

Małgorzata Stachera-Grzenkowicz

**Kliniczne znaczenie ekspresji antygenu CD154
i receptora CXCR6 na limfocytach T
w płucach oskrzelowo-pęcherzykowych
i krwi obwodowej u chorych na sarkoidozę.**

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Promotor

Prof. dr hab. med. Jan Marek Słomiński

Katedra Pneumonologii i Alergologii
Gdański Uniwersytet Medyczny

Gdańsk 2011

Praca została wykonana w ramach
projektu badawczego promotorskiego **N N420 081234**

**Składam serdeczne podziękowania za okazaną pomoc
wszystkim Pracownikom
Katedry Pneumonologii i Alergologii,
Katedry i Zakładu Fizjopatologii,
Zakładu Terapii Monitorowanej i Farmakogenetyki.**

*Moim Rodzicom,
Mężowi i Córeczce*

Spis treści

1. Wykaz najważniejszych skrótów.....	6
2. Wstęp.....	7
2.1 Sarkoidoza	7
2.1.1 Epidemiologia	7
2.1.2 Rys historyczny.....	7
2.1.3 Zmiany w badaniu histopatologicznym	7
2.1.4 Czynniki sarkoidalne	8
2.1.5 Rozpoznanie.....	8
2.1.6 Obraz kliniczny	8
2.1.7 Obraz radiologiczny	9
2.1.8 Badania czynnościowe płuc	10
2.1.9 Rokowanie	10
2.1.10 Leczenie	10
2.2 Bronchofiberoskopia – podstawy teoretyczne i rys historyczny.....	11
2.3 Cytometria przepływowa - podstawy teoretyczne i rys historyczny ...	12
2.4 Podstawy immunologiczne	13
2.4.1 Limfocyty T CD4 i CD8.....	13
2.4.2 Chemokiny i receptory chemokinowe	14
2.4.3 Chemotaksja	15
2.4.4 Limfocyty T CD45RA i CD45RO	15
2.4.5 Limfocyty T TCR $\alpha\beta$ i TCR $\gamma\delta$	16
2.4.6 Aktywacja limfocytów T i kostymulacja.....	16
2.4.7 CD28	17
2.4.8 CD152	17
2.4.9 CD25	17
2.4.10 CD154	17

2.4.11	Receptor CXCR6.....	17
2.4.12	CD69	18
2.4.13	HLA-DR	18
2.5	Immunologia sarkoidozy.....	18
3	Cel pracy.....	20
4.	Materiały i metody.....	21
4.1	Charakterystyka badanych grup.....	21
4.2	Zgoda na udział w badaniu.....	25
4.3	Bronchoskopia i płukanie oskrzelowo-pęcherzykowe (BAL).....	25
4.4	Przygotowanie materiału i analiza cytometryczna.....	26
4.5	Analiza statystyczna	27
5.	Wyniki.....	28
5.1	Receptor CXCR6.....	28
5.2	Subpopulacje limfocytów T	35
5.2.1	Limfocyty T CD4 i CD8.....	35
5.2.2	Limfocyty T TCR $\alpha\beta$ i TCR $\gamma\delta$	53
5.2.3	Limfocyty T CD45RA i CD45RO.....	56
5.3	Cząsteczka kostymulująca CD28.....	59
5.4	Markery aktywacji limfocytów	64
5.4.1	CD69	64
5.4.2	HLA-DR	67
5.4.3	CD25	70
5.4.4	CD154	73
5.5	Podsumowanie wyników.....	76
6.	Dyskusja.....	79
7.	Wnioski	97
8.	Streszczenie	98

8.1	Summary	100
9.	Spis wykresów	102
10.	Spis tabel.....	106
11.	Piśmiennictwo.....	107

1. Wykaz najważniejszych skrótów

ALS (advanced life support) zaawansowane zabiegi ratowania życia

BAL (bronchoalveolar lavage) płukanie oskrzelowo-pęcherzykowe

CD (cluster of differentiation) kompleks różnicowania, oznaczenie struktur powierzchniowych komórek, głównie leukocytów

DLCO pojemność dyfuzyjna płuc dla tlenku węgla

EDTA K2 wersenian dwupotasowy

FEV1 (forced expiratory volume in first second) natężona objętość wydechu pierwszosekundowa

FITC (fluorescein isothiocyanate) rodzaj znacznika fluorescencyjnego

FSC (forward scatter channel) detektor rozproszenia światła zgodnie z kierunkiem wiązki laserowej

GKS glikokortykosteroidy

GUMed Gdański Uniwersytet Medyczny

IL (interleukin) interleukina

MHC (major histocompatibility complex) główny układ zgodności tkankowej

PC5 (phycoerythrin-cyanin 5.1) rodzaj znacznika fluorescencyjnego

PE (phycoerythrin) rodzaj znacznika fluorescencyjnego

RPE-Cy5 (phycoerythrin-cyanine 5) rodzaj znacznika fluorescencyjnego

RTG badanie (zdjęcie) rentgenowskie

SSC (side scatter channel) detektor rozproszenia światła pod kątem 90 stopni od osi optycznej

Tc (T cytotoxic cells) limfocyty T cytotoksyczne

TCR (T cell receptor) receptor limfocytów T

Th (T helper cells) limfocyty T pomocnicze

TKWR tomografia komputerowa wysokiej rozdzielczości

TLBL (transbronchial lung biopsy) przezoskrzelowa biopsja płuca

TLC (total lung capacity) całkowita pojemność płuc

TNF (tumor necrosis factor) czynnik martwicy nowotworu

VC (vital capacity) pojemność życiowa

2. Wstęp

2.1 Sarkoidoza

2.1.1 Epidemiologia

Sarkoidoza jest jedną z najczęściej spotykanych chorób śródmiąższowych płuc. W Polsce zachorowalność szacuje się na około 10 na 100 000 osób (na świecie według różnych danych od 0,56 do 64 na 100 000 osób) [63,64]. Głównie występuje u młodych dorosłych między 20 a 40 rokiem życia. W Skandynawii i Japonii obserwuje się drugi szczyt zachorowań wśród kobiet po 50 roku życia [29,63].

2.1.2 Rys historyczny

Pierwszego opisu sarkoidozy dokonał J. Hutchinson w 1877 roku (zmiany skórne pod postacią rumienia guzowatego). W 1915 roku E. Kuznitsky i A. Bittorf powiązali występowanie zmian skórnych w sarkoidozie z widocznym w RTG klatki piersiowej powiększeniem węzłów chłonnych wnek i naciekami w płucach. Skrót BBS, używany na określenie sarkoidozy, wywodzi się od nazwisk badaczy M. Besnier, C. Boeck i J.Schaumann, którzy opisywali różną lokalizację zmian sarkoidalnych. Nazwa „sarkoidoza”, zastosowana w 1899 roku przez C. Boecka, miała wyrazić podobieństwo histopatologiczne do „mięsaka - sarcoma” [29,63,81,104].

2.1.3 Zmiany w badaniu histopatologicznym

Proces chorobowy obejmuje śródmiąższ płuc, tj. przestrzeń między błoną podstawną pęcherzyków płucnych, a śródłonkiem naczyń włosowatych. W ujęciu klinicznym za „śródmiąższ” przyjmuje się zawartość przegród międzypęcherzykowych i światła pęcherzyków płucnych, jak również sieć naczyń włosowatych i limfatycznych oraz tkankę łączną okołonaczyniową i okołoskrzelową [96]. W badaniu histopatologicznym stwierdza się ziarniniaki sarkoidalne, które w zdecydowanej większości przypadków nie ulegają serowaceniowi (martwicy). Utworzone są z komórek nabłonkowych i wielojądrzastych komórek olbrzymich. Komórki te powstają na drodze przekształcenia monocytów w makrofagi, a następnie ich fuzji. W skład ziarniniaków wchodzi również limfocyty, zlokalizowane głównie w części obwodowej [2,63,64].

2.1.4 Czynniki sarkoidalne

Ziarniniaki są najpewniej odpowiedzią na niezidentyfikowany dotychczas czynnik sprawczy, tzw. czynnik sarkoidalny. Prawdopodobnie są wyrazem reakcji obronnej organizmu, mającej na celu odizolowanie antygeny i ograniczenie reakcji zapalnej. Podkreśla się dużą rolę predyspozycji genetycznych, które w połączeniu z czynnikami środowiskowymi mogą modyfikować przebieg choroby [22,29,63]. Toczą się dyskusje na temat udziału prątka gruźlicy w etiopatogenezie sarkoidozy [22,63]. A. Dubaniewicz wskazuje na udział białek szoku termicznego *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb-hsp) [29,30]. Badanie ACCES (A Case Control Etiologic Study of Sarcoidosis) stwierdza możliwość udziału różnych czynników środowiskowych. Potwierdza ono również negatywny związek sarkoidozy z paleniem tytoniu [22,61].

2.1.5 Rozpoznanie

Rozpoznanie sarkoidozy opiera się na badaniu histopatologicznym, w którym stwierdza się obecność nieserowaczących ziarniniaków sarkoidalnych w zajętych narządach. Konieczne jest współwystępowanie typowego dla sarkoidozy obrazu klinicznego i radiologicznego. Wykluczenia wymagają inne choroby ziarniniakowe o podobnym przebiegu [29,63,64,86].

2.1.6 Obraz kliniczny

Szacuje się, że u około 60% chorych sarkoidozę wykrywa się przypadkowo, tj. w trakcie rutynowych badań okresowych (badanie radiologiczne klatki piersiowej). Tylko 30% pacjentów prezentuje objawy ogólne (osłabienie, gorączka, utrata masy ciała). Sarkoidoza może dotyczyć każdego narządu. Obraz kliniczny zależy od dominującej lokalizacji i rozległości zmian, a także aktywności procesu chorobowego. Najczęściej zajęte są płuca (>90%) i węzły chłonne wnek i śródpiersia (95-98%). Zmiany osłuchowe, głównie pod postacią trzeszczeń nad polami płucnymi, stwierdzane są u mniej niż 20% chorych. U około 20%-30% osób rasy białej występuje ostry początek sarkoidozy, tzw. zespół Löfgrena. Przebiega on z gorączką, obustronnym powiększeniem węzłów chłonnych wnek płucnych, rumieniem guzowatym i bólem stawów. Ustępuje zwykle samoistnie, a nawroty choroby są rzadkie. Sarkoidoza przewlekła występuje u ok. 10%-30% chorych [63,64,86]. Za sarkoidozę przewlekłą uznawane jest utrzymywanie się zmian sarkoidalnych powyżej 2 lat [63,98], niektórzy stosują również kryterium 5 lat [7,52].

2.1.7 Obraz radiologiczny

Zwraca uwagę występująca często duża dysproporcja między obserwowanymi zmianami radiologicznymi, a dobrym stanem ogólnym pacjenta [63,64,86]. Na podstawie klasycznego badania radiologicznego klatki piersiowej wyróżnia się 5 stadiów sarkoidozy (tabela 1).

Tabela 1. Stadia sarkoidozy (RTG- badanie radiologiczne).

Stadium sarkoidozy	Zmiany widoczne w badaniu RTG klatki piersiowej
0	obraz prawidłowy (pozapłucna lokalizacja sarkoidozy)
1	poszerzenie wnęk płucnych, tj. powiększone węzły chłonne wnęk płucnych i/lub śródpiersia
2	towarzyszące powiększonym węzłom chłonnym drobnoguzkowe zmiany rozsiane w miąższu płuc
3	tylko zmiany rozsiane śródmiąższowe (bez towarzyszących powiększonych węzłów chłonnych)
4	zaawansowane zmiany włókniste płuc

Często konieczne jest wykonanie badania tomografii komputerowej wysokiej rozdzielczości (TKWR). Stwierdzić w nim można m.in. charakterystyczny rozkład zmian drobnoguzkowych, tj. okołoskrzelowo, okołonaczyniowo, podopłucnowo, wzdłuż szczelin międzypłatowych, jak również zgrubienie przegród międzyzrazikowych. Niekiedy widoczne są zmiany typu „mlecznej szyby”, które mogą świadczyć o wypełnieniu pęcherzyków płucnych przez nacieki komórkowe i wskazywać na aktywność choroby, bądź związane są z włóknieniem płuc. Istotna jest ocena nasilenia zmian włóknistych ze względu na zaburzoną architekturę miąższu płucnego, towarzyszące rozstrzenia oskrzeli i zmiany typu „plastra miodu”. Dość charakterystyczne obrazy radiologiczne są niezwykle pomocne w różnicowaniu z wieloma innymi śródmiąższowymi chorobami płuc [63,64,86].

2.1.8 Badania czynnościowe płuc

W badaniach czynnościowych płuc stwierdzić można narastające zaburzenia wentylacji, głównie pod postacią zmian restrykcyjnych. Zmniejsza się zdolność dyfuzyjna dla tlenu węgla (DLCO) [29,63,64,86,96].

2.1.9 Rokowanie

Rokowanie u chorych z zespołem Löfgrena jest dobre. Sarkoidoza przewlekła ma często podstępny początek i rzadko ulega samoistnej remisji. W przypadku, gdy choroba postępuje konieczne może być włączenie leczenia. Jednak nawroty po leczeniu są częste, a rokowanie niepewne. Śmiertelność w sarkoidozie, szacowana na mniej niż 5%, związana jest z postępującą niewydolnością oddechową, zajęciem serca, bądź ośrodkowego układu nerwowego [63,64,86].

2.1.10 Leczenie

W leczeniu sarkoidozy najczęściej stosuje się glikokortykosteroidy (GKS) [6,39,63,64,86,95]. Wskazaniami do rozpoczęcia terapii są zajęcie serca, ośrodkowego układu nerwowego, narządu wzroku lub hiperkalcemia. W sarkoidozie układu oddechowego leczenie włącza się w momencie stwierdzenia progresji choroby. Stąd konieczność obserwacji i monitorowania chorych. Ocenia się progresję w zakresie badań czynnościowych i radiologicznych płuc, nasilenie objawów klinicznych. Leczenie alternatywne polega na zastosowaniu metotreksatu, azatiopryny, bądź cyklofosfamidu. Dotychczas nie ma jednak jednoznacznych badań świadczących o przewadze takiego leczenia [6,63,64,86]. Obecnie bada się skuteczność inhibitorów TNF α (etanercept, infliximab, golimumab), talidomidu, przeciwciał monoklonalnych przeciwko IL-12 i IL-23 (ustekinumab) [7,38,57]. W przypadku niewydolności oddechowej i nadciśnienia płucnego w przebiegu zaawansowanej sarkoidozy rozważa się wykonanie przeszczepienia płuc [29,63,64,86].

2.2 Bronchofiberoskopia – podstawy teoretyczne i rys historyczny

Bronchoskopia jest badaniem endoskopowym układu oddechowego. Umożliwia obejrzenie dróg oddechowych na poziomie krtani, tchawicy, oskrzeli głównych, płatowych, ujść oskrzeli segmentalnych i podsegmentalnych. Po raz pierwszy sztywnego bronchoskopu ze źródłem światła użył w 1904 r. C. Jockson. Wcześniej klasyczny bronchoskop sztywny był opisywany przez G. Kiliana (1897r.) i P. Pieniążka (1901r.). Obecnie rzadko, ale nadal wykorzystuje się bronchoskopy sztywne, głównie przy usuwaniu ciał obcych z dróg oddechowych, laseroterapii, protezowaniu dróg oddechowych [63]. W 1967 r. S. Ikeda zastosował bronchofibroskop (bronchoskop giętki). Dzięki ruchomości aparatu możliwe jest dotarcie do tych miejsc dróg oddechowych, które były niedostępne bronchoskopom sztywnym. Nadal jednak istnieją ograniczenia, wynikające ze średnicy samego aparatu. Stąd wykorzystanie techniki płukania oskrzelowo-pęcherzykowego (BAL) w pozyskaniu materiału pochodzącego z najbardziej obwodowych części dróg oddechowych. Płyn oskrzelowo-pęcherzykowym dostarcza informacje o środowisku drobnych oskrzeli, oskrzelików i pęcherzyków płucnych, ich składzie komórkowym i cytokinowym [18,63].

Tradycyjnie BAL wykonuje się po stronie prawej w jednym z oskrzeli płata środkowego lub po stronie lewej, w odpowiadającym im oskrzelach języczka [18,63]. Niekiedy wykonuje się w innym miejscu ze względu na największe nasilenie procesu śródmiąższowego, uwidocznionego w badaniu TKWR klatki piersiowej [104]. Ma to jednak większe znaczenie przy wyborze miejsca do TBLB (przezoskrzelowej biopsji płuca) [45,95,98]. Po zaklinowaniu końcówki bronchofibroskopu w jednym z oskrzeli podsegmentalnych, podaje się w porcjach sól fizjologiczną (0,9% NaCl), a następnie odsysa. Pierwsza odessana frakcja stanowi materiał z większych oskrzeli, kolejne to płyn, który dotarł do drobnych oskrzelików i pęcherzyków płucnych.

Istnieją liczne wskazania do bronchofiberoskopii. Można je podzielić na kliniczne, radiologiczne i związane z leczeniem. W diagnostyce coraz szersze zastosowanie znajduje bronchofiberoskopia fluorescencyjna i biopsja przezoskrzelowa pod kontrolą ultrasonografii. Należy pamiętać o istniejących względnych przeciwwskazaniach i ewentualnych powikłaniach związanych z samym zabiegiem lub stosowanym znieczuleniem miejscowym, czy premedykacją. Opisywana śmiertelność związana z bronchofiberoskopią wynosi 0,01%-0,04% [18,63,86].

2.3 Cytometria przepływowa - podstawy teoretyczne i rys historyczny

Zastosowanie cytometrii przepływowej pozwala na przyżyciowe badanie pojedynczych komórek. Metoda odznacza się dużą szybkością i obiektywizmem. Uzyskiwane wyniki są powtarzalne i dokładne, oparte na analizie od kilkuset do kilku tysięcy komórek na sekundę. Rozwój techniki umożliwił jednoczesną ocenę kilku parametrów w każdej badanej komórce [44].

W 1934 roku Maldaven opisał pierwsze urządzenie do automatycznego liczenia krwinek czerwonych z użyciem detektora fotoelektrycznego połączanego z mikroskopem. Znacząco na rozwój cytometrii przepływowej wpłynęło zastosowanie zasady hydrodynamicznego ogniskowania. Wprowadzenie znakowania przeciwciał za pomocą barwników fluorescencyjnych umożliwiło szerokie jej wykorzystanie [44]. Cytometr przepływowy składa się z układu hydraulicznego, optycznego, detektorów i komputera. Laminarny przepływ badanych komórek zostaje wymuszony przez konstrukcję układu hydraulicznego, wykorzystującego zjawisko hydrodynamicznym ogniskowaniem. Badane komórki płyną wąskim strumieniem, jedna za drugą w otoczeniu szybko płynącej cieczy ogniskującej. Stąd możliwe jest by na każdą komórkę z osobna padło światło lasera. Źródłem światła w cytometrze przepływowym jest najczęściej laser argonowy, emitujący falę o długości 488nm. Obecnie wykorzystuje się dwa lub trzy lasery. Jednocześnie dokonuje się analiza optyczna i wzbudzenie fluorescencji. Detektor rejestrujący światło rozproszone do przodu, tj. zgodnie z kierunkiem wiązki laserowej, dostarcza informacji o wielkości komórki. Odpowiada to parametrowi FSC (ang. Forward Scatter). Drugi detektor rejestruje rozproszenie światła pod kątem 90 stopni. Parametr nazywa się SSC (ang. Side Scatter) i opisuje wewnętrzną strukturę komórki, m.in. jej ziarnistość. Wzbudzone światło fluorescencji po przejściu odpowiednich filtrów jest mierzone za pomocą odrębnego systemu detekcji [4,44,49]. Fluorescencja zależna jest od użytych do badania przeciwciał monoklonalnych, które są sprzężone z odpowiednimi barwnikami fluorescencyjnymi. Przeciwciała te łączą się z komplementarnymi antygenami powierzchniowymi na badanych komórkach. Istotny jest właściwy dobór barwników fluorescencyjnych, w sposób umożliwiający uniknięcie nakładania się widm emisyjnych barwników. Często pomocna jest tzw. kompensacja, która polega na elektronicznym przetworzeniu poziomu fluorescencji. Intensywność fluorescencji liniowo koreluje z gęstością antygenu na powierzchni komórki. Najczęściej wykorzystywane barwniki to FITC (ang. fluorescein isothiocyanate izomer 1), PE (ang. phycoerythrin), PE-Cy5 (ang. phycoerythrin-cyanine 5), PC5 (ang. phycoerythrin-cyanin 5.1). Różnorodność dostępnych przeciwciał i barwników może

wpływać na uzyskiwane wyniki. Stąd wprowadza się nieformalne standardy używanych przeciwciał np. w diagnostyce hematologicznej [4,44,49].

Fotopowielacze w cytometrze przepływowym zamieniają informacje niesione przez fotony na impuls elektryczny. Ostatecznie dane w postaci cyfrowej gromadzone są w komputerze. Do zobrazowania wyników można użyć wykresów jednowymiarowych (histogramów), wykresów dwuwymiarowych (cytogramów) lub trójwymiarowych. Najczęściej stosowany jest wykres kropkowy (dot plot), na którym każdemu punktowi na wykresie odpowiada jedna badana komórka. Używa się również wykresów gęstości (obszary o jednakowej ilości komórek posiadają identyczną intensywność obrazu) lub wykresów konturowych, gdzie ilość komórek wyrażona jest poziomiami. Przy użyciu tzw. bramek można oddzielić wybrane fragmenty obrazu na ekranie komputera, tj. wybrać interesującą populację komórek i tylko ją poddać dalszej analizie [44].

Termin „immunofenotyp komórkowy” oznacza zestaw antygenów charakteryzujących daną komórkę. Ma on istotne znaczenie we współczesnej diagnostyce hematologicznej przy rozpoznawaniu wielu jednostek chorobowych. W 1982 roku wprowadzono jednolity system nazewnictwa poszczególnych antygenów na powierzchni komórki tzw. CD (ang. Cluster Differentiation) i cCD (ang. Cytoplasmic Cluster Differentiation) dla antygenów cytoplazmatycznych [37].

2.4 Podstawy immunologiczne

2.4.1 Limfocyty T CD4 i CD8

Limfocyty T niegdyś dzielono na limfocyty T pomocnicze (Th) i limfocyty T cytotoksyczne (Tc), co miało odpowiadać limfocytom T CD4⁺ (Th) i limfocytom T CD8⁺ (Tc). Obecnie wiadomo, że CD4 i CD8 nie determinuje funkcji pomocniczej czy cytotoksycznej, a jedynie umożliwia rozpoznawanie antygenów w połączeniu z cząsteczkami odpowiednio MHC klasy II lub klasy I [37]. Średni stosunek limfocytów CD4⁺ do CD8⁺ we krwi ludzi zdrowych wynosi ok. 1,3 (od 0,5 do 7,0) [37].

Cząsteczki MHC klasy II prezentują antygeny zewnątrzkomórkowe (np. z fagocytowanych bakterii), a cząsteczki MHC klasy I głównie antygeny syntezowane wewnątrzkomórkowo, choć niekiedy, na drodze prezentacji krzyżowej, również antygeny zewnątrzkomórkowe [37].

Limfocyty Tc niszczą obce komórki. Limfocyty Th uczestniczą w odpowiedzi typu humoralnego i komórkowego. Wspomagają aktywację, proliferację i

różnicowanie limfocytów B. Wpływają na prekursorów limfocytów Tc i makrofagi. W zależności od panelu wytwarzanych cytokin wyróżnia się limfocyty Th1, Th2 i Th17. Pierwotnego podziału na limfocyty Th1 i Th2 u myszy dokonał Mosmann w 1986 roku. Limfocyty Th1 działają pomocniczo w odpowiedzi typu komórkowego (zakażenia pierwotniakami, grzybami i niektórymi bakteriami, np. *Mycobacterium*), a limfocyty Th2 uczestniczą w odpowiedzi typu humoralnego (zakażenia niektórymi pasożytami np. tasiemiec i bakteriami np. *Borrelia burgdorferi*). Profil wytwarzanych cytokin może ulec zmianie w zależności od aktualnych warunków. Zależy to również od rodzaju zakażenia, komórek prezentujących antygen i cząsteczek kostymulujących. Przy długotrwałe utrzymującym się bodźcu limfocyty Th utrwalają określony fenotyp i rodzaj wytwarzanych cytokin [37].

2.4.2 Chemokiny i receptory chemokinowe

Dotychczas nie ujednolicono systemu klasyfikującego cytokiny. Można je dzielić w zależności od budowy, działania, czy występowania. Niekiedy te same cytokiny zaliczane są do różnych grup. Obecność receptora dla cytokiny na danej komórce warunkuje możliwość jej oddziaływania [36,37,71].

Limfocyty Th1, Th2, Th17 posiadają różne receptory chemokinowe na swojej powierzchni, stąd ich różna odpowiedź na bodźce chemokinowe [37,46,53,71,72]. Chemokiny są cytokinami o działaniu chemotaktycznym i prawdopodobnie aktywującym różne subpopulacje leukocytów, stymulującymi ich proliferację i różnicowanie. Cechują się podobną budową i oddziaływaniem na te same receptory, choć często posiadają swoiste receptory [37,46,53,71,72]. Mechanizm regulujący odpowiedź leukocytów na chemokiny polega m.in. na utracie wrażliwości receptora na daną chemokinę po jej zadziałaniu (desentyzacja receptora), co umożliwia precyzyjną migrację leukocytów. Chemokiny, stymulując dojrzewanie leukocytów, powodują jednocześnie utratę ich wrażliwości na swoje działanie. Niektóre wirusy (np. HIV) wykorzystują receptory chemokinowe do zakażenia komórek. Blokowanie receptorów chemokinowych przy użyciu rekombinowanej chemokiny lub przeciwciała przeciw receptorowi dałoby możliwość obrony przed zakażeniem. Mogłoby również zmienić odpowiedź leukocytów w rozumieniu migracji, aktywacji, proliferacji, czy różnicowania [36,37,46,53,71,72].

2.4.3 Chemotaksja

We krwi obwodowej znajduje się zaledwie 2% limfocytów z ogólnej puli limfocytów dorosłego człowieka [37]. Krążą one między różnymi kompartmentami organizmu. Migracja ta warunkowana jest oddziaływaniem chemokin na receptory chemokinowe. Dzięki chemokinom na powierzchni śródbłónka naczyń toczące się limfocyty ulegają aktywacji, co zmienia ich zdolności do ścisłej adhezji. Zwiększona płynność błony komórkowej limfocytów pozwala na zmianę ich kształtu przez co mogą przecisnąć się między komórkami śródbłónka i przejść do tkanek (diapedeza) [37,53,54,71,72]. Jedną z hipotez zakłada ukierunkowaną migrację limfocytów do miejsca, w którym po raz pierwszy zetknęły się z antygenem (ang. lymphocytes homing). Według niej istnieją na limfocytach cząsteczki zwane receptorami zasiedlenia, które oddziałują z odpowiednimi adresynami na komórkach śródbłónka [37,46,54,71,72].

2.4.4 Limfocyty T CD45RA i CD45RO

W zależności od pierwotnego kontaktu z antygenem wyróżnia się limfocyty dziewicze i pamięci. Różnią się one izoformami fosfatazy tyrozynowej (CD45), biorącej udział w aktywacji limfocytów. Limfocyty T CD45RA (izoforma o dużej masie cząsteczkowej) stanowią pulę limfocytów dziewiczych, tj. takich, które nie spotkały jeszcze antygeny. Limfocyty T CD45RO (izoforma o małej masie cząsteczkowej) są limfocytami pamięci, preferującymi krążenie pomiędzy tkankami nielimfatycznymi. Stąd termin „lymphocytes lung homing” dla określenia powrotu limfocytów T pamięci na teren płuc, gdzie po raz pierwszy zetknęły się z antygenem (np. substancją zakaźną). Limfocyty T dziewicze krążą głównie pomiędzy krwią i narządami limfatycznymi [37].

Pamięć immunologiczna pozwala na przyśpieszoną i bardziej efektywną odpowiedź immunologiczną podczas ponownego kontaktu z antygenem. Pierwszy kontakt z antygenem powoduje wzrost liczby limfocytów, które pod koniec odpowiedzi pierwotnej giną na skutek apoptozy (ponad 90%). Dzięki mechanizmom antyapoptotycznym pozostają limfocyty pamięci, przygotowane na powtórny kontakt z antygenem. Różne hipotezy tłumaczą utrzymywanie się pamięci immunologicznej. Opierają się one na założeniu długowieczności limfocytów pamięci, czy nieustannej stymulacji antygenowej. Antygen wywołujący pierwotną odpowiedź może przetrwać m.in. dzięki komórkom dendrytycznym. Również na drodze stymulacji krzyżowej możliwe jest pobudzanie limfocytów pamięci przez inne antygeny [29,37,53,70,72].

2.4.5 Limfocyty T TCR $\alpha\beta$ i TCR $\gamma\delta$

Warunkiem wiązania antygeny do limfocyty T jest obecność swoistego receptora tj. TCR (T cell receptor). TCR zbudowany jest z dwóch łańcuchów o częściach zmiennych i stałych. We krwi obwodowej ok. 65-75% limfocytów T posiada receptory utworzone przez łańcuchy α i β , a tylko 1-5% przez łańcuchy γ i δ . Limfocyty T $\gamma\delta$ charakteryzują się węższym zakresem rozpoznawanych antygenów i nie wymagają prezentacji antygeny w połączeniu z cząsteczkami MHC. Mogą rozpoznawać fosfoantygeny wytwarzane np. przez *Mycobacterium tuberculosis* HMP-PP, białka szoku cieplnego. Pełnią rolę nadzoru immunologicznego koniecznego dla utrzymania homeostazy ustroju (procesy immunomodulacji) i stanowią pulę pierwotną w stosunku do limfocytów T $\alpha\beta$. Limfocyty T $\alpha\beta$ rozpoznają antygeny peptydowe w połączeniu z cząsteczkami MHC w błonie komórek prezentujących antygen. Współuczestniczą w obronie przeciwko mikroorganizmom dzięki bezpośredniemu efektowi cytotoksycznemu, bądź pośrednio wspomagając odpowiedź immunologiczną [36,37,72].

TCR łączy się w błonie limfocytów T z kompleksem CD3. Łańcuchy CD3 pośredniczą w przekazywaniu sygnału aktywującego komórkę od receptora do wnętrza komórki. Limfocyty T można identyfikować na podstawie obecności CD3 [37].

2.4.6 Aktywacja limfocytów T i kostymulacja

Rozpoznanie swoistego antygeny przy pomocy TCR zapoczątkowuje aktywację limfocytów T. Jej konsekwencją jest proliferacja i różnicowanie limfocytów T w komórki efektorowe [36,37]. Przekazywanie sygnału do wnętrza komórki wymaga obecności cząsteczek modulujących. Do aktywacji limfocytów dziewiczych konieczne są dwa sygnały. Pierwszy pochodzi od antygeny rozpoznanego przez TCR i przekazanego do wnętrza za pośrednictwem kompleksu CD3. Drugiego sygnału dostarczają cząsteczki kostymulujące. Jeśli brak jest drugiego sygnału, to limfocyty dziewicze wchodzą w stan anergii, tj. braku możliwości rozpoznania antygeny w przyszłości nawet po otrzymaniu odpowiedniej kostymulacji [8,85]. Limfocyty T pomocnicze i cytotoksyczne wymagają odpowiednio udziału cząsteczek CD4 lub CD8. Stabilne połączenie między limfocytem a komórką prezentującą antygen możliwe jest dzięki synapsie immunologicznej. W jej tworzeniu współuczestniczą cząsteczki adhezyjne, m.in. receptory dla chemokin [11,37].

2.4.7 CD28

CD28 jest jedną z cząsteczek kostymulujących, tj. warunkujących przekazywanie drugiego sygnału aktywacji. Występuje konstytutywnie na 95-100% limfocytów CD4+ i 30-50% limfocytów CD8+. Dzięki kostymulacji poprzez CD28 dochodzi m.in. do zwiększenia ekspresji podjednostek α i β receptora dla IL-2, jak również zwiększenia ekspresji ligandu dla cząsteczki CD40, tj. CD154 [11,37].

2.4.8 CD152

CD152 jest również cząsteczką kostymulującą. Podobnie jak dla CD28 ligandami dla niej są CD80 i CD86. CD152 odznacza się jednak 40-100-krotnie większym powinowactwem. W odróżnieniu od CD28 jest ona indukowana na powierzchni aktywnych limfocytów T. Przekazuje do wnętrza komórki sygnał hamujący aktywację limfocytu [11,37].

2.4.9 CD25

CD25 jest łańcuchem α receptora dla IL-2. Występuje na aktywnych limfocytach T i B [37]. Określa się go mianem markera wczesnej aktywacji [19,104]. Limfocytom T CD4+lowCD25+high przypisuje się rolę regulatorową, polegającą na hamowaniu rozwoju limfocytów autoreaktywnych i blokowaniu nadmiernie aktywnych reakcji immunologicznych [11,14,19,37,90,94].

2.4.10 CD154

CD154 (CD40L) jest białkiem należącym do rodziny TNF. Ligandem dla niego jest CD40. Szlak CD40-CD40L zaangażowany jest w proces aktywacji limfocytów T i B. Wiąże się go ze wspomaganie właściwości kostymulujących komórek prezentujących antygen. CD154 występuje głównie na aktywnych limfocytach CD4+ [11,37].

2.4.11 Receptor CXCR6

CXCR6 jest receptorem chemokinowym charakterystycznym dla odpowiedzi Th1- i Th17-zależnej [46,47]. Występuje na aktywnych limfocytach T. Znany jest jako koreceptor, umożliwiający zakażenie komórek przez wirus HIV [23,37].

2.4.12 CD69

CD69 występuje na aktywnych limfocytach T i monocytach. Uczestniczy w przekazywaniu sygnału aktywacyjnego, doprowadzając m.in. do wydzielania IL-2, IFN- γ , receptora dla IL-2. Jest markerem bardzo wczesnej aktywacji [37,104].

2.4.13 HLA-DR

HLA-DR jest markerem późnej aktywacji. Stanowi część kompleksu MHC klasy II. Występuje na aktywnych limfocytach T, a także na limfocytach B, NK, monocytach i komórkach prekursorowych [37,104].

2.5 Immunologia sarkoidozy

Obecnie dominuje hipoteza, w której nieznany antygen, tzw. czynnik sarkoidalny, jest wchłaniany i przetwarzany przez komórki prezentujące antygen (komórki dendrytyczne, makrofagi) na terenie płuc. Najprawdopodobniej ten nieokreślony antygen dostał się do płuc drogą wziewną. Stąd wraz z komórkami prezentującymi antygen wędruje do regionalnych węzłów chłonnych, gdzie jest prezentowany limfocytom T dziewiczym [3,64]. Uruchomiona zostaje kaskada odpowiedzi o profilu Th1-zależnym [3,16,32,33,56,63,101] i Th17-zależnym [33,101]. Powstają oligoklonalne limfocytów T CD4+, których receptory TCR zbudowane są z łańcuchów α i β . Pod wpływem stymulacji pochodzącej od makrofagów i komórek dendrytycznych (m.in. IL-12, IL-15, IL-18) dochodzi do aktywacji i proliferacji limfocytów T, wytwarzających m.in. IFN- γ , TNF α , IL-2. Konsekwencją jest dalszy napływ i gromadzenie limfocytów T, monocytów i ich przekształcanie w makrofagi, a następnie w komórki nabłonkowe i wielojądrzaste komórki olbrzymie. W zajętych narządach tworzą się nieserowaciejące ziarniniaki sarkoidalne [2,63,80,104].

Po ustąpieniu czynnika sprawczego należałoby się spodziewać wygaszania procesu zapalnego. Nie wiadomo co zainicjowało proces i czy faktycznie „czynnik sarkoidalny” zawsze zostaje wyeliminowany. Możliwe jest, że niekiedy wciąż stymuluje reakcje immunologiczne w zajętych narządach [42,50,52,56]. Doprowadza to do progresji zmian pod postacią nowych ziarniniaków bądź włóknienia [2]. Może włóknienie jest wyrazem gojenia, które na skutek defektu kontroli immunologicznej przybrało charakter destrukcyjny. Badania genetyczne za

pomocą mikromacierzy u chorych na sarkoidozę wykazały nadekspresję genów odpowiadających za aktywację i proliferację [9,38].

W rutynowej diagnostyce sarkoidozy wykorzystywane jest określenie stosunku limfocytów CD4 do CD8 w popłuczynach oskrzelowo-pęcherzykowych (bronchoalveolar lavage, BAL). Za charakterystyczny dla sarkoidozy uznaje się stosunek $CD4/CD8 > 3,5$ [86] lub $>2,5$ [63]. Istotny jest również skład komórkowy BAL. Sarkoidozę cechuje zwiększony odsetek limfocytów, tj. $>20\%$ [63].

Dotychczas nie znaleziono żadnych swoistych biomarkerów, które pozwoliłyby prognozować przebieg choroby. Nie wiadomo, u których pacjentów dojdzie do włóknienia płuc, a którzy nie wymagają żadnej interwencji medycznej, by osiągnąć całkowitą remisję. Wyjątek stanowi, wspomniany wyżej, zespół Löfgrena, cechujący się dobrym rokowaniem [7,55,63,64,86].

Konieczne jest poznanie mechanizmów regulujących przebieg reakcji immunologicznych w sarkoidozie.

3 Cel pracy

1. Ocena ekspresji receptora chemokinowego CXCR6 i antygenu CD154 na limfocytach T u chorych na sarkoidozę w BAL i krwi obwodowej w zależności od obrazu klinicznego i radiologicznego.
2. Ocena subpopulacji limfocytów T (CD4, CD8, TCR $\alpha\beta$, TCR $\gamma\delta$, CD45RA, CD45RO) w BAL i krwi obwodowej u chorych na sarkoidozę.
3. Ocena markerów aktywacji limfocytów T (CD69, HLA-DR, CD25) i cząsteczki kostymulującej (CD28) w BAL i krwi obwodowej u chorych na sarkoidozę.

4. Materiały i metody

4.1 Charakterystyka badanych grup

Niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana w ramach projektu badawczego promotorskiego nr rejestracyjny N N402 081234, zgłoszonego w 34 konkursie projektów badawczych Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego. Rekrutację chorych na sarkoidozę i grupy kontrolnej prowadzono w Klinice Pneumonologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Opracowanie laboratoryjne materiału diagnostycznego i badanie cytometryczne wykonano w Katedrze i Zakładzie Fizjopatologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego za zgodą pana prof. dr hab. J. Witkowskiego.

Zbadano 67 osób chorych na sarkoidozę płuc. Grupę kontrolną (23 osoby) stanowiły osoby diagnozowane z powodu przewlekłego kaszlu, u których na podstawie przeprowadzonych badań wykluczono choroby płuc, jako przyczynę zgłaszanych dolegliwości. U wszystkich wykonano podstawowe badania laboratoryjne i radiologiczne. Szczegółową charakterystykę badanych grup zawierają tabela 2 oraz wykresy: 1-6.

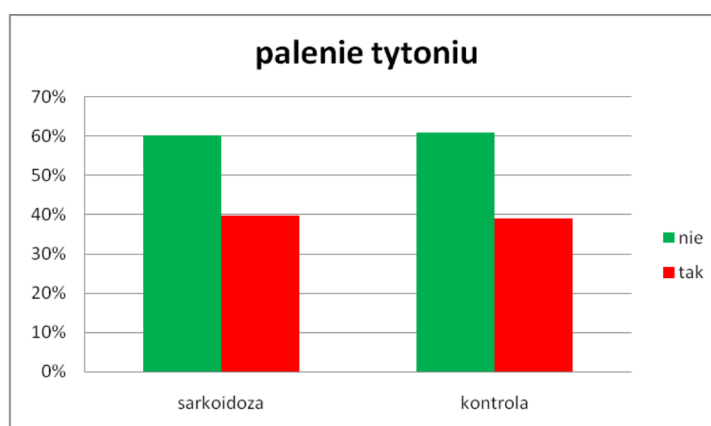
Uzyskane wyniki analizowano w odniesieniu do objawów klinicznych, badań radiologicznych płuc, badań czynnościowych płuc, stosowanego leczenia, czasu trwania choroby. Wyróżniono grupę chorych z sarkoidozą trwającą do 2 lat i powyżej 2 lat [63,98], wyodrębniono podgrupę z chorobą utrzymującą się powyżej 5 lat [7,52]. Za progresję w badaniach czynnościowych, podobnie jak Ziegenhagen i wsp. [103] uznawano pogorszenie o 10% w badaniu TLC lub DLCO; zmniejszenie o 15% VC lub FEV1. Progresję radiologiczną oceniano na podstawie obecności nowych zmian lub nasilenia dotychczasowych.

