

Wydział Lekarski
Collegium Medicum
Uniwersytetu Jagiellońskiego

E w a C Z A R N O B I L S K A

Charakterystyka komórek przestrzeni oskrzelowo-pęcherzykowej w sarkoidozie płuc

(Praca doktorska)

Bibl. Medyczna CM UJ



1816095538

Promotor: Prof.dr hab.med. Zbigniew CHŁAP

Praca została wykonana w Zakładzie Patofizjologii Klinicznej
Międzywydziałowej Katedry Patofizjologii Collegium Medicum UJ
w Krakowie

Kierownik Katedry: Prof.dr hab.med. Zbigniew CHŁAP

Kraków 1993

Mojemu Promotorowi

Panu Prof.dr hab. Zbigniewowi CHŁAPOWI

składam serdeczne podziękowania za

inspirację do badań i stałą opiekę

w czasie ich wykonywania

S P I S T R E Ś C I

	strona
I. Wstęp	4
II. Cel pracy	14
III. Materiał i metody	15
IV. Wyniki badań	26
V. Dyskusja i omówienie wyników.....	47
VI. Wnioski	65
VII. Streszczenie	68
VIII. Piśmiennictwo	72

W S T Ę P

Sarkoidoza jest przewlekłą wielonarządową chorobą o nieznannej etiologii, charakteryzująca się występowaniem swoistej ziarniny i wzmożoną odpornością komórkową w narządach zmienionych chorobowo. Definicja ta przyjęta na IX Konferencji poświęconej sarkoidozie w Wiedniu w 1986 r. podkreśla znaczenie odczynów immunologicznych występujących w przebiegu sarkoidozy. Procesy te wydają się bowiem odgrywać zasadniczą rolę w jej patogenezie (37, 77, 89, 105). Odnośnie umiejscowienia zmian stwierdza się, iż w układzie oddechowym występują one u około 90% chorych, a u 10 - 20% z tej grupy obserwuje się postępującą niewydolność oddechową spowodowaną zwłóknieniem tkanki płucnej (30, 59, 105, 152).

Sarkoidoza jest chorobą ludzi młodych i w średnim wieku. Częstość jej występowania wykazuje dużą zmienność od 0,2 do 80/100 tys. ludności. Rejestrowana częstość sarkoidozy w Polsce wynosi 10/100 tys. osób. Uważa się, że sarkoidoza nie jest związana z zawodem, pićią czy rasą (19, 26, 51, 80, 124).

Do cech charakterystycznych morfologicznie dla sarkoidozy należy tworzenie się nieserowaciejących ziarniaków zbudowanych z komórek nabłonkowatych, wielojądraztych komórek olbrzymich typu Langhansa otoczonych naciekami z limfocytów, monocytów i proliferujących fibroblastów

(60, 85, 125).

Należy podkreślić, że do powstania podobnej histologicznie tkanki ziarninowej może dojść także w następujących przypadkach: 1) po wprowadzeniu do organizmu cząstek nieorganicznych np. krzemu, berylu, 2) po zetknięciu się ustroju z niecałkowicie zdegradowanym antygenem np. prątkiem kwasoopornym, 3) jeśli zaburzeniu ulegnie proces fagocytozy i nie dochodzi do pełnej degradacji cząstek organicznych, 4) gdy pojawia się w organizmie trudno rozpuszczalne duże kompleksy antygen-przeciwciało (52, 68). Wspólną istotną cechą w mechanizmie powstania ziarniniaków jest długotrwały czas ekspozycji na powyżej wymienione czynniki (60, 105, 109).

Pierwszy przypadek sarkoidozy opisał w 1864 r. Jonathan Hutchinson, chirurg i dermatolog w Kings College w Londynie. Francuz Ernest Besnier podał pierwsze spostrzeżenie dotyczące tocznia odmrozinowego, a 8 lat później Norweg Caesar Beck opisał przypadek sarkoidozy skóry, śluzówek nosa i węzłów obwodowych, udokumentowany badaniami histologicznymi. Drugi okres badań nad sarkoidozą został uwieczniony pracami i publikacjami J.Schaumanna ze Szwecji z lat 1914 - 1922. Autor ten udowodnił, że toczeń odmrozinowy Besniera i sarkoid Becka są jedynie różnymi postaciami tej samej choroby. Do 1937 roku sarkoidoza pozostawała prawie wyłącznie domeną zainteresowania dermatologów, kiedy to francuski lekarz L.Poutrie wyodrębnił postacie sarkoidalnych zmian rozsianych w płucach, uważane uprzednio

za rozsiewy gruźlicze. On także nadał sarkoidozie nazwę choroby Besmiera-Becka-Schaumanna (BBS) (59, 105).

