

VILNIAUS UNIVERSITETO MEDICINOS FAKULTETO
FIZIOLOGIJOS, BIOCHEMIJOS IR
LABORATORINĖS MEDICINOS KATEDRA

MAGISTRO DARBAS

SERGANČIŲJŲ PLAUČIŲ SARKOIDOZE T LIMFOCITŲ
PROLIFERACINIO IR APOPTOZĖS INICIJAVIMO RECEPTORIŲ
TYRIMAS BRONCHOALVEOLINIO LAVAŽO SKYSTYJE IR
PERIFERINIAME KRAUJYJE

Magistrantė VALENTINA GINEVIČIENĖ _____

Darbo vadovė dr. L. JURGAUSKIENĖ _____

VU MF Fiziologijos, biochemijos ir
laboratorinės medicinos katedros vedėja
hab.dr., prof. Z. Kučinskienė

leidžiama ginti _____

Darbo įteikimo data _____

Registracijos Nr. _____

2006

TURINYS

TEKSTE VARTOJAMI LIETUVIŠKI IR TARPTAUTINIAI SUTRUMPINIMAI.....	3
ĮVADAS	5
DARBO TIKSLAS:.....	6
DARBO UŽDAVINIAI:	6
1. LITERATŪROS APŽVALGA	7
1.1. SARKOIDOZĖ.....	7
1.1.1. Epidemiologija.....	9
1.1.2. Etiologija	9
1.1.3. Sarkoidozės imunopatogenezės etapai	9
1.1.4. Sergančiųjų sarkoidoze kvėpavimo organų imuninis atsakas	10
1.2. APOPTOZĖ.....	13
1.2.1. Apoptozės mechanizmai.....	14
1.2.1.1. Apoptozę sukeliančio signalo perdavimas	14
1.2.1.2. Kontrolės ir integracijos fazė.....	17
1.2.1.3. Vykdomoji apoptozės fazė	19
1.2.1.4. Žuvusių ląstelių pašalinimas.....	20
1.2.2. Patologija, atsirandanti dėl apoptozės sutrikimų	21
1.2.3. Apoptozė sarkoidozės atveju	21
1.2.4. Dažniausiai naudojami apoptozinių ląstelių nustatymo metodai	23
1.3. DAUGIAPARAMETRĖ TĖKMĖS CITOMETRIJA	25
1.3.1. Imunokompetentinių ląstelių žymenys.....	27
2. TIRIAMOJI MEDŽIAGA IR METODAI	28
2.1. TIRIAMIEJI	28
2.2. DARBO EIGA.....	29
2.2.1. Tiriamosios medžiagos surinkimas	29
2.2.2. Ląstelių gyvybingumo vertinimo metodika.....	30
2.2.3. Mėginių ruošimo tėkmės citometriniame tyrimui metodika	30
2.2.4. Duomenų analizė	32
2.2.5. Statistinė duomenų analizė	33
3. REZULTATAI	34
3.1. SERGANČIŪJŲ SARKOIDOZE IL-2R (CD25) EKSPRESUOJANČIŲ LIMFOCITŲ ANALIZĖ BAL SKYSTYJE IR PERIFERINIAME KRAUJYJE	37
3.2. SERGANČIŪJŲ SARKOIDOZE APOPTOZĖS INICIJAVIMO RECEPTORIŲ (CD95) EKSPRESUOJANČIŲ LIMFOCITŲ ANALIZĖ BAL SKYSTYJE IR PERIFERINIAME KRAUJYJE.....	41
4. REZULTATŲ APTARIMAS	46
IŠVADOS	49
PADĖKA.....	51
LITERATŪRA	52

TEKSTE VARTOJAMI LIETUVIŠKI IR TARPTAUTINIAI SUTRUMPINIMAI

AIDS	įgytas imunodeficitas sindromas (angl. <i>acquired immunodeficiency syndrome</i>)
Apaf-1	apoptozės proteazės aktyvinantis veiksnys, proapoptotinis baltymas (angl. <i>apoptotic protease activating factor</i>)
APL	antigeną pateikianti ląstelė
AT - PGR	atvirkštinės transkriptazės PGR (angl. <i>RT - PCR, reverse transcriptase - PCR</i>)
BAL	bronchoalveolinis lavažas
Bcl-2	antiapoptozinis baltymas Bcl-2
BCR	B limfocitų receptoriaus (angl. <i>B cell receptor</i>)
CD	leukocitų diferenciacijos grupė (angl. <i>cluster of differentiation</i>)
CTL	citotoksiniškas T limfocitas
DNR	deoksiribonukleorūgštis
FAAD	adaptacinis baltymas, su Fas susijęs žūties domenai (angl. <i>Fas-associated death domain</i>)
Fas	apoptozės inicijavimo receptoriaus (CD95)
FasL	apoptozės inicijavimo receptoriaus Fas ligandas
FITC	fluoresceino izotiocianatas
Fc	antikūno molekulinė dalis (angl. <i>fragment crystallizable</i>)
CSF	kolonijas stimuliuojantys faktoriai (angl. <i>colony stimulating factor</i>)
IFN	interferonas
Ig	imunoglobulinas
IL	interleukinas
IL-2R	interleukino-2 receptoriaus
iRNR	informacinė ribonukleorūgštis
ISEL	imunofermentinis metodas apoptozei nustatyti (angl. <i>In situ end labeling</i>).
kDa	kilodaltonas
LAK	limfocinų aktyvintas natūralus kileris (angl. <i>lymphokine activated killer</i>)
LWB	lizuoto kraujo technika (angl. <i>lysed whole blood</i>)
MHC	pagrindinis audinių suderinamumo kompleksas (angl. <i>major histocompatibility complex</i>)
NK	natūralieji kileriai (angl. <i>natural killer</i>)
NNF	navikų nekrozės faktorius (angl. <i>tumour necrosis factor, TNF</i>)
NNFR	navikų nekrozės faktoriaus receptoriaus (angl. <i>tumour necrosis factor receptor, TNFR</i>)
PE	fikoeritinas (angl. <i>phycoerythrin</i>)
PGR	polimerazės grandininė reakcija (angl. <i>polymerase chain reaction, PCR</i>)
PŠS	priekinė šviesos sklaida (angl. <i>forward scatter, FSC</i>)

p53	53 kDa baltymas, transkripcijos veiksnys, vėžį slopinantis baltymas
RIP	su receptoriumi sąveikaujantis baltymas (angl. <i>receptor interacting protein</i>)
ŠŠS	šoninė šviesos sklaida (angl. <i>side scatter, SSC</i>)
TCR	T limfocitų receptorių (angl. <i>T cell receptor</i>)
TGFβ	β transformuojantis augimo faktorius (angl. <i>transforming growth factor-β</i>)
Th	T helperiai limfocitai
TRADD	NNFR adaptacinis baltymas turintis atitinkamus žūties domenus (angl. <i>TNFR-adaptor protein with death domain</i>)
TUNEL	imunofermentinis metodas apoptozei nustatyti (angl. <i>TdT mediated dUTP-biotin nick end labeling</i>)
ŽLA	žmogaus leukocitų antigenai (angl. <i>human leukocyte antigens, HLA</i>)

ĮVADAS

Sarkoidozė – tai lėtinė nežinomos etiologijos granulominė liga, pažeidžianti daugelį organų. Prieš šimtą metų sarkoidozė buvo apibūdinama kaip odos liga. Vėliau sarkoidozė buvo aprašoma dažniausiai kaip asimptominė tarpuplaučio limfadenopatija su ar be plaučių infiltratų [67, 81]. Pastaruosius 20 metų plaučių ligų diagnostikai ir tyrimui pradėjus plačiai taikyti bronchoalveolinį lavažą (BAL), paaiškėjo, kad sarkoidozė yra imuninė liga. Dabar sarkoidozė apibrėžiama kaip multiorganinė liga, pasireiškianti imuniniu atsaku vyraujant ląsteliniam pažeistuose organuose. Ja, kaip dabar manoma, po ekspozicijos su aplinkos veiksniais (antigenais), suserga genetinę predispoziciją turintys žmonės [9, 53, 64, 67].

Ligos metų aktyvinti antigeno CD4+ T helperiai (Th) limfocitai veikiami IL-2 (CD25) proliferuoja ir susikaupia plaučių alveolėse, sukeldami T ląstelinį alveolitą [9, 21, 46, 62, 77]. BAL skystyje didėja limfocitų skaičius ir CD4+/CD8+ limfocitų potipių santykis [61, 74]. Kartu su alveolitu formuojasi granulomos. Granulomos gali susiskaidyti spontaniškai arba išnykti tik po tam tikro gydymo, liga gali progresuoti išvešant fibroziniam audiniui [34, 74].

Paskutinių metų moksliniai tyrimai parodė, jog sarkoidozės metu formuojantis granulomoms ir vykstant uždegimui reikšminga ne vien aktyvintų ląstelių proliferacija, bet ir jų „programuota mirtis“ arba apoptozė [59, 71]. Apoptozė yra fiziologinis genetiškai reguliuojamas ląstelių pašalinimo procesas, reikalingas audinių homeostazei palaikyti. Šio proceso suvokimas leidžia sukurti naujus pranašesnius diagnostikos ir gydymo metodus. Yra nustatyta, kad plaučių homeostazei palaikyti būtina pusiausvyra tarp apoptozės ir uždegiminių ląstelių išgyvenamumo [41, 43, 71]. Atlikta nemažai įvairių mokslinių tyrimų, nagrinėjančių apoptozės mechanizmą, tačiau iki šiol yra mažai žinoma apie T limfocitų likimą plaučiuose [43].

Naudojamos įvairios apoptozės mechanizmų tyrimo metodikos. Morfologinius apoptozės požymius galima nustatyti elektroniniu mikroskopu, tačiau tyrimas yra sunkus, nes šis procesas yra trumpalaikis, todėl mėginyje būna nedaug ląstelių su aiškiais programuotos mirties požymiais [50, 79]. Dabar apoptozinėms ląstelėms nustatyti dažniausiai atliekamos *in situ* fermentinės reakcijos (pvž. TUNEL). Tyrimų, nagrinėjančių apoptozę, atliekama vis daugiau, tačiau dažniau pasirodo ir straipsnių, vertinančių metodinius apoptozės nustatymo ypatumus. Jau yra žinoma, kad, atliekant *in situ* fermentines reakcijas, gali būti klaidingų apoptozės reakcijų. Kad duomenys būtų tikslūs, būtina standartizuoti šias reakcijas, o patikimiau būtų – jas derinti su kitais apoptozės nustatymo metodais. Norint gauti patikimus duomenis, neatliekant biopsijos galima panaudoti tekamės citometriją nustatant Fas ligando ir Fas receptorius ant tiriamų ląstelių membranų paviršiaus. Fas antigenas (CD95) yra vienas iš apoptozę sukeliančių signalų perdavimo receptorių [54, 65,].

Šiuo metu intensyviai tiriama galimi sarkoidozės aktyvumo kriterijai. Daugumai ligonių klinikiniai ir rentgeniniai ligos požymiai savaime išnyksta per kelis mėnesius ar kelerius metus, priklausomai nuo ligos formos. Granulomų rezorbcijos ir uždegimo rezoliucijos bei liekamųjų reiškinų mechanizmas tiksliai nežinomas. Pastaraisiais metais kai kurių autorių atlikti darbai parodė, kad sergantiesiems sarkoidoze yra didesnė rizika susirgti vėžiu. Manoma, kad lėtinis uždegimas skatina ląstelės supiktybėti [74].

Kadangi sarkoidozės etiologija yra nežinoma ir iki šiol nėra aiški sarkoidoze sergančiųjų įvairia šios ligos forma prognozė, mes tyrėme ligonių, sergančių aktyvia ir neaktyvia plaučių sarkoidozės forma, T limfocitų proliferacinio (CD25) ir apoptozės inicijavimo (CD95) receptorių ekspresiją BAL skystyje ir periferiniame kraujyje. Naudojome vieną iš informatyviausių laboratorinio tyrimo metodų – daugiaparametrę tėkmės citometriją.

DARBO TIKSLAS:

Ištirti ligonių, sergančių plaučių sarkoidoze, proliferacinio (CD25) ir apoptozės inicijavimo (CD95) receptorių ekspresiją T limfocitų membranose bronchoalveolinio lavažo skystyje ir periferiniame kraujyje

DARBO UŽDAVINIAI:

1. Nustatyti ligonių, sergančių sarkoidoze, apoptozės inicijavimo (CD95) receptoriaus ekspresiją T limfocitų membranose BAL skystyje ir periferiniame kraujyje.
2. Palyginti ligonių, sergančių aktyvia ir neaktyvia sarkoidozės formomis, CD95 receptoriaus ekspresiją T limfocitų paviršiuje ir lokaliame ir sisteminiame imuniniame atsake.
3. Nustatyti ligonių, sergančių sarkoidoze, IL-2R (CD25) ekspresiją T limfocitų membranose BAL skystyje ir periferiniame kraujyje.
4. Palyginti ligonių, sergančių skirtingomis sarkoidozės formomis CD25 receptoriaus ekspresiją T limfocitų membranose tiek lokaliame tiek sisteminiame imuniniame atsake.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

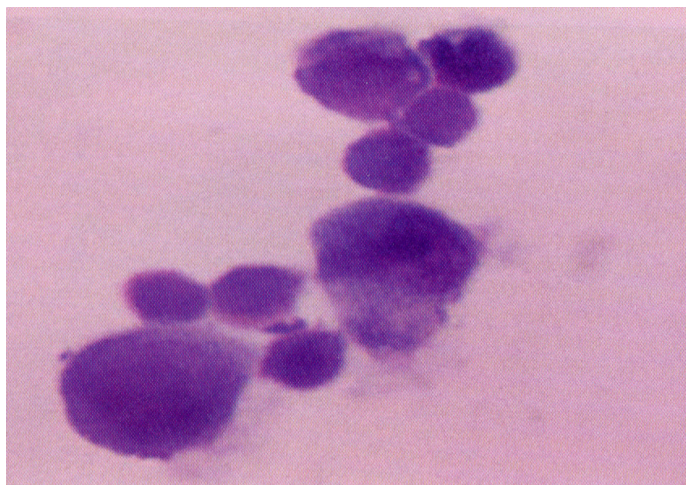
1.1. SARKOIDOZĖ

Sarkoidozė - sisteminė neaiškios etiologijos granulominė liga. Sarkoidozė anksčiau buvo apibrėžiama kaip liga, pirmiausia pažeidžianti odą. Tačiau pasirodė, jog sarkoidozė net 90% atvejų pažeidžia plaučius, šiek tiek rečiau – akis, blužnį, inkstus ir kt. Sarkoidozė gali pažeisti bet kuri organą [64, 67, 72, 80, 81].

Ligos metu susiformavusios granulomos gali susiskaidyti spontaniškai arba išnykti tik po tam tikro gydymo. Kartais liga gali progresuoti išvešant fibroziniam audiniui ir dėl to sutrinka normali organo funkcija [34, 53, 64]. Savaiminė sarkoidozės remisija (per 1-3 metus) įvyksta 70-80 procentų ligonių. Sarkoidozės eiga tampa lėtine 10-20 procentų atvejų. Tik 2-8 procentai pacientų, kuriems įvyko savaiminė remisija ar ligos stabilizacija, pasireiškia recidyvų [67, 74].

Tiksliai nustatyti sarkoidozės paplitimą sunku, nes dažnai ligos eiga būna besimptomė, tik vienam trečdaliui ligonių pakyla temperatūra, atsiranda greitas nuovargis, kartais svorio kritimas [56]. Rečiau nustatoma ūminės sarkoidozės simptomų, kurie gali pasireikšti įvairiais klinikiniais respiraciniais ir nerespiraciniais simptomais, patologiniais pokyčiais krūtinės ląstos rentgenogramose ar sutrikusia plaučių funkcija. Jei ligos simptomai išlieka ilgiau kaip dvejus metus, sarkoidozė yra lėtinė. Lėtinė plaučių sarkoidozė pasireiškia nuolatiniais ar progresuojančiais ligos simptomais, kuriuos lemia progresuojanti pneumofibrozę ir normalios plaučių struktūros suardymas [64, 67, 74].

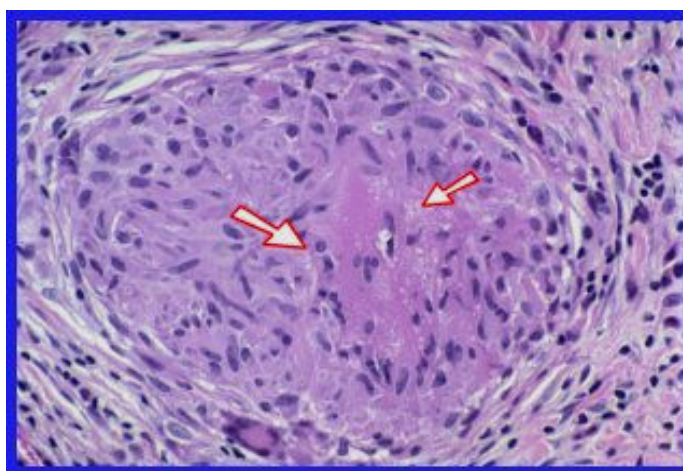
Kaip pažymi A. Pietinalho, 50% atvejų liga aptinkama sveikatos patikrinimo metu [60]. Šiuos ligonius tiriant rentgeno aparatu, dažniausia randama abipusė plaučių šaknų limfadenopatija ar plaučių infiltracija. Plaučių sarkoidozės diagnozė nustatoma, kai yra tam tikri klinikiniai ir rentgeniniai radiniai, patvirtinti audinių biopsija ar tipiniais bronchoalveolinio lavažo (BAL) skysčio pokyčiais [64]. BAL skystyje randamas padidėjęs CD4+ limfocitų skaičius, CD4+/CD8+ T limfocitų santykis, kartais makrofagų-limfocitų rožečių (1 pav.). Tačiau klinikiniai sarkoidozės simptomai ir histologiniai radiniai yra nespecifiniai, o epitelioidinė granuloma, nustatoma sarkoidozės atveju, yra neatskiriama nuo kitos kilmės granulomų [34]. Granulomų centrinėje dalyje yra makrofagų, daugiabranduolių gigantiškųjų ir epitelioidinių ląstelių, periferinėje zonoje – limfocitų, monocitų, fibroblastų. Granulomos centre gali būti fibrinoidinė nekrozė (2 pav.). Granulomos susiformavimas yra T ląstelių sužadinto imuninio atsako, nukreipto prieš nežinomą persistojantį antigeną, rezultatas. [24, 69]. Per 2-3 mėnesius granulomos gali rezorbuotis be jokių liekamųjų pokyčių arba jų vietoje formuojasi fibrozė [53, 67, 72, 73].



1 pav. BAL skystis. Makrofagų-limfocitų rozetės (Šatkauskas B., 2004)

Pradėjus taikyti bronchoskopiją ir bronchoalveolinio lavažo skysčio tyrimus, ši liga diagnozuojama radus tipiškus BAL skysčio pokyčius ir ekskludavus kitas, panašų rentgeninį vaizdą turinčias plaučių ligas. Kaip teigia G. Hunnighake ir kt., BAL skystis gali būti naudojamas sarkoidozės diagnostikai, net kai bronchoskopinė plaučių audinio biopsija yra nerezultatyvi. Sarkoidozės atveju $CD4+/CD8+ >3,5$, šio rodiklio specifiškumas yra apie 94% [13, 20, 28]. Daugelis mokslininkų pažymi, kad BAL skystis yra plaučių parenchimos uždegiminio proceso atspindys [35, 72, 73, 74].

Sarkoidozei būdingi ir kai kurie laboratorinių rodiklių pokyčiai: leukopenija, anemija, galima hiperglobulinemija, kartais hiperkalcemija ir hiperkalciurija, padidėjusi angiotenziną konvertuojančio fermento koncentracija kraujo serume [56, 64, 81].



2 pav. Nekrozė sarkoidozės granulioje (Cree I.A et al 1987)

1.1.1. Epidemiologija

Sarkoidozė yra dažniausiai diagnozuojama diseminota plaučių liga [16]. Tačiau jos paplitimas tiksliai nežinomas, nes daugeliui ligonių, sergančių sarkoidoze, nėra jokių ligos simptomų. Sergamumas sarkoidoze įvairiuose šalyse sudaro 9 – 64 atvejus 100 000 gyventojų. Sarkoidoze dažniausiai serga suaugę žmonės nuo 20 iki 40 metų, sergamumo pikas – trečia gyvenimo dekada [19, 56].

Sarkoidozės klinikiniai simptomai, ligos eiga ir įvairių organų pažeidimas priklauso nuo žmogaus rasės, tautybės ir gyvenamosios vietos [67, 74]. Duomenų apie sergamumą šia liga Lietuvoje neradome.

1.1.2. Etiologija

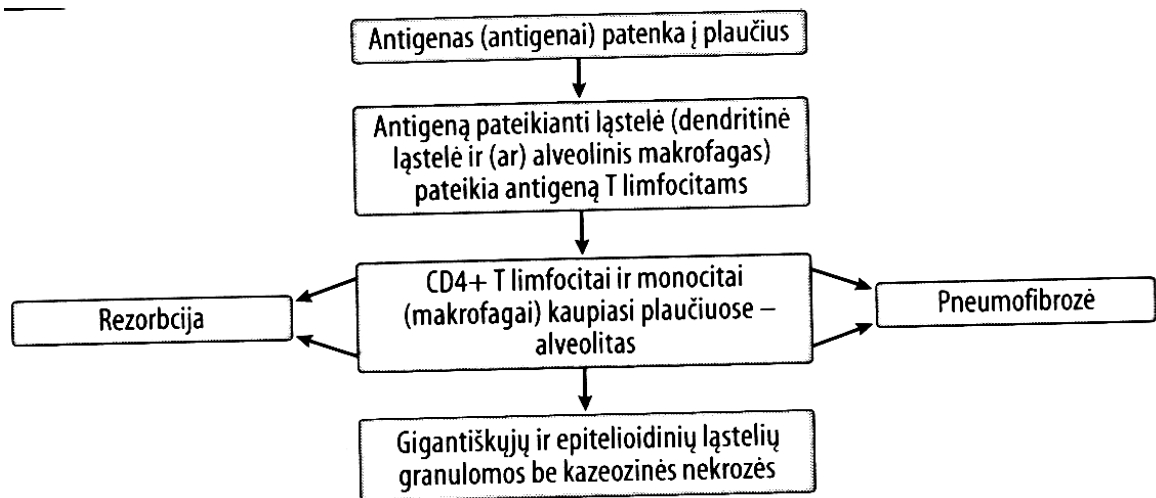
Sarkoidozės etiologija iki šiol nežinoma [53, 64, 67, 74]. Prieš šimtą metų sarkoidozė buvo apibūdinama kaip odos liga. Vėliau sarkoidozė buvo aprašoma dažniausiai kaip asimptominė tarpuplaučio limfadenopatija su ar be plaučių infiltratų [81]. 1905 metais M. Boeckas aprašė sarkoidozę kaip „bakterinę infekcinę ligą“. Nuo to laiko intensyviai ieškota sarkoidozės sukėlėjo [63].

