; IL-2 have the properties of lymphocytes T growth factor and is synthesized by activated lymphocytes Th population. It is required for IL-4 synthesis, together with IL-4 to IL-10 synthesis and in combination with IL-10 plays a crucial role for IL-9 expression, intensifying expression on lymphocytes T [21]. Studies in a murine model confirmed that IL-9 expression becomes markedly reduced by deficiency of IL-2 on T-lymphocytes [22]. There was demonstrated that in patients with asthma, expression of mRNA for IL-9 correlated significantly with airways response to metacholine [23]. Other studies demonstrated, that together with IL-3 it promotes marrow-derived mast cells proliferation, influencing the differentiation by regulation of proteases expression (such as mMCP-1, granzymes B), which leads to MCP-1 increase in the bloodstream (cit. after [24]). The present study showed a significant correlation between MCP-1 synthesis and IL-2, both in supernatants – following cells culture with and without PHA or LPS, and between post-stimulation enhanced CCR2 receptor expression and concentration of these substances, although the relations were diversified. For CCR2(+)/MCP-1 significant correlation concerned only a full pool of PBMC cultured in the presence of PHA, but not LPS, whereas for CCR2(+)/IL-2 only spontaneous cultures of full pool PBMC and monocytes. Following cells culture in the presence of LPS (but not PHA) significant negative correlation for monocytes was found. The results of our study suggest an important role of CCR2 receptor and synergistic or opposite action of MCP and IL-2, depending on stimulatory factor. Observed – in spontaneous cultures and after cells induction with non-specific factors or specific allergen - significant correlation between CCR2(+) expression on PBMC and apoptosis suggests, that this is also an important transmitter of information between cells in allergic inflammation. This may be also the route of elimination of reactive or allergen-specific Th2 lymphocytes. Studies by Lucas M. et al. [25] indicate the important role of apoptotic cells in cytokines synthesis regulation. Apoptotic cells in combination with TLR receptors ligands increased early secretion of TNF- α , MIP-1 α , MIP-2 with subsequent release of TGF- β 1, and after time suppressed TNF- α , IL-10, IL-12 synthesis via a mechanism, which could be suppressed by IFN- γ . A separate consideration as to the role of CCR2 in cells survival should be done for (observed in our study) necrosis process – thus pathological cellular death (significantly higher proportion of necrotic cells was observed immediately after mononuclear cells isolation in allergic patients, as compared to healthy controls). Taking into account that in patients an inflammatory process is going on, we cannot exclude significant role of mediators

my STAT, co może prowadzić do agregacji receptorów cytokinowych [19,20]. U chorych atopowych PHA istotnie nasilała syntezę IL-2 w porównaniu ze zdrowymi; IL-2 posiada właściwości czynnika wzrostu limfocytów T i jest syntetyzowana przez populację aktywowanych limfocytów Th. Jest wymagana dla syntezy IL-4, wspólnie z IL-4 do syntezy IL-10 a w zestawieniu z IL-10 odgrywa zasadniczą rolę dla ekspresji IL-9 potęgując ekspresję na limfocytach T [21]. W badaniach na mysim modelu potwierdzono, że ekspresja IL-9 jest istotnie zredukowana przy niedoborze IL-2 na limfocytach T [22]. Dowiedziono, że u chorych na astmę ekspresja RNA dla IL-9 istotnie korelowała z odpowiedzią na metacholinę w drogach oskrzelowych [23]. W innych badaniach wykazano, że wspólnie z IL-3 promuje proliferację szpiko-pochodnych mastocytów wpływając na różnicowanie poprzez regulację ekspresji proteaz (m.in. mMCP-1, granzymów B), co prowadzi do wzrostu MCP-1 w krążeniu (cyt. za [24]). W prezentowanych badaniach wykazaliśmy istotną korelację pomiędzy syntezą MCP-1 oraz IL-2 zarówno w nadśączach – po hodowli – bez oraz w obecności PHA lub LPS z jednej strony, z drugiej zaś korelację pomiędzy nasiloną – po stymulacji – ekspresją receptora CCR2 a stężeniem tychże, chociaż relacje te były zróżnicowane. W przypadku CCR2(+)/MCP-1 istotna korelacja dotyczyła tylko pełnej puli PBMC hodowanych w obecności PHA ale nie LPS, natomiast CCR2(+)/IL-2 już w hodowlach spontanicznych dla pełnej puli PBMC oraz dla monocytów. Po hodowli komórek w obecności LPS (ale nie PHA) stwierdzono istotną odwrotną korelację dla monocytów. Wyniki naszych badań wskazują na istotną rolę receptora CCR2 oraz synergistyczne działanie MCP-1 i IL-2 z jednej strony a w zależności od czynnika pobudzającego, przeciwnie z drugiej. Zaobserwowana przez nas – w hodowlach spontanicznych oraz po indukcji komórek nieswoistymi czynnikami lub swoistym alergenem – istotna korelacja pomiędzy ekspresją CCR2 (+) na PBMC a całkowitą apoptozą wskazuje, iż jest to także znaczący w zapaleniu alergicznym przekaznik informacji pomiędzy komórkami. Być może także tą drogą odbywa się eliminacja reaktywnych lub alergenowo swoistych limfocytów Th2. Badania przeprowadzone przez Lucas M. i wsp. [25] wskazują na istotny udział komórek apoptotycznych w regulacji syntezy cytokin. Komórki apoptotyczne w kombinacji z ligandami receptorów TLR nasilały wczesną sekrecję TNF- α , MIP-1 α , MIP-2, z późniejszym uwalnianiem TGF- β 1, by po pewnym czasie oddziaływać supresyjnie na syntezę TNF- α , IL-10, IL-12 przez mechanizm, który mógłby być zniesiony przez IFN- γ . Odrębne rozważanie udziału CCR2 w przeżywalności komórek należałoby przeprowadzić w odniesieniu do zaobserwowanego przez nas procesu nekrozy – a więc patologicznej śmierci komórki (istotnie wyższy odsetek komórek nekrotycznych u chorych z alergią w porównaniu ze zdrowymi, odnotowaliśmy już bezpośrednio po wyizolowaniu