Od tej pory datują się liczne badania nad etiologią sarkoidozy płucnej. Najczęściej wysuwana hipoteza jest jej rzekomy związek z zakażeniem atypowymi prątkami gruźliczymi, infekcją wirusową, grzybiczą czy inhalacją pyłkami drzew iglastych, głównie sosny (60). Żadna z nich jednak nie uzyskała pełnego potwierdzenia.

W ostatnich latach znaczny postęp w zrozumieniu patogenezы zmian sarkoidalnych oraz poszerzenie możliwości diagnostycznych i prognostycznych w sarkoidozie płucnej nastąpił dzięki wprowadzeniu metody płukania oskrzelowo-pęcherzykowego (Broncho-Alveolar-Lavage - BAL). Metoda ta pozwala na uzyskiwanie materiału z przestrzeni oskrzelowo-pęcherzykowej płuc zawierającego zarówno komórki jak i substancje przez nie wydzielane (26, 35, 42, 105, 136). Początkowo płukanie było stosowane raczej ze wskazań terapeutycznych: zwłaszcza w astmie, proteinozie pęcherzykowej czy w mukowiscydozie. Szersze zastosowanie płukania wiąże się z wprowadzeniem przez L.Ikedę w 1967 r. giętkiego bronchofiberoskopu. Pierwszym, który zastosował płukanie w praktyce był R.Sackner. Wkrótce wykazano, że BAL jest badaniem bezpiecznym, a więc powtarzalnym i bardzo pomocnym w diagnostyce wielu schorzeń śródmiąższowych płuc, w tym również sarkoidozy (26, 47, 144, 151). W 1970 r. R.Sackner, G. Hunninghake i R.Crystal określili skład komórek odczynowych przestrzeni oskrzelowo-pęcherzykowej u zdrowych ochotników. Zasadnicza

populacja komórkowa w płucach oskrzelowo-pęcherzykowych u ludzi zdrowych są makrofagi (powyżej 85%), następnie limfocyty (poniżej 5%), neutrofile (poniżej 3%) i komórki tłuszczne (poniżej 0,5%) (124).

