

# Ekspresja Fas/APO-1, Bcl-2, PCNA i HLA-DR w bioptatach pochodzących z oskrzeli chorych na astmę alergiczną

## Fas/APO-1, Bcl-2, PCNA and HLA-DR expression in bronchial biopsies of patients suffering from allergic asthma

SŁAWOMIR ŻEGLIŃ<sup>1/</sup>, ANDRZEJ GABRIEL<sup>2/</sup>, JERZY KOZIELSKI<sup>3/</sup>, BARBARA ROGALA<sup>1/</sup>

<sup>1</sup> Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych, Alergologii i Immunologii Klinicznej, Śląska Akademia Medyczna, ul. 3-go Maja 13-15, 41-800 Zabrze

<sup>2</sup> Katedra Patomorfologii, Śląska Akademia Medyczna, ul. 3-go Maja 13-15, 41-800 Zabrze

<sup>3/</sup> Katedra i Klinika Chorób Płuc i Gruźlicy, Śląska Akademia Medyczna, ul. Koziółka 10, 41-800 Zabrze

**Wprowadzenie.** Zahamowanie apoptozy limfocytów i tym samym ich wydłużone przeżycie wydaje się być ważnym czynnikiem podtrzymującym proces zapalny. Do najważniejszych czynników przekazujących sygnał apoptozy należy antygen Fas, z kolei jednym z istotniejszych inhibitorów tego procesu jest Bcl-2.

**Cel pracy.** Ocena stopnia ekspresji Fas/APO-1, Bcl-2, PCNA i HLA-DR w bioptatach pochodzących z oskrzeli chorych na astmę alergiczną.

**Material i metody.** Grupa badana składała się z 7 chorych na epizodyczną atopową astmę oskrzelową alergiczną w okresie bezobjawowym. Grupę odniesienia stanowiło 5 chorych na sarkoidozę. Podczas badania bronchofiberoskopowego pobierano 3-4 wycinki z oskrzeli płata dolnego płuca prawego. Do oceny wybranych czynników zastosowano metodę immunohistochemiczną.

**Wyniki.** Bcl-2 był obecny u wszystkich chorych na astmę oskrzelową. Zaobserwowano odczyn średnio pozytywny Fas na komórkach jednojądrzastych w obrębie nabłonka oskrzeli u dwóch chorych na astmę oskrzelową. Stwierdzono silnie pozytywny odczyn w przypadku antygeny HLA-DR u wszystkich badanych chorych. Odczyn z PCNA był słabo dodatni u pięciu chorych na astmę oskrzelową. Stopień ekspresji Bcl-2 oraz Fas u chorych na sarkoidozę był porównywalny do tego obserwowanego w astmie. Ekspresja HLA-DR była o stopień słabsza, natomiast reakcja z PCNA o stopień silniejsza w porównaniu z chorymi na astmę.

**Wnioski.** Przewlekane się procesu zapalnego w przebiegu chorób alergiczych może być wywołane poprzez nadmierną aktywację inhibitorów apoptozy.

*Alergia Astma Immunologia, 2004, 9(2), 99-105*

**Słowa kluczowe:** Fas/APO-1, Bcl-2, PCNA, HLA-DR, biopaty oskrzelowe, astma alergiczną

**Introduction.** Inhibition of lymphocyte apoptosis resulting in longer lymphocyte life seems to be an important factor sustaining the inflammatory process. Fas antigen is one of the most important transmitters of the apoptotic signal, while Bcl-2 is one of the major inhibitors.

**Aim of the study.** To evaluate the spontaneous expression of Fas/APO-1, Bcl-2, PCNA and HLA-Dr in bronchial biopsies obtained from patients suffering from allergic asthma.

**Material and methods.** The study group comprised 7 patients (mean age – 36.7 ± 6.7) with episodes of atopic bronchial asthma during the asymptomatic period of the disease. The bronchial mucosa slides from 5 patients with sarcoidosis (mean age – 32.6 ± 4.9) were used as the reference.

Three to four biopsy specimens of bronchial mucosa and submucosa were taken from a peripheral bronchus of the inferior lobe during the fiberoptic bronchoscopy. The sections were processed by a three-stage immunohistochemical method.

**Results.** Bcl-2 was found in each patient with bronchial asthma. Moderate Fas expression was observed on the multinucleated cells of the bronchial epithelium in two asthmatic subjects. Strong positive reaction with HLA-DR was observed in all study subjects. Slight reaction with PCNA was noted in five of seven asthmatic patients. Slight/moderate positive reaction with Fas and Bcl-2 in the sarcoid group was comparable to that observed in the asthmatic subjects. HLA-DR antigen expression was weaker, while reaction with PCNA was stronger than in the asthmatic patients).

