

**AKADEMIA MEDYCZNA W GDAŃSKU**  
**KATEDRA I ZAKŁAD FIZJOPATOLOGII**

**Anna Dubaniewicz**

**UDZIAŁ BIAŁEK SZOKU TERMICZNEGO**  
***MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS***  
**W ETIOPATOGENEZIE SARKOIDOZY**

**Rozprawa habilitacyjna**

**GDAŃSK 2007**

Wydano za zgodą  
Senackiej Komisji Wydawnictw Akademii Medycznej w Gdańsku

© Copyright by Medical University of Gdańsk

Wydawca: *Akademia Medyczna w Gdańsku*  
Druk: *Dział Wydawnictw AMG*  
*ul. Marii Skłodowskiej-Curie 3a,*  
*Zlecenie KW/187/07*

*Moim Rodzicom*



**Profesorowi dr hab. med. J. Morysiowi, Dziekanowi Wydziału Lekarskiego AMG, dziękuję za motywację do złożenia projektu grantu KBN, w ramach którego zrealizowano poniższą pracę habilitacyjną**

**Dziękuję dr hab. med. J.M. Witkowskiemu, profesorowi AMG, za pomoc w walce z chorobą mojego Taty w trakcie pisania poniższej rozprawy oraz wsparcie merytoryczne**

**Szczególne wyrazy wdzięczności składam dr D. Wieczorkowi z Katedry i Zakładu Rehabilitacji AMG za pomoc, bez której ta i żadna inna praca badawcza po 1997 r. nie powstałaby**

## Indeks używanych skrótów

<b>APC</b>	komórki prezentujące antygen ( <i>ang. Antigen Presenting Cells</i> )
<b>BAL</b>	płukanie oskrzelowo-pęcherzykowe ( <i>bronchoalveolar lavage</i> )
<b>BCG</b>	szczepionka przeciw gruźlicy ( <i>Bacillus Calmette-Guerin</i> )
<b>CR</b>	receptory dla fragmentów dopełniacza ( <i>ang. Complement Receptors</i> )
<b>FcR</b>	receptory dla fragmentu Fc immunoglobulin ( <i>ang. Fc Receptors for immunoglobulins</i> )
<b>HLA</b>	układ antygenów zgodności tkankowej ( <i>ang. Human Leukocyte Antigen</i> )
<b>Hsp</b>	rodzina białek szoku termicznego ( <i>ang. Heat Shock Proteins family</i> )
<b>hsp</b>	białka szoku termicznego ( <i>ang. heat shock proteins</i> )
<b>IL</b>	interleukina
<b>INF-<math>\gamma</math></b>	interferon gamma
<b>Mtb</b>	prątek gruźlicy ( <i>Mycobacterium tuberculosis</i> )
<b>NO</b>	tlenek azotu ( <i>ang. Nitric Oxide</i> )
<b>iNOS</b>	indukowana syntaza tlenku azotu ( <i>ang. inducible Nitric Oxide Synthase</i> )
<b>NRAMP1</b>	białko naturalnej odpowiedzi związanej z makrofagami 1 ( <i>ang. Natural Resistance-Associated Macrophage Protein one</i> )
<b>PBMC</b>	komórki jednojądrzaste krwi obwodowej ( <i>ang. Peripheral Blood Mononuclear Cells</i> )
<b>PCR-SSP</b>	reakcja łańcuchowa polimerazy z zastosowaniem swoistych primerów ( <i>ang. Polymerase Chain Reaction-Sequence-Specific Primer</i> )
<b>PHA</b>	fitohemagglutynina ( <i>ang. phytohemagglutinin</i> )
<b>PPD</b>	oczyszczona tuberkulina ( <i>ang. Purified Protein Derivative</i> )
<b>PSH</b>	stan przedziarniniakowy ( <i>ang. pregranulomatous phase</i> )
<b>TB</b>	gruźlica
<b>TCR</b>	receptor dla antygeny na limfocytach T ( <i>ang. T-Cell Receptor</i> )
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	transformujący czynnik wzrostu beta ( <i>ang. Transforming Growth Factor-beta</i> )
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	czynnik martwicy nowotworów alfa ( <i>ang. Tumor Necrosis Factor-alfa</i> )
<b>TNFR</b>	receptor dla TNF- $\alpha$
<b>SA</b>	sarkoidoza

# SPIS TREŚCI

<b>I.</b>	<b>WSTĘP .....</b>	<b>11</b>
<b>II.</b>	<b>CEL PODJĘTYCH BADAŃ.....</b>	<b>17</b>
<b>III.</b>	<b>MATERIAŁ I METODY .....</b>	<b>18</b>
<b>IV.</b>	<b>OMÓWIENIE WYNIKÓW ZAGADNIENÍ ROZPRAWY HABILITACYJNEJ.....</b>	<b>20</b>
	1. IDENTYFIKACJA <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i> COMPLEX I JEGO ANTYGENÓW (BIAŁEK SZOKU TERMICZNEGO – MTB-HSP70, MTB-HSP65 I MTB-HSP16).....	20
	2. UDZIAŁ BIAŁEK SZOKU TERMICZNEGO <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i> W ZMIENIONEJ REAKTYWNOŚCI IMMUNOLOGICZNEJ CHORYCH NA SARKOIDOZĘ I CHORYCH NA GRUŻLICĘ .....	23
	3. UWARUNKOWANIE GENETYCZNE WYSTĘPOWANIA SARKOIDOZY ALBO GRUŻLICY W TEJ SAMEJ GRUPIE ETNICZNEJ .....	29
<b>V.</b>	<b>SYNTETYCZNE OMÓWIENIE WYNIKÓW .....</b>	<b>35</b>
<b>VI.</b>	<b>WNIOSKI .....</b>	<b>38</b>
<b>VII.</b>	<b>PIŚMIENNICTWO .....</b>	<b>39</b>
<b>VIII.</b>	<b>ZAŁĄCZONE PUBLIKACJE .....</b>	<b>47</b>





## Spis opublikowanych prac będących przedmiotem rozprawy habilitacyjnej

1. **Dubaniewicz A**, Dubaniewicz-Wybieralska M, Sternau A, Zwolska Z, Iżycka - Świeżewska E, Augustynowicz-Kopeć E, Skokowski J, Singh M, Zimnoch L. *Mycobacterium tuberculosis* complex and mycobacterial heat shock proteins in lymph nodes from patients with pulmonary sarcoidosis. *J Clin Microbiol* 2006;44:3448-3451.
2. **Dubaniewicz A**, Kämpfer S, Singh M. Serum anti-mycobacterial heat shock proteins antibodies in sarcoidosis and tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)*. 2006; 86: 60-67.
3. **Dubaniewicz A**, Trzonkowski P, Dubaniewicz-Wybieralska M, Singh M, Myśliwski A. Mycobacterial heat shock protein-induced blood T lymphocyte subsets and cytokine pattern. Comparison of sarcoidosis, tuberculosis and controls. *Respirology* 2007; 12: 346-354.
4. **Dubaniewicz A**, Trzonkowski P, Dubaniewicz-Wybieralska M, Dubaniewicz A, Singh M, Myśliwski A. Comparative analysis of mycobacterial heat shock proteins–induced apoptosis of peripheral blood mononuclear cells in sarcoidosis and tuberculosis. *J Clin Immunol* 2006; 26:243-250.
5. **Dubaniewicz A**, Szczerkowska Z, Hoppe A. Comparative analysis of HLA class I antigens in pulmonary sarcoidosis and tuberculosis in the same ethnic group; a common origin of the two disorders? *Mayo Clin Proc* 2003; 78: 436-442.
6. **Dubaniewicz A**, Moszkowska G. Analiza częstości występowania alleli DRB i DQ u chorych na sarkoidozę i gruźlicę płuc w tej samej grupie etnicznej. *Pneumonol Alergol Pol* 2007; 75:13-21.
7. **Dubaniewicz A**, Jamieson SE, Dubaniewicz-Wybieralska M, Fakiola M, Miller EN, Blackwell JM. Association between *SLC11A1* (formerly *NRAMP1*) and the risk of sarcoidosis in Poland. *Eur J Hum Gen* 2005;13: 829-834.

**Pracę habilitacyjną zrealizowano w ramach grantu KBN No. 3PO5B 15522**

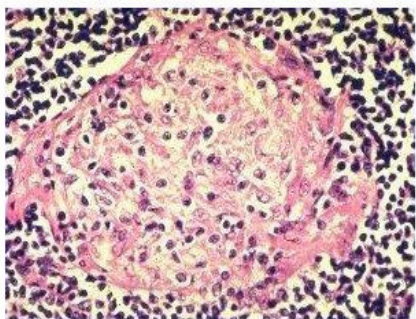


## I. WSTĘP

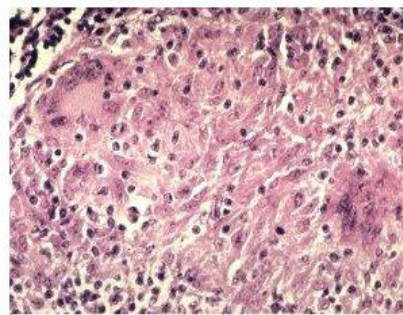
Sarkoidoza jest wielonarządową chorobą ziarniniakową o nieznannej etiologii. Najczęściej zajmuje węzły chłonne śródpiersia i/lub obwodowe, płuca, wątrobę. Może przebiegać bezobjawowo, albo w sposób ostry z zajęciem stawów, powiększeniem węzłów chłonnych wnek i rumieniem guzowatym (zespół Löfgrena) i/lub przewlekłe z samoistną remisją choroby w początkowych stadiach (w ok. 70%). Sarkoidoza może prowadzić do inwalidztwa, najczęściej z powodu niewydolności oddechowej (w ok. 10%) lub zgonu (w ok. 1-5%) [1-5].

Choroba rozpoznawana jest na podstawie objawów klinicznych i obecności nieserowaciejącej ziarniny w narządach objętych procesem chorobowym, po wykluczeniu innych przyczyn. Wymieniane są tutaj czynniki infekcyjne, organiczne, chemiczne, autoimmunizacyjne oraz genetyczne [1,6-12].

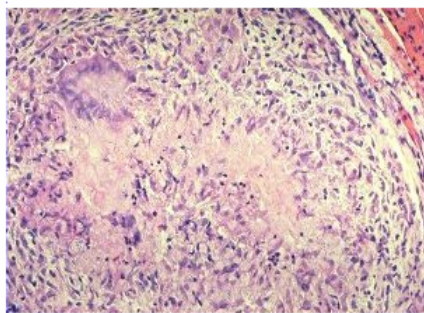
Ze względu na podobieństwo obrazu klinicznego i histopatologicznego (ryc.1-4) sarkoidozy (SA) do gruźlicy (TB), rozważany jest udział prątka gruźlicy lub jego antygenów w etiopatogenezie sarkoidozy [7,13].



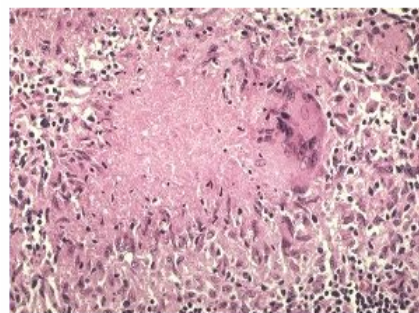
Ryc. 1. Ziarnina sarkoidalna bez martwicy



Ryc. 2. Ziarnina gruźlicza bez martwicy



Ryc. 3. Ziarnina sarkoidalna z martwicą



Ryc. 4. Ziarnina gruźlicza z martwicą

**Ryc. 1-4.** Preparaty mikroskopowe ziarniny sarkoidalnej i gruźliczej skopiowano za zgodą pisemną autora [[www.granuloma.homestead.com/index.html](http://www.granuloma.homestead.com/index.html)]

Pierwsze pozytywne próby identyfikacji *Mycobacterium tuberculosis* w ziarninie sarkoidalnej dotyczyły obecności L-formy prątka gruźlicy. W innym badaniu stwierdzono charakterystyczny dla prątków kwas tuberkulostearynowy w tkankach chorych na SA [7].

Obecnie, pomimo zastosowania czułych i swoistych metod molekularnych, próby identyfikacji i hodowli mykobakterii z materiału pochodzącego od chorych na sarkoidozę są nadal niejednoznaczne. Podczas gdy niektóre badania ziarniny potwierdzają obecność DNA *Mycobacterium tuberculosis* complex (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canetti*) u 50-95% chorych na SA, inne ujawniają materiał genetyczny prątka gruźlicy jedynie w niewielkim odsetku badanych. Natomiast wyniki innych prac nie wykazują obecności *M. tuberculosis* w ziarninie sarkoidalnej. Niektóre z powyższych analiz ujawniają prątkowe białko szoku termicznego (Mtb-hsp) o masie cząsteczkowej 65kDa –hsp65, stabilne ewolucyjnie, silny immunogen, występujący u większości mykobakterii [7].

Pomimo różnic w uzyskanych wynikach, które mogą zależeć od doboru materiału (bioptat i/lub preparat histopatologiczny zawierający ziarninę czy też jej brak) lub różnej czułości i swoistości stosowanych metod PCR, badania wskazują na wysokie prawdopodobieństwo udziału *M. tuberculosis* w etiopatogenezie sarkoidozy [7].

Oprócz niejednoznacznych wyników badań molekularnych, potwierdzających lub wykluczających prątek gruźlicy jako czynnik etiopatogenetyczny sarkoidozy, istnieją próby oceny poziomu przeciwciał skierowanych przeciwko antygenom tej bakterii w surowicy chorych na sarkoidozę. W nielicznych pracach wykazano surowicze przeciwciała przeciw wspomnianemu wyżej antygenowi hsp65, a także wzmożoną ekspresję hsp70 na powierzchni komórek jednojądrzastych krwi obwodowej (również występujące na powierzchni większości prątków gruźlicy), p36 *M. paratuberculosis* i A60 *M. bovis* [14-16].