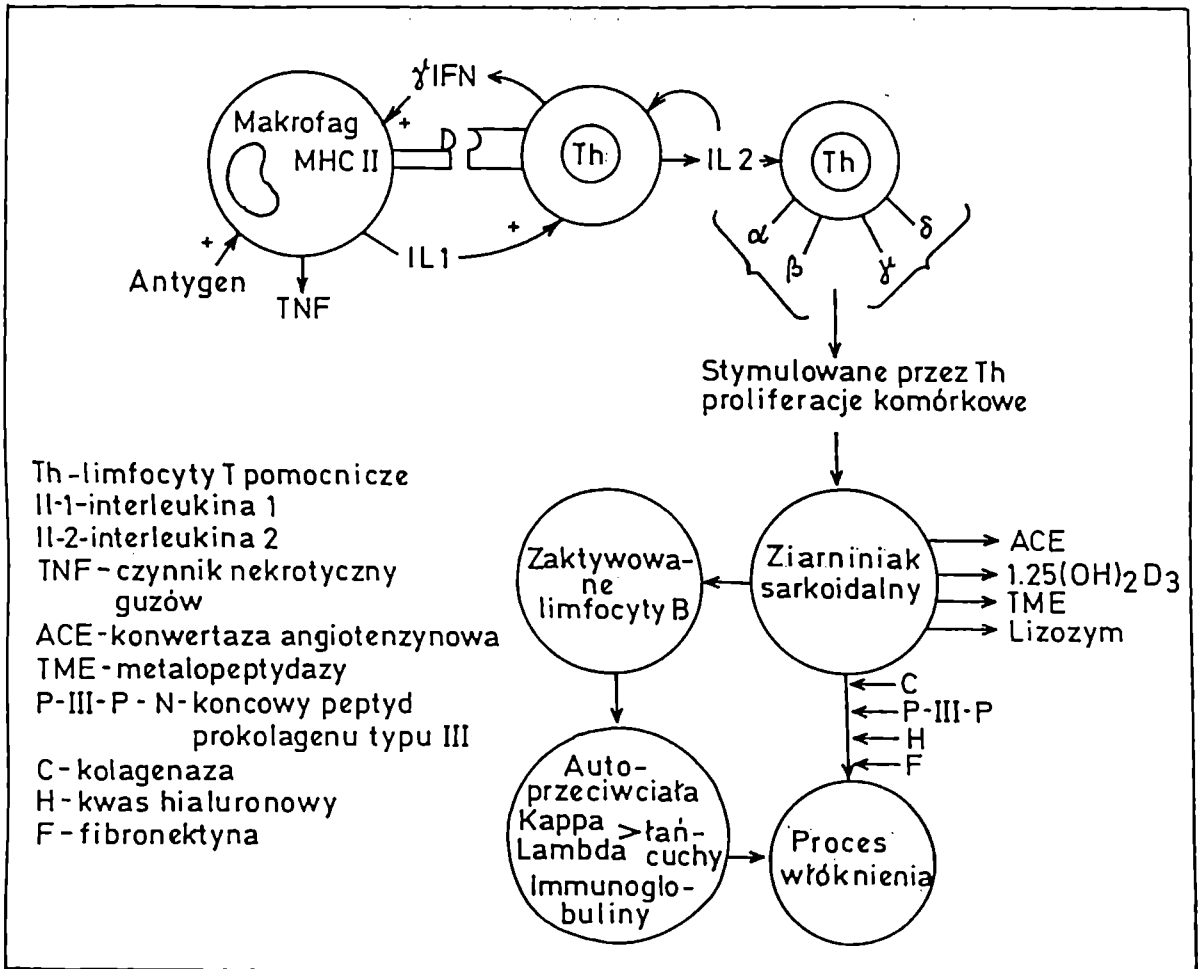
Istotny rozwój wiedzy o sarkoidozie nastąpił w ostatnich latach dzięki zastosowaniu przeciwciał monoklonalnych oraz metod immunoenzymatycznych i cytofluorometrii przepływowej. Umożliwiły one dokładną ocenę subpopulacji komórek odczynowych uzyskanych za pomocą metody BAL, ekspresji receptorów na ich powierzchni, a także analizę licznych, aktywnych substancji przez nie wydzielanych.

Mimo setek prac pojawiających się w rocznych zbiorach literatury światowej, z sarkoidozą wiążą się problemy dotyczące etiopatogenezy, diagnostyki, prognozowania i leczenia (69, 121, 123).

Najbardziej przekonującą teorią tłumaczącą patomechanizm tworzenia się ziarniny sarkoidalnej jest aktywacja płucnych limfocytów T-pomocniczych (CD_4) zależna od lokalnej przewlekłej stymulacji antygenowej (16, 45, 48, 60, 105, 111, 134, 150). Limfocyty T wytwarzają interleukinę 2 (Il-2) 2 - 4-krotnie ponad normalne ilości, wykazują obecność transkryptu Il-2-mRNA, natomiast limfocyty T we krwi u tych chorych nie posiadają tej właściwości. Wśród komórek T wykazano obecność subpopulacji limfocytów T gamma-delta, która wydaje się prawdopodobnie odgrywać rolę w tworzeniu ziarniny sarkoidalnej (Ryc. 1 wg Jamesa) (46, 50, 55, 60, 133).

U chorych na sarkoidozę wytworzenie ziarniniaków

Ryc.1



Mechanizm tworzenia ziarniniaka sarkoidalnego : zależności pomiędzy makroflagami, limfocytami T i B oraz cytokinami (modyf. wg James)

poprzedza zawsze zapalenie pęcherzyków płucnych (96, 105, 124). Uważa się, że zmiany w populacjach komórek przestrzeni oskrzelowo-pęcherzykowej pozwalają wykryć wczesne stadium sarkoidozy i odzwierciedlają patologiczne procesy toczące się w tkance płucnej. Nie ma jednak swoistej cechy tych zaburzeń, która byłaby diagnostyczna dla sarkoidozy (110, 134). Większość autorów uważa, że podwyższony stosunek limfocytów T-pomocniczych do T-supresorowych ($CD_4/CD_8 > 3,5$) z równoczesną wysoką T-limfocytozą w popłuczynach oskrzelowo-pęcherzkowych jest najbardziej charakterystyczną cechą sarkoidozy (38, 72, 111), aczkolwiek opisywane są również przypadki z przewagą limfocytów T-supresorowych (116).