Ligoniams, turintiems genetinę predispoziciją sirgti sarkoidoze, pagrindiniu veiksniumi yra laikomas antigenas. Šis su sarkoidoze susijęs hipotetinis antigenas gali būti specifinis, arba alternatyviai – tai gali būti keli antigenai, kurie galėtų paaiškinti skirtingas šios ligos formas. Antigenų kilmė įvairi: tai gali būti mikobakterinės infekcijos (pvz. *M. tuberculosis*, fagų transformuotos mikobakterijos ir t.t.), kiti infekciniai agentai (pvz. virusai, mikoplazmos), organiniai agentai (pvz. pušų žiedadulkės), neorganinės medžiagos (pvz. talkas, berilis) [19, 23].

1.1.3. Sarkoidozės imunopatogenezės etapai

Alveolito fazė. Pirmasis etapas – iniciacija, kurią sąlygoja kontaktas su vienu hipotetiniu specifiniu antigenu ar keliais antigenais [73]. Po kontakto su antigenu (antigenais) dendritinės ląstelės skatina „naivius“ CD4 (Th0) limfocitus diferencijuotis į CD4 (Th1) ląsteles. Th1 ląstelės sekretuoja IL-2 ir skatina T limfocitų proliferaciją ir akumuliaciją. Plaučiuose ir kitose organuose kaupiasi iš kraujo migravę CD4+ limfocitai. Limfocitų migraciją į plaučius skatina ir alveolinių makrofagų sekretuojamos medžiagos (3 pav.) [53, 72, 74].

Granulomų susidarimo fazė. Antrasis etapas – plaučiuose kaupiasi makrofagai (monocitai), kurių dalis transformuojasi į epitelioidines ląsteles. Formuojasi epitelioidinių gigantiųjų ląstelių granulomos (3 pav.) [13, 72, 74].



3 pav. Sarkoidozės patogenezė (pagal B.Šatkauską, E.Danilą, 2004)

Fibroziųjų pokyčių fazė. Trečiasis patogenezės etapas – pneumofibrozę atsiradimas (3 pav.). Plaučiuose aktyvinama koaguliacijos kaskada, kuri skatina fibrino depoziciją alveolėse ir intersticiniame audinyje. Fibrinas tiesiogiai didina kraujagyslių pralaidumą ir yra kolageno pagrindas. Plaučių fibrozė susidaro tik nedidelei sarkoidoze sergančių daliai. Granulomų rezorbcijos ir uždegimo rezoliucijos be liekamųjų reiškinų mechanizmas nežinomas. Specialūs imuniniai tyrimai parodė, kad sergant sarkoidoze T limfocitai produkuoja daugiau monocitų chemotaksio faktoriaus, kuris pailgina monocitų (makrofagų) gyvenimo trukmę ir skatina juos tapti granulomų epitelioidinėmis ląstelėmis. Apoptozės uždelsimas skatina uždegimą ir audinių pažeidimą [13, 47, 72, 74].

1.1.4. Sergančiųjų sarkoidoze kvėpavimo organų imuninis atsakas

Sarkoidozės patogenezėje labai svarbus vaidmuo tenka ląstelių imunologijai. Limfocitai – pagrindinės specifinio atsako ląstelės, nes organizme jos vienintelės gali specifiskai atpažinti ir atskirti įvairias antigenines determinantes (epitopus). Pastarieji lemia imuninio atsako įvairovę, specifiskumą, imuninę atmintį. Sveiko suaugusio žmogaus plaučiuose kaip ir kraujyje yra maždaug 65-75% CD3+ limfocitų, 40-49% - CD3+CD4+ ir 20-30% - CD3+CD8+ limfocitų [24]. Tačiau CD16+/56+ ląstelių yra tik iki 10%, o B limfocitai tesudaro mažiau nei 5% visų

limfocitų. Plaučių T ląstelių repertuaras kinta visą laiką atspindėdamos supančios aplinkos įtaką kvėpavimo takų ląstelėms bei jų funkcijoms [4, 24].

Plaučių intersticiume priskaičiuojama 10×10^9 limfocitų, skaičius ekvivalentiškas periferiniame kraujyje cirkuliuojančių limfocitų skaičiui. BAL skystyje limfocitai tesudaro apie 15% visų ląstelių. Iš visų BAL skystyje esančių limfocitų dauguma yra T (CD3+) limfocitai [4, 24, 30].

George Macknanes 1960 metais pirmasis aprašė T ląstelinio imuniteto reikšmę kvėpavimo takų gynyboje. T limfocitų sąlygotas imunitetas – svarbus gynybos mechanizmas, apsisaugant nuo įvairių virusų, viduląstelinų bakterijų, įskaitant *Mycobacterium tuberculosis*, grybelių, kai kurių protozoinių parazitų. Po kontakto su antigenu plaučiuose atsiranda visa eilė morfologinių, biocheminių ir biologinių pokyčių [49].

Intersticiumo ir alveoliniai makrofagai – pirmosios ląstelės, su kuriomis susiduria įvairūs antigenai, patekę į plaučius. Makrofagai atlieka svarbų vaidmenį uždegiminiuose procesuose, išskirdami laisvuosius deguonies radikalus ir proteolizinius fermentus. Jų sekretuojami kai kurie citokinai, pvz., augimą skatinantys ir slopinantys mediatoriai, veikia tiek pažeidimo, tiek atsistatymo procesus. Alveoliniai makrofagai atlieka pagrindinį vaidmenį įgimto imuniteto susiformavime prieš įvairius patogenus. Lipopolisacharidų stimuliuoti alveoliniai makrofagai sekretuodami didesnius kiekius uždegiminio citokino $\text{TNF}\alpha$, pritraukia polimorfonuklearinius limfocitus kovai su infekcija. Makrofagai, be abejonės, dalyvauja ir įgyto imuniteto reguliavime. Aktyvinti makrofagai išskiria IL-12, kuris atlieka pagrindinį vaidmenį Th1 imuninio atsako išsivystyme [7, 29].

Kai kurių autorių tvirtinimu sarkoidozės atveju kinta alveolinių makrofagų antigeno pateikimo galimybės. Nustatyta kostimuliacinių molekulių (CD80, CD86), reikalingų sąveikai su T limfocitų CD28 molekulėmis, didesnė ekspresija makrofagų membranoje sergant sarkoidoze [69, 77].

Wahlstrom J. ir kt. rašo, kad yra iškelta hipotezė, jog CD80 ir CD86 molekulės veikia ir T helperių (Th1 ir Th2) diferenciaciją: CD80 kostimuliacija aktyvina Th1 ląsteles, o CD86 – Th2 ląsteles. Sergančiųjų sarkoidoze alveolinių makrofagų membranų paviršiuje daugiau koekspresuojama CD80, CD40, CD30L molekulių, kurios yra svarbios T ląstelių aktyvinimui [63, 77]. Wahlstrom J. ir kt. aprašė teigiamą koreliaciją tarp CD80 molekulių ekspresijos alveolinių makrofagų membranose ir BAL skysčio CD4+/CD8+ limfocitų santykio, manoma dėl to, kad šiuo atveju vyrauja Th1 tipo uždegiminis atsakas [77].

Pagrindinė Th1 efektorių ląstelė taikinytis yra makrofagai. Th1 per adhezijos molekules prisitvirtina prie makrofago ir jų TCR sureaguoja su makrofago membranoje esančiu peptido

ŽLA II klasės molekulės kompleksu, Th1 aktyvinami ir pradeda sintetinti efektorines molekules. Šių poveikis makrofagams įvairus:

- veikiami $\text{IFN}\gamma$ ir sąveikaujant CD40L-CD40 molekulėms makrofagai aktyvinami: didėja jų baktericidinis aktyvumas; makrofagų membranose daugėja ŽLA I ir ŽLA II klasės molekulių, dėl to makrofagai tampa aktyvesnėmis antigeną pateikiančiomis ląstelėmis (APL);
- citokinai sutelkia makrofagus infekcijos židinyje;
- Fas ligando sąveika su Fas molekule makrofagų membranoje ir $\text{TNF}\beta$ gali sunaikinti infekuotus ir nesugebančius patogeno užmušti makrofagus, o iš jų išsiskyrusias bakterijas fagocituoja nauji, aktyvinti makrofagai [3].

T_H1 išskiriamas IL-2 sukelia antigenui specifiskų T limfocitų proliferaciją, tuo didindamas efektorinių ląstelių skaičių, taip pat aktyvindamas CD8⁺ ir skatindamas jų virstimą CTL. Aktyvinamos ir NK ląstelės – veikiamos IL-2, taip pat ir $\text{IFN}\gamma$, jos virsta – LAK, o šių citolizinis aktyvumas kur kas didesnis. Veikiant Th1 infekcijos židinyje kaupiasi uždegiminės ląstelės. $\text{TNF}\beta$ aktyvina dar ir neutrofilus. IL-2 ir $\text{IFN}\gamma$ turi įtakos ir B limfocitams: jie skatina opsonizuojančių antikūnų sintezę. Tačiau Th1 išskiriamas $\text{IFN}\gamma$ slopina Th2 vystymąsi bei aktyvumą [3].

T limfocitai savo membranų paviršiuje gali turėti IL-2 receptoriaus tris skirtingas subvienetų grandis: α (CD25), β (CD122) ir γ (CD132) [69]. Kockysz M. ir kt. pažymi, kad sergančių sarkoidoze T limfocitai ekspresuoja didesne IL-2 receptoriaus alfa ir beta grandinių tiek BAL skystyje tiek periferiniame kraujyje palyginus su sveikųjų asmenų [47].

IL-2 dar vadinamas T limfocitų augimo faktoriumi, nes prisijungęs prie specifinio receptoriaus T limfocitų membranoje, sukelia aktyvinimo signalą, o šis – ląstelės perėjimą iš G1 fazės į S fazę. IL-2 sintetintas T limfocitų (autokriniškas poveikis) po antigeno atpažinimo, sukelia ne tik antigenui specifiskų limfocitų proliferaciją, bet ir jų apoptozę Fas būdu [3].

Ištirus sarkoidoze sergančiųjų BAL skysčio limfocitus, nustatyta, kad dauguma T limfocitų yra atminties, t.y. CD29⁺ ir CD45RO⁺ limfocitai, savo membranų paviršiuje turintys daugiau ir IL-2 receptorių [6, 46, 77].

Aktyvinti antigeno CD4⁺ T helperiai ankstyvosios ligos stadijose susikaupia plaučių alveolėse, sukeldamos T ląstelinį alveolitą [9, 21, 46, 62, 77]. Nustatyta, kad sarkoidoze sergančiųjų BAL skystyje yra daugiau tirpių CD4 molekulių, nei sveikųjų asmenų, o tirpių CD8 – daugiau ligonių serume, sergančiųjų aktyvia plaučių sarkoidoze, palyginus su sveikųjų kraujo serumu [46, 77]. Wahlstrom J. ir kt. teigia, kad sarkoidozės atveju padidėja kai kurių molekulių ekspresija T limfocitų paviršiuje, tokių kaip CD26, CD95(Fas), aktyvacijos molekulių – CD69 ir gp240, vėlyvos aktyvacijos antigeno – 1 (VLA-1), CD49a, CD49d ir ŽLA-DR. BAL skystyje padidėjęs CD26⁺ limfocitų procentas liudija apie lėtinę T ląstelių stimuliaciją plaučiuose. Be to,

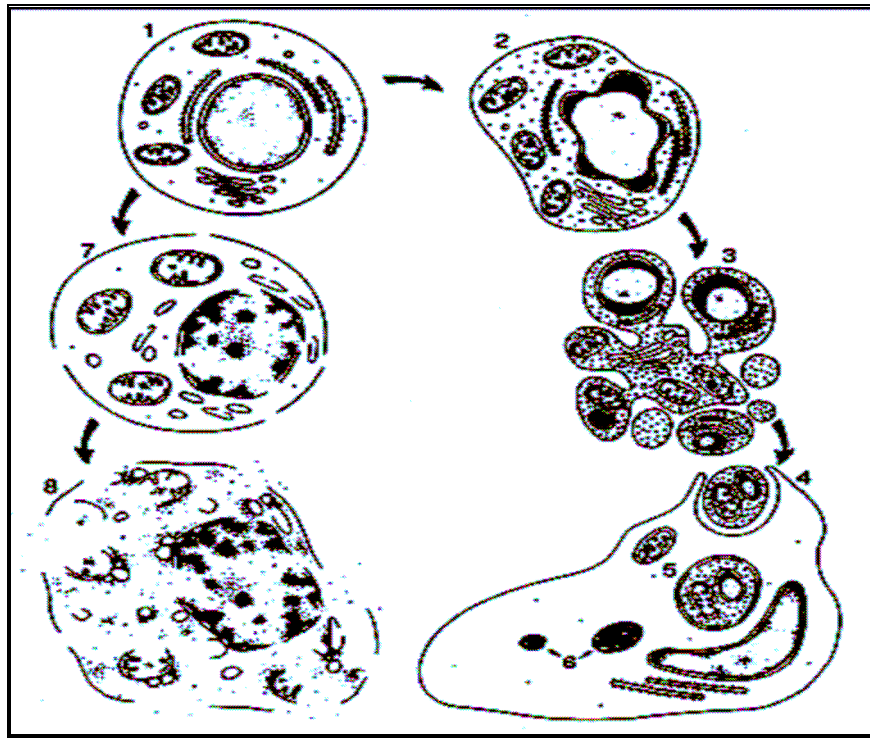
kai kurie autoriai teigia, kad CD26 antigenai, ekspresuojami BAL skysčio T limfocitų, nusako, kad uždegiminiame sarkoidozės atsake dalyvauja Th1 profilio ląstelės [7, 77].

1.2. APOPTOZĖ

Apoptozė arba programuota ląstelių mirtis yra fiziologinis genetiškai reguliuojamas ląstelių pašalinimo procesas, kurio metu iš organizmo pašalinamos pažeistos arba nereikalingos ląstelės, bet nesukeliamas uždegiminis atsakas. Tai normalus fiziologinis procesas, prasidedantis jau embrioninio vystymosi metu. Reiškinį 1972 metais aprašė ir pavadinimą pasiūlė A.R. Kiuri (A.R. Currie) su bendraautoriais. Jis apoptozę apibūdino kaip pavienių ląstelių „mirties“ būdą, kurios metu ląstelė įgija būdingų morfologinių požymių ir išnyksta be pasekmių [54].

Apoptozė vyksta vystantys organizmui, kai palaikomas tam tikras ląstelių populiacijų proporcijos dydis audiniuose, vykstant imuninėms reakcijoms, pažeidus ląsteles, senstant organizmui. Dėl jos programuotai suardomos ląstelės embriogenezės – implantacijos, organogenezės ar involiucijos – metu, taip pat vyksta nuo hormonų priklausoma involiucija suaugusiame organizme (pvz.; endometriumo ląstelių žūtis menstruacinio ciklo metu, krūtų regresija nutraukus maitinimą ir kt.), pašalinamos ląstelės iš proliferuojančių jų populiacijų, žūva neutrofilai ūmių uždegiminių reakcijų metu, T ir B ląstelės, jų mikroaplinkoje išnykus citokinams, ar sunaikinami autoreaktyvūs T limfocitai čiobrialiaukėje, žūva ląstelės veikiant citotoksiniams T limfocitams, esant patologinei parenchiminių organų atrofijai dėl jų latakų užsikimšimo, pažeidžiamos ląsteles sergant kai kuriomis virusinėmis ligomis, žūva ląstelės dėl daugelio žalojančių veiksnių, kai veikia nedidelės jų dozės (pvz; radiacija, citotoksikai preparatai nuo vėžio ir t.t.). Didelės šių veiksnių dozės sukelia ląstelių nekrozę – kitą jų žūties formą (4 pav.) [38].

Audiniuose apoptozė pasireiškia pavienėse ląstelėse, priešingai negu nekrozę, kuri paprastai apima visą susijusių ląstelių grupę. Ten, kur vyksta apoptozė, nebūna beveik jokių uždegimo požymių. Nekrozę yra ląstelių žūties forma, atsirandanti dėl metabolinio ląstelės „kolapso“, kai tokia ląstelė nebegali toliau palaikyti joninės homeostazės, tuo tarpu apoptozėi būdingi citoplazmos ir branduolio kondensacija ir internukleosominis DNR suskaidymas, kuris visai nebūdingas nekrozei. Galutinėse stadijose apoptozės būdu žūvanti ląstelė suyra į apoptozinius kūnelius, greitai pašalinamus fagocitozės būdu (4 pav.) [18, 38, 54].



4 pav. Ląstelės sunaikinimo apoptozės (1-6) ir nekrozės (7-8) būdu skirtumai. Normali ląstelė (1), apoptozės metu ląstelės turinys ir jos branduolys kondensuojasi (2), ląstelė subyra į apoptozinius kūnus (3), apoptozinius kūnus fagocituoja makrofago ląstelė (4), fagosomose, kuriose virškinamos apoptozinių kūnų liekanos (5,6); nekrozės metu ląstelė brinksta, pažeidžiama jos plazminė membrana (7), ląstelės turinys patenka į tarpląstelinę erdvę (8) (pagal J.F.R. Kerr, *Neglected opportunities in apoptosis research*, Trends Cell Biol.1995;5:55-57.)

1.2.1. Apoptozės mechanizmai

Apoptozė yra galutinis molekulių pokyčių, kuriems reikia energijos, kaskados pasireiškimas. Jos eiga skirstoma į keturias fazes [10, 38]:

1. signalo, inicijuojančio apoptozės procesą, perdavimas;
2. kontrolės ir integracijos fazė, kurios metu intraląstelinės reguliacinės molekulės slopina, skatina arba ignoruoja apoptozės signalus ir nulemia šios fazės baigtį;
3. bendra vykdomoji fazė, kurios metu realizuojama ląstelės žūties programa ir kurią iš esmės atlieka kaspazių šeimos proteazės;
4. žuvusių ląstelių pašalinimas fagocitozės būdu.

1.2.1.1. Apoptozę sukeliančio signalo perdavimas

Apoptozę inicijuojantys veiksniai sužadina signalus, kurie arba per citoplazmos membranoje esančius receptorius perduodami viduląstelinėms reguliacinėms molekulėms, arba tiesiogiai veikia taikinius, esančius ląstelės viduje. Transmembraniniai signalai gali skatinti arba

slopinti apoptozę. Pavyzdžiui, kai kurie hormonai, augimo faktoriai ir citokinai generuoja signalų perdavimo kaskadas, kurios slopina egzistuojančią ląstelės žūtis programą ir skatina ląstelės išgyvenimą. Priešingai, kai nėra kai kurių tokių faktorių ląstelės mikroaplinkoje, panaikinamas mirties programų slopinimas ir paleidžiami apoptozės mechanizmai [10].

Apoptozinio signalo jutikliai gali būti ląstelės paviršiaus receptoriai, kurie, prisijungus atitinkamam ligandui, agreguoja ir aktyvina artimiausius signalo tarpininkus. Ekstraląstelinis apoptozę skatinantis signalas gali būti antigenas (pvz. neigiama timocitų selekcija), hormonas (pvz. gliukokortikoidų poveikis), citokinas ar jo analogas (pvz. FasL, NNF ir kt.). Apoptozė gali būti skatinama ir kai nėra tam tikrų aplinkos signalų – trūksta citokinų (pvz. kamieninių kraujo ląstelių žūtis trūkstant citokinų ar aktyvintų T limfocitų žūtis nesant jų mikroaplinkoje IL-2), nėra antigeno (pvz. B ląstelių žūtis germinaciniuose centruose) arba koreceptorinio signalo (pvz. apoptozė, vykstanti aktyvinant T ląsteles ir nesant signalo iš CD28) [38].

Intraląsteliniais signalams, skatinantiems apoptozę, galima priskirti chromosomų pažeidimus ir kitus chromatino pokyčius (pvz. radiacinė limfocitų žūtis interfazėje) [5, 38].

Signalas, patenkantis į T limfocitus per antigeno receptorių (kompleksas TCR-CD3), suaktyvina limfocitus ir sukelia jų proliferaciją, tačiau kai kada ir jų apoptozę, vadinamą aktyvinimo apoptoze. Signalas gali būti perduodamas veikiant receptorių antigenų, superantigenų, mitogeniniu lektinu, antikūnais, gebančiais kryžmiškai sujungti receptoriaus molekules. Šiais atvejais apoptozė indukuojama, kai yra viena iš šių sąlygų: 1) nėra papildomo signalo (pvz. nėra kostimuliacijos per CD28 molekulę); 2) ligandas pakartotinai veikia aktyvintas ląsteles; 3) trūksta augimo faktorių (pirmiausia IL-2). Analogiška situacija susidaro aktyvinant B limfocitus per receptorių BCR: apoptozės atsiradimo sąlyga šiuo atveju yra kostimuliacijos per membranos molekulę CD40 nebuvimas. Apoptozės signalas gali būti perduodamas ir per kitas limfocitų membranines struktūras – CD2, ŽLA I klasės molekules, β_1 ir β_2 integrinus ir kt. [5, 38].

Apoptozę gali indukuoti kai kurie citokinai, pirmiausia navikų nekrozės faktorius. NNF α gamina neutrofilai, makrofagai, NK, endotelio ląstelės ir kt. Aktyvinti limfocitai gamina NNF β . Jie abu priklauso uždegiminiams citokinams. Mirties signalas perduodamas per vieną iš dviejų jo receptorių membranoje – NNFR1 ar NNFR2. NNF receptoriai dalyvauja realizuojant įvairius NNF poveikius [5, 26].

Egzistuoja ir receptoriaus, kuriam būdinga vienintelė funkcija – apoptozės signalo perdavimas. Tai yra Fas receptoriaus (CD95), spontaniškai ar po suaktyvinimo ekspresuojamas įvairių tipų ląstelių membranose. Jis priklauso tai pačiai šeimai kaip ir NNF receptoriai. Kaip ir NNFR1, Fas receptoriaus turi citoplazminį žūtis domeną. Jo natūralus ligandas, dėl kurio per šį receptorių sukeliama apoptozė, yra Fas ligandas (FasL). Jis yra homologinis NNF, CD40L ir kai

kurioms kitoms molekulėms, kurios atlieka ligandų vaidmenį šios šeimos receptorių molekulėms. FasL egzistuoja „imunologiškai privilegijuotų organų“ ląstelėse, taip pat aktyvintų limfocitų paviršiuje. FasL esti ir kaip laisva tirpi molekulė [1, 5, 10, 12].

Daugelio ląstelių išgyvenimas priklauso nuo citokinų ar augimo faktorių buvimo jų mikroaplinkoje. Pašalinus augimo faktorių, proapoptoziniai Bcl-2 baltymo šeimos nariai iš citozolio patenka į išorinę mitochondrijos membraną ir pakeičia proapoptozinių ir antiapoptozinių šios šeimos baltymų santykį pirmųjų naudai. Toks pokytis padidina membranos pralaidumą, išsina citochromas c ir aktyvinama proteolizinė kaskada. Kai kuriais kraujodaros ląstelių raidos etapais jos automatiškai žūva, kai joms trūksta serumo faktorių ir (arba) tam tikrų citokinų. CSF ir kiti hemopoeziniai citokinai paprastai veikia skatindami kraujodaros ląstelių išgyvenimą. Analogiška situacija susiklosto ir limfocitų aktyvinimo metu: T ląstelės, stimuliuotos antigenų ar mitogenu, žūva, jei joms nepakanka IL-2. Tokiu atveju T ląstelės nežūva, jei jų aplinkoje yra bent vienas iš keturių interleukinų, kurių receptoriai turi bendrą γ grandinę – IL-2, IL-4, IL-7 ir IL-15 [38].