Tabela 2. Charakterystyka badanych grup.

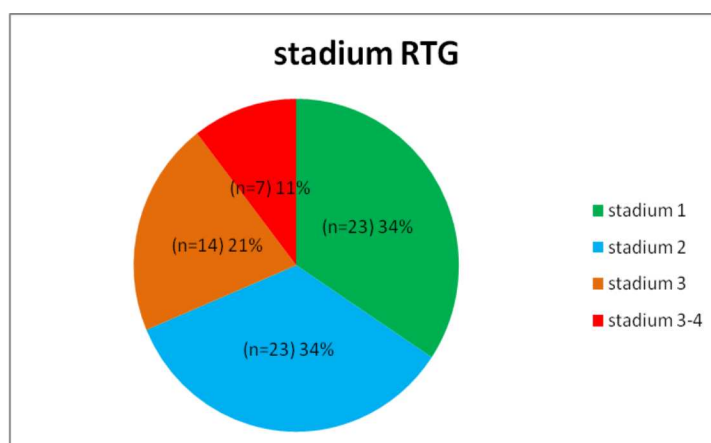
Grupy badane	Liczba bad.	Wiek*	M/K	WBC* BAL (G/l)	LIMF* BAL (G/l)	WBC* krew (G/l)	LIMF* krew (G/l)
sarkoidoza	67	45 (24-68)	45/22	1,55 (0,1-7,6)	0,9 (0,15-1,1)	6,3 (3,3-11,5)	1,27 (0,5-2,9)
kontrolna	23	59 (21-76)	7/16	0,35 (0,02-1,0)	0,12 (0,07-0,16)	6,24 (3,8-9,6)	1,75 (1,1-3,8)

* wartości przedstawione zostały jako mediana, (zakres)

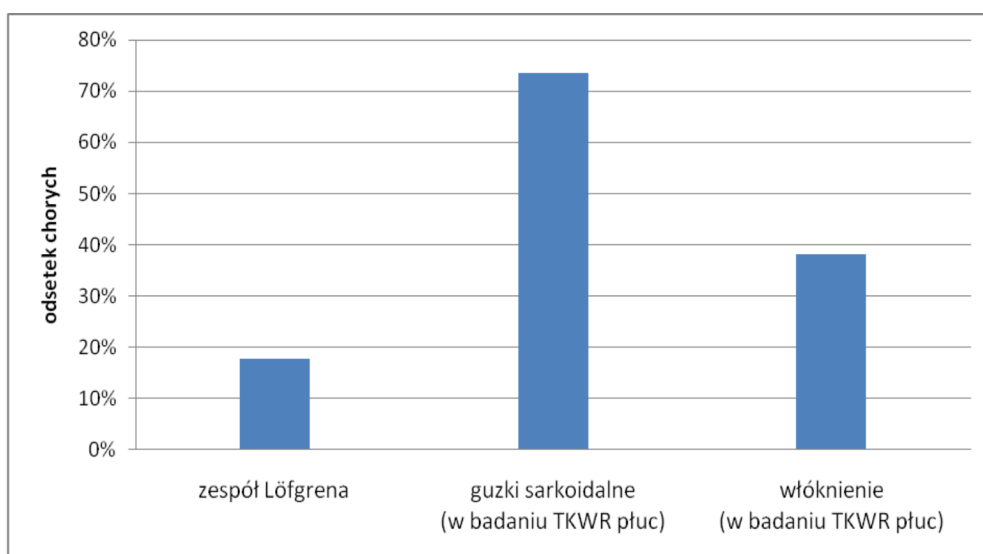
Wykres 1. Odsetek osób palących tytoń w badanych grupach.



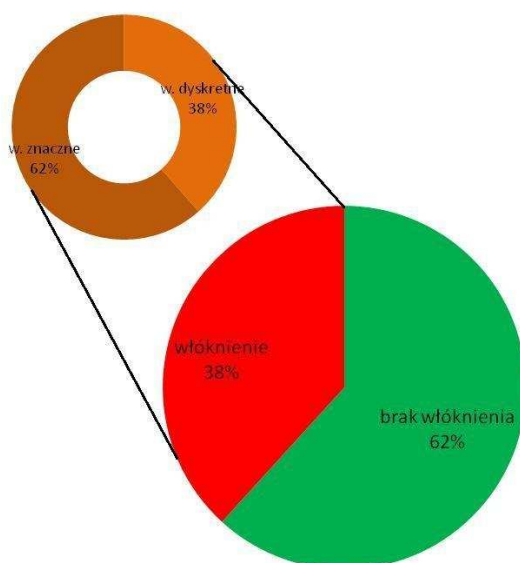
Wykres 2. Stadia sarkoidozy - rozkład procentowy (n- liczba chorych).



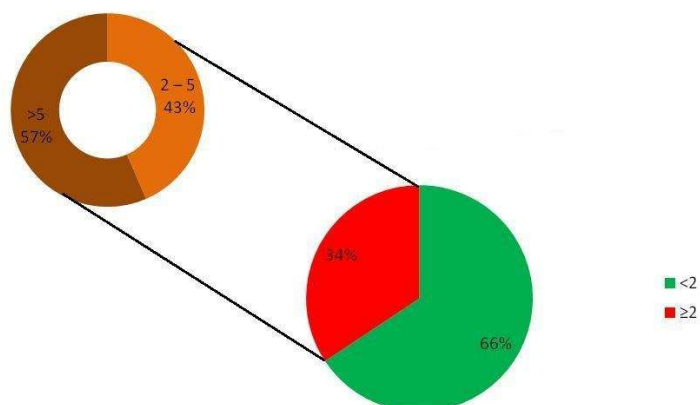
Wykres 3. Odsetek chorych na sarkoidozę z rozpoznaniem zespołu Löfgrena, stwierdzonymi w badaniu TKWR płuc guzkami sarkoidalnymi i włóknieniem.



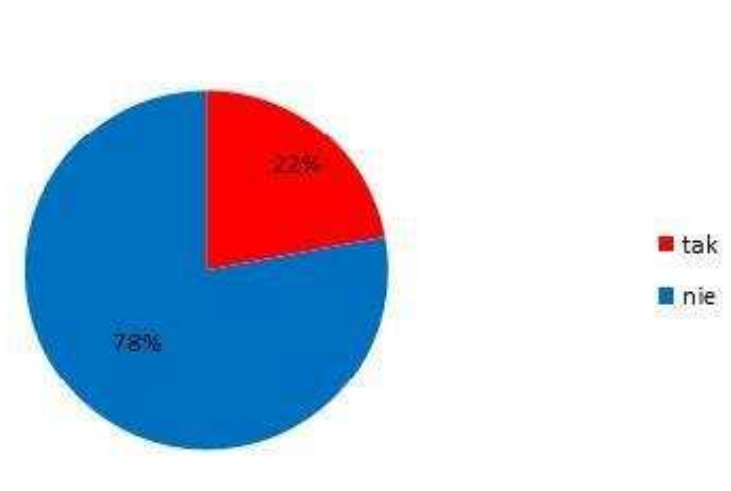
Wykres 4. Rozkład procentowy włóknienia i jego nasilenie, stwierdzone na podstawie badania TKWR płuc u chorych na sarkoidozę (w.- włóknienie).



Wykres 5. Czas trwania sarkoidozy w latach w momencie wykonywania badania (rozkład procentowy).



Wykres 6. Rozkład procentowy chorych na sarkoidozę leczonych w przeszłości glikokortykosteroidami.



4.2 Zgoda na udział w badaniu

Wszystkie badane osoby wyraziły świadomą, pisemną zgodę na udział w badaniu, zaakceptowaną przez Niezależną Komisję Bioetyczną do Spraw Badań Naukowych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (NKEBN/432/2006).

4.3 Bronchoskopia i płukanie oskrzelowo-pęcherzykowe (BAL)

Przed wykonaniem badania bronchofiberoskopowego pacjent musiał być na czczo przez minimum 4 godziny. Niektórzy badani wymagali podania premedykacji, złożonej z diazepam (5mg doustnie) i kodeiny (20mg doustnie) wieczorem w dniu poprzedzającym bronchofiberoskopię i rano w dniu badania. Miejscowo na łuki podniebienne, tylną ścianę gardła i nasadę języka podawano 10% lidokainę w aerozolu, a następnie do znieczulenia krtani i oskrzeli używano roztworu 2% lidokainy (nie przekraczano maksymalnej dawki dla lidokainy wynoszącej 8,2mg/kg). Sporadycznie w trakcie zabiegu chorzy wymagali zastosowania pochodnej benzodiazepiny o szybkim i silnym działaniu uspokajającym (midazolam dożylnie).

Aparat bronchofiberoskopu (Pentax EPK-100p) wprowadzano do oskrzeli w pozycji siedzącej pacjenta, przez jamę ustną. W trakcie badania monitorowano saturację krwi i akcję serca za pomocą pulsoksymetru, podawano tlen. Gabinet zabiegowy wyposażony był w zestaw ALS (ang. advanced life support), elektrokardiograf. Po obejrzeniu dróg oddechowych wykonywano płukanie oskrzelowo-pęcherzykowe (BAL). Końcówkę bronchofiberoskopu klinowano po stronie prawej w jednym z ujść oskrzeli podsegmentarnych płata środkowego. W trzech porcjach podawano 120ml soli fizjologicznej (0,9% NaCl), odpowiednio po 20ml, 50ml i 50ml. Po każdym podaniu odsysano płyn. Pierwsza porcja, zawierająca wydzielinę z dużych oskrzeli, stanowiła materiał do badań mikrobiologicznych (flora swoista, nieswoista, grzyby), kolejne do badań cytologicznych i cytometrycznych. Za satysfakcjonujący uznawano odzysk popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych powyżej 50% ilości podanego płynu, bez domieszki krwi [25].

Całość badania bronchofiberoskopowego z wykonaniem BAL trwała kilkanaście minut. Natychmiast po pobraniu BAL poddawano przygotowaniu do badania cytometrycznego. Oceniano ogólną leukocytozę i skład komórkowy BAL, wykluczano infekcje.

4.4 Przygotowanie materiału i analiza cytometryczna

Do analizy cytometrycznej użyto cytometru przepływowego FACScan Becton Dickinson, USA. Do przygotowania badanych zawiesin wykorzystano wirówkę Eppendorf Centifuge 5810R. Stosowano roztwór lizujący (0,83g NH_4Cl , 0,1g KHCO_3 w 100ml wody destylowanej) i PBS (14,24g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 2,76g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 87,6g NaCl , 2g NaN_3 , uzupełnione do 1l wodą destylowaną). Do opracowania wyników użyto oprogramowania CellQuest BD, USA i WinMDI w.2.9 (J. Trotter, The Scripps Research Institute. USA).

Od każdej osoby badanej pobrano po 10ml krwi pełnej na wersenian dwupotasowy (EDTA K2) bezpośrednio przed wykonaniem badania bronchofiberoskopowego. Zgodnie z protokołem do każdej próbówki cytometryczne dodano po 100 μl krwi, a następnie po 10 μl odpowiednich przeciwciał monoklonalnych, skierowanych przeciw określonym antygenom powierzchniowym limfocytów. Po trwającej 30 minut inkubacji, bez dostępu światła, poddano komórki hipotonicznej lizie erytrocytów (inkubacja 15 minut po dodaniu po 2 ml roztworu lizującego). Po odwirowaniu (2 000 obrotów / minutę przez 5 minut) i usunięciu supernatantu, do komórek dodano po 2 ml PBS i wirowano (2 000 obrotów / minutę przez 5 minut), aby usunąć nadmiar niezwiązanych przeciwciał. Tak przygotowane komórki zawieszano w niewielkiej objętości PBS (ok. 200 μl), uzyskując materiał do analizy cytometrycznej. Oceniano 10 000 limfocytów.

Popłuczyny oskrzelowo-pęcherzykowe bezpośrednio po pobraniu przesączono przez filtr komórkowy 70 μm , by usunąć zanieczyszczenia śluzem. Uzyskany materiał diagnostyczny przygotowywano zgodnie z opisaną powyżej procedurą z pominięciem etapu lizy erytrocytów.

Pierwsze dwie badane próbówki stanowiły kontrolę izotypową bez swoistości antygenowej. Były to przeciwciała tego samego izotypu co przeciwciała monoklonalne użyte do badania, odpowiednio IgM lub IgG tej samej podklasy.

W badaniu wykorzystano następujące przeciwciała:

- MultiMix Triple-Colour Control Reagent (Mouse IgG1/FITC, Mouse IgG2a/RPE, Mouse IgG1/RPE-Cy5) DakoCytomation,
- IgG1-PC5 Isotypic Control BeckmanCoulter,
- Mouse Anti-Human CD3-PC5, klon UCHT1, BeckmanCoulter
- Mouse Anti-Human CD4 RPE-Cy5, klon MT310, DakoCytomation
- Mouse Anti-Human CD8 RPE-Cy5, klon DK25, DakoCytomation
- Mouse Anti-Human TCR $\alpha\beta$ FITC, klon T10B9.1A-31, BD Pharmingen
- Mouse Anti-Human TCR $\gamma\delta$ FITC, klon B1, BD Pharmingen

- Mouse Anti-Human CD45RA FITC, klon HI100, BD Pharmingen
- Mouse Anti-Human CD45RO FITC, klon UCHL1, BD Pharmingen
- Mouse Anti-Human CXCR6 PE, klon 56811, R&D Systems
- Mouse Anti-Human CD154 FITC, klon TRAP1, BD Pharmingen
- Mouse Anti-Human CD28 PE, klon CD28.2, BD Pharmingen
- Mouse Anti-Human CD152 PE, klon BNI3, BD Pharmingen
- Mouse Anti-Human CD69 FITC, klon FN50, BD Pharmingen
- Mouse Anti-Human HLA-DR FITC, klon L243, BD Pharmingen
- Mouse Anti-Human CD25 PE, klon M-A251, BD Pharmingen

Zbadano ekspresję receptora CXCR6 i antygenu CD154 na limfocytach T (CD3+) w rozbiciu na subpopulacje CD4+ i CD8+ u 67 chorych na sarkoidozę i u 23 osób, stanowiących grupę kontrolną. Również pozostałe antygeny, dla których oznaczenia użyto wyżej wymienionych komplementarnych przeciwciał monoklonalnych, były oceniane w grupie kontrolnej. U wybranych chorych na sarkoidozę (20 osób) oznaczono TCR $\alpha\beta$, TCR $\gamma\delta$, CD45RA, CD45RO, a u 34 chorych antygeny: CD69, HLA-DR, CD25, CD28, CD152.

4.5 Analiza statystyczna

Analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem programu STATISTICA 9.0 (licencja GUMed). W pierwszym etapie procedury analizy statystycznej oceniano badane zmienne pod kątem typu rozkładu danych, używając testu Kołmogorowa-Smirnowa. W celu porównania wartości cech ilościowych w dwóch analizowanych populacjach zastosowano test U-Manna Whitneya. W przypadku porównań wartości zmiennych w więcej niż dwóch populacjach zastosowano test analizy wariancji ANOVA Kruskala-Wallisa. Zastosowanie tych testów było uwarunkowane rozkładem nieparametrycznym analizowanych zmiennych, jak również ocenianą stosunkowo małą populacją. Ilościowe dane parametryczne analizowano z wykorzystaniem analizy wariancji (ANOVA) oraz testu post-hoc Scheffego. Zależności pomiędzy dwoma zmiennymi jakościowymi oceniono testem Chi². W celu sprawdzenia istotności statystycznej w danym rozkładzie częstości (ilości oraz odsetku osób) prezentowanym w danych kategoriach zmiennych zastosowano test różnic pomiędzy dwoma składnikami struktury. Zmienne opisywano na wykresach ramka-wąsy za pomocą mediany wraz z zakresem górnego i dolnego kwartyla i podaniem minimum i maksimum. W wybranych przypadkach * oznaczono istotność statystyczną p. W opisanych metodach analizy, wartość statystyki $p \leq 0,05$ przyjęto za istotność statystyczną.

5. Wyniki

5.1 Receptor CXCR6

Stwierdzono istotnie statystycznie wyższy odsetek limfocytów CXCR6+CD4+ w BAL w porównaniu do krwi obwodowej zarówno u chorych na sarkoidozę ($p=0,000001$), jak i w grupie kontrolnej ($p=0,0005$) (wykres 7). Również odsetek limfocytów CXCR6+CD8+ w BAL w porównaniu do krwi obwodowej u chorych na sarkoidozę był istotnie statystycznie wyższy ($p=0,000001$). W grupie kontrolnej widoczna jest podobna tendencja, ale bez stwierdzanej istotności statystycznej ($p=0,10$) (wykres 8).

W tabelach 3 i 4 zestawiono parametry statystyczne, opisujące odsetek limfocytów CXCR6+CD4+ i CXCR6+CD8+ u chorych na sarkoidozę i w grupie kontrolnej. Nie obserwowano istotnych statystycznie różnic w odsetku limfocytów CXCR6+CD4+ i CXCR6+CD8+ pomiędzy chorymi na sarkoidozę, a grupą kontrolną, zarówno w BAL, jak i krwi obwodowej (tabele 3 i 4).

Stwierdzono istotną statystycznie różnicę w odsetku limfocytów CXCR6+CD4+ w BAL pomiędzy stadium 1 i 3 sarkoidozy, ocenianym na podstawie RTG klatki piersiowej (wykres 9, tabela 5). Nie stwierdzono podobnych różnic dla CXCR6+CD8+ (wykres 10, tabela 6).

Natomiast we krwi obwodowej odsetek limfocytów CXCR6+CD4+ różnił się istotnie pomiędzy stadium 3-4 w porównaniu do stadium 1 ($p=0,005$), stadium 2 ($p=0,01$) i stadium 3 ($p=0,05$). Także grupa kontrolna miała niższy odsetek limfocytów CXCR6+CD4+ we krwi w porównaniu do stadium 3-4 ($p=0,002$) (wykres 11, tabela 7). Dla limfocytów CXCR6+CD8+ we krwi różnice obserwowano jedynie pomiędzy stadium 2, a stadium 3-4 ($p=0,05$) (wykres 12, tabela 8).

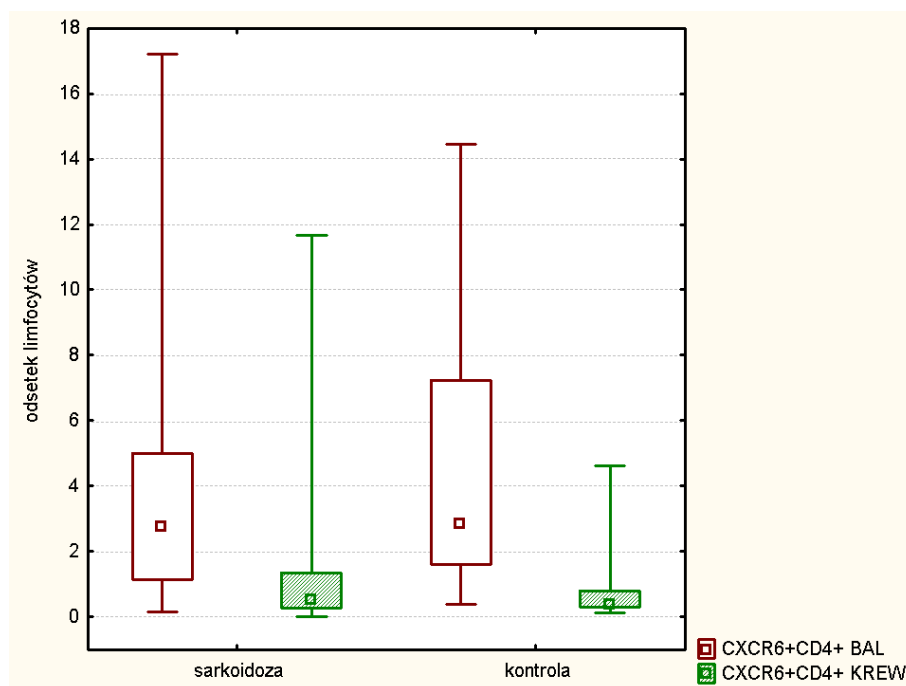
Tabela 3. Odsetek limfocytów T CXCR6+CD4+ i CXCR6+CD8+ w BAL u chorych na sarkoidozę i w grupie kontrolnej.

BAL	CXCR6+CD4+ %						CXCR6+CD8+ %					
	średnia	SD	Q25	Me	Q75	p	średnia	SD	Q25	Me	Q75	p
sarkoidoza	4,41	5,39	1,21	2,84	5,20	0,37	5,44	6,12	1,65	3,59	6,48	0,27
kontrola	5,45	5,48	1,61	2,88	7,62		4,37	5,10	0,90	2,45	4,70	

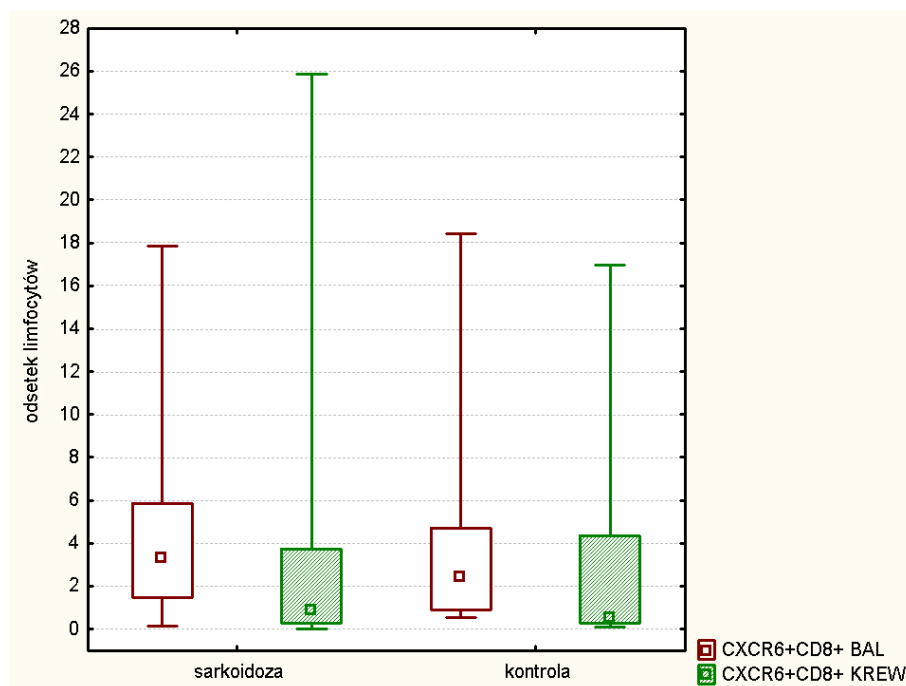
Tabela 4. Odsetek limfocytów T CXCR6+CD4+ i CXCR6+CD8+ we krwi u chorych na sarkoidozę i w grupie kontrolnej.

KREW	CXCR6+CD4+ %						CXCR6+CD8+ %					
	średnie	SD	Q25	Me	Q75	p	średnie	SD	Q25	Me	Q75	p
sarkoidoza	1,44	2,24	0,27	0,62	1,54	0,19	5,75	10,66	0,31	0,96	5,11	0,61
kontrola	0,71	0,99	0,30	0,33	0,66		5,27	13,50	0,28	0,57	4,50	

Wykres 7. Odsetek limfocytów CXCR6+CD4+ w BAL i krwi obwodowej u chorych na sarkoidozę i w grupie kontrolnej.



Wykres 8. Odsetek limfocytów CXCR6+CD8+ w BAL i krwi obwodowej u chorych na sarkoidozę i w grupie kontrolnej.



Wykres 9. Odsetek limfocytów CXCR6+CD4+ w BAL w zależności od stadium sarkoidozy.

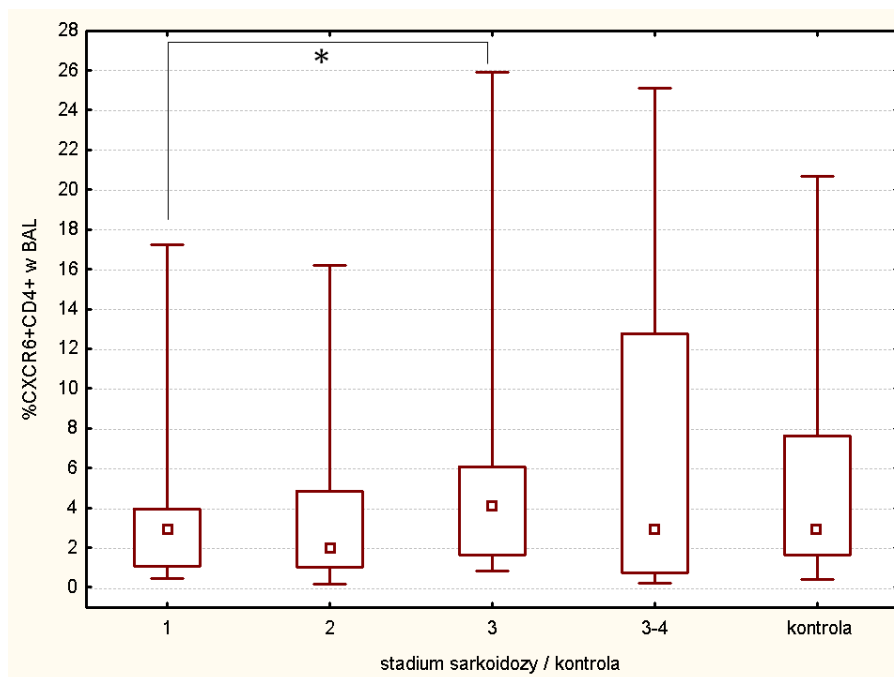


Tabela 5. Istotności statystycznie pomiędzy różnicami w odsetku limfocytów CXCR6+CD4+ w BAL w zależności od stadium sarkoidozy w porównaniu do grupy kontrolnej.

Stadium sarkoidozy	1	2	3	3-4	kontrola
	Mediana 2,9%	Mediana 1,8%	Mediana 4,1%	Mediana 2,8%	Mediana 2,8%
1	-	0,54	0,05	0,27	0,46
2	0,54	-	0,23	0,13	0,18
3	0,05	0,23	-	0,62	0,96
3-4	0,27	0,13	0,62	-	0,56
kontrola	0,46	0,18	0,96	0,56	-

*na czerwono zaznaczono p istotne statystycznie

Wykres 10. Odsetek limfocytów CXCR6+CD8+ w BAL w zależności od stadium sarkoidozy.

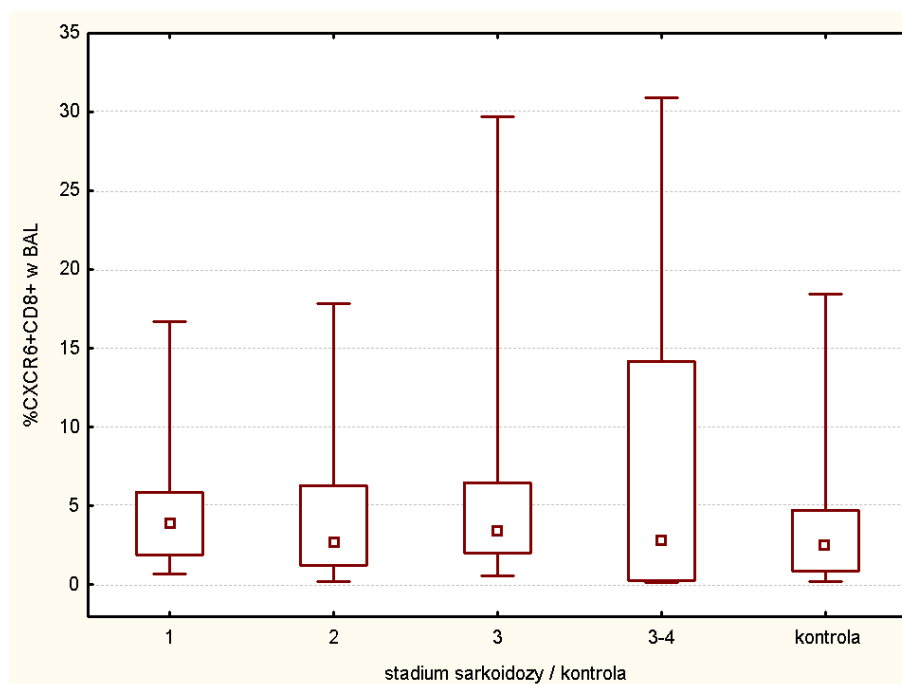


Tabela 6. Istotności statystycznie pomiędzy różnicami w odsetku limfocytów CXCR6+CD8+w BAL w zależności od stadium sarkoidozy w porównaniu do grupy kontrolnej.

Stadium sarkoidozy	1	2	3	3-4	kontrola
	Mediana 3,8%	Mediana 2,6%	Mediana 3,4%	Mediana 2,7%	Mediana 2,4%
1	-	0,61	0,72	0,31	0,59
2	0,61	-	0,42	0,17	0,96
3	0,72	0,42	-	0,49	0,41
3-4	0,31	0,17	0,49	-	0,17
kontrola	0,59	0,96	0,41	0,17	-

Wykres 11. Odsetek limfocytów CXCR6+CD4+ we krwi w zależności od stadium sarkoidozy.

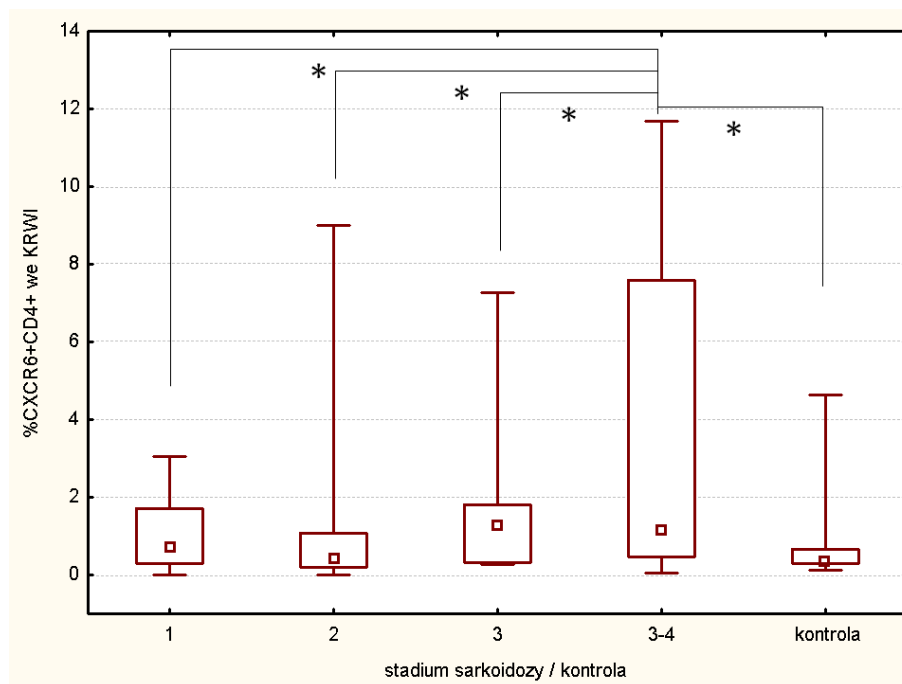


Tabela 7. Istotności statystyczne pomiędzy różnicami w odsetku limfocytów CXCR6+CD4+we krwi w zależności od stadium sarkoidozy w porównaniu do grupy kontrolnej.

Stadium sarkoidozy	1	2	3	3-4	kontrola
	Mediana 0,7%	Mediana 0,4%	Mediana 1,2%	Mediana 1,1%	Mediana 0,3%
1	-	0,66	0,4	0,005	0,64
2	0,66	-	0,62	0,01	0,37
3	0,4	0,62	-	0,05	0,22
3-4	0,005	0,01	0,05	-	0,002
kontrola	0,64	0,37	0,22	0,002	-

*na czerwono zaznaczono p istotne statystycznie

Wykres 12. Odsetek limfocytów CXCR6+CD8+ we krwi w zależności od stadium sarkoidozy.

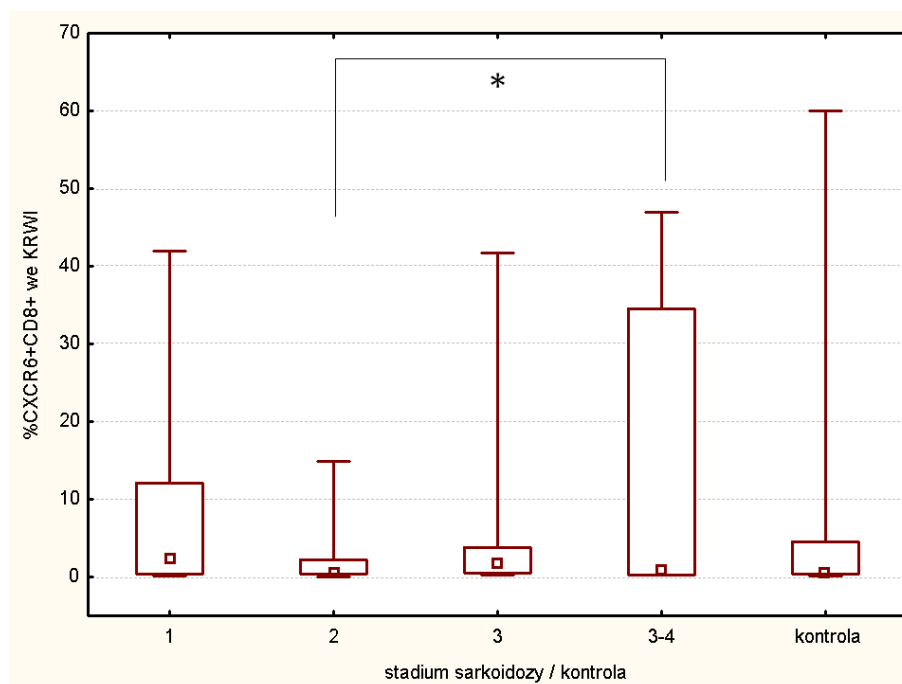


Tabela 8. Istotności statystycznie pomiędzy różnicami w odsetku limfocytów CXCR6+CD8+ we krwi w zależności od stadium sarkoidozy w porównaniu do grupy kontrolnej .

Stadium sarkoidozy	1	2	3	3-4	kontrola
-	Mediana 2,2%	Mediana 0,5%	Mediana 1,6%	Mediana 0,7%	Mediana 0,5%
1	-	0,12	0,55	0,36	0,51
2	0,12	-	0,48	0,05	0,42
3	0,55	0,48	-	0,2	0,98
3-4	0,36	0,05	0,2	-	0,17
kontrola	0,51	0,42	0,98	0,17	-

*na czerwono zaznaczono p istotne statystycznie

5.2 Subpopulacje limfocytów T

5.2.1 Limfocyty T CD4 i CD8

Stwierdzono zwiększony odsetek limfocytów CD4+ w BAL u chorych na sarkoidozę w porównaniu do grupy kontrolnej ($p=0,001$). W przeciwieństwie do obserwowanego zmniejszonego odsetka limfocytów CD8+ ($p=0,005$), czego konsekwencją jest zwiększony stosunek CD4/CD8 w BAL u chorych na sarkoidozę ($p=0,003$). W krwi obwodowej nie wykazano istotnych statystycznie różnic w odsetku limfocytów CD4+. Stwierdzono wyższy odsetek limfocytów CD8+ ($p=0,003$) i niższy stosunek CD4/CD8 ($p=0,049$) u chorych na sarkoidozę (wykresy 13 i 14, tabele 9 i 10).

Analizując grupę chorych na sarkoidozę, wyróżniono osoby z klinicznym rozpoznaniem zespołu Löfgrena. Stwierdzono u nich zwiększony odsetek limfocytów CD4+ ($p=0,024$) w BAL, przy jednoczesnym zmniejszonym odsetku limfocytów CD8+ ($p=0,006$), czego konsekwencją jest zwiększony stosunek CD4/CD8 ($p=0,0004$). We krwi obwodowej istotnie statystycznie zwiększony był jedynie odsetek limfocytów CD4+ ($p=0,0006$) (wykresy 15 i 16, tabele 11 i 12).

W zależności od obserwowanej klinicznie progresji choroby stwierdzono w BAL spadek odsetka limfocytów CD4+ ($p=0,05$), wzrost odsetka limfocytów CD8+ ($p=0,07$) i spadek stosunku CD4/CD8 ($p=0,07$). W rozważanej sytuacji nie obserwowano istotnych statystycznie różnic w odsetku analizowanych limfocytów we krwi obwodowej (wykresy 17 i 18, tabele 13 i 14).

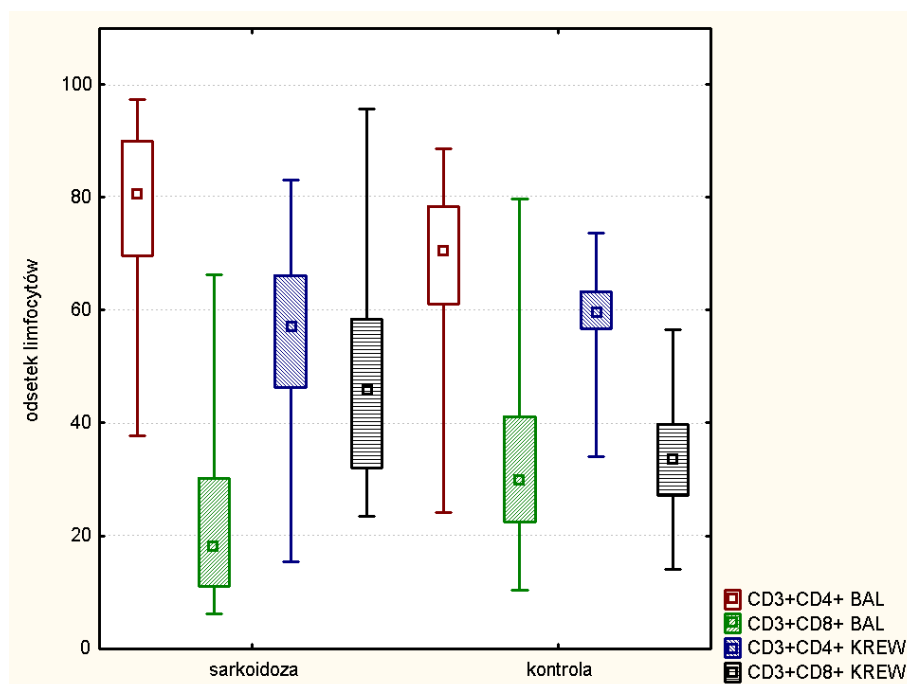
W zależności od obserwowanego nasilenia włóknienia w badaniu TKWR płuc stwierdzono w BAL spadek odsetka limfocytów CD4+ ($p=0,05$), wzrost odsetka limfocytów CD8+ ($p=0,05$) i spadek stosunku CD4/CD8 ($p=0,02$). Również we krwi obwodowej stwierdzono spadek odsetka limfocytów CD4+ ($p=0,02$) i wzrost odsetka limfocytów CD8+ ($p=0,04$), spadek stosunku CD4/CD8 ($p=0,02$) (wykresy 19 i 20, tabele 15 i 16).

Rozpatrując guzki sarkoidalne, opisywane w badaniu TKWR płuc, stwierdzono w BAL spadek odsetka limfocytów CD4+ ($p=0,005$), wzrost odsetka limfocytów CD8+ ($p=0,011$) i spadek stosunku CD4/CD8 ($p=0,006$) w obecności guzków sarkoidalnych. Również we krwi obwodowej występował spadek odsetka limfocytów CD4+ ($p=0,010$), wzrost odsetka limfocytów CD8+ ($p=0,013$) i spadek stosunku CD4/CD8 ($p=0,025$) (wykresy 21 i 22, tabele 17 i 18).