Według du Bois makrofagi pęcherzykowe (AM) w sarkoidozie różnią się od normalnych składem błony komórkowej, co wykazano przy udziale przeciwciał monoklonalnych RFD₁ (3, 15, 134). Poulter i wsp. (111) w sarkoidalnym zapaleniu pęcherzyków płuc wyróżniają 3 populacje makrofagów: z fenotypem RFD₇ - charakterystycznym dla komórek efektorowych, RFD₁ - charakterystycznym dla komórki prezentującej antygen oraz makrofagów z podwójnym fenotypem RFD₁ i RFD₇, które oddziałują supresyjnie na limfocyty T. Zmiany w populacjach tych makrofagów są wyrazem aktywności choroby (15, 111, 133).

W ostatnich latach ukazało się wiele prac na temat markerów cytologicznych i biochemicznych w tzw. aktywnej postaci sarkoidozy (95, 98, 99, 103, 104, 106, 107). Ustalenie

rozpoznania tej fazy choroby miałyby istotne znaczenie dla jej leczenia i prognozowania. W aktywnym okresie choroby wzrasta znacznie ogólna liczba komórek odczynowych przestrzeni oskrzelowo-pęcherzykowej z charakterystyczną wysoką limfocytozą, w tym przewagę stanowią limfocyty T-pomocnicze, a zatem rośnie również stosunek CD_4/CD_8 , który 10-krotnie przewyższa wartości u ludzi zdrowych (10, 11, 38, 72, 74, 105, 109, 124, 127, 131, 135, 145). Zwiększa się również aktywność limfocytów T-pomocniczych zwłaszcza w zakresie wydzielania takich mediatorów jak: Il-2, czynnik chemotaktyczny dla monocytów (MCF), czynnik hamujący migrację makrofagów, gamma-interferon (IFN-gamma), czynnik wzrostu komórek B (BCGF) oraz czynnik różnicowania komórek B (BCDF) (105, 112, 113). Pod wpływem dwóch ostatnich czynników dochodzi do poliklonalnej aktywacji komórek B i zwiększonego wytwarzania przez nie immunoglobulin.

Również makrofagi pęcherzykowe wykazują znaczny stopień aktywacji, czego wyrazem jest wysoka liczba subpopulacji makrofagów z antygenem RFD_1 (3, 134). Według Spiteri'ego zwiększona proporcja makrofagów RFD_1/RFD_7 w aktywnej sarkoidozie może być rezultatem zwiększonej ekspresji dla antygeny RFD_1 na makrofagach, które wykazują równoczesną ekspresję dla antygeny RFD_7 (111, 133). Haslam i wsp. (54) stwierdzili zwiększoną ekspresję dla antygenów HLA-DQ, HLA-DP oraz receptorów dla transferyny i Il-2 na makrofagach pęcherzykowych w aktywnej sarkoidozie (53, 54, 95). Wielu autorów podkreśla zwiększoną zdolność makrofagów

do wydzielania szeregu mediatorów, a głównie interleukiny-1 (IL-1), interleukiny-6 (IL-6) oraz czynnika nekrotycznego guzów (TNF) (8, 29, 44, 53, 58, 62, 64, 90, 100, 108, 114, 126, 127, 137). Du Bois (15) wykazał, że makrofagi pęcherzykowe w sarkoidozie mają zdolność do spontanicznego wydzielania TNF-alfa; do wydzielania IL-1 musiały zostać uprzednio stymulowane. Barth (8) natomiast twierdzi, że w aktywnej sarkoidozie makrofagi pęcherzykowe wydzielają spontanicznie IL-1. Sapatafora (131) oznaczał poziom TNF w płynie z hodowli stymulowanych makrofagów pęcherzykowych i wykazał, że wydzielanie TNF było znacząco wyższe w przypadku makrofagów pęcherzykowych pochodzących od pacjentów z aktywną postacią sarkoidozy (127, 131)). Przepuszczalna rola TNF w patogenezie sarkoidozy, ma polegać na zwiększeniu napływu monocytów z krwi obwodowej do przestrzeni oskrzelowo-pęcherzykowej oraz ułatwieniu przylegania limfocytów do komórek śródbłonka, co zwiększa ich migrację do tkanek. TNF odgrywa również rolę w procesach włóknienia tkanki płucnej (131). Strausz (138) wykazał wzrost produkcji wolnych rodników przez makrofagi pęcherzykowe, który dodatnio korelował z parametrami zapalenia limfocytarnego pęcherzyków. Nielsen (94) podkreśla, że zwiększone uwalnianie rodników tlenowych przez makrofagi pęcherzykowe może być odpowiedzialne za zmiany patologiczne w tkance płucnej (82, 94, 138).