**Conclusions.** Pathophysiology of allergic inflammation could be associated with excessive activity of apoptosis inhibitors.

*Alergia Astma Immunologia, 2004, 9(2), 99-105*

**Key words:** Fas/APO-1, Bcl-2, PCNA, HLA-DR, bronchial biopsies, allergic asthma

Błona śluzowa drzewa oskrzelowego stanowi barierę, w obrębie której dochodzi do interakcji pomiędzy czynnikami zewnętrznymi a wewnątrzpochodnymi mechanizmami obronnymi ustroju. Stan równowagi warunkowany adekwatną odpowiedzią układu immunologicznego zapewnia homeostazę ustrojową w obrębie tkanek oskrzeli i płuc. Przewlekły proces zapalny leżący u podłoża odpowiedzi alergicznej zależy w równej mierze od środowiskowych, zewnątrzpochodnych czynników wywołujących, jak i nieprawidłowej odpowiedzi układu odpornościowego np. dysregulacji wydzielania cytokin Th1/Th2. Zaburzenie balansu uwalniania cytokin jest rezultatem przedłużonej żywotności komórek odczynu zapalnego, która z kolei wynika z zaburzenia dynamiki ich apoptozy.

W odróżnieniu od martwicy apoptoza jest procesem fizjologicznej regulacji długości życia komórki. Zachodzi w sytuacjach, kiedy śmierć komórki jest przewidywalna, jak w przypadku inwolucji tymocytów, czy podczas szybkiego mnożenia się komórek np. w obrębie krypt nabłonka przewodu pokarmowego. Częściowo poznane jest znaczenie tego procesu w kształtowaniu patofizjologii chorób nowotworowych, autoimmunologicznych, neurodegeneracyjnych czy AIDS [1-3]. W rozważaniach nad patogenezą klinicznych manifestacji atopii, badania dotyczące apoptozy ograniczyły się jedynie do określenia jej roli w regulowaniu żywotności i eliminacji eozynofili oraz neutrofilów z tkanek zmienionych w przebiegu przewlekłych schorzeń zapalnych [4-6].

Antygen błonowy Fas (CD95/APO-1) jest jednym z receptorów należących do nadrodziny związanej z czynnikiem martwicy nowotworów i przekazuje podstawowe sygnały kontrolujące zaprogramowaną śmierć komórki [7-10]. Częsteczką ta jest glikoproteiną stanowiącą integralną część błony komórkowej o masie cząsteczkowej 50 kD (11-13; 335 reszt aminokwasowych). Komórki, na których stwierdza się wzmożoną ekspresję swoistego dla Fas ligandu tj. FasL, wykazują silne działanie cytotoksyczne w stosunku do tych wykazujących pozytywną ekspresję CD95 – np. zainfekowanych wirusem [14]. Przeważająca liczba badań dotyczących Fas skupiona jest na ocenie jego roli w patofizjologii chorób nowotworowych, autoimmunologicznych, infekcjach wirusowych np. HIV [15-17].

Bcl-2 jest wewnątrzkomórkowym białkiem, jednym z ważniejszych inhibitorów apoptozy. Został po raz pierwszy opisany w przebiegu chłoniaków B komórkowych. Istnieje wiele genów kodujących białka należące do rodziny Bcl-2, których podstawową funkcją jest regulacja apoptozy. Część z nich wykazuje aktywność agonistyczną w stosunku do tego procesu (*bax*, *bcl-x<sub>S</sub>*, *bak*), inne mają aktywność antagonistyczną (*bcl-x<sub>L</sub>*, *bcl-w*) [18,19].

Oprócz stopnia ekspresji Fas i Bcl-2 dokonano oceny odczynu immunohistochemicznego z markerami aktywacji – HLA-DR oraz proliferacji komórek – PCNA. HLA-DR jest glikoproteiną kodowaną przez geny zgod-

ności tkankowej MHC (*major histocompatibility complex* – MHC) klasy II. Glikoproteina, której główna funkcja polega na prezentacji antygenów (cząsteczki MHC klasy II prezentują peptydy generowane z białek pochodzenia pozakomórkowego limfocytom T). Ekspresja HLA-DR jest typowa dla komórek prezentujących antygen, makrofagów, komórek B. Wzmożona ekspresja tej glikoproteiny jest związana z prezentacją antygenów komórce T lub z samym stanem aktywacji, pobudzenia komórki.

Antygen jądrowy komórek proliferujących (PCNA) jest nieswoistym komórkowo, ale swoistym dla podziału komórki, markerem. Jest to białko związane z polimerazą DNA, syntetyzowane krótko przed fazą S podziału komórkowego. Stopień jego ekspresji stanowi uznany, pośredni dowód podziału komórek.