Po T limfocitų diferencijavimosi į efektorines ląsteles – citotoksinius T limfocitus, taip pat T atminties (CD45R0) ląsteles, juose taip pat ekspresuojamos Bcl-2 ir jos kartu įgyja atsparumą apoptozės indukcijai. Tačiau efektorinėms ląstelėms, turinčioms žymenį CD45R0, yra daug lengviau sukelti apoptozę negu naiviesiems T limfocitams, turintiems žymenį CD45RA. Be to, Bcl-2 ekspresija imuninės sistemos B ir T ląstelėse trunka neilgai. Ekspresijos išnykimas neišvengiamai sukelia ląstelių žūtį. Atminties ląstelėse apsauginių Bcl-2 tipo protoonkogenų ekspresija trunka daug ilgiau, todėl šių ląstelių išgyvenimo trukmė gerokai didesnė. Ypač stabili Bcl-2 ekspresija atminties ląstelėse yra tada, kai jas periodiškai veikia specifinis antigenas, esantis germinacinių centrų dendritinių ląstelių paviršiuje [33, 58, 64].

Vidinio apoptozės signalo pavyzdys gali būti nereparuotų DNR pertrūkių susikaupimas. Ląstelių apšvitinimas ar citotoksinių chemoterapinių vaistų vartojimas sukelia apoptozę, kurios mechanizmas prasideda DNR pažeidimu (genotoksiniu stresu). Šiame mechanizme dalyvauja antionkogenas p53, kurio produktas p53 kaupiasi, kai pažeidžiama DNR, ir sustabdo ląstelės ciklą G_1 fazėje, o tai suteikia ląstelei papildomo laiko DNR ištaisymui. Jei ištaisymo procesai nepavyksta, p53 sukelia apoptozę. Taigi p53 normaliai skatina apoptozę, tačiau, kai jis yra mutavęs ar jo nėra (tai būdinga kai kurių auglių ląstelėms), skatinamas ląstelės išgyvenimas [55]. Taigi p53 atlieka perjungiklio „gyvybė ar mirtis“ vaidmenį genotoksinio streso metu. Mechanizmai, kuriais DNR pažeidimas inicijuoja ląstelės žūties etapus – kaspazių suaktyvinimą, siejasi su transkripcinio reguliavimo funkcijų pokyčiais [51, 54].

Citotoksiniai T limfocitai (CTL) ekspresuoja membranose FasL ir gali sukelti apoptozę ląstelių, turinčių Fas receptorių. Manoma, kad šis būdas svarbus reguliuojant imuninį atsaką,

kontroliuojant pernelyg didelį limfocitų aktyvinimą nuosavais antigenais [3]. CTL atpažįsta svetimus antigenus, esančius infekuotos šeimininko ląstelės paviršiuje. Po atpažinimo jie išryškina FasL savo paviršiuje ir nužudo ląsteles taikinius, prisijungdami prie Fas receptorių. Be to, CTL sukelia ląstelių taikinių apoptozę, sekretuodami baltymą perforiną, transmembranines poras atveriančią molekulę, ir „sušvirksdami“ savo citoplazmos granulių turinį į atakuojamą ląstelę. Serino proteazė granzimas B yra pats citotoksiškiausias CTL granulių komponentas. Granzimas B geba skaidyti baltymus prie aspartato radikalų ir aktyvinti daugelį ląstelės kaspazių. Taigi CTL žudo ląsteles taikinius, apeidami signalų perdavimą, ir tiesiogiai sukelia vykdomąją apoptozės fazę [3, 14, 36, 64].

1.2.1.2. Kontrolės ir integracijos fazė

Ją atlieka specifiniai adaptaciniai baltymai, sujungiantys ląstelės žūties signalus su jų realizavimo programa. Šie baltymai įtraukia į veiksmą kitus adaptacinius baltymus ar signalo perdaviklius. Geriausiai ištirti adaptaciniai baltymai, dalyvaujantys apoptozėje, kurią inicijuoja NNF. Prisijungęs prie signalo jutiklio receptoriaus NNFR1, jis sukelia receptoriaus agregaciją. NNFR1 turi viduląstelinį domeną, kuris vadinamas žūties (mirties) domenu. Po receptoriaus sąveikos su ligandu receptoriaus žūties domenas jau gali sąveikauti su viena iš adaptacinių molekulių TRADD. Po šios sąveikos TRADD į įvykių grandinę įtraukia adapterį FADD, kuris savo ruožtu įtraukia RIP ir kaspazių šeimos narius. Jis suaktyvina kaspazę 8, o ši jau paleidžia apoptozės vykdomąjį mechanizmą (5 pav.) [10, 54].

Fas receptorius taip pat turi viduląstelinį mirties domeną, kuris po sąveikos gali įtraukti FADD, šitaip praleisdamas biocheminių veiksmų grandinę, panašią į tą, kurią indukavo NNFR1 [10, 54].

Apoptozės eigą kontroliuojantys baltymai labai svarbūs dėl to, kad jų poveikis gali pasireikšti arba „mirties nuosprendžiu“ ląstelei, arba potencialiai žudančių ją signalų atšaukimu. Dalyvaujantys tokioje reguliacijoje baltymai gali turėti klinikinę reikšmę, lemdami ląstelių išgyvenimą ar žūtį vykstant svarbiems biologiniams procesams (pvz. imuninėms reakcijoms ar navikiniam procesui) [33].

Protoonkogeno *bcl-2* koduojamas Bcl-2 baltymas turi svarbią reikšmę reguliuojant ląstelių reakcijas į apoptozę sukeliančius signalus [31, 57]. Protoonkogenų grupei jis priskiriamas todėl, kad daugelio tipų ląstelėse blokuoja apoptozę ir, selektyviai padidindamas kai kurių ląstelių išgyvenimą, gali paskatinti kancerogenezę. Kai kurie šios baltymų šeimos nariai taip pat veikia slopindami apoptozę (Bcl-X_L, Mc-1, A1 ir kt.). Kiti šios šeimos nariai skatina

ląstelės žūtį (Bad, Bak, Bax, Bcl-X_S). Manoma, kad Bcl-2 šeimos narių tarpusavio sąveika turi lemiamą reikšmę jų funkcijoms [26, 31, 57].

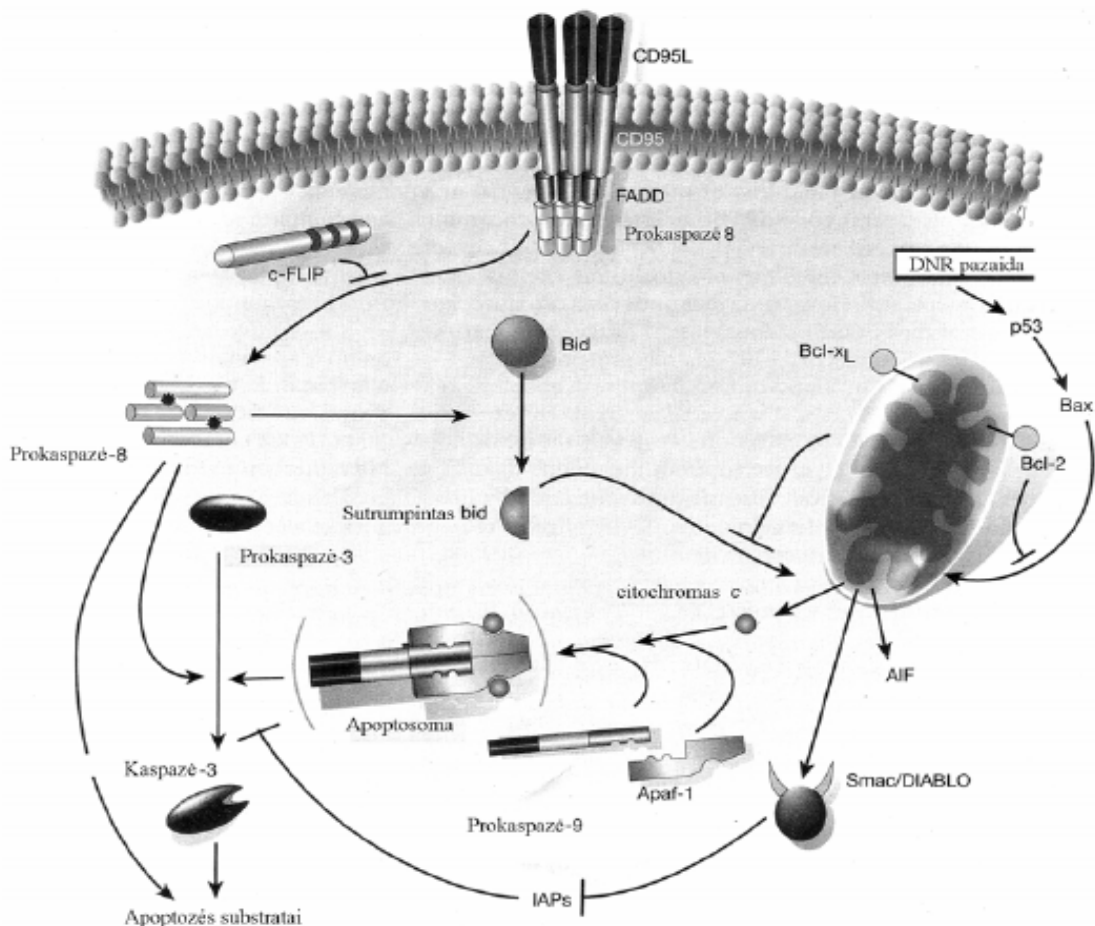
Baltymo Bcl-2 randama mitochondrijų, branduolio, endoplazminio tinklo membranose. Jis, kaip ir kiti šios šeimos nariai, dalyvauja reguliuojant mitochondrijų transmembraninį potencialą. Apoptozę skatinantys veiksniai gali sužadinti signalus, pažeidžiančius mitochondrijas (jie gali paveikti mitochondrijų membranų pralaidumą). Susidarius poroms vidinėje mitochondrijų membranoje, sumažėja mitochondrijos membraninis potencialas ir jos pabrinksta. Šie signalai taip pat sukelia išorinių mitochondrijų membranų pralaidumo padidėjimą, šitaip padidindami apoptozės skatintojo – citochromo c išsiskyrimą iš mitochondrijų į citozolį. Citochromas c yra tarp vidinės ir išorinės mitochondrijos membranos ir yra kvėpavimo grandinės komponentas. Citochromas c išsiskiria dar prieš atsirandant morfologiniams apoptozės požymiams. Bcl-2 slopina apoptozę bent dviem būdais: tiesiogiai veikdamas mitochondrijas ir mažindamas jų membranų pralaidumą; ir veikdamas mitochondrijas po sąveikos su kitais baltymais [57]. Nustatyta, kad mitochondrijų membranų pralaidumą lemia apoptozę skatinančių ir apoptozę slopinančių Bcl-2 šeimos baltymų kiekių santykis mitochondrijų membranose. Geno *bcl-2* ekspresija kinta vystantis limfocitams. Bent jau imuninėje sistemoje su jo ekspresija siejasi ląstelių atsparumo apoptozei lygis [31, 42].

Tam tikrose ląstelėse Bcl-2 gali slopinti apoptozę, sujungdamas kai kuriuos citozolio baltymus mitochondrijos membranoje. Toks baltymų sujungimas turi poveikį paties Bcl-2 funkcijai arba neleidžia tokiems sujungtiems baltymams sąveikauti su kitais baltymais. Tarp tokių Bcl-2 prijungiamų baltymų gana svarbus yra Apaf-1. Manoma, kad citochromui c išsiskyrus iš mitochondrijų (po žūties signalo perdavimo), jis aktyvina Apaf-1 ir per jį – iniciatorinę kaspazę bei paleidžia proteolizinę kaskadą, sukeliančią ląstelės žūtį. Toks Bcl-2 prisijungimas apsaugo ląstelę nuo žūties, nes sujungiamas Apaf-1 ir blokuojama katalizinė kaspazių funkcija, net jei citochromas c ir išsiskiria iš mitochondrijų (5 pav.) [42].

Reguliuojant apoptozę dalyvauja ir kiti baltymai, tarp jų baltymas p53. Manoma, kad normalus *p53* yra navikų supresijos genas. Jis jungiasi prie daugelio svarbių ląstelės baltymų ir dalyvauja reguliuojant genų ekspresiją. Iširta, kad, nesant *Rb* geno, *p53* apoptozę skatinanti funkcija gali kompensuoti šį praradimą ir neleisti atsirasti piktybinei transformacijai: tiriant neturinčias *Rb* geno peles, nustatyta, kad aktyvus genas *p53* sukelia ląstelių apoptozę. Tokių pelių akys yra pakitusios, tačiau joms neatsiranda auglių [55]. Radiacija ar kiti DNR pažeidžiantys veiksniai padidina p53 kiekį, veikdami potransliaciniu mechanizmu. Vėžinėse ląstelėse, įprastai turinčiose daug genetinių pažaidų, mutuoatas baltymas p53 apoptozės aktyvinti nesugeba [25, 31, 37, 54].

1.2.1.3. Vykdomoji apoptozės fazė

Nors ląstelės žūties signalų įvairovė yra labai didelė, vienas mechanizmas visada pasireiškia apoptozės metu. Tai yra baigiamoji apoptozės fazė – proteolizės kaskada. Proteazės, kurios pradeda ir vykdo šią apoptozės fazę, yra labai paplitusios įvairių rūšių ląstelėse ir priklauso kaspazių šeimai. Jos yra apvaliosios kirmėlės *Caenorhabditis elegans* geno *ced-3* homologai žinduolių organizme. Kaspazės terminas (angl. *caspase*) parodo dvi šiu fermentu katalizines savybes: raidė „c“ reiškia „cisteino proteazė“, o „aspase“ – kad jos yra aspartato proteazės. Šiuo metu nustatyta apie dešimt kaspazių šeimos narių [26, 54]. Šią šeimą sąlygiškai galima padalyti į dvi grupes – iniciatorius ir vykdytojus, atsižvelgiant į tai, kokia eilės tvarka jie yra suaktyvinami iki žūvant ląstelei. Apoptozę inicijuojančioms kaspazėms priklauso kaspazė 9, kuri jungiasi su Apaf-1, taip pat kaspazė 8, kuri yra suaktyvinama susijungus Fas(CD95) su FasL (5 pav.) [26, 38, 54].



5 pav. Vidinis apoptozės kelias (pagal Mildažienė V. ir kt., 2004)

Kaip ir daugelis proteazių, kaspazės egzistuoja neaktyvia (prokaspazių) forma, o kad būtų pradėta apoptozė, turi įvykti aktyvinantis jų suirimas. Prokaspazių hidrolizę gali pradėti kitos kaspazės, tačiau jų aktyvinimas gali būti ir autokatalizinis. Kai suaktyvinama iniciatorinė

kaspazė, prasideda fermentinė ląstelės žūties programa ir toliau įvykiai klostosi labai greitai. Vykdančiosios kaspazės suardo ląstelės skeletą, suskaidydamos ląstelės skeleto ir branduolio matrikso baltymus. Kaspazė 3 yra ta proteazė, kuri aktyvinama ankstyvose apoptozės stadijose. Aktyvi kaspazė 3, randama ląstelėse, kuriose vyksta apoptozė. Būdamas aktyvi, kaspazė 3 sukelia kitų kaspazių proteolizę ir jas suaktyvina. Su šių proteazių aktyvinimu susijusi masinė citoplazmos baltymų proteolizė apoptozės metu, tačiau didžiausią reikšmę turi kaspazių poveikis taikiniams ląstelės branduolyje. Suaktyvintų kaspazių taikiniai tampa baltymais, dalyvaujantys transkripcijoje, DNR replikacijoje, DNR ištaisyme (5 pav.) [26, 38].

Apoptozinėse ląstelėse vyksta daugybė biocheminių pokyčių, lemiančių jos struktūrinius pasikeitimus. Apoptozės metu hidrolizuojami baltymai. Kaspazės skaido branduolio struktūras ir ląstelės skeletą. Dėl jų poveikio taip pat suaktyvėja endonukleazės. Suaktyvėjus transgliutaminazei vyksta masinis kryžminis baltymų jungimasis, todėl citoplazmos baltymai virsta kovalentiškai susijungusiomis susiraukšlėjusiomis struktūromis, galinčiomis subyrėti į apoptozinius kūnelius. Apoptozinėse ląstelėse DNR subyra į didelius 50 – 300 kilobazių fragmentus. Vėliau, veikiant nuo Ca^{2+} ir Mg^{2+} priklausomoms endonukleazėms, vyksta internukleosominis DNR skilimas į oligonukleosomas, sudarytas iš 180 – 200 bazių porų [38, 42].

Mitochondrijų membraninis potencialas sumažėja dėl staigaus mitochondrijų membranų pralaidumo padidėjimo, todėl susilygina jonų koncentracijos abiejose membranos pusėse. Mitochondrijos visiškai praranda potencialą tik apoptozės metu ir tai gali būti apoptozės žymuo. Dėl padidėjusio mitochondrijų membranų pralaidumo į citoplazmą patenka veiksniai, sukeltys chromatiną degradaciją izoliuotuose branduoliuose. Jei sumažėja transmembraninis mitochondrijų potencialas, apoptozė tampa neišvengiama [10, 38].

1.2.1.4. Žuvusių ląstelių pašalinimas

Apoptozinių ląstelių membranos išoriniame sluoksnyje randama fosfatidilserino, čia patekusio iš gilesnių sluoksnių. Kai kuriais apoptozės atvejais apoptozinių kūnelių paviršiuje randama trombospondino, adhezinio glikoproteino. Šie pokyčiai leidžia makrofagams ir aplink esančioms ląstelėms anksti atpažinti žuvusias ląsteles ir pradėti jų fagocitozę nedalyvaujant uždegimą skatinantiems ląstelių komponentams. Šitaip žuvusios ląstelės pašalinamos minimaliai pažeidžiant aplinkinius audinius. Šis procesas yra toks efektyvus, kad žuvusios ląstelės išnyksta be pėdsakų, neatsirandant uždegimui būdingų požymių [50].

1.2.2. Patologija, atsirandanti dėl apoptozės sutrikimų

Pažymėtina, kad išsiregulavusios apoptozės koncepcija („pernelyg daug ar pernelyg mažai“) gali būti tinkama daugelio ligų patogenezei aiškinti. Dėl tokio „išsiregulavimo“ gali pasireikšti bent dviejų grupių ligos:

1) ligos, atsirandančios dėl apoptozės nuslopavimo ir pailgėjusio ląstelių išgyvenimo. Pernelyg menkas apoptozės pasireiškimas gali prailginti nenormalių ląstelių gyvavimą. Tokios ląstelės besikaupdamos gali skatinti auglių, ypač karcinomų su p53 mutacijomis ar nuo hormonų priklausomų ir autoimuninių ligų atsiradimą, kurios gali kilti nesunaikinus autoimuninių limfocitų po imuninio atsako;

2) ligos, atsirandančios dėl pernelyg sustiprėjusios apoptozės ir daugelio ląstelių žūties. Sergant jomis prarandama daugybė normalių ar apsauginių ląstelių. Šioms ligoms priklauso neurodegeneracinės ligos, kai prarandami specifiniai neuronų tinklai; ischeminiai pažeidimai, iš jų ir miokardo infarktas bei insultai, virusų sukeltas limfocitų skaičiaus sumažėjimas, pavyzdžiui, sergant AIDS [10, 38, 75].

1.2.3. Apoptozė sarkoidozės atveju

Kvėpavimo takai kiekvieną dieną pašalina didžiulį kiekį svetimkūnių nesukeldami uždegiminės reakcijos. Tyrėjai dirbę su pelių modeliais nustatė, kad Fas/FasL sistema aktyviai dalyvauja pašalinant įkvėptus svetimkūnius ir neleidžia atsirasti gyvybei pavojingoms reakcijoms [41, 71].

Daugelio plaučių ligų atvejais sutrinka apoptozės proceso reguliacija. Plaučių homeostazei palaikyti būtina pusiausvyra tarp apoptozės ir uždegiminių ląstelių išgyvenamumo. Pastaraisiais metais apoptozės fenomenas buvo plačiai studijuojamas, tačiau yra mažai žinoma apie T ląstelių likimą plaučiuose [41, 43, 71].

Žmonių ir triušių plaučių audinio analizė parodė, kad kvėpavimo takų alveolinis epitelis ir alveoliniai makrofagai savo membranose turi Fas molekules. Be to pastebėta, kad mažėjant BAL skystyje esančių limfocitų skaičiui, mažėja IL-2 citokino kiekis, tačiau plaučių parenchimoje didėja uždegimą slopinančiojo citokino IL-10 koncentracija [71]. Taigi, buvo iškelta hipotezė, kad fiziologinė homeostazė yra išlaikoma gleivinių paviršiuje pagal tam tikrą apoptozinį mechanizmą, kurį kontroliuoja imuninės ląstelės [71, 72]. F.Spinozzi ir kt. teigia, kad tokiuose fiziologiniuose mechanizmuose yra svarbūs daugelis citokinių, ypač IFN- γ ir IL-2. Nustatyta, kad sergant intersticinėmis plaučių ligomis, visų pirma pažeidžiamos epitelinės plaučių ląstelės. Virusai, autoimuninės reakcijos, toksinai, kai kurios medžiagos, kaip bleomycinas – yra žinomi kaip epitelinių ląstelių apoptozės iniciatoriai. Nepilnavertės apoptozės

pasekmė gali būti sukelta kaupiantis T limfocitams ir mononukleariniams fagocitams plaučiuose, kuomet atsiranda audinių pažeidimas ir susidaro epitelioidinių ląstelių granulomos [71].

Sarkoidozė yra lėtinė nežinomos etiologijos imuninė liga, kurios prognozė nėra aiški, todėl yra tikslinga tirti apoptozinius mechanizmus lokaliame ir sisteminiame imuniniame atsake, tai yra BAL skystyje ir periferiniame kraujyje [23, 53, 72, 78]. Ligonų bronchoalveolinėje terpėje pastebėta padidinta limfocitų proliferacija ir apoptozė [27, 59]. Nepilnavertės T limfocitų apoptozės pasekmė sarkoidozės atveju yra granulomų formavimasis ir lėtinio uždegimo vystymasis [23, 53, 59, 72].