Problem udziału makrofagów pęcherzykowych w procesie włóknienia jest nadal otwarty. Wskazują na to

badania Firemana (41) nie potwierdzające roli makrofagów pęcherzykowych w procesie włóknienia. Wykazał on bowiem, że makrofagi pęcherzykowe pochodzące od pacjentów z sarkoidozą wydzielają czynnik hamujący proliferację fibroblastów pęcherzykowych. Do chwili obecnej nie wiadomo dlaczego tylko u niektórych chorych dochodzi do niekorzystnego przebiegu choroby (69, 113, 146). W tym patologicznym procesie włóknienia makrofagi pęcherzykowe odgrywają niewątpliwie kluczową rolę przede wszystkim przez wydzielanie szeregu substancji odpowiedzialnych za włóknienie, takich jak: Il-1, TNF, fibronektyna, makrofagowy czynnik wzrostu (ADMGF), czynnik stymulujący fibroblasty (FGA) i wiele innych (141, 142). James i Spiteri (134) wykazali, że za proces włóknienia tkanki płucnej w sarkoidozie odpowiedzialne są głównie subpopulacje makrofagów z podwójnym fenotypem RFD₁ i RFD₇. Makrofagi te mają zdolność do wydzielania fibronektyny - czynnika przyciągającego i aktywującego fibroblasty. Również wzrost liczby mastocytów w popłuczynach oskrzelowo-pęcherzykowych uważany jest za niekorzystny wskaźnik procesu włóknienia (43, 69). Wielu autorów uważa, że zwiększony poziom peptydu prokolagenu III (P-III-P), kolagenazy, fibronektyny, kwasu hialurowego oraz obecność mastocytów w popłuczynach oskrzelowo-pęcherzykowych może odgrywać istotną rolę w procesie włóknienia tkanki płucnej w sarkoidozie (73, 78, 79, 131). Odmiennego zdania jest Blaschke i wsp. (14), którzy stwierdzili w grupie chorych na sarkoidozę znamienne zwiększenie stężenia fibronektyny,

kwasy hialurowego, P-III-P oraz albumin (61). Wzrosty tych wartości dodatnio korelowały z aktywnością sarkoidozy, natomiast nie odzwierciedlały rozwoju zwłóknienia. W odniesieniu do neutrofilów stwierdzono dodatnią korelację pomiędzy zwiększoną liczbą neutrofilów w popłuczynach oskrzelowo-pęcherzykowych a cechami zwłóknienia płuc w obrazie radiologicznym i zaburzeniami czynnościowymi układu oddechowego (69, 74, 75, 142, 146). Natomiast limfocytoza pęcherzykowa nawet utrzymująca się przez wiele lat, wydaje się nie mieć wpływu na postęp procesu zwłóknienia (42).

Dalszy podstawowy problem w klinice sarkoidozy płuc stanowi trudność trafnego przewidywania u poszczególnych chorych postępującego charakteru choroby w oparciu o wyniki badań klinicznych, radiologicznych laboratoryjnych i czynnościowych układu oddechowego. Z przeglądu bardzo licznych publikacji dotyczących prognostycznego znaczenia limfocytozy w materiale z popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych nie można wyciągać jednoznacznych wniosków. Baughman i wsp. (9) badając liczne parametry u chorych z różnymi postaciami sarkoidozy stwierdzili, że tylko limfocytoza powyżej 35% może mieć istotne znaczenie w klinicznym prognozowaniu odpowiedzi na leczenie. Z kolei inni autorzy podkreślają, że zasadniczą rolę odgrywa nie tyle ogólna liczba limfocytów, co odsetek limfocytów T-pomocniczych w przestrzeni oskrzelowo-pęcherzykowej (12, 69, 111, 143, 145). Odsetek ten przekraczający 28% wskazuje na znaczne prawdopodobieństwo pogorsze-