Różnicując chorych na sarkoidozę w zależności od stadium sarkoidozy, obserwowano tendencję spadku odsetka limfocytów CD4+ i wzrostu odsetka

limfocytów CD8+ zarówno w BAL, jak i krwi obwodowej. Wyraźnie zaznaczony jest spadek stosunku limfocytów CD4/CD8 w BAL; istotny statystycznie pomiędzy stadium 1 (Me=6,1), a stadium 3 (Me=2,5) i stadium 3-4 (Me=1,8), jak również kontrolą (Me=2,3). Również podobne zależności wstępują między stadium 2 (Me=4,6), a stadium 3-4 (Me=1,8) i kontrolą (Me=2,3). We krwi obwodowej zwraca uwagę istotnie statystycznie niski odsetek limfocytów CD4+ w stadium 3-4 sarkoidozy w porównaniu do pozostałych stadiów zaawansowania i grupy kontrolnej. Odsetek limfocytów CD8+ we krwi obwodowej istotnie wzrasta w stadium 2, stadium 3 i stadium 3-4 w porównaniu z grupą kontrolną. Również pomiędzy stadium 1 a stadium 3-4 obserwuje się istotny statystycznie wzrost odsetka limfocytów CD8+ we krwi obwodowej (wykresy 23-28, tabele 19-24).

Wykres 13. Odsetek limfocytów CD4+ i CD8+ w BAL i krwi obwodowej u chorych na sarkoidozę i w grupie kontrolnej.



Wykres 14. Stosunek limfocytów CD4+ do CD8+ w BAL i krwi obwodowej u chorych na sarkoidozę i w grupie kontrolnej.

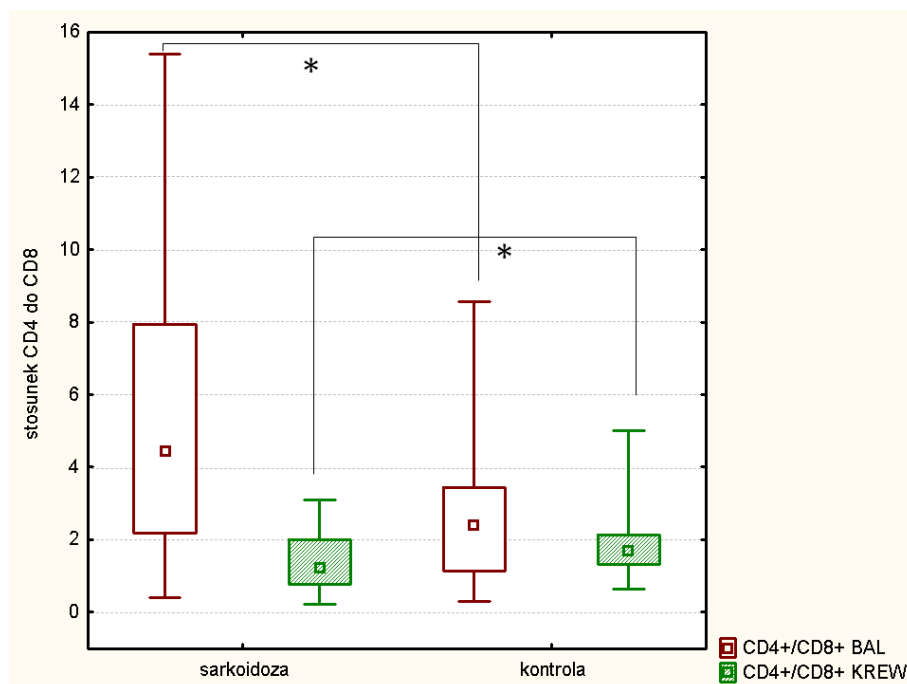


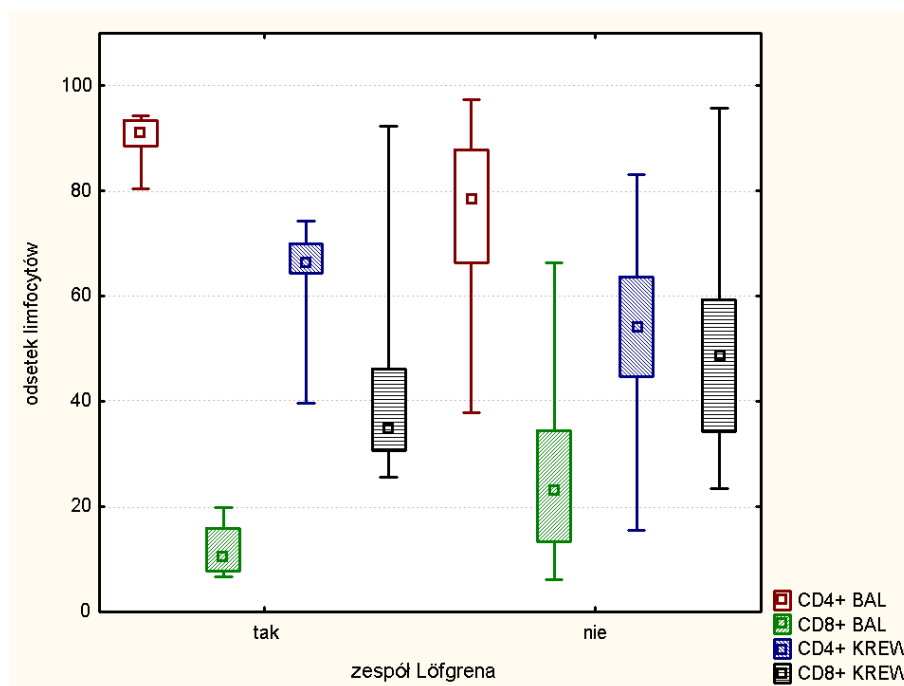
Tabela 9. Parametry statystyczne limfocytów CD4+ i CD8+ w BAL i krwi obwodowej u chorych na sarkoidozę.

limfocyty	średnia	mediana	min	max	Kwartył dolny	Kwartył górny	Odchylenie standardowe
CD4+ BAL	78,3%	80,4%	37,7%	97,3%	69,4%	89,6%	14,0%
CD8+BAL	22,7%	18,5%	6,1%	66,3%	11,0%	30,3%	14,4%
CD4/CD8 BAL	5,4	4,4	0,4	15,4	2,1	7,9	4,0
CD4+ krew	55,5%	57,0%	15,3%	83,1%	46,3%	66,1%	15,6%
CD8+ krew	47,0%	45,7%	23,4%	95,6%	32,0%	58,4%	17,0%
CD4/CD8 krew	1,4	1,2	0,2	3,1	0,7	2,0	0,7

Tabela 10. Parametry statystyczne limfocytów CD4+ i CD8+ w BAL i krwi obwodowej w grupie kontrolnej.

limfocyty	średnia	mediana	min	max	Kwartył dolny	Kwartył górny	Odchylenie standardowe
CD4+ BAL	64,4%	70,4%	24,2%	88,6%	57,9%	78,3%	19,4%
CD8+BAL	34,8%	29,9%	10,3%	79,7%	22,4%	43,3%	18,4%
CD4/CD8 BAL	2,6	2,3	0,3	8,5	1,1	3,4	2,0
CD4+ krew	56,9%	59,4%	34,0%	73,6%	55,1%	63,2%	10,8%
CD8+ krew	34,9%	32,5%	14,1%	56,6%	25,8%	39,6%	14,2%
CD4/CD8 krew	1,9	1,6	0,6	5,0	1,3	2,1	1,0

Wykres 15. Odsetek limfocytów CD4+ i CD8+ w BAL i krwi obwodowej u chorych na sarkoidozę w zależności od stwierdzonego zespołu Löfgrena.



Wykres 16. Stosunek limfocytów CD4+ do CD8+ w BAL i krwi obwodowej u chorych na sarkoidozę w zależności od stwierdzonego zespołu Löfgrena.

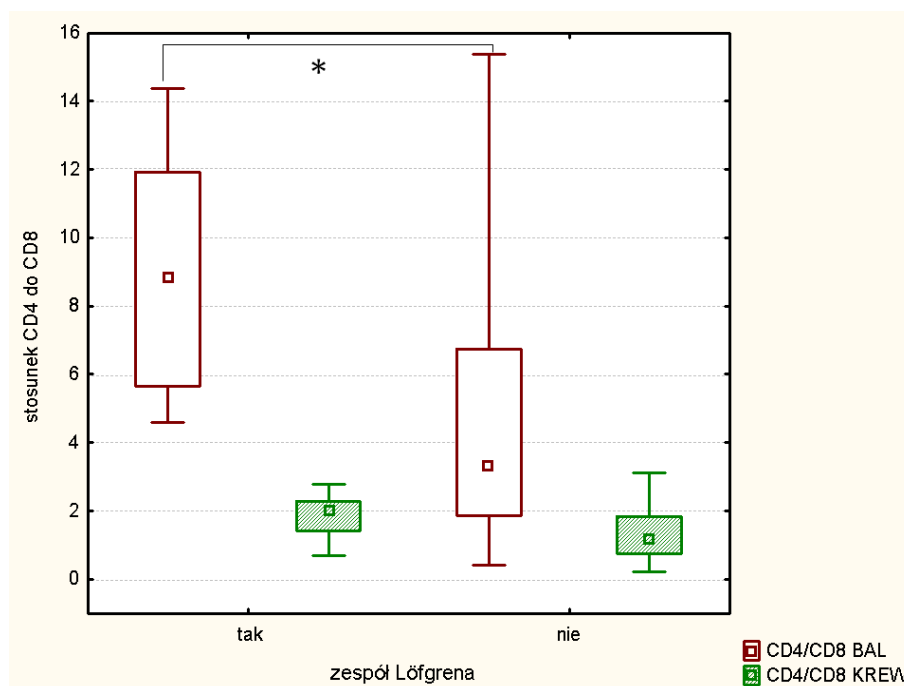


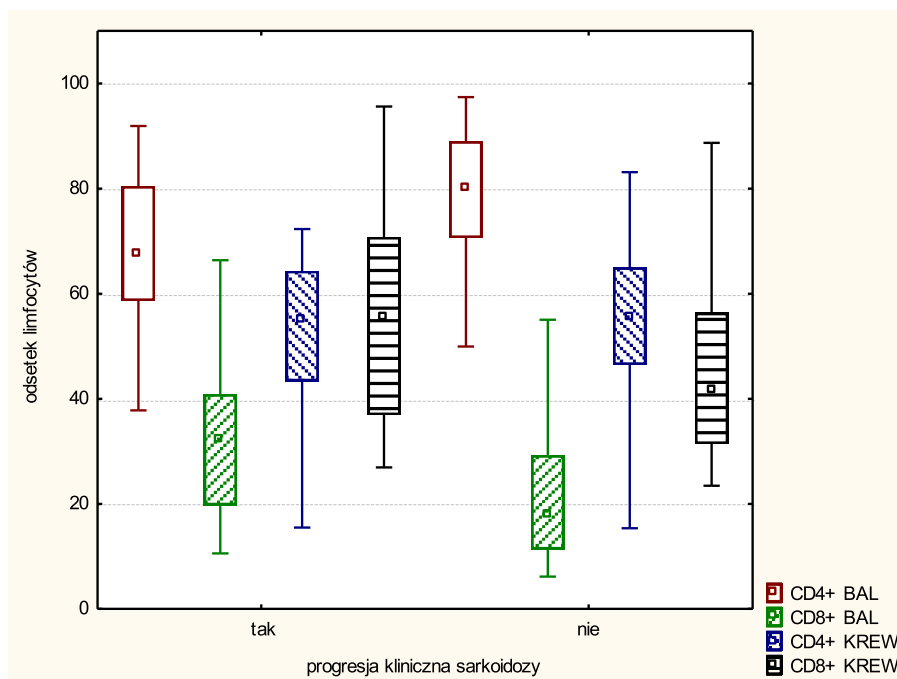
Tabela 11. Parametry statystyczne limfocytów CD4+ i CD8+ w BAL i krwi obwodowej u chorych na sarkoidozę z rozpoznaniem zespołu Löfgrena.

limfocyty	średnia	mediana	min	max	Kwartył dolny	Kwartył górny	Odchylenie standardowe
CD4+ BAL	90,2%	91,3%	80,3%	94,2%	88,5%	93,3%	4,2%
CD8+BAL	11,5%	10,3%	6,5%	19,7%	7,6%	15,7%	4,4%
CD4/CD8 BAL	8,9	8,8	4,5	14,3	5,6	11,9	3,4
CD4+ krew	64,8%	66,1%	39,6%	74,2%	64,2%	69,8%	8,7%
CD8+ krew	40,9%	34,6%	25,5%	92,2%	30,6%	46,0%	18,9%
CD4/CD8 krew	1,8	1,9	0,6	2,7	1,4	2,2	0,6

Tabela 12. Parametry statystyczne limfocytów CD4+ i CD8+ w BAL i krwi obwodowej u chorych na sarkoidozę bez rozpoznania zespołu Löfgrena.

limfocyty	średnia	mediana	min	max	Kwartył dolny	Kwartył górny	Odchylenie standardowe
CD4+ BAL	75,5%	78,5%	37,7%	97,3%	66,3%	87,6%	14,0%
CD8+BAL	25,2%	22,8%	6,1%	66,3%	13,2%	34,3%	14,7%
CD4/CD8 BAL	4,6	3,3	0,4	15,3	1,8	6,7	3,7
CD4+ krew	53,4%	54,2%	15,3%	83,1%	44,6%	63,6%	16,2%
CD8+ krew	48,3%	48,5%	23,4%	95,6%	34,1%	59,1%	16,5%
CD4/CD8 krew	1,3	1,1	0,2	3,1	0,7	1,8	0,7

Wykres 17. Odsetek limfocytów CD4+ i CD8+ w BAL i krwi obwodowej w zależności od stwierdzonej progresji klinicznej sarkoidozy.



Wykres 18. Stosunek limfocytów CD4+ do CD8+ w BAL i krwi obwodowej w zależności od stwierdzonej progresji klinicznej sarkoidozy.

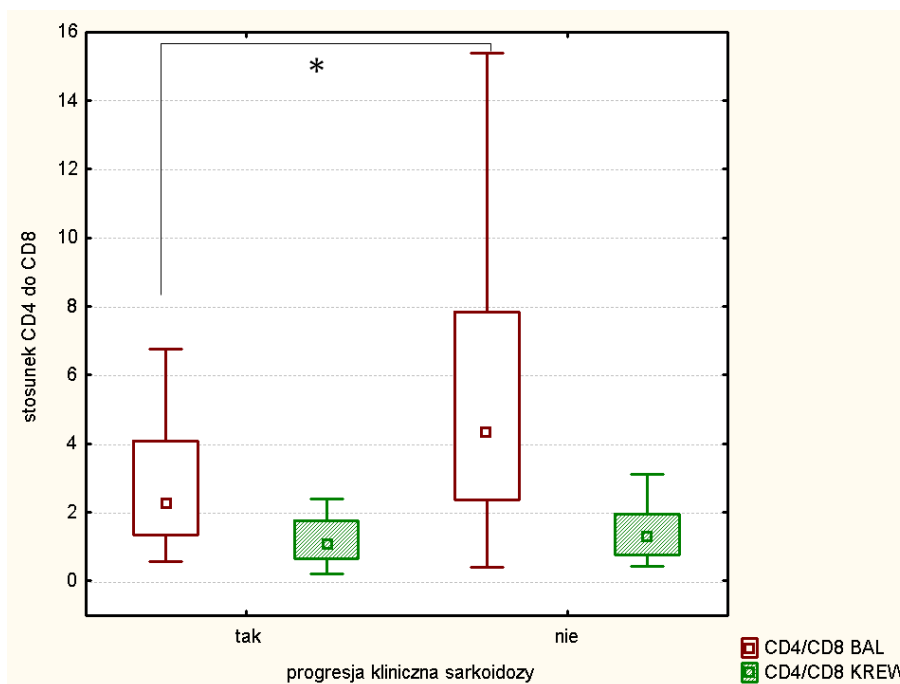


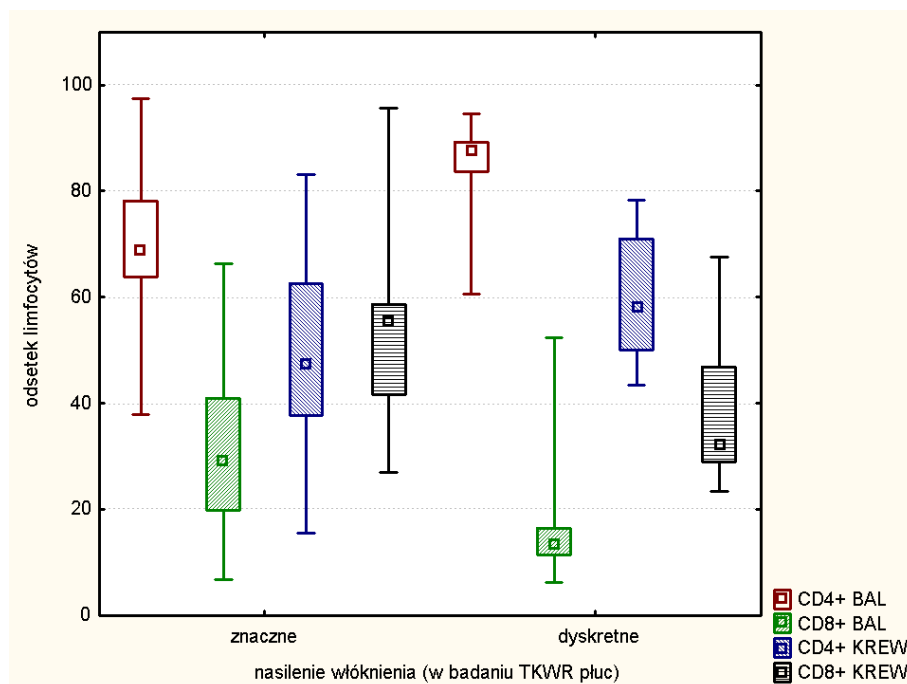
Tabela 13. Parametry statystyczne limfocytów CD4+ i CD8+ w BAL i krwi obwodowej u chorych na sarkoidozę z progresją kliniczną.

limfocyty	średnia	mediana	min	max	Kwartył dolny	Kwartył górny	Odchylenie standardowe
CD4+ BAL	68,6%	67,7%	37,7%	91,9%	58,6%	80,4%	16,9%
CD8+BAL	31,5%	32,1%	10,5%	66,3%	19,7%	40,8%	15,6%
CD4/CD8 BAL	3,2	2,2	0,5	8,7	1,3	4,0	2,7
CD4+ krew	51,9%	54,8%	15,4%	72,3%	43,3%	64,3%	16,7%
CD8+ krew	55,7%	55,4%	26,9%	95,6%	36,9%	70,7%	19,1%
CD4/CD8 krew	1,1	1,0	0,2	2,3	0,6	1,7	0,6

Tabela 14. Parametry statystyczne limfocytów CD4+ i CD8+ w BAL i krwi obwodowej u chorych na sarkoidozę bez progresji klinicznej.

limfocyty	średnia	mediana	min	max	Kwartył dolny	Kwartył górny	Odchylenie standardowe
CD4+ BAL	78,9%	80,0%	49,9%	97,3%	70,6%	88,9%	12,0%
CD8+BAL	22,2%	17,9%	6,1%	55,0%	11,3%	29,2%	13,6%
CD4/CD8 BAL	5,3	4,3	0,4	15,3	2,3	7,8	3,9
CD4+ krew	55,0%	55,4%	15,3%	83,1%	46,5%	64,9%	16,1%
CD8+ krew	44,9%	41,7%	23,4%	88,6%	31,4%	56,3%	14,6%
CD4/CD8 krew	1,3	1,3	0,4	3,1	0,7	1,9	0,7

Wykres 19. Odsetek limfocytów CD4+ i CD8+ w BAL i krwi obwodowej u chorych na sarkoidozę w zależności od stwierdzanego w badaniu TKWR płuc nasilenia włóknienia.



Wykres 20. Stosunek limfocytów CD4+ do CD8+ w BAL i krwi obwodowej u chorych na sarkoidozę w zależności od stwierdzanego w badaniu TKWR płuc nasilenia włóknienia.

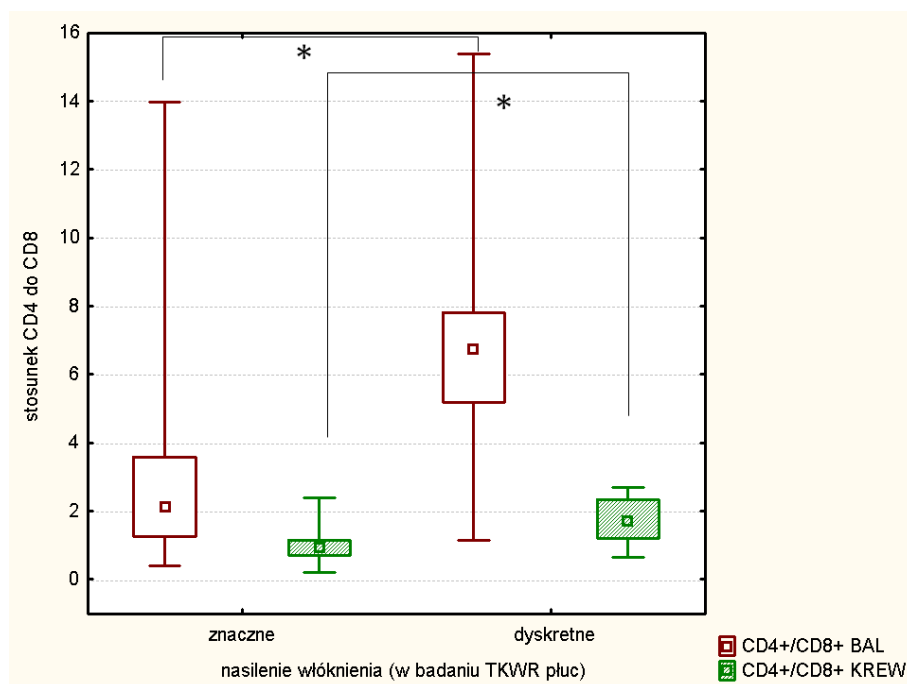


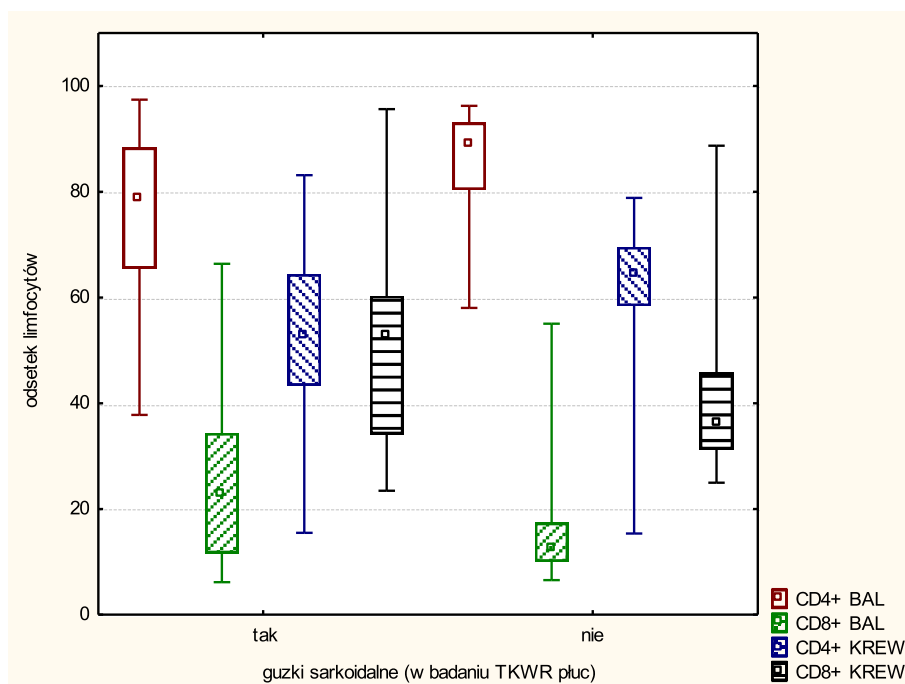
Tabela 15. Parametry statystyczne limfocytów CD4+ i CD8+ w BAL i krwi obwodowej u chorych na sarkoidozę ze stwierdzonym w badaniu TKWR płuc włóknieniem, opisanym jako znacznie nasilone włóknienie płuc.

limfocyty	średnia	mediana	min	max	Kwartył dolny	Kwartył górny	Odchylenie standardowe
CD4+ BAL	68,9%	68,9%	37,7%	97,3%	63,8%	78,0%	16,2%
CD8+BAL	30,6%	29,2%	6,7%	66,3%	19,7%	40,8%	15,8%
CD4/CD8 BAL	3,6	2,1	0,4	13,9	1,2	3,5	4,1
CD4+ krew	47,3%	47,3%	15,4%	83,1%	37,6%	62,5%	17,9%
CD8+ krew	53,5%	55,4%	26,9%	95,6%	41,6%	58,6%	17,0%
CD4/CD8 krew	1,0	0,9	0,2	2,3	0,7	1,1	0,6

Tabela 16. Parametry statystyczne limfocytów CD4+ i CD8+ w BAL i krwi obwodowej u chorych na sarkoidozę ze stwierdzonym w badaniu TKWR płuc włóknieniem, opisanym jako dyskretne zmiany włókniste płuc.

limfocyty	średnia	mediana	min	max	Kwartył dolny	Kwartył górny	Odchylenie standardowe
CD4+ BAL	82,7%	87,5%	60,5%	94,6%	83,7%	89,2%	11,3%
CD8+BAL	19,0%	13,2%	6,1%	52,3%	11,4%	16,3%	14,7%
CD4/CD8 BAL	6,6	6,7	1,1	15,3	5,1	7,8	4,1
CD4+ krew	59,6%	57,9%	43,3%	78,3%	50,0%	71,0%	12,3%
CD8+ krew	39,1%	32,3%	23,4%	67,4%	28,9%	46,7%	14,3%
CD4/CD8 krew	1,7	1,6	0,6	2,7	1,1	2,3	0,7

Wykres 21. Odsetek limfocytów CD4+ i CD8+ w BAL i krwi obwodowej w zależności od stwierdzonych w badaniu TKWR płuc guzków sarkoidalnych.



Wykres 22. Stosunek limfocytów CD4+ do CD8+ w BAL i krwi obwodowej w zależności od stwierdzonych w badaniu TKWR płuc guzków sarkoidalnych.

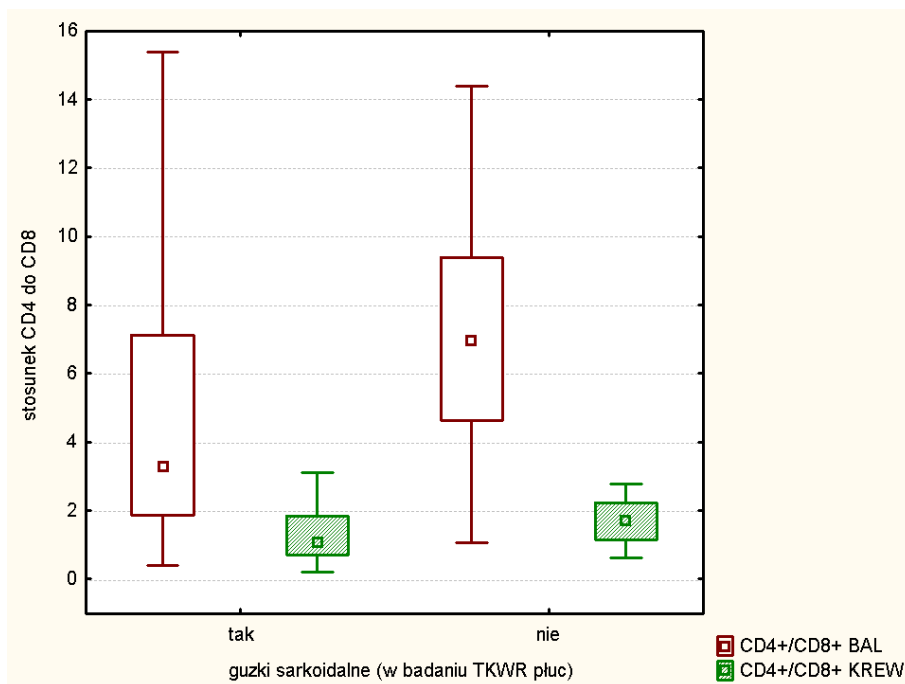


Tabela 17. Parametry statystyczne limfocytów CD4+ i CD8+ w BAL i krwi obwodowej u chorych na sarkoidozę ze stwierdzonymi w badaniu TKWR płuc guzkami sarkoidalnymi.

limfocyty	średnia	mediana	min	max	Kwartył dolny	Kwartył górny	Odchylenie standardowe
CD4+ BAL	75,6%	78,5%	37,7%	97,3%	65,4%	88,3%	14,3%
CD8+BAL	25,0%	22,8%	6,1%	66,3%	11,6%	34,3%	14,4%
CD4/CD8 BAL	4,6	3,2	0,4	15,3	1,8	7,1	3,7
CD4+ krew	53,0%	52,8%	15,4%	83,1%	43,3%	64,3%	15,9%
CD8+ krew	49,9%	52,5%	23,4%	95,6%	34,1%	60,2%	17,0%
CD4/CD8 krew	1,2	1,0	0,2	3,1	0,7	1,8	0,7

Tabela 18. Parametry statystyczne limfocytów CD4+ i CD8+ w BAL i krwi obwodowej w grupie chorych na sarkoidozę bez stwierdzonych w badaniu TKWR płuc guzków sarkoidalnych.

limfocyty	średnia	mediana	min	max	Kwartył dolny	Kwartył górny	Odchylenie standardowe
CD4+ BAL	85,7%	89,1%	58,0%	96,2%	80,3%	93,0%	9,9%
CD8+BAL	16,6%	12,4%	6,5%	55,0%	10,0%	17,3%	12,7%
CD4/CD8 BAL	7,4	6,9	1	14,3	4,6	9,3	4
CD4+ krew	62,0%	64,2%	15,3%	78,8%	58,4%	69,5%	13,3%
CD8+ krew	39,4%	36,3%	24,9%	88,6%	31,3%	45,7%	15,0%
CD4/CD8 krew	1,7	1,7	0,6	2,7	1,1	2,2	0,6

Wykres 23. Odsetek limfocytów CD4+ w BAL w zależności od stadium sarkoidozy w porównaniu do grupy kontrolnej.

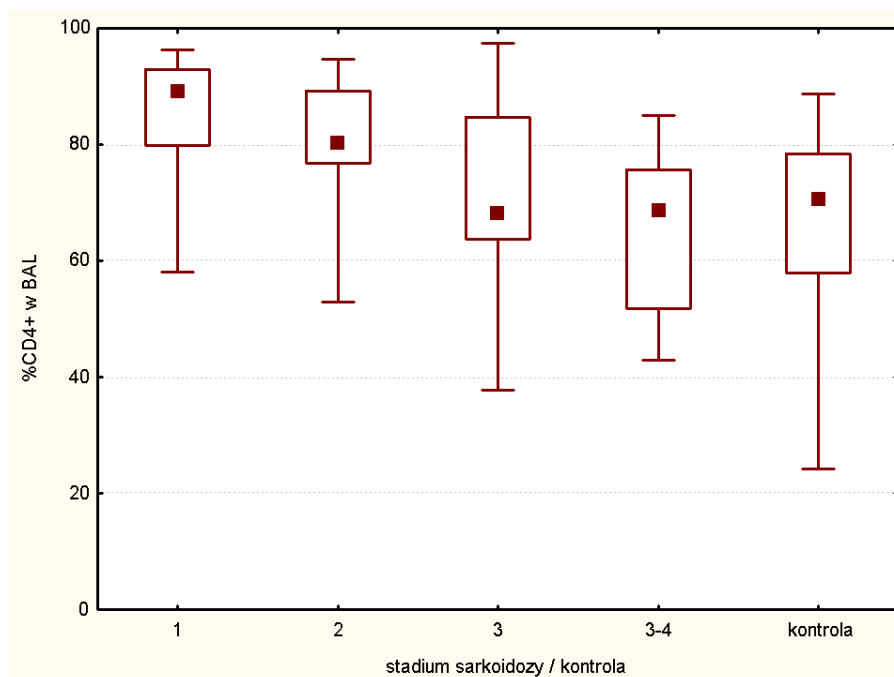


Tabela 19. Istotności statystyczne pomiędzy odsetkami limfocytów CD4+ w BAL w zależności od stadium sarkoidozy w porównaniu do grupy kontrolnej.

Stadium sarkoidozy	1	2	3	3-4	kontrola
	Mediana 88,9%	Mediana 80,4%	Mediana 68,2%	Mediana 68,3%	Mediana 70,4%
1	-	0,195	0,003	0,002	0,00001
2	0,195	-	0,070	0,027	0,0009
3	0,003	0,070	-	0,452	0,210
3-4	0,002	0,027	0,452	-	0,829
kontrola	0,00001	0,0009	0,210	0,829	-

*na czerwono zaznaczono p istotne statystycznie

Wykres 24. Odsetek limfocytów CD8+ w BAL w zależności od stadium sarkoidozy w porównaniu do grupy kontrolnej.

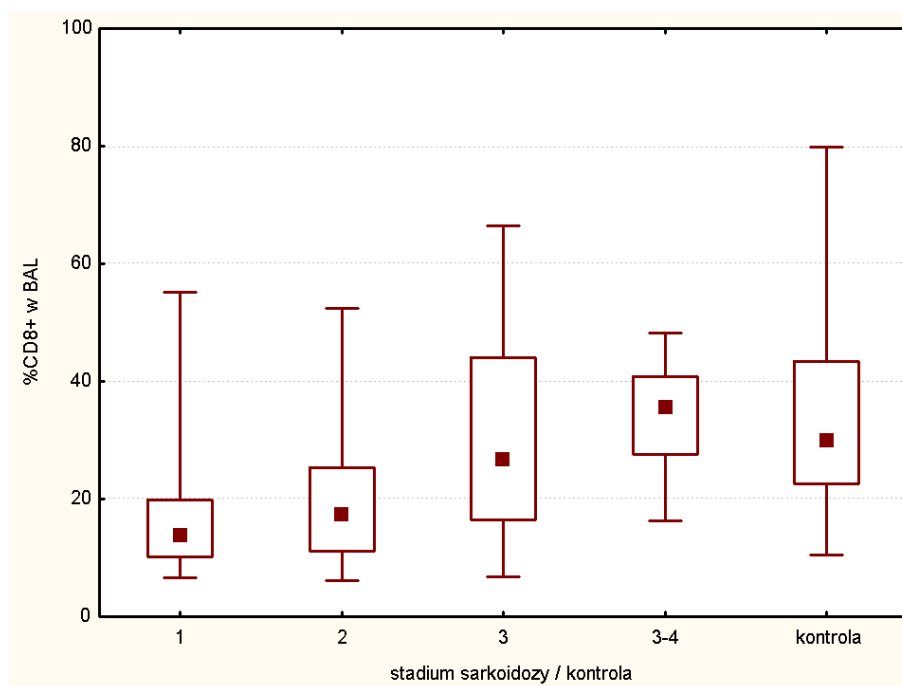


Tabela 20. Istotności statystyczne pomiędzy odsetkami limfocytów CD8+ w BAL w zależności od stadium sarkoidozy w porównaniu do grupy kontrolnej.

Stadium sarkoidozy	1	2	3	3-4	kontrola
	Mediana 13,6%	Mediana 17,5%	Mediana 17,5%	Mediana 35,6%	Mediana 29,9%
1	-	0,401	0,019	0,016	0,0002
2	0,401	-	0,105	0,061	0,003
3	0,019	0,105	-	0,520	0,293
3-4	0,016	0,061	0,520	-	0,903
kontrola	0,0002	0,003	0,293	0,903	-

*na czerwono zaznaczono p istotne statystycznie

Wykres 25. Stosunek limfocytów CD4+ do CD8+ w BAL w zależności od stadium sarkoidozy w porównaniu do grupy kontrolnej.

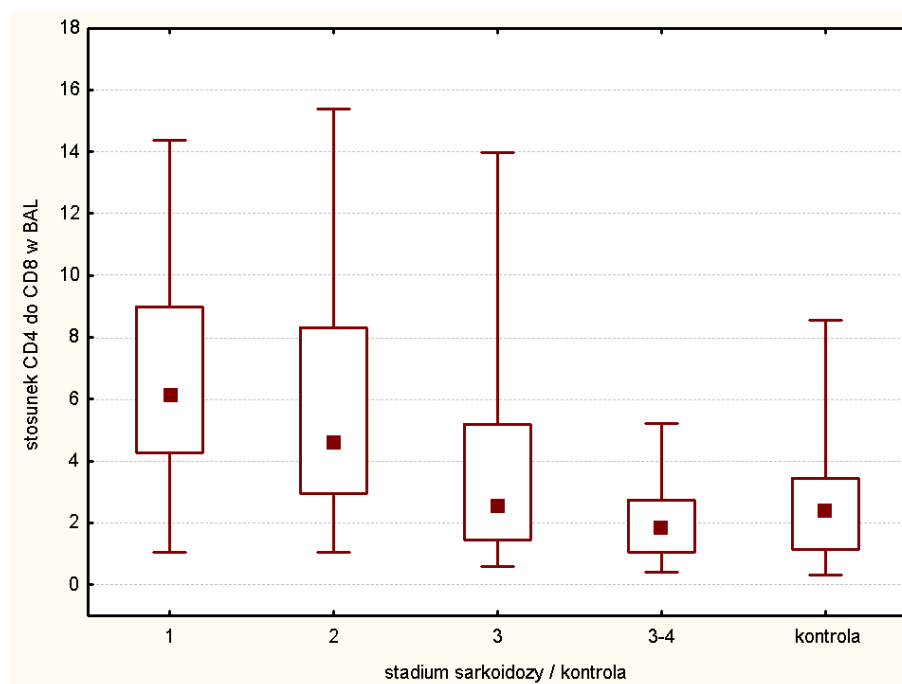


Tabela 21. Istotności statystyczne pomiędzy stosunkami limfocytów CD4+ do CD8+ w BAL w zależności od stadium sarkoidozy w porównaniu do grupy kontrolnej.

Stadium sarkoidozy	1	2	3	3-4	kontrola
	Mediana 6,1	Mediana 4,6	Mediana 2,5	Mediana 1,8	Mediana 2,3
1	-	0,204	0,024	0,001	0,0001
2	0,204	-	0,251	0,019	0,007
3	0,024	0,251	-	0,168	0,188
3-4	0,001	0,019	0,168	-	0,692
kontrola	0,0001	0,007	0,188	0,692	-

*na czerwono zaznaczono p istotne statystycznie

Wykres 26. Odsetek limfocytów CD4+ we krwi w zależności od stadium sarkoidozy w porównaniu do grupy kontrolnej.