Kai kurie autoriai pažymi, kad ligonių sergančių plaučių sarkoidoze lokalus ir sisteminis T limfocitų atsakas yra skirtingas [59]. M.J.Garlepp ir kt. teigia, kad sveikų asmenų periferiniame kraujyje IL-2 koncentracija yra didesnė nei BAL skystyje, o sergančių neaktyvia sarkoidozės forma BAL skystyje padidėja IL-2 koncentracija, ir tai gali turėti lemiamą reikšmę ligos prognozeje [21]. Daugelis kitų mokslininkų pažymi, kad ligonių, sergančių sarkoidoze, BAL skystyje padidėja uždegiminių citokinų, būtent $\text{TNF}\alpha$ ir Th1 atsakui būdingų citokinų: IL-2 ir IFN- γ [53, 78].

I.Herry ir kt. teigia, kad sergančių sarkoidoze in vitro kultūroje T limfocitų, turinčių apoptozinius žymenis, procentas BAL skystyje yra didesnis nei kraujyje, lyginant su sveikųjų grupe, todėl autorius pažymi, kad BAL skysčio CD4+ T ląstelės nėra jautrios apoptozei, nes yra stipriai aktyvuotos [27].

Nustatyta, kad ląstelėje yra baltymų, skatinančių arba slopinančių apoptozę. Daguma jų koduojama *Bcl-2* šeimos genų. C.Mermigkis ir kt. pastebėjo, kad BAL skysčio limfocitai ir makrofagai pacientų sergančių sarkoidoze pasižymi padidinta antiapoptozinio *Bcl-2* baltymo ekspresija [52].

I.Domagala-Kulawik ir kt. imunocitocheminiu būdu tyrė Fas antigeno ekspresiją bronchoalveolinio lavažo skystyje. Fas receptorius buvo rastas epitelinių ląstelių citoplazmoje, makrofaguose, neutrofiluose ir limfocituose. Nustatyta didesnė Fas molekulių ekspresija alveolinių makrofagų membranose ligonių, sergančių sarkoidoze, kiek mažiau ligonių, sergančių plaučių vėžiu ir mažiausiai sveikų asmenų [17].

R.Kunitake ir kt. tyrė Fas/FasL sistemą ligonių sergančių plaučių sarkoidoze TUNEL ir imunohistocheminių metodais. Šios molekulės buvo aptiktos epitelioidiniuose histiocituose ir BAL skysčio limfocituose, o taip pat granulomas sudarančių ląstelių membranose. Apoptozė turi svarbią reikšmę granulomų regresijoje. Sarkoidozės granulomose aptikti apoptoziniai kūneliai. AT-PGR metodu aptikta FasL iRNR BAL limfocituose, esančiuose granulomose ir viduje ir išorėje. Gauti TUNEL metodu, tiriant Fas/FasL sistemą, rezultatai stipriai koreliavo su sergančiųjų plaučių sarkoidoze klinikiniais simptomais [45].

H.Dai ir kt. pastebėjo, kad ligonių, sergančių aktyvia sarkoidozės forma alveoliniai makrofagai daugiau ekspresuoja apoptozės FasR ir NFR1 receptorių savo membranose, negu periferinio kraujo limfocitai [12]. Alveoliniai T limfocitai yra skirtingo diferenciacijos ir aktyvumo laipsnio, palyginus su cirkuliuojančiomis T ląstelėmis periferiniame kraujyje [12, 27].

Tyrėjai pastebėjo, kad ligonių, sergančių sarkoidoze BAL skystyje yra ir tirpi Fas ligando (sFasL) forma. sFasL yra biologiškai aktyvi molekulė, kuri sukelia kvėpavimo takų epitelinių ląstelių apoptozę *in vitro*. Tirpi sFasL yra neekvivalentiška su membrana susijusiai FasL. Shikawa ir kt. aptiko aukštą sFasL koncentraciją BAL skystyje ir kraujo serume, ligonių sergančių aktyvia sarkoidozės forma. Tyrėjai pastebėjo, kad plaučių epitelinės ląstelės yra jautrios sFasL, o neutrofilai ir alveoliniai makrofagai yra santykinai jautrūs sFasL [51, 70].

Paskutinių metų moksliniai tyrimai parodė, kad ligonių, sergančių sarkoidoze BAL skysčio aktyvuoti T limfocitai yra atsparūs apoptozei, tačiau pasižymi dideliu kaspazės-3 aktyvumu. Aktyvi kaspazė-3, randama ląstelėse, kuriose vyksta apoptozė [72].

Daugelis mokslininkų pažymi, kad Fas antigeno ekspresijos analizė gali būti naudinga įvertinant apoptozės vaidmenį plaučių homeostazėje [17, 41, 71].

1.2.4. Dažniausiai naudojami apoptozinių ląstelių nustatymo metodai

Naudojamos įvairios apoptozės mechanizmų tyrimo metodikos. Morfologinius apoptozės požymius galima nustatyti elektroniniu mikroskopu. Apoptozinės ląstelės traukiasi, jų piknotiškas chromatinas išsidėsto ties branduolio membrana, vėliau branduolys suyra, ląstelė pasidaro netaisyklingos formos, su išaugomis, kuriose gali būti suskilusio branduolio fragmentų [50]. Morfologinė apoptozės diagnostika sunki, nes šis procesas yra trumpalaikis, todėl audinyje būna nedaug ląstelių su aiškiais programuotos mirties požymiais [79].

Kai vyksta apoptozė, aktyvinta endonukleazė suskaido DNR į fragmentus, turinčius 180 – 200 bp, todėl sutrūkinėjusi DNR yra būdinga apoptozės būdu žūvančioms ląstelėms. Šiuo metu apoptozinėms ląstelėms nustatyti dažniausiai atliekamos dvi *in situ* fermentinės reakcijos. Jų esmę sudaro žymėtujų nukleotidų prijungimas prie sutrūkinėjusios DNR galų. Viena iš šių reakcijų yra ISEL. Atliekant šią reakciją naudojama DNR polimerazė I, kuri pritvirtina žymėtuosius nukleotidus prie DNR laisvųjų galų, vėliau šis prisijungimas vizualizuojamas naudojant įvairius metodus [79]. Naudojant antrąjį metodą, terminalinė deoksinukleotidiltransferazė (TdT) prijungia deoksiuridin trifosfatą (dUTP) ir fluoresceinu žymėto biotino kompleksą prie suskilusios DNR laisvojo 3'- galo. Ši reakcija vadinama TUNEL.

Pastarojo metodo savybė ta, kad pažymimi tik atviri nutrūkusios dvigubos DNR grandinės galai. O toks DNR dvigubos grandinės suskilimas būdingas apoptozei [32].

Tikslesnė apoptozės analizė gali būti atlikus DNR elektroforezę. Naudojant šį metodą, nustatoma, į kokio dydžio fragmentus yra suskilusi DNR. Jei nustatoma apoptozei būdinga DNR fragmentacija, lieka neaišku, kokių ląstelių. Todėl DNR elektroforezė rekomenduotina tiriant tik vienos rūšies ląsteles (pvz., audinių kultūrą), bet netinka audiniams, sudarytiems iš įvairių ląstelių [32].

Tyrimų, nagrinėjančių apoptozę, atliekama vis daugiau, tačiau dažniau pasirodo ir straipsnių, vertinančių metodinius apoptozės nustatymo ypatumus. Jau yra žinoma, kad, atliekant *in situ* fermentines reakcijas, gali būti klaidingai teigiamos arba klaidingai neigiamos apoptozės reakcijos. M. M. Kockx ir kt., vertindami aterosklerozės plokštelės ląstelių apoptozę, nustatė, kad naudojant *in situ* žymėjimo techniką, gali būti pažymėtos ir ne branduolio struktūros. Pasirodo, kad aterosklerotinės plokštelės kalcio nuosėdos gali nespecifiškai prisijungti žymėtuosius nukleotidus, naudojamus *in situ* fermentinei reakcijai [39].

Kita problema yra ta, kad sutrūkinėjusi DNR grandinė yra būdinga ne tik apoptozei. Naudojant ISEL arba TUNEL metodiką, tik parodoma, kad yra DNR grandinių defektai. Tokie DNR pažeidimai gali būti, kai vyksta ląstelių nekrozė arba autolizė. Remiantis B.Grasl-Kraupp ir kt., DNR fragmentacija būdinga įvairiems ląstelių mirties būdams, todėl jos nustatymas *in situ* fermentiniais metodais negali būti laikomas apoptozės specifiniu ženklu [22]. Aprašyta nemažai priežasčių, galinčių iškreipti ISEL ar TUNEL reakcijų duomenis nustatant apoptozines ląsteles. Kad duomenys būtų tikslūs, būtina standartizuoti šias reakcijas, o patikimiau būtų – jas derinti su kitais apoptozės nustatymo metodais. Norint gauti patikimus duomenis, neatliekant biopsijos, galima panauduoti tekės citometriją nustatant Fas ligando ir Fas receptorių ekspresiją ant tiriamų ląstelių membranų paviršiaus [22].

Mes tyrėme CD95 ir CD25 receptorių ekspresiją T limfocitų membranose sergančiųjų sarkoidoze kraujo ir BAL skysčio ląstelių membranose. Naudojome vieną iš informatyviausių laboratorinio tyrimo metodų – daugiaparametrę tekės citometriją. Kaip teigia A.Koepke ir kt. šis metodas pasižymi tam tikrais pranašumais (palyginus su imunohistocheminiu tyrimu): tiriamoji medžiaga imama mažai invaziniu būdu; tyrimui pakanka nedidelio bandinio kiekio; galima nustatyti daugelį tos pačios ląstelės parametrų vienu metu; galima tirti bet kuriuos audinius, iš kurių ruošiamos ląstelių suspensijos; rezultatas gaunamas greitai (per kelias valandas, o ne dienas); tyrimas statistiškai patikimas (įvertinama tūkstančiai ląstelių, o ne regėjimo laukai); tyrimas objektyvus (duomenis vertina kompiuteris, o ne žmogus akimi); paprastesnė ir labiau standartizuota bandinio ruošimo technika [40].

1.3. DAUGIAPARAMETRĖ TĖKMĖS CITOMETRIJA

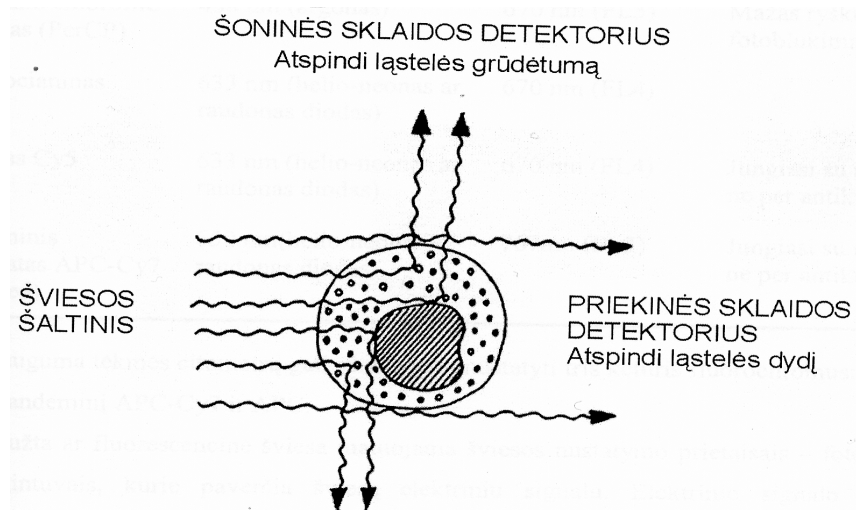
Kiekybinės citometrijos era prasidėjo 1930 metais nuo T.Casperssono darbų apie ląstelių nukleorūgščių matavimus [76]. 1953 metais P.Crossland-Tayloras atrado ir pritaikė laminarinės tėkmės arba hidrodinaminio fokusavimo principą, kuriuo suspensijos daleles galima „išrikiuoti“ vieną paskui kitą. Remdamasis šiuo ir kitais laimėjimais, 1965 metais L.Kamentzky sukuria pirmąjį tėkmės citometro prototipą, gebantį vienu metu vertinti daugiau negu vieną ląstelės parametą. Minėto prototipo pagrindu daugelis gamintojų išplėtojo savo modelius, gebančius vienu metu vertinti iki 10 ląstelės parametų, o tai suteikia tyrėjams praktiškai neribotas ląstelių analizės tyrinėjimo galimybes (6 pav.) [76].



6 pav . Tėkmės citometras.

Citometrija pagrįsta keliais principais:

- ✓ hidrodinaminio ląstelių, tekančių nešančiojo skysčio srovėje, fokusavimu, dėl kurio ląstelės išsirikiuoja viena paskui kitą prieš kirsdamos lazerio spindulį. Šį principą užtikrina tėkmės citometro slėgio ir skysčių sistemos;
- ✓ monochrominės lazerio šviesos sklaida, kuria įvertinamas ląstelės dydis (pagal priekinę spindulio sklaidą) ir grūdėtumas (pagal šoninę spindulio sklaidą); fluorochromų sužadiniu ir skirtingų bangos ilgių šviesos emisija (7 pav.);
- ✓ monochromine lazerio šviesa galima vienu metu sužadinti skirtingus fluorochromus ir gauti informaciją apie kelis ląstelės požymius.



7 pav. Šviesos sklaida ląstelei kertant lazerio spindį.

Keliaudamos per citometro tėkmės kamerą, ląstelės kerta argono jonų lazerio šviesą ir ją išsklaido. Fiksuojamas išsklaidymas 90° ir 180° kampu, o kartu sužadinami ant ląstelės prikibę fluorochromai, kurie išspinduliuoja skirtingo bangos ilgio šviesą. Ją fiksuoja detektoriai ir paverčia signalą kompiuteriui suprantamu, kad galėtų vykti analizė. Lazerio spindulio kryptimi į priekį matuojama priekinė šviesos sklaida (PŠS) arba mažo kampo sklaida, o 90° kampu matuojama šoninė šviesos sklaida (ŠŠS). PŠS signalas pirmiausia priklauso nuo dalelių ar ląstelių dydžio, ŠŠS signalas rodo vidinę struktūrą, citoplazmos grūdėtumą, branduolio tankį (7 pav.).

Išspinduliuota fluorescencinė šviesa optiškai surenkama 90° kampu ir priklausomai nuo išspinduliuotos bangos ilgio šviesa dikrotinių veidrodžių suskaidoma į du ar tris spindulius.

Tėkmės citometrijoje naudojama monochrominė šviesa patogi tirti fluorochromais žymėtas struktūras. Tyrimo specifiškumas nustatant mus dominančias struktūras pasiekiamas monokloniniais antikūnais (pagamintais taikant hibridomų techniką), kurių Fc fragmentas sujungtas su fluorochromais. Citometrijai naudojami fluorochromai labai įvairūs. Dauguma tėkmės citometrų gali vienu metu nustatyti tris, keturis ir daugiau fluorochromus. Dažniausiai naudojami: FITC (fluoresceino izotiocianatas), PE (fikoeritrinas), PerCP (peridinochlorofilo proteinas), tandeminį APC-Cy7 ir APC.

Laužta ar fluorescencinė šviesa matuojama šviesos nustatymo prietaisais: fotodiodais ar fotodaugintuvais, kurie paverčia šviesą elektriniu signalu. Elektrinio signalo dydis yra proporcingas nustatytos šviesos kiekiui, kuris fluorescencinės šviesos atveju susijęs su švytinčių molekulių skaičiumi. Kiekvienos ląstelės ar dalelės signalas, išmatuotas skirtingais šviesos nustatymo įrenginiais, yra perdirbamas ir siunčiamas

vadinamųjų sąrašinių duomenų pavidalu į kompiuterį. Tėkmės citometrija leidžia greitai gauti informaciją apie didelį ląstelių skaičių (250-4000 ląstelių/sek.).

Matavimo metu gaunama daug informacijos, todėl duomenims apdoroti ir analizuoti reikia galingų kompiuterių, sudėtingos programinės įrangos. Paprastai įvertinama nuo 5000 iki 10 000 ląstelių ir gaunami penki - šeši skirtingi kiekvienos ląstelės parametrai. Vieno parametro rezultatai gali būti pateikiami ir analizuojami naudojant histogramas. Tačiau labiau informatyvu nubrėžti dviejų skirtingų parametrų diagramas vieną priešais kitą, pavyzdžiui, brėžinyje pažymint taškus arba kontūrus [15].

Lizuoto kraujo ląstelių taškinės diagramos leidžia atskirti limfocitus, monocitus ir granulocitus. Galima analizuoti visas ląsteles arba tik dominančią populiaciją. Pastaruoju atveju ląstelės atrenkamos apibrėžiant regioną aplink tiriamas ląsteles taškinėje diagramoje. Taškinėse diagramose ląstelių populiacijos atskiriamos pagal šviesos sklaidos pobūdį ir naudojamos ląstelėms imunofenotipuoti. Atrinktos į regioną ląstelės toliau gali būti tiriamos siekiant nustatyti kitus parametrus. Tėkmės citometrijos būdu objektyviai apskaičiuojamas fluorescencijos intensyvumas [15].

1.3.1. Imunokompetentinių ląstelių žymenys

Imunokompetentinės ląstelės savo paviršiuje ekspresuoja skirtingus antigenus.

1975 metais G.Kohleris ir C.Milsteinas paskelbė darbą apie monokloninių antikūnų gamybą taikant hibridomų techniką [48]. 1982 metais Paryžiuje įvyko pirmoji konferencija, skirta žmogaus leukocitų diferencijavimo antigenams. Jos metu monokloniniai antikūnai prieš įvairias leukocitų struktūras buvo pradėti klasifikuoti pagal CD nomenklatūrą [40].

Panaudojus monokloninius antikūnus prieš atitinkamų ląstelių paviršinius žymenis tėkmės citometro pagalba nustatinėjome mus dominančias ląsteles.

CD45 – glikoproteinas, kuris egzistuoja įvairiose izoformose nuo 180 iki 220 kDa. CD45 epitopas randamas visų žmogaus leukocitų paviršiuje, apimant limfocitus, monocitus, polimorfonuklearus. CD45 100% randamas timocitų, įvairius audinius infiltruojančių leukocitų, B limfocitų, T limfocitų ir mieloidinės linijos ląstelių paviršiuje. Anti – CD45 nereaguoja su cirkuliuojančiais eritrocitais ar trombocitais [2].

CD3 – 22-28 kDa dydžio antigenas yra susijungęs su TCR $\alpha\beta$ arba $\gamma\delta$ grandinėmis, ekspresuojamas visų subrendusių T limfocitų paviršiuje. CD3 molekulė perduoda aktyvinimo signalus, kilusius TCR sąveikaujant su specifiniu antigenu [3].

CD4 – 55 kDa transmembraninis glikoproteinas, sudarytas iš keturių ekstraląstelių imunoglobulinų tipo domenų. CD4 yra ekspresuojamas T helperių paviršiuje. CD4 molekulės dviejų domenų N galai yra ŽLA II klasės molekulių prisijungimo vieta. CD4 stabilizuoja TCR-peptido-ŽLA kompleksą ir dalyvauja perduodant aktyvinimo signalą. CD4 molekulių, nors ir gerokai mažiau negu limfocituose, yra monocitų, Langerhanso ląstelių ir eozinofilų membranos paviršiuje [3].

CD8 – 32-34 kDa dimerinis glikoproteinas, sudarytas iš α ir β grandinių. Jis ekspresuojamas citotoksinių T limfocitų arba kaip homodimeras, susidedantis iš dviejų α grandinių arba kaip heterodimeras, susidedantis iš α ir β grandinės. Ši molekulė prisijungia prie ŽLA I klasės molekulių. CD8 taip pat ekspresuojamas NK ląstelių, daugumos timocitų, kur jis dažniausiai ekspresuojamas kartu su CD4 [3].

CD14 – 53-55 kDa vienos grandinės membraninis glikoproteinas, kuris ekspresuojamas mielomonocitinės linijos ląstelių, įskaitant monocitus, makrofagus ir dalį granulocitų. Jis silpnai ekspresuojamas neutrofilų, B limfocitų, bet jo neturi T limfocitai, NK ląstelės, eritrocitai ir trombocitai. CD14 randamas Langerhanso ląstelių, dendritinių ląstelių ir histiocitų paviršiuje. Todėl CD14 laikomas monocitų / makrofagų žymeniu. CD14 yra lipopolisacharidų receptorius. Lipopolisacharidas iššaukia aktyvuotų makrofagų ir monocitų gaminamų mediatorių ir citokinų sekreciją [2].

CD25 – 55kDa IL-2 receptoriaus α grandinė. Jį ekspresuoja aktyvinti T limfocitai. Sintetintas T limfocitų po antigeno atpažinimo, sukelia antigenui specifiskų limfocitų proliferaciją; sukelia NK ląstelių bei B limfocitų proliferaciją ir suaktyvina antikūnų sintezę; sukelia antigeno aktyvintų T limfocitų apoptozę Fas būdu [3].

CD95 – 48 kDa antigenas. Apoptozės Apo-1/Fas žymuo. Tai yra antigenas ekspresuojamas T ir B limfocitų, NK ląstelių, monocitų, dažniausiai CD45RO atminties limfocitų. FasR aktyvinimas FasL ląstelėje sukelia apoptozę [3].

2. TIRIAMOJI MEDŽIAGA IR METODAI

2.1. TIRIAMIEJI

Nuo 2004 m. spalio mėnesio iki 2006 m. balandžio mėnesio VšĮ Vilniaus Universiteto ligoninėje „Santariškių klinikos“ Laboratorinės diagnostikos centro Klinikinės imunologijos laboratorijoje ištirti 42 ligoniai, sergantys sarkoidoze (19 moterų ir 23 vyrai) nuo 23 iki 77 metų (amžiaus vidurkis – $38,8 \pm 10,5$ metų). Tiriamieji buvo suskirstyti į dvi grupes: sergantys aktyvia (n = 20) ir neaktyvia (n = 22) plaučių sarkoidozės forma. Demografiniai tiriamųjų duomenys

pateikti 1 lentelėje. Tyrime dalyvavo ir 5 sveiki savanoriai. Visiems tiriamiesiems atliktas bronchoalveolinis lavažas, BAL skysčio ir periferinio kraujo imunologinis tyrimas. Sarkoidozės diagnozė nustatyta gydytojų pulmonologų, remiantis tipiškais klinikiniais simptomais (aktyvi ligos forma) ar klinikinių simptomų nebuvimu (neaktyvi forma), krūtinės ląstos rentgeniniais požymiais (padidinti tarpuplaučio limfmazgiai).

1 lentelė. Demografiniai tiriamųjų duomenys

Lytis	Aktyvi forma		Neaktyvi forma		Viso (n)	Amžius
	n	amžiaus vidurkis	n	amžiaus vidurkis		
Vyrai	7	33,7±8,1	16	39,6±12,1	23	40,1±9,7
Moterys	13	40,7±10,9	6	37,3±6,7	19	37,7±11,2
Viso:	20		22		42	38,8±10,5

2.2. DARBO EIGA

2.2.1. Tiriamosios medžiagos surinkimas

Periferinio kraujo pavyzdžiai. Periferinis kraujas buvo imamas į sterilius vakuuinius mėgintuvėlius žaliu kamšteliu (su ličio heparinu) tą pačią dieną, kada buvo imamas ir bronchoalveolinio lavažo skystis.