released from necrotic cells. This way - via TLR2 receptors stimulation - activation of NF- κ B genes occur, necessary to induce inflammatory process from one side, and reparatory processes - from the other [26]. Up till now, an important role in allergic inflammatory reaction was attributed to CCR3, CCR4 and CCR8 receptors and to their respective cytokines/chemokines, such as MCP-3, Eotaxine or RANTES, regarding their regulatory function on differentiation and expression of eosinophiles receptors and development of Th1/Th2 response [27,28,29,30].

Presented results suggest a role for CCR2 receptors in regulation of survival and activation of MNC (including lymphocytes and monocytes), involved allergic inflammation process.

komórek jednojądrowych). Zważywszy, że u chorych toczy się proces zapalny nie możemy wykluczyć istotnej roli mediatorów uwalnianych z nekrotycznych komórek. Tą drogą – poprzez pobudzenie receptorów TLR2 dochodzi do aktywacji genów NF- κ B koniecznych do wywołania z jednej strony procesów zapalenia, a z drugiej procesów naprawczych [26]. Jak dotąd istotny udział w reakcji zapalenia alergicznego, przypisywano receptorom CCR3, CCR4 i CCR8 oraz odpowiadającym im cytokinom/chemokinom, takim jak MCP-3, Eotaksynie czy RANTES z uwagi na regulacyjny wpływ różnicowania i ekspresji receptorów dla eozynofili oraz rozwój odpowiedzi Th1/Th2 [27,28,29,30].

Przedstawione wyniki badań własnych wskazują na udział także receptorów CCR2 w regulacji przeżywalności i aktywacji komórek MNC (w tym limfocytów, monocytów) uczestniczących w procesie zapalenia alergicznego o podłożu atopowym.