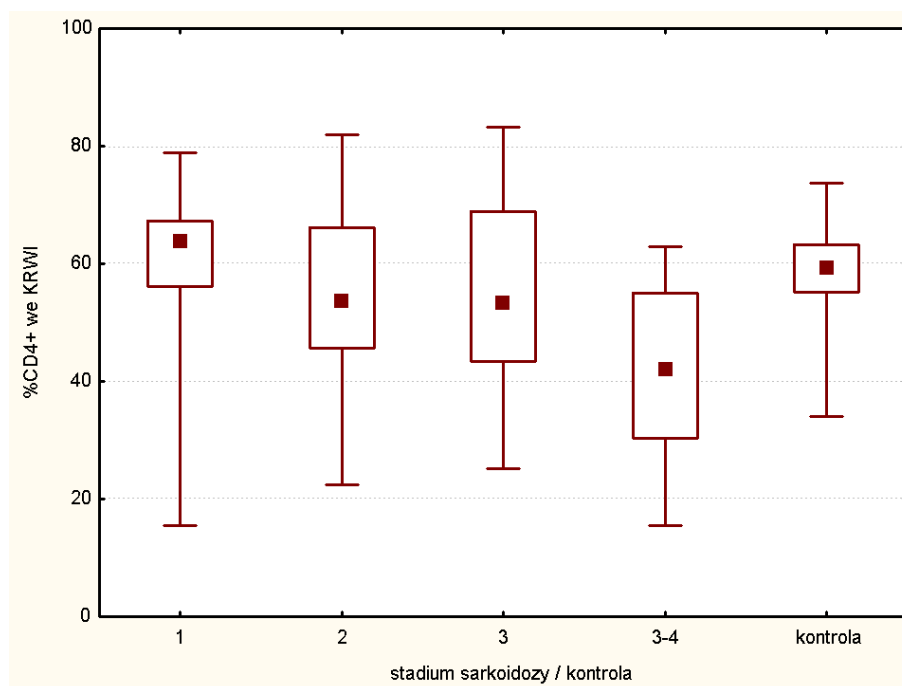


Tabela 22. Istotności statystycznie pomiędzy odsetkami limfocytów CD4+ we krwi w zależności od stadium sarkoidozy w porównaniu do grupy kontrolnej.

Stadium sarkoidozy	1	2	3	3-4	kontrola
	Mediana 64,1%	Mediana 52,9%	Mediana 53,3%	Mediana 41,2%	Mediana 59,4%
1	-	0,204	0,373	0,005	0,471
2	0,204	-	0,842	0,042	0,617
3	0,373	0,842	-	0,043	0,81
3-4	0,005	0,042	0,043	-	0,021
kontrola	0,471	0,617	0,81	0,021	-

*na czerwono zaznaczono p istotne statystycznie

Wykres 27. Odsetek limfocytów CD8+ we krwi w zależności od stadium sarkoidozy w porównaniu do grupy kontrolnej.

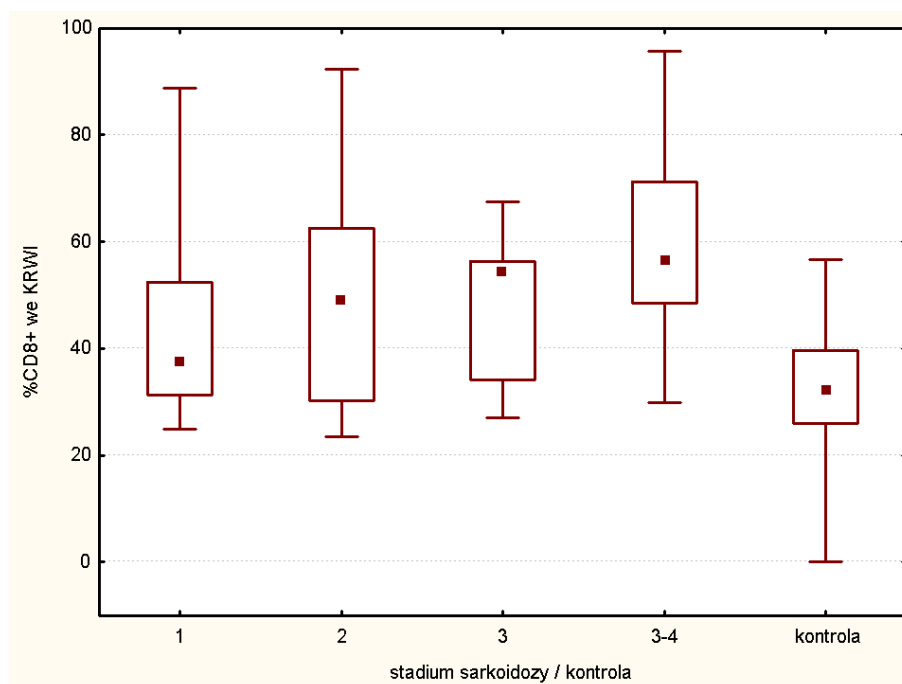


Tabela 23. Istotności statystycznie pomiędzy odsetkami limfocytów CD8+ we krwi w zależności od stadium sarkoidozy w porównaniu do grupy kontrolnej.

Stadium sarkoidozy	1	2	3	3-4	kontrola
-	Mediana 37,2%	Mediana 47,9%	Mediana 51,5%	Mediana 54,3%	Mediana 33,5%
1	-	0,147	0,302	0,017	0,092
2	0,147	-	0,837	0,142	0,002
3	0,302	0,837	-	0,132	0,016
3-4	0,017	0,142	0,132	-	0,0007
kontrola	0,092	0,002	0,016	0,0007	-

*na czerwono zaznaczono p istotne statystycznie

Wykres 28. Stosunek limfocytów CD4+ do CD8+ we krwi w zależności od stadium sarkoidozy w porównaniu do grupy kontrolnej.

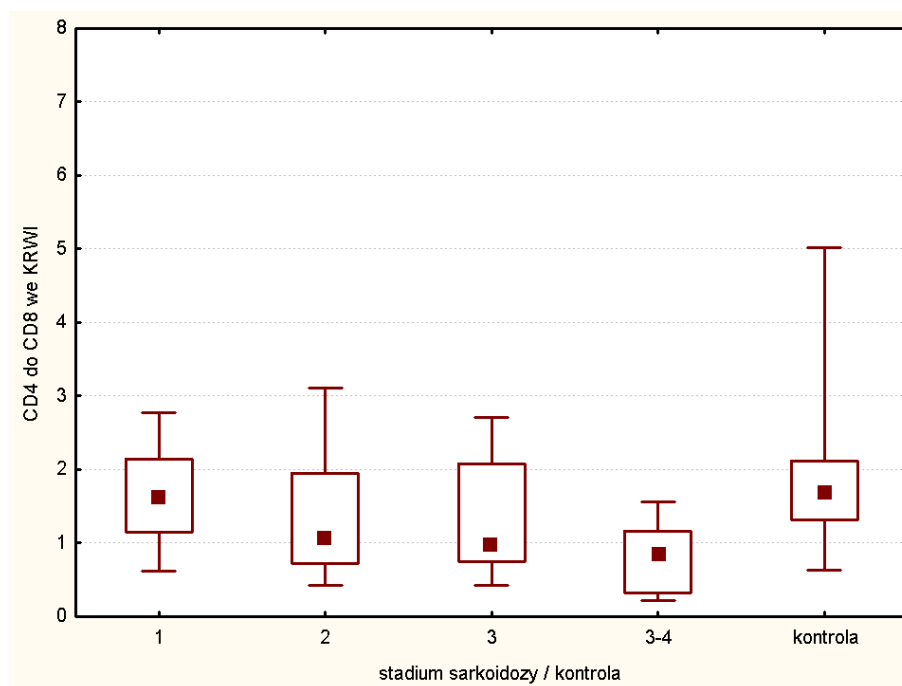


Tabela 24. Istotności statystycznie pomiędzy stosunkami limfocytów CD4+ do CD8+ we krwi w zależności od stadium sarkoidozy w porównaniu do grupy kontrolnej.

Stadium sarkoidozy	1	2	3	3-4	kontrola
	Mediana 1,6	Mediana 1	Mediana 0,9	Mediana 0,8	Mediana 1,6
1	-	0,226	0,334	0,026	0,263
2	0,226	-	0,949	0,143	0,027
3	0,334	0,949	-	0,16	0,061
3-4	0,026	0,143	0,16	-	0,004
kontrola	0,263	0,027	0,061	0,004	-

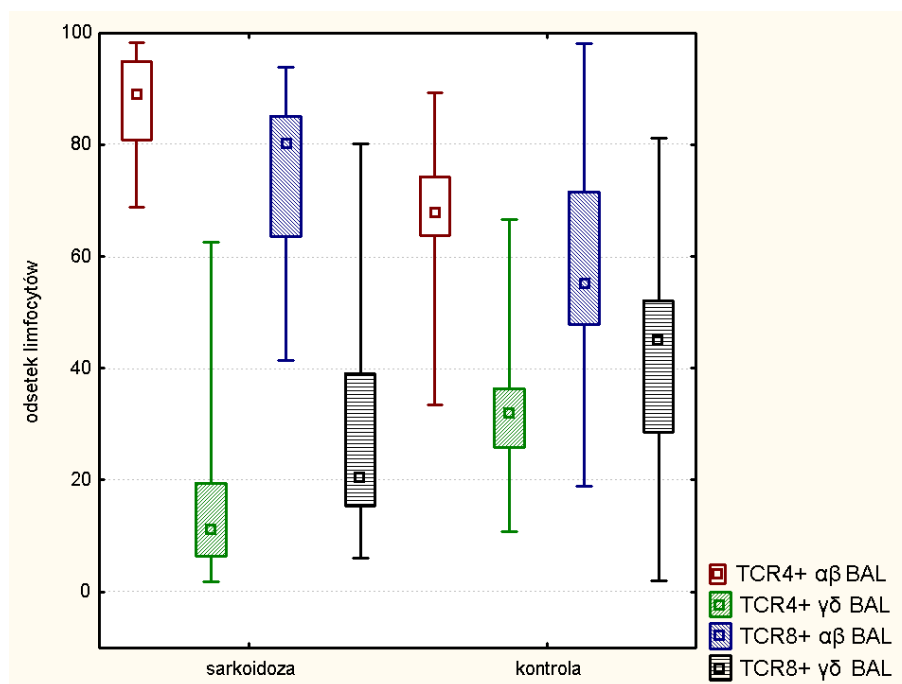
*na czerwono zaznaczono p istotne statystycznie

5.2.2 Limfocyty T TCR $\alpha\beta$ i TCR $\gamma\delta$

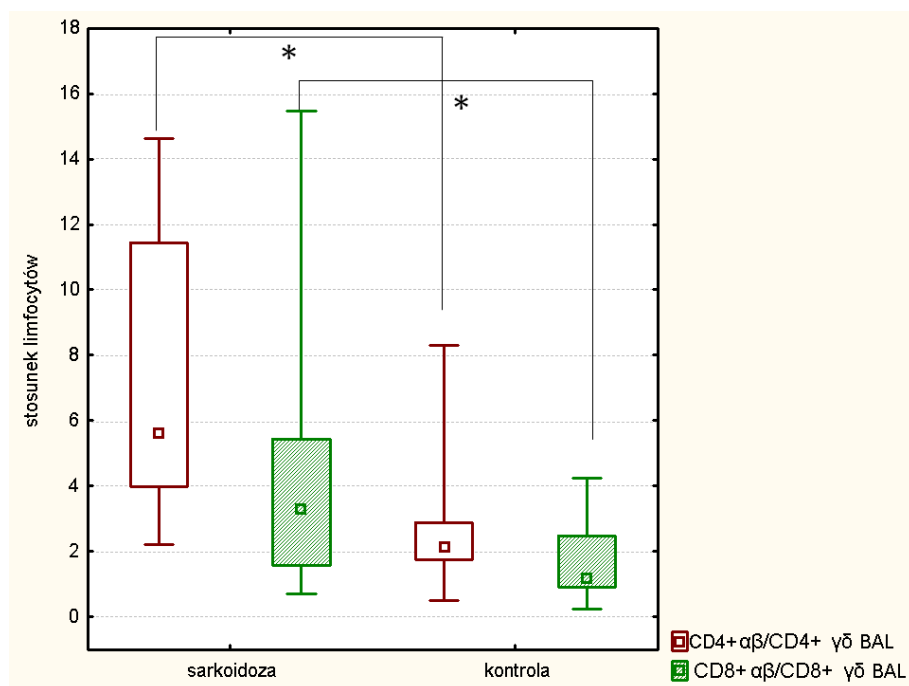
Stwierdzono w BAL istotny statystycznie wzrost odsetka limfocytów TCR $\alpha\beta$ CD4⁺ ($p=0,00001$), TCR $\alpha\beta$ CD8⁺ ($p=0,002$) przy jednoczesnym obniżeniu odsetka limfocytów TCR $\gamma\delta$ CD4⁺ ($p=0,00005$), TCR $\gamma\delta$ CD8⁺ ($p=0,0078$) u chorych na sarkoidozę w stosunku do grupy kontrolnej (wykres 29). Stwierdzony również istotny statystycznie wyższy stosunek limfocytów TCR $\alpha\beta$ CD4⁺ do TCR $\gamma\delta$ CD4⁺ ($p=0,00001$) i TCR $\alpha\beta$ CD8⁺ do TCR $\gamma\delta$ CD8⁺ ($p=0,0008$) u chorych na sarkoidozę (wykres 30).

Rozważano zmiany w odsetku subpopulacji limfocytów TCR $\alpha\beta$ i TCR $\gamma\delta$ w BAL w zależności od stwierdzanych w badaniu TKWR płuc powiększonych węzłów chłonnych. Obserwowano tendencję wzrostu odsetka limfocytów TCR $\alpha\beta$ CD4⁺ ($p=0,09$) i TCR $\alpha\beta$ CD8⁺ ($p=0,09$) przy jednoczesnym obniżeniu odsetka limfocytów TCR $\gamma\delta$ CD4⁺ ($p=0,13$) i TCR $\gamma\delta$ CD8⁺ ($p=0,13$) w obecności węzłów chłonnych (wykres 31). W analizowanej sytuacji obserwowano również wyższy stosunek limfocytów TCR $\alpha\beta$ CD4⁺ do TCR $\gamma\delta$ CD4⁺ ($p=0,08$) i stosunek limfocytów TCR $\alpha\beta$ CD8⁺ do TCR $\gamma\delta$ CD8⁺ ($p=0,08$) (wykres 32).

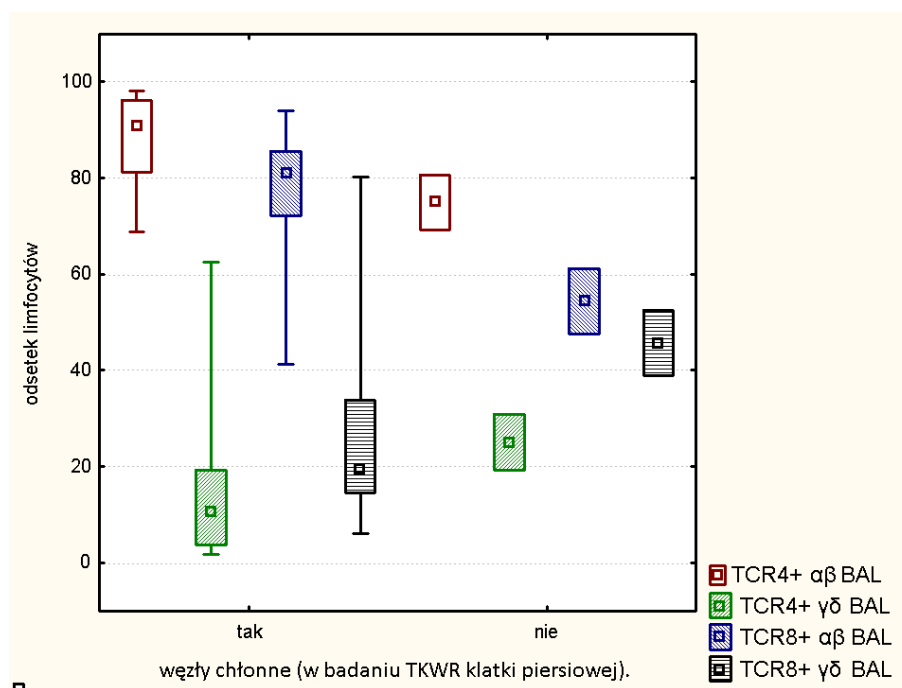
Wykres 29. Odsetek limfocytów TCR $\alpha\beta$ CD4+, TCR $\gamma\delta$ CD4+, TCR $\alpha\beta$ CD8+, TCR $\gamma\delta$ CD8+ w BAL u chorych na sarkoidozę i w grupie kontrolnej.



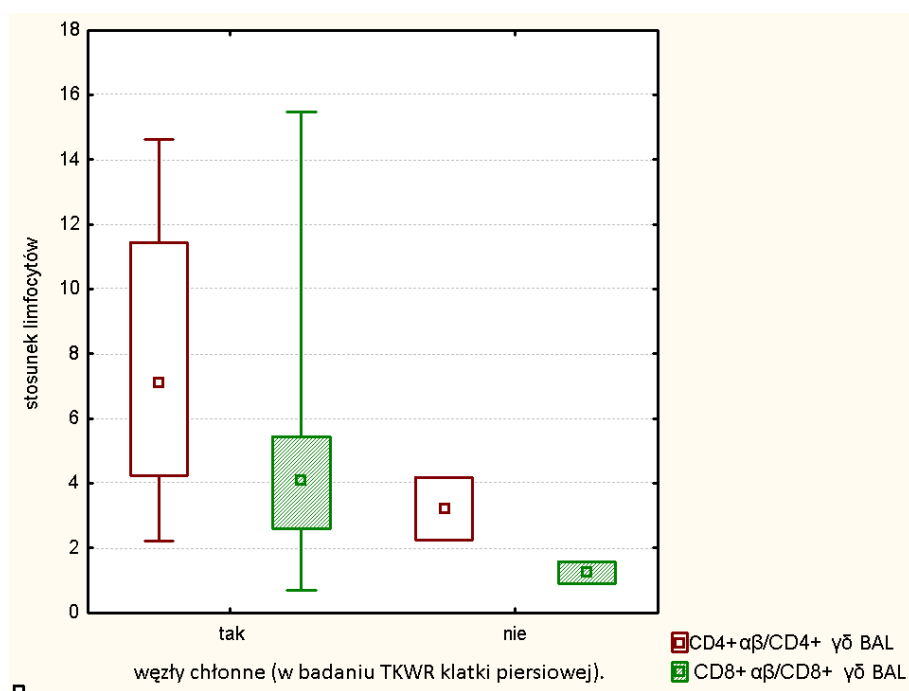
Wykres 30. Stosunek limfocytów TCR $\alpha\beta$ CD4+ do TCR $\gamma\delta$ CD4+ i stosunek limfocytów TCR $\alpha\beta$ CD8+ do TCR $\gamma\delta$ CD8+ w BAL u chorych na sarkoidozę i w grupie kontrolnej.



Wykres 31. Odsetek limfocytów $\text{TCR}\alpha\beta\text{CD4}^+$, $\text{TCR}\gamma\delta\text{CD4}^+$, $\text{TCR}\alpha\beta\text{CD8}^+$, $\text{TCR}\gamma\delta\text{CD8}^+$ w BAL u chorych na sarkoidozę w zależności od stwierdzonych w badaniu TKWR płuc powiększonych węzłów chłonnych.



Wykres 32. Stosunek limfocytów $\text{TCR}\alpha\beta\text{CD4}^+$ do $\text{TCR}\gamma\delta\text{CD4}^+$ i stosunek limfocytów $\text{TCR}\alpha\beta\text{CD8}^+$ do $\text{TCR}\gamma\delta\text{CD8}^+$ w BAL u chorych na sarkoidozę w zależności od stwierdzonych w badaniu TKWR płuc powiększonych węzłów chłonnych.



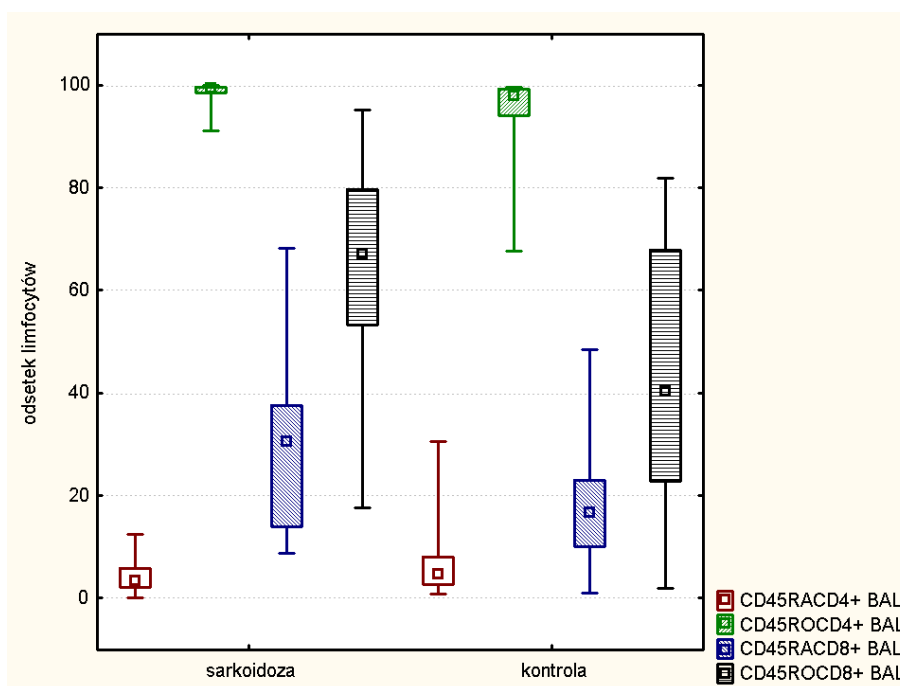
5.2.3 Limfocyty T CD45RA i CD45RO

W BAL u chorych na sarkoidozę w porównaniu do grupy kontrolnej stwierdzono istotny statystycznie wzrost odsetka limfocytów CD45RO+CD4+ ($p=0,01$), wzrost odsetka limfocytów CD45RO+CD8+ ($p=0,02$), wzrosty odsetka CD45RA+CD8+ ($p=0,03$). Nie wykazano istotności statystycznej dla CD45RA+CD4+ ($p=0,29$) (wykres 33). Nie obserwowano istotnych różnic stosunku CD45RO+CD4+ do CD45RA+CD4+ ($p=0,34$), ani CD45RO+CD8+ do CD45RA+CD8+ ($p=0,98$) w analizowanej sytuacji (wykres 34).

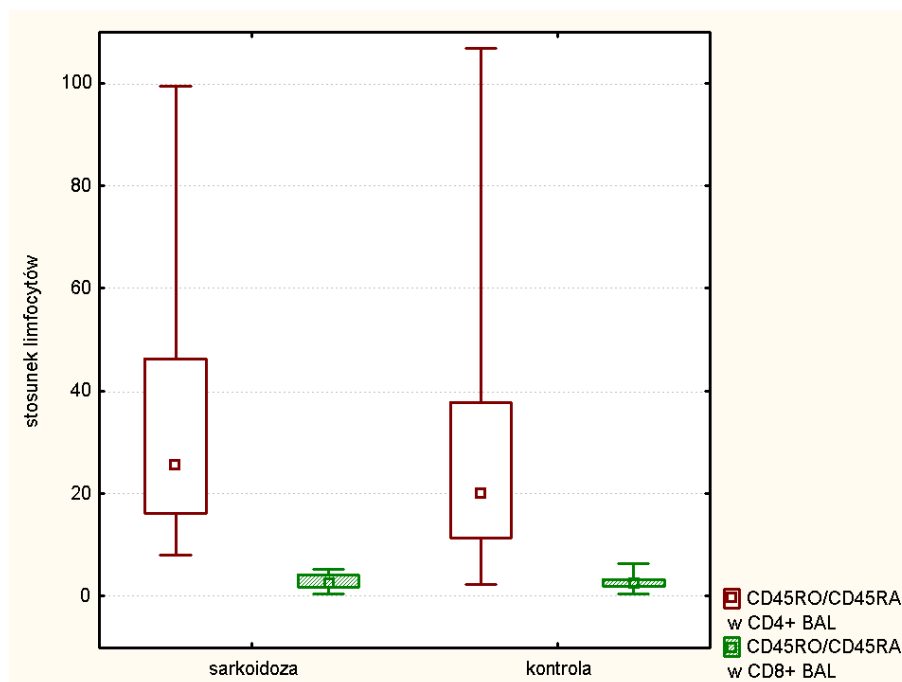
Jedyna stwierdzona istotna statystycznie zmiana we krwi u chorych na sarkoidozę w porównaniu do grupy kontrolnej dotyczyła wzrost odsetka limfocytów CD45RA+CD8+ ($p=0,01$). Nie obserwowano różnic dla CD45RO+CD8+ ($p=0,49$) (wykres 35).

Biorąc pod uwagę badanie TKWR płuc i stwierdzone w nim powiększenie węzłów chłonnych, obserwowano na granicy istotności statystycznej wyższy odsetek limfocytów CD45RA+CD8+ ($p=0,05$) w BAL u chorych na sarkoidozę (wykres 36). Analizując włóknie płuc, wykazane w badaniu TKWR, stwierdzono istotny statystycznie spadek w BAL odsetka limfocytów CD45RO+CD4+ ($p=0,02$) (wykres 37).

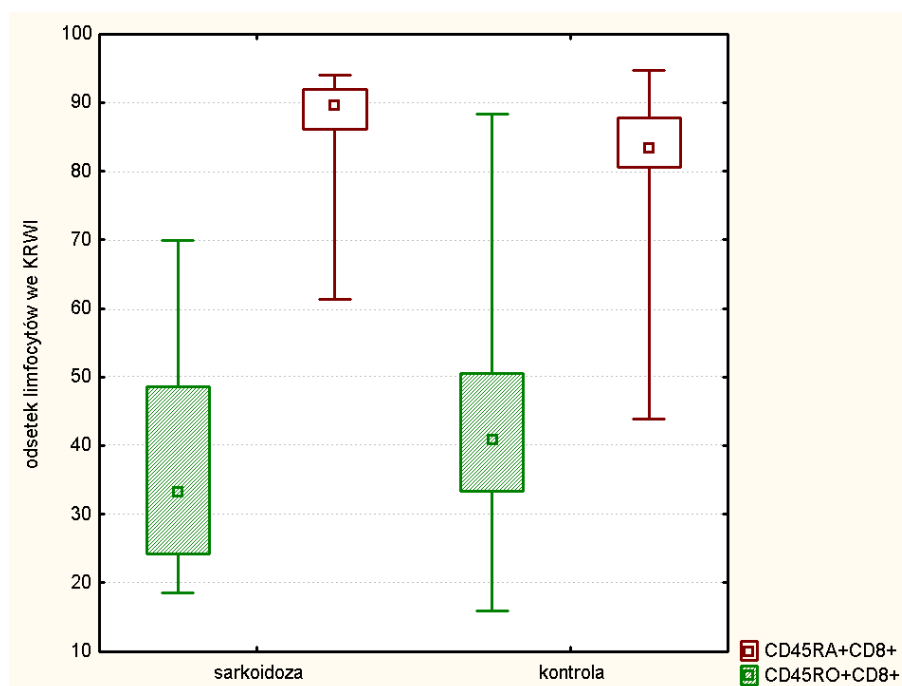
Wykres 33. Odsetek limfocytów CD45RO+CD4+, CD45RA+CD4+, CD45RO+CD8+, CD45RA+CD8+ w BAL u chorych na sarkoidozę i w grupie kontrolnej.



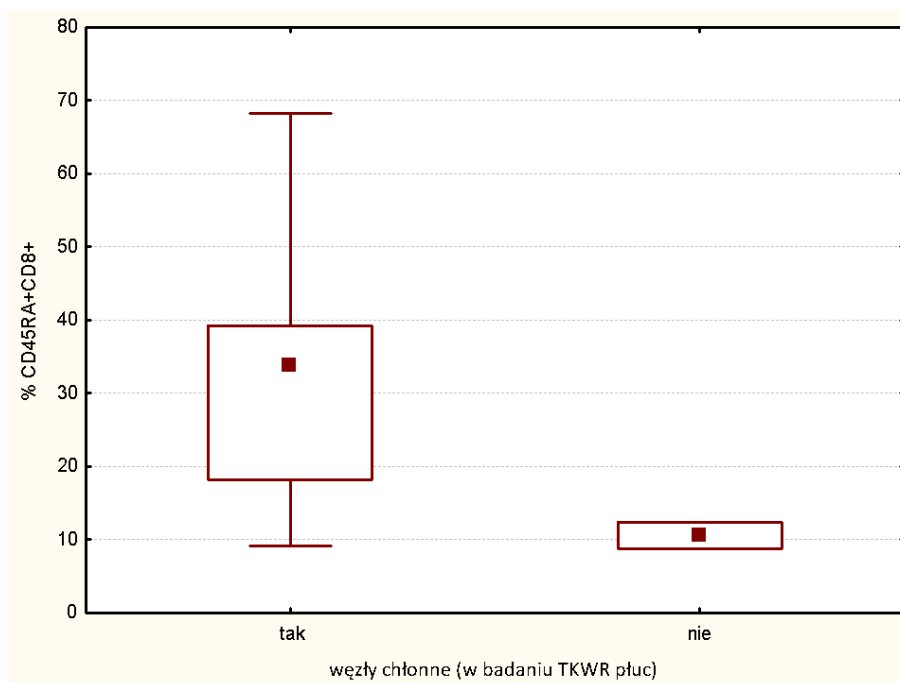
Wykres 34. Stosunek limfocytów CD45RO+CD4+ do CD45RA+CD4+ i CD45RO+CD8+ do CD45RA+CD8+ w BAL u chorych na sarkoidozę i w grupie kontrolnej.



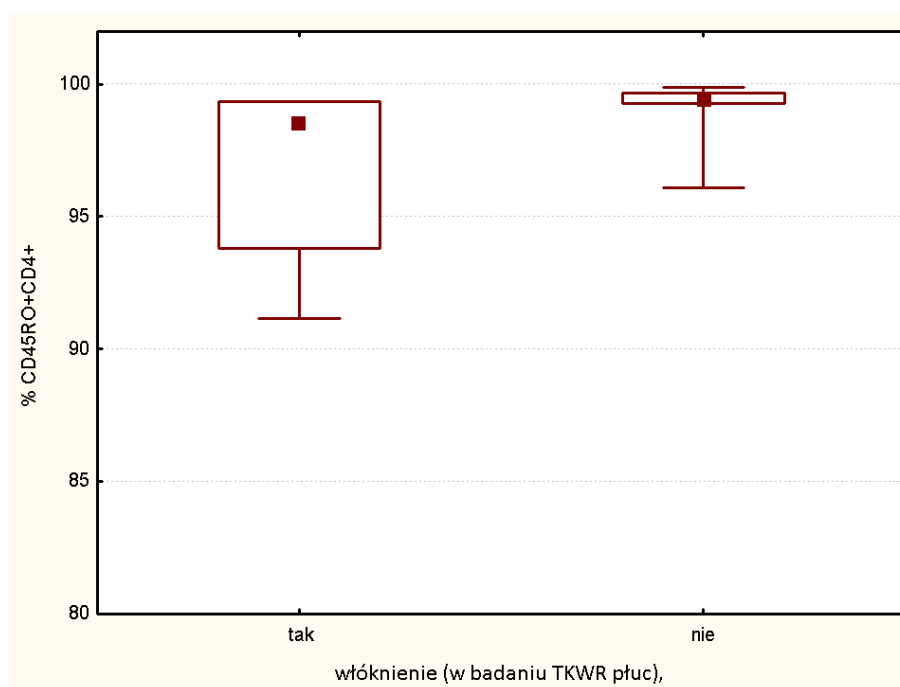
Wykres 35. Odsetek limfocytów CD45RO+CD8+ i CD45RA+CD8+ we krwi u chorych na sarkoidozę i w grupie kontrolnej.



Wykres 36. Odsetek limfocytów CD45RA+CD8+ w BAL u chorych na sarkoidozę w zależności od stwierdzanych w badaniu TKWR płuc powiększonych węzłów chłonnych.



Wykres 37. Odsetek limfocytów CD45RO+CD4+ w BAL u chorych na sarkoidozę w zależności od stwierdzanego w badaniu TKWR płuc włóknienia.



5.3 Częsteczka kostymulująca CD28

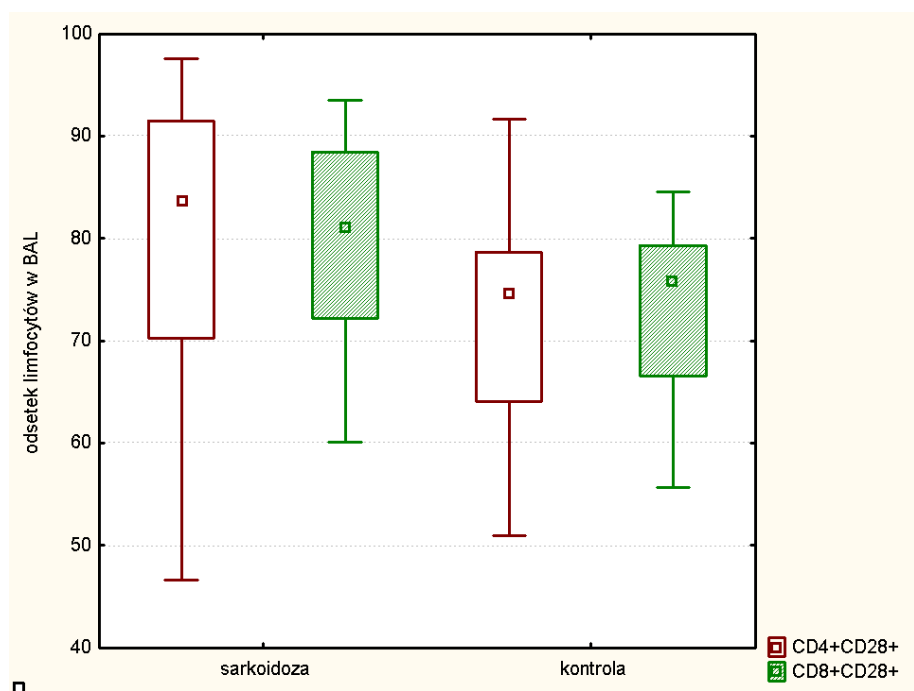
W BAL u chorych na sarkoidozę w porównaniu do grupy kontrolnej stwierdzono istotny statystycznie wzrost odsetka limfocytów CD28+CD4+ ($p=0,01$) i CD28+CD8+ ($p=0,04$) (wykres 38).

Chorzy z rozpoznaniem zespołu Löfgrena odznaczali się istotnym statystycznie wzrostem odsetka limfocytów CD28+CD4+ ($p=0,003$) i CD28+CD8+ ($p=0,001$) w BAL u w porównaniu do grupy kontrolnej. Również porównując chorych na sarkoidozę z zespołem Löfgrena i bez jego rozpoznania, obserwowano istotny statystycznie wzrost odsetka limfocytów CD28+CD4+ ($p=0,02$) i CD28+CD8+ ($p=0,01$). Nie wykazano natomiast różnic pomiędzy chorymi na sarkoidozę, u których nie było rozpoznawanego zespołu Löfgrena, a kontrolą (wykres 39).

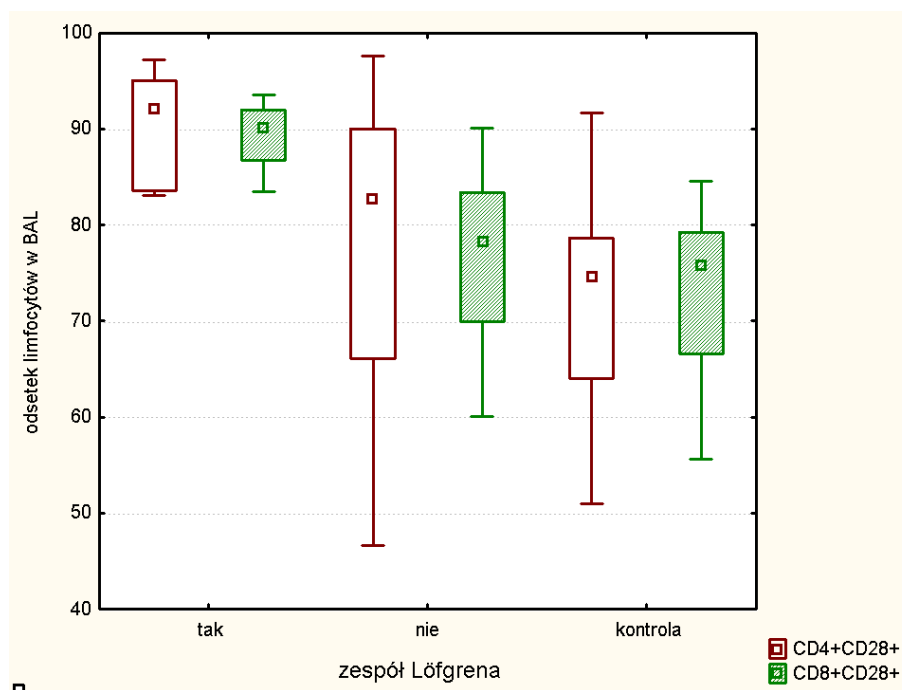
We krwi obwodowej u chorych z rozpoznaniem zespołu Löfgrena stwierdzono istotny statystycznie wzrost odsetka limfocytów CD28+CD8+ ($p=0,04$) w porównaniu do chorych, u których go nie rozpoznawano. Nie wykazano różnicy między chorymi a kontrolą (odpowiednio $p=0,50$ i $p=0,26$). Nie stwierdzono również w rozważanych grupach istotnych statystycznie różnic w odsetku limfocytów CD28+CD4+ (wykres 40).

Biorąc pod uwagę badanie TKWR płuc i stwierdzane w nim guzki sarkoidalne, wykazano istotny statystycznie spadek odsetka limfocytów CD28+CD4+ ($p=0,007$) w BAL u chorych na sarkoidozę. Nie obserwowano istotnych statystycznie różnic dla CD28+CD8+ ($p=0,17$) (wykres 41). Również analizując włóknienie płuc, stwierdzono na granicy istotności statystycznej spadek odsetka limfocytów CD28+CD4+ ($p=0,05$) w BAL i brak różnic dla CD28+CD8+ ($0,33$) (wykres 42). Zaznaczyła się tendencja spadku odsetka limfocytów CD28+CD4+ ($p=0,13$) i CD28+CD8+ ($p=0,16$) w BAL u chorych na sarkoidozę w zależności od stopnia nasilenia włóknienia, tj. opisywanego przez radiologów jako dyskretne lub znaczne włóknienie (wykres 43). U chorych ze stwierdzanymi jednocześnie guzkami sarkoidalnymi i włóknieniem analogicznie stwierdzono istotny statystycznie spadek odsetka limfocytów CD28+CD4+ ($p=0,01$) w BAL, jak również obserwowano podobną tendencję w odsetku limfocytów CD28+CD8+ ($p=0,05$) (wykres 44).

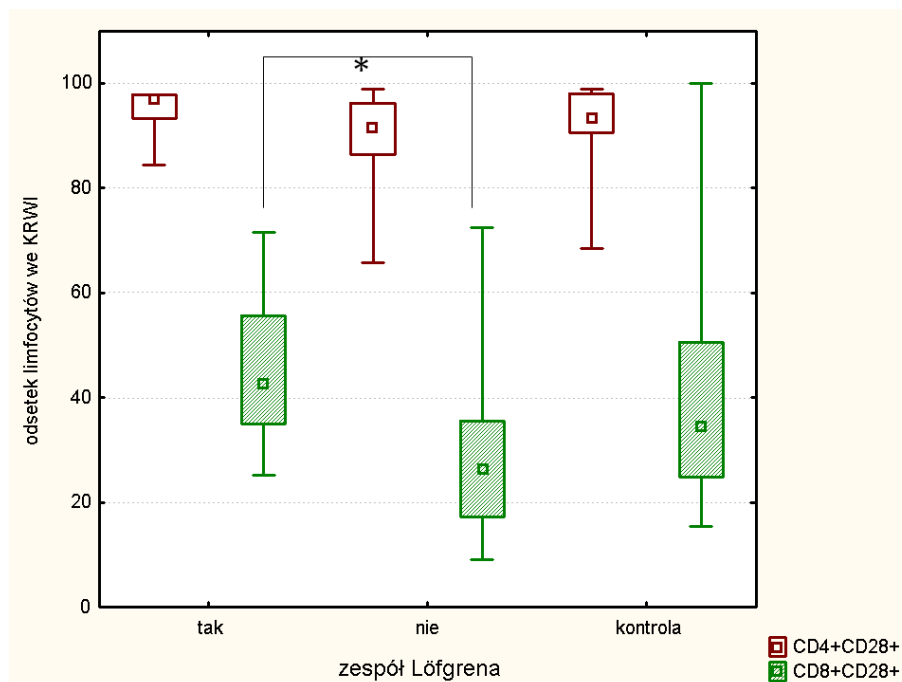
Wykres 38. Odsetek limfocytów CD28+CD4+ i CD28+CD8+ w BAL u chorych na sarkoidozę i w grupie kontrolnej.