Celem pracy jest przeprowadzenie porównawczej analizy stopnia ekspresji antygenów Fas i onkoproteiny Bcl-2 oraz markerów: aktywacji (HLA-DR) i proliferacji (PCNA) komórek nacieku zapalnego w biopsjach oskrzeli chorych na astmę alergiczną – chorobę o patofizjologii opartej na nadmiernej aktywacji cytokin typu Th-2 oraz u chorych na sarkoidozę, w przebiegu której dochodzi do hyperaktywacji typu Th-1.

## PACJENCI I METODY

### Pacjenci

Grupę badaną stanowiło 7 chorych na epizodyczną atopową astmę oskrzelową alergiczną w okresie bezobjawowym (3 kobiety i 4 mężczyzn; średnia wieku – 36,7±6,7). Rozpoznanie u chorych ustalono wg kryteriów GINA 2002.

Zastosowano następujące kryteria włączenia:

- astma epizodyczna
- FEV<sub>1</sub> >70% wartości należnej
- odwracalność > 12% (wartość FEV<sub>1</sub> przed i po podaniu 0,2 mg salbutamolu)
- całkowite stężenie IgE > 100 kU/L (*Pharmacia Cap System*)
- dodatni wynik punktowych testów skórnych wobec co najmniej jednego alergenu wziewnego (bąbel powyżej 3 mm, kontrola dodatnia i ujemna, diagnostyczny test firmy Allergopharma).

Jako kryteria wyłączenia przyjęto:

- negatywny wynik punktowych testów skórnych,
- steroidoterapia i/lub immunoterapia w poprzedzającym okresie (3 miesiące steroidoterapii, 3 lata immunoterapii),
- palenie papierosów,
- infekcja górnych dróg oddechowych w okresie miesiąca poprzedzającego badanie.

Grupę kontrolną stanowiło 5 chorych na sarkoidozę (2 kobiety, 3 mężczyzn, średnia wieku – 32,6±4,9). Rozpoznanie sarkoidozy płuc ustalono na podstawie badania

histopatologicznego biopsji płuca. Aktywność i zaawansowanie procesu określono na bazie badań radiologicznych (Tomografia Komputerowa).

Jako kryteria wyłączenia przyjęto:

- steroidoterapia w poprzedzającym okresie,
- palenie papierosów,
- infekcja górnych dróg oddechowych w okresie miesiąca poprzedzającego badanie.

## Metody

### Bronchofiberoskopia

Przed badaniem bronchoskopowym zastosowano premedykację z Atropiny (0,5 mg s.c.) oraz diazepam (5 mg s.l.). Krtań i górne drogi oddechowe znieczulono stosując ksylokainę w nebulizacji, a następnie w aerozolu (2%).

Przez okres badania monitorowano utlenowanie krwi oraz akcję serca (monitor Siemens 214), podawano tlen przez zgłębnik donosowy (przepływ 2 L/min).

Bronchofiberoskop (Olympus) wprowadzano przez jamę ustną i po dokładnych oględzinach drzewa oskrzelowego pobierano od trzech do czterech wycinków z oskrzeli płata dolnego płuca prawego.

### Badanie immunohistochemiczne

Biopaty umieszczano w 5% roztworze z buforowanej formaliny na okres 24-48 godzin, zatapiano w parafinie i krojono na 5 mm skrawki.

Analizę immunohistochemiczną wykonywano wg metody trójstopniowej ABC (Avidin-Biotin-Complex Kit Duet DAKO, Copenhagen) stosując następujące przeciwciała: HLA-DR (NCL-LN3, dilution 1:200, Novocastra, UK and Strept AB complex/HRP Duet, Mouse/Rabbit, DAKO), PCNA (NCL-LN3, dilution 1:200, Novocastra, UK and Strept AB complex/HRP Duet, Mouse/Rabbit, DAKO), Bcl-2 (Mause anti-human oncoprotein DAKO 1587, LSAB2 K675 DAKO), Fas/CD95/APO-1 (Human Fas, DAKO). Reakcję antygeny z przeciwciałem uwiadczniano przy użyciu chromogenu DAB (DAKO 53020, diaminobenzodyna). Jako kontrolę dodatniej reakcji użyto tkanki wężła chłonnego. Obraz histopatologiczny analizowano w mikroskopie (BX-40 Olympus) pod powiększeniem od 40x do 400x (HPF – pow. x40x400). Ekspresję badanych antygenów oceniano analizując 5 pól widzenia pod powiększeniem 400x i licząc średnią liczbę komórek, w których była widoczna reakcja immunohistochemiczna.