Analiza mechanizmów immunoreaktywności organizmu zakażonego prątkiem gruźlicy, doprowadziła do identyfikacji antygenów *M. tuberculosis*, które aktywują odpowiedź immunologiczną [17]. Niektóre z nich należą do wspomnianych powyżej białek hsp, które pełniąc rolę białek opiekuńczych wspomagają wytwarzanie właściwych struktur oraz usuwanie białek nieprawidłowych [18]. W trakcie nieswoistej odpowiedzi na zakażenie prątkiem gruźlicy, białka hsp są wytwarzane zarówno przez fagocytowaną bakterię (Mtb-hsp), jak i przez zainfekowaną komórkę gospodarza, w odpowiedzi na podwyższenie temperatury lub inne bodźce, takie jak fagocytoza, nadmiar rodników hydroksylowych [18-20]. Stosując kryterium masy

cząsteczkowej, wyróżnia się następujące rodziny białek szoku termicznego: Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40 oraz rodzinę małych sHsp (15-25 kD) [18].

Mechanizmy odpowiedzi immunologicznej indukowanej przez hsp prątka gruźlicy nie zostały jeszcze wyjaśnione. Białka te zlokalizowane głównie wewnątrzkomórkowo, mogą ujawniać swoją ekspresję na powierzchni komórek zarówno gospodarza, jak i bakterii. Pochodzące z nich epitopy są rozpoznawane przez limfocyty B oraz T, w tym Tr1 i  $\gamma\delta^+$  [19-27]. Immunogennymi białkami szoku termicznego są białka Mtb-hsp o masie cząsteczkowej 70kD, 65kD i 16kD, które to poprzez stymulację komórek odpowiedzi immunologicznej do wydzielania prozapalnych i regulatorowych cytokin, mogą wpływać np. na przebieg ich aktywacji czy proliferacji [19,21-37]. W związku ze znacznym ewolucyjnie uwarunkowanym konserwatyżmem struktury, Mtb-hsp mogą również powodować wytwarzanie przeciwciał dających krzyżowe reakcje z ludzkimi białkami hsp [19,38-40]. Do chwili obecnej nie zostało rozstrzygnięte, czy reakcja immunologiczna na te białka ma w organizmie gospodarza charakter defensywny czy destruktywny.

W gruźlicy różne epitopy immunogenów, takich jak Mtb-hsp65, Mtb-hsp71, Mtb-hsp16 są rozpoznawane przez receptor dla antygeny na limfocytach T (TCR)  $\alpha\beta$ , ale przede wszystkim  $\gamma\delta$ , wywołując proliferację tych komórek w odniesieniu do antygenów układu zgodności tkankowej (HLA). Wykazano związek między antygenami HLA a nadmierną proliferacją limfocytów T w odpowiedzi na różne epitopy białek szoku termicznego np. DR5, DR7, DRw52 na Mtb-hsp71, DR2, DR3, DR4 i allele DRB1\*0301, DQA1\*0301 oraz DQB1\*0302 na Mtb-hsp65, podczas gdy allele DRB1\*0101, DRB1\*1501, DRB1\*0401 na Mtb-hsp16 [32-36].

W sarkoidozie odsetek oraz liczba bezwzględna limfocytów T  $\gamma\delta^+$  we krwi obwodowej były wyższe niż w gruźlicy i wzrastały w miarę przewlekania się procesu chorobowego przy równoczesnym obniżaniu się liczby komórek CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> i B [41]. Pomimo zmniejszonej zawartości limfocytów we krwi obwodowej chorych na sarkoidozę, obserwowana była hipergammaglobulinemia przebiegająca ze wzrostem stężenia krążących kompleksów immunologicznych [1,42]. Wynikać to może z przewlekłej aktywacji komórek B w związku z ciągłą stymulacją antygenową receptorów TCR i podwyższonego poziomu cytokin wytwarzanych przez limfocyty T  $\alpha\beta^+$  i/lub  $\gamma\delta^+$  [43,44]. Epitopy C-końcowej części Mtb-hsp70, Mtb-hsp65 oraz epitop p21-40 Mtb-hsp16 o wysokiej homologii z ludzkimi epitopami indukują silną odpowiedź humoralną [26,27,45,46]. Pomimo tej aktywacji nie dochodzi do efektywnej eliminacji antygen(-ów), co może być przyczyną utrzymującej się antygenemii w sarkoidozie

[28,47-53]. Ma to miejsce zwłaszcza w warunkach obniżonej ekspresji allelu 2 promotora  $(GT)_n$  genu kodującego białko naturalnej odpowiedzi związanej z makrofagami (*NRAMP1*), wzmożonej sekrecji interleukiny (IL-10), IL-4 i towarzyszącego zahamowania apoptozy monocytów/makrofagów czy subpopulacji limfocytów T.

Możliwymi przyczynami antygenemii i w konsekwencji kompleksemii może być również obniżenie zdolności bakteriobójczych makrofagów i/lub osłabienie funkcji receptorów dla fragmentu Fc immunoglobulin IgG (FcR), czy receptorów dla składowych układu dopełniacza (CR) monocytów/makrofagów w klirensie immunokompleksów w obecności IL-4, IL-10, interferonu-gamma ( $INF-\gamma$ ) [7,47,53-59]. Hsp70 aktywują układ dopełniacza niezależnie od przeciwciał, podczas gdy kompleks hsp65 prątka gruźlicy (i hsp60 ludzkie) ze swoistym przeciwciałem pobudzał układ dopełniacza drogą klasyczną [60,61]. Może to sugerować, że różne białka szoku termicznego w odmienny sposób indukują reakcje układu odpornościowego.

Pojedyncze prace podkreślają podłoże genetyczne zaburzeń funkcji komórek układu fagocytów jednojądrowych w sarkoidozie. Lawley i wsp. [57] wiąże defekt FcR na powierzchni sarkoidalnych monocytów/makrofagów z częstym występowaniem HLA-B8 i DR3. Również polimorfizm promotora  $(GT)_n$  genu *NRAMP1* [7] stwierdzony wśród Afroamerykanów, związany ze wzrostem podatności na zachorowanie na gruźlicę, chroni przed rozwojem sarkoidozy w populacji badanych pacjentów. Doniesienie autorów z Japonii nie wykazało istnienia polimorfizmu genu *NRAMP1* u chorych na sarkoidozę [62]. Zgodnie z moją wiedzą nie przeprowadzono analizy tego genu wśród rasy kaukaskiej.

Być może, osobnicy predysponowani genetycznie, narażeni na czynniki środowiska (np. prątki gruźlicy lub ich antygeny), reagują nasiloną reakcją ziarniniakową w chorobowo zajętych narządzie (przewaga proporcji limfocytów  $CD4^+/CD8^+$ ) przy względnym niedoborze liczby i aktywności komórek  $CD4^+T$  we krwi obwodowej, co skutkuje anergią obwodową [1].

Badania populacyjne HLA chorych na sarkoidozę w różnych etnicznie grupach na świecie, pomimo różnic, wykazują częstsze występowanie antygenów HLA-A1,-B8 i DR3 [1,63]. Rodzinne występowanie SA oraz zachorowania wśród bliźniąt jednojajowych również sugerują uwarunkowanie genetyczne sarkoidozy [1]. Natomiast na gruźlicę częściej chorowali pacjenci z obecnymi antygenami HLA-B7, -B8, -B15, -B35, -DR2 i -DQB1 [64].

Osobnicy, posiadający w swoim haplocyocie typowe dla preferencji wobec zachorowalności na sarkoidozę antygeny A1, B8 i DR3, DQ2, DQ8 są częściej predysponowani do rozwoju

chorób z autoagresji [65,66]. Może to wskazywać na autoimmunizacyjne podłoże samej sarkoidozy. Natomiast jak dotychczas nieliczne badania dotyczą bezpośrednio procesów z autoagresji w etiopatogenezie SA.

Sarkoidoza często towarzyszy innym chorobom autoimmunizacyjnym np. zapaleniu tarczycy Hashimoto, cukrzycy insulinozależnej typu 1 czy zespołowi wielogruchołowatości wielonarządowej [67,68]. Choroby te występują często rodzinnie, podobnie jak sarkoidoza. Analogicznie do SA dotyczą one częściej młodych kobiet, co związane jest z hipotezą, że to estrogeny są odpowiedzialne za nadmierną ekspresję HLA w prezentacji antygenów [68]. Białka szoku termicznego prątka gruźlicy podwyższając m.in. ekspresję cząstek adhezyjnych, kostymulatorowych cząsteczek, np. CD80/CD86 mogą również uczestniczyć w rozwoju procesów z autoagresji [19,31,69-72]. U podłoża chorób autoimmunizacyjnych, jako jedną z wielu przyczyn, wymienia się także mimikrę molekularną między antygenami hsp70, hsp65 i hsp16 prątka gruźlicy a homologicznymi antygenami na komórkach gospodarza [19,38-40]. Podwyższony poziom przeciwciał przeciw Mtb-hsp stwierdzono w w/w chorobach autoimmunizacyjnych i w przewlekłych zakażeniach, np. w gruźlicy płuc [19,73]. W dostępnym piśmiennictwie nie przeprowadzono tego typu badań w sarkoidozie. Z opublikowanych danych wynika, że wzrost podatności na zachorowanie na gruźlicę jest związany z obniżoną ekspresją allelu 2 promotora (GT)<sub>n</sub> genu *NRAMP1*, podczas gdy podwyższona ekspresja allelu 3 tego genu może być związana z rozwojem chorób autoimmunizacyjnych [74].

Oprócz udziału komórek układu fagocytów jednojądrowych w patogenezie zarówno gruźlicy jak i chorób z autoagresji, zauważalny jest także udział limfocytów  $\gamma\delta^+$  [75]. Odnotowano, że komórki T  $\gamma\delta^+$  proliferują w odpowiedzi na stymulację zarówno mykobakteryjnymi, jak i ludzkimi hsp, co sugeruje związek między infekcją a rozwojem procesów autoimmunizacyjnych [76]. Wyniki nielicznych badań dotyczących udziału subpopulacji limfocytów T  $\gamma\delta^+$  w sarkoidozie są rozbieżne [41,77-80]. W gruźlicy, komórki T CD8<sup>+</sup> reagowały krzyżowo zarówno na specyficzne epitopy hsp70 i hsp65 prątka gruźlicy oraz ludzi [81,82]. W SA, tak jak w procesach z autoagresji, dochodzi też często do zaburzeń kontroli immunologicznej, związanych z zaburzeniami liczby limfocytów T CD8<sup>+</sup> [1].

Zagadnienia dotyczące roli hsp w zakażeniach bakteryjnych, w tym *Mycobacterium tuberculosis*, są złożone i nie ma dotychczas jednoznacznych odpowiedzi, czy immunoreaktywność gospodarza, wywołana przez te białka, ma charakter ochronny czy niszczący - prowadzący do indukcji procesów autoimmunizacyjnych.

Chcąc odpowiedzieć na pytania, dotyczące wyjaśnienia udziału *Mycobacterium tuberculosis* i/lub jego antygenów - białek szoku termicznego w etiopatogenezie sarkoidozy, przedstawiam obecną dysertację.



## II. CEL PODJĘTYCH BADAŃ

Zasadniczym celem proponowanych badań była próba odpowiedzi na pytanie:

**Czy białka szoku termicznego *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb-hsp) uczestniczą w etiopatogenezie sarkoidozy?**

Aby odpowiedzieć na to pytanie podjęłam się wyjaśnienia następujących zagadnień:

1. Identyfikacja *Mycobacterium tuberculosis* complex i jego antygenów (białek szoku termicznego –Mtb-hsp70, Mtb-hsp65 i Mtb-hsp16) w węzłach chłonnych oraz surowicy chorych na sarkoidozę i chorych na gruźlicę (praca nr 1 i nr 2).
2. Udział białek szoku termicznego *Mycobacterium tuberculosis* w odpowiedzi immunologicznej (subpopulacje limfocytów T, stężenie cytokin Th1/Th2, ekspresja wewnątrzkomórkowa IL-4, apoptoza limfocytów T i monocytów przed i po stymulacji Mtb-hsp komórek jednojądrzastych krwi obwodowej) u chorych na sarkoidozę a chorych na gruźlicę (praca nr 3 i nr 4).
3. Uwarunkowanie genetyczne (częstość występowania antygenów HLA klasy I i II oraz polimorfizm promotora (GT)<sub>n</sub> genu *NRAMP1*) występowania sarkoidozy albo gruźlicy w tej samej grupie etnicznej (praca nr 5, nr 6 i nr 7).

### III. MATERIAŁ I METODY

#### Materiał

Materiałem do badań była krew obwodowa oraz węzły chłonne pobrane w czasie rutynowej diagnostyki chorych na sarkoidozę płuc (SA) i na gruźlicę płuc (TB) przed włączeniem leczenia oraz osób stanowiących grupę kontrolną. Do grupy badanej zakwalifikowano 100 chorych na SA, 100 chorych na TB, 5 chorych na niedrobnokomórkowego raka płuc, 4 pacjentów z niespecyficzną limfadenopatią oraz 143 niespokrewnionych, zdrowych dawców krwi. Chorzy o zbliżonym obrazie klinicznym i radiologicznym byli diagnozowani w Szpitalu Specjalistycznym w Wejherowie oraz Katedrze i Klinice Chirurgii Klatki Piersiowej, Zakładzie Patomorfologii AMG. W wywiadzie zarówno zdrowych jak i w grupach chorych nie stwierdzono SA, TB oraz chorób autoimmunologicznych. U wszystkich przeprowadzono szczepienia BCG. Badane grupy stanowiły homogenną kaukaską grupę etniczną z Gdańska i okolic. Wszyscy badani powiadomieni o celowości przeprowadzanych badań, wyrazili pisemną zgodę. Badania przeprowadzono za zgodą Niezależnej Komisji Bioetycznej do Spraw Badań Naukowych przy Akademii Medycznej w Gdańsku.

#### Metody

W celu oceny udziału białek szoku termicznego *Mycobacterium tuberculosis* complex w etiopatogenezie sarkoidozy przeprowadziłam:

1. Identyfikację *Mycobacterium tuberculosis* complex (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canetti*) w węzłach chłonnych i surowicy w badanych grupach w oparciu o analizę:
  - a. molekularną na obecność DNA prątka gruźlicy (PCR z użyciem IS6110) z zastosowaniem systemu ProbeTec wyposażony w wewnętrzną kontrolę procesu amplifikacji (praca nr 1) oraz analizę immunohistochemiczną z zastosowaniem wizualizującego zestawu APAAP (*Alkaline Phosphatase - Antialkaline Phosphatase*) na obecność białek szoku termicznego prątka gruźlicy (Mtb-hsp70, Mtb-hsp65 i Mtb-hsp16) (praca nr 1);
  - b. poziomu przeciwciał anti-Mtb-hsp70, anti-Mtb-hsp65 i anti-Mtb-hsp16 metodą ELISA (praca nr 2).