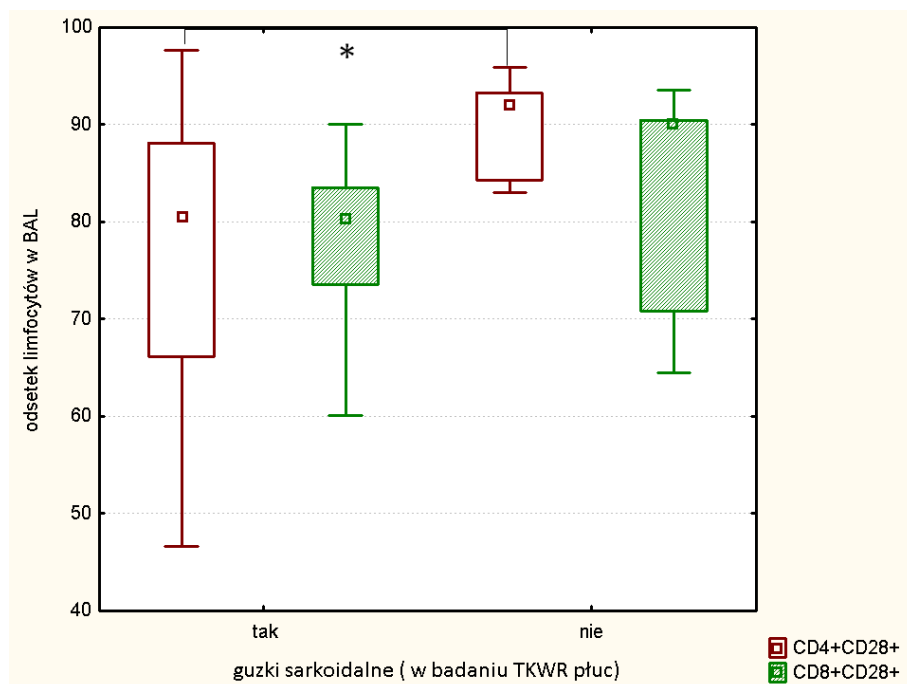
Wykres 39. Odsetek limfocytów CD28+CD4+ i CD28+CD8+ w BAL u chorych na sarkoidozę w zależności od zespołu Löfgrena w porównaniu z grupą kontrolną.



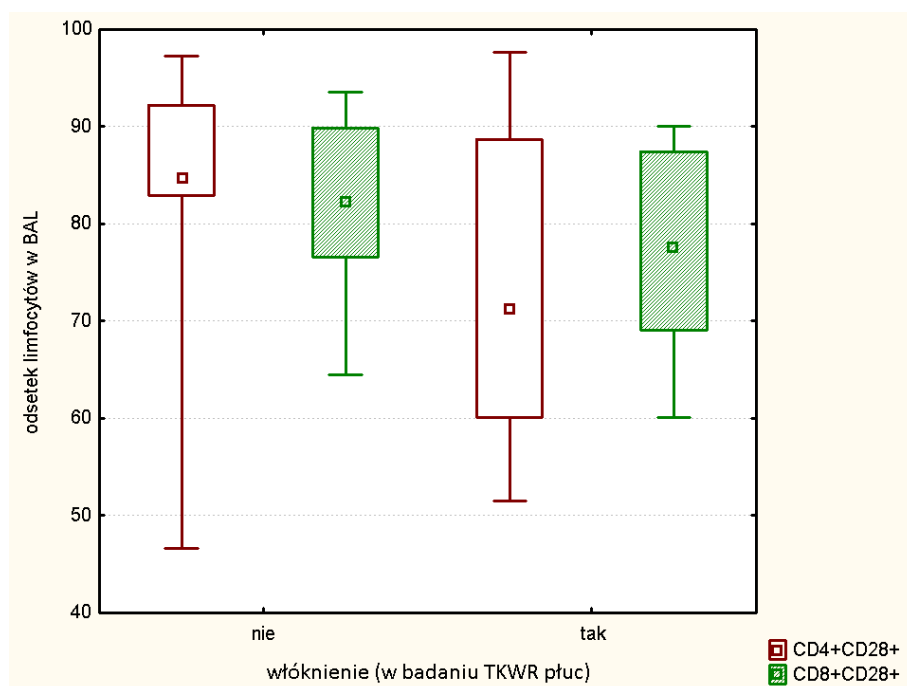
Wykres 40. Odsetek limfocytów CD28+CD4+ i CD28+CD8+ we krwi u chorych na sarkoidozę w zależności od zespołu Löfgrena w porównaniu z grupą kontrolną.



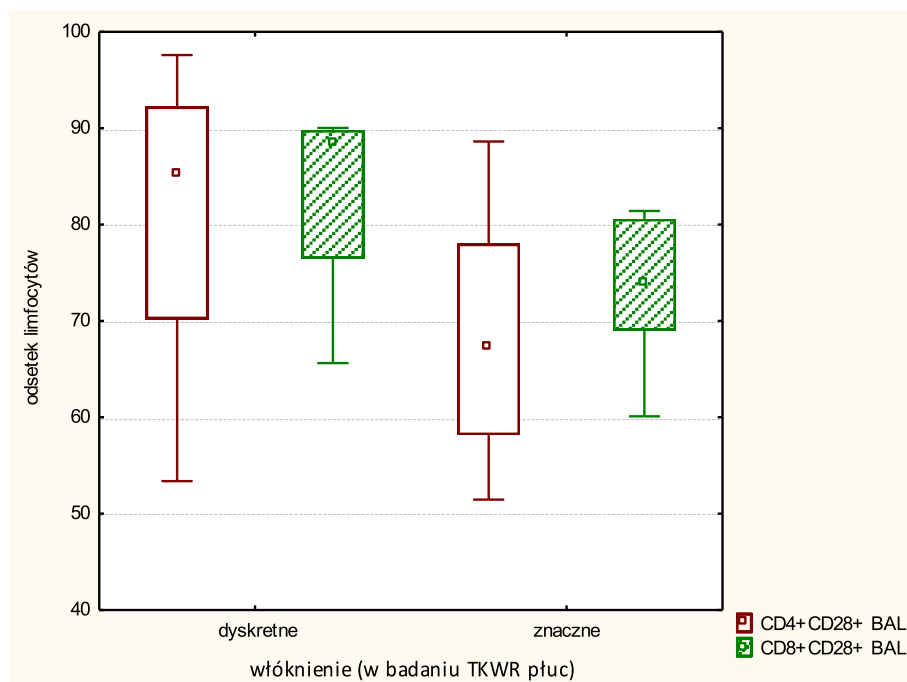
Wykres 41. Odsetek limfocytów CD28+CD4+ i CD28+CD8+ w BAL u chorych na sarkoidozę w zależności od stwierdzanych w badaniu TKWR płuc guzków sarkoidalnych.



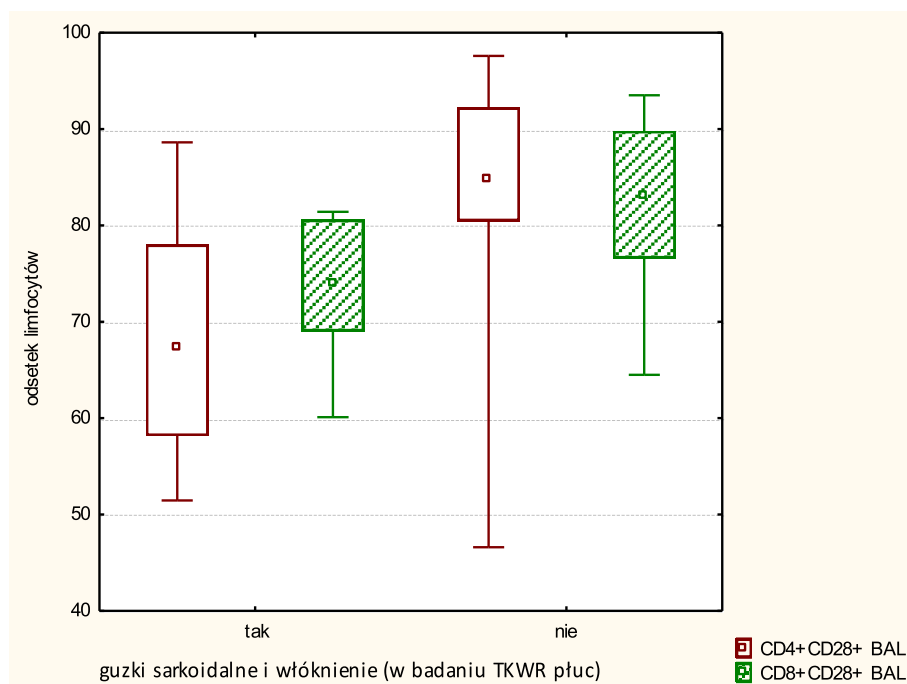
Wykres 42. Odsetek limfocytów CD28+CD4+ i CD28+CD8+ w BAL u chorych na sarkoidozę w zależności od stwierdzanego w badaniu TKWR płuc włóknienia.



Wykres 43. Odsetek limfocytów CD28+CD4+ i CD28+CD8+ w BAL u chorych na sarkoidozę w zależności od nasilenia włóknienia, stwierdzanego w badaniu TKWR płuc.



Wykres 44. Odsetek limfocytów CD28+CD4+ i CD28+CD8+ w BAL u chorych na sarkoidozę w zależności od stwierdzanych w badaniu TKWR płuc zmian, tj. guzków sarkoidalnych i włóknienia.



5.4 Markery aktywacji limfocytów

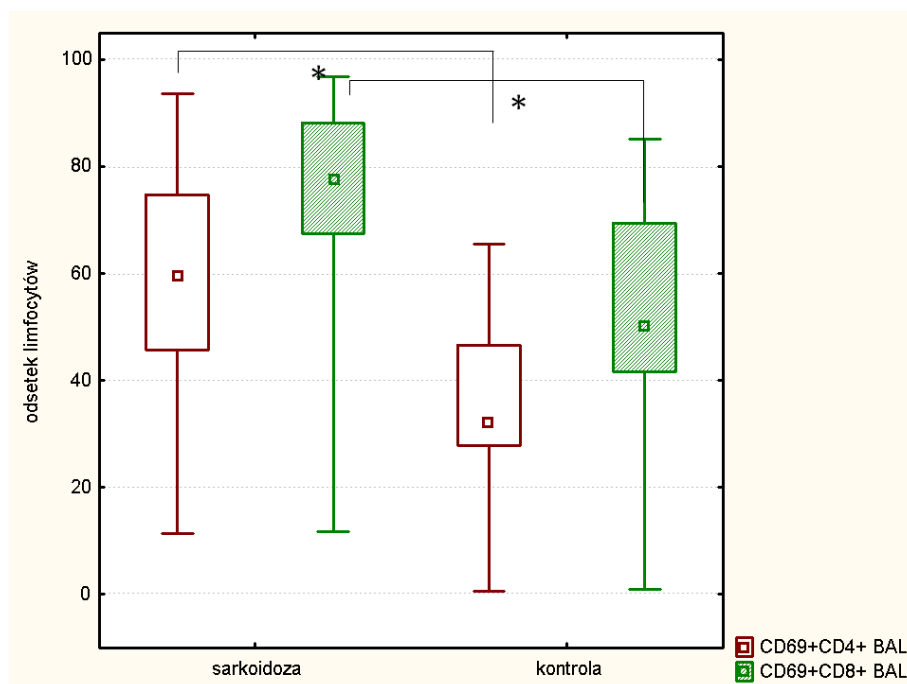
5.4.1 CD69

Stwierdzono istotny statystycznie wzrost odsetka limfocytów CD69+CD4+ ($p=0,00004$) i CD69+CD8+ ($p=0,00012$) w BAL u chorych na sarkoidozę w porównaniu do grupy kontrolnej (wykres 45). Podobnie we krwi obwodowej stwierdzono istotny statystycznie wzrost odsetka zarówno limfocytów CD69+CD4+ ($p=0,00004$), jak i CD69+CD8+ ($p=0,013$) (wykres 46).

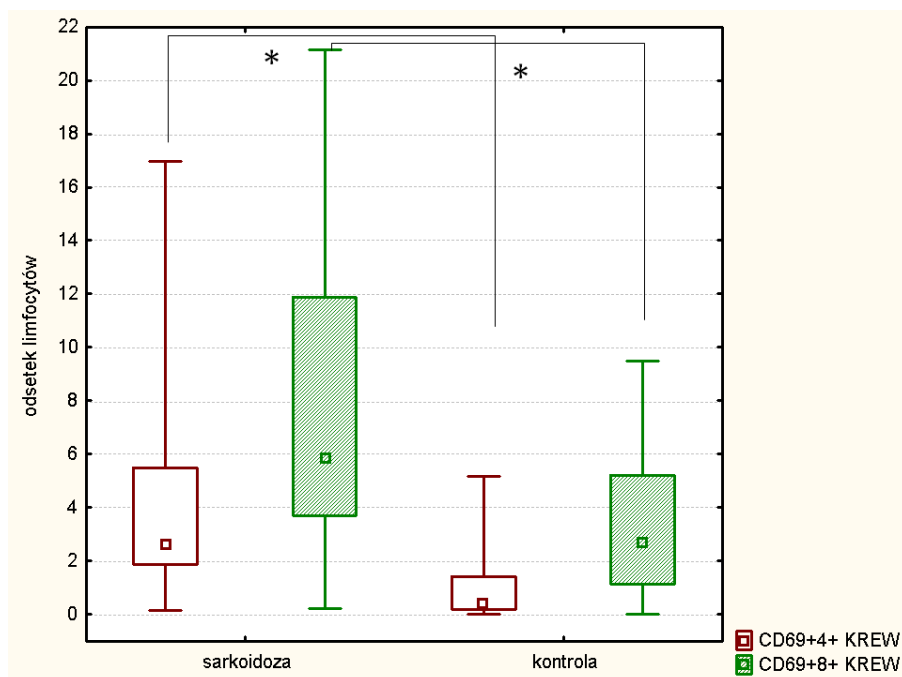
Rozważając grupę chorych z rozpoznaniem zespołu Löfgrena i bez jego rozpoznania, nie stwierdzono istotnego statystycznie wzrost odsetka limfocytów CD69+CD4+ ($p=0,37$), ani CD69+CD8+ ($p=0,67$) w BAL (wykres 47), jak również we krwi obwodowej, odpowiednio dla limfocytów CD69+CD4+ ($p=0,77$) i CD69+CD8+ ($p=0,28$) (wykres 48).

Natomiast biorąc pod uwagę czas trwania choroby w momencie badania, stwierdzono istotny statystycznie wzrost odsetka limfocytów CD69+CD4+ w BAL u chorych na sarkoidozę trwającą krócej niż 2 lata w porównaniu do trwania choroby powyżej 5 lat ($p=0,0009$). Obserwowano również istotne statystycznie różnice pomiędzy 2-5 letnim okresem trwania sarkoidozy, a powyżej 5 lat trwania choroby ($p=0,02$). Nie obserwowano różnic w odsetku limfocytów CD69+CD8+ w wyróżnionych podgrupach chorych (wykres 49).

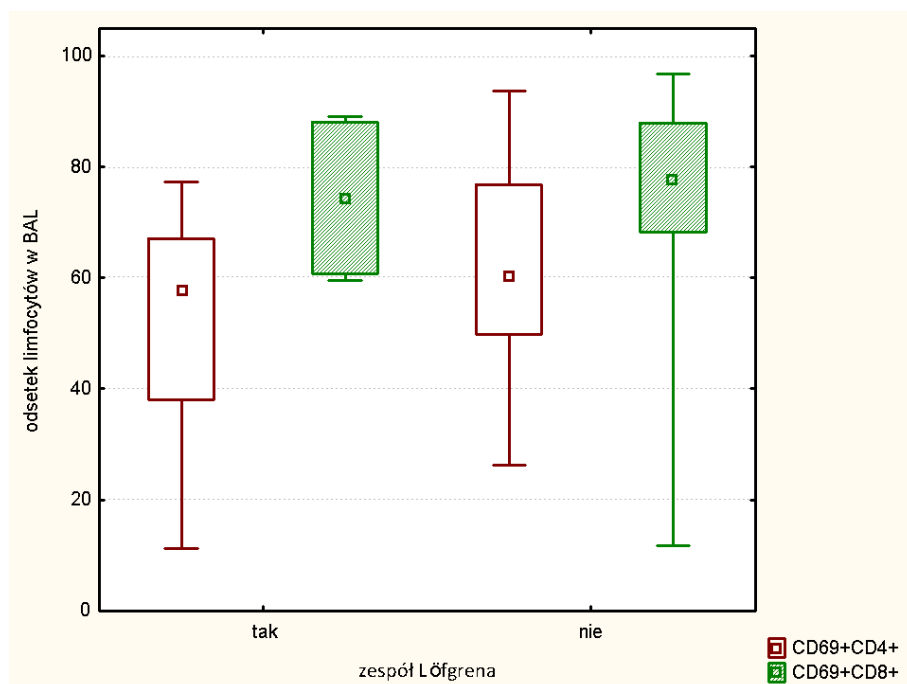
Wykres 45. Odsetek limfocytów CD69+CD4+ i CD69+CD8+ w BAL u chorych na sarkoidozę i w grupie kontrolnej.



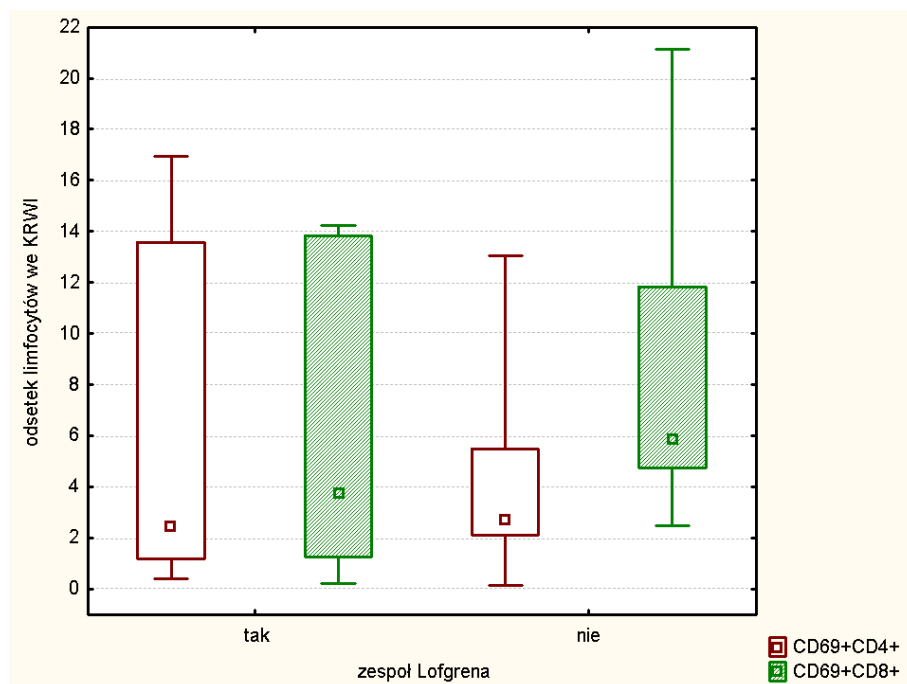
Wykres 46. Odsetek limfocytów CD69+CD4+ i CD69+CD8+ we krwi u chorych na sarkoidozę i w grupie kontrolnej.



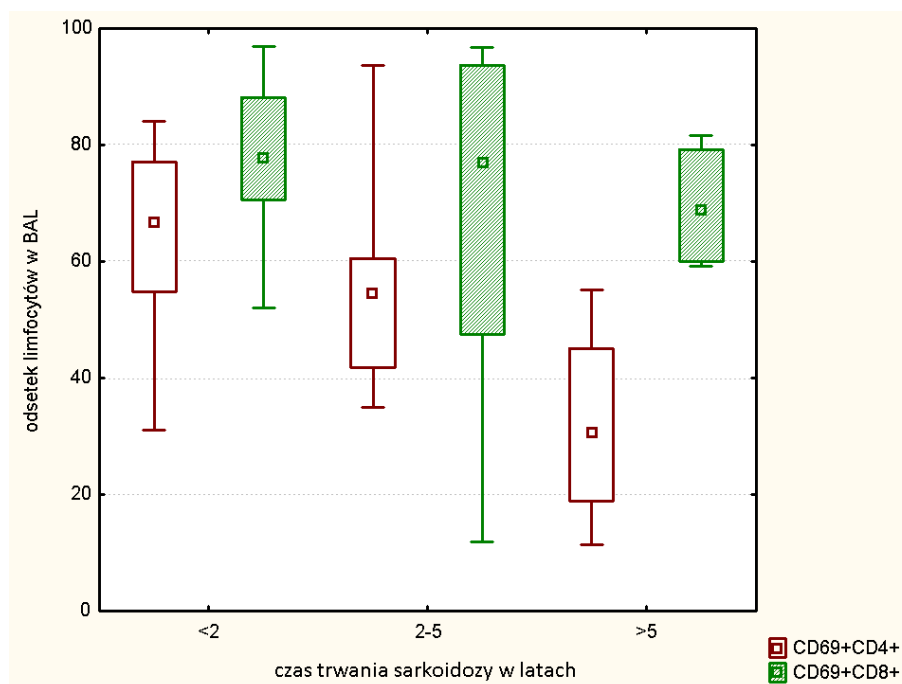
Wykres 47. Odsetek limfocytów CD69+CD4+ i CD69+CD8+ w BAL u chorych na sarkoidozę w zależności od rozpoznanego zespołu Löfgrena.



Wykres 48. Odsetek limfocytów CD69+CD4+ i CD69+CD8+ we krwi u chorych na sarkoidozę w zależności od rozpoznanego zespołu Löfgrena.



Wykres 49. Odsetek limfocytów CD69+CD4+ i CD69+CD8+ w BAL u chorych na sarkoidozę w zależności od czasu trwania choroby.

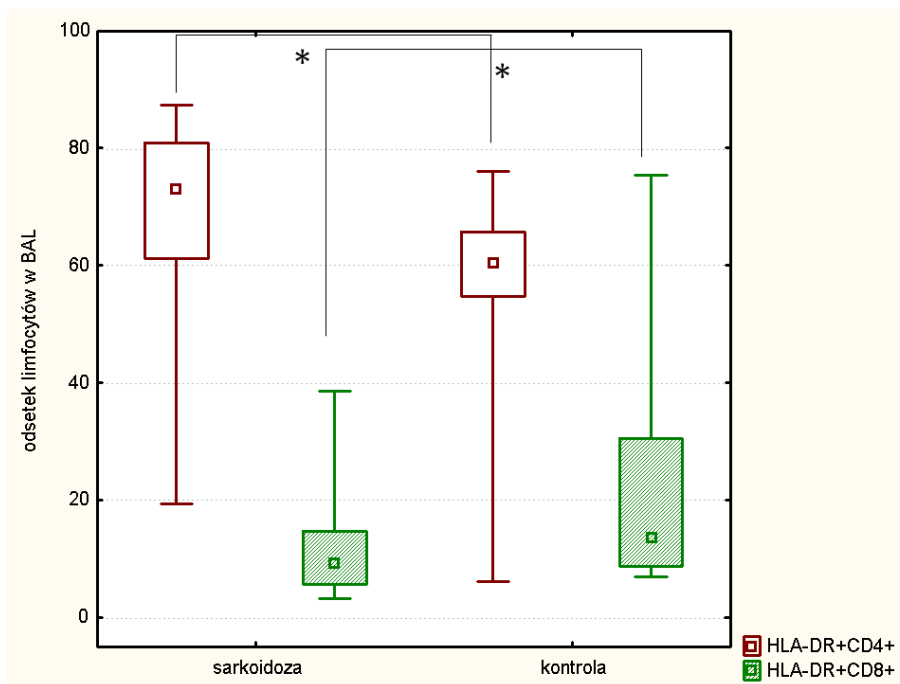


5.4.2 HLA-DR

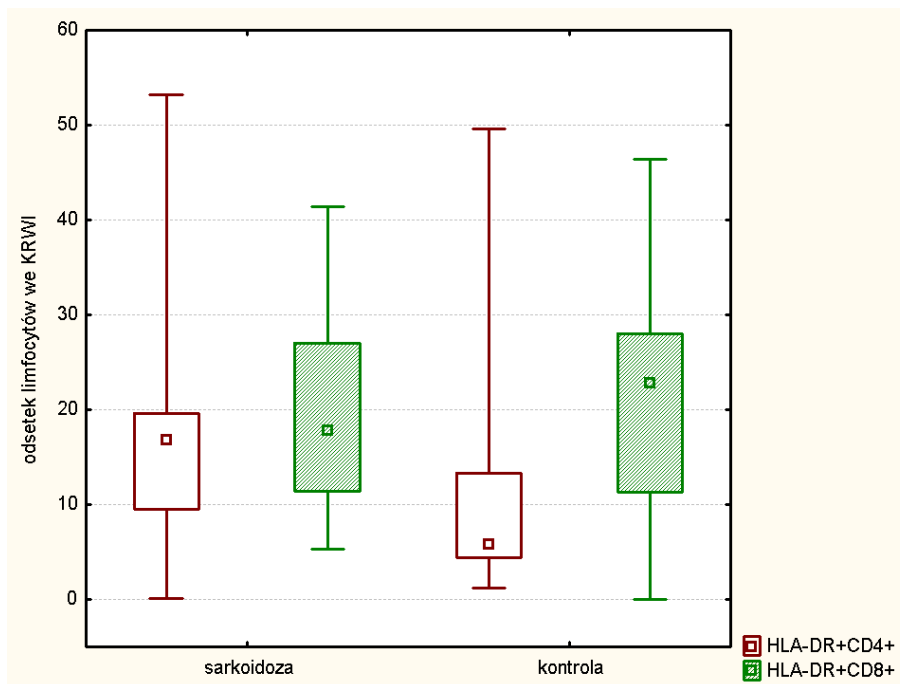
Stwierdzono istotny statystycznie wyższy odsetek limfocytów HLA-DR+CD4+ ($p=0,004$) i niższy odsetek limfocytów HLA-DR+CD8+ ($p=0,007$) w BAL u chorych na sarkoidozę w porównaniu do grupy kontrolnej (wykres 50). Podobnie stwierdzono istotny statystycznie wzrost odsetka limfocytów HLA-DR+CD4+ ($p=0,001$) we krwi u chorych na sarkoidozę w porównaniu do grupy kontrolnej. Jednak nie obserwowano różnic w odsetku limfocytów HLA-DR+CD8+ ($p=0,35$) (wykres 51).

Analogicznie jak poprzednio wyróżniono grupę chorych z rozpoznaniem zespołu Löfgrena. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w odsetku limfocytów HLA-DR+CD4+ ($p=0,80$), ani HLA-DR+CD8+ ($p=0,12$) w BAL (wykres 52). Również biorąc pod uwagę czas trwania choroby w momencie badania nie obserwowano w BAL różnic w odsetku limfocytów HLA-DR+CD4+ , jak i HLA-DR+CD8+ (wykres 53).

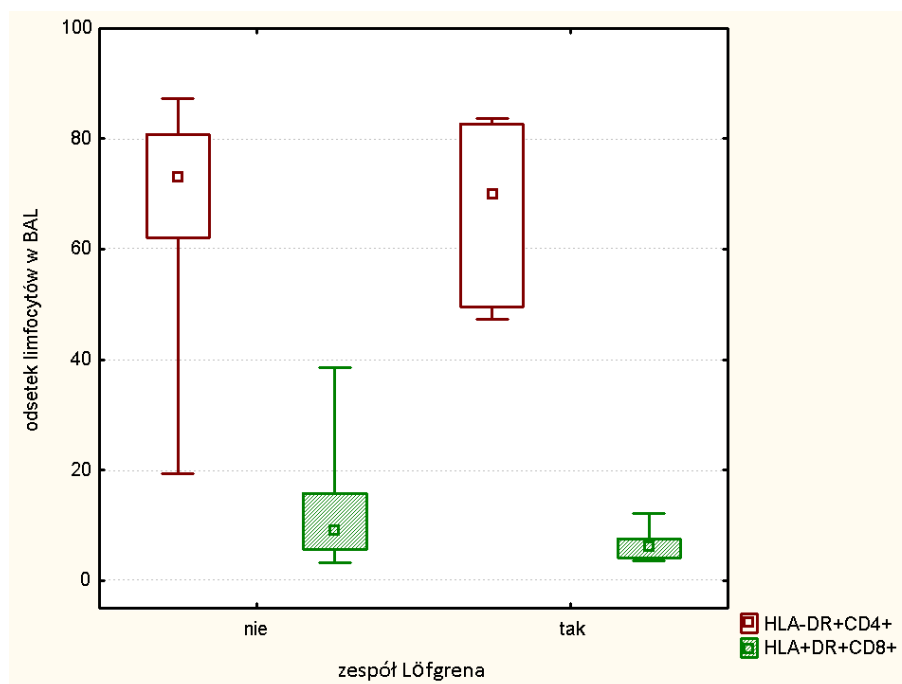
Wykres 50. Odsetek limfocytów HLA-DR+CD4+ i HLA-DR+CD8+ w BAL u chorych na sarkoidozę i w grupie kontrolnej.



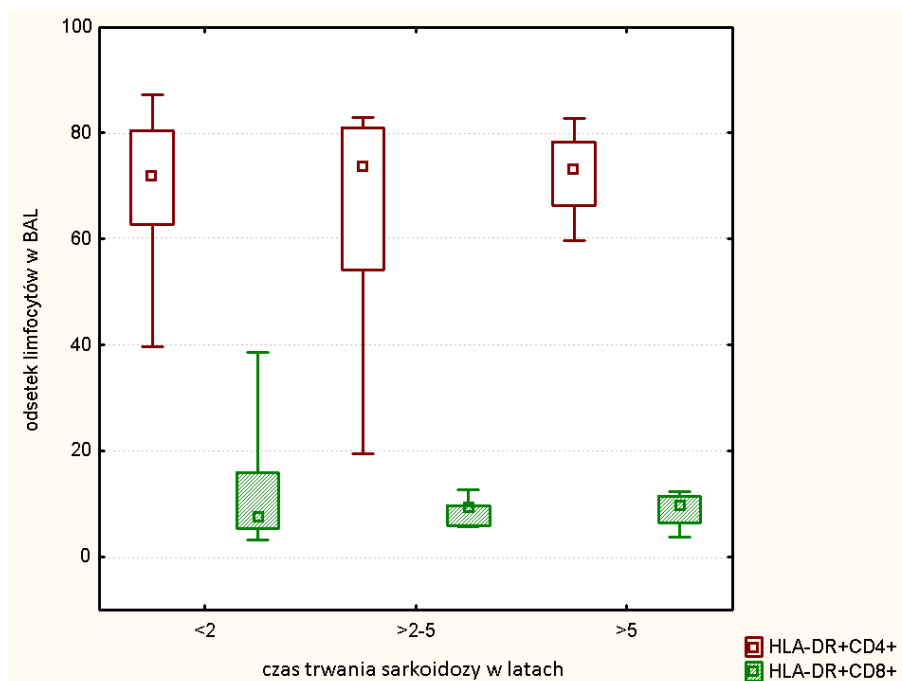
Wykres 51. Odsetek limfocytów HLA-DR+CD4+ i HLA-DR+CD8+ we krwi u chorych na sarkoidozę i w grupie kontrolnej.



Wykres 52. Odsetek limfocytów HLA-DR+CD4+ i HLA-DR+CD8+ w BAL u chorych na sarkoidozę w zależności od rozpoznanego zespołu Löfgrena.



Wykres 53. Odsetek limfocytów HLA-DR+CD4+ i HLA-DR+CD8+ w BAL u chorych na sarkoidozę w zależności od czasu trwania choroby.



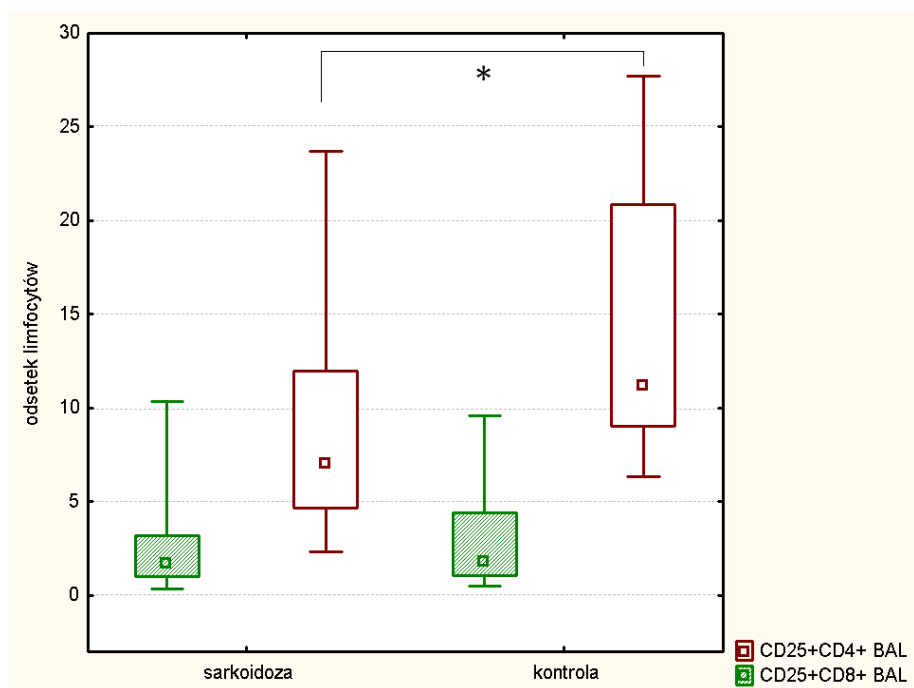
5.4.3 CD25

Stwierdzono istotny statystycznie spadek odsetka limfocytów CD25+CD4+ ($p=0,0028$) w BAL u chorych na sarkoidozę w porównaniu do grupy kontrolnej. Nie obserwowano różnic w odsetku limfocytów CD25+CD8+ ($p=0,36$) (wykres 54). Nie stwierdzono również różnic w odsetku limfocytów CD25+CD4+ ($p=0,33$), ani CD25+CD8+ ($p=0,37$) we krwi obwodowej u chorych na sarkoidozę w porównaniu do grupy kontrolnej (wykres 55).

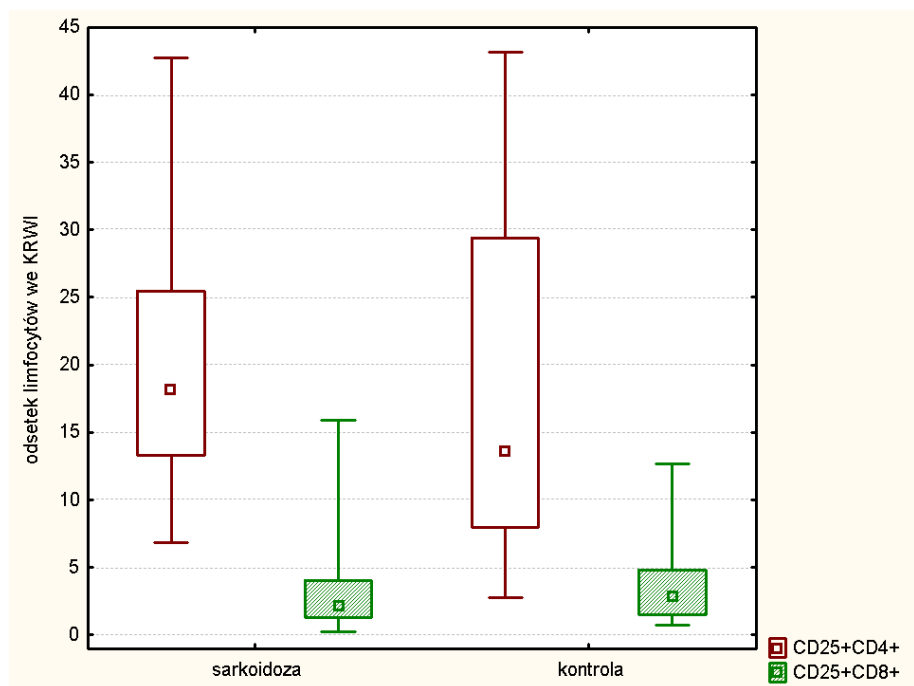
Podobnie jak wcześniej rozważano grupę chorych z aktywną fazą sarkoidozy, odpowiadającą klinicznemu zespołowi Löfgrena. Stwierdzono u tych chorych w BAL istotny statystycznie spadek odsetka limfocytów CD25+CD4+ ($p=0,0005$). Nie obserwowano różnic w odsetku limfocytów CD25+CD8+ ($p=0,36$) (wykres 56). Rozważając czas trwania choroby, nie stwierdzono w BAL różnic w odsetku limfocytów CD25+CD4+, ani CD25+CD8+ (wykres 57).

Natomiast biorąc pod uwagę nasilenie włóknienia, stwierdzone w badaniu TKWR płuc, wykazano istotny statystycznie wzrost odsetka limfocytów CD25+CD4+ ($p=0,04$) w BAL (wykres 58).

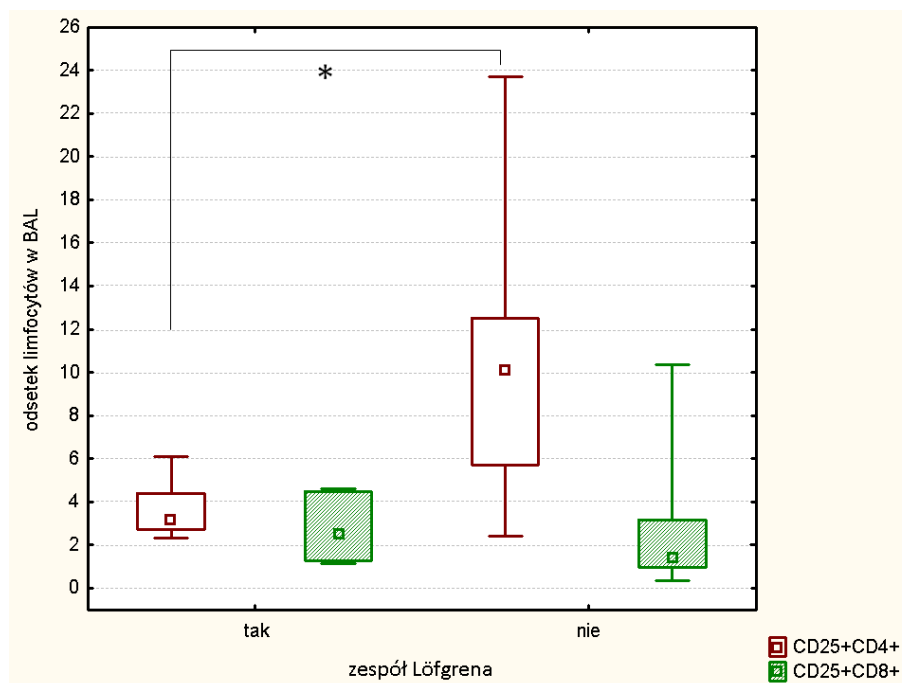
Wykres 54. Odsetek limfocytów CD25+CD4+ i CD25+CD8+ w BAL u chorych na sarkoidozę i w grupie kontrolnej.