Bronchoalveolinio lavažo skysčio pavyzdžiai. Fibrobronchoskopija atlikta videobronchoskopu Pentax EB-1530T2 po lidokaino vietinės nejautros. 100 ml (5 porcijos po 20 ml) instiliuoto izotoninio natrio chlorido tirpalo iš karto švirškštu buvo aspiruojama per silikoninį kateterį ir supilama į silikoninius indelius. Tirta „alveolių“ porcija – skystis, aspiruotas iš distalinių kvėpavimo takų ir alveolių. Aspiruojama 30-60% instiliuoto tirpalo kiekio (kita tirpalo dalis rezorbuojasi). Minimalus būtinas kiekis – 25 ml. BAL lokalizacija pasirenkama pagal rentgeninius pokyčius plaučiuose. BAL skystis pristatomas į laboratoriją 1 – 2 val. bėgyje silikonizuotame indelyje.

BAL skystis filtruotas naudojant vienkartinį filtrą (poros skersmuo 0,7mm).

2.2.2. Ląstelių gyvybingumo vertinimo metodika

Gauti rezultatai nebus tiksūs, jei mėginyje bus didelė žuvusių ląstelių priemaiša. Ši priemaiša gali atsirasti imant bandinį ir (arba) ruošiant mėginį. Todėl svarbu patikrinti ląstelių gyvybingumą. Techninėse rekomendacijose nurodoma, kad žuvusių ląstelių turi būti ne daugiau nei 5% [8]. Mes naudojome supravitalinio dažymo tripano mėlio tirpalu (Sigma, JAV) metodiką. Mūsų tirtuose bandiniuose ląstelių gyvybingumas svyravo nuo 95% iki 100%. Tripano mėlį absorbuoja negyvos ląstelės. Šio dažiklio nepriima gyvos ląstelės, todėl ši tyrimo technika vadinama „ląstelių gyvybingumo nustatymu pagal dažiklio atmetimą“.

Reikalingi reagentai ir priemonės:

1. Tripano mėlio tirpalas (0,4%) (Sigma).
2. Falcon 12x75 mm mėgintuvėliai.
3. Pipetės arba Pastero pipetės.
4. Objektiniai stikleliai.
5. Dengiamieji stikleliai.
6. Gorjajevo kamera.
7. Šviesinis mikroskopas.

Mėginio ruošimas:

1. Į mėgintuvėlį vienam lašui ląstelių suspensijos įlašinamas vienas lašas 0,4% Tripano mėlio tirpalo. Sumaišoma.
2. Ši suspensija užlašinama ant objekcinio stiklelio ir uždengiama dengiamuoju stikleliu. Po kelių minučių ląstelės prikimba ir absorbuoja dažą.
3. Tiriama šviesiniu mikroskopu x 40 objektyvu ir suskaičiuojama 100 ląstelių.
 - Gyvybingumas apskaičiuojamas pagal formulę:

Gyvybingumo % = (gyvų ląstelių skaičius / visų ląstelių skaičius) x 100 [44].

2.2.3. Mėginių ruošimo tėkmės citometriniam tyrimui metodika

Periferinio kraujo mėginių eritrocitų lizė buvo atliekama pagal LWB metodiką *Lysing* reagentu (Becton Dickinson, JAV), laikantis gamintojo instrukcijų [15, 65]. BAL skysčio mėginiai buvo lizuoti, tik esant eritrocitų priemaišai. Šios procedūros metu patentuotu

hipotoniniu lizavimo tirpalu iš kraujo ir BAL skysčio bandinio eliminuojami eritrocitai, tačiau išsaugomos ląstelės su branduoliu.

Reikalingi reagentai ir priemonės:

1. Vienkartiniai polipropileno Falcon 12 x 75 mm citometrijos mėgintuvėliai.
2. Sūkurinė purtyklė *Vortex*.
3. Mikropipetė su vienkartiniais antgaliais.
4. Dejonizuotas vanduo.
5. Laboratorinių skysčių talpos.
6. Centrifuga, minimalus greitis 200 x g.
7. Lizuojantis tirpalas (FACS Lysing solution).
8. Plaunantis buferis (PBS).
9. Parafolmaldehido tirpalas (ląstelių membranų fiksavimui).
10. Monokloniniai antikūnai, žymėti dviem skirtingais fluorochromais: FITC ir PE (Becton Dickinson, JAV) (2 lentelė).

2 lentelė. Monokloninių antikūnų charakteristika

Monokloniniai antikūnai pagal CD klasifikaciją	Konjuguotas fluorochromas	Specifiškumas
CD3	FITC	T limfocitų žymuo
CD4	PE	T helperių žymuo, silpniau ekspresuojamas ir monocitų/ makrofagų
CD8	PE	Citotoksinių T limfocitų žymuo, silpniau ekspresuojamas ir dalies natūralių kilių
CD25	PE	IL-2 receptoriaus α grandį ekspresuojantys limfocitai
CD95	PE	Fas receptorių, ekspresuojamas T ir B limfocitų, NK ląstelių, monocitų .
CD14	PE	Monocitų / makrofagų žymuo
CD45	FITC	Bendras leukocitų žymuo
γ_1 (IgG ₁)	FITC	Specifinis pelių ląstelių žymuo, kurio neturi žmogaus ląstelės
γ_{2a} (IgG _{2a})	PE	Specifinis pelių ląstelių žymuo, kurio neturi žmogaus ląstelės

Limfocitų analizės regionui nustatyti ruošiamas mėginys su Simultest LeucoGATE (CD45/CD14). Fluorescencijos ribai tarp teigiamai ir neigiamai nusidažiusių ląstelių nustatyti ir galimam nespecifiniam švytėjimui įvertinti ruošiamas mėginys su Simultest Control $\gamma_1(\text{IgG}_1)/\gamma_{2a}(\text{IgG}_{2a})$.

Mėginio ruošimas:

1. 100 μl kraujo ar BAL skysčio mėginiai pažymėtuose (Falcon 12 x 75 mm) mėgintuvėliuose inkubuojamos su 20 μl pasirinktu monokloniniu antikūnu kambario temperatūroje (20 - 25°C), tamsoje iki 15 - 30 min.
2. Po inkubavimo į mėgintuvėlius pridedama paruošto FACS lizavimo tirpalo.
3. Mėginiai sumaišomi purtykle *Vortex* apie 3 s.
4. Kraujo mėginys inkubuojamas iki 12 minučių kambario temperatūroje (20 - 25°C) tamsoje, o esant reikalui inkubuojamas ir BAL skysčio mėginys iki 5 minučių (ilgiau inkubuoti negalima, nes gali būti pažeista leukocitų membrana).
5. Po inkubacijos mėgintuvėlis centrifuguojamas (300 x g 5 min). Supernatantas nupilamas. Nuosėdos sukratomos, kad būtų išvengta ląstelių sukibimo.
6. Į mėginį įpilama 2ml PBS, sumaišoma (*Vortex*) ir centrifuguojama (200 x g 5 min).
7. Supernatantas nupilamas paliekant apie 50 μl nuosėdų dugne. Nuosėdos sukratomos, kad būtų išvengta ląstelių sukibimo.
8. Užpilama 500 μl 1% paraformadehido tirpalo.
9. Mėginys paruoštas citometrinei analizei.
10. Fiksuotos ląstelės stabilios 24 valandas. Iki vertinimo uždengti mėgintuvėliai laikomi 2 - 8 °C temperatūroje tamsoje.
11. Prieš tiriant bandinį iš naujo purtoma purtykle *Vortex* 3 s.

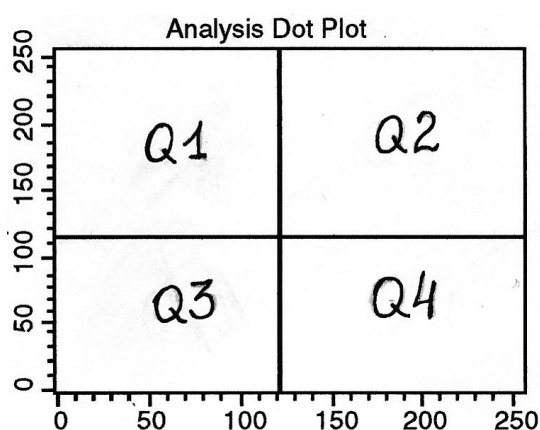
2.2.4. Duomenų analizė

Duomenims rinkti ir analizuoti naudojome *FACSCalibur* (BD, JAV) tėkmės citometrą, turintį kalibravimo, duomenų rinkimo ir analizės programas. Detektorių jautrumas nustatomas ir fluorescencijos spektrų persidengimo kompensacija vykdoma naudojant programinę įrangą *FACSComp* bei *CaliBrite* spalvotus fluorescuojančius rutuliukus.

Duomenis analizavome *CellQuest* arba *Simul SET* programine įranga dvispalvei analizei. Analizuota po 10 000 ląstelių kiekviename mėginyje, po keturis ląstelės parametrus (ląstelės dydis, grūdėtumas, dvi žymėtos monokloniniais antikūnais paviršiaus struktūros).

Prieš tiriant bandinį visada buvo atliekama neigiama nespecifinės fluorescencijos kontrolė izotipiniais reagentais prieš žmogaus organizme nesančias struktūras. Naudodami izotopinės neigiamos kontrolės reagentą patikrinome, ar nėra nespecifinio ir (arba) citofilinio antikūnų jungimosi prie tiriamųjų ląstelių populiacijos. Jei nespecifinis švytėjimas didelis (daugiau kaip 5% tiriamos populiacijos), bandinys ruošiamas tyrimui iš naujo.

8 paveiksle pateikta duomenų analizė taškinėse diagramose, kur: **Q1** – FITC (-) PE (+); **Q2** – FITC (+) PE (+); **Q3** – FITC (-) PE (-); **Q4** – FITC (+) PE (-).



8 pav. Taškinių diagramų duomenų analizės schema

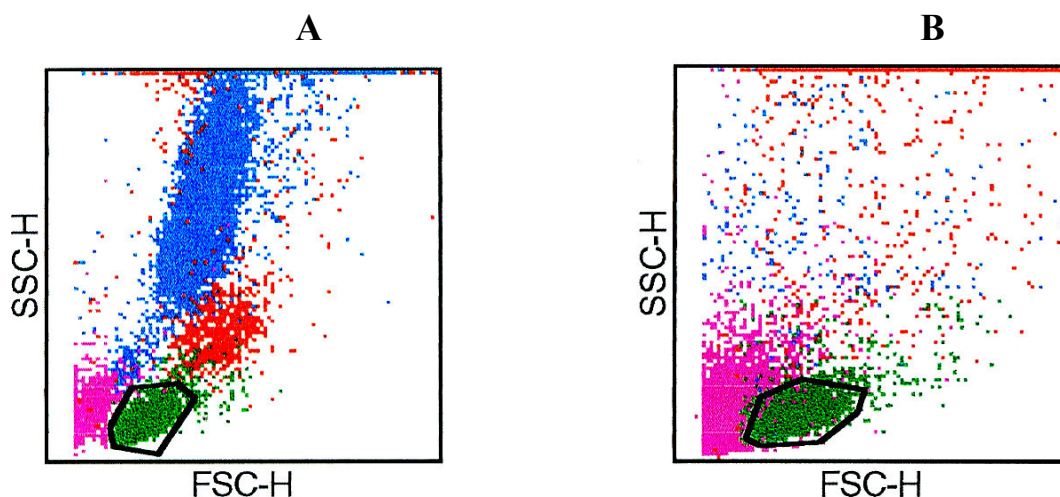
2.2.5. Statistinė duomenų analizė

Tyrimų rezultatai statistikai apdoroti asmeniniu kompiuteriu, naudojant programų paketus *Statistica for Windows* ir *Microsoft Excel*. Tikrinant hipotezes apie parametrų pasiskirstymo normalumą, naudotas *Shapiro - Wilk* testas. Statistiškai lyginant hipotezes apie imčių vidurkių lygybes, nepriklausomiems kintamiesiems taikytas neparametrinis *Mann - Whitney U* testas. Reikšmingais skirtumai buvo laikomi, kai $p < 0,05$. Siekiant nustatyti tiesinės priklausomybės tarp kintamųjų laipsnį, buvo apskaičiuotas koreliacijos koeficientas **r**. Koreliacinis ryšys buvo vertinamas kaip silpnas, jei **r** buvo nuo 0,3 iki 0,5 (nuo -0,3 iki -0,5); vidutinis jei **r** nuo 0,5 iki 0,7 (nuo -0,5 iki -0,7); stiprus, jei nuo 0,7 iki 0,99 (nuo -0,7 iki -0,99) [11, 66, 68]

3. REZULTATAI

Mūsų tyrimo tikslas buvo ištirti sergančiųjų plaučių sarkoidoze proliferacinio ir apoptozės inicijavimo receptorių ekspresiją T limfocitų membranose lokaliame ir sisteminame imuniniame atsake. Kad nustatyti mus dominančią ląstelių populiaciją taškinėje diagramoje naudojome CD45/CD14 monokloninius antikūnius. Analizavome limfocitų populiaciją, apibrėždami regioną aplink tiriamas ląsteles (9 pav.).

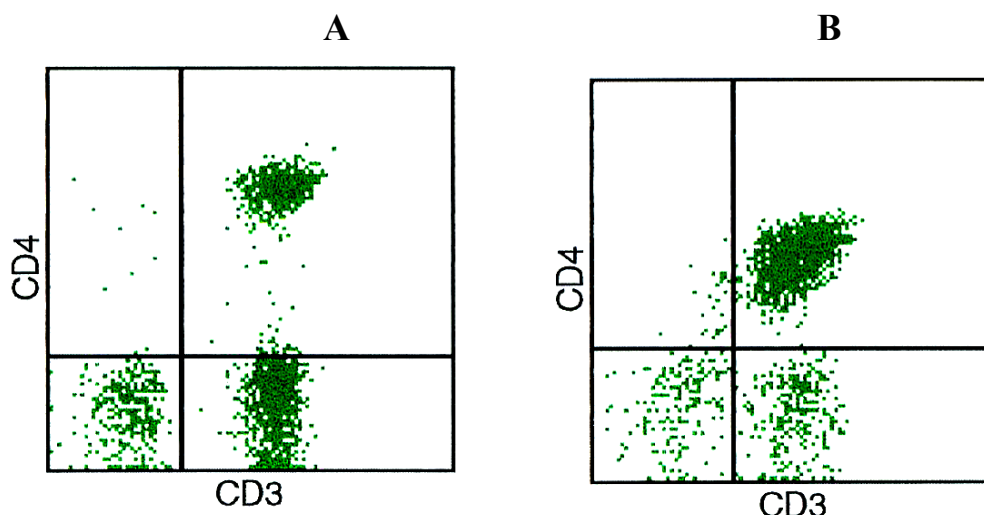
Tiriant mėginius, taškinėse diagramuose ląstelėms išsidėsčius pagal dydį (PŠS) ir branduolio grūdėtumą (ŠŠS), nustatėme, kad periferiniame kraujyje ir BAL skystyje ląstelių sudėtis skiriasi (9 pav.). Periferiniame kraujyje vyrauja granulocitai (9 pav. A (mėlyna spalva)), BAL skystyje – limfocitai (sarkoidoze sergantiems) (9 pav. B (žalia spalva)).



9 pav. Ląstelių išsidėstymas taškinėse diagramose pagal šoninę ir priekinę šviesos sklaidą:
A – sergančiųjų sarkoidoze periferiniame kraujyje,
B – sergančiųjų sarkoidoze bronchoalveolinio lavažo skystyje.
Limfocitai pažymėti žalia spalva, monocitai – raudona, granulocitai – mėlyna.

10 paveiksle pateiktos sergančiųjų sarkoidoze taškinės diagramos, kuriose matyti skirtingas CD3+CD4+ T limfocitų vaizdas.

Sergančiųjų aktyvia ir neaktyvia plaučių sarkoidozės formomis, periferinio kraujo bei BAL skysčio limfocitų populiacijų, tirtų tėkmės citometrijos metodu, charakteristika pateikiama 3 lentelėje.

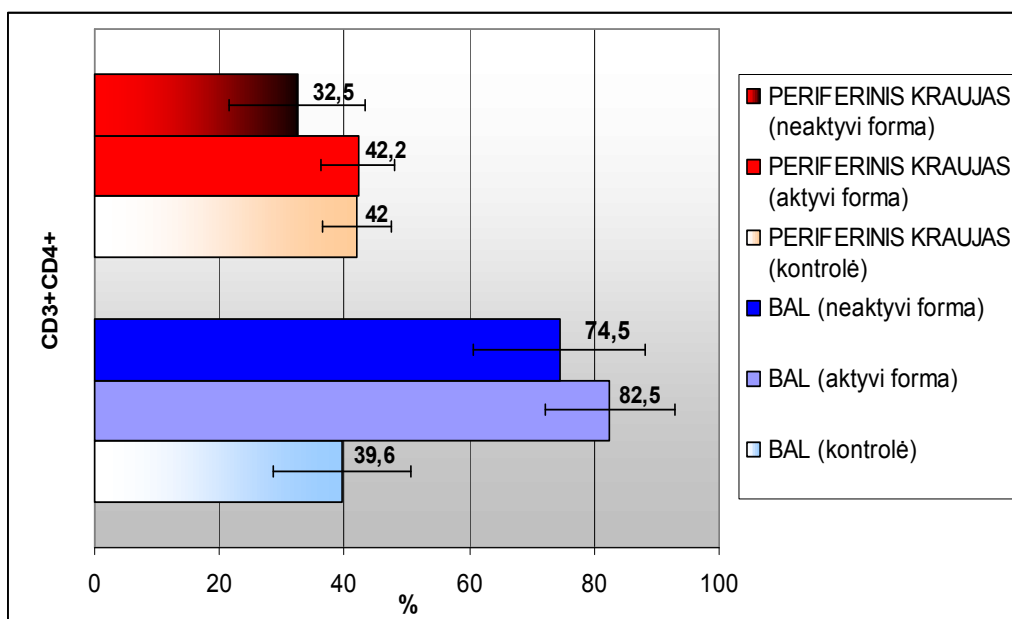


10 pav. Sergančiųjų sarkoidoze T limfocitai (CD3+CD4+):
A – periferinio kraujo mėginiuose (Q2 kvadrate CD3+CD4+ (40%));
B – BAL skysčio mėginiuose (Q2 kvadrate CD3+CD4+ (80%)).

3 lentelė. Ligonų, sergančių aktyvia ir neaktyvia sarkoidozės forma, limfocitų potipių pasiskirstymas

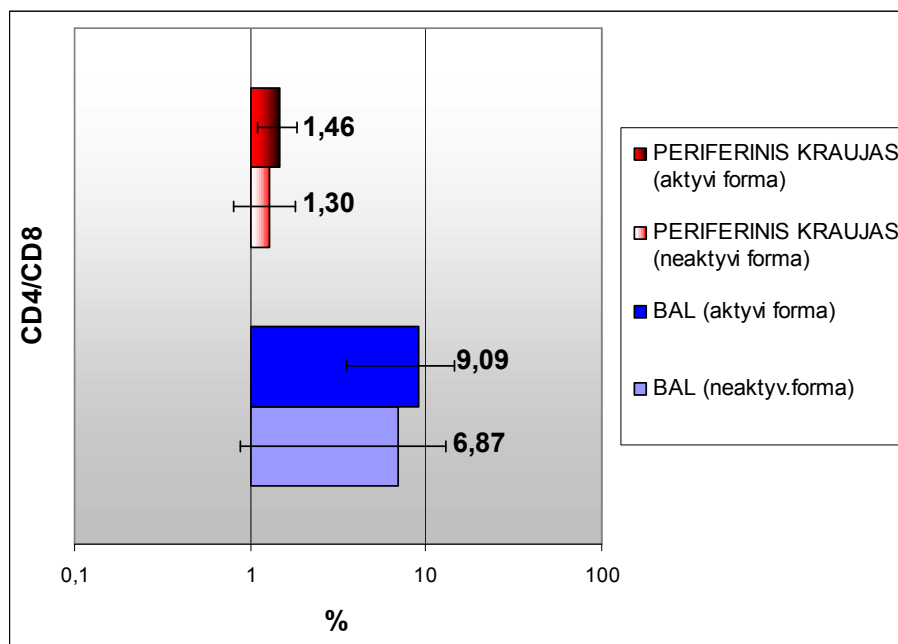
Rodiklis (%)	Aktyvi forma (n=20)			Neaktyvi forma (n=22)		
	BAL	Periferinis kraujas	p	BAL	Periferinis kraujas	p
CD3+	94,7 ± 4,0	73,9 ± 7,1	p < 0,05	93,4 ± 3,8	72,4 ± 8,8	p < 0,05
CD4+	82,5 ± 10,3	42,2 ± 5,9	p < 0,05	74,5 ± 13,8	39,7 ± 6,2	p < 0,05
CD8+	12,3 ± 7,1	31,7 ± 8,7	p < 0,05	16,9 ± 9,7	32,5 ± 10,9	p < 0,05
CD4+/CD8+	9,1 ± 5,5	1,4 ± 0,3	p < 0,05	6,8 ± 5,9	1,3 ± 0,5	p < 0,05

Tyrimo rezultatai rodo, kad mūsų tirtose ligonių grupėse rastas reikšmingai didesnis CD3+CD4+ T limfocitų procentas BAL skystyje, negu sveikųjų asmenų BAL mėginiuose. Sarkoidoze sergančiųjų CD3+CD4+ limfocitų kiekis BAL skystyje buvo daug didesnis nei periferiniame kraujyje (11 pav.).



11 pav. Ligonų sergančių sarkoidoze ir sveikų asmenų CD3+ CD4+ limfocitų palyginimas BAL skystyje ir periferiniame kraujyje

Nustatėme, kad ligonių sergančių plaučių sarkoidoze, CD4+/CD8+ limfocitų santykis BAL skystyje buvo statistiškai patikimai didesnis nei periferiniame kraujyje (12 pav.). Sveikų asmenų CD4+/CD8+ santykis BAL skystyje yra nuo 1 iki 2,5%, kraujyje nuo 1 iki 2%.