2. Porównawczą analizę wpływu Mtb-hsp na parametry odpowiedzi immunologicznej w badanych grupach w oparciu o badanie cytometryczne:
  - a. częstości występowania subpopulacji limfocytów T ( $CD4^+ \alpha\beta^+$ ,  $CD4^+ \gamma\delta^+$ ,  $CD8^+ \alpha\beta^+$ ,  $CD8^+ \gamma\delta^+$ ,  $CD4^- CD8^-$ ), ekspresji wewnątrzkomórkowej IL-4 w tych subpopulacjach oraz poziomu cytokin INF- $\gamma$ , IL-2, TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-6, IL-10 w supernatancie z hodowli limfocytów i monocytów z krwi obwodowej (PBMC) przed i po 24 godzinnej stymulacji fitohemagglutyniną (PHA) lub Mtb-hsp (70kDa, 65kDa, 16kDa) (praca nr 3);
  - b. apoptozy limfocytów  $CD4^+$  i  $CD8^+$  przed i po 24 godzinnej stymulacji hodowli PBMC fitohemagglutyniną lub Mtb-hsp (test ANNEXIN-V-FITC) (praca nr 4);
  - c. apoptozy monocytów przed i po 24 godzinnej stymulacji hodowli PBMC fitohemagglutyniną lub Mtb-hsp (test ANNEXIN-V-FITC) (praca nr 4).
3. Analizę predyspozycji genetycznej zachorowania na sarkoidozę albo gruźlicę w oparciu o:
  - a. typowanie antygenów układu zgodności tkankowej HLA klasy I (metodą serologiczną- test mikrolimfocytotoksyczny) i HLA klasy II (metodą PCR-SSP „*low- and high-resolution*” (reakcja łańcuchowa polimerazy o niskiej lub wysokiej rozdzielczości z zastosowaniem swoistych primerów) (praca nr 5 i nr 6);
  - b. polimorfizmu promotora  $(GT)_n$  genu *NRAMP1* metodą PCR a produkty reakcji były analizowane z użyciem automatycznego kapilarnego sekwenatora (praca nr 7).

## IV. OMÓWIENIE WYNIKÓW ZAGADNIEŃ ROZPRAWY HABILITACYJNEJ

1. **Identyfikacja *Mycobacterium tuberculosis* complex i jego antygenów (białek szoku termicznego – Mtb-hsp70, Mtb-hsp65 i Mtb-hsp16)**
  - a) **Identyfikacja *Mycobacterium tuberculosis* complex oraz Mtb-hsp w węzłach chłonnych chorych na sarkoidozę oraz w grupie kontrolnej (praca nr 1)**

Przeprowadziłam analizę molekularną na obecność DNA (sekwencję insercyjną - IS6110, która jest bardziej swoista dla *M. tuberculosis* niż *M. bovis* czy *M. bovis* BCG) *Mycobacterium tuberculosis* complex w węzłach chłonnych i wykazałam obecność prątka gruźlicy tylko u 3 (6%) z 50 badanych chorych na sarkoidozę i wśród wszystkich chorych na TB. Trzyletnia obserwacja chorych na SA nie wykazała rozwoju gruźlicy u tych pacjentów. Nie wykryto DNA *M. tuberculosis* complex metodą PCR wśród 5 badanych chorych z niedrobnokomórkowym rakiem płuc i 4 pacjentów z niespecyficzną limfadenopatią.

Porównywalne wyniki badań sarkoidalnego materiału na obecność prątka gruźlicy uzyskali inni autorzy (cytowani w pracy nr 1). Pomimo, że otrzymane dane nie potwierdzają etiologii gruźliczej w grupie 47 badanych chorych na SA, to również nie wykluczają udziału prątka gruźlicy w etiopatogenezie SA. Wg autorów (cytowani w pracy nr 1) negatywne wyniki badań molekularnych na obecność *M. tuberculosis* w SA mogą być wywołane małą ilością mykobakterii i/lub kopii IS6110 prątkach gruźlicy albo długim terminem przechowywania materiału DNA. Inni badacze (cytowani w pracy nr 1) uważają, że tak mała ilość mykobakterii, których nie wykrywa reakcja PCR z użyciem sekwencji IS6110, może indukować tworzenie ziarniny sarkoidalnej. Przedstawione powyżej wyniki badań własnych oraz innych autorów [7,26,27,31-36,83] mogą sugerować udział nie całej mykobakterii, ale poszczególnych jej antygenów, w tym immunogennych hsp.

W związku z hipotezą, że poszczególne antygeny prątka gruźlicy mogą indukować różną odpowiedź immunologiczną w odniesieniu do odmiennych genotypów, postanowiłam w następnym etapie pracy ocenić częstość występowania immunogennych białek hsp70, hsp65 i hsp16 prątka gruźlicy w tych samych badanych węzłach i surowicy chorych na SA i grupy kontrolnej.

Analiza immunohistochemiczna wykazała wzmożoną ekspresję przeciwciał anti-Mtb-hsp70, anti-Mtb-hsp65 i anti-Mtb-hsp16, zarówno w sarkoidalnym, jak i gruźliczym materiale. Natomiast nie ujawniłam intensywnej reakcji w zmianach nieswoistych i nowotworowych. Nadmierna ekspresja przeciwciał anti-Mtb-hsp70 i anti-Mtb-hsp16 w porównaniu z anti-Mtb-hsp65 była obecna we wszystkich badanych obszarach węzłów chłonnych (stan przedziarniniakowy - PSH, ziarniniaki, powierzchnia limfocytów, otaczających PSH i ziarniniaki), przy czym ekspresja przeciwciał anti-Mtb-hsp16 była wyższa niż przeciwciał anti-Mtb-hsp70 we wczesnych stadiach rozwoju SA (PSH, powierzchnia limfocytów w obszarach między PSH). Analiza porównawcza ekspresji poszczególnych przeciwciał anti-Mtb-hsp w fazie I i II sarkoidozy wykazała, że ekspresja przeciwciał anti-Mtb-hsp70 była wyższa w II niż I stadium SA. Ekspresja wszystkich badanych białek szoku termicznego w ziarninie była bardziej intensywna niż w PSH. Godny podkreślenia jest fakt, że w śródbłonku naczyń węzłów chłonnych 6 (24%) chorych na SA stwierdzono znamienne większą ekspresję przeciwciał anti-Mtb-hsp65 niż anti-Mtb-hsp70 i anti-Mtb-hsp 16.

W związku ze stwierdzeniem obecności przeciwciał anti-Mtb-hsp w węzłach chłonnych chorych na SA, a szczególnie śródbłonku naczyń tych węzłów, postanowiłam w następnym etapie pracy ocenić poziom i częstość występowania surowicznych przeciwciał anti-Mtb-hsp w badanych grupach.

**b) Analiza częstości występowania przeciwciał anti-Mtb-hsp70, anti-Mtb-hsp65 i anti-Mtb-hsp16 w surowicy chorych na sarkoidozę w porównaniu z grupą chorych na gruźlicę i populacją zdrowych ochotników (praca nr 2)**

Podobnie do analizy immunohistochemicznej węzłów chłonnych, przeprowadzone badanie surowicy wykazało obecność przeciwciał w/w anti-Mtb-hsp w badanych grupach pacjentów. Poziom przeciwciała anti-Mtb-hsp70 był znamienne podwyższony wśród chorych na SA i TB w porównaniu z populacją ludzi zdrowych. Przeciwciała anti-Mtb-hsp65 i anti-Mtb-hsp16 występowały częściej w TB niż w SA i w grupie kontrolnej. Analiza porównawcza występowania przeciwciał anti-Mtb-hsp wykazała swoiście podwyższony poziom i częstość występowania przeciwciał anti-Mtb-hsp70 niż przeciwciał anti-Mtb-hsp65 i anti-Mtb-hsp16 w grupie chorych na sarkoidozę, podczas gdy nie stwierdzono takiej znamienności wśród chorych na gruźlicę czy w grupie kontrolnej. Zgodnie z analizą immunohistochemiczną węzłów chłonnych, stwierdziłam istotnie większą częstość

występowania przeciwciał anti-Mtb-hsp70 niż anti-Mtb-hsp65 w surowicy chorych na SA w fazie II w porównaniu z fazą I choroby.

Obecność w sarkoidozie i gruźlicy, związanych w badanych tkankach, przeciwciał anti-Mtb-hsp może świadczyć o obecności antygenów białek szoku termicznego prętka gruźlicy o masie 70kDa, 65kDa i 16kDa. Otrzymane wyniki wskazują na przewagę występowania antygeny *M. tuberculosis* hsp70 w surowicy zarówno chorych na SA, jak i chorych na TB. Jest prawdopodobne, że stwierdzony obniżony poziom przeciwciała anti-Mtb-hsp65 i anti-Mtb-hsp16 w sarkoidozie jest wynikiem, podobnie jak to ma miejsce w gruźlicy, wiązania się tych antygenów w krążące kompleksy immunologiczne [73]. Potwierdzeniem tej hipotezy może być, stwierdzona u chorych na SA, wzmożona ekspresja przeciwciała anti-Mtb-hsp65 w śródbłonku naczyń węzłów chłonnych i obniżona jego ekspresja w pozostałych obszarach badanych węzłów. Wskazuje to na możliwość w/w sekwestracji antygeny Mtb-hsp65 w formie złożonej, np. w immunokompleksy, których podwyższone stężenie wykazałam wcześniej u tych chorych [42]. Uzyskane przeze mnie dane sugerują również udział Mtb-hsp16 w indukcji wczesnej fazy rozwoju sarkoidozy (PSH, faza I choroby, powierzchnia limfocytów w obszarach między PSH), podczas gdy Mtb-hsp70 może pełnić znaczącą rolę w stadium II choroby.

Z dotychczasowych badań [19,22,25,28,29,31-37,45,47,69,76,81] wynika, że białka hsp70, hsp65 i hsp16 prętka gruźlicy stymulują limfocyty TCR  $\alpha\beta^+$   $\gamma\delta^+$  do proliferacji, wytwarzania prozapalnych cytokin TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12, czynników antyapoptotycznych IL-10, TGF- $\beta$  oraz produktów przemian tlenku azotu (NO). Wg autorów [29] białko hsp65 *M. tuberculosis* aktywuje nie tylko limfocyty Th1, ale i monocyty/makrofagi do wytwarzania IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$ . Również w innych badaniach [28] przeprowadzonych *in vitro* wykazano, że stymulacja limfocytów T Mtb-hsp, zwłaszcza hsp70, wywołuje zwiększone wytwarzanie IL-10, która hamuje wytwarzanie INF- $\gamma$ , IL-2.

W związku z obecnością białek szoku termicznego *Mycobacterium tuberculosis* w węzłach chłonnych oraz surowicy chorych na SA (praca nr 1 i nr 2) i podkreślanym powyżej wpływie hsp prętka gruźlicy na parametry odpowiedzi immunologicznej, w pracach nr 3 i nr 4 podjęłam próbę oceny wpływu Mtb-hsp na subpopulację limfocytów T, poziom cytokin Th1/Th2 oraz na proces apoptozy komórek jednojądrzastych krwi obwodowej chorych na sarkoidozę lub gruźlicę.

## 2. **Udział białek szoku termicznego *Mycobacterium tuberculosis* w zmienionej reaktywności immunologicznej chorych na sarkoidozę i chorych na gruźlicę**

### a) ***Wpływ Mtb-hsp na subpopulacje limfocytów T (CD4<sup>+</sup>αβ<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>γδ<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>αβ<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>γδ<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) oraz poziom cytokin Th1/Th2 w supernatancie hodowli PBMC chorych na sarkoidozę w porównaniu z grupą chorych na gruźlicę i zdrowymi ochotnikami (praca nr 3)***

Wykazałam w tej pracy, że w niestymulowanej populacji komórek jednojądrzastych krwi obwodowej u osób chorych na sarkoidozę występował istotnie wyższy odsetek limfocytów CD8<sup>+</sup>αβ<sup>+</sup> oraz podwyższony poziom IL-6 i obniżony IL-4, podczas gdy u chorych na gruźlicę stwierdziłam jedynie istotnie obniżony poziom cytokin INF-γ, IL-2, IL-4 i IL-10 w porównaniu z grupą zdrowych ochotników. Skutkiem stymulacji Mtb-hsp PBMC chorych na gruźlicę, była zwiększona częstość występowania komórek CD4<sup>+</sup>γδ<sup>+</sup> i podwyższony poziom TNF-α, IL-6, podczas gdy w sarkoidozie wykazałam zmniejszoną obecność limfocytów CD8<sup>+</sup>γδ<sup>+</sup>IL-4<sup>+</sup> oraz istotnie obniżoną zawartość INF-γ, IL-2, IL-4, ale podwyższony poziom cytokin TNF-α, IL-6 i IL-10, w zestawieniu z wartościami uzyskanymi dla badanej populacji osób zdrowych.

W przeciwieństwie do gruźlicy, w sarkoidozie stwierdzono znaczącą koncentrację IL-10 oraz istotnie niski poziom IL-4. Badanie wewnątrzkomórkowej ekspresji IL-4 w subpopulacjach limfocytów T wykazało, że to właśnie komórki CD8<sup>+</sup>γδ<sup>+</sup>IL-4<sup>+</sup> odpowiadają za obniżone stężenie tej cytokiny w supernatantach z hodowli PBMC stymulowanych Mtb-hsp u chorych na sarkoidozę i w ten sposób mogą indukować rozwój procesów autoimmunizacyjnych.

Pojedyncze badania krwi chorych na sarkoidozę wykazały zwiększony odsetek limfocytów CD4<sup>+</sup>IL-4<sup>+</sup> oraz CD8<sup>+</sup>IL-4<sup>+</sup>, podczas gdy w gruźlicy wykryto zwiększoną ekspresję wewnątrzkomórkowej IL-4 w komórkach CD8<sup>+</sup> i γδ<sup>+</sup> w porównaniu z grupą kontrolną [84,85]. Inni autorzy [86,87] nie potwierdzają różnic w częstości subpopulacji limfocytów T z wewnątrzkomórkową ekspresją IL-4<sup>+</sup> między grupą chorych na sarkoidozę a kontrolą.