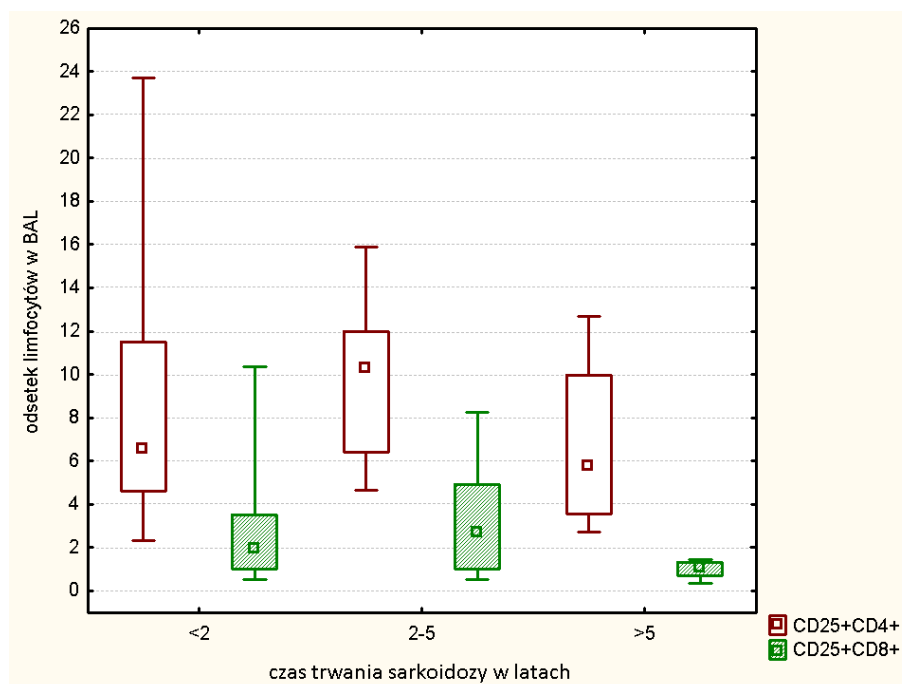
Wykres 55. Odsetek limfocytów CD25+CD4+ i CD25+CD8+ we krwi u chorych na sarkoidozę i w grupie kontrolnej.



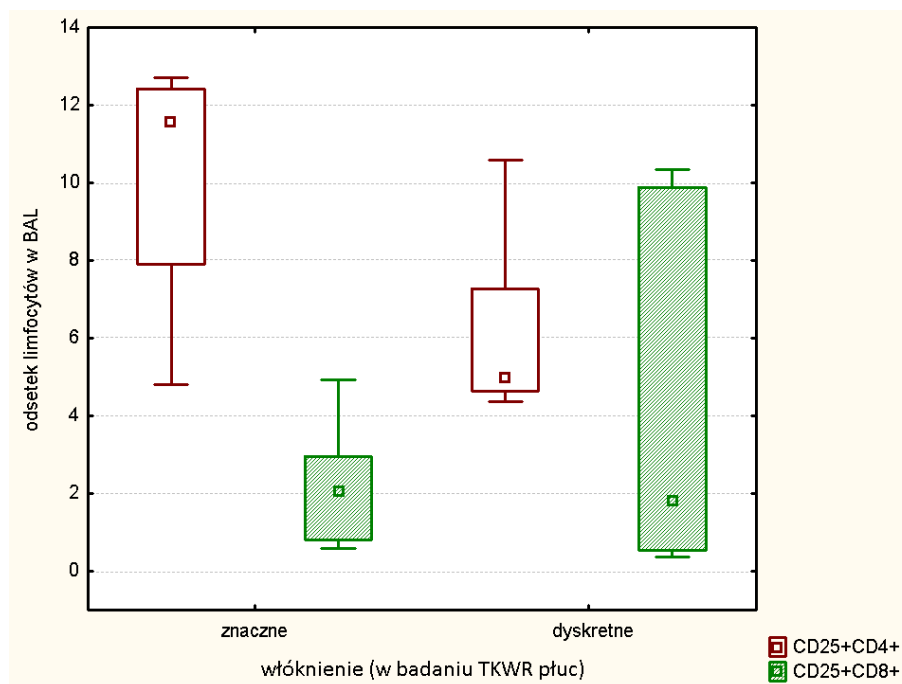
Wykres 56. Odsetek limfocytów CD25+CD4+ i CD25+CD8+ w BAL u chorych na sarkoidozę w zależności od rozpoznanego zespołu Löfgrena.



Wykres 57. Odsetek limfocytów CD25+CD4+ i CD25+CD8+ w BAL u chorych na sarkoidozę w zależności od czasu trwania choroby.



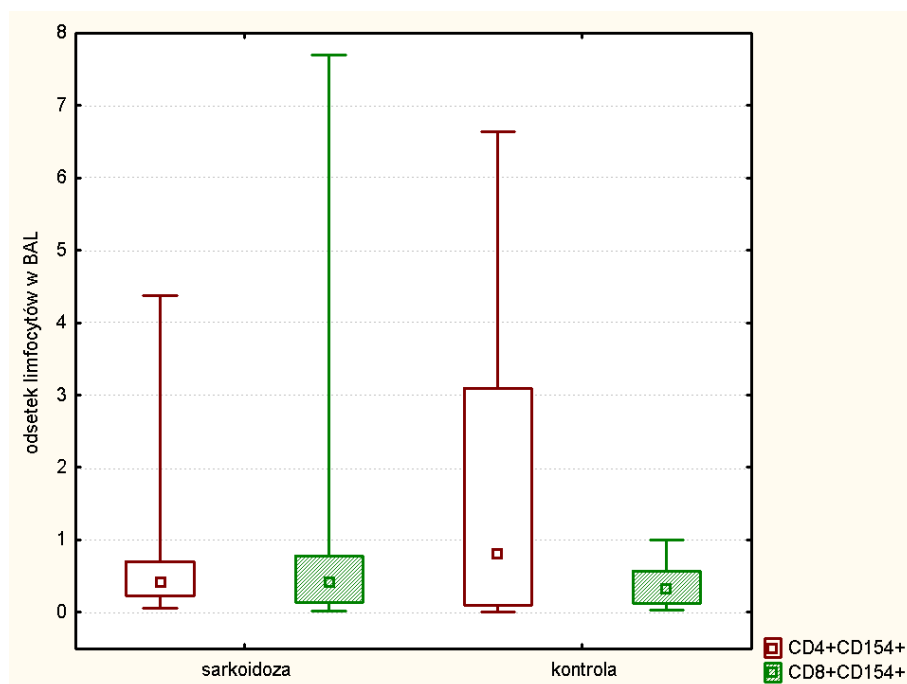
Wykres 58. Odsetek limfocytów CD25+CD4+ i CD25+CD8+ w BAL u chorych na sarkoidozę w zależności od nasilenia włóknienia, stwierdzanego w badaniu TKWR płuc.



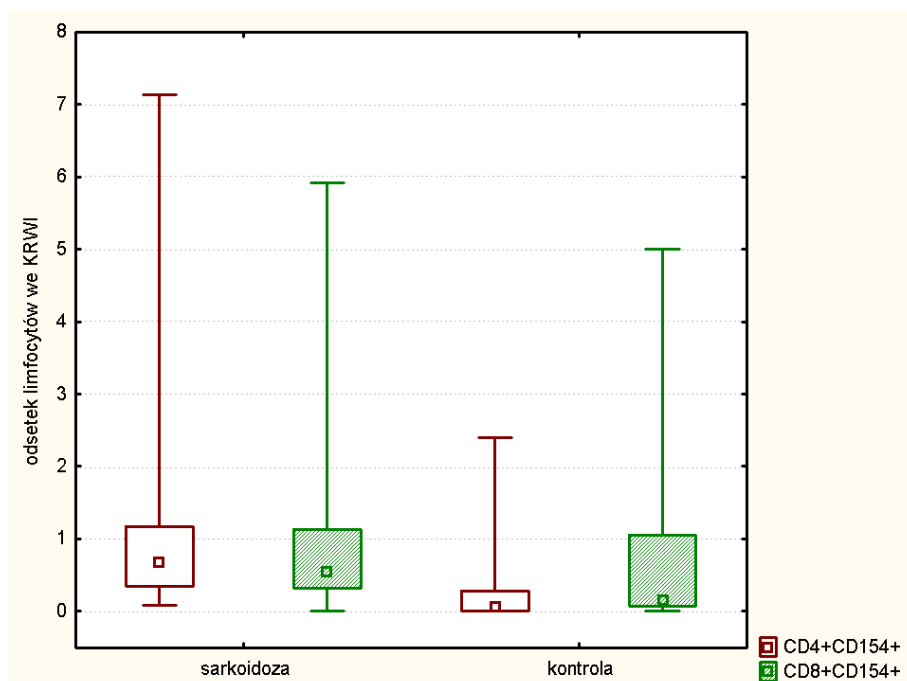
5.4.4 CD154

Nie wykazano istotnych statystycznie różnic w odsetku limfocytów CD154+CD4+ i CD154+CD8+ w BAL, porównując chorych na sarkoidozę i grupę kontrolną (wykres 59). Stwierdzono istotny statystycznie wyższy odsetek limfocytów CD154+CD4+ ($p=0,00002$) i CD154+CD8+ ($p=0,022$) we krwi u chorych na sarkoidozę w porównaniu do grupy kontrolnej (wykres 60). Obserwowano również tendencję wzrostu odsetka limfocytów CD154+CD4+ ($p=0,10$) i CD154+CD8+ ($p=0,09$) we krwi u chorych na sarkoidozę w zależności od nasilenia włóknienia, stwierdzanego w badaniu TKWR płuc (wykres 61).

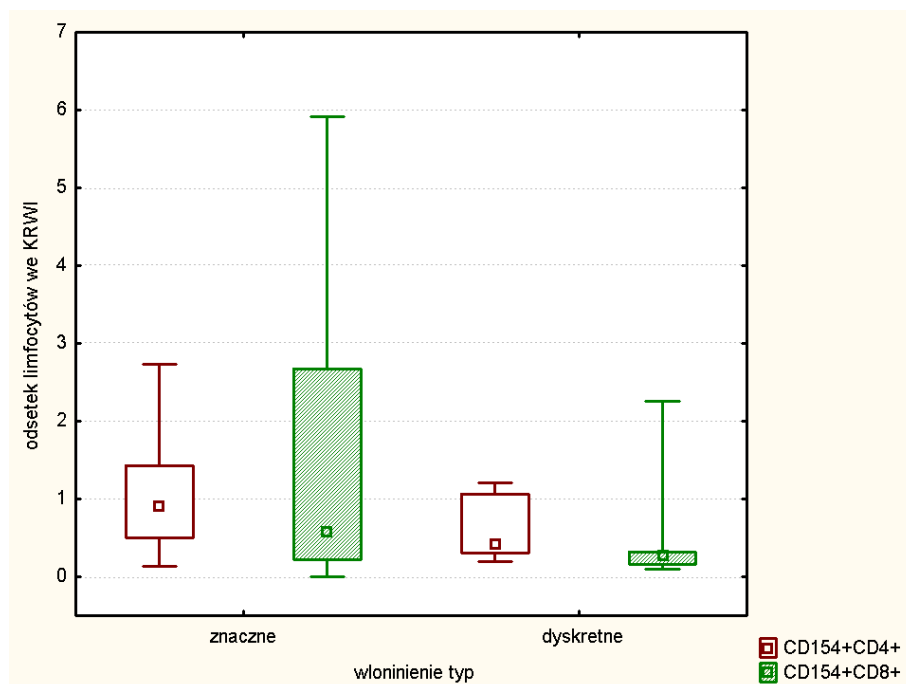
Wykres 59. Odsetek limfocytów CD154+CD4+ i CD154+CD8+ w BAL u chorych na sarkoidozę i w grupie kontrolnej.



Wykres 60. Odsetek limfocytów CD154+CD4+ i CD154+CD8+ we krwi u chorych na sarkoidozę i w grupie kontrolnej.



Wykres 61. Odsetek limfocytów CD154+CD4+ i CD154+CD8+ we krwi u chorych na sarkoidozę w zależności od nasilenia włóknienia, stwierdzonego w badaniu TKWR płuc.



5.5 Podsumowanie wyników

Stwierdzony wyższy odsetek limfocytów CXCR6+CD4+ i CXCR6+CD8+ w BAL w porównaniu do krwi obwodowej, wskazuje na udział tego receptora chemokinowego w procesie migracji limfocytów T do płuc, tzw. lymphocytes lung homing.

Nie wykazano istotnych statystycznie różnic pomiędzy odsetkiem limfocytów CXCR6+CD4+ i CXCR6+CD8+ pomiędzy chorymi na sarkoidozę, a grupą kontrolną, zarówno w BAL, jak i krwi obwodowej. Nie stanowi on zatem markera różnicującego obie grupy. Przemawia to raczej za niespecyficznym charakterem tego receptora chemokinowego.

Wprawdzie niewielka, ale istotna statystycznie różnica w odsetku limfocytów CXCR6+CD4+ we krwi pomiędzy stadium 3-4 sarkoidozy, a stadiami 1,2,3 i grupą kontrolną, może świadczyć o potencjalnym zaangażowaniu receptora CXCR6 w rozwoju włóknienia płuc. Z drugiej jednak strony nie stwierdzono podobnych zależności w odsetku limfocytów CXCR6+CD4+ w BAL, poza stadium 1 i stadium 3 sarkoidozy.

W porównaniu z grupą kontrolną, u chorych na sarkoidozę stwierdzono w BAL wyższy odsetek limfocytów CD4+, niższy odsetek limfocytów CD8+, czego konsekwencją jest wyższy stosunek limfocytów CD4/CD8. Analogiczne zestawienie we krwi obwodowej nie wykazało różnic w odsetku CD4+. Widoczna jest jednak odwrotna zależność w odsetku limfocytów CD8 i stosunku limfocytów CD4 do CD8. Uzyskane wyniki potwierdzają główną rolę limfocytów CD4+ w immunopatologii sarkoidozy.

Rozpatrując chorych na sarkoidozę w kontekście klinicznej aktywności choroby, wyróżniono grupę chorych z rozpoznaniem zespołu Löfgrena. Stwierdzono u tych chorych istotnie statystycznie wyższy odsetek limfocytów CD4+ w BAL i krwi obwodowej, jak również niższy odsetek limfocytów CD8+ i wyższy stosunek CD4 do CD8 w BAL. Biorąc pod uwagę kliniczną progresję sarkoidozy, stwierdzono w BAL spadek odsetka limfocytów CD4+, wzrost odsetka limfocytów CD8+ i wynikający z tego spadek stosunku limfocytów CD4/CD8. Najpewniej ma to związek z obecnością ziarniniaków sarkoidalnych i zaangażowaniem głównie limfocytów CD4+ w ich tworzenie. Stąd obserwowane zmiany w subpopulacji limfocytów CD4+ i CD8+ zarówno w BAL, jak i krwi obwodowej, w zależności od stwierdzonych guzków w badaniu TKWR płuc. Podobna tendencja widoczna jest u chorych z rozwijającym się włóknieniem płuc, ocenianym na podstawie nasilenia zmian

włóknistych w badaniu TKWR płuc. Spodziewanym odzwierciedleniem stwierdzanych zależności są wykazane zmiany w odsetku limfocytów CD4+ i CD8+ i ich stosunku w zależności od stadium sarkoidozy. Wprawdzie podziału dokonuje się na podstawie oceny RTG klatki piersiowej, a nie TKWR płuc, niemniej jednak czułość metody wydaje się być zadowalająca.

U chorych na sarkoidozę w BAL stwierdzono wyższy odsetek limfocytów TCR $\alpha\beta$ CD4+ i TCR $\alpha\beta$ CD8+ w porównaniu z grupą kontrolną. Najpewniej T cell receptor (TCR), zbudowany z łańcuchów α i β , zaangażowany jest w rozpoznawanie potencjalnego czynnika sarkoidalnego. Być może ma to również związek z prezentacją antygenów w węzłach chłonnych.

Również odsetek limfocytów CD45RO+CD4+ i CD45RO+CD8+ jest wyższy u chorych na sarkoidozę w porównaniu do grupy kontrolnej. Ma to z pewnością związek z pamięcią immunologiczną i być może ciągłą stymulacją antygenową. Z drugiej strony interesujący jest obserwowany wzrost odsetka limfocytów CD45RA+CD8+ w BAL i krwi u chorych na sarkoidozę, co może sugerować ich zaangażowanie w zwalczanie potencjalnego czynnika sarkoidalnego.

Kostymulacja poprzez cząsteczkę CD28 wydaje się mieć istotne znaczenie w aktywnej fazie sarkoidozy, odpowiadającej klinicznemu obrazowi zespołu Löfgrena. Stwierdzono u tych chorych w BAL istotny statystycznie wyższy odsetek limfocytów CD28+CD4+ i CD28+CD8+ w porównaniu do chorych na sarkoidozę bez rozpoznania zespołu Löfgrena, jak również w porównaniu do grupy kontrolnej. Zauważyć należy, że nie było istotnych różnic pomiędzy kontrolą, a chorymi bez rozpoznania zespołu Löfgrena. Również ilościowo odsetek omawianych limfocytów w tych grupach badanych, był różny od spodziewanego. Analogiczna analiza krwi obwodowej wykazała istotne statystycznie różnice jedynie w odsetku limfocytów CD28+CD8+. Stwierdzono ich wyższy odsetek u chorych z rozpoznaniem zespołu Löfgrena w porównaniu do pozostałych chorych, bez różnic w porównaniu do grupy kontrolnej. Rozpatrując uzyskane wyniki w kontekście zmian uwidoczniionych w badaniu TKWR płuc, obserwowano tendencję spadku odsetka limfocytów CD28+CD4+ w BAL, w zależności od obecności guzków sarkoidalnych, włóknienia płuc (również w zależności od stopnia nasilenia włóknienia).

Oceniano następujące markery aktywacji limfocytów T: CD69, HLA-DR, CD25 i CD154. Stwierdzono wyższy odsetek limfocytów CD69+CD4+ i CD69+CD8+, zarówno w BAL, jak i krwi obwodowej, u chorych na sarkoidozę w porównaniu do grupy kontrolnej. Nie wykazano różnic w zależności od aktywności klinicznej sarkoidozy (zespół Löfgrena). Analizując czas trwania choroby w

momencie wykonywania badania, zaobserwowano tendencję spadkową w odsetku limfocytów CD69+CD4+ w BAL i utrzymywanie się wysokiego odsetka limfocytów CD69+CD8+ w BAL. Odmienne w zależności od czasu trwania choroby zachowują się limfocyty HLA-DR+CD4+, tj. utrzymuje się ich podwyższony odsetek. W porównaniu z grupą kontrolną, u chorych na sarkoidozę w BAL stwierdzono wyższy odsetek limfocytów HLA-DR+CD4+ i niższy HLA-DR+CD8+. We krwi obwodowej wyższy był jedynie odsetek limfocytów HLA-DR+CD4+. Prawdopodobnie obserwowane zmiany należy rozważać w świetle hipotezy ciągłej stymulacji antygenowej przez potencjalny czynnik sarkoidalny.

Odsetek limfocytów CD25+CD4+ w BAL u chorych na sarkoidozę był istotnie statystycznie niższy niż w grupie kontrolnej. Nie stwierdzono różnic w odsetku limfocytów CD25+CD8+ zarówno w BAL, jak i krwi, jak również dla CD25+CD4+ we krwi. Przypuszczalnie na subpopulację limfocytów CD25+CD4+ należy patrzeć w kontekście ich funkcji regulatorowych, a nie aktywacji limfocytów. Zastanawia ich rola w zespole Löfgrena, jak również w rozwijającym się włóknieniu płuc. W niniejszej pracy doktorskiej stwierdzono istotnie statystycznie niski odsetek limfocytów CD25+CD4+ w BAL u chorych z zespołem Löfgrena w porównaniu do pozostałych chorych. Natomiast w porównaniu nasilonego włóknienia płuc do zmian dyskretnych, opisywanych w badaniu TKWR płuc, stwierdzono w BAL ich zwiększony odsetek.

Ze względu na niskie odsetki limfocytów CD154+CD4+ i CD154+CD8+ w BAL i krwi obwodowej, zarówno u chorych na sarkoidozę, jak i w grupie kontrolnej, obserwowane różnice wydają się nie mieć istotnego znaczenia klinicznego. Stwierdzono wzrost ich odsetka we krwi obwodowej u chorych na sarkoidozę w porównaniu do grupy kontrolnej, jak również tendencję wzrostu w zależności od nasilenia włóknienia.

6. Dyskusja

Popłuczyny oskrzelowo-pęcherzykowe (BAL) od ponad 35 lat stanowią użyteczną metodę diagnostyczną, wykorzystywaną szeroko w pneumonologii. Pierwsza konferencja poświęcona BAL odbyła się we Francji w 1976 roku. Przez kolejne lata próbowano kwestionować wiarygodność BAL, szukać i zastępować go lepszymi technikami. Między innymi płwocina indukowana, jako metoda prostsza i mniej inwazyjna wydawała się spełniać te oczekiwania [65]. Jednak należy pamiętać o odmiennym pochodzeniu komórek, które pozyskujemy tymi różnymi technikami. BAL dostarcza informacji z obwodowych dróg oddechowych i pośrednio świadczy o stanie śródmiąższu płuc. Znaczenie BAL wydaje się niepodważalne i niezwykle pomocne jako uzupełnienie diagnostyki, szczególnie w śródmiąższowych chorobach płuc [18,24,25,26,57,68,95,103,104].

Podstawowe założenia techniki wykonywania BAL nie uległy zasadniczym zmianom. Brak jest jednak zasad standaryzacji, co utrudnia porównywanie wyników [18,63]. Różni autorzy wykorzystują do badań różne objętości soli fizjologicznej, tj. 100ml [20,21,98], 120ml [5,65,98,104], 150ml [32,33,45], 200ml [24,26,32,33,41,42,91], 240ml [45], 250ml [93], 300ml [103]. W niniejszej pracy doktorskiej zastosowano, obowiązującą w Klinice Pneumonologii GUMed, procedurę z użyciem 120 ml soli fizjologicznej. Zatem spojrzenie od strony samej techniki wykonywania BAL może wpłynąć na osąd porównywanych wyników różnych badaczy.

W wielu pracach zwraca uwagę trudności w rekrutacji idealnej grupy kontrolnej. Czasami badania na dużej grupie chorych na sarkoidozę prezentowane są bez odniesienia do grupy kontrolnej [20,45]. Niekiedy są to bardzo małe grupy zdrowych ochotników [27,56] lub niezgodne pod względem wieku i płci [42]. Nierzadko grupę kontrolną stanowią osoby, u których nie stwierdzono żadnych chorób płuc, a bronchofiberoskopia była elementem diagnostyki [103]. Głównie są to chorzy diagnozowani z powodu przewlekłego kaszlu [3,32,33]. Często grupę kontrolną stanowią chorzy z innymi chorobami płuc [98], w tym również z innymi śródmiąższowymi chorobami płuc [91]. W niniejszej pracy doktorskiej grupę kontrolną stanowiły osoby diagnozowane z powodu przewlekłego kaszlu, u których nie stwierdzono choroby płuc [58].

Kolejny punkt sporny stanowi różne podejście do oceny aktywności choroby [7]. Jedynie chorzy z zespołem Löfgrena nie budzą wątpliwości i zgodnie przez wszystkich badaczy klasyfikowani są jako aktywna faza sarkoidozy [20,21,29,42,103]. Charakterystyczny obraz zespołu Löfgrena pozwala, zgodnie z

wytycznymi, na odstępianie od potwierdzenia rozpoznania sarkoidozy badaniem histopatologicznym [95]. Bezwzględnie jednak obowiązuje wykluczenie innych znanych przyczyn występowania zespołu Löfgrena [63,86,95,96]. Trudna jest również ocena progresji choroby [7]. Konieczna jest obserwacja chorych i monitorowanie zarówno nasilenia objawów klinicznych, radiologicznych i zaburzeń w badaniach czynnościowych płuc. Informacje z wszystkich tych obszarów pozwalają na ustosunkowanie się do postępu choroby, czego konsekwencją jest decyzja o włączeniu lub zmianie stosowanego leczenia. Niekiedy stwierdza się jedynie progresję w badaniach radiologicznych, bądź czynnościowych płuc. Nierzadko zgłaszane przez chorego objawy kliniczne mają związek z innymi współistniejącymi chorobami [7,63,86,95,96].

Również ocena stadium sarkoidozy może podlegać dyskusji. Problem wiąże się z zastosowaniem badania tomografii komputerowej wysokiej rozdzielczości (TKWR), w której widać znacznie więcej zmian niż w klasycznym zdjęciu RTG klatki piersiowej [28]. Brytyjskie wytyczne chorób śródmiąższowych płuc wskazują na RTG przeglądowe klatki piersiowej jako badanie podstawowe. Badanie TKWR płuc należy rozważyć dopiero jako kolejny krok postępowania diagnostycznego [95]. Rodzi się pytanie o zasadność ewentualnej zmiany klasyfikacji stadium sarkoidozy w oparciu o badanie TKWR płuc. Wielokrotnie praktyka kliniczna wymaga tego badania dla pełnej oceny stanu chorych i podjęcia decyzji odnośnie dalszego postępowania diagnostyczno-terapeutycznego, m.in. oceny progresji radiologicznej choroby. Niemniej jednak dla rutynowej diagnostyki i monitorowania chorych RTG klatki piersiowej pozostaje badaniem podstawowym [63,64,86,95,96]. Ważny jest tu również aspekt finansowy, dostępność badań i dawka promieniowania jonizującego. Zaznaczyć należy, że w niniejszej pracy doktorskiej nie było chorych w stadium 4 sarkoidozy. Wiąże się ono ze znacznie zaawansowanymi zmianami w płucach pod postacią nasilonego włóknienia. W analizie wyróżniono grupę chorych w stadium 3-4, tj. ze zmianami bardziej zaawansowanymi niż stadium 3, ale bez dokonanych całkowitych zmian destrukcyjnych w płucach. Niektórzy mogą tę grupę traktować jako stadium 3 sarkoidozy inni jako stadium 4. Podobnego podziału dokonali autorzy innych prac [16,20].

Głównym celem niniejszej pracy doktorskiej była ocena ekspresji CXCR6 na limfocytach T CD4+ i CD8+ w BAL i krwi obwodowej u chorych na sarkoidozę w porównaniu do grupy kontrolnej. CXCR6 jest receptorem chemokinowym łączącym się ze swoistym ligandem CXCL16, obecnym na makrofagach i komórkach dendrytycznych [3,32,82]. Potwierdzono ekspresję CXCL16 na komórkach jąder

ziarniniaków sarkoidalnych i naciek limfocytów T CXCR6+ w ich otoczeniu [3]. Stwierdzono obecność CXCL16 na makrofagach pęcherzyków płucnych, jak również formę rozpuszczalną w supernatancie z popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych [56]. CXCL16 odpowiada za migrację i aktywację limfocytów T. Bierze udział w zwalczaniu mikroorganizmów, m.in. bakterii Gram ujemnych i Gram dodatnich. Wykazano doświadczalnie zahamowanie fagocytozy bakterii przez komórki prezentujące antygen (komórki dendrytyczne) poprzez blokowanie CXCL16 [82].

Jedna z hipotez na temat czynnika etiologicznego w sarkoidozie zakłada obecność nieznanego antygenu, tzw. czynnika sarkoidalnego, który drogą wziewną dostaje się do płuc i poprzez komórki prezentujące antygen inicjuje kaskadę odpowiedzi immunologicznej [40,50,52]. Chemotaksja, warunkująca napływ limfocytów do płuc, zależna jest od obecności na nich receptorów chemokinowych. Wykazano zwiększony odsetek limfocytów T CXCR6+CD3+ w BAL w porównaniu z krwią obwodową u chorych na sarkoidozę [56]. W pracy tej porównywano ekspresję 14 receptorów chemokinowych u chorych z sarkoidozą (n=15), astmą (n=7), różnymi innymi niż sarkoidoza chorobami śródmiąższowymi płuc (n=8) i zdrowymi ochotnikami (n=8) [56].

Wyniki niniejszej pracy doktorskiej również potwierdzają wyższy odsetek limfocytów T CXCR6+ w BAL w porównaniu do krwi obwodowej. U chorych na sarkoidozę zarówno odsetek limfocytów CXCR6+CD4+, jak i CXCR6+CD8+ był istotnie statystycznie wyższy w BAL w stosunku do krwi. Podobne zależności obserwowano w grupie kontrolnej. Nie wykazano jednak istotnych statystycznie różnic w odsetku limfocytów T CXCR6+ pomiędzy chorymi na sarkoidozę, a grupą kontrolną. W przeciwieństwie do autorów wspomnianej pracy, którzy stwierdzili różnice pomiędzy odsetkiem limfocytów CXCR6+CD3+ w BAL u chorych na sarkoidozę i astmę, jak również w porównaniu ze zdrowymi ochotnikami. Nie wykazano natomiast różnic w porównaniu do grupy innych chorób śródmiąższowych [56]. Tłumaczyć to można m.in. udziałem w badaniu zdrowych ochotników. W niniejszej pracy doktorskiej grupę kontrolną rekrutowano z osób diagnozowanych z powodu przewlekłego kaszlu. Natomiast odmienność astmy wynika prawdopodobnie z innego profilu odpowiedzi immunologicznej (Th2 zależnej) [69]. Warto zaznaczyć, że określone receptory chemokinowe wiąże się właśnie z konkretnym profilem odpowiedzi immunologicznej [17,40]. Dla odpowiedzi Th1 charakterystyczne są receptory CCR5 i CXCR3, podczas gdy Th2 wiąże się z CCR3, CCR4, CCR8, a Th17 z CCR6, choć stwierdza się również inne receptory

chemokinowe, m.in. CXCR6 [17,40,46,47]. Autorzy wspomnianej pracy również stwierdzili zwiększony odsetek limfocytów T z innymi receptorami chemokinowymi (CCR5, CCR6, CXCR3) w BAL w porównaniu z krwią obwodową u chorych na sarkoidozę, choć szczególnie podkreślili znaczenie CXCR6 [56].

Sarkoidoza określana jest mianem odpowiedzi Th1 zależnej [16,32,40,63,64,86,96,101,104] i Th17 zależnej [16,33]. Wykazano naciek limfocytów T (IL-17)+/CD4+ w otoczeniu jąder ziarniaków sarkoidalnych [33]. Autorzy przypisują im znaczenie dla nawrotów sarkoidozy i progresji choroby. Wskazują na udział receptora CCR6 i jego ligandu CCL20 w rekrutacji limfocytów T do płuc [33]. Potwierdzono naciek limfocytów CCR6+ wokół jąder ziarniaków sarkoidalnych i obecność jego ligandu CCL20 na komórkach prezentujących antygen [32].

Podkreśla się znaczenie koekspresji receptorów chemokinowych CCR6, CXCR3 i CXCR6 na limfocytach T w BAL u chorych na sarkoidozę [3,32,40,56]. Stąd wydaje się, że proces chemotaksji limfocytów T do płuc jest złożony i zależy od kilku chemokin i różnych receptorów chemokinowych [2,16,1732,33,40,82]. Pytanie, który ma najistotniejsze znaczenie pozostaje otwarte. Odpowiedź na nie dałaby możliwość działania terapeutycznego, poprzez blokowanie konkretnego szlaku [104].

Poszukiwane jest potencjalne miejsce uderzenia terapii celowanej w sarkoidozie. Receptory chemokinowe wydają się mieć szczególne znaczenie, zwłaszcza w kontekście obecnego zaangażowania przemysłu farmaceutycznego. Trwają prace nad nowymi lekami do zwalczania zakażenia wirusem HIV, czy prewencji odrzucania przeszczepów narządowych. Dotychczasowe leki ingerowały głównie w strukturę wirusa. Nowe podejście przenosi ciężar na komórki infekowane. Blokując koreceptory, umożliwiające wniknięcie wirusa, zapobiega się możliwości jego działania [35,48].

CXCR6 został odkryty jako koreceptor, umożliwiający zakażenie komórek przez wirus HIV [23]. Jednak główne znaczenie przypisuje się receptorowi CCR5, którego mutacje genetyczne, warunkujące budowę receptora, a co za tym idzie brak jego ekspresji na powierzchni komórek, skutkują opornością limfocytów T CD4+ na zakażenie wirusem HIV [12,35]. Receptor chemokinowy CCR5 również stanowił przedmiot zainteresowania badaczy u chorych na sarkoidozę [16].

Stwierdzono spadek odsetka limfocytów T CCR5+ w BAL u pacjentów od 1 do 3 stadium sarkoidozy, przy założeniu, że stadium 3 obejmowało również pacjentów w stadium 4 [16]. Przedstawia się to odmiennie w stosunku do wyników

niniejszej pracy doktorskiej. Przeprowadzone badania nie wykazały istotnych statystycznie różnic w odsetku limfocytów CXCR6+CD4+ w BAL, poza porównaniem stadium 1 i 3 sarkoidozy. Natomiast we krwi obwodowej stwierdzono wprawdzie niewielkie, ale istotne różnice w odsetku CXCR6+CD4+ pomiędzy stadium 3-4, a stadiami 1,2,3 i grupą kontrolną. Obserwowana jest dyskretna tendencja wzrostowa. Być może różnice w ekspresji receptorów chemokinowych (CXCR6 i CCR5) w zależności od stadium sarkoidozy wiążą się z ich różnym znaczeniem immunologicznym, którego dotychczas nie poznaliśmy; przewagą odpowiedzi Th1 lub Th17 zależnej.

Autorzy przytaczanej pracy sugerują, że zmniejszający się odsetek limfocytów T CCR5+ w BAL może mieć związek z progresją choroby i postępującym włóknieniem płuc [16]. Popierają hipotezę zmiany profilu odpowiedzi immunologicznej z Th1 na Th2, która jest charakterystyczna m.in. dla samoistnego włóknienia płuc [2,16,64,91].

W sprzeczności z tą teorią pozostają ostatnie wyniki badań genetycznych za pomocą mikromacierzy w grupie chorych z progresją sarkoidozy i włóknieniem płuc w porównaniu do grupy ze stabilizacją i remisją choroby (bez włóknienia płuc) [52,68]. Znalezione 334 geny odpowiedzialne za aktywację i proliferację, różniące się ekspresją pomiędzy badanymi grupami. Interesującym jest fakt, że wzór genów przypominał raczej chorych z włóknieniem w przebiegu alergicznego zapalenia pęcherzyków płucnych niż chorych z samoistnym włóknieniem płuc. Alergiczne zapalenie pęcherzyków płucnych charakteryzuje się, podobnie jak sarkoidoza, wysoką limfocytozą w BAL, ale niskim stosunkiem CD4/CD8. Rodzi się pytanie, czy zawsze w sarkoidozie mamy wysoką limfocytozę i wysoki stosunek CD4/CD8. Należy się również zastanowić nad stanem aktywacji limfocytów T.

Podkreślenia wymaga także fakt, że obserwowane zmiany genetyczne o profilu przypominającym alergiczne zapalenie pęcherzyków płucnych były wykrywane jedynie u pacjentów z progresją sarkoidozy i włóknieniem płuc [52]. Według autorów stanowi to silny argument na poparcie hipotezy o przewlekłej stymulacji tych pacjentów potencjalnym czynnikiem sarkoidalnym. Wiążą to również z przetrwałą odpowiedzią limfocytów T i ich aktywacją, a nie z charakterystycznym dla samoistnego włóknienia płuc potencjałem fibrotycznym [52]. W tym kontekście rozważania na temat mechanizmów utrzymujących limfocyty w miejscu wytworzonych ziarnin sarkoidalnych są jak najbardziej zasadne. Rola receptorów chemokinowych i omawianego tu CXCR6, jako jednego z czynników chemotaktycznych i aktywujących limfocyty wymaga dalszych badań.

Spojrzenie na włóknienie płuc w sarkoidozie poprzez pryzmat alergicznego zapalenia pęcherzyków płucnych, mogłoby stworzyć szanse na zapobieganie jego rozwojowi, a nie jak w samoistnym włóknieniu płuc skazywać na niepowodzenie terapeutyczne [66]. Stąd tak ważne jest znalezienie markera, który wskazywałby chorych zagrożonych włóknieniem płuc i odróżnił od pacjentów osiągających samoistną remisję.

Również ocena poprzez praktykę kliniczną skłania ku omawianej teorii. Glikokortykosteroidy są podstawą leczenia chorych na sarkoidozę już od lat sześćdziesiątych ubiegłego wieku. Ich duże dawki działają immunosupresyjnie, a mniejsze przeciwzapalnie [6,7,57,95]. Po zaprzestaniu glikokortykoterapii do nawrotu sarkoidozy dochodzić może nawet u ok. 50%-70% chorych [95].

W niniejszej pracy doktorskiej nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w ekspresji CXCR6 w zależności od obserwowanych zmian w TKWR płuc, badań czynnościowych płuc, aktywności choroby, czasu trwania choroby. Być może należałoby to tłumaczyć faktem, że szlak CXCL16-CXCR6 nie jest specyficzny dla sarkoidozy [56]. Jest tylko jednym z wielu elementów odpowiedzi Th1 i Th17 zależnej [3,32,33,56]. Podobne badania prowadzone są w innych chorobach np. reumatoidalnym zapaleniu stawów [60], wirusowych zapaleniach wątroby [10].

Wytyczne podkreślają dużą rolę BAL dla rozpoznania sarkoidozy. Wielokrotnie, choć nie zawsze, obserwuje się zwiększoną limfocytozę w BAL i zwiększony stosunek CD4/CD8 [57,95]. Jak już wspomniano, podwyższony odsetek limfocytów stwierdza się również w alergicznym zapaleniu pęcherzyków płucnych, ale tu stosunek CD4/CD8 jest niski [63,86,95]. W świetle omawianej teorii włóknienia płuc w sarkoidozie i jej analogii z alergicznym zapaleniem pęcherzyków płucnych [52] warto się zastanowić, czy w progresji sarkoidozy i włóknieniu nie dochodzi do zmian w obrębie subpopulacji limfocytów CD4+ i CD8+.

Badania, porównujące 221 chorych na sarkoidozę w stadium od 1 do 3, świadczą o spadku odsetka limfocytów CD4+ w BAL i wzroście CD8+, czego konsekwencją jest zmniejszenie się stosunku CD4/CD8 [20]. W analizowanej grupie nie było chorych w 4 stadium sarkoidozy, nie było również grupy kontrolnej, z którą porównano by uzyskane wyniki [20]. Inni badacze na mniejszej grupie chorych (n=30) z grupą kontrolną (n=18) również opisują omawiane zależności [16]. W obu przytoczonych badaniach nie wykonywano jednak równoległej analizy we krwi obwodowej. W niniejszej rozprawie doktorskiej potwierdzono trend obserwowanych zależności. Nie stwierdzono w BAL różnic między stadium 3 a 3-4, jak i 3 a grupą kontrolną, 3-4 a grupą kontrolną. Podobnie jak wcześniej przy omawianiu różnic w

ekspresji CXCR6, należałoby to tłumaczyć umowną granicą pomiędzy różnianymi stadiami 3 i 3-4. Również autorzy przytoczonej pracy nie stwierdzili różnic w odsetku limfocytów CD4+, ani stosunku CD4/CD8 w BAL w porównaniu stadium 3 do grupy kontrolnej [16]. Być może ze względu na małą grupę badanych, kwalifikowali oni do stadium 3 również chorych, opisanych na podstawie TKWR płuc jako 3-4 [16]. Podkreślić należy, że w niniejszej pracy doktorskiej podobne zależności jak w BAL, choć z udziałem mniejszego odsetka limfocytów CD4+, a większego odsetka limfocytów CD8+ obserwowano również we krwi obwodowej.

Stwierdzono także, że u chorych z progresją kliniczną, w porównaniu do osób bez progresji klinicznej, jest zauważalny w BAL spadek odsetka limfocytów CD4+, wzrost odsetka limfocytów CD8+, a co za tym idzie spadek stosunku CD4/CD8. Definicja progresji klinicznej może budzić wątpliwości [7]. Mniej zastrzeżeń wiąże się z badaniem TKWR płuc, w którym stwierdza się charakterystyczne zmiany dla sarkoidozy [63,64,86]. Wytyczne podkreślają ogromne znaczenie doświadczenia radiologów [95]. Próby obiektywizacji badania wypadają korzystnie [28].