Zastosowano metodę półilościową do oceny stopnia ekspresji badanych antygenów:

- odczyn słabo pozytywny (mniej niż 5 reagujących komórek w polu widzenia),
- odczyn średnio pozytywny (5-15 komórek reagujących),
- odczyn silnie pozytywny (> 15 komórek reagujących)

Komórki, których cytoplazma lub jądra zabarwione były na ciemny, brązowy kolor ocenione były jako dająca pozytywną reakcję. Oceny dokonywało jednocześnie i niezależnie dwóch lekarzy patologów. Nie dokonano analizy morfometrycznej w przypadku badanych antygenów ze względu na duże prawdopodobieństwo błędny oceny statystycznej (mała liczba przypadków, różne populacje komórek, mała ilość materiału).

## WYNIKI

Zaobserwowano odczyn średnio pozytywny Fas na komórkach jednojądrzastych w obrębie nabłonka oskrzeli u dwóch chorych na astmę oskrzelową. Podobny stopień ekspresji zanotowano u trzech pacjentów z sarkoidozą, również głównie w obrębie komórek nabłonka dróg oddechowych.

Bcl-2 był obecny u wszystkich chorych na astmę oskrzelową i trzech chorych z sarkoidozą (odczyn słabo i średnio pozytywny). Dodatnią ekspresję obserwowano głównie w obrębie nacieku zapalnego w warstwie podnabłonkowej.

Stwierdzono silnie pozytywny odczyn w przypadku antygeny HLA-DR u wszystkich badanych chorych na astmę oskrzelową. Obraz widoczny na preparatach był wybitnie heterotypowy. Pozytywna reakcja dotyczyła komórek nacieku zapalnego, głównie komórek jednojądrzastych. Ekspresja antygeny miała charakter jądrowy i błonowy.

W grupie z sarkoidozą stopień ekspresji był o stopień mniejszy.

Odczyn z PCNA był słabo dodatni u pięciu chorych na astmę oskrzelową oraz trzech z sarkoidozą i dotyczył komórek zarówno nabłonka, jak i nacieku zapalnego.

Wyniki u poszczególnych chorych przedstawiają tabele I i II.

Przykłady obrazów histopatologicznych przedstawiono na rycinach 1 i 2.

## DYSKUSJA

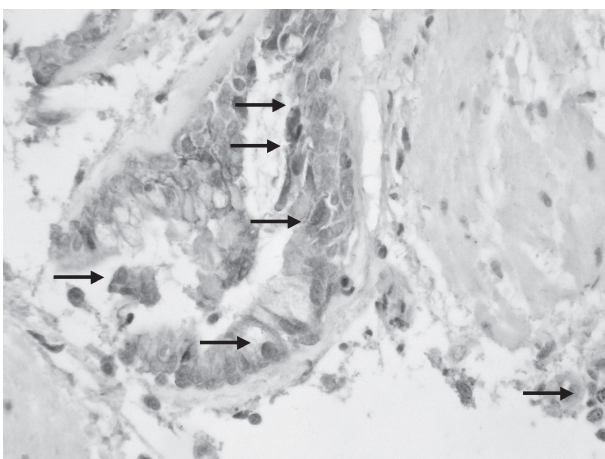
U wszystkich chorych na astmę stwierdzono obecność inhibitora apoptozy – Bcl-2. Stopień ekspresji tej cząsteczki wahał się od słabo dodatniego (poniżej 5 wybarwionych komórek) do średnio dodatniego (5-15 komórek reagujących). Pozytywna reakcja dotyczyła zarówno komórek nabłonka, jak i warstwy podnabłonkowej. Wzmoczona ekspresja niektórych czynników należących do rodziny Bcl-2 chroni komórki limfoidalne przed programowaną śmiercią. Jednocześnie jednak zbyt intensywna aktywność inhibitorów apoptozy może przyczyniać się do przewlekania procesu zapalnego poprzez wydłużanie życia komórek limfoidalnych. Istnieją prace oceniające

Tabela I. Ekspresja antygenu Fas, onkoproteiny Bcl-2 oraz HLA-DR i PCNA w biopsatach oskrzelowych chorych na astmę epizodyczną

Astma				
Symbol chorego	Fas	Bcl-2	HLA	PCNA
1	Fas	Bcl-2	HLA	PCNA
Nabłonek	0	+	0	0
Warstwa podnabłonkowa	0	++	+++	0
2	Fas	Bcl-2	HLA	PCNA
Nabłonek	0	+	0	+
Warstwa podnabłonkowa	0	+	+++	0
3	Fas	Bcl-2	HLA	PCNA
Nabłonek	++	0	0	0
Warstwa podnabłonkowa	0	+	+++	0
4	Fas	Bcl-2	HLA	PCNA
Nabłonek	0	0	+	0
Warstwa podnabłonkowa	0	+	0	+
5	Fas	Bcl-2	HLA	PCNA
Nabłonek	0	+	0	+
Warstwa podnabłonkowa	0	++	++	0
6	Fas	Bcl-2	HLA	PCNA
Nabłonek	0	0	+	0
Warstwa podnabłonkowa	0	+	0	+
7	Fas	Bcl-2	HLA	PCNA
Nabłonek	++	0	0	0
Warstwa podnabłonkowa	++	+	+++	+