Większość badań [41,77-79] potwierdza wzrost subpopulacji limfocytów T γδ<sup>+</sup> we wczesnej fazie SA i TB, chociaż są autorzy [80], którzy nie wykazali różnic w liczbie tych komórek. Natomiast wyniki pracy [41] wskazują na obniżony poziom komórek T γδ<sup>+</sup> w gruźlicy w porównaniu z chorymi na sarkoidozę i ze zdrowymi osobnikami.

Dotychczas nie przebadano udziału subpopulacji limfocytów  $CD4^+\gamma\delta^+$  i  $CD8^+\gamma\delta^+$  w immunoreaktywności chorych na gruźlicę czy sarkoidozę, pomimo istniejących danych dla zdrowych populacji [89]. Zgodnie z moją wiedzą, przedstawiony tutaj wynik jest pierwszym doniesieniem na temat obecności populacji limfocytów  $CD4^+\gamma\delta^+$  oraz  $CD8^+\gamma\delta^+$  podczas stymulacji białkami szoku termicznego *M. tuberculosis* zarówno u chorych na gruźlicę, jak i u chorych na sarkoidozę.

Przewaga limfocytów  $CD8^+\alpha\beta^+$  w sarkoidozie a  $CD4^+\gamma\delta^+$  w gruźlicy może wynikać z odmiennej odpowiedzi (prolifracja, wytwarzanie cytokin) komórek T na te same antygeny prątka gruźlicy w odniesieniu do stwierdzonych w pracach nr 5 i nr 6 różnych haplotypów HLA wśród chorych na sarkoidozę albo gruźlicę. Zgodnie z wynikami innych badań, przyczyną tej dysproporcji w zawartości subpopulacji limfocytów T w grupie chorych na SA może być odmienna wrażliwość tych komórek na mitogeny swoiste np. PPD albo nieswoiste np. PHA [89].

Również udowodniony bezpośredni wpływ hsp70 i hsp65 prątka gruźlicy na aktywację limfocytów  $CD4^+$  lub  $CD8^+$  może wpływać na dysproporcję limfocytów i wytwarzanych przez nie cytokin, stwierdzoną w obecnej pracy [25,28,29,81]. Zgodnie z wynikami naszych badań (praca nr 3), obserwacje poczynione przez innych autorów [25,28,29,90] ujawniły, że Mtb-hsp70, Mtb-hsp65, czy Mtb-hsp16 stymulują komórki TCR  $\alpha\beta^+$  i  $\gamma\delta^+$  do wytwarzania cytokin TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10, mniejszych ilości INF- $\gamma$  i IL-2 ale nie IL-4. Podwyższony, w skutek stymulacji Mtb-hsp, poziom IL-10 u naszych chorych na SA może hamować wytwarzanie zarówno INF- $\gamma$  jak i IL-2 z obserwowanym obniżeniem proliferacji limfocytów  $CD4^+$  i przewagą limfocytów  $CD8^+$  u tych pacjentów [90,91]. Tego efektem może być zmieniony stosunek subpopulacji komórek T stwierdzony we krwi obwodowej naszych chorych. Inne badania [92,93] tłumaczą obniżoną zawartość limfocytów  $CD4^+$  i tym samym obniżony stosunek  $CD4^+/CD8^+$  we krwi obwodowej, krążącymi rozpuszczalnymi receptorami dla IL-2 (CD25) zarówno w sarkoidozie i w gruźlicy. Również ostatnie doniesienia [94,95] wskazują na obecność komórek regulatorowych Treg ( $CD4^+CD25^+T$  i  $CD4^+CD25^+Foxp3^+T$ ) we krwi chorych na sarkoidozę, które mogą hamować proliferację limfocytów T i wytwarzanie cytokin INF- $\gamma$ , IL-2 ale nie hamują całkowicie wytwarzania TNF- $\alpha$ . Wiadomym jest, że TNF- $\alpha$  jest kluczową cytokiną odpowiadającą za tworzenie sarkoidalnej ziarniny [1]. Także u naszych chorych na SA stwierdziliśmy podwyższoną zawartość TNF- $\alpha$  i IL-6 po stymulacji Mtb-hsp. Wzrost poziomu tych cytokin jest charakterystyczny m.in. dla przewlekłego zapalenia, jakim jest zarówno ziarnina sarkoidalna jak i gruźlica [96]. Również



podwyższona zawartość tych cytokin może tłumaczyć wzrost wytwarzania IL-10, która hamuje przewlekłe zapalenie w drodze ujemnego sprzężenia zwrotnego [21,96]. Interleukina 10 jest wytwarzana m.in. przez monocyty/makrofagi, ale w większym stopniu przez komórki Tr1 regulatorowe, które wytwarzają duże ilości tej interleukiny, ale nie produkują IL-4, a taką konfigurację cytokin obserwowano w obecnej pracy. Ponadto badania [90] wykazały, że hsp70 i hsp65 prątka gruźlicy stymulują m.in. tę subpopulację regulatorowych limfocytów T. Dotychczas nie opisano tych komórek w SA. Wyniki przedstawione w pracy nr 3 w sposób pośredni mogą sugerować obecność limfocytów Tr1 we krwi obwodowej chorych na sarkoidozę i tym samym tłumaczyć anergię obwodową obserwowaną w tej chorobie. Wg cytowanych powyżej autorów, wysoki poziom IL-10 i niski IL-4 jest charakterystyczny dla komórek Tr1, które proliferują w odpowiedzi na stałą stymulację Mtb-hsp lub ludzkimi homologami w wyniku reakcji krzyżowej [90].

Stwierdzony w obecnej pracy odmienny poziom IL-10, IL-4 po stymulacji Mtb-hsp w sarkoidozie i w gruźlicy, może wpływać nie tylko na dominację odpowiedzi typu Th2 i postulowaną obecność komórek Treg we krwi obwodowej chorych na SA, ale i na przebieg apoptozy poszczególnych subpopulacji limfocytów T w tych dwóch chorobach [97].

Ze względu na możliwość istnienia zaburzeń apoptozy jako przyczyny wykazanych powyżej dysproporcji w SA i TB, postanowiłam ocenić proces zaprogramowanej śmierci komórek T oraz wpływ białek szoku termicznego prątka gruźlicy na jej przebieg w/w grupach badanych.

**b) *Analiza porównawcza apoptozy limfocytów CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> przed i po stymulacji PHA oraz Mtb-hsp hodowli komórek jednojądrzastych krwi obwodowej chorych na sarkoidozę, chorych na gruźlicę i zdrowych ochotników (praca nr 4)***

Efektom pracy nr 4 było wykazanie różnic w spontanicznej oraz indukowanej Mtb-hsp apoptozie przede wszystkim limfocytów CD4<sup>+</sup> we krwi obwodowej chorych na sarkoidozę i pacjentów z gruźlicą. Spontaniczna apoptoza komórek T CD4<sup>+</sup> była niższa u chorych na TB w porównaniu z grupą pacjentów z SA i grupą kontrolną, podczas gdy odsetek apoptotycznych komórek CD8<sup>+</sup> był porównywalny we wszystkich badanych populacjach. Stymulacja hodowli komórek jednojądrzastych krwi obwodowej Mtb-hsp wywołała obniżony odsetek komórek apoptotycznych T CD4<sup>+</sup> u chorych na gruźlicę w porównaniu z pozostałymi badanymi grupami, podczas gdy apoptoza limfocytów CD8<sup>+</sup> była obniżona zarówno

u chorych na SA jak i na TB w porównaniu z wartościami uzyskanymi dla zdrowych ochotników. Stymulacja PBMC nieswoistym mitogenem nie miała wpływu na proporcję limfocytów CD4<sup>+</sup> tylko w sarkoidozie, podczas gdy Mtb-hsp spowodowały wzrost odsetka apoptotycznych komórek T CD4<sup>+</sup> we krwi chorych na SA w przeciwieństwie do pacjentów z gruźlicą i zdrowych ochotników. Nie było istotnych różnic międzygrupowych w odsetku komórek CD8<sup>+</sup> ulegających apoptozie po stymulacji PHA. We wszystkich grupach białka szoku termicznego prątka gruźlicy i PHA powodowało podobny, istotny statystycznie wzrost odsetka apoptotycznych komórek CD8<sup>+</sup>.

Wyniki obecnej pracy wskazują, że to zwiększona apoptoza komórek T CD4<sup>+</sup> u chorych na SA i wzrost odsetka apoptotycznych limfocytów CD4<sup>+</sup> u chorych na TB przy zmniejszonej apoptozie komórek CD8<sup>+</sup> po stymulacji Mtb-hsp w obu chorobach może być przyczyną zmian w proporcji subpopulacji limfocytów T i odmiennej wartości stosunku limfocytów CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> we krwi obwodowej, obserwowanego u chorych na SA i TB.

Podsumowując dotychczasowe wyniki badań własnych wykazałam, że stymulacja limfocytów T hsp prątka gruźlicy wywołuje zwiększoną apoptozę i przez to mniejszą zawartość komórek CD4<sup>+</sup> we krwi obwodowej chorych na SA oraz zmniejszoną apoptozę i przewagę subpopulacji CD8<sup>+</sup> w obecności podwyższonej koncentracji TNF- $\alpha$ , IL-10 i obniżonego poziomu IL-2, IL-4, INF- $\gamma$ . Wydaje się, że uzyskane dane mogą sugerować obecność limfocytów regulatorowych Tr1 i odzwierciedlać przyczyny anergii obwodowej spotykanej w przebiegu SA.

Zaburzenia apoptozy limfocytów T i monocytów/makrofagów z wewnątrzkomórkową obecnością w ich wnętrzu przetrwałych antygenów, np. Mtb-hsp, może prowadzić do rozwoju procesu zapalnego w stałej obecności prozapalnych cytokin [47,48,97-100]. Jednym z możliwych mechanizmów prozapalnego działania tychże cytokin może być regulacja wytwarzania NO. Wykazano w badaniach innych autorów, że INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  podwyższają ekspresję syntazy tlenku azotu. Wg tych autorów wiąże się to z inicjacją apoptozy, podczas gdy cytokiny IL-4 i IL-10 hamując wytwarzanie NO, mogą wpływać na obniżenie procesu zaprogramowanej śmierci komórki [47,52,97].

Ponieważ monocyty/makrofagi są kluczowymi komórkami w zakażeniu *Mycobacterium tuberculosis* a zaburzenie ich funkcji może być źródłem utrzymującej się antygenemii, postanowiłam przeprowadzić badania apoptozy monocytów i wpływu Mtb-hsp na jej przebieg w w/w badanych grupach.

**c) Analiza porównawcza apoptozy monocytów w hodowli PBMC przed i po stymulacji Mtb-hsp u chorych na sarkoidozę, chorych na gruźlicę i wśród zdrowych ochotników (praca nr 4)**

W obecnym badaniu wykazałam, że zarówno spontaniczna jak i indukowana Mtb-hsp oraz PHA apoptoza monocytów była niższa u chorych na gruźlicę w porównaniu do wartości otrzymanych wśród pacjentów z sarkoidozą i zdrowej populacji. Godnym uwagi jest fakt, że stymulacja Mtb-hsp i PHA nie indukowała wzrostu odsetka monocytów ulegających apoptozie jedynie u osób chorych na sarkoidozę, co mogłoby być przyczyną przetrwałej antygenemii i długotrwałej ich prezentacji limfocytom T w tej grupie badanej.

Zgodnie z moją wiedzą jest to jedyne doniesienie, dotyczące apoptozy monocytów krwi obwodowej w sarkoidozie. Pozostałe, nieliczne i rozbieżne wyniki badań apoptozy dotyczyły makrofagów pęcherzykowych w materiale z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego (BAL) u chorych na sarkoidozę [97,101]. Natomiast zgodnie z wynikami badań procesu zaprogramowanej śmierci komórki w TB [102], wykazano mniejszy odsetek apoptotycznych monocytów krwi obwodowej.

Wy tłumaczeniem różnic, otrzymanych u naszych chorych, mogą być wyniki badania genetycznego procesu apoptozy monocytów krwi obwodowej u chorych na sarkoidozę, które wykazały odmienną ekspresję genów kodujących czynniki wzrostu i Bcl-2 z następowym zmniejszeniem apoptozy oraz ekspresji genów sygnalowania przez TNF- $\alpha$  z podwyższonym odsetkiem komórek apoptotycznych [103]. Ponadto, wyniki badań przeprowadzonych *in vitro* wykazały obniżoną apoptozę fagocytów jednojądrowych zakażonych *M. tuberculosis*, wskutek podwyższonej ekspresji antyapoptotycznego genu *Bcl-2* i zmniejszonej ekspresji genu *NRAMP1* [47,104]. W warunkach niskiej ekspresji genu *NRAMP1* dochodzi do przewagi wytwarzania antyapoptotycznej IL-10 nad TNF- $\alpha$  i NO [47].

Także obecność cytokin w supernatancie z hodowli PBMC po stymulacji Mtb-hsp prątka gruźlicy, zwłaszcza IL-10, może tłumaczyć oporność monocytów na apoptozę i różnice między procesem apoptozy w SA a w TB. Zgodne z wynikami obecnej pracy, badania *in vitro* przeprowadzone przez innych autorów, wykazują znaczącą rolę hsp70 prątka gruźlicy w indukcji zwiększonego wytwarzania IL-10 [25,28,90]. Dotychczasowe dane z piśmiennictwa [49,104] sugerują antyapoptotyczny wpływ hsp70, hsp65 i hsp16 na jednojądrowe fagocyty poprzez zabezpieczenie integralności mitochondrium i/lub łączenie się hsp z białkami Apaf-1 aktywującym kaspazy (*apoptosis protease activating factor-1*), Bcl-2, czy z kinazą fosforyzującą N-terminalny fragment c-Jun. Inne badania sugerują, że wysoka

ekspresja białek szoku termicznego wytwarzanych przez komórkę zakażoną mało zjadliwym drobnoustrojem hamuje jej apoptozę, prawdopodobnie w wyniku przyśpieszonego dojrzewania białek Bcl-2 i/lub obniżenia aktywacji kaspaz mediowanej przez cytochrom c/dATP [47-49,98-100]. *M. tuberculosis* o wysokiej wirulencji indukuje fagocyty do wytwarzania mniejszych ilości cytokin INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  i IL-6, IL-12 niż prątki gruźlicy o niskiej wirulencji [47,98-100]. Może to być przyczyną uzyskanych w obecnej pracy różnic w wytwarzaniu cytokin i przebiegu apoptozy w SA i TB.