Biorąc pod uwagę rozwój włóknienia płuc jako ewidentny wykładnik progresji sarkoidozy, stwierdzono na granicy istotności statystycznej w BAL spadek odsetka limfocytów CD4+, wzrost odsetka limfocytów CD8+ i istotny statystycznie spadek stosunku limfocytów CD4/CD8. Analiza subpopulacji limfocytów CD4+ i CD8+ we krwi w porównaniu włóknienia dyskretnego i znacznego ujawniła analogiczne do BAL zależności istotne statystycznie. Podejmując próbę wyjaśnienia obserwowanych zmian, warto przytoczyć powyżej wspomnianą już hipotezę, w której tzw. czynnik sarkoidalny na drodze wziewnej dostaje się do płuc i jest przetwarzany przez komórki prezentujące antygen w jądrach ziarniników sarkoidalnych [50,52]. Powoduje to inicjację odpowiedzi immunologicznej. Napływają limfocyty T, dochodzi do ich aktywacji i proliferacji. Przetrwała być może stymulacja antygenowa, nie pozwala na „wygaszenie” miejscowej reakcji zapalnej. Konsekwencją jest utrzymywanie się zmian sarkoidalnych, co odpowiada ziarniniakom sarkoidalnym. Kolejny krok w zaburzonej regulacji immunologicznej to rozwój włóknienia. Zadać można pytanie, czy włóknienie jest procesem „gojenia”, czy raczej wyrazem destrukcji. Dla tak sformułowanej hipotezy ważna jest ocena, czy obserwowane zmiany w odsetku subpopulacji limfocytów CD4+ i CD8+ widoczne są również w porównaniu chorych w zależności od obecności guzków sarkoidalnych. Odpowiadają one ziarniniakom sarkoidalnym, tj. hipotetycznemu miejscu prezentacji czynnika sarkoidalnego układowi immunologicznemu.

Wyniki niniejszej pracy doktorskiej potwierdzają istotny statystycznie spadek odsetka limfocytów CD4+, wzrost odsetka limfocytów CD8+ i spadek stosunku CD4/CD8 zarówno w BAL, jak i krwi obwodowej u chorych ze stwierdzonymi guzkami sarkoidalnymi w badaniu TKWR płuc, w porównaniu do chorych bez guzków. W myśl wspomnianej hipotezy limfocyty CD4+ gromadzą się w ziarniniakach sarkoidalnych [3,50,52,56], stąd ich spadek w BAL i krwi obwodowej. Przy czym we krwi obwodowej jest ich porównywalnie mniej, bo „zgromadziły” się w płucach (BAL i ziarniniaki sarkoidalne) [104]. Naturalnym następstwem jest odsetkowo widoczny wzrost limfocytów CD8+ i zmiana stosunku CD4/CD8.

Zakładając prawidłowość tak sformułowanego toku rozumowania, należałoby się spodziewać u chorych bez zmian guzkowych, tj. na samym początku choroby, wysokiego odsetka limfocytów CD4+ w BAL, niskiego CD8+ i wysokiego stosunku CD4/CD8. Z klinicznego punktu widzenia najwcześniejszą obserwowaną fazą sarkoidozy, która zarazem zgodnie przez wszystkich badaczy traktowana jest jako aktywna sarkoidoza, jest zespół Löfgrena [20,21,42,103]. Wyniki innych badań wskazują, że istotnie w zespole Löfgrena jest wysoki stosunek CD4/CD8 w BAL na skutek zwiększonego odsetka limfocytów CD4+ [95]. Badania w niniejszej pracy doktorskiej pozostają zgodne.

Nie obserwowano istotnych statystycznie różnic w subpopulacjach limfocytów T CD4+ i CD8+ w zależności od stwierdzonych powiększonych węzłów chłonny. Tłumaczyć to można faktem, że powiększone węzły chłonne nie są charakterystyczne tylko dla zespołu Löfgrena, ale mogą być również obserwowane w stadium 2, a badanie TKWR płuc pozwala wykazać ich nieznaczne powiększenie nawet u chorych z bardzo zaawansowaną chorobą. Być może ma to związek z włóknieniem i przebudową węzłów. Również nie obserwowano istotnych statystycznie zależności, biorąc pod uwagę „matową szybę”, stwierdzaną w badaniu TKWR płuc i traktowaną jako wyraz aktywności choroby. Nierzadko niewielkie obszary matowej szyby są wykrywane w badaniu TKWR płuc i mogą mieć związek z włóknieniem [66].

Podsumowując zagadnienie limfocytów CD4+ i CD8+ należy za wytycznymi podkreślić znaczenie stosunku CD4/CD8 w BAL dla rozpoznania sarkoidozy [95]. W niniejszej pracy doktorskiej wykazano jego istotne statystycznie różnice w zależności od stadium zaawansowania sarkoidozy podobnie jak inni autorzy [16,20]. Próby ustalenia charakterystycznego dla sarkoidozy stosunku CD4/CD8 [2,63,86,98] są niekiedy kwestionowane [45]. Niektórzy badacze uzależniają go od objawów i stosowanego leczenia [21,68]. Konieczne wydaje się branie pod uwagę

zmian zachodzących w zależności od stadium choroby. Przekłada się to na obserwowane cechy kliniczne i radiologiczne, m.in. zespół Löfgrena, zmiany w TKWR płuc. Subpopulacje limfocytów CD4+ i CD8+ odgrywają niewątpliwie olbrzymią rolę w immunopatologii sarkoidozy, co odzwierciedlają istotne statystycznie różnice w ich odsetku w BAL między chorymi, a grupą kontrolną.

Punkt wyjścia dla rozważania znaczenia subpopulacji limfocytów TCR $\alpha\beta$ i TCR $\gamma\delta$ u chorych na sarkoidozę może stanowić praca na temat roli limfocytów T CD4+ w sarkoidozie, w której autorzy omawiają m.in. swoje dotychczasowe badania na temat TCR [38]. Również są zwolennikami hipotezy, w której nieznany czynnik sarkoidalny jest rozpoznawany przez limfocyty T, co inicjuje ich aktywację i proliferację. Odbywa się to za pośrednictwem receptora TCR $\alpha\beta$, którego oligoklonalność wykazali u chorych na sarkoidozę [38]. Zagadnienie omawiają również inni badacze [2,40,50].

W prezentowanej rozprawie doktorskiej stwierdzono istotny statystycznie wzrost odsetka limfocytów TCR $\alpha\beta$, zarówno CD4+, jak i CD8+, przy jednoczesnym spadku limfocytów TCR $\gamma\delta$ w BAL u chorych na sarkoidozę w porównaniu do grupy kontrolnej. Nie obserwowano takich zależności we krwi obwodowej. Śmiała hipoteza, wiążąca zwiększony odsetek limfocytów TCR $\alpha\beta$ CD4+ i TCR $\alpha\beta$ CD8+ ze stwierdzonymi w badaniu TKWR płuc powiększonymi węzłami chłonnymi, nie ma jednoznacznego poparcia w parametrach statystycznych. Niemniej jednak pozwala na budowanie podstaw teoretycznych. Limfocyty po rozpoznaniu antygeny, ulegają aktywacji i proliferacji. Pobudzony zostaje układ chłonny, czego wykładnikiem są powiększone węzły chłonne. Istotne znaczenie odgrywają tu limfocyty dziewicze, preferujące krążenie pomiędzy narządami limfatycznymi i limfocyty pamięci, krążące głównie pomiędzy narządami nielimfatycznymi [37]. W świetle badań nad komórkami dendrytycznymi, które przenoszą i prezentują antygen (potencjalny czynnik sarkoidalny) do okolicznych węzłów chłonnych, gdzie stymulują limfocyty T dziewicze [87], kierunek rozważań wydaje się słuszny. W niniejszej pracy doktorskiej zaobserwowano tendencję do wzrostu odsetka limfocytów TCR $\alpha\beta$ CD8+ i CD45RA+CD8+ w BAL u chorych ze stwierdzonymi w badaniu TKWR płuc powiększonymi węzłami chłonnymi. Obserwacja ta jest zgodna z prezentowaną teorią o różnicowaniu limfocytów CD8+ w komórki efektorowe, które z węzłów chłonnych przedostają się do tkanek zainfekowanych, by walczyć z patogenem [15], w tym wypadku potencjalnym czynnikiem sarkoidalnym. Być może ma to również związek z komórkami dendrytycznymi, które prezentują antygen poprzez MHC klasy I [87].

Limfocyty T $\gamma\delta$ wydają się nie odgrywać znaczącej roli w sarkoidozie [34,88,99,104]. D. Ziora nie stwierdził różnic w ich odsetku, badając popłuczyny oskrzelowo-pęcherzykowe (BAL) u chorych na sarkoidozę z dwóch różnych segmentów płuc, tj. o największym i najmniejszym nasileniu zmian w badaniu TKWR płuc. Oznaczając różne cytokiny i markery aktywacji limfocytów T badał homogenność fazy zapalnej w sarkoidozie. Uzyskane wyniki pozwoliły na postawienie wniosku o zróżnicowaniu procesu chorobowego na terenie płuc i dużym znaczeniu badania TKWR dla jego oceny [104]. Również na podstawie niniejszej pracy doktorskiej wydają się, że limfocyty T $\gamma\delta$ nie odgrywają szczególnej roli w sarkoidozie.

Tematyka limfocytów CD45RA⁺ i CD45RO⁺ stanowi kolejny punkt rozważań. W tym miejscu zasadne wydaje się odniesienie do teorii „lymphocytes homing”. Zakłada ona ukierunkowaną migrację limfocytów do miejsca, w którym po raz pierwszy zetknęły się z antygenem [15]. Mechanizm ten ma charakter ogólnoustrojowy, stąd mówi się o nim w kontekście migracji limfocytów m.in. do skóry, jelit, czy płuc [15]. Wielu autorów podkreśla znaczenie redystrybucji limfocytów do płuc [77,78,104]. Wyraźnie akcentowane jest w nim znaczenie receptorów chemokinowych [15]. Omawiany wcześniej receptor CXCR6, wydają się odgrywać istotną rolę w procesie migracji limfocytów T do płuc (ang. lymphocytes lung homing).

Pamięć immunologiczna, której przejawem jest obecność limfocytów CD45RO⁺CD4⁺ i CD45RO⁺CD8⁺, odgrywa nieocenioną rolę na terenie płuc. Umożliwia bardziej efektywną walkę z obcymi antygenami, m.in. czynnikami zakaźnymi i potencjalnie również nieznanym czynnikiem sarkoidalnym. Limfocyty pamięci stanowią główną subpopulację na terenie płuc [40,73,75,104]. Stąd spodziewane są uzyskane wyniki, w których stwierdzono istotny statystycznie wyższy odsetek limfocytów pamięci w BAL u chorych na sarkoidozę w porównaniu do grupy kontrolnej. Także grupa kontrolna cechuje się wysokim odsetkiem limfocytów CD45RO⁺CD4⁺. Zarówno w sarkoidozie, jak i w grupie kontrolnej stwierdzono niski odsetek limfocytów CD45RA⁺CD4⁺.

Wracając do rozważań na temat progresji sarkoidozy i włóknienia płuc w niniejszej rozprawie doktorskiej stwierdzono istotny statystycznie spadek odsetka limfocytów CD45RO⁺CD4⁺ w BAL u chorych z włóknieniem w porównaniu do braku cech włóknienia w badaniu TKWR płuc. Prawdopodobnie związane jest to z „wyciszaniem” odpowiedzi immunologicznej. Niezależnie, czy włóknienie uznać za przejaw gojenia, czy destrukcji, dochodzi w ostateczności do nieodwracalnych i

końcowych zmian, skutkujących niewydolnością danego narządu. W tym wypadku są to płuca. Niezmiernie ważne jest poznanie mechanizmów prowadzących i wpływających na obserwowane procesy.

Kontynuując temat odpowiedzi immunologicznej na potencjalny czynnik sarkoidalny, który dostał się na teren płuc, warto przyjrzeć się komórkom prezentującym antygen. Stanowią one przedmiot dociekań wielu badaczy [1,2,62,83,87,93,101]. Stwierdzono zaburzenia w ekspresji CD80 i CD86 na makrofagach płucnych, czego konsekwencją może być zaburzona regulacja aktywacji i proliferacji limfocytów T [62]. Wymienione antygeny są ligandami dla CD28. Również zmiany w obrębie komórek dendrytycznych mogą mieć znaczący wpływ na przebieg sarkoidozy [87,101].

W niniejszej rozprawie doktorskiej skupiono się na komórkach „odpowiadających” na „prezentację”, tj. limfocytach T. Zastanawia mechanizm warunkujący ich migrację do płuc, stan ich aktywacji i możliwości regulacji odpowiedzi immunologicznej. Podjęto próbę odpowiedzi na pytanie o rolę receptora CXCR6 w procesie chemotaksji u chorych na sarkoidozę. Rozważano zmiany w obrębie poszczególnych subpopulacji limfocytów T, co wiązało się z budową TCR i pamięcią immunologiczną.

Rozpoznanie antygeny (np. czynnika sarkoidalnego) odbywa się w określonych warunkach. Niezwykle ważna jest tu rola wspomnianych komórek prezentujących antygen, jak również możliwości limfocytów T rozpoznania danego antygeny dzięki TCR. Niezbędne jest połączenie z odpowiedniej klasy cząsteczkami MHC, choć np. limfocyty TCR $\gamma\delta$ nie wymagają takiej prezentacji [36,37]. Między komórką prezentującą antygen, a limfocytem tworzy się tzw. synapsa immunologiczna, w której formowaniu współuczestniczą cząsteczki adhezyjne, m.in. receptory chemokionowe. Po rozpoznaniu antygeny, dzięki kompleksowi CD3, sygnał aktywacji przekazywany jest do wnętrza limfocytu (tzw. pierwszy sygnał aktywacji). W konsekwencji dochodzi do proliferacji i różnicowania się limfocytów w komórki efektorowe [37,101]. Dla limfocytów dziewiczych (CD45RA) istotny dla aktywacji jest także tzw. drugi sygnał aktywacji, tj. pochodzący od cząsteczek kostymulujących. Upraszczając procedurę, można przyjąć, że dzięki m.in. kostymulacji poprzez wiązanie antygenów CD80/CD86 na komórkach prezentujących antygen z CD28 obecnym na limfocytach T, obniża się „próg aktywacji” limfocytów [11,37]. Limfocyty pamięci (CD45RO) niejednokrotnie traktowane są jak limfocyty w tzw. „częściowym stanie aktywacji”. Należy to rozumieć, jako ich zwiększony potencjał do szybszej i bardziej efektywnej

odpowiedzi przy ponownym kontakcie z antygenem. Przekłada się to na fakt, braku konieczności otrzymania przez nie drugiego sygnału aktywacji [37,104].

W myśl przedstawionego wywodu rozważania na temat odsetka limfocytów CD28+ u chorych na sarkoidozę wydają się niezwykle ciekawe. Należałoby się spodziewać konstytutywnie obecności ok. 95%-100% limfocytów CD28+ CD4+ i ok. 30%-50% limfocytów CD28+CD8+ [37]. W niniejszej rozprawie doktorskiej rzeczywiście sytuacja taka występuje we krwi obwodowej zarówno u chorych na sarkoidozę, jak i grupie kontrolnej. Zastanawia jednak fakt stwierdzonego obniżenia odsetka limfocytów CD28+CD4+ w BAL u chorych na sarkoidozę i grupie kontrolnej. Przy czym w grupie kontrolnej, która z założenia powinna być zdrowa, ten odsetek jest istotnie statystycznie niższy niż u chorych na sarkoidozę. Uprzednio omawiano kwestię problemu z doбором odpowiedniej grupy kontrolnej, co może wpływać na stwierdzane zmiany. Niemniej jednak rodzi się pytanie, czy obserwowane zależności nie mają szczególnego znaczenia immunologicznego. Sięgając do kliniki sarkoidozy i rozpatrując różne fazy choroby, poszukiwano konkretnej sytuacji, w której odsetek limfocytów CD28+CD4+ zachowywałby się zgodnie z przewidywaniem. Wyodrębnienie grupy chorych z zespołem Löfgrena spełnia te oczekiwania. W ujęciu klinicznym grupa jest jednorodna pod względem prezentowanych objawów, przebiegu choroby i rokowania. Odsetek limfocytów CD28+CD4+ w BAL w zespole Löfgrena jest istotnie statystycznie wyższy, niż u chorych bez zespołu Löfgrena, jak również w stosunku do grupy kontrolnej. Natomiast nie stwierdza się różnic pomiędzy chorymi na sarkoidozę bez rozpoznanego zespołu Löfgrena i grupą kontrolną. Zwraca uwagę istotny statystycznie wzrost odsetka limfocytów CD28+CD8+ w BAL w zespole Löfgrena w analogicznych porównaniach. Dziwi ich całościowy zwiększony odsetek w BAL, tak różny od spodziewanego. Trend wzrostu limfocytów CD28+CD8+ widoczny jest również we krwi, choć tu całościowe odsetki nie zaskakują. Być może należałoby to tłumaczyć koniecznością otrzymania konstymulacji poprzez antygen CD28 w początkowej fazie sarkoidozy, tj. w momencie rozpoznawania i prezentacji czynnika sarkoidalnego. W analizowanym materiale nie stwierdzono jednak istotnego statystycznie wzrostu odsetka limfocytów dziewiczych w BAL w zespole Löfgrena, dla których konstymulacja jest konieczna. W BAL dominują limfocyty pamięci, zarówno u chorych na sarkoidozę, jak i w grupie kontrolnej. Dla nich konstymulacja za pośrednictwem CD28 (tzw. drugi sygnał aktywacji) nie jest niezbędna [37]. Być może w ten sposób należałoby tłumaczyć fakt zmniejszonego odsetka limfocytów CD28+ w BAL.

Przenosząc się na drugi biegun choroby, tj. sarkoidoza z włóknieniem płuc, także zauważyć można interesujące zmiany. Stwierdza się obniżony odsetek limfocytów CD28+CD4+ w BAL, a w miarę nasilenia włóknienia obserwować można tendencję spadkową. Rozważając pośrednie sytuacje kliniczne, tj. chorych ze stwierdzonymi w badaniu TKWR płuc guzkami sarkoidalnymi, jak również chorych z guzkami i włóknieniem płuc, także wykazano istotny statystycznie spadek odsetka limfocytów CD28+CD4+ w BAL. Część odpowiedzi, próbującej wyjaśnić obserwowane zależności, przytoczono uprzednio, omawiając sytuację subpopulacji limfocytów T CD4+. Teoria zakładająca ich migrację do guzków sarkoidalnych, gdzie odbywa się prezentacja czynnika sarkoidalnego, a gdzie kostymulacja od CD28 wydawałaby się jak najbardziej uzasadniona. Choć na wstępie rozważań zaznaczono, że ekspresja ligandów dla CD28 na komórkach prezentujących antygen może być w sarkoidozie zaburzona [62]. Także w myśl teorii o przewlekłej stymulacji w sarkoidozie [42,50,52,93] obecność CD28 nie jest obowiązkowa [37]. W odróżnieniu od pierwszej fazy choroby, tj. zespołu Löfgrena, w której prawdopodobnie dochodzi do pierwotnego kontaktu z czynnikiem sarkoidalnym. Spójny z powyższą hipotezą wydaje się wykazany w niniejszej pracy doktorskiej istotny statystycznie wysoki odsetek limfocytów CD28+CD4+ i CD28+CD8+ w BAL w zespole Löfgrena i jego obniżenie na innych etapach choroby. Także inni badacze stwierdzili obniżony odsetek limfocytów CD28+CD4+ w BAL [42,93]. Brak jest jednak porównania do grupy kontrolnej [93] lub grupa kontrolna rekrutuje się z osób młodych (średnia wieku 30 lat), co również może wpływać na obserwowane zależności [42]. Stwierdzony odsetek limfocytów CD28+CD4+ w BAL jest wprawdzie wyższy niż w niniejszej pracy doktorskiej, można to jednak wiązać z przewagą w przytaczanej pracy chorych z sarkoidozą w stadium 1 i zespołem Löfgrena w porównaniu do innych stadiów zaawansowania choroby [42]. Ważne wydaje się podkreślenie faktu, że w pracy tej stwierdzono również obniżenia odsetka limfocytów CD28+CD4+ w BAL u chorych na alergiczne zapalenie pęcherzyków płucnych, co autorzy również wiążą z teorią tzw. ciągłej stymulacji antygenowej [42]. W kontekście wspomnianych wcześniej badań genetycznych może to mieć istotne znaczenie [52].

Dla porządku w tym miejscu warto wspomnieć o innej cząsteczce kostymulującej, tj. CD152. Jest ona indukowana na powierzchni aktywnych limfocytów T i przekazuje do wnętrza limfocyta sygnał hamujący [11,37]. W niniejszej pracy doktorskiej nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w odsetku

limfocytów CD152+CD4+ i CD152+CD8+ u chorych na sarkoidozę w porównaniu do grupy kontrolnej, jak również w zależności od obecności zespołu Löfgrena.

Sygnalizowano już kwestię aktywacji limfocytów T, powołując się na badanie genów aktywacji i proliferacji u chorych na sarkoidozę w kontekście włóknienia płuc [52], omawiając rozpoznawanie antygeny przez receptor TCR [2,38,50], kostymulację poprzez CD28 [37,42,93], chemotaksję zależną od receptorów chmokinowych i ich ligandów [16,32,33,37]. Wszystkie te elementy wpływają na stan aktywacji limfocytów. Dla określenia pojęcia sarkoidoza aktywna, często używa się kryterium zwiększonej limfocytozy w BAL i zwiększonego stosunku limfocytów CD4/CD8, choć podawane są różne zakresy liczbowe [2,3,32,33]. Konieczna jest ocena kliniczna i radiologiczna [32,33,52]. Niekiedy pomocne są badania radioizotopowe z użyciem galu 67 [3,29]. Nie ma jednak jednoznacznych kryteriów. Jak już wielokrotnie wspomniano jedynie zespół Löfgrena nie budzi zastrzeżeń [20,21,29,42,103]. Zarówno w ujęciu klinicznym, jak i immunologicznym traktowany jest jako aktywna faza sarkoidozy.

W niniejszej pracy doktorskiej stwierdzono istotnie statystycznie zwiększony odsetek limfocytów CD69+CD4+ i CD69+CD8+ zarówno w BAL, jak i krwi obwodowej u chorych na sarkoidozę w porównaniu do grupy kontrolnej. Przy czym w BAL odsetek był zdecydowanie wyższy. Zwracają uwagę limfocyty CD69+CD8+, które przeważają nad limfocytami CD69+CD4+ zarówno w BAL, jak i krwi. Podobne wyniki przedstawili inni badacze [42,93]. Klinika w świetle opisywanych zależności, stawia pytanie o zespół Löfgrena. Nie wykazano jednak spodziewanego wzrostu odsetka limfocytów T CD69+ u tych chorych. Może jednak w tym wypadku warto sięgnąć do hipotezy o tzw. ciągłej stymulacji [42,50,52,93]. Zakłada ona przetrwanie czynnika sarkoidalnego np. w komórkach prezentujących antygen. Stąd nieustanna prezentacja antygenów, być może również na drodze krzyżowej i utrzymywanie w stanie aktywacji limfocytów T. Na poparcie tych twierdzeń warto przytoczyć wyniki niniejszej pracy doktorskiej, które wskazują na utrzymywanie się wysokiego odsetka CD69+CD8+ w BAL u chorych z długim czasem trwania sarkoidozy. Nawet przyjmując kryterium powyżej 5 lat [7], a nie tylko powyżej 2 lat [63], widać wyraźnie utrzymujący się zwiększony odsetek limfocytów CD69+CD8+ w BAL. Odnosząc się do obserwowanego jednocześnie istotnego statystycznie spadku odsetka CD69+CD4+ należy wrócić do początków tej dyskusji, gdzie omawiano zmiany subpopulacji CD4+ w zależności od stadium zaawansowania choroby i rozwijającego się włóknienia. Widoczna natomiast różnica w odsetku limfocytów CD69+CD8+ wynikać może z pełnionych przez nie funkcji komórek efektorowych

(cytotoksycznych). Być może organizm podtrzymuje ich gotowość do „walki” z czynnikiem sarkoidalnym. Poprzez antygen CD69+ odbywa się przekazywanie sygnału do produkcji m.in. IL-2, INF- γ [37].

W niniejszej pracy doktorskiej badano również inny marker aktywacji limfocytów T, tj. HLA-DR. Również nie wykazano różnic w jego ekspresji, biorąc pod uwagę zespół Löfgrena jako wykładnik aktywności choroby. Zwraca uwagę jego odmienna ekspresja w stosunku do CD69 na subpopulacjach limfocytów T CD4+ i CD8+. Stwierdzono istotnie statystycznie zwiększony odsetek limfocytów HLA-DR+CD4+ zarówno w BAL, jak i krwi obwodowej u chorych na sarkoidozę w porównaniu do grupy kontrolnej. Przy czym odsetek ten był zdecydowanie wyższy w BAL. Nie obserwowano zwiększonego odsetka HLA-DR+CD8+ w BAL, a nawet stwierdzono istotny statystycznie spadek w porównaniu z grupą kontrolną. Również inni badacze stwierdzili zwiększony odsetek limfocytów HLA-DR+CD4+ w BAL, choć odsetek limfocytów HLA-DR+CD8+ w BAL był również zwiększony [42]. W omawianym przypadku nie było porównania do grupy kontrolnej [42]. Inni autorzy również opisują podwyższony odsetek limfocytów T HLA-DR w BAL [76,85,104]. Niektórzy sugerują jego niekorzystne znaczenie prognostyczne [85]. Stąd analogicznie do uprzednich rozważań należy zapytać o czas trwania sarkoidozy. W niniejszej pracy doktorskiej stwierdzono utrzymujący się wysoki odsetek limfocytów HLA-DR+CD4+ w długo trwającej sarkoidozie. Podstawę teoretyczną dla wyjaśnienia obserwowanych zależności może stanowić rola antygenu HLA-DR. Jest on częścią kompleksu MHC klasy II. Jego ekspresja może być indukowana na aktywnych limfocytach T. Wiadomo, że rolą MHC jest prezentacja antygenów [37,83]. Zasadna zatem wydaje się obecność zwiększonego odsetka limfocytów CD4+, rozpoznających antygen w kontekście MHC klasy II. Utrzymywanie się ich w długo trwającej sarkoidozie można wiązać z hipotezą ciągłej stymulacji antygenowej [42,50,52,93] i potrzebą „pomocy” komórkom prezentującym antygen [2,101].

Kolejny badany w niniejszej pracy doktorskiej marker aktywacji limfocytów T stanowi antygen CD25. Stwierdzono istotny statystycznie spadek odsetka limfocytów CD25+CD4+ w BAL u chorych na sarkoidozę w porównaniu do grupy kontrolnej. Nie wykazano takiej zależności we krwi obwodowej. Nie stwierdzono różnic w odsetku limfocytów CD25+CD8+ zarówno w BAL, jak i krwi. Również inni badacze nie stwierdzili zwiększonego odsetka limfocytów T CD25+ u chorych na sarkoidozę [59,74,100,102,104]. Choć niektórzy obserwowali niewielką grupę chorych ze zwiększonym odsetkiem limfocytów CD25+ [59]. Podkreśla się znaczenie limfocytów CD25+CD4+ w procesie regulacji odpowiedzi immunologicznej

[11,14,37,84,89]. Stąd, w odróżnieniu od omawianych CD69 i HLA-DR, na CD25 należałoby raczej spojrzeć w kontekście regulacji. Właśnie zaburzenia regulacji immunologicznej wydają się być istotnym, o ile nie najważniejszym czynnikiem wpływającym na przebieg sarkoidozy [2,51]. W niniejszej pracy doktorskiej stwierdzono istotny statystycznie spadek CD25+CD4+ u chorych na sarkoidozę z zespołem Löfgrena w porównaniu do pozostałych chorych. Prawdopodobnie należy to wiązać z brakiem konieczności hamowania odpowiedzi aktywnych limfocytów. W tym wypadku zależy przecież na ich pełnej „mobilizacji” do walki z potencjalnym czynnikiem sarkoidalnym. Z kolei w sytuacji rozwijającego się włóknienia płuc, interpretowanego jako wyraz destrukcji, spodziewać można się ich wzrostu. Byłby to wyraz „obrony” organizmu poprzez wyciszenie odpowiedzi immunologicznej, tj. zahamowanie nadmiernie i być może przewlekłe stymulowanego układu immunologicznego. Spójna wydaje się zatem obserwacja, istotnego statystycznie wzrostu odsetka limfocytów CD25+CD4+ u chorych na sarkoidozę ze znacznie nasilonymi zmianami włóknistymi, stwierdzonymi w badaniu TKWR płuc, w porównaniu do zmian dyskretnych. Choć z drugiej strony nie wykazano zwiększonego ich odsetka analizując czas trwania choroby. W myśl założenia progresji choroby w czasie i rozwoju włóknienia, można byłoby się spodziewać ich wzrostu. Może warto zauważyć, że osoby z długim czasem trwania choroby najczęściej podawane są kolejnym cyklem leczenia (głównie GKS). Celem terapii jest zahamowanie postępu choroby i rozwoju włóknienia. Nie ma zgodności odnośnie wpływu GKS na naturalny przebieg choroby [6,7,63,95]. Takie naświetlenie zagadnienia mogłoby tłumaczyć brak wzrostu odsetka limfocytów CD25+CD4+ w zależności od czasu trwania choroby. Pytanie, czy faktycznie warto hamować rozwój limfocytów CD25+CD4+ należy pozostawić otwarte. Nie znane jest ich faktyczne znaczenie dla rozwoju włóknienia płuc u chorych na sarkoidozę. Czy jest ono pożądane, czy wręcz szkodliwe może stanowić kolejny punkt dociekań badaczy. Być może obserwowane zależności mają związek z wiekiem pacjentów [90,94]. Również samo wyodrębnienie subpopulacji limfocytów CD25+CD4+ nie odpowiada ich funkcjom regulatorowym. Należałoby określić również inne markery, tj. Foxp3+ [11,67], CD27 [31,70], bądź rozbić na podgrupy w zależności od ekspresji CD25 i CD4 [8,14,19,90].

Temat limfocytów T o właściwościach regulatorowych w sarkoidozie stanowi przedmiot zainteresowania badaczy [40,51]. Stwierdzono znaczną redukcję, a nawet brak limfocytów CD1d NKT u chorych na sarkoidozę [51]. Autorzy zadają pytania o przyczynę formowania ziarninaków sarkoidalnych, mechanizm rekrutacji

limfocytów do płuc, ale przede wszystkim o czynnik warunkujący „wyłączenie” ich aktywacji [51]. Podobnie jak inni badacze stoją na stanowisku popierającym teorię „przewlekłej stymulacji antygenowej” przez potencjalny czynnik sarkoidalny [2,40,42,50,51,52,93]. Upatrują przyczynę przewlekania się procesu sarkoidalnego w zaburzeniach układu immunoregulacyjnego. Wprawdzie znaczenie limfocytów CD1d NKT u ludzi nie jest do końca wyjaśnione [46,94], jednak w badaniach na myszach wykazano ich znaczącą rolę w ograniczaniu chorób Th1 zależnych [92,79]. Również inni badacze zajmują się rolą limfocytów regulatorowych m.in. w ograniczaniu chorób autoimmunologicznych [13,14,19]. Stanowią one potencjalne miejsce działania nowych leków w celu zahamowania progresji chorób z wykorzystaniem układu immunologicznego [97]. W tym miejscu warto wskazać na toczące się dyskusje na temat relacji sarkoidozy z chorobami autoimmunologicznymi [80]. Wspólne są niektóre kierunki badań, m.in. nad znaczeniem receptora chemokinowego CXCR6 i antygeny CD154 [60].

Ostatni punkt poruszany w niniejszej rozprawie doktorskiej stanowi antygen CD154. Wiązany jest on z aktywacją limfocytów CD4+, jak również z wzajemną relacją limfocytów T i B, wspomaganiem właściwości kostymulujących komórek prezentujących antygen [37]. Nieliczni badacze zajmują się jego rolą w sarkoidozie [50,87]. Szlak CD40-CD154 badano u chorych na sarkoidozę z zajęciem mięśni. Stwierdzono obecność limfocytów CD154+ w badaniu immunohistopatologicznym na obwodzie ziarniników sarkoidalnych u 3 z 5 pacjentów [87]. Podejmowano próbę wyjaśnienia roli komórek prezentujących antygen (makrofagów płucnych) i koekspresji CD40, CD86, CD80 [62]. W badaniach tych wykazano zwiększoną ekspresję CD40, tj. ligandu dla CD154, na makrofagach płucnych [62].

Ekspresję CD154 na limfocytach T u chorych na sarkoidozę oceniano jedynie we krwi obwodowej w kontekście m.in. anergii [50]. Autorów zajmuje znaczenie CD154 na limfocytach T i jego związek z limfocytami B poprzez CD40. Zakładają konieczność prawidłowej odpowiedzi ze strony limfocytów B dla eliminacji potencjalnego czynnika sarkoidalnego. Według nich defekt tej regulacji, objawiający się m.in. obniżeniem odsetka limfocytów CD154+CD4+ prowadzi do utrzymywania się ziarniników sarkoidalnych i przewlekłego zapalenia. W niniejszej pracy doktorskiej nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w odsetku limfocytów CD154+CD4+ i CD154+CD8+ w BAL u chorych na sarkoidozę w porównaniu do grupy kontrolnej. Jedynie we krwi obwodowej wykazano istotny statystycznie, ale bardzo niewielki wzrost CD154+CD4+ i CD154+CD8+, porównując chorych na sarkoidozę z grupą kontrolną. Stoi to niejako w sprzeczności z proponowaną

powyżej teorią. Sugerowana progresja sarkoidozy w kontekście CD154 we krwi obwodowej w niniejszej rozprawie doktorskiej ma raczej związek ze wzrostem odsetka limfocytów CD154+. Obserwowano taką tendencję porównując nasilenie włóknienia w badaniu TKWR płuc.

Warto podsumować zebrane w niniejszej pracy doktorskiej wyniki badań dotyczące limfocytów CD8+ we krwi u chorych na sarkoidozę. W porównaniu do grupy kontrolnej stwierdzono statystycznie istotny wzrost odsetka limfocytów T CD8+, CD45RA+CD8+, CD69+CD8+, CD154+CD8+. Również w zależności od stadium sarkoidozy obserwowano wzrost odsetka limfocytów CD8+. Wydaje się, że najbardziej prawdopodobna teoria wyjaśniająca obserwowane zmiany opiera się na hipotezie ciągłej stymulacji antygenowej w sarkoidozie [40,42,50,51,52,93]. Sugerowane podtrzymywanie gotowości do „walki” z potencjalnym czynnikiem sarkoidalnym, dzięki obecności komórek cytotoksycznych, być może odgrywa wiodącą rolę w patogenezie sarkoidozy. Podobne podejście do tematu prezentuje teoria indukowania różnicowania limfocytów T CD8+ dziewiczych w limfocyty T cytotoksyczne poprzez ligand dla CD154, tj. CD40 obecny na komórkach dendrytycznych [87]. Znaczenie mogą również mieć efektorowe limfocyty T pomoci [43,70]. Otwarty pozostaje również problem wpływu limfocytów T regulatorowych na zachodzące procesy [94]. Może jednak zasadniczy wpływ na obserwowane zmiany ma migracja limfocytów CD4+ do płuc [77,78] i mechanizm kompensowania poprzez wzrost odsetka limfocytów CD8+ we krwi obwodowej.

7. Wnioski

1. Receptor chemokinowy CXCR6 najpewniej odgrywa rolę w procesie migracji limfocytów T do płuc u chorych na sarkoidozę (ang. lymphocytes lung homing). Potwierdza to wyższy odsetek limfocytów CXCR6+CD4+ i CXCR6+CD8+ w BAL w porównaniu z krwią obwodową. CXCR6 nie jest jednak markerem różnicującym chorych na sarkoidozę od grupy kontrolnej. Potencjalnie mógłby stanowić pomoc w ocenie stadium sarkoidozy, z uwagi na wykazaną niewielką, ale istotną różnicę w odsetku limfocytów CXCR6+CD4+ we krwi.
Stwierdzony niski odsetek limfocytów T CD154+ w BAL i krwi obwodowej wydaje się mieć marginalne znaczenie w patogenezie sarkoidozy.
2. Limfocyty T CD4+ są główną subpopulacją limfocytów T zaangażowaną w patoimmunologię sarkoidozy. Stwierdzony w BAL ich zwiększony odsetek i podwyższony stosunek CD4/CD8 odpowiada aktywnej fazie choroby (zespół Löfgrena). Obserwowana tendencja spadkowa może mieć związek z progresją kliniczną i radiologiczną sarkoidozy. Zasadnicze znaczenie w odpowiedzi immunologicznej u chorych na sarkoidozę mają również limfocyty TCR $\alpha\beta$ i CD45RO, których istotnie wyższy odsetek stwierdzono w BAL w porównaniu do grupy kontrolnej. Zwiększony odsetek limfocytów CD45RA+CD8+ w BAL i krwi obwodowej, może sugerować znaczenie tej subpopulacji limfocytów w walce z potencjalnym czynnikiem sarkoidalnym. Stwierdzony niski odsetek limfocytów TCR $\gamma\delta$ wydają się nie odgrywać znaczącej roli.
3. Zwiększony odsetek limfocytów T CD69+CD4+ i CD69+CD8+ zarówno w BAL, jak i krwi obwodowej u chorych na sarkoidozę może świadczyć o aktywacji limfocytów i gotowości układu immunologicznego do zwalczania czynnika sarkoidalnego. Może również przemawiać za hipotezą ciągłej stymulacji antygenowej w sarkoidozie, podobnie jak zwiększony odsetek limfocytów T HLA-DR+CD4+. Zmiany w odsetku limfocytów T CD25+ CD4+ należy prawdopodobnie rozpatrywać w kontekście zaburzeń mechanizmów regulacji odpowiedzi immunologicznej. Kostymulacja poprzez cząsteczkę CD28 wydaje się mieć istotne znaczenie w aktywnej fazie sarkoidozy, odpowiadającej klinicznemu obrazowi zespołu Löfgrena.

8. Streszczenie

Sarkoidoza jest jedną z chorób śródmiąższowych płuc o nieznanym czynniku etiologicznym. Najczęściej chorują ludzie młodzi. Główną lokalizacją zmian sarkoidalnych jest układ oddechowy. Choroba charakteryzuje się ogólnie dobrym rokowaniem, choć u części chorych postępuje, doprowadzając do niewydolności zajętego narządu. Mimo licznych badań nie udało się znaleźć czynnika rokowniczego, który wskazałby chorych np. zagrożonych włóknieniem płuc. Podejmowane są próby wyjaśnienia przyczyn formowania się ziarninaków sarkoidalnych, stwierdzanych w badaniu histopatologicznym. Obecnie dominuje hipoteza, zakładająca odpowiedź immunologiczną na nieznaną czynnik sarkoidalny, który dostał się do płuc drogą wziewną. Reakcja immunologiczna ma najpewniej na celu wyeliminowanie, bądź przynajmniej ograniczenie miejscowej reakcji zapalnej. Istotne w tym procesie są komórki prezentujące antygen, które stanowią pierwszy punkt linii obrony organizmu. Dzięki wytwarzanym przez nie cytokinom następuje rekrutacja komórek zapalnych i ich aktywacja. W niniejszej pracy doktorskiej badano limfocyty T.

Celem pracy była próba odpowiedzi na pytanie o rolę receptora chemokinowego CXCR6 w procesie migracji limfocytów T do płuc (ang. lymphocytes lung homing). Oceniano ekspresję CXCR6 i antygenu CD154 na limfocytach T w rozbiciu na subpopulacje limfocytów CD4⁺ i CD8⁺, w zależności od obrazu klinicznego i radiologicznego.

Zbadano 67 chorych na sarkoidozę. Grupę kontrolną stanowiły 23 osoby diagnozowane z powodu przewlekłego kaszlu, u których wykluczono choroby płuc, jako przyczynę zgłaszanych dolegliwości. Za pomocą cystometrii przełykowej badano limfocyty T w popłuczynach oskrzelowo-pęcherzykowych (BAL) i krwi obwodowej. Na wybranej grupie osób oceniano również inne subpopulacje limfocytów T (TCRαβ, TCRγδ, CD45RA, CD45RO) i stan ich aktywacji. Brano pod uwagę ekspresję antygenów powierzchniowych limfocytów T: CD69, HLA-DR, CD25, jak również cząsteczki kostymulującej CD28. Uzyskane wyniki powiązano z obrazem klinicznym i radiologicznym chorych na sarkoidozę.