Legenda:

- 0 brak reakcji
- + odczyn słabo pozytywny (mniej niż 5 reagujących komórek w polu widzenia)
- ++ odczyn średnio pozytywny (5-15 komórek reagujących)
- +++ odczyn silnie pozytywny (> 15 komórek reagujących)



Ryc. 1. Obraz błony śluzowej oskrzeli – średniego stopnia reakcja pozytywna z Bcl-2 (od 5 do 15 komórek pozytywnych); pow. zdjęcie 400x. Strzałki wskazują komórki reagujące dodatnio

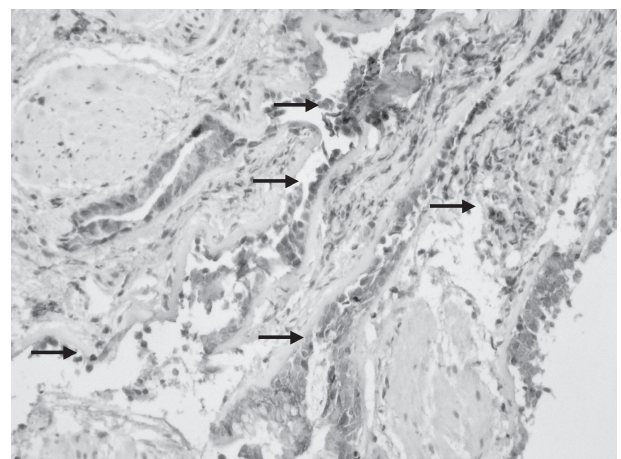
Tabela II. Ekspresja antygenu Fas, onkoproteiny Bcl-2 oraz HLA-DR i PCNA w biopsatach oskrzelowych chorych na sarkoidozę

Sarkoidoza				
Symbol chorego	Fas	Bcl-2	HLA	PCNA
1	Fas	Bcl-2	HLA	PCNA
Nabłonek	+	+	0	0
Warstwa podnabłonkowa	0	0	+	0
2	Fas	Bcl-2	HLA	PCNA
Nabłonek	+	0	0	+
Warstwa podnabłonkowa	0	0	0	+
3	Fas	Bcl-2	HLA	PCNA
Nabłonek	Dyfuzja	0	0	0
Warstwa podnabłonkowa	0	0	++	0
4	Fas	Bcl-2	HLA	PCNA
Nabłonek	+	0	0	+
Warstwa podnabłonkowa	+	+	+	+
5	Fas	Bcl-2	HLA	PCNA
Nabłonek	0	0	0	0
Warstwa podnabłonkowa	0	++	++	0

Legenda:

- 0 brak reakcji
- + odczyn słabo pozytywny (mniej niż 5 reagujących komórek w polu widzenia)
- ++ odczyn średnio pozytywny (5-15 komórek reagujących)
- +++ odczyn silnie pozytywny (> 15 komórek reagujących)

ekspresję Bcl-2 w obrębie eozynofików pochodzących z płucociny osób chorych na atopową astmę oskrzelową. W badaniach tych stwierdzono dodatnią korelację



Ryc. 2. Obraz błony śluzowej oskrzeli – reakcja silnie pozytywna z HLA-DR (powyżej 15 komórek pozytywnych w polu widzenia); pow. zdjęcie 200x. Strzałki wskazują skupiska komórek reagujących dodatnio

pomiędzy ilością eozynofiliów Bcl-2+ a stopniem nasilenia objawów chorobowych i stężeniem IL-5 i ECP [20]. Kolejne badania udowodniły, że stosowanie glikokortykosteroidów powoduje wzmożenie ekspresji Bcl-2 w biopatach pochodzących od chorych [21]. Nie stwierdzono natomiast obecnego w warunkach patologicznych stymulującego wpływu IL-5 i GM-CSF na ekspresję Bcl-2 [22].

Są również dane stanowiące kontrargument dla wzmożonej aktywności Bcl-2. Zaobserwowano bowiem, że ekspresja Bcl-2 na błonie mitochondriów komórek CD4+ obecnych w biopatach chorych na astmę oskrzelową była znamienne słabsza w porównaniu z grupą kontrolną. Autorzy pracy udowodnili również, że populacje komórek CD4+INF- $\gamma$ + w znacznie większym odsetku ulegały apoptozie. Wyniki te potwierdzają hipotezę, że zaburzenie równowagi pomiędzy Th1 a Th2 wynika z przedwczesnej apoptozy komórek subpopulacji Th1 [23], niekoniecznie z przedłużenia żywotności komórek typu Th2.