Dotychczas otrzymane przeze mnie wyniki dowodzą obecności Mtb-hsp i ich przewlekłej stymulacji antygenowej, co w świetle zaburzonej apoptozy monocytów krwi obwodowej chorych na SA, może prowadzić do tworzenia krążących immunokompleksów. Podwyższony poziom krążących kompleksów immunologicznych, charakterystyczny dla procesów z autoagresji, wykazałam również w surowicy tych chorych [42]. Zgodnie z wynikami innych badań [omówiono w 42], immunokompleksy występowały znamienne częściej we wszystkich stadiach SA oraz u pacjentów z całkowitą remisją choroby niż w grupie kontrolnej. Wykazana (praca nr 1 i nr 2) u tych chorych obecność Mtb-hsp oraz stwierdzona przez innych autorów, obecność immunoglobulin czy składników dopełniacza w ziarninie węzłów chłonnych czy w ścianie naczyń krwionośnych może przemawiać za udziałem immunokompleksów w etiopatogenezie sarkoidozy [105,106]. Wyniki pracy nr 4 oraz doniesienia innych autorów wskazują, że kompleksema może sugerować zaburzenia funkcji komórek układu fagocytów jednojądrowych np. obniżenie apoptozy czy podwyższonej ekspresji receptorów dla fragmentu Fc immunoglobulin (FcR) i obniżonej ekspresji receptorów dla składowych układu dopełniacza (CR) w nieobecności IL-4 i INF- $\gamma$  a przewodze IL-10 [12,28,47,50,53-60,107,108].

Za pośrednictwem receptorów dla fragmentu C3 dopełniacza (CR1-CD35, CR3-CD18/11b, CR4-CD18/11c), w mniejszym stopniu dzięki FcR (Fc $\gamma$ RI-CD64, Fc $\gamma$ RII-CD32, Fc $\gamma$ RIII-CD16), zachodzi proces fagocytozy immunologicznej przez monocyty, m.in. kompleksów immunologicznych, aktywacja limfocytów T i B czy synteza i transport IgG, prezentacja antygenów [55-59,107,108]. Populacja monocytów (CD14<sup>+</sup>) krwi obwodowej jest heterogenna i dzieli się na subpopulację CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> i mniejszą - prozapalną CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>. Subpopulacja CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> wydziela większą ilość TNF- $\alpha$ , ale mniejszą ilość rodników hydroksylowych, posiada mniejsze zdolności fagocytarne i bakteriobójcze niż monocyty CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> [109,110].

Nieopublikowane wyniki badań własnych potwierdzają powyższe doniesienia i dodatkowo sugerują niedobór receptorów dla C3 składowej dopełniacza na monocytach chorych na sarkoidozę w porównaniu z chorymi na gruźlicę i populacją zdrowych ochotników. Ponadto, stwierdzona w tych badaniach, obecność większego odsetka komórek CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> u chorych na sarkoidozę, może tłumaczyć różnice w procesie fagocytozy między tymi samymi grupami pacjentów i obecność kompleksemii, wynikającej z obniżonej fagocytozy u chorych na SA.

Istnieją nieliczne prace podkreślające podłoże genetyczne zaburzeń funkcji komórek układu fagocytów jednojądrzastych w sarkoidozie. Praca Lawley i wsp. [57] wiąże defekt FcR na powierzchni sarkoidalnych monocytów/makrofagów z częstym występowaniem, charakterystycznym dla SA, HLA-B8 i -DR3.

W związku z odmiennym wpływem białek szoku termicznego prętka gruźlicy na parametry odpowiedzi immunologicznej w SA i TB oraz możliwością zróżnicowanej prezentacji tych samych antygenów - Mtb-hsp w odniesieniu do różnych haplotypów, oceniałam częstość występowania antygenów HLA klasy I i II w dwóch jednostkach chorobowych.

### **3. Uwarunkowanie genetyczne występowania sarkoidozy albo gruźlicy w tej samej grupie etnicznej**

#### **a) *Analiza porównawcza częstości występowania antygenów/alleli HLA klasy I i II w grupach chorych na sarkoidozę, na gruźlicę i wśród zdrowych ochotników (praca nr 5 i nr 6)***

Współczesne dane z piśmiennictwa wskazują, że antygeny HLA klasy I i II kontrolują przebieg odpowiedzi immunologicznej organizmu na zakażenie *Mycobacterium tuberculosis*. Stwierdzono, że główne etapy tej odpowiedzi, takie jak prezentacja antygenów prętka przez makrofagi limfocytom T, fagocytoza *M. tuberculosis* oraz sprawność mechanizmów bakteriobójczych, zależą od swoistości loci HLA [64]. Istnienie licznych odmian allelicznych genów DRB1, DQA1, DQB1 powoduje zróżnicowanie odpowiedzi układu immunologicznego na te same antygeny. Ponadto wykazano, że nie tylko różne antygeny, ale różne epitopy tego samego antygeny np. białek szoku termicznego *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb-hsp) o masie cząsteczkowej 70kDa, 65kDa, czy 16kDa mogą rozpoznawać receptory TCR, wywołując proliferację limfocytów T czy B oraz wytwarzanie cytokin w odniesieniu do różnych antygenów HLA [26,27,32-36,45,46]. Wydaje się, że te same mykobakteryjne

epitopy/antygeny wraz HLA klasy I lub II mogą indukować odmienną odpowiedź immunologiczną a tym samym kształtować wrażliwość na zachorowanie na sarkoidozę albo gruźlicę.

W związku z powyższym, postanowiłam odpowiedzieć na pytanie: czy występują różnice w częstości występowania poszczególnych antygenów HLA klasy I i II wśród chorych na sarkoidozę lub gruźlicę płuc (praca nr 5 i nr 6)? W piśmiennictwie brak jest danych dotyczących zarówno związku antygenów HLA z gruźlicą w populacjach europejskich, jak i analizy porównawczej haplotypów występujących w SA i TB w tej samej homogennej grupie etnicznej.

Konsekwencją moich badań (praca nr 5) było wykazanie znamienych różnic w częstości występowania antygenów HLA klasy I wśród chorych na SA i chorych na TB. Stwierdziłam, że występowanie antygenów HLA-B5, -B8 zwiększało ryzyko zachorowania na SA, podczas gdy obecność antygenów HLA-B13, -B35, -Cw4 była związana z ochronnym działaniem. Natomiast w TB dominowały antygeny HLA-B15, -Cw5 a mniejszą częstość zaobserwowano dla antygenów HLA-A2 w stosunku do populacji zdrowych ochotników. Analiza porównawcza obecności HLA klasy I w dwóch grupach pacjentów wykazała, że w SA antygeny HLA-B5, -B8 występują istotnie częściej a HLA-B13, -B15, -Cw4 znamienne rzadziej niż wśród chorych na gruźlicę (praca nr 5).

Analiza częstości występowania antygenów HLA klasy II, przedstawiona w pracy nr 6 (tabela 2 i 3), wykazała, że częstość występowania alleli DRB1, DQB1 i DQA1 jest różna dla obydwu badanych populacji chorych.

Uzyskane w naszych badaniach u chorych na sarkoidozę wyniki ujawniły związek częstego występowania alleli DRB1\*03, DRB1\*11, DQB1\*02 i DQA1\*0501 ze zwiększonym ryzykiem pojawienia się zespołu Löfgrena (faza I), podczas gdy częściej występujące allele DRB1\*15, DQA1\*0102, DQA1\*0103 były związane ze stadium II sarkoidozy. Mniejszą częstość alleli DRB1\*16, DRB1\*04, DRB1\*08, DQB1\*02, DQB1\*03, DQB1\*05 i DQA1\*0102, DQA1\*0301 stwierdzono w zespole Löfgrena a DQB1\*03, DQB1\*05, DQB1\*06 i DQA1\*0301 w fazie II choroby w stosunku do populacji zdrowych ochotników. Po zastosowaniu poprawki Bonferroniego okazały się istotnie różne tylko częstości DRB1\*04, DQB1\*02, DQB1\*03, DQB1\*05, DQB1\*06 i DQA1\*0102, DQA1\*0301, DQA1\*0501. Wśród naszych chorych na gruźlicę wykazano związek alleli DRB1\*16, DRB1\*14, DQB1\*05 oraz DQA1\*0303 ze zwiększoną zachorowalnością na TB i protekcyjne

działanie alleli DRB1\*11, DQB1\*02, DQA1\*0201 i DQA1\*0505 w porównaniu z kontrolą, lecz różnice były istotne po zastosowaniu poprawki Bonferroniego tylko w częstości alleli DRB1\*16, DQB1\*02, DQB1\*05 oraz DQA1\*0303, DQA1\*0505. Analiza porównawcza alleli HLA klasy II w badanych populacjach pacjentów wykazała, że allele DRB1\*11, DQB1\*02 i DQA1\*0201, DQA1\*0501, DQA1\*0505 w zespole Löfgrena oraz allele DRB1\*15, DRB1\*11, DQA1\*0102 w fazie II sarkoidozy występowały istotnie częściej w SA niż w TB, podczas gdy allele DRB1\*16, DRB1\*04, DRB1\*14, DQB1\*03, DQB1\*05, DQB1\*06 i DQA1\*0301, DQA1\*0302, DQA1\*0303 występowały istotnie rzadziej zarówno w fazie I z zespołem Löfgrena, jak i w fazie II choroby w SA niż w TB, nawet po korekcie statystycznej.

Analiza opublikowanych dotychczas haplotypów w różnych etnicznie populacjach chorych na SA albo TB na świecie wykazała, że antygeny HLA-B8, -B27, -B35 i DR5, DRB1\*15, DRB1\*1501, DRB1\*14 oraz allele DQB1\*0502, DQB1\*0503, DQB1\*0601, DQA1\*0101 występowały znamienne częściej a HLA-B12 rzadziej, zarówno w S.A., jak i w TB w porównaniu ze zdrowymi osobnikami (tabela 1 w pracy nr 5 i 6). Antygeny HLA-A1, -B7, -B13, -Cw7, DRB1\*0301, DRB1\*12, DRw52 i DQB1\*02, DQA1\*0104, DQA1\*0501 obserwowane były częściej a DRB1\*01, DRB1\*07, DQB1\*05 i DQA1\*0301 rzadziej tylko wśród chorych na SA, podczas gdy w TB z większą częstością występowały antygeny HLA-B5, -15, DRB1\*1506, DRB1\*1601, DQB1\*0501, DQA1\*0103 w zestawieniu z kontrolą (tabela 1 w pracy nr 5 i nr 6). Natomiast korelacja między HLA-A2, DR6, DRB1\*04, DRB1\*11, DRB1\*08 i DQB1\*03, DQB1\*04 a zachorowalnością była pozytywna dla wzrostu zachorowań na sarkoidozę, ale negatywna w TB w porównaniu ze zdrowymi, w różnych grupach etnicznych (tabela 1 w pracy nr 5 i nr 6). Obecność allelu DQB1\*0201 związana ze zwiększonym ryzykiem zachorowania na SA w populacji pacjentów z terenu Szwecji, była związana z działaniem ochronnym tego allelu wśród Azjatów i Afroamerykanów oraz wśród naszych chorych na gruźlicę. Inni autorzy nie wykazali żadnego związku między zachorowalnością na SA lub TB a występowaniem poszczególnych alleli DRB1, DQA1 i DQB1.

Podsumowując, typowanie przeprowadzone w zakresie HLA klasy I i II wśród badanych grup wykazało znamienne różnice między subpopulacjami chorych na sarkoidozę a chorymi na gruźlicę w homogennej etnicznie grupie z terenu północnej Polski. Godnym odnotowania jest fakt, że częstość alleli DRB1\*16, DRB1\*11 i DQB1\*02, DQB1\*05 w fazie I i II sarkoidozy była przeciwstawna do obecności tych alleli w TB w porównaniu ze zdrową

populacją badanych. Obecne dane sugerują, że allele DRB1\*16 i DQB1\*05 związane z wysokim ryzykiem rozwoju TB, mogą mieć protekcyjne znaczenie dla rozwoju SA i odwrotnie, allele DRB1\*11 i DQB1\*02 związane z niskim ryzykiem rozwoju TB, może być związane ze zwiększoną podatnością na rozwój SA. Również w zakresie polimorfizmu genu *NRAMP1* wśród Afroamerykanów chorych na sarkoidozę lub gruźlicę zaobserwowano taką samą relację [7]. Także większość badań epidemiologicznych sarkoidozy i gruźlicy na świecie potwierdza wyniki badań genetycznych i wskazuje, że w krajach o wysokim współczynniku zachorowalności na SA, odnotowano niską zachorowalność na gruźlicę, podczas gdy w krajach o zwiększonej zachorowalności na TB, sarkoidoza występuje rzadko [111,112]. Takim przykładem może być również Polska, która należy do krajów europejskich z wysokim współczynnikiem zachorowalności na TB (27/100 000), ale małą zachorowalnością na sarkoidozę (6/100 000) [2-5,113].

Być może brak albo współistnienie TB i/lub szczepień BCG (antygeny prątka gruźlicy, np. Mtb-hsp) na danym terenie wpływa na rozwój autoimmunizacji, zwłaszcza u osób z haplotypem A1/B8/DR3/DQ2/DQ8 [65,66,114]. Zgodnie z wynikami badań haplotypów w różnych grupach etnicznych, wyniki naszej analizy antygenów HLA klasy I i II wskazują na częstą obecność B8, DRB1\*03, DQB1\*02, DQA1\*0501 wśród chorych na SA.

W świetle stwierdzonej roli genu *NRAMP1* w indukcji przez czynnik infekcyjny procesu z autoagresji a wykazaną przeze mnie obecność Mtb-hsp oraz ich zróżnicowany wpływ na parametry odpowiedzi immunologicznej w grupach pacjentów o odmiennych haplotypach, postanowiłam przeprowadzić analizę polimorfizmu promotora (GT)<sub>n</sub> *NRAMP1* w/w grupach badanych.