Potwierdzono znaczenie receptora chemokinowego CXCR6 dla migracji limfocytów T do płuc u chorych na sarkoidozę. CXCR6 nie jest jednak markerem różnicującym chorych na sarkoidozę od grupy kontrolnej. Potencjalnie mógłby stanowić pomoc w ocenie stadium sarkoidozy z uwagi na wykazaną niewielką, ale istotną różnicę w odsetku limfocytów CXCR6⁺CD4⁺ we krwi. Stwierdzony

nieznaczny odsetek limfocytów T CD154+, zarówno w BAL, jak i krwi obwodowej, wydaje się nie mieć istotnego znaczenia w sarkoidozie. Limfocyty T CD4+ są główną subpopulacją limfocytów T zaangażowaną w patoimmunologię sarkoidozy. Stwierdzony w BAL ich zwiększony odsetek i podwyższony stosunek CD4 do CD8 odpowiada aktywnej fazie choroby (zespół Löfgrena). Obserwowana tendencja spadkowa może mieć związek z progresją kliniczną i radiologiczną sarkoidozy. Zasadnicze znaczenie w odpowiedzi immunologicznej u chorych na sarkoidozę mają również limfocyty TCR $\alpha\beta$ i CD45RO, których istotnie wyższy odsetek stwierdzono w BAL w porównaniu do grupy kontrolnej. Zwiększony odsetek limfocytów CD45RA+CD8+ w BAL i krwi obwodowej, może sugerować znaczenie tej subpopulacji w walce z potencjalnym czynnikiem sarkoidalnym. Stwierdzony niski odsetek limfocytów TCR $\gamma\delta$ wydaje się nie odgrywać znaczącej roli w sarkoidozie.

Markery aktywacji (CD69, HLA-DR, CD25) i cząsteczka kostymulująca CD28 mogą być pomocne w ocenie chorych na sarkoidozę. Zwiększony odsetek limfocytów T CD69+CD4+ i CD69+CD8+, zarówno w BAL, jak i krwi obwodowej u chorych na sarkoidozę, może świadczyć o aktywacji limfocytów i gotowości układu immunologicznego do zwalczania czynnika sarkoidalnego. Może również przemawiać za teorią ciągłej stymulacji antygenowej w sarkoidozie, podobnie jak zwiększony odsetek limfocytów T HLA-DR+CD4+. Zmiany w odsetku limfocytów T CD25+CD4+ należy prawdopodobnie rozpatrywać w kontekście zaburzeń mechanizmów regulacji odpowiedzi immunologicznej. Kostymulacja poprzez cząsteczkę CD28 wydaje się mieć istotne znaczenie w aktywnej fazie sarkoidozy, odpowiadającej klinicznemu obrazowi zespołu Löfgrena.

Niewątpliwie kierunek badań, oceniających wpływ potencjalnego czynnika sarkoidalnego na układ immunologiczny i znaczenie być może przetrwałej stymulacji, może się okazać istotny z punktu widzenia badań poznawczych, jak również praktyki klinicznej.

8.1 Summary

Sarcoidosis is one of the interstitial lung diseases of unknown etiology. It develops mostly in younger patients and affects mainly the organs of respiratory system. Although sarcoidosis generally has a good prognosis, in some proportion of patients the progressive course of the disease may lead to failure of affected organ. Despite many already conducted studies, there was no one prognostic factor found that would help identify patients with, for example, high risk of pulmonary fibrosis. The causes of sarcoid granulomas, found in pathology examination, formation are still being investigated. It has been hypothesized that the immunological response to unknown pathogenic stimulus transferred to the lung by airways is responsible. The probable purpose of the immunological response is to eliminate or at least contain a localized inflammatory reaction. The key role in this process, as the first line of defense, is played by antigen presenting cells. Through secretion of cytokines they affect recruitment and activation of inflammatory cells. T lymphocytes were researched in this doctoral thesis.

The aim of the study was to assess the role of chemokine receptor CXCR6 in the T lymphocytes lung homing. The expression of CXCR6 and CD154 antigen were assessed on T lymphocytes subpopulations CD4⁺ and CD8⁺, depending on clinical and radiological data.

67 patients with sarcoidosis were evaluated. The control group was 23 patients that complained of cough but with lung diseases already excluded as the reason for ailment. T cells obtained from bronchoalveolar lavage (BAL) and peripheral blood were examined with flow cytometry. In specified subgroup of patients other T cells subpopulations (TCR $\alpha\beta$, TCR $\gamma\delta$, CD45RA, CD45RO) and their activation status were assessed. Following T cells surface antigens were examined: CD69, HLA-DR, CD25 together with costimulatory molecule CD28. The results were analyzed in association with clinical and radiological data of patients.

The role of chemokine receptor CXCR6 in T cells lung homing in patients with sarcoidosis was confirmed. Nonetheless, CXCR6 is not a marker that allows to differentiate sarcoidosis patient from the control group. It may be potentially helpful in staging of sarcoidosis as a small, but significant, difference in proportion of CXCR6⁺CD4⁺ cells in peripheral blood in various stages was noted. Small percentage of CD154⁺ T cells was also found both in BAL and peripheral blood samples, but this phenomenon seems not to be of great significance in sarcoidosis.

The main subpopulation of T lymphocytes involved in immunopathology of sarcoidosis are CD4⁺ T cells. The increased percentage of CD4⁺ subset and thus high CD4:CD8 ratio measured in BAL corresponds to active phase of the disease - Löfgren syndrome. The observed decreasing trend may be associated with clinical and radiological progression of sarcoidosis. TCRαβ and CD45RO T cells also play essential role in immune response in patient with sarcoidosis, as a significantly higher percentage of this subset, compared to control group, was found in BAL specimens. Increased proportion of CD45RA+CD8⁺ T cells both in BAL and in peripheral blood may suggest that this subpopulation may be of significance in response to hypothesized stimulus causing sarcoidosis. Low percentage of TCRγδ cells seems not to be of significance in sarcoidosis.

Activation markers (CD69, HLA-DR, CD25) and costimulatory molecule CD28 may be of assistance in the assessment of patients with sarcoidosis. Increased proportion of CD69+CD4⁺ and CD69+CD8⁺ T cells in BAL and peripheral blood of patients with sarcoidosis may indicate lymphocyte activation and readiness of the immunologic system to fight the causative factor of sarcoidosis. Together with increase percentage of HLA-DR+CD4⁺T cells subset it may support the continuous antigen stimulation theory. Changes in percentage of CD25+CD4⁺ T cells should be probably considered in the context of deregulation of immune response mechanisms. It is possible that co-stimulation by CD28 molecule may be important in the active phase of the disease, which corresponds to clinical presentation of Löfgren syndrome.

Undoubtedly the area of research concentrating on potential influence of sarcoidosis causative factor on immune system and significance of potentially persisting stimulation, might be important both scientifically and clinically.

9. Spis wykresów

Wykres 1. Odsetek osób palących tytoń w badanych grupach.	22
Wykres 2. Stadia sarkoidozy - rozkład procentowy (n- liczba chorych).	22
Wykres 3. Odsetek chorych na sarkoidozę z rozpoznany zespółem Löfgrena, stwierdzonymi w badaniu TKWR płuc guzkami sarkoidalnymi i włóknieniem.	23
Wykres 4. Rozkład procentowy włóknienia i jego nasilenie, stwierdzone na podstawie badania TKWR płuc u chorych na sarkoidozę (w.- włóknienie).....	23
Wykres 5. Czas trwania sarkoidozy w latach w momencie wykonywania badania (rozkład procentowy).	24
Wykres 6. Rozkład procentowy chorych na sarkoidozę leczonych w przeszłości glikokorykosteroidami.	24
Wykres 7. Odsetek limfocytów CXCR6+CD4+ w BAL i krwi obwodowej u chorych na sarkoidozę i w grupie kontrolnej.....	30
Wykres 8. Odsetek limfocytów CXCR6+CD8+ w BAL i krwi obwodowej u chorych na sarkoidozę i w grupie kontrolnej.....	30
Wykres 9. Odsetek limfocytów CXCR6+CD4+ w BAL w zależności od stadium sarkoidozy.	31
Wykres 10. Odsetek limfocytów CXCR6+CD8+ w BAL w zależności od stadium sarkoidozy.	32
Wykres 11. Odsetek limfocytów CXCR6+CD4+ we krwi w zależności od stadium sarkoidozy.	33
Wykres 12. Odsetek limfocytów CXCR6+CD8+ we krwi w zależności od stadium sarkoidozy.	34
Wykres 13. Odsetek limfocytów CD4+ i CD8+ w BAL i krwi obwodowej u chorych na sarkoidozę i w grupie kontrolnej.	37
Wykres 14. Stosunek limfocytów CD4+ do CD8+ w BAL i krwi obwodowej u chorych na sarkoidozę i w grupie kontrolnej.....	37
Wykres 15. Odsetek limfocytów CD4+ i CD8+ w BAL i krwi obwodowej u chorych na sarkoidozę w zależności od stwierdzanego zespołu Löfgrena.....	39
Wykres 16. Stosunek limfocytów CD4+ do CD8+ w BAL i krwi obwodowej u chorych na sarkoidozę w zależności od stwierdzanego zespołu Löfgrena.....	39
Wykres 17. Odsetek limfocytów CD4+ i CD8+ w BAL i krwi obwodowej w zależności od stwierdzanej progresji klinicznej sarkoidozy.	41

Wykres 18. Stosunek limfocytów CD4+ do CD8+ w BAL i krwi obwodowej w zależności od stwierdzonej progresji klinicznej sarkoidozy.	41
Wykres 19. Odsetek limfocytów CD4+ i CD8+ w BAL i krwi obwodowej u chorych na sarkoidozę w zależności od stwierdzanego w badaniu TKWR płuc nasilenia włóknienia.	43
Wykres 20. Stosunek limfocytów CD4+ do CD8+ w BAL i krwi obwodowej u chorych na sarkoidozę w zależności od stwierdzanego w badaniu TKWR płuc nasilenia włóknienia.	43
Wykres 21. Odsetek limfocytów CD4+ i CD8+ w BAL i krwi obwodowej w zależności od stwierdzanych w badaniu TKWR płuc guzków sarkoidalnych.	45
Wykres 22. Stosunek limfocytów CD4+ do CD8+ w BAL i krwi obwodowej w zależności od stwierdzanych w badaniu TKWR płuc guzków sarkoidalnych.	45
Wykres 23. Odsetek limfocytów CD4+ w BAL w zależności od stadium sarkoidozy w porównaniu do grupy kontrolnej.	47
Wykres 24. Odsetek limfocytów CD8+ w BAL w zależności od stadium sarkoidozy w porównaniu do grupy kontrolnej.	48
Wykres 25. Stosunek limfocytów CD4+ do CD8+ w BAL w zależności od stadium sarkoidozy w porównaniu do grupy kontrolnej.	49
Wykres 26. Odsetek limfocytów CD4+ we krwi w zależności od stadium sarkoidozy w porównaniu do grupy kontrolnej.	50
Wykres 27. Odsetek limfocytów CD8+ we krwi w zależności od stadium sarkoidozy w porównaniu do grupy kontrolnej.	51
Wykres 28. Stosunek limfocytów CD4+ do CD8+ we krwi w zależności od stadium sarkoidozy w porównaniu do grupy kontrolnej.	52
Wykres 29. Odsetek limfocytów TCR $\alpha\beta$ CD4+, TCR $\gamma\delta$ CD4+, TCR $\alpha\beta$ CD8+, TCR $\gamma\delta$ CD8+ w BAL u chorych na sarkoidozę i w grupie kontrolnej.	54
Wykres 30. Stosunek limfocytów TCR $\alpha\beta$ CD4+ do TCR $\gamma\delta$ CD4+ i stosunek limfocytów TCR $\alpha\beta$ CD8+ do TCR $\gamma\delta$ CD8+ w BAL u chorych na sarkoidozę i w grupie kontrolnej.	54
Wykres 31. Odsetek limfocytów TCR $\alpha\beta$ CD4+, TCR $\gamma\delta$ CD4+, TCR $\alpha\beta$ CD8+, TCR $\gamma\delta$ CD8+ w BAL u chorych na sarkoidozę w zależności od stwierdzonych w badaniu TKWR płuc powiększonych węzłów chłonnych.	55
Wykres 32. Stosunek limfocytów TCR $\alpha\beta$ CD4+ do TCR $\gamma\delta$ CD4+ i stosunek limfocytów TCR $\alpha\beta$ CD8+ do TCR $\gamma\delta$ CD8+ w BAL u chorych na sarkoidozę w zależności od stwierdzonych w badaniu TKWR płuc powiększonych węzłów chłonnych.	55

Wykres 33. Odsetek limfocytów CD45RO+CD4+, CD45RA+CD4+, CD45RO+CD8+, CD45RA+CD8+ w BAL u chorych na sarkoidozę i w grupie kontrolnej.	56
Wykres 34. Stosunek limfocytów CD45RO+CD4+ do CD45RA+CD4+ i CD45RO+CD8+ do CD45RA+CD8+ w BAL u chorych na sarkoidozę i w grupie kontrolnej.	57
Wykres 35. Odsetek limfocytów CD45RO+CD8+ i CD45RA+CD8+ we krwi u chorych na sarkoidozę i w grupie kontrolnej.	57
Wykres 36. Odsetek limfocytów CD45RA+CD8+ w BAL u chorych na sarkoidozę w zależności od stwierdzanych w badaniu TKWR płuc powiększonych węzłów chłonnych.	58
Wykres 37. Odsetek limfocytów CD45RO+CD4+ w BAL u chorych na sarkoidozę w zależności od stwierdzanego w badaniu TKWR płuc włóknienia.	58
Wykres 38. Odsetek limfocytów CD28+CD4+ i CD28+CD8+ w BAL u chorych na sarkoidozę i w grupie kontrolnej.	60
Wykres 39. Odsetek limfocytów CD28+CD4+ i CD28+CD8+ w BAL u chorych na sarkoidozę w zależności od zespołu Löfgrena w porównaniu z grupą kontrolną.	61
Wykres 40. Odsetek limfocytów CD28+CD4+ i CD28+CD8+ we krwi u chorych na sarkoidozę w zależności od zespołu Löfgrena w porównaniu z grupą kontrolną.	61
Wykres 41. Odsetek limfocytów CD28+CD4+ i CD28+CD8+ w BAL u chorych na sarkoidozę w zależności od stwierdzanych w badaniu TKWR płuc guzków sarkoidalnych.	62
Wykres 42. Odsetek limfocytów CD28+CD4+ i CD28+CD8+ w BAL u chorych na sarkoidozę w zależności od stwierdzanego w badaniu TKWR płuc włóknienia.	62
Wykres 43. Odsetek limfocytów CD28+CD4+ i CD28+CD8+ w BAL u chorych na sarkoidozę w zależności od nasilenia włóknienia, stwierdzanego w badaniu TKWR płuc.	63
Wykres 44. Odsetek limfocytów CD28+CD4+ i CD28+CD8+ w BAL u chorych na sarkoidozę w zależności od stwierdzanych w badaniu TKWR płuc zmian, tj. guzków sarkoidalnych i włóknienia.	63
Wykres 45. Odsetek limfocytów CD69+CD4+ i CD69+CD8+ w BAL u chorych na sarkoidozę i w grupie kontrolnej.	65
Wykres 46. Odsetek limfocytów CD69+CD4+ i CD69+CD8+ we krwi u chorych na sarkoidozę i w grupie kontrolnej.	65
Wykres 47. Odsetek limfocytów CD69+CD4+ i CD69+CD8+ w BAL u chorych na sarkoidozę w zależności od rozpoznanego zespołu Löfgrena.	66

Wykres 48. Odsetek limfocytów CD69+CD4+ i CD69+CD8+ we krwi u chorych na sarkoidozę w zależności od rozpoznanego zespołu Löfgrena.....	66
Wykres 49. Odsetek limfocytów CD69+CD4+ i CD69+CD8+ w BAL u chorych na sarkoidozę w zależności od czasu trwania choroby.	67
Wykres 50. Odsetek limfocytów HLA-DR+CD4+ i HLA-DR+CD8+ w BAL u chorych na sarkoidozę i w grupie kontrolnej.	68
Wykres 51. Odsetek limfocytów HLA-DR+CD4+ i HLA-DR+CD8+ we krwi u chorych na sarkoidozę i w grupie kontrolnej.	68
Wykres 52. Odsetek limfocytów HLA-DR+CD4+ i HLA-DR+CD8+ w BAL u chorych na sarkoidozę w zależności od rozpoznanego zespołu Löfgrena.	69
Wykres 53. Odsetek limfocytów HLA-DR+CD4+ i HLA-DR+CD8+ w BAL u chorych na sarkoidozę w zależności od czasu trwania choroby.	69
Wykres 54. Odsetek limfocytów CD25+CD4+ i CD25+CD8+ w BAL u chorych na sarkoidozę i w grupie kontrolnej.....	71
Wykres 55. Odsetek limfocytów CD25+CD4+ i CD25+CD8+ we krwi u chorych na sarkoidozę i w grupie kontrolnej.....	71
Wykres 56. Odsetek limfocytów CD25+CD4+ i CD25+CD8+ w BAL u chorych na sarkoidozę w zależności od rozpoznanego zespołu Löfgrena.....	72
Wykres 57. Odsetek limfocytów CD25+CD4+ i CD25+CD8+ w BAL u chorych na sarkoidozę w zależności od czasu trwania choroby.	72
Wykres 58. Odsetek limfocytów CD25+CD4+ i CD25+CD8+ w BAL u chorych na sarkoidozę w zależności od nasilenia włóknienia, stwierdzanego w badaniu TKWR płuc.	73
Wykres 59. Odsetek limfocytów CD154+CD4+ i CD154+CD8+ w BAL u chorych na sarkoidozę i w grupie kontrolnej.....	74
Wykres 60. Odsetek limfocytów CD154+CD4+ i CD154+CD8+ we krwi u chorych na sarkoidozę i w grupie kontrolnej.....	74
Wykres 61. Odsetek limfocytów CD154+CD4+ i CD154+CD8+ we krwi u chorych na sarkoidozę w zależności od nasilenia włóknienia, stwierdzanego w badaniu TKWR płuc.	75

10. Spis tabel

Tabela 1. Stadia sarkoidozy (RTG- badanie radiologiczne).....	9
Tabela 2. Charakterystyka badanych grup.....	22
Tabela 3. Odsetek limfocytów T CXCR6+CD4+ i CXCR6+CD8+ w BAL u chorych na sarkoidozę i w grupie kontrolnej.....	29
Tabela 4. Odsetek limfocytów T CXCR6+CD4+ i CXCR6+CD8+ we krwi u chorych na sarkoidozę i w grupie kontrolnej.....	29
Tabela 5. Istotności statystycznie pomiędzy różnicami w odsetku limfocytów CXCR6+CD4+ w BAL w zależności od stadium sarkoidozy w porównaniu do grupy kontrolnej.....	31
Tabela 6. Istotności statystycznie pomiędzy różnicami w odsetku limfocytów CXCR6+CD8+w BAL w zależności od stadium sarkoidozy w porównaniu do grupy kontrolnej.....	32
Tabela 7. Istotności statystycznie pomiędzy różnicami w odsetku limfocytów CXCR6+CD4+we krwi w zależności od stadium sarkoidozy w porównaniu do grupy kontrolnej.....	33
Tabela 8. Istotności statystycznie pomiędzy różnicami w odsetku limfocytów CXCR6+CD8+ we krwi w zależności od stadium sarkoidozy w porównaniu do grupy kontrolnej.....	34
Tabela 9. Parametry statystyczne limfocytów CD4+ i CD8+ w BAL i krwi obwodowej u chorych na sarkoidozę.....	38
Tabela 10. Parametry statystyczne limfocytów CD4+ i CD8+ w BAL i krwi obwodowej w grupie kontrolnej.....	38
Tabela 11. Parametry statystyczne limfocytów CD4+ i CD8+ w BAL i krwi obwodowej u chorych na sarkoidozę z rozpoznaniem zespołu Löfgrena.....	40
Tabela 12. Parametry statystyczne limfocytów CD4+ i CD8+ w BAL i krwi obwodowej u chorych na sarkoidozę bez rozpoznania zespołu Löfgrena.....	40
Tabela 13. Parametry statystyczne limfocytów CD4+ i CD8+ w BAL i krwi obwodowej u chorych na sarkoidozę z progresją kliniczną.....	42
Tabela 14. Parametry statystyczne limfocytów CD4+ i CD8+ w BAL i krwi obwodowej u chorych na sarkoidozę bez progresji klinicznej.....	42
Tabela 15. Parametry statystyczne limfocytów CD4+ i CD8+ w BAL i krwi obwodowej u chorych na sarkoidozę ze stwierdzonym w badaniu TKWR płuc włóknieniem, opisanym jako znacznie nasilone włóknienie płuc.....	44

Tabela 16. Parametry statystyczne limfocytów CD4+ i CD8+ w BAL i krwi obwodowej u chorych na sarkoidozę ze stwierdzonym w badaniu TKWR płuc włóknieniem, opisanym jako dyskretne zmiany włókniste płuc.....	44
Tabela 17. Parametry statystyczne limfocytów CD4+ i CD8+ w BAL i krwi obwodowej u chorych na sarkoidozę ze stwierdzonymi w badaniu TKWR płuc guzkami sarkoidalnymi.	46
Tabela 18. Parametry statystyczne limfocytów CD4+ i CD8+ w BAL i krwi obwodowej w grupie chorych na sarkoidozę bez stwierdzonych w badaniu TKWR płuc guzków sarkoidalnych.	46
Tabela 19. Istotności statystycznie pomiędzy odsetkami limfocytów CD4+ w BAL w zależności od stadium sarkoidozy w porównaniu do grupy kontrolnej.	47
Tabela 20. Istotności statystycznie pomiędzy odsetkami limfocytów CD8+ w BAL w zależności od stadium sarkoidozy w porównaniu do grupy kontrolnej.	48
Tabela 21. Istotności statystycznie pomiędzy stosunkami limfocytów CD4+ do CD8+ w BAL w zależności od stadium sarkoidozy w porównaniu do grupy kontrolnej.....	49
Tabela 22. Istotności statystycznie pomiędzy odsetkami limfocytów CD4+ we krwi w zależności od stadium sarkoidozy w porównaniu do grupy kontrolnej.	50
Tabela 23. Istotności statystycznie pomiędzy odsetkami limfocytów CD8+ we krwi w zależności od stadium sarkoidozy w porównaniu do grupy kontrolnej.	51
Tabela 24. Istotności statystycznie pomiędzy stosunkami limfocytów CD4+ do CD8+ we krwi w zależności od stadium sarkoidozy w porównaniu do grupy kontrolnej.....	52

11. Piśmiennictwo

1. Agostini C. Alveolar macrophage-T cell interactions during Th1-type sarcoid inflammation. *Micros Res Tech.* 2001; 53: 278-287
2. Agostini C. Limfocyty T i cytokiny w sarkoidozie. Sarkoidoza w XXI wieku- leczenie i postępowanie. Red.Sharma Om.P., red. wydania polskiego Pirożyński M. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, 2003: 2(6): 10-15
3. Agostini C. Role for CXCR6 and its ligand CXCL16 in the pathogenesis of T-cell alveolitis in sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005; 172 (10): 1290-1298
4. Baran J. Cytometria przepływowa- istota metody i jej wykorzystanie. *Mikrobiologia Medyczna*, 1996; 3(8):33-40

5. Baughman R. Increased Pneumocystic carini recovery form upper lobes in pneumocystis pneumonia. The effect aerosol pentamidine prophylaxis. Chest. 1993; 103:426-432
6. Baughman R.P. Stare i nowe możliwości leczenia sarkoidozy. Sarkoidoza w XXI wieku- leczenie i postępowanie. Red.Sharma Om.P., red. wydania polskiego Pirożyński M. Current Opinion in Pulmonary Medicine, 2003: 2(6): 21-26
7. Baughman R.P. Treatment of sarcoidosis. Clin Chest Med. 2008; 29:533-548
8. Beacher-Allan C. CD4+CD25 high regulatory cells in human peripheral blood. J Immunol. 2001;167(3):1245-1253
9. Berner B. Increased expression of CD40 ligand (CD154) on CD4+ T cells as a marker of disease activity in rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis. 2000; 59:190-195.
10. Boisvert J. Liver-infiltrating lymphocytes in end-stage hepatitis C virus: subsets, activation status, and chemokine receptor phenotypes. J Hepatol. 2003; 38: 67-75
11. Bour-Jordan H. Regulating the regulators: costimulatory signals control the homeostasis and function of regulatory T cells. Immunol Rev. 2009; 229(1): 41-66
12. Broder Ch. C. Chemokine receptors and HIV. J Leukoc Biol. 1997; 62: 20-29
13. Brusko T.M. Human regulatory T cell: role in autoimmune disease and therapeutic opportunities. Immunol Rev. 2008; 223: 371-390
14. Bryl E. Human CD4^{low} CD25^{high} regulatory Tcells indiscriminately kill autologous activated T cells. Immunology. 2009; 128(1): 287-295
15. Campbell D.J. Targeting T cell responses by selective chemokine receptor expression. Semin Immunol. 2003; 15: 277-286
16. Capelli A. Increased macrophage inflammatory protein-1 α and macrophage inflammatory protein-1 β levels in bronchoalveolar lavage fluid of patients affected by different stages of pulmonary sarcoidosis. Am J Respir Crit Care Med. 2002; 167: 236-241
17. Comerford I. An immune paradox: how can the same chemokine axis regulate both immune tolerance and activation? Bioessays. 2010; 32: 1067-1076
18. Costabel U. Płukanie oskrzelowo-pęcherzykowe w chorobach śródmiąższowych płuc. Red. Sharma O.P.,red. wydania polskiego Chazan R. Current Opinion in Pulmonary Medicine. 2001; 1(12):13-19

19. Dac A. Zmiany fenotypowe i czynnościowe limfocytów T CD4+ u pacjentów z toczniem rumieniowatym układowym, ze szczególnym uwzględnieniem limfocytów T regulatorowych. Rozprawa doktorska Gdańsk 2011; Promotor: dr hab. n. med. E. Bryl
20. Danila E. BAL fluid cells and pulmonary function in different radiographic stages of newly diagnosed sarcoidosis. *Adv Med Sci.* 2008; 53(2): 228-233
21. Danila E. BAL fluid cells in newly diagnosed pulmonary sarcoidosis with different clinical activity. *Ups J Med Sci.* 2009; 114: 26-31
22. Darvid R. Przyczyny sarkoidozy. Sarkoidoza w XXI wieku- leczenie i postępowanie. Red.Sharma O.P., red. wydania polskiego Pirożyński M. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, 2003; 2(6): 4-9
23. Deng H.K. Expression cloning of new receptors used by simian and human immunodeficiency viruses. *Nature* 1997;388: 296-300
24. Domagała-Kulawik J. BAL in the diagnosis of smoking-related interstitial lung Disease: review of literature and analysis of our experience. *Diagn Cytopathol.* 2008; 36(12): 909-915
25. Domagała-Kulawik J. Trudności interpretacyjne w ocenie rozmazów komórkowych BAL i płwociny indukowanej. *Pneumonol Alergol Pol.* 2007; 75 (3): 261-267
26. Domagała-Kulawik Role of bronchoalveolar lavage in the initial diagnosis of smoking-related interstitial lung diseases. *J Physiol Pharmacol.* 2008; 59(6): 243-251
27. Drent M. Does the cellular bronchoalveolar lavage fluid profile reflect the severity of sarcoidosis? *Eur Respir J.* 1999; 13: 1338-1344
28. Drent M. Sarcoidosis: assessment of disease severity using HRCT. *Eur Radiol.* 2003; 13: 2462-2471
29. Dubaniewicz A. Sarkoidoza- choroba o wielu twarzach. *Forum Medycyny Rodzinnej* 2009; 3(1): 27-41
30. Dubaniewicz A. Udział białek szoku termicznego *Mycobacterium tuberculosis* w etiopatogenezie sarkoidozy. Rozprawa habilitacyjna; 2007, Dział Wydawnictw AMG, Gdańsk
31. Duggleby R.C. CD27 expression discriminates between regulatory and non-regulatory cells after expansion human peripheral blood CD4+CD25+ cells. *Immunology.* 2007; 121(1):129-139
32. Facco M. Expression and role of CCR6/CCL20 chemokine axis in pulmonary sarcoidosis. *J Leukoc Biol.* 2007; 82: 946-955

33. Facco M. Sarcoidosis is a Th1/Th17 multisystem disorder. *Thorax*. 2011; 66: 144-150
34. Fujii T. Gamma-delta T cell in BAL fluid of chronic lower respiratory tract infection. *Chest*. 1997; 111: 1697-1701
35. Gilliam B.L. Clinical use of CCR5 inhibitors in HIV and beyond. *J Transl Med*. 2010; 9(1): 1-14
36. Glatzel A. Patterns of chemokine receptor expression on peripheral blood $\gamma\delta$ T lymphocytes: strong expression of CCR5 is a selective feature of V δ 2/V γ 9 T cells. *J Immunol*. 2002; 168: 4920-4929
37. Gołab J., Jakóbsiak M., Lasek W. *Immunologia*, PWN, Warszawa 2005, ISBN 83-01-14262-6
38. Grunewald J. Role of CD4+ T cells in sarcoidosis. *Proc Am Thorac Soc*. 2007; 4: 461-464
39. Grutters J.C. Corticosteroid treatment in sarcoidosis. *Eur Respir J*. 2006; 28: 627-636
40. Gurrieri C. Cytokines, chemokine and other biomolecular markers in sarcoidosis. *Sarcoidosis Vas Diffuse Lung Dis*. 2005; 22: 9-14
41. Heron M. Evaluation of CD103 as a cellular marker for the diagnosis of pulmonary sarcoidosis. *Clin Immunol*. 2008; 126: 338-344
42. Heron M. T cell activation profiles in different granulomatous interstitial lung diseases - a role for CD8+CD28^{null} cells? *Clin Exp Immunol*. 2009; 160:256-265
43. Hislop A.D. EBV-specific CD8+ T cell memory: relationships between epitope specificity, cell phenotype, and immediate effector function. *J Immunol*. 2001; 167: 2019-2029
44. Kantorski J. Podstawy cytometrii przepływowej. *Central-European Journal of Immunology*, 1996; 21: 87-93
45. Kantrow S.P. The CD4/CD8 ratio in BAL fluid is highly variable in sarcoidosis. *Eur Respir J*. 1997; 10: 2716-2721
46. Kim Ch. H. Distinct subsets of human V α 24-invariant NKT cells: cytokine responses and chemokine receptor expression. *Trends Immunol*. 2002; 23 (11): 516-519
47. Kim Ch.H. Rules of chemokine receptor association with T cell polarization in vivo. *J Clin Invest*. 2001; 108: 1331-1339
48. Kuhmann S.E. Targeting chemokine receptors in HIV: a status report. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2008; 48: 452-461

49. Kuśnierz-Cabala B. Cytofluorymetria przepływowa i jej znaczenie w diagnostyce hematologicznej. *Badanie i Diagnoza*, 1999; 5(12):85-88
50. Lee N.S. Low levels of NF- κ B/p65 mark anergic CD4⁺ T cells and correlate with disease severity in sarcoidosis. *Clin Vaccine Immunol.* 2011; 18 (2): 223-234
51. Ling-Pei Ho. Deficiency of a subset of T cells with immunoregulatory properties in sarcoidosis. *Lancet.* 2005; 365:1062-1072
52. Lockstone H. E. Gene Set Analysis of lung samples provides insight into pathogenesis of progressive, fibrotic pulmonary sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010; 181:1367-1375
53. Luther S. A. Chemokines as regulators of T cell differentiation. *Nat Immunol* 2001; 2:102-107
54. Mackay C. Chemokines: immunology's high impact factors. *Nat Immunol.* 2001; 2: 95-101
55. Mana J. Erythema nodosum. *Clin Dermatol.* 2007; 25(3): 288-294
56. Morgan A.J. Expression of CXCR6 and its ligand CXCL16 in the lung health and disease. *Clin Exp Allergy.* 2005; 35:1572-1580
57. Morgenthau A. S. Recent advances in sarcoidosis. *Chest.* 2011; 139: 174-182
58. Morice A.H. The diagnosis and management of chronic cough. *Eur Respir J.* 2004; 24: 481-492
59. Müller-Quernheim J. Interleukin-2 receptor gene expression by broncho-alveolar lavage lymphocytes in pulmonary sarcoidosis. *Am Rev Respir Dis.* 1989; 140: 82-88
60. Nanki T. Pathogenic role of the CXCL16-CXCR6 pathway in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2005; 52(10): 3004-3014
61. Newman L.S. A case control etiologic study of sarcoidosis: environmental and occupational risk factors. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004; 170(12): 1324-1330
62. Nicod L. P. Alveolar macrophages in sarcoidosis coexpress high levels of CD86 (B7.2), CD40, and CD30L. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1997; 17: 91-96
63. Piotrowski W. Sarkoidoza. *Wielka Interna, Pulmonologia część II*, red. Antczak A.; Wydanie I, Warszawa 2010, ISBN 978-83-60135-92-1

64. Płodziszewska M. Sarkoidoza; Choroby śródmiąższowe płuc pod redakcją Roziwńska-Zakrzewska E., Wiatr E., Pirożyński M. Rozdział 8, α-medica Press, Bielsko-Biała 2001, ISBN 83-88778-08-0
65. Porzezińska M. Zastosowanie techniki płwociny indukowanej w diagnostyce, ocenie dynamiki i monitorowaniu przebiegu sarkoidozy płuc. Rozprawa doktorska Gdańsk 2004; Promotor: prof. dr hab. n med. J.M. Słomiński
66. Raghu G. An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management . Am J Respir Crit Care Med. 2011; 183(6): 788-824
67. Ramsdell F. Foxp3 and natural regulatory T cells: key to a cell lineage? Immunity. 2003; 19(2): 165-168
68. Reynolds H. Y. Bronchoalveolar lavage and other methods to define the human respiratory tract milieu in health and disease. Lung. 2011; 189: 87-99
69. Robinson D. S. Predominant Th2-like bronchoalveolar T lymphocyte population in atopic asthma. N Eng J Med. 1992; 326: 298-304
70. Romero P. Four functionally distinct populations of human effector-memory CD8+ T lymphocyte. J Immunol. 2007; 178: 4112-1119
71. Rossi D. The biology of chemokine and their receptors. Annu Rev Immunol. 2000; 18: 217 -242
72. Sallusto F. The role of chemokine receptors in primary, effector and memory immune responses. Annu Rev Immunol. 2000; 18: 593-620
73. Saltini C. Biased accumulation of T lymphocyte with „memory”- type CD45 leukocyte common antigen gene expression on the epithelial surface of the human lung. J Exp Med. 1990; 171: 1123-1140
74. Saltini C. Spontaneous release of interleukin-2 by lung T lymphocyte in active pulmonary sarcoidosis is primarily from the Leu3+DR+T cell subset. J Clin Invest. 1986; 77: 1962-1970
75. Saltini C. The lung epithelial immune system. J Immunolo Res. 1991; 3: 43-48
76. Schoenfeld N. Activation of bronchoalveolar lavage T lymphocytes and clinical, functional and radiological features in sarcoidosis. Sarcoidosis. 1995;12: 135-139
77. Semezato G. Immunopathogenesis of sarcoidosis. Sarcodiosis. 1994; 11 (1): 59-71

78. Semezato G. Redistribution of T lymphocytes in the lymph nodes of patients with sarcoidosis. *N Engl J Med.* 1982; 306:48-49
79. Sharif S. Activation of natural killer T cell by alpha-galactosylceramide treatment prevents the onset and recurrence of autoimmune type 1 diabetes. *Nat Med.* 2001; 7(9): 1057-1062
80. Sharma O. P. Sarkoidoza i inne choroby autoimmunologiczne. Sarkoidoza w XXI wieku- leczenie i postępowanie. Red.Sharma Om.P., red. wydania polskiego Pirożyński M. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, 2003; 2(6): 16-20
81. Sharma O.P. Sarcoidosis: a historical perspective. *Clin Dermatol.* 2007; 25(3): 232-241
82. Shimaoka T. Cutting Edge: SR-PSOX/CXC chemokine ligand 16 mediates bacterial phagocytosis by APCs through its chemokine domain. *J Immunol.* 2003;171: 1647-1651
83. Spurzem J.R. Expression of HLA class II genes in alveolar macrophages of patients with sarcoidosis. *Am Rev Respir Dis.* 1989; 140: 89-94
84. Suri-Payer E. CD4+CD25+T cells inhibit both the induction and effector function of autoreactive T cells and represent a unique lineage of immunoregulatory cells. *J Immunol.* 1998; 160(3): 1212-1218
85. Suzuki K. Prognostic value of Ia⁺ T lymphocytes in bronchoalveolar lavage fluid in pulmonary sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996; 154: 707-712
86. Szczeklik A. Choroby wewnętrzne. Wydanie I, Kraków 2005, ISBN 83-7430-031-0
87. Tateyama M. Dendritic cells in muscle lesions of sarcoidosis. *Human Pathology.* 2011; 42: 340-346
88. Tazi A. Gamma/Delta T lymphocytes are not increased in number in granulomatous lesions of patients with tuberculosis or sarcoidosis. *Am Rev Respir Dis.* 1991;144: 1373-1375
89. Thornton A.M. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med.* 1998; 188(2): 287-296
90. Trzonkowski P. CD4+CD25+ T regulatory cells inhibit cytotoxic activity of CTL and NK cells in humans-impact of immunosenescence. *Clin Immunol.* 2006; 119(3): 307-316
91. Vasakova M. Bronchoalveolar lavage fluid cellular characteristics, functional parameters and cytokine and chemokine levels in interstitial lung diseases. *Scand J Immunol.* 2009; 69: 268-274

92. Vincent M.S. Understanding the function of CD1-restricted T cells. *Nat Immunol.* 2003; 4: 517-523
93. Wahlström J. Phenotypic analysis of lymphocytes and monocytes/macrophages in peripheral blood and bronchoalveolar lavage fluid from patients with pulmonary sarcoidosis. *Thorax.* 1999; 54: 339-346
94. Wang L. An association between immunosenescence and CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells: a systematic review. *Biomed Environ Sci.* 2010; 23: 327-332
95. Wells A.U. Interstitial lung disease guideline: the British Thoracic Society in collaboration with the Thoracic Society of Australia and New Zealand and the Irish Thoracic Society. *Torax.* 2008; 63: 1-58
96. Wiatr E. Klasyfikacja chorób śródmiąższowych z omówieniem sarkoidozy, alergicznego zapalenie pęcherzyków płucnych i samoistnego włóknienia płuc. *Medycyna po Dyplomie.* 2008; supl.01: 35-41
97. Wieckiewicz J. T regulatory cells and the control of alloimmunity: from characterisation to clinical application. *Curr Opin Immunol.* 2010; 22(5): 662-628
98. Winterbauer R. H. Bronchoalveolar lavage cell populations in the diagnosis of sarcoidosis. *Chest.* 1993; 104: 352-361
99. Wisner M.L. Gamma/delta cells in tissue from patients with sarcoidosis. *Torax.* 1996; 51: 1123-1126
100. Xaubet A. BAL lymphocyte activation antigens and diffusing capacity are related in mild to moderate pulmonary sarcoidosis. *Eur Respir J.* 1993; 6: 715-718
101. Zaba L.C. Dendritic cells in the pathogenesis of sarcoidosis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2010; 42: 32-39
102. Zheng L. Alveolar macrophage TNF- α release and BAL cell phenotypes in sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995; 152: 1061-1066
103. Ziegenhagen M.W. Bronchoalveolar and serological parameters reflecting the severity of sarcoidosis. *Eur Respir J.* 2003; 21: 407-413
104. Ziora D. Ocena homogenności fazy zapalnej "alveolitis" u chorych na sarkoidozę na podstawie oznaczania wybranych subpopulacji limfocytów i stężeń wybranych cytokin w popłuczynach oskrzelowo-pęcherzykowych (BAL) z dwóch różnych segmentów płuc, wskazanych badaniem tomografii komputerowej o wysokiej rozdzielczości (HRCT). Rozprawa habilitacyjna. Katowice 1998