W pracy stwierdzono pozytywną ekspresję antygeny Fas u dwóch chorych – ekspresja tej molekuly, przekazującej sygnał apoptozy był zdecydowanie słabszy niż reakcja z Bcl-2. Czy zatem przedłużenie życia komórek alergicznego zapalenia wynika nie tylko z nadmiernej aktywacji inhibitorów apoptozy (Bcl-2), ale także z zaburzenia przekazywania sygnału apoptozy np. przez Fas?

Aktywacja Bcl-2 blokuje apoptozę stymulowaną nieswoiście np. poprzez deksametazon, natomiast tylko częściowo prowadzi do zahamowania tego procesu, gdy elementem przekazującym programowaną śmierć jest receptor Fas. Dla receptora Fas znane są dwie alternatywne ścieżki przekazywania apoptozy – jedna poprzez kaspazę 8, która w dużej ilości wiąże się z „domeną śmierci” receptora Fas i bezpośrednio rozpoczyna aktywację kolejnych enzymów tzn. kaspazy 3 oraz 9. Mitochondria są niszczone w końcowym etapie przez przyłączenie BID (*BH3 domain-containing proapoptotic Bcl2 family member*). Drugi typ aktywacji polega na przyłączeniu niewielkiej ilości kaspazy 8 do „domeny śmierci” receptora Fas i powolniejszej aktywacji apoptozy i co najważniejsze pierwotnie obejmującej niszczenie mitochondriów [24,25]. Bcl-2 zapobiega apoptozie głównie poprzez protekcję mitochondriów. Nieznaczne wzmożenie ekspresji CD95 uzyskano po stymulacji anty-CD3, natomiast gdy do hodowli dodawano IL-4 obserwowano hamowanie stopnia ekspresji CD95 bardziej efektywne u chorych niż u zdrowych osób. Cytokiny typu Th-2 wykazują działanie hamujące ekspresję antygeny CD95. W warunkach *in vitro* stymulacja komórek T oczyszczonym alergenem *Dermatophagoides pteronyssinus* powoduje przejściowy wzrost stopnia ekspresji CD95, bez wpływu na proces zaprogramowanej śmierci komórki. Z kolei dodanie do hodowli komórek cytokin typu Th-2, takich jak IL-4, IL-5, GM-CSF powoduje zależne od dawki obniżenie ekspresji mRNA (*messenger RNA*) dla receptora CD95 [26,27]. Autorzy postulują, iż jest to jeden z podstawowych mechanizmów

determinujących przedłużoną żywotność limfocytów T w przebiegu alergicznego zapalenia.

Cormican dokonał oceny jednocześnie ekspresji Bcl-2, Fas i FasL. Stwierdził, że ilość komórek o pozytywnej ekspresji Bcl-2, Fas czy FasL była porównywalna w biopatach chorych na astmę (niezależnie od stosowania u nich steroidów) oraz w grupie osób zdrowych. Zanotowano jednak, że chorzy leczeni glikokortykosteroidami wykazywali zwiększoną ekspresję Bcl-2, FasL (skala punktowa) w warstwie nabłonkowej, w porównaniu z chorymi nieleczonymi oraz osobami zdrowymi. Nie zanotowano różnicy w ilości komórek ulegających apoptozie. Ponadto stopień ekspresji Bcl-2, Fas i Fas-L korelowały z nasileniem odczynu PCNA [23,28].

Przeprowadzono analizę ekspresji PCNA w obrębie biopatów oskrzelowych osób chorych i zdrowych, nie stwierdzając różnicy pomiędzy chorymi a grupą osób zdrowych. U chorych z astmą steroidozależną odczyn PCNA był znamienne wyższy niż u chorych leczonych steroidami drogą wziewną. Wyższy także niż u chorych nieleczonych oraz niż w grupie kontrolnej; zaobserwowano także korelację pomiędzy stopniem ekspresji PCNA a cieńczeniem nabłonka u chorych ze steroidozależną astmą oskrzelową [29]. W naszym badaniu odczyn z PCNA był również widoczny aczkolwiek w stopniu niewielkim. Liczebność grupy nie pozwalała na ocenę zależności pomiędzy ekspresją badanych antygenów. Należy zaznaczyć, że dodatni odczyn z PCNA dotyczył w równym stopniu komórek nabłonka, jak i nacieku zapalnego.