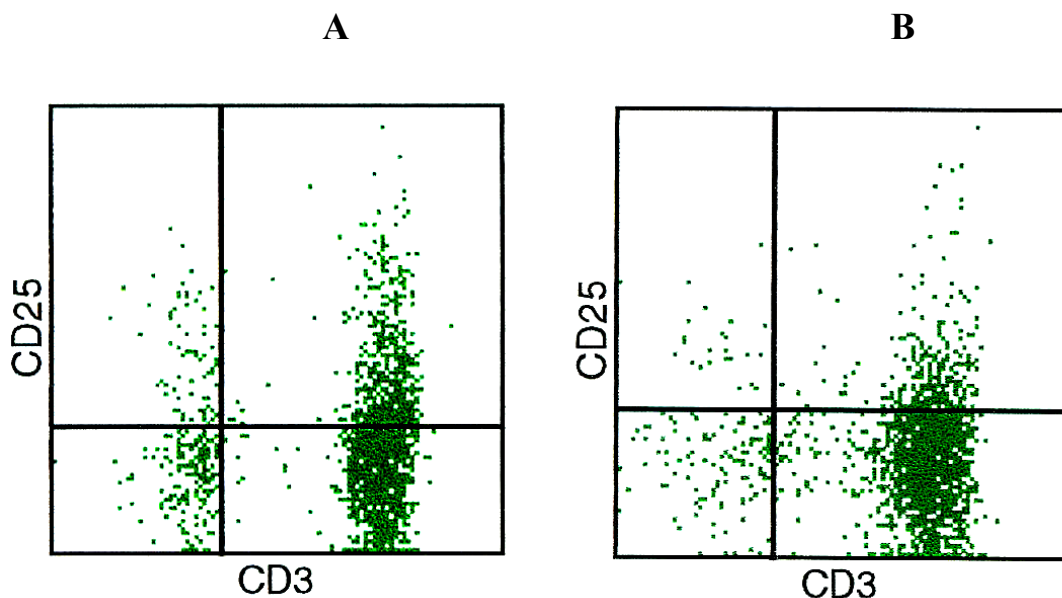


12 pav. Plaučių sarkoidoze sergančių ligonių CD4+/CD8+ santykio palyginimas BAL skystyje ir kraujyje

3.1. SERGANČIŲJŲ SARKOIDOZE IL-2R (CD25) EKSPRESUOJANČIŲ LIMFOCITŲ ANALIZĖ BAL SKYSTYJE IR PERIFERINIAME KRAUJYJE

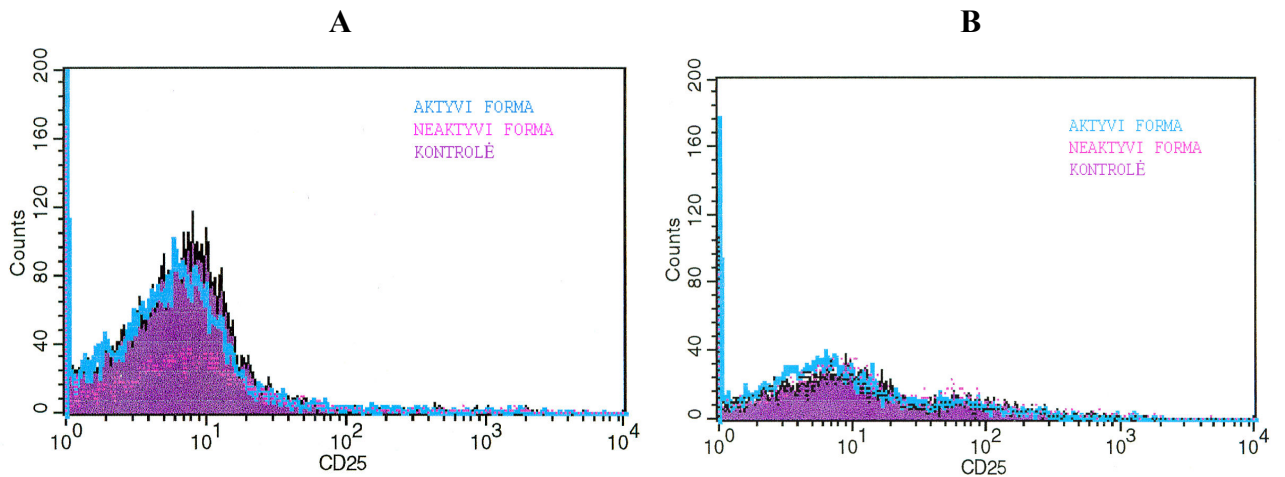
Siekiant įvertinti sergančiųjų sarkoidoze IL-2R ekspresiją T limfocitų paviršiuje lokaliame ir sisteminame imuniniame atsake, atlikome BAL skysčio ir periferinio kraujo limfocitų analizę tėkmės citometrijos metodu, nustatant procentiškai kuri dalis dominančios populiacijos turi CD25 žymenį.

Ligonių, sergančių sarkoidoze, IL-2R α grandį ekspresuojančių limfocitų vaizdas taškinėse diagramose pateiktas 13 paveiksle. Pateiktose diagramose matome skirtingą limfocitų, savo paviršiuje turinčių CD25 molekules, vaizdą.



13 pav. Sarkoidoze sergančiųjų IL-2R α grandį ekspresuojantys limfocitai (CD3+CD25+) (Q2 kvadrante): **A** – periferinio kraujo mėginiuose; **B** – BAL skysčio mėginiuose.

Sarkoidoze sergančiųjų ir kontrolinės grupės CD3+CD25+ limfocitų histogramų vaizdas BAL skystyje ir periferiniame kraujyje pateiktas 14 paveiksle. Matome, kad mūsų tirtose grupėse lokalus ir sisteminis imuninis atsakas yra skirtingas.



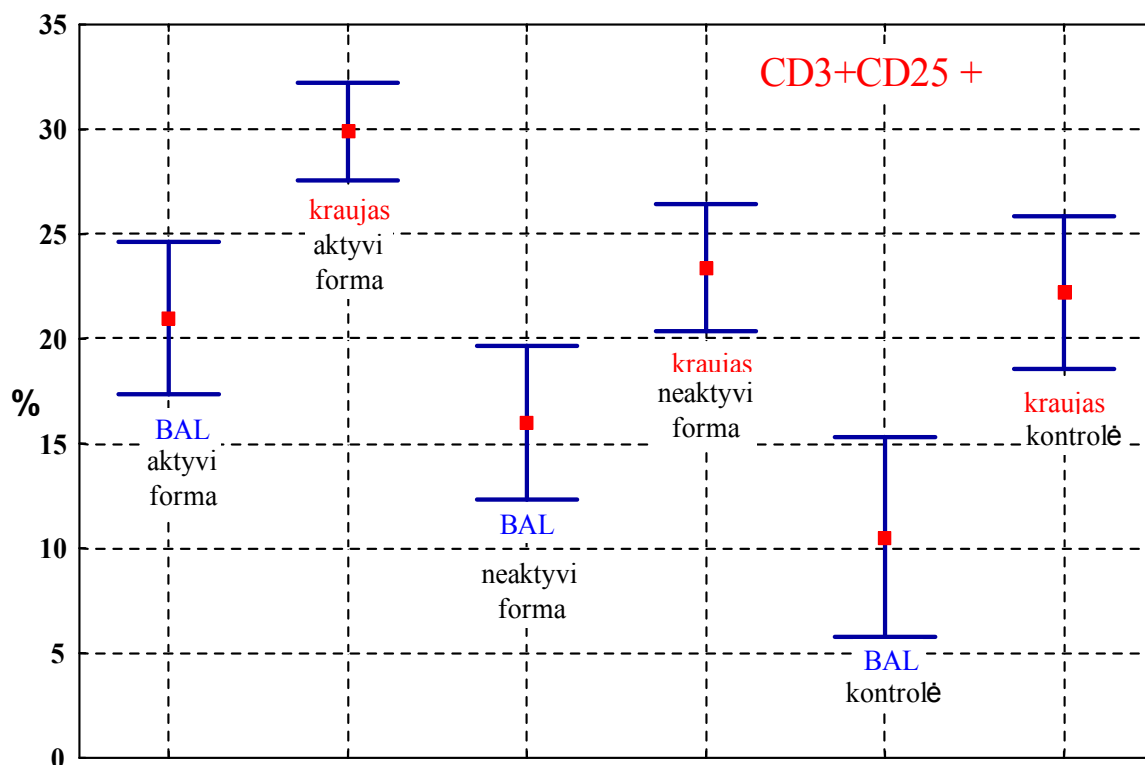
14 pav. Sergančiųjų skirtingomis sarkoidozės formomis ir kontrolinės grupės CD3+CD25+ limfocitų histogramų vaizdas: **A** – periferiniame kraujyje; **B** – BAL skystyje.

Sergančiųjų sarkoidoze ir kontrolinės grupės sveikųjų asmenų IL-2R ekspresuojančių limfocitų statistinė duomenų charakteristika BAL skystyje ir periferiniame kraujyje pateikta 4 lentelėje. CD3+CD25+ limfocitų vidurkių pasikliautinieji intervalai pateikti 15 paveiksle.

4 lentelė. Sergančiųjų sarkoidoze ir kontrolinės grupės CD3+CD25+ limfocitų charakteristika

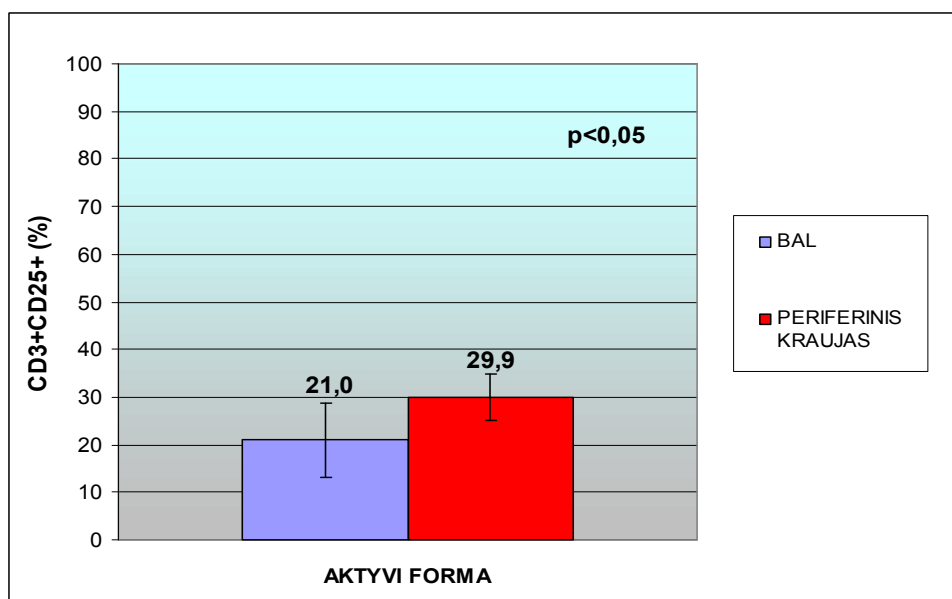
Tiriamieji	CD3+CD25+(%)			
	BAL	Periferinis kraujas	p	r
Aktyvi forma (n = 20)	21 ± 7,7	29,9 ± 4,9	p < 0,05	r = 0,47
Neaktyvi forma (n = 22)	16 ± 8,2	23,4 ± 6,8	p < 0,05	r = -0,54
Kontrolė (n = 5)	10,5 ± 6,2	22,2 ± 4,7	p < 0,05	r = 0,35

Tirtų ligonių, sergančių aktyvia sarkoidozės forma, grupėje nustatėme statistiškai patikimą vidutinio stiprumo teigiamą koreliaciją tarp CD3+CD25+ limfocitų BAL skystyje ir kraujyje (r = 0,47), bei neigiamą koreliaciją sergančiųjų neaktyvia ligos forma grupėje (r = -0,54; p < 0,05) (4 lentelė).

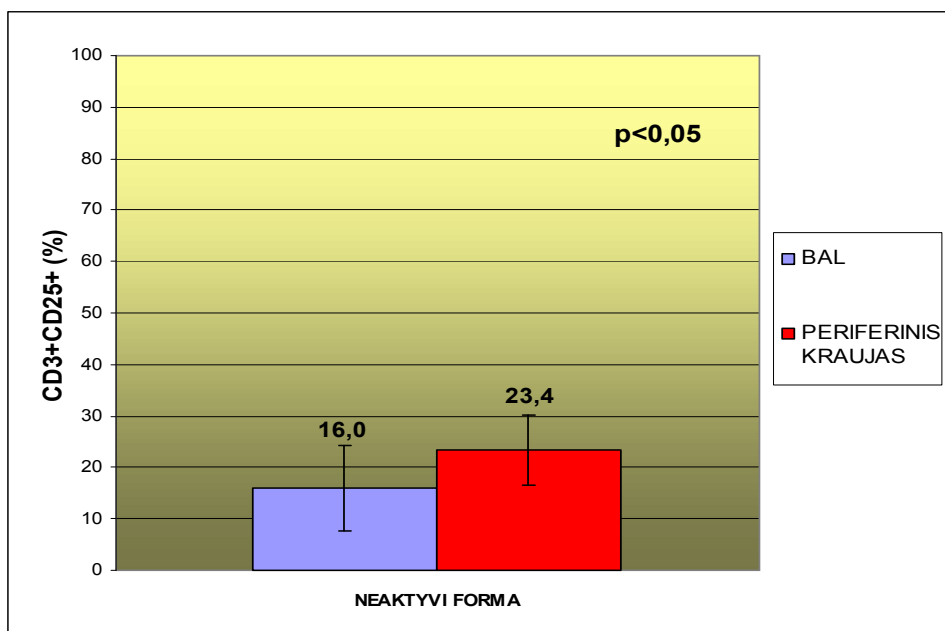


15 pav. CD3+CD25+ ląstelių vidurkių pasikliautinieji intervalai: ■ vidurkis
 I pasikliautinųjų intervalų ribos (standartinė paklaida)

Gauti rezultatai rodo, kad abiejų ligonių grupėse BAL skystyje CD25 receptorių ekspresuojančių limfocitų buvo patikimai mažiau palyginti su periferinio kraujo CD3+CD25+ limfocitais (15, 16, 17 pav.).



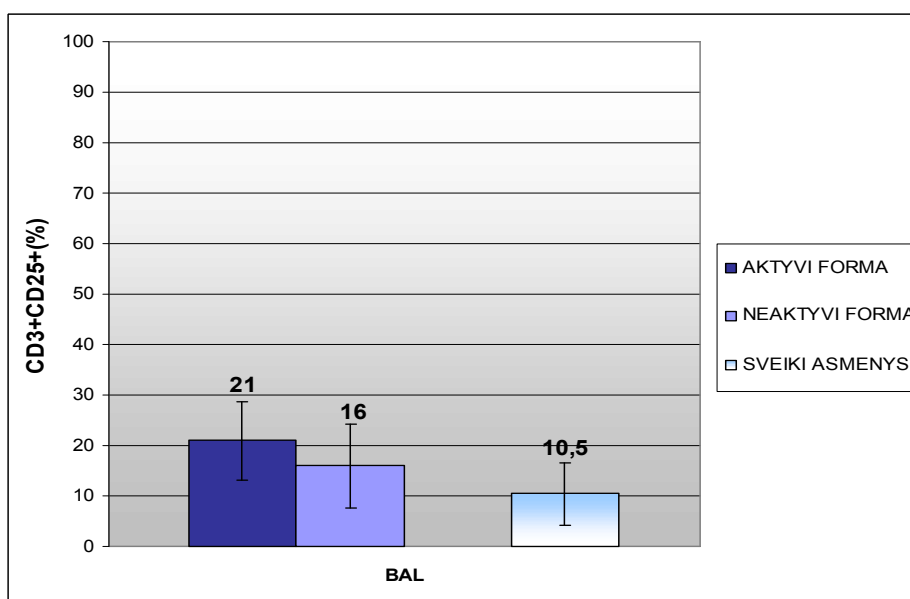
16 pav. Ligonų sergančių aktyvia sarkoidozės forma CD3+CD25+ limfocitų palyginimas BAL skystyje ir periferiniame kraujyje



17 pav. Ligonų sergančių neaktyvia sarkoidozės forma CD3+CD25+ limfocitų palyginimas BAL skystyje ir periferiniame kraujyje

Mūsų tyrimo duomenimis ligonių sergančių aktyvia ligos forma BAL skystyje limfocitų membranų paviršiuje ekspresuojančių IL-2R, buvo daugiau nei ligonių, sergančių neaktyvia ligos forma (18 pav). Tirtų ligonių grupėse nustatėme vidutinio stiprumo neigiamą koreliaciją tarp aktyvios ir neaktyvios sarkoidozės formų CD3+CD25+ ląstelių procento BAL skystyje ($r = -0,65$), tačiau rezultatas buvo statistiškai nepatikimas ($p > 0,05$).

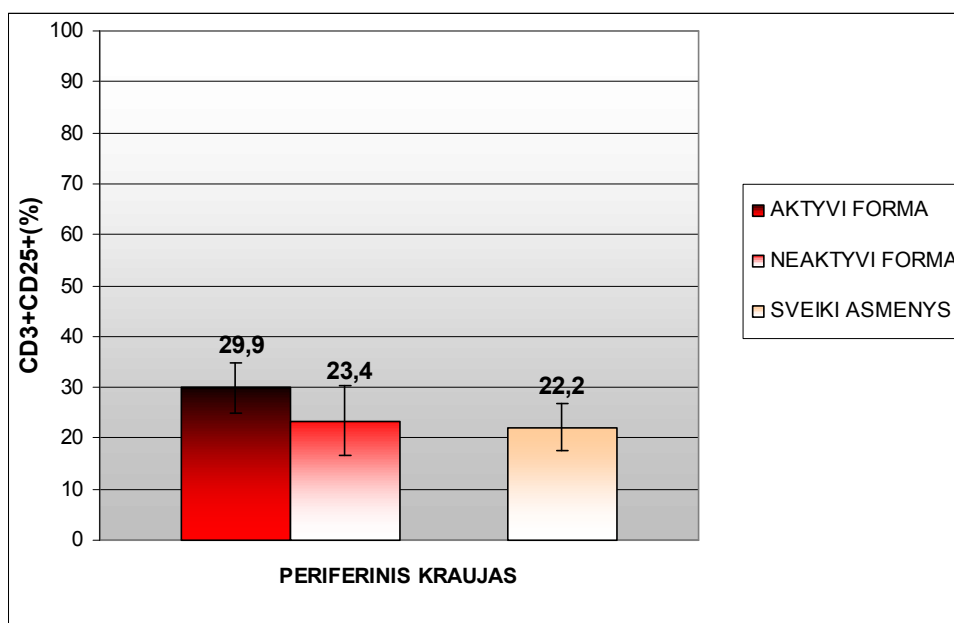
CD3+CD25+ limfocitų procentai BAL skystyje abiejuose ligonių grupėse lyginant su sveikųjų asmenų duomenimis buvo patikimai didesni ($p < 0,05$) (18 pav.).



18 pav. Ligonų sergančių skirtingomis sarkoidozės formomis ir sveikų asmenų CD3+CD25+ limfocitų procento palyginimas BAL skystyje

Nustatyta statistiškai patikima vidutinio stiprumo neigiama koreliacija tarp sergančiųjų aktyvia ligos forma ir sveikų asmenų CD3+CD25+ limfocitų procento kraujyje ($r = -0,47$; $p < 0,05$). Taip pat buvo nustatytas panašus ryšys tarp sergančiųjų neaktyvia sarkoidozės forma ir sveikų žmonių CD3+CD25+ limfocitų kraujyje ($r = -0,49$), tačiau rezultatas buvo statistiškai nepatikimas ($r = -0,49$; $p > 0,05$).

Palyginus periferinio kraujo tyrimo rezultatus paaiškėjo, jog aktyvios ligos formos pacientai turėjo reikšmingai didesnę CD3+CD25+ ląstelių procentą nei pacientai, sergantys neaktyvia sarkoidozės forma (19 pav.).



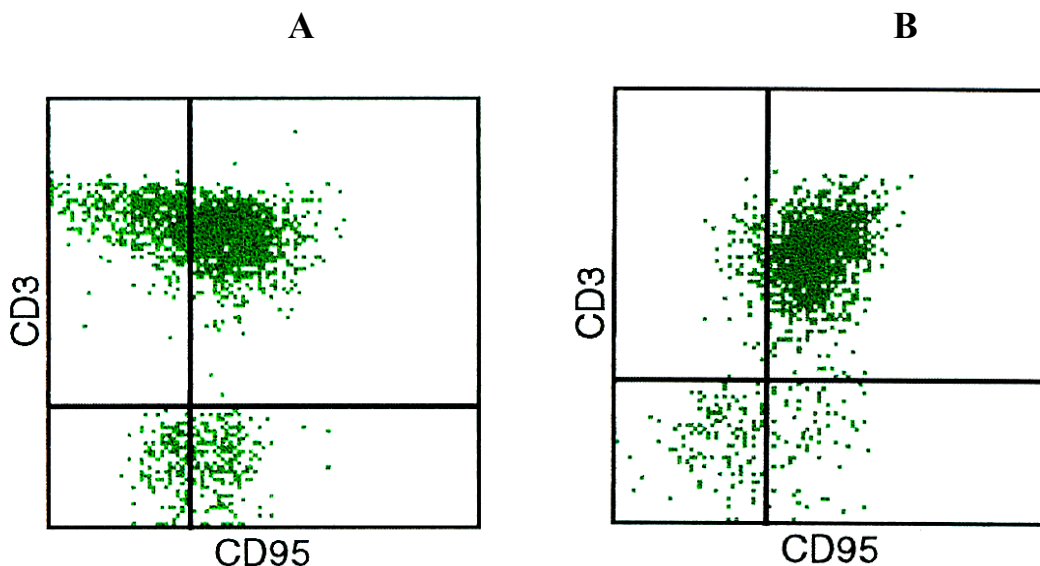
19 pav. Ligonų sergančių sarkoidoze ir sveikų asmenų CD3+CD25+ limfocitų procento palyginimas periferiniame kraujyje.

3.2. SERGANČIŲJŲ SARKOIDOZE APOPTOZĖS INICIJAVIMO RECEPTORIŲ (CD95) EKSPRESUOJANČIŲ LIMFOCITŲ ANALIZĖ BAL SKYSTYJE IR PERIFERINIAME KRAUJYJE

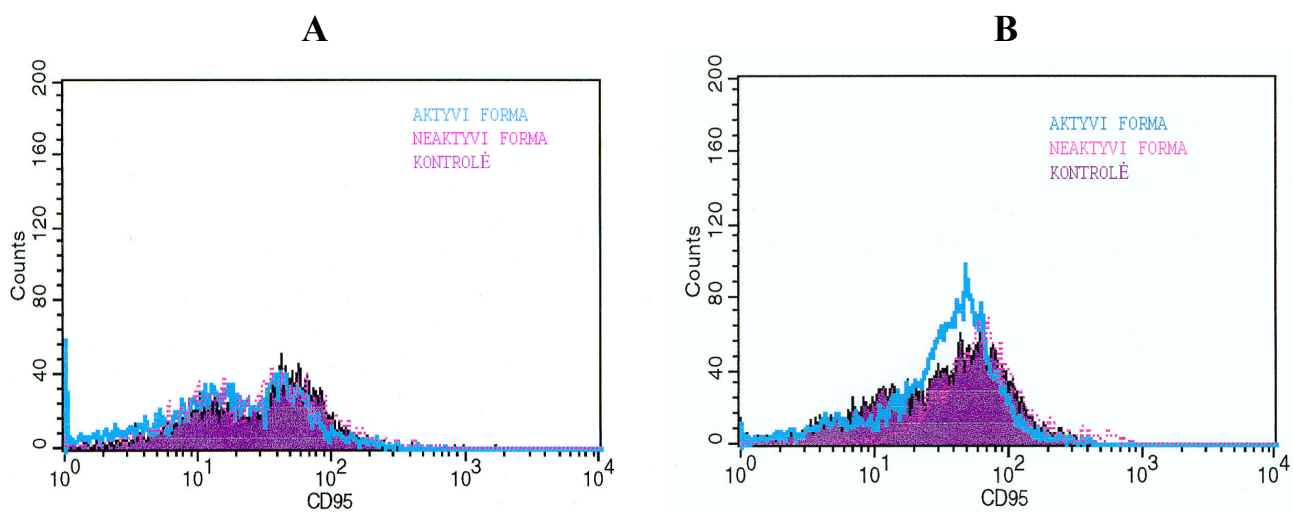
Siekiant įvertinti sergančiųjų sarkoidoze apoptozės inicijavimo receptoriaus ekspresiją T limfocitų membranose lokaliame ir sisteminiame imuniniame atsake, atlikome BAL skysčio ir periferinio kraujo limfocitų analizę, nustatant procentiškai kuri dalis dominančios populiacijos turi CD95 žymenį.