**b) Ocena związku polimorfizmu promotora (GT)<sub>n</sub> genu *NRAMP1* ze zwiększoną zachorowalnością na sarkoidozę albo gruźlicę (praca nr 7)**

W badaniach własnych (praca nr 7) wykazałam różnicę w polimorfizmie allelu 3, spośród czterech alleli promotora (GT)<sub>n</sub> *NRAMP1* w sarkoidozie. Nie stwierdziłam polimorfizmu allelu 2 tego genu w populacji naszych chorych na gruźlicę, pomimo że wykazano związek obniżonej ekspresji allelu 2 *NRAMP1* ze zwiększoną podatnością na zachorowanie na TB w różnych grupach etnicznych na świecie [7,74,115]. W analizie porównawczej częstości występowania czterech alleli promotora (GT)<sub>n</sub> *NRAMP1* wśród badanych grup, wykazałam, że allel 3 był stwierdzony istotnie częściej w SA, natomiast w TB ujawniłam związek



zwiększonego występowania allelu 2 [116]. Wyżej wspomniana mutacja w *NRAMP1*, stwierdzona wśród Afroamerykanów, związana ze wzrostem ryzyka zachorowania na sarkoidozę, chroni przed rozwojem gruźlicy w badanej populacji [7].

Dotychczas opublikowane wyniki analizy polimorfizmu *NRAMP1* w różnych grupach etnicznych na świecie wskazują, że przewlekła aktywacja monocytów/makrofagów zależna od wzmożonej ekspresji allelu 3 *NRAMP1* może być funkcjonalnie związana ze wzrostem podatności na rozwój chorób autoimmunizacyjnych, podczas gdy obniżona ekspresja allelu 2 tego genu prowadzi do zwiększonej podatności na zachorowanie na choroby infekcyjne [74,115-117]. Wykazano, że *NRAMP1* wpływa na aktywację i różnicowanie się makrofagów poprzez wzrost ekspresji czynników transkrypcyjnych a także antygenów układu HLA klasy II, cytokin TNF- $\alpha$ , IL-10 oraz syntazy tlenku azotu (iNOS). Wywołuje to przewagę odpowiedzi Th1, charakterystycznej np. dla reumatoidalnego zapalenia stawów, cukrzycy typu 1, gruźlicy i także dla sarkoidozy [115,117]. Białko NRAMP1 poprzez regulację gospodarki kationów Fe<sup>2+</sup> uczestniczy również w wytwarzaniu rodników hydroksylowych, które często ujawniają kryptogenne epitopy autoantygenów indukując autoagresję [117].

Zgodnie z moją wiedzą, obecna praca, jest pierwszą próbą oceny polimorfizmu(ów) genu *NRAMP1* wśród chorych na SA i TB przeprowadzonej w obrębie rasy kaukaskiej i przemawia nie tylko za odmiennością podłoża genetycznego tych dwóch chorób o zbliżonym obrazie klinicznym, histopatologicznym, ale przede wszystkim sugeruje możliwość udziału Mtb-hsp w indukcji procesu autodestrukcji w etiopatogenezie sarkoidozy. Również inne badania [118] sugerują, że obecność specyficznych antygenów HLA klasy II na powierzchni limfocytów B zwiększa, mediowaną przez odpowiedź komórkową, autoreaktywność organizmu zakażonego czynnikiem infekcyjnym i prowadzi do rozwoju procesów autoimmunizacyjnych. Ponadto z danych literaturowych wynika, że osobnicy posiadający w swoim haplocyfie typowe dla preferencji wobec zachorowalności na sarkoidozę antygeny HLA-A1, -B8 i -DR3, -DQ2, -DQ8 mogą być częściej predysponowani do rozwoju procesów z autoagresji [65,66]. Sarkoidoza często towarzyszy innym chorobom autoimmunizacyjnym [19,67,68]. Również analogicznie do SA, procesy związane z autoagresją, dotyczą młodych ludzi, zwłaszcza kobiet, u których poziom estrogenów nasilał ekspresję antygenów HLA i przewagę odpowiedzi komórkowej [1-3,5,68]. Za udziałem komponenty autoimmunizacyjnej w patogenezie SA przemawia także stwierdzona obecność przeciwciał anti-Mtb-hsp w surowicy i węzłach chłonnych chorych na SA, które są wykrywane zarówno w chorobach o podłożu autoimmunizacyjnym jak i w przewlekłych zakażeniach, w tym gruźlicy

[19,73,119]. U podłoża procesów z autoagresji jako jedną z innych przyczyn wymienia się mimikrę molekularną między białkami szoku termicznego prątka gruźlicy a hsp komórek ludzkich, ze względu na ich wysoki procent homologii np. hsp70 (46%), hsp65 (60%) i hsp16 (18%) [19,21,38-40,72,75,76,82]. Również stwierdzono znaczny udział mykobakteryjnych hsp70, hsp65 w indukcji procesów z autoagresji poprzez ich wpływ na ekspresję kostymulatorowych cząsteczek (np. CD80/86) czy aktywację komórek regulatorowych, w tym sugerowanych przez nas w pracy nr 3, limfocytów Tr1 [19,21,31,72]. Potwierdzeniem hipotezy udziału dysregulacji ekspresji CD80/CD86, charakterystycznej dla chorób autoimmunizacyjnych, w etiopatogenezie sarkoidozy jest ostatnie doniesienie autorów [120], którzy ujawnili wśród chorych na SA obecność mutacji genu *BTLN2* (butyrophilin-like2) wykazującego homologię funkcjonalną i strukturalną do CD80/CD86. Stwierdzona w badaniach własnych (praca nr 3), obniżona częstość limfocytów CD8<sup>+</sup>γδ<sup>+</sup>IL-4<sup>+</sup> z równoczesnym niskim poziomem IL-4 a wysokim IL-10 w supernatancie z hodowli PBMC stymulowanych hsp prątka gruźlicy, może indukować rozwój procesów z autoagresji [21,47,75,76,82,121]. Również zaburzona apoptoza fagocytów jednojądrzastych z następującą zwiększoną zawartością immunokompleksów, często stwierdzana w chorobach autoimmunizacyjnych, może sugerować obecność procesu z autoagresji w sarkoidozie. Ponadto, w tej samej grupie chorych na SA, stwierdziłam istotnie podwyższoną zawartość przeciwciał narządowo-swoistych, których obecność jest charakterystyczna dla chorób z autoagresji [122].

Potwierdzeniem hipotezy udziału komponenty autoimmunizacyjnej w etiopatogenezie sarkoidozy mogą być opublikowane badania [1,67,68,123,124], których wyniki są zgodne z obecnie przyjętymi kryteriami rozpoznania jednostki chorobowej jako choroby z autoagresji [125]: możliwość przenoszenia SA wraz z przeszczepianym narządem [123], rozwój SA u zwierząt, którym podano dotchawiczo popłuczyny z BAL-u chorego na SA [124], rozwój nacieków limfocytarnych w narządach dotkniętych procesem chorobowym [1], częste współistnienie z innymi chorobami o podłożu autoimmunizacyjnym [67,68], zwiększone ryzyko zachorowania na SA związane z obecnością poszczególnych antygenów HLA [1,65,66] oraz poprawa po zastosowaniu terapii immunosupresyjnej [1].

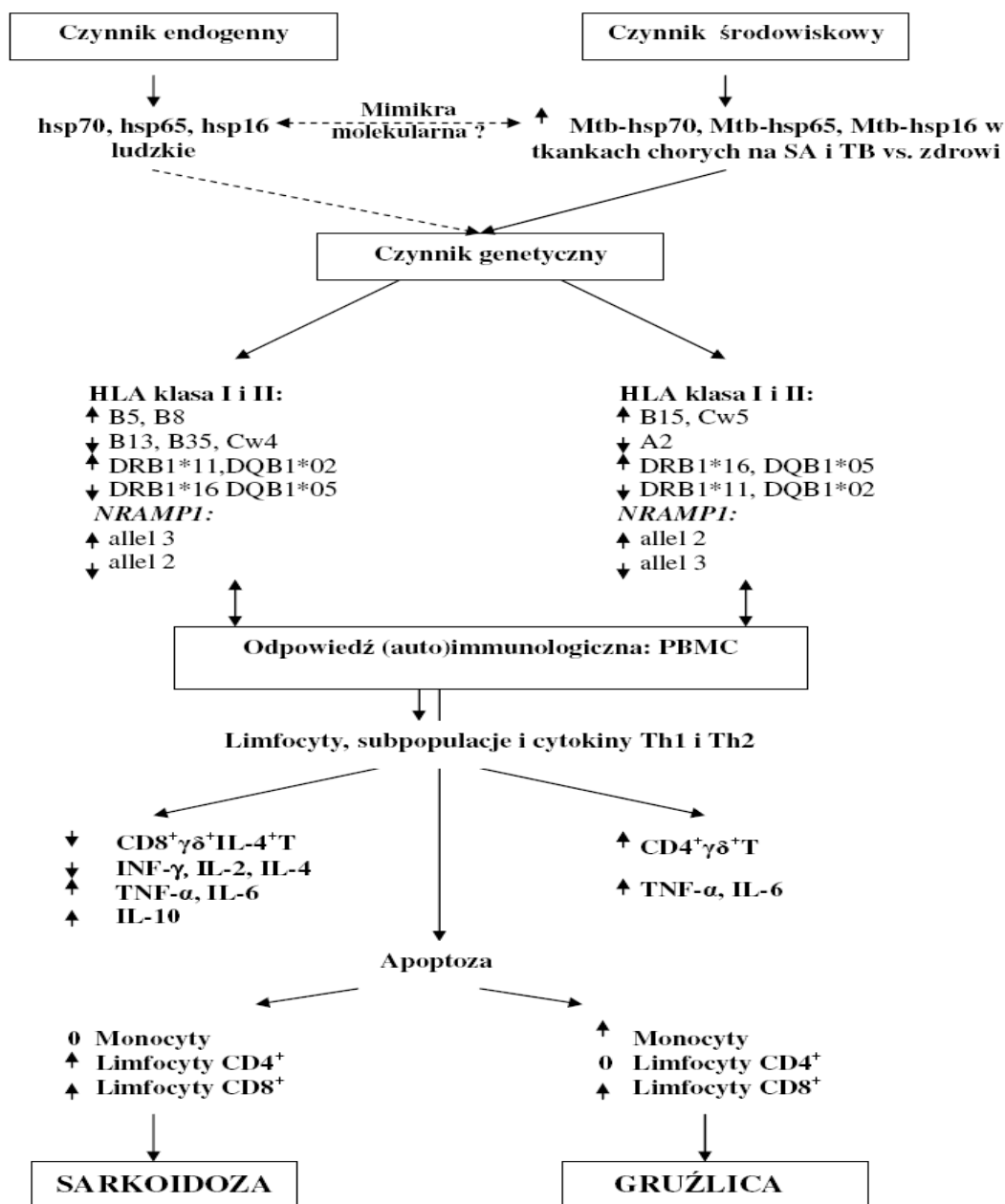
Wyniki moich badań wskazują na możliwość zróżnicowanej prezentacji tych samych antygenów (Mtb-hsp) w odniesieniu do różnych genotypów (HLA, *NRAMP1*) i w konsekwencji różną immunoreaktywność wobec tych antygenów, prowadząc do rozwoju sarkoidozy albo gruźlicy. Ponadto, obserwacje poczynione w moich pracach mogą sugerować istotną rolę Mtb-hsp w indukcji procesów autoimmunizacyjnych.

## V. SYNTETYCZNE OMÓWIENIE WYNIKÓW

Podstawowym pytaniem tej rozprawy było: **Czy białka szoku termicznego *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb-hsp) uczestniczą w etiopatogenezie sarkoidozy?**

Szukając odpowiedzi na to pytanie uzyskałam następujące wyniki:

Analiza molekularna węzłów chłonnych, pobranych od chorych na sarkoidozę nie wykazała obecności prątka gruźlicy u większości badanych. W tej grupie, jak i u chorych na gruźlicę, stwierdziłam wzmożoną ekspresję w węzłach chłonnych i wysoki poziom w surowicy wszystkich badanych przeciwciał anty-Mtb-hsp (praca nr 1 i nr 2).



Ekspresja przeciwciał anti-Mtb-hsp16 w węzłach chłonnych była wyższa niż przeciwciał anti-Mtb-hsp70 we wczesnych fazach rozwoju SA (stan przedziarniniakowy i stadium I). Natomiast fazę II charakteryzowała podwyższona ekspresja i wysoki poziom przeciwciał anti-Mtb-hsp70 w badanych tkankach. Ponadto, w śródbłonku naczyń węzłów chłonnych chorych na sarkoidozę była obecna znamienne większa ekspresja przeciwciał anti-Mtb-hsp65 niż anti-Mtb-hsp70 i anti-Mtb-hsp16.

Odmienne był udział białek szoku termicznego *M. tuberculosis* w reaktywności immunologicznej chorych na SA albo TB. Chorych na sarkoidozę charakteryzowała istotnie obniżona zawartość limfocytów CD4<sup>+</sup>γδ<sup>+</sup>T i niski poziom IL-4, ale statystycznie znamienne wzrost IL-10 po stymulacji Mtb-hsp w porównaniu z chorymi na TB (praca nr 3). Indukcja hodowli PBMC przez hsp prętka gruźlicy wywołała obniżenie zawartości komórek CD8<sup>+</sup>γδ<sup>+</sup>IL-4<sup>+</sup>T u chorych na sarkoidozę w porównaniu z grupą kontrolną. W sarkoidozie w porównaniu z TB, monocyty były istotnie odporne na stymulację apoptozy, podczas gdy komórki CD4<sup>+</sup>T wykazały znamienne odmienną odpowiedź na stymulację Mtb-hsp (praca nr 4).

Stwierdziłam również znamienne różnice w częstości występowania antygenów/alleli HLA klasy I i II wśród chorych na sarkoidozę i chorych na gruźlicę płuc (praca nr 5 i nr 6). Godnym odnotowania jest fakt, że allele DRB1\*11 i DQB1\*02 związane z wysokim ryzykiem rozwoju SA, mogą mieć protekcyjne znaczenie dla rozwoju TB, podczas gdy DRB1\*16 i DQB1\*05 allele związane z niskim ryzykiem rozwoju SA, wykazują związek ze zwiększoną podatnością na rozwój TB. W zakresie polimorfizmu genu *NRAMP1* była także obecna przeciwstawna częstość występowania alleli 2 i 3 w dwóch populacjach pacjentów. Wśród chorych na SA wykazałam istotny związek polimorfizmu allelu 3 promotora (GT)<sub>n</sub> genu *NRAMP1* (praca nr 7) ze zwiększonym ryzykiem rozwoju sarkoidozy, co przemawia nie tylko za odmiennością podłoża genetycznego tych dwóch chorób ale przede wszystkim sugeruje możliwość udziału Mtb-hsp w indukcji procesu z autoagresji w etiopatogenezie SA.