Piśmiennictwo

- Alam R, Kampen G. Cytokines in allergic inflammation. *Clin Allergy Immunol.* 2002; 16: 255-74.
- Machura E, Mazur B, Folwarczyn A, Karczewska K, Golemie E, Kauffman J. Wpływ kolonizacji skóry na wewnątrzkomórkową ekspresję cytokin w limfocytach T CD3+ krwi obwodowej u dzieci z wypryskiem atopowym. *Astma Alergia Immunol.* 2006; 11: 42-48.
- Grzegorzczak J, Kowalski ML, Korzon L, Leszczyńska J. Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) is chemotactic for human neutrophils. *Eur Resp J.* 1997; 10: 136.
- Pype JL, Dupont LJ, Menten P, Collie EV, Opdenakker G, DammeJV, ChungKF, Demedts MG, Verleden GM. Expression of Monocyte Chemotactic Protein-1 (MCP-1), MCP-2 and MCP-3 by Human Airway Smooth-Muscle cells. *Am J Resp Cell Mol Biol.* 1999 21; 4: 528-36.
- Bonecchi R. i wsp. Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. *J Exp Med.* 1998; 187: 129-34.
- Sallusto F, Lenig D, Mackay CR & Lanzavecchia A. Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. *J Exp Med.* 1998; 187: 875-83.
- Luther SA, Cyster JG. Chemokine reviews. *Nature Immunology.* 2001; 2: 102-7.
- Qin S i wsp. Expression of monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 receptors on subsets of T cells: correlation with transendothelial chemotactic potential. *Eur J Immunol.* 1996; 26: 640-7.
- Loetscher P, Seitz M, Baggiolini M, Moser B. Interleukin-2 regulates CC chemokine receptor expression and chemotactic responsiveness in T lymphocytes. *J Exp Med.* 1996; 184: 569-77.
- Syrie U, Sivek J, Hamann A. Th1/Th2 subsets: distinct differences in homing and chemokine receptor expression? *Springer Semin Immunopathol.* 1999; 21: 263-85.
- Nakayama T, Mutsuga N, Yao FAO, Tosato G. Prostaglandin E2 promotes degranulation-independent release of MCP-1 from mast cells. *J Leukoc Biol.* 2006; 79: 95-104.
- Żegleń S, Rogala B. Stężenie sCD30 i przeciwciał skierowanych przeciw aneksynie V w surowicy oraz onkoproteiny Bcl-2 w lizatach limfocytarnych chorych z alergią wziewną. *Alergia Astma Immunol.* 2006; 11: 35-41.
- Grzegorzczak J, Kowalski ML, Piłata A, Iwaszkiewicz J. Increased apoptosis of peripheral blood mononuclear cells with perennial allergic asthma/rhinitis: Relation to serum markers of apoptosis. *Med Inflamm.* 2002; 11: 225-33.
- Brattona DL, Hamid Q, Boguniewicz M i wsp. Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor contributes to enhanced monocyte survival in chronic atopic dermatitis. *J Clin Invest.* 1995; 95: 211-18.
- Boyüm A. Separation of lymphocytes, granulocytes and monocytes from human blood using iodinated density gradient media. *Met Enzymol.* 1984; 108: 88-97.
- Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidyleserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Meth.* 1995; 184: 39-51.
- Kuna P, Reddigari S, Ruciński D i wsp. Monocyte chemotactic and activating factor is a potent histamine-releasing factor for human Basophil. *J Exp Med.* 1992; 175: 489-93.
- Charo IF, Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med.* 2006; 354: 610-21.
- Chen L, Pei G, Zhang W. An overall picture of chemokine receptors: basic research and drug development. *Curr Pharmaceutical Design.* 2004; 10: 1-11.
- Biswas SK, Sodhi A. Tyrosine phosphorylation-mediated signal transduction in MCP-1 - induced macrophage activation: role for receptor dimerization, focal adhesion protein complex and JAK/STAT pathway. *Int Immunopharmacol.* 2002; 2: 1095-107.
- Houssiau F, Schandené F, Stevens M, i wsp. A cascade of cytokines responsible for IL-9 expression in human T cells: involvement of IL-2, IL-4 and IL-10. *J Immunol.* 1995; 154: 2624-30.
- Schmitt E, Germann T, Goedert S i wsp. IL-9 production of naive CD4+ T cells depends on IL-2, is synergistically enhanced by combination of TGF- α and IL-4 and is inhibited by IFN- γ . *J Immunol.* 1994; 153: 3989-96.

23. Shimbara A, Christodoulou P, Soussi-Gounni A i wsp. IL-9 and its receptor in allergic and nonallergic lung disease: increased expression in asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2000; 105: 108-15.
24. Renault J.C. New insights into the role of cytokines in asthma. *J Clin Pathol.* 2001; 54: 577-89.
25. Lucas M, Stuart LM, Savill J, Lacy-Hulbert A. Apoptotic cells and innate immune stimuli combine to regulate macrophage cytokine secretion. *J Immunol.* 2003; 171: 2610-15.
26. Tchórzewski H. Alergia i autoimmunizacja – dwa ostrza tego samego miecza. *Alergia Astma Immunol.* 2002; 7: 125-30.
27. Bonecchi R, Bianchi G, Bordignon PP i wsp. Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. *J Exp Med.* 1998; 187: 127-34.
28. Leblond-Tillie I, Hammad H, Desurmont S i wsp. CC chemokines and Interleukin-5 in bronchial lavage fluid from patients with status asthmaticus. Potent implication in eosinophil recruitment. *Am J Resp Crit Care Med.* 2000; 162: 586-92.
29. D'Ambrosio D, Mariani M, Panina-Bordignon P, Sinigaglia F. Chemokines and their receptors guiding T lymphocyte recruitment in lung inflammation. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001; 164: 1266-75.
30. Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines. A New classification system and Their role in immunity. *Immunity.* 2000; 12: 121-7.