20 paveiksle pateiktas ligonių, sergančių plaučių sarkoidoze, apoptozės inicijavimo receptoriaus vaizdas taškinėse diagramose. Pateiktose diagramose matome, kad CD3+CD95+ limfocitų skaičius kraujyje ir BAL skystyje skiriasi.

Histogramų vaizdas pateiktas 21 paveiksle, kuriame matyti, kad mūsų tirtose grupėse CD3+CD95+ limfocitų procentas BAL skystyje ir kraujyje yra skirtingas.

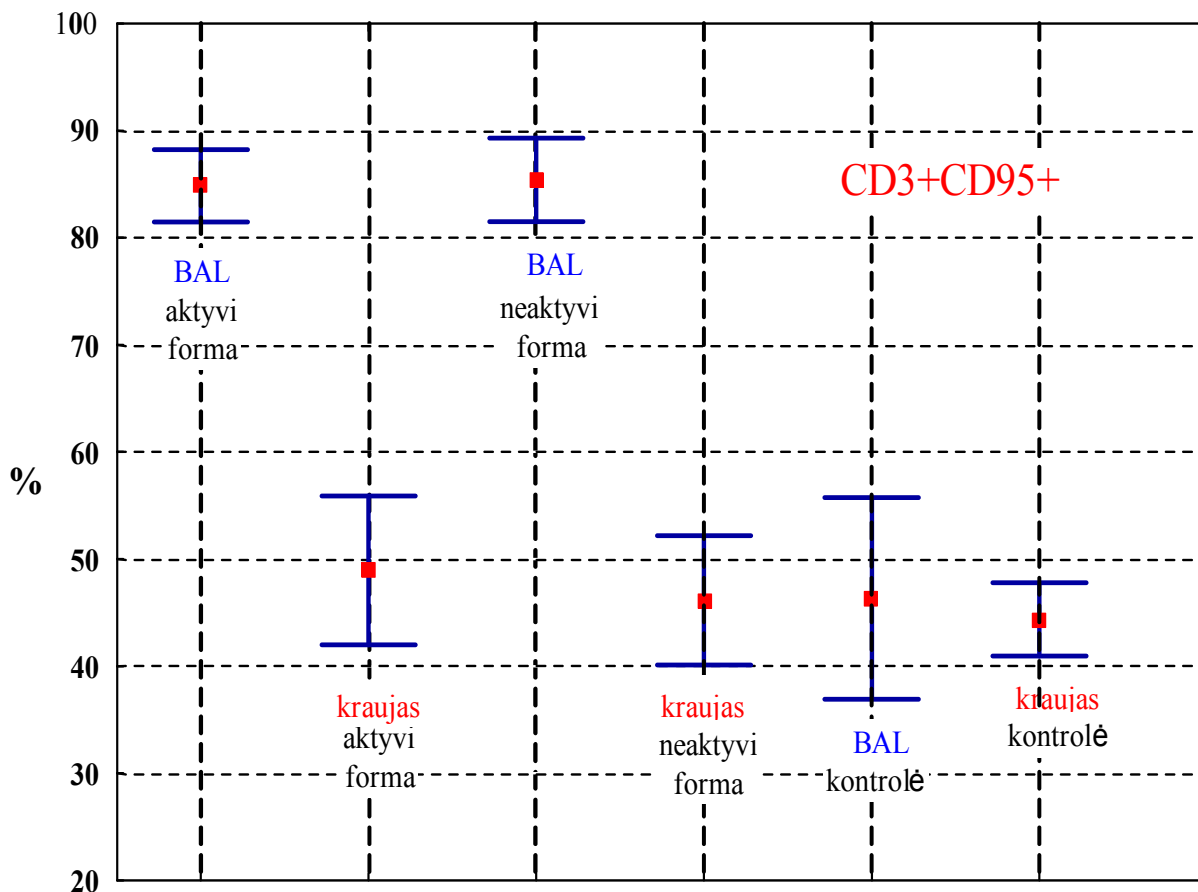


20 pav. Sarkoidoze sergančiųjų, CD3+CD95+ limfocitų vaizdai taškinėse diagramose (Q2 kvadrate): **A** – periferinio kraujo mėginiuose; **B** – BAL skysčio mėginiuose.



21 pav. Sergančiųjų skirtingomis sarkoidozės formomis ir kontrolinės grupės CD3+CD95+ limfocitų histogramų vaizdas: **A** – periferiniame kraujyje; **B** – BAL skystyje.

Sergančiųjų sarkoidoze ir kontrolinės grupės sveikųjų asmenų limfocitų, ekspresuojančių apoptozės inicijavimo receptorių statistinė analizė BAL skystyje ir periferiniame kraujyje pateikta 5 lentelėje. CD3+CD95+ limfocitų vidurkių pasikliautiniai intervalai pateikti 22 paveiksle.

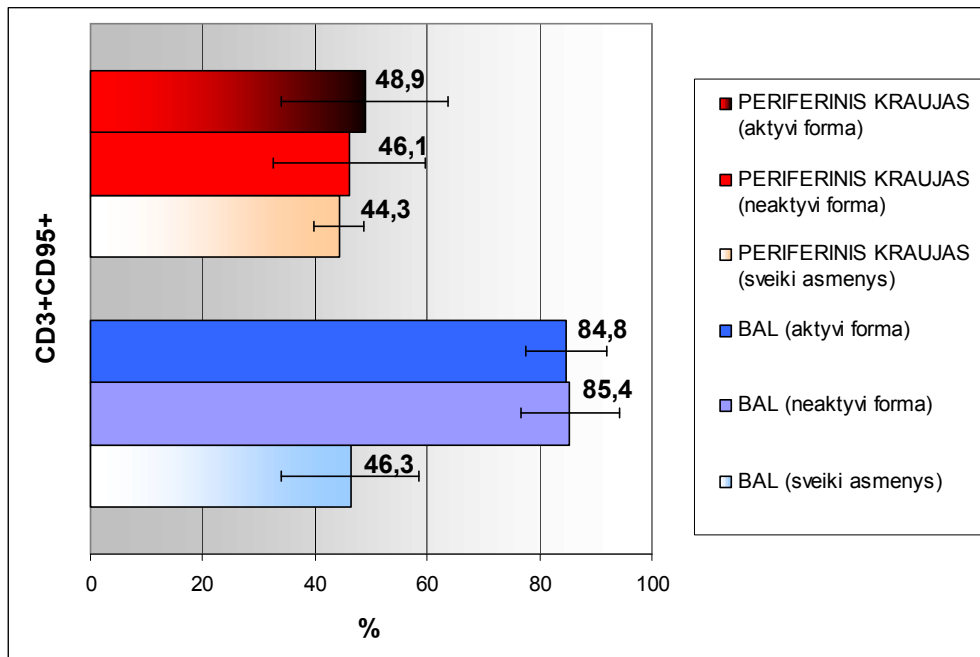


22 pav. CD95+3+ limfocitų vidurkių pasikliautiniai intervalai: ■ vidurkis
 I pasikliautinių intervalų ribos (standartine paklaida)

5 lentelė. Sergančiųjų sarkoidoze ir kontrolinės grupės CD3+CD95+ (%) charakteristika

Tiriamieji	CD3+CD95+(%)			
	BAL	Periferinis kraujas	p	r
Aktyvi forma (n = 20)	84,8 ± 7,2	48,9 ± 14,8	p < 0,05	r = 0,51
Neaktyvi forma (n = 22)	85,4 ± 8,8	46,1 ± 13,6	p < 0,05	r = 0,53
Kontrolė (n = 5)	46,3 ± 12,2	44,3 ± 4,4	p > 0,05	r = 0,44

Nagrinėjant apoptozės receptorių ekspresuojančių limfocitų nuošimtį pasirodė, kad ligonių, sergančių tiek aktyvia tiek neaktyvia plaučių sarkoidozės forma buvo reikšmingai didesnis CD3+CD95+ ląstelių procentas BAL skystyje nei periferiniame kraujyje lyginant su sveikųjų mėginiais. Negavome didelio skirtumo, lyginant tarpusavyje sveikų asmenų BAL skysčio ir kraujo ląstelių nuošimčius, savo membranose turinčius CD95 receptorių (22, 23 pav.) (5 lentelė).

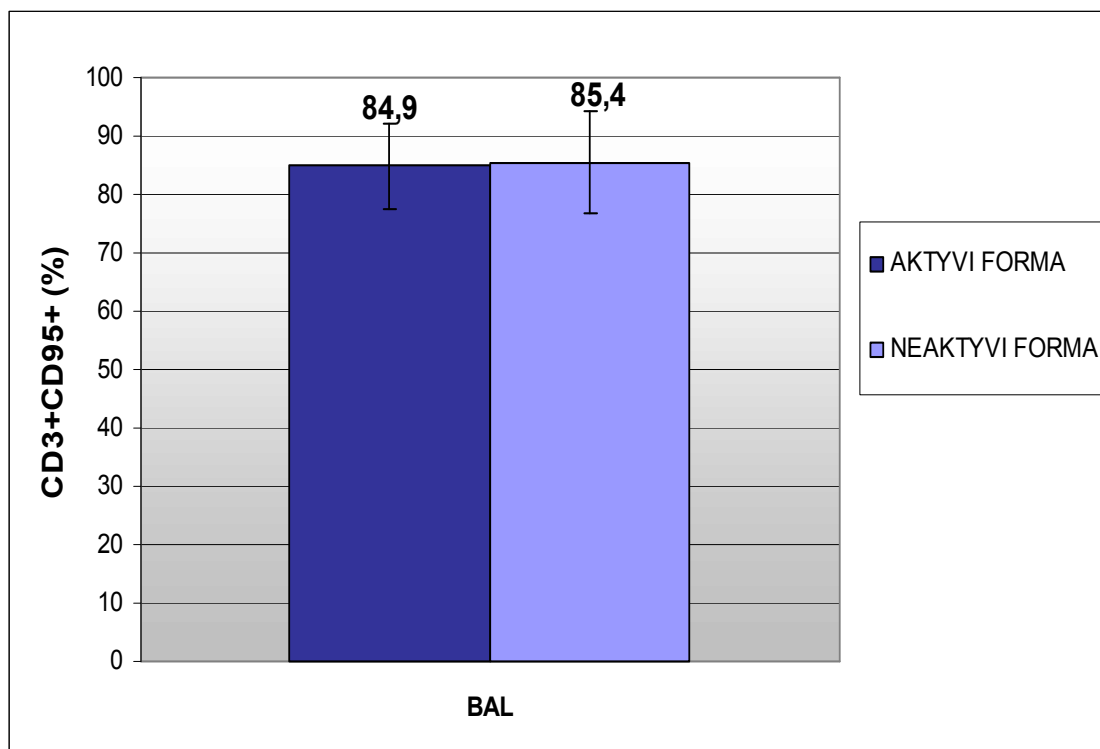


23 pav. Ligonų sergančių sarkoidoze ir sveikų asmenų CD3+ CD95+ limfocitų palyginimas BAL skystyje ir periferiniame kraujyje

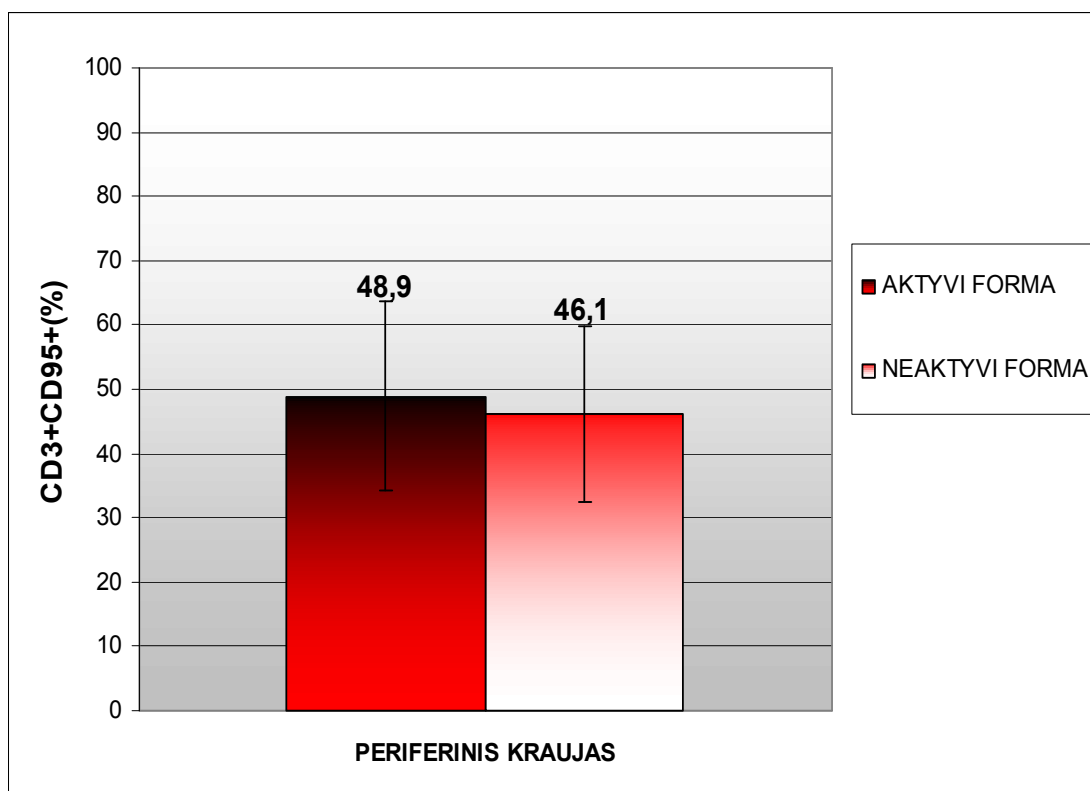
Mūsų tirtų ligonių, sergančių aktyvia sarkoidozės forma, grupėje nustatėme statistiškai patikimą vidutinio stiprumo teigiamą koreliaciją tarp CD3+CD95+ limfocitų BAL skystyje ir kraujyje ($r = 0,51$). Nustatytas panašus ryšys ir sergančiųjų neaktyvia ligos forma, grupėje ($r = 0,53$; $p < 0,05$) (5 lentelė).

Gauti rezultatai rodo, kad abiejose ligonių grupėse BAL skysčio CD3+CD95+ limfocitų buvo reikšmingai daugiau nei sveikų asmenų mėginiuose ($p < 0,05$), tačiau periferinio kraujo duomenys (sergančiųjų ir sveikų) reikšmingai nesiskyrė ($p > 0,05$) (23 pav.).

Palyginome, sergančiųjų aktyvia bei neaktyvia sarkoidozės forma, BAL skysčio ir periferinio kraujo T limfocitus savo paviršiuje ekspresuojančius CD95 molekules. Nustatėme, kad statistikai patikimai šios ligonių grupės nesiskyrė (24 pav.) (25 pav.).



24 pav. Ligonių, sergančių skirtingomis sarkoidozės formomis, CD3+CD95+ limfocitų palyginimas BAL skystyje



25 pav. Ligonių, sergančių skirtingomis sarkoidozės formomis, CD3+CD95+ limfocitų palyginimas periferiniame kraujyje

4. REZULTATŲ APITARIMAS

Yra žinoma, jog sarkoidozė yra daugiasisteminė imuninė liga, pasižyminti T limfocitų susikaupimu plaučiuose ir kituose organuose, audinių pakenkimu ir granulomų susidarymu. Tačiau iki šiol yra sunku paaiškinti kodėl liga kartais pasireiškia ūmiai, kartais pereina į lėtinę formą, o kartais progresuoja išvešant fibroziniam audiniui dėl ko sutrinka organo funkcija. Tačiau dažniausiai ligos eiga būna besimptomė ir praeina be liekamųjų reiškinių.

Literatūroje nurodoma, kad sergant sarkoidoze, pasireiškia sisteminio ir lokalaus imuninio atsako sutrikimas. Daugelis autorių tvirtina, kad BAL skysčio imunokompetentinių ląstelių kiekybiniai ir funkciniai rodikliai, esant įvairioms sarkoidozės formoms gali skirtis [13, 72, 74]. Todėl mūsų tiriamieji buvo suskirstyti į dvi grupes: sergantys aktyvia ir neaktyvia ligos formomis.

Mūsų tirtų ligonių BAL skysčio limfocitų fenotipas buvo T (CD3+) limfocitai, būtent helperiai / induktoriai (CD3+CD4+), kurių procentas abiejose sergančiųjų grupėse buvo ženkliai didesnis nei sveikųjų. Todėl CD4+/CD8+ santykis ženkliai padidėjo palyginus su sveikų asmenų santykiu. Gauti duomenys patvirtino sarkoidozės metu sukeltą T limfocitų helperių alveolitą.

T limfocitai bei monocitai yra pagrindinės imuninės sistemos ląstelės, kurių išskiriamos biologiškai aktyvios medžiagos, ypač citokinai, veikia daugelį imuninės sistemos grandžių. Šiuo atveju pagrindinį reguliuojantį vaidmenį atlieka T limfocitai helperiai / induktoriai (CD3+CD4+), kurie pagal išskiriamus citokinus skirstomi į Th1 ir Th2 [3]. Yra nustatyta, jog sergant sarkoidoze, ypač reikšminga darniai funkcionuojanti ląstelinė imuninės sistemos grandis yra Th1 limfocitai [77]. Antigenų aktyvinti Th1 išskiria IFN γ , IL2, NNF β , kurių svarba ląsteliniam imuniniam atsakui yra aprašyta 1.1.4. skyriuje.

Šio tyrimo metu sergančiųjų BAL skystyje rastas padidėjęs T limfocitų (CD3+CD4+) skaičius galėtų reikšti ir jų funkcijos sutrikimą visose grandyse. Gauti duomenys patvirtino daugelio autorių akcentuojama T limfocitų vaidmenį šios ligos patogenezėje [9, 21, 45, 62, 77].

Nuodugniam plaučių T limfocitų, ypač Th1 funkcijai įvertinti būtina atkreipti dėmesį ne tik į limfocitų populiacijų kiekybines charakteristikas, bet ir į kitus šių ląstelių veiklos mechanizmus, pavyzdžiui, į išskiriamus citokinus. Teigiama, kad fiziologiniuose homeostazės mechanizmuose yra svarbūs daugelis citokinių, ypač IL2 ir IFN γ [71].

Yra nustatyta, kad sarkoidoze sergančiųjų plaučiuose dauguma T limfocitų yra atminties (CD45RO+) limfocitai, savo membranų paviršiuje turintys ir IL-2R [6, 46, 77].

Aktyvinti antigeno plaučių Th1 limfocitai gausiai produkuoja citokiną IL-2, kurio dėka plaučiuose padidėja tam tikro klonu T limfocitų populiacija. Teigiama, kad T limfocitai savo membranų paviršiuje gali turėti IL-2 receptoriaus tris skirtingas subvienetų grandis: α (CD25),

β (CD122) ir γ (CD132) [69]. Kai kurie autoriai pastebėjo, kad sergančių sarkoidoze T limfocitai ekspresuoja didesnę procentą IL-2 receptoriaus alfa ir beta grandinių tiek BAL skystyje tiek periferiniame kraujyje palyginus su sveikųjų asmenų limfocitais [47]. Tačiau kita mokslininkų grupė pažymi, kad ligonių sergančių plaučių sarkoidoze lokalus ir sisteminis T limfocitų atsakas yra skirtingas [59]. Buvo nustatyta, kad sveikų asmenų periferiniame kraujyje IL-2 koncentracija yra didesnė nei BAL skystyje, o sergančių neaktyvia sarkoidozės forma BAL skystyje padidėja IL-2 koncentracija ir, kaip daugelis autorių teigia, tai gali turėti lemiamą reikšmę ligos prognozėje [21].

Analizuodami skirtingomis sarkoidozės formomis sergančių ligonių CD25 receptoriaus ekspresiją T limfocitų membranose tiek lokaliame tiek sisteminame imuniniame atsake, nustatėme, kad mūsų tirtų ligonių IL-2R α grandį (CD25) ekspresuojančių limfocitų procentas BAL skystyje buvo patikimai didesnis nei sveikų asmenų. Pateikti rezultatai sutapo su kitų mokslininkų duomenimis, patvirtinančiais, kad IL-2 veikia kaip lokalus T ląstelių, infiltruojančių plaučių audinius, augimo faktorius. Tačiau vertindami rezultatus pastebėjome, kad sergančiųjų aktyvia sarkoidozės forma periferiniame kraujyje CD3+CD25+ limfocitų taip pat buvo patikimai daugiau nei sveikų žmonių kraujyje, nors neaktyvia forma sergančiųjų šių limfocitų nuošimtis statistiškai reikšmingai nuo sveikųjų nesiskyrė.

Lygindami tarpusavyje aktyvia ir neaktyvia ligos formos, nustatėme, kad ligonių sergančių aktyvia forma ir BAL skystyje ir periferiniame kraujyje CD3+CD25+ limfocitų buvo daugiau nei ligonių, sergančių neaktyvia forma.

Paskutinių metų moksliniai tyrimai parodė, kad sarkoidozės metu formuojantis granulomoms ir vykstant uždegimui reikšminga ne vien aktyvintų ląstelių proliferacija, bet ir jų programuota mirtis [59, 71]. Yra nustatyta, kad plaučių homeostazei palaikyti būtina pusiausvyra tarp apoptozės ir uždegiminių ląstelių išgyvenamumo [43]. Atlikta nemažai įvairių mokslinių tyrimų nagrinėjančių apoptozės mechanizmą, tačiau iki šiol yra mažai žinoma apie T limfocitų likimą plaučiuose [41, 43, 71]. Kai kurie autoriai pastebėjo, kad ligonių sergančių sarkoidoze bronchoalveolinėje terpėje aktyvesnė limfocitų proliferacija ir apoptozė [27, 59]. Manoma, kad nepilnavertės T limfocitų apoptozės pasekmė plaučių sarkoidozės atveju yra granulomų formavimasis ir lėtinio uždegimo vystymasis [71]. Kai kurie mokslininkai pažymi, kad sergančiųjų sarkoidoze in vitro kultūroje T limfocitų, turinčių apoptozinius žymenis, procentas BAL skystyje yra didesnis nei kraujyje, lyginant su sveikųjų grupe [27].