Silnie pozytywny odczyn z HLA-DR w okresie bezobjawowym stanowi dowód, że alergiczne zapalenie toczy się niezależnie od występowania objawów choroby. Znaczenie antygenów zgodności tkankowej w rozpoznawaniu antygenów przez komórki T to ich główna funkcja. Do ekspresji HLA-DR dochodzi głównie na powierzchni komórek B, endotelium, makrofagów, komórek dendrytycznych w czasie ich aktywacji. Do najważniejszych komórek prezentujących antygen należą komórki dendrytyczne. Uważa się, że oprócz aktywacji czy prezentacji antygeny (w kontekście HLA-DR) komórki dendrytyczne odgrywają kluczową rolę w indukcji wydzielania cytokin przez komórki T, warunkując ich dalszy rozwój – np. w kierunku Th1 czy Th2 [30-33]. AB Kay w 1999 roku dowiódł ponadto, iż podanie śródskórnie chorym atopowym fragmentu alergenu kota (Fel d 1) może inicjować zależną od MHC klasy II (m.in. od HLA-DR-1) późną reakcję astmatyczną typu komórkowego bez reakcji IgE-zależnej. Potwierdził tym samym, iż cząstka HLA-DR mediuje swoiście proces aktywacji limfocytów, w dodatku w sposób izolowany od IgE-zależnej reakcji alergicznej [34]. Jej silna ekspresja w błonie chorych na astmę w okresie bezobjawowym stanowi dowód, że komórki alergicznego zapalenia pozostają w fazie aktywacji.

Grupę odniesienia w naszym badaniu stanowiła grupa chorych na sarkoidozę, chorobę ziarniniakową, w której patofizjologii kluczową rolę odgrywają cytokiny typu Th1. Pomimo małej liczebności grupy stwierdzono obecność pozytywnej reakcji zarówno w przypadku mediatora sygnału apoptozy (Fas), jak i jej inhibitora (Bcl-2). Stopień ekspresji tych antygenów był porównywalny do tego obserwowanego w grupie z astmą. Istnieją dane wskazujące, że INF- $\gamma$  odgrywa istotną rolę w utrzymywaniu i progresji zapalenia w przewlekłej sarkoidozie. Działanie TNF- $\alpha$  jest w sarkoidozie wielokierunkowe; z jednej strony zaburzenia interakcji pomiędzy receptorami a ligandami receptorów dla TNF stymulują powstawanie ziarniniaków, z drugiej strony dowiedziono indukcji TNF- $\alpha$  w komórkach zapalnych w fazie ustępowania ziarnin-

kowego zapalenia [35,36]. Proces zaprogramowanej śmierci komórkowej odgrywa istotną rolę w immunopatologii sarkoidozy. U chorych z postępującym procesem chorobowym wykazano wzrost ekspresji NF- $\kappa$ B oraz nasilenie ekspresji inhibitorów apoptozy (np. Bcl-x<sub>L</sub>) [37,38]. Nie stwierdzono jednak zmniejszonej aktywności receptorów mediujących programowaną śmierć – wręcz przeciwnie – ekspresja cząsteczek Fas w sarkoidalnych limfocytach T jest większa niż w populacjach komórek niezmiennych [36].

Przewlekanie się procesu zapalnego w przebiegu chorób alergicznych może być wywoływane poprzez nadmierną aktywację inhibitorów apoptozy, a nie poprzez zaburzenie mediowania sygnału programowanej śmierci np. przez receptory dla TNF (Fas).