Obecność przeciwciał anti-Mtb-hsp w surowicy i węzłach chłonnych naszych chorych na SA, wykrywanych zarówno w chorobach autoimmunizacyjnych jak i w przewlekłych zakażeniach, przemawia za udziałem procesu z autoagresji w patogenezie sarkoidozy. U podłoża procesów autoimmunizacyjnych jako jedną z innych przyczyn wymienia się także mimikrę molekularną między białkami szoku termicznego prętka gruźlicy a hsp komórek ludzkich ze względu na wysoki procent ich podobieństwa antygenowego. Stwierdzono również znaczny udział Mtb-hsp w indukcji procesów autoimmunizacyjnych poprzez ich wpływ na aktywację komórek regulatorowych, w tym sugerowanych przez nas limfocytów

Tr1. Wykazana w pracy nr 3, obniżona częstość limfocytów  $CD8^+\gamma\delta^+IL-4^+$  z równoczesnym niskim poziomem IL-4 a wysokim IL-10 w supernatancie z hodowli PBMC stymulowanych Mtb-hsp, może indukować rozwój reakcji autoimmunizacyjnych. Również zaburzona apoptoza fagocytów jednojądrowych z następującą immunokompleksemią, opisaną przez mnie wcześniej, często stwierdzana w chorobach z autoagresji, wskazuje na obecność komponenty autoimmunizacyjnej w SA.

Powyższe obserwacje sugerują udział białek szoku termicznego *Mycobacterium tuberculosis* w etiopatogenezie sarkoidozy.

## VI. WNIOSKI

Na podstawie uzyskanych wyników, zawartych w pracach będących przedmiotem rozprawy habilitacyjnej, przedstawiam poniższe wnioski:

1. Odmienna reaktywność monocytów oraz subpopulacji limfocytów CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> wobec antygenów białek szoku termicznego *Mycobacterium tuberculosis* w sarkoidozie i gruźlicy wskazuje na udział hsp prątka gruźlicy w etiopatogenezie tych chorób.
2. Odmienna immunoreaktywność wobec białek szoku termicznego *Mycobacterium tuberculosis* może wynikać z ich zróżnicowanej prezentacji w odniesieniu do różnych genotypów (HLA, *NRAMP1*) chorych na sarkoidozę i gruźlicę.
3. Udział białek szoku termicznego prątka gruźlicy w indukcji procesów autoimmunizacyjnych w etiopatogenezie sarkoidozy wydaje się być wysoce prawdopodobny.

**Powyższe obserwacje sugerują udział białek szoku termicznego *Mycobacterium tuberculosis* w etiopatogenezie sarkoidozy.**

## VII. PIŚMIENICTWO

1. American Thoracic Society: Statement on sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:736-755.
2. Wiatr E. Sarkoidoza. *Przegl Dermatol* 2000; 4:289-301.
3. Zielonka TM. Epidemiologia, genetyka i rodzinne występowanie sarkoidozy. *Pneumonol Alergol Pol* 1996;64(5-6):345-351.
4. Ziora D, Trzepiora B, Kozielski J. Zmiana profilu chorych hospitalizowanych w Klinice Ftizjopneumonologicznej w Zabrze z powodu płucnej manifestacji sarkoidozy w 1976-80 i w 1996-2000. *Pneumonol Alergol Pol* 2005;73(3):234-238.
5. Porzezińska M, Słomiński JM. Sarkoidoza - obraz kliniczny, diagnostyka i leczenie. *Przegl Lek* 2004;61:972-977.
6. Barbers RG. Role of lung, liver, and heart transplantation in sarcoidosis. *Clin Chest Med* 1997;18:865-874.
7. du Bois RM, Goh N, McGrath M, Cullinan P. Is there a role for microorganisms in the pathogenesis of sarcoidosis? *J Intern Med* 2003;253: 4–17.
8. Dworniczak S, Ziora D, Basta L i wsp. Human cytomegalovirus serological status in patients with interstitial lung diseases. *Przegl Epidemiol* 2003;57:431-437.
9. Wiesebuter CW, Sharma OP. Is sarcoidosis an autoimmune disorders?: reports of four cases and review of literature. *Semin Arthritis Rheum* 1979;9:124-144.
10. Bogunia-Kubik K, Koscinska K, Suchnicki K, Lange A. HSP70-hom gene single nucleotide (+2763 G/A and +2437 C/T) polymorphisms in sarcoidosis. *Int J Immunogenet* 2006;33:135–140.
11. Goljan A, Puscinska E, Sankowska M, Zielinski J. Polymorphism of histocompatibility class II antigens coded with the DRB gene in in familial sarcoidosis in Poland. *Pneumonol Alergol Pol* 2000;68(11-12):533-544.
12. Iannuzzi MC, Rybicki BA. Genetics of sarcoidosis: candidate genes and genome scans. *Proc Am Thorac Soc* 2007;4:108-116.
13. Lillebaek T , Thomsen VO. A patient with suspected sarcoidosis died from miliary tuberculosis. *Scand J Infect Dis* 2000;32:218-20.
14. Hrycaj P, Wurm K, Mennet P, Muller W. Antibodies to heat shock proteins in patients with pulmonary sarcoidosis. *Sarcoidosis* 1995;12:124-130.
15. Staton JM, Dench JE, Currie B i wsp. Expression and immune recognition of stress proteins in sarcoidosis and other chronic interstitial lung diseases. *Immunol Cell Biol* 1995;73:23-32.
16. Demkow U, Zielonka TM, Michalowska-Mitczuk D i wsp. Usefulness of measuring serum IgG antibodies against A60 mycobacterial antigen for diagnosis of tuberculosis. *Pol Arch Med Wewn* 1999;101:99-105.
17. Young DB, Lathigra R, Hendrix D, Sweetser D, Young RA. Stress proteins are immune targets in leprosy and tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci* 1988; 85:4267-4270.

18. Bukau B. Associated protein folding. W: Molecular chaperones and folding catalysts. Regulation, cellular function and mechanisms. Eds. Bukau. Harwood Academic Publishers, The Netherlands 1999:3.
19. Zügel, U, Kaufmann, SHE. Role of heat shock proteins in protection from and pathogenesis of infectious diseases. Clin Microbiol Rev 1999;12:19-39.
20. Dubaniewicz A. Immunogenous heat shock protein of *Mycobacterium tuberculosis* in tuberculosis. Pol Merk Lek 2000;8:353-355.
21. Trinchieri G. Regulatory role of T cells producing both interferon  $\gamma$  and interleukin 10 in persistent infection. J Exp Med 2001;194:53-57.
22. Haregewoin A, Soman G, Horn RC, Finberg RW. Human gamma delta<sup>+</sup>T cells respond to mycobacterial heat-shock protein. Nature 1989;340:309-312.
23. Young D, Mehlert A. Serology of mycobacteria: Characterization of antigens recognized by monoclonal antibodies. Rev Infect Dis 1989;11:431-435.
24. Tsan MF, Gao B. Cytokine function of heat shock proteins. Am J Physiol Cell Physiol 2004;286:C739-C744.
25. Beagley KW, Fujihashi K, Black CA i wsp. The *Mycobacterium tuberculosis* 71-kDa heat – shock protein induces proliferation and cytokine secretion by murine gut intraepithelial lymphocytes. Eur J Immunol 1993;23:2049-2059.
26. Davenport MP, McKenzie KR, Basten A i wsp. The variable C-terminal region of the *Mycobacterium leprae* 70-kilodalton heat shock protein is the target for humoral immune responses. Infect Immun 1992;60:1170-1177.
27. Peake PW, Britton WJ, Davenport MP i wsp. Analysis of B-cell epitopes in the variable C-terminal region of the *Mycobacterium leprae* 70-kilodalton heat shock protein. Infect Immun 1993;61:135-141.
28. Detanico T, Rodrigues L, Sabritto AC i wsp. Mycobacterial heat shock protein 70 induces interleukin-10 production: immunomodulation of synovial cell cytokine profile and dendritic cell maturation. Clin Exp Immunol 2004;135:336-342.
29. Friendland JS, Shattock R, Remick DG, Griffin GE. Mycobacterial 65-kD heat shock protein induces release of proinflammatory cytokines from human monocytic cells. Clin Exp Immunol 1993;91:58-62.
30. Rhodes SG, Gavier-Widen D, Buddle BM i wsp. Antigen specificity in experimental bovine tuberculosis. Infect Immun 2000;68:2573-2578.
31. Wang Y, Whittall T, McGowan E i wsp. Identification of stimulating and inhibitory epitopes within the heat shock protein 70 molecule that modulate cytokine production and maturation of dendritic cells. J Immunol 2005;174:3306-3316.
32. Charo J, Sundback M, Geluk A i wsp. DNA immunization of HLA transgenic mice with a plasmid expressing mycobacterial heat shock protein 65 results in HLA class I – and II-restricted T cell responses that can be augmented by cytokines. Hum Gen Therapy 2001;12:1797-1804.
33. Geluk A, Taneja V, vanMeijgaarden KE i wsp. Identification of HLA class II-restricted determinants of *Mycobacterium tuberculosis*-derived proteins by using HLA-transgenic, class II-deficient mice. Immunology 1998;95:10797-10802.



34. Agrewala JN, Wilkinson RJ. Influence of HLA-DR on the phenotype of CD4<sup>+</sup>T lymphocytes specific for an epitope of the 16-kDa  $\alpha$ -crystallin antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur J Immunol* 1999;29:1753-1761.
35. Oftung F, Geluk GA, Lundin KE i wsp. Mapping of multiple HLA class II-restricted T-cell epitopes of the mycobacterial 70-kilodalton heat shock protein. *Infect Immun* 1994;62:5411-5418.
36. van Schooten W, Elferink CA, van Embdenj DG i wsp. DR3-restricted T cells from different HLA-DR3-positive individuals recognize the same peptide of the mycobacterial 65-kDa heat-shock protein. *Eur J Immunol* 1989; 19:2075-2079.
37. Moseley PL. Heat shock proteins and the inflammatory response. *Ann N Y Acad Sci*. 1998;856:206-213.
38. Garsia RJ, Hellqvist L, Booth RJ i wsp. Homology of the 70-kilodalton antigens from *M. leprae* and *M. bovis* with the *M. tuberculosis* 71-kilodalton antigen and with the conserved heat shock protein 70 of eucaryotes. *Infect Immun* 1989;57:204-212.
39. Jindal S, Dudani AK, Singh B i wsp. Primary structure of a human mitochondrial protein homologous to the bacterial and plant chaperonins and to the 65-kilodalton mycobacterial antigen. *Mol Cell Biol* 1989;9:2279-2283.
40. Valdez MM, Clark JI, Wu GJS i wsp. Functional similarities between the small heat shock proteins *Mycobacterium tuberculosis* HSP 16.3 and human  $\alpha$  B-crystallin. *Eur J Biochem* 2002;269:1806-1813.
41. Li B, Rossman MD, Imir T i wsp. Disease-specific changes in gammadelta T cell repertoire and function in patients with pulmonary tuberculosis. *J Immunol* 1996;157: 4222-4229.
42. Dubaniewicz A. Frequency of occurrence of circulating immune complexes in sera of patients with pulmonary sarcoidosis; Preliminary report. *Vestnik MCDC* 2004;III (1): 108-113.
43. Yuan Y, Crane DD, Barry CE, III. Stationary phase-associated protein expression in *Mycobacterium tuberculosis*: function of the mycobacterial alpha-crystallin homolog. *J Bacterial* 1996;178:4484-4492.
44. Iezzi G, Scotet E, Scheidegger D, Lanzavecchia A. The interplay between the duration of TCR and cytokine signaling determines T cell polarization. *Eur J Immunol* 1999;29: 4092-4101.
45. Agrewala JN, Wilkinson RJ. Differential regulation of Th1 and Th2 cells by p91-110 and p21-40 peptides of the 16-kD alpha-crystallin antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Exp Immunol* 1998;114:392-397.
46. Cox JH, Ivanyi J, Young DB i wsp. Orientation of epitopes influences the immunogenicity of synthetic peptide dimers. *Eur J Immunol* 1988;18:2015-2019.
47. Rojas M, Olivier M, Gros P, Barrera LF, Garcia LF. TNF-alpha and IL-10 modulate the induction of apoptosis by virulent *Mycobacterium tuberculosis* in murine macrophages. *J Immunol* 1999;162:6122-6131.
48. Hisaeda H, Sakai T, Ishikawa H i wsp. Heat shock protein 65 induced by  $\gamma\delta$  T cells prevents apoptosis of macrophages and contributes to host defense in mice infected with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 1997;159:2375-2381.

49. Sreedhar AS, Csermely P. Heat shock proteins in the regulation of apoptosis: new strategies in tumor therapy: a comprehensive review. *Pharmacol Ther* 2004;101:227-257.
50. Lang D, Hubrich A, Dohle F i wsp. Differential expression of heat shock protein 70 (hsp70) in human monocytes rendered apoptotic by IL-4 or serum deprivation. *J Leukoc Biol* 2000;68:729-736.
51. Thoma-Uszynski S, Stenger S, Modlin RL. CTL-mediated killing of intracellular *Mycobacterium tuberculosis* is independent of target cell nuclear apoptosis. *J Immunol* 2000;165:5773-5779.
52. Sciorati C, Rovere P, Ferrarini M i wsp. Generation of nitric oxide by the inducible nitric oxide synthase protects gamma delta T cells from *Mycobacterium tuberculosis*-induced apoptosis. *J Immunol* 1999;163:1570-1576.
53. Orosi P, Nugent K. Studies of phagocytic and killing activities of alveolar macrophages in patients with sarcoidosis. *Lung* 1993;171:225-233.
54. Wilsher ML, Fergusson W, Milne D, Wells AU. Exhaled nitric oxide in sarcoidosis. *Thorax* 2005;60:967-970.
55. Te Velde AA, Huijbens RJF, de Vries JE, Figdor CG. IL-4 decreases FcγR membrane expression and FcγR-mediated cytotoxic activity of human monocytes. *J Immunol* 1990;144:3046-3051.
56. Te Velde AA, de Waal Malefijt R, Huijbens RJF i wsp. IL-10 stimulates monocytes FcγR surface expression and cytotoxic activity: distinct regulation of ADCC by INF-γ, IL-4, IL-10. *J Immunol* 1992;149: 4048-4052.
57. Lawley TJ, Hall RP, Fauci AS i wsp. Defective Fc-receptor functions associated with the HLA-B8/DRw3 haplotype: studies in patients with dermatitis herpetiformis and normal subjects *N Engl J Med* 1981;304:1185-1192.
58. Schlesinger L, Bellinger-Kawahara CG, Payne NR, Horwitz MA. Phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by human monocytes complement receptors. *J Immunol* 1990;144:2771-2787.
59. Wright S, Detmers P, Jong M, Meyer B. Interferon-γ depresses binding of ligand by C3b and C3bi receptors on cultured human monocytes, an effect reversed by fibronectin. *J Exp Med* 1986;163:1245-1259.
60. Prohaszka Z, Singh M, Nagy K i wsp. Heat shock protein 70 is a potent activator of the human complement system. *Cell Stress Chaperones* 2002;7:17-22.
61. Prohaszka Z, Duba J, Lakos G i wsp. Antibodies against human heat-shock protein (hsp) 60 and mycobacterial hsp65 differ in their antigen specificity and complement-activating ability. *Int Immunol* 1999;11:1363-1370.
62. Akahoshi M, Ishihara M, Remus N i wsp. Association between IFNA genotype and the risk of sarcoidosis. *Hum Genet* 2004;114:503-509.
63. Kunikane H, Abe S, Yamagushi E. Analysis of restriction fragment length polymorphism for the HLA-DR gene in Japanese patients with sarcoidosis. *Thorax* 1994;49:573-576.
64. Meyer ChG, May J, Stark K. Human leukocyte antigens in tuberculosis and leprosy. *Trends Microbiol* 1998;6:148-153.