Nagrinėdami apoptozės inicijavimo receptoriaus ekspresiją T limfocitų paviršiuje lokaliame ir sisteminame imuniniame atsake nustatėme, kad ligonių sergančių tiek aktyvia tiek neaktyvia plaučių sarkoidozės forma BAL skysčio CD3+CD95+ limfocitų procentas BAL skystyje buvo patikimai didesnis nei periferiniame kraujyje. Abiejuose ligonių grupėse rastas

reikšmingai didesnis CD95 receptorių ekspresuojančių limfocitų procentas BAL skystyje nei sveikų asmenų mėginiuose.

Lygindami sergančiųjų grupes tarpusavyje nustatėme, kad nei BAL skystyje nei periferiniame kraujyje statistikai reikšmingai ligonių grupės nesiskiria. Todėl limfocitų, ekspresuojančių apoptozės receptorių, tyrimas BAL skystyje ir kraujyje neleidžia diferencijuoti aktyvios ir neaktyvios sarkoidozės formų.

Nors darbo rezultatai rodo, kad sergančiųjų plaučių sarkoidoze BAL skysčio T limfocitai pasižymi padidinta apoptozės receptoriaus ekspresija, tačiau dar nėra aišku ar tai yra pakankamas signalas, kad būtų paleistas pilnavertis apoptozės mechanizmas. Galima manyti, kad egzistuoja ir slopinantys apoptozę veiksniai, kurie ir pailgina T limfocitų išgyvenamumą plaučiuose.

Signalas, patenkantis į T limfocitus per receptorių, suaktyvina limfocitus ir sukelia jų proliferaciją, tačiau kai kada ir jų apoptozę. Šis signalas gali būti perduodamas veikiant receptorių antigenų, superantigenų, mitogeniniu lektinu ir t.t. Tokiais atvejais T limfocitų apoptozė indukuojama, kai trūksta kai kurių augimo faktorių – pirmiausiai IL-2 [5, 38]. Tyrimo metu atkreipėme dėmesį į tai, kad sergančiųjų sarkoidoze BAL skysčio T limfocitai pasižymi padidinta IL-2R ekspresija, vadinasi sergančiųjų sarkoidoze plaučiuose nėra šio citokino trūkumo, kad vyktų apoptozė.

Nustatyta, kad ląstelėje yra baltymų, skatinančių arba slopinančių apoptozę. Daguma jų koduojama *Bcl-2* šeimos genų (1.2.1.2. skyrius). Imuninėje sistemoje su geno *bcl-2* ekspresija siejamas ląstelių atsparumo apoptozei lygis [31, 42]. Atminties ląstelėse (CD45RO+) *Bcl-2* baltymo ekspresija trunka daug ilgiau nei naiviųjų T limfocitų, todėl šių ląstelių išgyvenimo trukmė gali būti ilgesnė. Ypač stabili *Bcl-2* ekspresija atminties ląstelėse yra tada, kai jas periodiškai veikia specifinis antigenas [33, 58].

Naujausi tyrimai parodė, kad BAL skysčio limfocitai ir makrofagai pacientų sergančiųjų sarkoidoze pasižymi padidinta antiapoptozinio *Bcl-2* baltymo ekspresija [52]. Todėl galima manyti, jog sergančiųjų sarkoidoze plaučių T limfocitai gali būti atsparūs apoptozei, ir tai gali turėti įtakos uždegiminių ląstelių kaupimuisi plaučiuose bei granulomų susidarymui [52].

Taigi programuota ląstelių mirtis yra sudėtingas, įvairialypis ir svarbus sarkoidozės patogenezėje veiksnys, kurio reikšmė ir mechanizmai vis dar tyrinėjami. Mūsų darbo gauti rezultatai taip pat skatina tęsti tyrimus.

IŠVADOS

- 1.** Ligonų, sergančių plaučių sarkoidoze, apoptozės inicijavimo receptoriaus (CD95) ekspresija T limfocitų membranose reikšmingai didesnė BAL skystyje nei periferiniame kraujyje.
- 2.** Ligonų, sergančių tiek aktyvia tiek neaktyvia sarkoidozės forma, BAL skysčio CD3+CD95+ limfocitų procentas patikimai didesnis nei sveikų savanorių BAL skystyje. Tačiau CD95 receptoriaus ekspresija lyginant sergančiųjų grupes tarpusavyje nei BAL skystyje nei periferiniame kraujyje statistikai nesiskiria. Todėl limfocitų, ekspresuojančių apoptozės receptorių, tyrimas BAL skystyje ir kraujyje neleidžia diferencijuoti aktyvios ir neaktyvios sarkoidozės formų.
- 3.** Sarkoidoze sergančių IL-2R (CD25) ekspresuojančių limfocitų procentas BAL skystyje patikimai mažesnis nei periferiniame kraujyje.
- 4.** Sergančiųjų grupėse CD25 ekspresuojančių limfocitų procentas sisteminiame ir lokaliame imuniniame atsake yra patikimai didesnis nei sveikų asmenų. Aktyvia sarkoidozės forma sergančių pacientų tiek BAL skystyje tiek periferiniame kraujyje CD3+CD25+ limfocitų procentas yra didesnis nei sergančiųjų neaktyvia ligos forma.

SUMMARY

The investigation of T-lymphocytes proliferation receptors and apoptosis initiative receptors in bronchoalveolar lavage fluid and peripheral blood of patients with lung sarcoidosis

Sarcoidosis is a chronic granulomatous lung disease of unknown origin. The accumulation of activated CD4⁺ T cells at sites of inflammation represents an early stage in granuloma formation. Antigenic presentation stimulates T cells to proliferate via the production of interleukin IL-2. In the last few years evidence has arisen for dysregulation of apoptosis in a number of different pulmonary diseases. Mechanisms governing the normal resolution of inflammatory processes are poorly understood. CD95, also known as Fas antigen, has the ability to activate the cellular death program „apoptosis“, which can be critical for limiting an inflammatory response.

This study aimed to investigate the apoptotic and proliferating markers of lung and peripheral blood T-lymphocytes.

MATERIAL. The investigation material was gathered in Vilnius University hospital „Santariškių klinikos“ in the Immunological laboratory. 45 patients with sarcoidosis (the average age was 38,8±10,5 years) were investigated. The patients were divided into two groups: the ones having an active form of sarcoidosis (n=20) and the others non-active form of sarcoidosis (n=22). In addition, 5 healthy volunteers participated in the investigation. Lymphocyte analysis was performed using flow cytometric method.

RESULTS. The percentage of lymphocytes expressing IL-2 receptor α chain (CD25) in patients with sarcoidosis (active form (21,0±7,7%) and non-active form (16,0±8,2%)) in BAL fluid is higher ($p<0,05$) compared with healthy controls (10,5±6,2%). The percentage of CD3+CD25⁺ lymphocytes in blood of patients with sarcoidosis of active form was significantly higher than in the blood of healthy controls (29,9±4,9% versus 22,2±4,7%). During the investigation of the expression of apoptosis initiative receptor (CD95) on the T-lymphocytes we observed that the percentage of CD3+CD95⁺ lymphocytes in BAL fluid was significantly higher than in peripheral blood ($p<0,05$) when comparing sarcoidic patients with active and non-active forms and healthy controls. In both patients' groups (active form 84,8±7,2%; non-active form 85,4±8,8%) there were more BAL fluid CD3+CD95⁺ lymphocytes ($p<0,05$) than in BAL fluid samples of healthy controls (46,3±12,2%).

CONCLUSIONS. Our results shows that BAL fluid lymphocytes seem to be resistant to apoptosis and it might contribute to the accumulation of inflammatory cells in the lungs, persistence of inflammation, and the development and maintenance of granuloma.

PADĖKA

Nuoširdžiai norėčiau padėkoti:

- Vilniaus Universiteto Medicinos fakulteto dekanei profesorei Zitai Aušrelei Kučinskienei už suteiktą galimybę studijuoti magistratūroje;
- Darbo vadovei dr. Laimutei Jurgauskienei už vadovavimą ir perteiktas žinias, už vertingas pastabas ir įvertinimą, už pagalbą atliekant tyrimus ir rašant šį darbą;
- VUL „Santariškių klinikos“ Klinikinės imunologijos laboratorijos darbuotojoms, ypač Teresei Brazevič už pasidalinimą patirtimi ir pagalbą atliekant tyrimus;
- Dr. Edvardui Danilai už bendradarbiavimą ir niekada nepasakiusiam „ne“ atliekant bronchoalveolinio lavažo tyrimą sveikiems savanoriams;
- Doc. Nijolei Janulevičiūtei už pertektas žinias imunologijos srytyje;
- Dr. Loretai Bagdonaitei ir kitiems VU dėstytojams už vertingas pastabas ir perteiktas žinias studijuojant magistratūroje.

LITERATŪRA

1. Abastado J.P. Apoptosis: function and regulation of cell death. *Res. Immunol.* 1996;147:443-456.
2. Abbas A.K., Lichtman A.H., Rober J.S. *Cellular and Molecular Immunology*. Fourth Edition. W.B.Saunders Company 2000.
3. Adomaitienė D., Janulevičiūtė N., Kazakevičius R., Vaičiuvėnas V. Klinikinės imunologijos įvadas. *Kaunas „Šviesa“* 2001:40-46, 161, 173-175.
4. Agostini C., Chilosi M., Zambelo R., Trentin L., Semenzato G. Pulmonary immune cells in health and disease: lymphocytes. *Eur. Respir. J.* 1993;6:1378-1401.
5. Ashkenazi A., Dixit V. Death receptor: signalling and modulation. *Science* 1998;281:1305.
6. Bradley J. Granulomatous diseases in *Clinical Immunology* edited by Bradley J. and McClusce J Oxford University Press 1997:189-193.
7. Bingisser R., Stey C., Weller M., Groscurth P., Russi E., Frei K. Apoptosis in human alveolar macrophages is induced by endotoxin and is modulated by cytokines. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996;15(1):64-70.
8. Costabel U., Danel C., Halsam P., Higgenbottam T., Klech H., et al. Technical recommendations and guidelines for bronchoalveolar lavage (BAL). *Eur. Respir. J.* 1989;2:561-585
9. Costabel U. Sarcoidosis: clinical update. *Eur. Respir. J.* 2001;18:Suppl.32: 56-68.
10. Cotran R.S., Kumar V., Collins T. *Cellular pathology I: Cell injury and cell death* Robbins Pathologic Basis of Disease. 6 ed. W.B.Saunders Co 1999:1-29.
11. Čėkanavičius V., Murauskas G. Statistika ir jos taikymai. I/II. *TEV.*, 2001/2002:240-268.
12. Dai H., Guzman J., Costabel U. Increased expression of apoptosis signalling receptors by alveolar macrophages in sarcoidosis. *Eur. Respir. J.* 1999;13:1451-1454.

13. Danila E., Jurgauskienė L., Malickaitė R., Nargėla R., Avižienienė M., Aleksonienė R., Šatkauskas B. Bronchoalveolinio lavažo reikšmė sarkoidozės diagnostikai. *Vaikų pulmonologija ir alergologija* 2002;5:3:1812-1816.
14. Darmon A.J. Activation of the apoptotic protease CPP32 by cytotoxic T cell-derived granzyme B. *Nature* 1995;377:446-448.
15. De Paoli P., Reitano M., Battistin S. et al. Enumeration of human lymphocyte subsets by monoclonal antibodies and flow cytometry: a comparative study using whole blood or mononuclear cells separated by density gradient centrifugation. *J. Immunol. Methods* 1984;72:349-353.
16. Demedts M., Wells A.U., Anto J.M., et al. Interstitial lung diseases: an epidemiological overview. *Eur. Respir. J* 2001;18:5-16.
17. Domagala-Kulawik J., Droszcz P., Kraszewska I., Chazan R. Expression of Fas antigen in the cells from bronchoalveolar lavage fluid (BALF). *Folia Histochem. Cytobiol.* 2000;38(4):185-188.
18. Eguchi Y., Shimizu S., Tsujimoto Y. Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. *Cancer, Res* 1997;57:1835-1840.
19. Eklund A., Grunewald J. Sarcoidosis in European Respiratory Monograph Olivieri D., du Bois R.M. *Interstitial Lung Diseases* 2000;5:96-106.
20. Fireman E., Topilsky I., Greif J. et al. Induced sputum compared to bronchoalveolar lavage for evaluating patients with sarcoidosis and non-granulomatous interstitial lung disease. *Respir. Med.* 1999;93:827-834.
21. Garlepp M.J., Rose A.H., Dench J.E., Robinson B.W. Clonal analysis of lung and blood T cells in patients with sarcoidosis. *Thorax* 1994;49(6):577-585.

22. Grasl-Kraupp B., Ruttkai-Nedecky B., Koudelka H. et al. In situ detection of fragmented DNA (TUNEL Assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autoiytic cell death: cautionary note. *Hepatology* 1995;21:1465-1468.
23. Grunewaid J., Eklund A. Studies of T lymphocytes in pursuit of sarcoidosis antigens. *Lakartidningen* 2002;99(36):3508-3513.
24. Harbeck R.J. Immunophenotyping of bronchoalveolar lavage lymphocytes. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. 1998;5(3):271-277.
25. Harrington E.A., Fanidi A., Evan G.I. Oncogenes and cell death. *Current opinion in genetics and development*. 1994;4:120-129.
26. Hengartner M.O. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000;407:770-776.
27. Herry I., Bonay M., Bouchonnet F., Schuller MP., Lecossier D., Tazi A., Lynch DH., Hance AJ. Extensive apoptosis of lung T-lymphocytes maintained in vitro. *Am.J.Respir. Cell Mol. Biol.* 1996;15(3):339-347.
28. Hunninghake G., Costabel U. Statement on sarcoidosis. *Am. J.Respir. Crit. Care Med.* 1999;160:736-755.
29. Isler P., Nicod L.P. Effect of lipopolysaccharide and superantigens on T cell activation on lung makrophages and dendritic cells. *Respir. J.* 2000;10(70):1636-1640.
30. Yamaguchi E., Itoh A., Furuya K., Hizawa N., Ohnuma N., Kodama N., Kojima J., Kawakami Y. Reduced expression of T-cell antigen receptor by alveolar T-cells. *Eur. Respir. J.* 1999;13:814-819.
31. Yamaguschi A., Maehara M., Goi T. et al. Bcl-2 protein expression in breast cancer and its relationship to prognosis. *Intern. J. Oncol.* 1997;10:381-384.
32. Yasuda M., Umemura S., Osamura R.Y., et al. Apoptosis cell in the human endometrium and placental villi: pitfalls in apply-ing the TUNEL method. *Arch. Histol. Cytol.* 1995;58:185-190.

33. Jarilin A.A. Apoptoz. Priroda fenomena i jego rolj v celostnom organizme. Patologičeskaja fiziologija i eksperimentalnaja terapija 1998;2:38-48 (Rusų k.).
34. Jurgauskienė L., Malickaitė R., Danila E., Tamošiūnas V., Ligonis, sergančių plaučių sarkoidoze, limfocitų fenotipas bronchoalveolinio lavažo skystyje. Laboratorinė medicina 2001;2(10):17-22.
35. Jurgauskienė L., Malickaitė R. Bronchoalveolinio lavažo skysčio tyrimas. Laboratorinė medicina 1999;4:31-33.
36. Kagi D., Ledermann B., Burki K. et al. Molecular mechanisms of lymphocyte-mediated cytotoxicity and their role in immunological protection and pathogenesis in vivo. Annu. Rev. Immunol. 1996;14:207-232.
37. Kastan M.B., Onyekwere O., Sidransky D., et al. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. Can. Res. 1991;51:6304-6311.
38. Kazakevičius V-R., Ročka V., Janulevičiūtė N. Apoptozė. Laboratorinė medicina 2000;1(5):43-49.
39. Kockx M.M., Muhring J., Bortier H. et al. Biotin or digoxigenin-conjugated nucleotides bind to matrix vesicles in atherosclerotic plaques. Am. J. Pathol. 1996;148:1771-1777.
40. Koepke A.J., et al. Clinical Hematology. 2 ed. Philadelphia: Lippincott 1998.
41. Krammer P.H. CD95 deadly mission in the immune system. Nature 2000;407:700-706.
42. Kroemer G., Reed J. Mitochondrial control of cell death. Nat. Med. 2000;6:513-519.
43. Krueger A., Fas SC., Baumann S., Krammer PH. The role of CD95 in the regulation of peripheral T-cell apoptosis. Immunol. Rev. 2003;193:58-69.
44. Kruse A., Patterson C. Tissue culture methods and applications. New York 1973.

45. Kunitake R., Kuwano K., Miyazaki H., Hagimoto N., Nomoto Y., Hara N. Apoptosis in the course of granulomatous inflammation in pulmonary sarcoidosis. *Eur. Respir. J.* 1999;13:1329-1337.
46. Kunisawa A., Kawanishi Y., Tago H., Nagate A., Kasuga J., Ohyashiki K. Direct demonstration of the productive capability of cytokines at the single cell level in lung sarcoidosis using multicolor cytometry. *Respiration* 2002;69(2):155-164.
47. Koktysz M., Kieszko R., Dmoszynska A., Milanowski J., Rolinski J. Expression of IL-2 receptor in peripheral blood lymphocytes and bronchoalveolar lavage fluid (BAL) in patients with sarcoidosis. *Pol. Arch. Med. Wewn.* 1998;99(1):9-14.
48. Lee R.G., Foerster J., et al. *Wintrobe's Clinical Hematology*. 10 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins 1999;2:1996-2002.
49. Lipscomb M.F., Izzo A., Wilder J.A., Lovchik J.A., Lyons C.R. Factors regulating effective T-cell immunity in the lung. *Eur. Respir. Rev.* 2000;10:70:103-107.
50. Majno G., Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am. J. Pathol.* 1995;146:3-15.
51. Martin S., Vallette F. Apoptosis and pathologies of the central nervous system. *Neurochirurgie* 2000;46:370-375.
52. Mermigkis C., Polychronopoulos V., Mermigkis D., Tsakanika K., Heretis M., Karagianidis N., Bouros D. Overexpression of Bcl-2 Protein in Bronchoalveolar Lavage Lymphocytes and Macrophages in Sarcoidosis. *Respiration* 2005.
53. Miyara M., Amoura Z., Parizot C., Badoual C. et al. The immune paradox of sarcoidosis and regulatory T cells. *Rockefeller University Press JEM* 2006;203(2):359-370.
54. Mildažienė V., Jarmalaitė S., Daugelavičius R. *Laštelės biologija*. Kaunas 2004:277-290.
55. Morgenbesser S.D., Williams B.O., Jacks T., Depinho R.A. p53 dependent apoptosis produced by rb deficiency in the developing mouse lens. *Nature* 1994;371:72-74.

56. Morey S.S. American Thoracic Society issues consensus statement on sarcoidosis. *Am. Fam. Physician* 2000;61(2):553-554.
57. Oltvai Z.N., Milžiman C.L., Korsmeyer S.J. Bcl-2 heterodimerizes *in vivo* with a conserved homolog, bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993;74:609-619.
58. Osborne B. Apoptosis and the maintenance of homeostasis in the immune system. *Curr. Opin. Immunol.* 1996;8:245-254.
59. Pabst R., Schister M., Tschernig T. Lymphocyte dynamics in the pulmonary microenvironment: implication for the pathophysiology of pulmonary sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc. Diffuse Lung Dis.* 1999;16(2):197-202.
60. Pietinalho A., Ohmichi M., Lofroos A.B., Hiraga Y., Selroos O. The prognosis of pulmonary sarcoidosis in Finland and Hokkaido, Japan. A comparative five year study of biopsy-proven cases. *Sarcoidosis Vasculitis and Diffuse Lung Diseases* 2000;17:158-166.
61. Poulter L.W., Rossi G.A., Bjermen L., Costabel U., Israel-Biet D., Klech H., Pohl W., Semenzato G. The value of bronchoalveolar lavage in the diagnosis and prognosis of sarcoidosis. *Eur. Respir. J.* 1992;2:8:75-82.
62. Prasse A., Georges C.G., Biller H., Hamm H., Matthys H., Luttmann W., Virchow J.C. Th1 cytokine pattern in sarcoidosis is expressed by bronchoalveolar CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *Clin. Exp. Immunol.* 2000;122(2):241-248.
63. Quernheim J.M. Sarcoidosis: immunopathogenetic concepts and their clinical application. *Eur. Respir. J.* 1998;12:716-738.
64. Roitt J., Brostoff J., Male D. *Immunology* 2000:485-486.
65. Romeu M.A. et al. Lymphocyte immunophenotyping by flow cytometry in normal adults: comparison of fresh whole blood lysis procedure, Ficoll-Paque separation and cryopreservation. *J Immunol Methods* 1992;154:7-10.

66. Рунион Р. Справочник по непараметрической статистике. Москва. Финансы и статистика 1982:51-52.
67. Sabaliauskienė J. Reumatologinės sarkoidozės išraiškos. Sveikata 2005:33-35.
68. Степнов М. Н. Статистические методы обработки результатов механических испытаний. Москва. Машиностроение 1985:230-231.
69. Semenzato G., Adami F., Maschio N., Agostini C. Immune mechanisms in interstitial lung diseases. Allergy 2000;55(12):1103-1120.
70. Shikuwa C., Kadota J., Mukae H., Iwashita T., Kaida H., Ishii H., Ishimatsu Y., Kohno S. High concentrations of soluble Fas ligand in bronchoalveolar lavage fluid of patients with pulmonary sarcoidosis. Thorax 2002;57(10):897-901.
71. Spinozzi F. Apoptosis, T Cells and airway inflammation. Annual Congress. What is the role of apoptosis in lung biology? European Respiratory Society 2001:25-28.
72. Stridh H., Planck A., Eklund A., Grunewald J. Apoptosis resistant bronchoalveolar lavage (BAL) fluid lymphocytes in sarcoidosis. Thorax 2002;57:897-901.
73. Šatkauskas B., Danila E. Diseminuotos plaučių ligos. Klinikinė pulmonologija 2001:205-222.
74. Šatkauskas B., Danila E. Klinikinė pulmonologija. Vilnius 2004:237-248.
75. Thompson C.B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. Science 1995;267:1456-1462.
76. Till J.E., McCulloch E.A. Direct measurement of radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. Radiat. Res. 1961;14:213.
77. Wahlstrom J., Berlin M., Skold C.M., Wigzell H., Eklund A., Grunewald 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.

78. Wahlstrom J., Katchar K., Wigzell H., Olerup O., Eklund A., Grunevald J. Analysis of Intracellular cytokines in CD4+ and CD8+ Lung and Blood T cells in Sarcoidosis. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 2001;163:115-121.
79. Wijasman J.H., Jonker R.R., Keijzer R., et al. A new method to detect apoptosis in paraffin sections: in situ end-labeling of fragmented DNA. *J. Histochem Cytochem* 1993;41:7-12.
80. Zissel G., Quernheim J.M. Sarcoidosis: historical perspective and immunopathogenesis (part 1). *Respir. Med.* 1998;92:126-139.
81. Žiugžda A., Bakšys J. Kvėpavimo organų ligos. 1990:201-203.