## Piśmiennictwo

1. Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 1980; 68: 251-306.
2. Carson DA, Ribeiro JM. Apoptosis and disease. *Lancet* 1993; 341: 1251-1254.
3. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995; 267: 1456-1462.
4. Simon HU, Yousefi S, Schranz C i wsp. Direct demonstration of delayed eosinophil apoptosis as a mechanism causing tissue eosinophilia. *J Immunol* 1997; 158: 3902-3908.
5. Simon HU, Blaster K. Inhibition of programmed eosinophil death: a key pathogenic event for eosinophilia? *Immunol Today* 1995; 16: 53-55.
6. Ochiai K, Kagami R, Matsumura R i wsp. IL-5 but not interferon-gamma (INF-gamma) inhibits eosinophil apoptosis by up-regulation of bcl-2 expression. *Clin Exp Immunol* 1997; 107: 198-204.
7. Krammer PH. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 2000; 407: 789-795.
8. Walker PR, Saas P, Dietrich PY. Role of Fas ligand (CD95L) in immune escape: the tumor cell strikes back. *J Immunol* 1997; 158: 4521-4527.
9. Trauth BC, Klas C, Peters AMJ i wsp. Monoclonal antibody – mediated tumor regression by apoptosis. *Science* 1989; 245: 301-305.
10. Rabinowich H, Reichert TE, Kashii Y i wsp. Lymphocyte Apoptosis induced by Fas Ligand – expressing Ovarian Carcinoma Cells implications for altered expression of T Cell Receptor in tumor-associated lymphocytes. *J Clin Invest* 1998; 101: 2579-2588.
11. Suda T, Takahashi T, Golstein P, Nagata S. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 1993; 75: 1169-1178.
12. Suda T, Nagata S. Purification and characterisation of the Fas-ligand that induces apoptosis. *J Exp Med* 1994; 179: 873-879.
13. Nagata S. Fas and Fas ligand: a death factor and its receptor. *Adv Immunol* 1996; 57: 129-144.
14. Hosaka N, Oyaizu N, Kaplan MH i wsp. Membrane and soluble forms of Fas (CD95) and Fas ligand in peripheral blood mononuclear cells and in plasma from human immunodeficiency virus-infected persons. *J Infect Dis* 1998; 178: 1030-1039.
15. Kamihira S, Yamada Y, Tomonaga M i wsp. Discrepant expression of membrane and soluble isoforms of Fas (CD95/APO-1) in adult T-cell leukaemia: soluble Fas isoform is an independent risk factor for prognosis. *Br J Haematol* 1999; 107: 851-860.
16. Krammer PH. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 2000; 407: 789-795.
17. Goel N, Ulrich DT, St-Clair EW i wsp. Lack of correlation between serum soluble Fas/APO-1 levels and autoimmune disease. *Arthritis Rheum* 1996; 39: 1611-1912.
18. Kroemer G. The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nature Med* 1997; 3: 614-620.
19. Boise LH, Gonzalez-Garcia M, Postema CE i wsp. Bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 1993; 74: 597-608.
20. Jang AS, Choi IS, Lee S i wsp. Bcl-2 expression in sputum eosinophils in patients with acute asthma. *Thorax* 2000; 55: 370-374.
21. Druilhe A, Wallaert B, Tsicopoulos A i wsp. 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.
22. Dibbert B, Daigle I, Braun D i wsp. 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.
23. Cormican L, O'Sullivan S, Burke CM i wsp. IFN-gamma but not IL-4 T cells of the asthmatic bronchial wall show increased incidence of apoptosis. *Clin Exp Allergy* 2001; 31: 731-739.
24. Li H, Zhu H, Xu CJ i wsp. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 1998; 94: 491.
25. Luo X, Budihardjo I, Zou H i wsp. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 1998; 94: 481.
26. Spinozzi F, Agea E, Fizzotti M i wsp. 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.
27. Spinozzi F, Fizzotti M, Agea E i wsp. Defective expression of Fas messenger RNA and Fas receptor on pulmonary T cells from patients with asthma. *Ann Intern Med* 1998; 128: 363-369.

28. Reed J. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* 1994; 124: 1-6.
29. Vignola AM, Chiappara G, Siena L i wsp. Proliferation and activation of bronchial epithelial cells in corticosteroid-dependent asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108: 738-746.
30. Schwartz BD. HLA molecules: sentinel of the immune response. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1991; 5: 211-212.
31. Puri J, Taplits M, Alava M i wsp. Inhibition of release of arachidonic acid, superoxide, and IL1 from human monocytes by monoclonal antiHLA class II antibodies. *Inflammation* 1992; 16: 31-43.
32. Moller GM, Overbeek SE, Van Helden-Meeuwssen CG. Increased numbers of dendritic cells in the bronchial mucosa of atopic asthmatic patients: downregulation by inhaled corticosteroids. *Clin Exp Allergy* 1996; 26: 517-524.
33. Robinson DS, Bentley AM, Hartnell A i wsp. Activated memory of T helper cells in bronchoalveolar lavage fluid from patients with atopic asthma: relation to asthma symptoms, lung function, and bronchial responsiveness. *Thorax* 1993; 48: 26-32.
34. Haselden BM, Kay AB, Larche M. Immunoglobulin E-independent major histocompatibility complex-restricted T cell peptide epitope-induced late asthmatic reactions. *J Exp Med* 1999; 189: 1885-1894.
35. Baughman RP, Strohofer SA, Buchsbaum J i wsp. Release of tumor necrosis factor by alveolar macrophages of patients with sarcoidosis. *J Lab Clin Med* 1990; 115: 36-42.
36. Agostini C, Zambello R, Sancetta R i wsp. Expression of tumor necrosis factor-receptor superfamily members by lung T lymphocytes in interstitial lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153: 1359-1367.
37. Greene CM, Meachery G, Taggart CC i wsp. Role of IL-18 in CD4+ T lymphocyte activation in sarcoidosis. *J Immunol* 2000; 165: 4718-4724.
38. Drent M, van den Berg R, Haenen GR i wsp. NF-kappaB activation in sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 2001; 18: 50-56.