65. Price P, Witt C, Allcock R i wsp. The genetic basis for the association of the 8.1ancestral haplotype (A1, B8, DR3) with multiple immunopathological diseases. *Immunol Rev* 1999;167: 257–274.
66. Sidney J, del Guercio MF, Southwood S, Sette A. The HLA molecules DQA1\*0501/B1\*0201 and DQA1\*0301/B1\*0302 share an extensive overlap in peptide binding specificity. *J Immunol* 2002;169:5098-5108.
67. Papadopoulos KI, Hörnblad Y, Liljebladh H i wsp. High frequency of endocrine autoimmunity in patients with sarcoidosis. *Eur J Endocrinol* 1996;134:331-336.
68. Neufeld M, Maclaren NK, Blizzard RM. Autoimmune polyglandular syndromes. *Pediatr Ann* 1980;9:154-162.
69. Salvetti M, Ristori G, Buttinelli C i wsp. The immune response to mycobacterial 70-kDa heat shock proteins frequently involves autoreactive T cells and is quantitatively dysregulated in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 1996;65:143-153.
70. Lamb JR, Bal V, Mendez-Samperio P i wsp. Stress protein may provide link between the immune response to infection and autoimmunity. *Int Immunol* 1989;1:191-196.
71. Cohen IR, Young DB. Autoimmunity, microbial immunity and the immunological homunculus. *Immunol Today* 1991;12:105-110.
72. Paul AG, van Der Zee R, Taams LS, van Eden W. A self-hsp60 peptide acts as a partial agonist inducing expression of B7-2 on mycobacterial hsp60-specific T cells: a possible mechanism for inhibitory T cell regulation of adjuvant arthritis? *Int Immunol* 2000;12:1041-1050.
73. Raja A, Uma Devi KR, Ramalingam B, Brennan PJ. Immunoglobulin G, A, and M responses in serum and circulating immune complexes elicited by the 16-kilodalton antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Diag Lab Immunol* 2002;9:308-312.
74. Searle S, Blackwell JM. Evidence for a functional repeat polymorphism in the promoter of the human NRAMP1 gene that correlates with autoimmune versus infectious disease susceptibility. *J Med Genet* 1999;36:295-299.
75. Yin Z, Craft J. Gamma/delta T cells in autoimmunity. *Spring Sem Immunopath* 2000;22:311-320.
76. Haregewoin A, Singh B, Gupta RS, Finberg RW. A mycobacterial heat-shock protein - responsive gamma delta T cell clone also responds to the homologous human heat-shock protein: a possible link between infection and autoimmunity. *J Infect Dis* 1991;163:156-160.
77. Balbi B, Moller DR, Kirby M, Holroyd KJ, Crystal RG. Increased numbers of T lymphocytes with gamma delta-positive antigen receptors in a subgroup of individuals with pulmonary sarcoidosis. *J Clin Invest* 1990;85:1353-1361.
78. Balbi B, Valle MT, Oddera S i wsp. T-lymphocytes with gamma delta<sup>+</sup> V delta 2<sup>+</sup> antigen receptors are present in increased proportions in a fraction of patients with tuberculosis or with sarcoidosis. *Am Rev Respir Dis* 1993;148:1685-1690.
79. Ito M, Kojiro N, Ikeda T i wsp. Increased proportions of peripheral blood  $\gamma\delta^+$  T cells in patients with pulmonary tuberculosis. *Chest* 1992;102:195-197.
80. Wilsher ML, Hallows M, Birchall NM. Gamma/delta T lymphocytes in the blood of patients with sarcoidosis. *Thorax* 1995;50:858-862.

81. Zügel U, Kaufmann SHE. Activation of CD8 T cells with specificity for mycobacterial heat shock protein 60 in *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin-vaccinated mice. *Infect Immun* 1997;65:3947-3950.
82. Zügel U, Schoel B, Yamamoto S i wsp. Crossrecognition by CD8 T cell receptor alpha beta cytotoxic T lymphocytes peptides in the self and the mycobacterial hsp60 which intermediate sequence homology. *Eur J Immunol* 1995;25:451-458.
83. Gazouli M, Ikonomopoulos J, Koundourakis A i wsp. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates from Greek patients with sarcoidosis by spoligotyping. *J Clin Microbiol* 2005;43:4858-4861.
84. Wahlström J, Katchar K, Wigzell H i wsp. Analysis of Intracellular Cytokines in CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> Lung and Blood T Cells in Sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163: 115-121.
85. Ordway DJ, Costa L, Martins M i wsp. Increased Interleukin-4 production by CD8 and gammadelta T cells in health-care workers is associated with the subsequent development of active tuberculosis. *J Infect Dis* 2004;190:756-766.
86. Inui N, Chida K, Suda T, Nakamura H. TH1/TH2 and TC1/TC2 profiles in peripheral blood and bronchoalveolar lavage fluid cells in pulmonary sarcoidosis. *J Allergy Clin Immunol* 2001;107,337-344.
87. Prasse A, Georges CG, Biller H i wsp. Th1 cytokine pattern in sarcoidosis is expressed by bronchoalveolar CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>T cells. *Clin Exp Immunol* 2000;122:241-248.
88. Spits H, Paliard X, Vandekerckhove Y i wsp. Functional and phenotypic differences between CD4<sup>+</sup> and CD4<sup>-</sup> T cell receptor-gamma delta clones from peripheral blood. *J Immunol* 1991;147:1180-1188.
89. Kataria YP, Holter JF. Immunology of sarcoidosis. *Clin Chest Med* 1997;18:719-739.
90. Wendling U, Paul L, van der Zee R i wsp. A conserved mycobacterial heat shock protein (hsp) 70 sequence prevents adjuvant arthritis upon nasal administration and induces IL-10-producing T cells that cross-react with the mammalian self-hsp70 homologue. *J Immunol* 2000; 164: 2711-2717.
91. de Waal M, Haanen RJ, Spits H i wsp. Interleukin-1- (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med* 1991;174:915-924.
92. Takahashi S, Setoguchi Y, Nukiwa T, Crystal RG. Soluble interleukin-2 receptor in sera of patients with pulmonary tuberculosis. *Chest* 1991; 99: 310-314.
93. Lawrence EC, Berger MB, Brousseau KP i wsp. Elevated serum levels of soluble interleukin-2 receptors in active pulmonary sarcoidosis: relative specificity and association with hypercalcemia. *Sarcoidosis* 1987; 4: 87-93.
94. Miyara M, Amoura Z, Parizot C i wsp. The immune paradox of sarcoidosis and regulatory T cells. *J Exp Med* 2006; 203: 359-370.
95. Planck A, Katchar K, Eklund A i wsp. T-lymphocyte activity in HLA-DR17 positive patients with active and clinically recovered sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 2003; 20: 110-117.
96. Trzonkowski P, Myśliwska J, Szmit E i wsp. Association between cytomegalovirus infection, enhanced proinflammatory response and low level of anti-hemagglutinins

- during the anti-influenza vaccination- an impact of immunosenescence. *Vaccine* 2003; 21: 3826-3836.
97. Dubaniewicz A, Dubaniewicz A. Apoptosis peripheral blood mononuclear cells in sarcoidosis and tuberculosis; Review. *Pol Merk Lek* 2005; 9:563-566.
  98. Flad HD, Grage-Griebenow E, Petersen F i wsp. The role cytokines in monocyte apoptosis. *Pathobiology* 1999;67:291-293.
  99. Beltan E, Horgen L, Rastogi N. Secretion of cytokines by human macrophages upon infection by pathogenic and non-pathogenic mycobacteria. *Microbiol Patholog* 2000; 28:313-318.
  100. Manca C, Tsenova L, Barry CE 3rd i wsp. *Mycobacterium tuberculosis* CDC1551 induces a more vigorous host response in vivo and in vitro, but is not more virulent than other clinical isolates. *J Immunol* 1999;162:6740-6746.
  101. Kopiński P, Przybylski G, Balicka-Slusarczyk B i wsp. Apoptosis of alveolar lymphocytes in sarcoidosis and in control group is more frequent in smokers than in nonsmoking persons. *Przegl Lek* 2006;63:841-847.
  102. Klingler K, Tchou-Wong KM, Brandli O i wsp. Effects of mycobacteria on regulation of apoptosis in mononuclear phagocytes. *Infect Immun* 1997;65:5272-5278.
  103. Rutherford RM, Kehren J, Staedtler F i wsp. Functional genomics in sarcoidosis-reduced or increased apoptosis? *Swiss Med Wkly* 2001;131:459-470.
  104. Sly LM, Hingley-Wilson SM, Reiner NE i wsp. Survival of *Mycobacterium tuberculosis* in host macrophages involves resistance to apoptosis dependent upon induction of antiapoptotic Bcl-2 family member Mc1-1. *J Immunol* 2003;170:430-437.
  105. Spector WG, Hessom N. The production of granulomata by antigen-antibody complexes. *J Pathol* 1969;98:31-39.
  106. Ullman S, Halberg P, Stahl D, Veien NK. Cutaneous sarcoidosis: an immunofluorescence study. *Acta Derm Venerol* 1983;63:343-346.
  107. Loegering DJ, Schwacha MG. Macrophage hydrogen peroxide production and phagocytic function are decreased following phagocytosis mediated by Fc receptors but not complement receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;180:268-272.
  108. van de Vinkel WL, Kim MK, Mayo-Bond L i wsp. The cytoplasmic domain of FcγRIIA (CD32) participates in phagolysosome formation. *Blood* 2001;98:3429-3434.
  109. Zielger-Heitbrock HW. Heterogeneity of human blood monocytes: the CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> subpopulation. *Immunol Today* 1996;17:424-428.
  110. Belge KU, Dayyani F, Horelt A i wsp. The proinflammatory CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>DR<sup>++</sup> monocytes are a major source of TNF. *J Immunol* 2002;168:3536-3542.
  111. Nunn P. The global control of tuberculosis: what are the prospects? *Scan J Infect Dis* 2001;35:329-332.
  112. Hosoda Y, Sasagawa S, Yamaguchi T. Sarcoidosis and tuberculosis: epidemiological similarities and dissimilarities. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 2004;21:85-93.
  113. Szczuka I. Tuberculosis and lung diseases in Poland in 2001. *Bull Natl Tuberc Lung Dis Res Inst* 2002;11-99.

114. Sewell DL, Reinke EK, Co DO i wsp. Infection with *Mycobacterium bovis* BCG diverts traffic of myelin oligodendroglial glycoprotein autoantigen-specific T cells away from the central nervous system and ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003;10:564-572.
115. Blackwell JM, Goswami T, Evans CA i wsp. SLC11A1 (formerly NRAMP1) and disease resistance. *Cell Microbiol* 2001;3:773-784.
116. Dubaniewicz A, Jamieson S, Blackwell JM. Polymorphic alleles at *NRAMP1* in sarcoidosis and tuberculosis. *Eur Resp J* 2005;26(49):468s.
117. Bowlus CL. The role of iron in T cell development and autoimmunity. *Autoimmunity Rev* 2003;2:73-78.
118. Rook GA, Adams V, Hunt J i wsp. Mycobacteria and other environmental organisms as immunomodulators for immunoregulatory disorders. *Springer Semin Immunopathol* 2004;25: 237-255.
119. Demkow U, Białas-Chromiec B, Filewska M i wsp. Humoral immune response against mycobacterial antigens in patients with tuberculosis and mycobacterial infections other than tuberculosis. *Pneumonol Alergol Pol* 2006;74(2):203-208.
120. Valentonyte R, Hampe J, Huse K i wsp. Sarcoidosis is associated with a truncating splice site mutation in *BTNL2*. *Nature Genetics* 2005;37:357-364.
121. Mendez-Samperio P, Badillo-Flores A, Nunez-Vazquez A, Hernandez GM. Interleukin-4 inhibits secretion of interleukin-1beta in the response of human cells to mycobacterial heat shock proteins. *Clin Diagn Lab Immunol* 1997;4:665-670.
122. Dubaniewicz A, Szczerkowska Z, Bąkowska A, Hoppe A. Frequency of autoantibodies (autoAb) and circulating immune complexes (CI) occurrences in pulmonary sarcoidosis. *Eur Resp J* 2002; 20(38):313s
123. Milman N, Andersen CB, Burton CM, Iversen M. Recurrent sarcoid granulomas in a transplanted lung derive from recipient immune cells. *Eur Respir J* 2005;26:549-552.
124. Ikonopoulou JA, Gorgoulis VG, Kastrinakis NG i wsp. Experimental inoculation of laboratory animals with samples collected from sarcoïdal patients and molecular diagnostic evaluation of the results. *In Vivo* 2000;14:761-765.
125. Betterle C, Pra CD, Mantero F, Zanchetta R. Autoimmune adrenal insufficiency and autoimmune polyendocrine syndromes: autoantibodies, autoantigens, and their applicability in diagnosis and disease prediction. *Endocr Rev* 2002;23:327-364.

## VIII. ZAŁĄCZONE PUBLIKACJE