nia się choroby. Również w badaniach Baughmana i wsp. (10) większość chorych wykazujących pogorszenie w okresie dwuletniej obserwacji, miało zwiększoną liczbę limfocytów w materiale z popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych, niezależnie od stopnia zaawansowania choroby. Verstraeten (145) uważa, że wysoka liczba limfocytów, a także wzrost stosunku CD_4/CD_8 w materiale z popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych u chorych na sarkoidozę płuc mają odzwierciedlać aktualne nasilenie odczynów zapalnych na poziomie pęcherzyków płuc („alveolitis”). Sądzi jednak, że nie są dobrym wskaźnikiem prognostycznym czy też diagnostycznym, na którym można by opierać decyzję odnośnie leczenia. Klech i wsp. wymieniają te czynniki, które mogą mieć znaczenie w diagnostyce sarkoidozy, tj. podwyższona T-limfocytoza z wysokim stosunkiem CD_4/CD_8 oraz obecność makrofagów z dodatnią ekspresją dla antygenów RFD₁ i RFD₇. Natomiast wzrost poziomu konwertazy angiotenzynowej (AC), P-III-P i kwasu hialuronowego w płynie z popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych nie są według nich specyficznymi markerami (69, 99, 106).

Przegląd powyższego piśmiennictwa wskazuje wyraźnie na duże rozbieżności zarówno w poglądach na etiopatogenezę sarkoidozy jak i na interpretację wyników badań opartych o metodę BAL. Zależy to od wielu czynników, a zwłaszcza od możliwości uzyskania jednorodnych grup badanych chorych oraz od ujawnienia dodatkowych czynników, które mogą modyfikować aktywność i zmieniać skład subpopulacji komórek przestrzeni oskrzelowo-pęcherzykowej.

C E L P R A C Y

Celem pracy jest ocena liczby, proporcji oraz aktywności komórek odczynowych przestrzeni oskrzelowo-pęcherzykowej u chorych w różnych okresach zaawansowania płucnej postaci sarkoidozy. Szczególną uwagę zwrócono na zależność zmian poszczególnych populacji komórek od stadium sarkoidozy oraz dodatkowych czynników takich jak palenie papierosów czy zanieczyszczenie powietrza.

M A T E R I A Ł I M E T O D Y

1. PACJENCI

Badanie popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych (BAL) oraz krwi obwodowej przeprowadzono u 278 chorych hospitalizowanych w II Katedrze Chorób Wewnętrznych AM w Krakowie* oraz w Krakowskim Szpitalu Specjalistycznym im. Jana Pawła II*, z powodu podejrzenia sarkoidozy płuc. Do szczegółowej analizy testów immunocytoologicznych i cytochemicznych wybrano grupę 110 chorych, nie leczonych sterydami i bez dodatkowych infekcji w drogach oddechowych. U tych chorych sarkoidozę płuc rozpoznano na podstawie obrazu rentgenowskiego klatki piersiowej, objawów klinicznych (34, 117), a także badania histologicznego w oparciu o biopsję ściany oskrzela. Rutynowo pobierano od 2-4 wycinków ze ściany oskrzela, a ich ocenę histologiczną przeprowadzano w pracowni cytohistologicznej Zakładu Patofizjologii. Wśród 110 chorych było 64

* Dziękuję Pani Doc.dr hab. Ewie Niżankowskiej, Kierownikowi Kliniki Pulmonologii II Katedry Chorób Wewnętrznych oraz Panu Dr Józefowi Owsieńskiemu, Ordynatorowi I Oddziału Chorób Płuc Krakowskiego Szpitala Specjalistycznego im. Jana Pawła II za umożliwienie mi przeprowadzenia badań.

kobiet i 46 mężczyzn w wieku od 23 do 57 lat. U 50% pacjentów występowały objawy kliniczne, takie jak: rumień guzowaty, odczyn zapalny stawów, duszność, gorączka. Chorych na sarkoidozę płuc podzielono na cztery grupy; w zależności od stadium choroby, rozpoznawanego na podstawie obrazu rentgenowskiego klatki piersiowej (34, 115). W każdej grupie uwzględniono palących oraz niepalących papierosów.

I grupa pacjenci w I stadium sarkoidozy niepalący papierosów (40 osób)

II grupa pacjenci w I stadium sarkoidozy palący papierosy (32 osoby)

III grupa pacjenci w II/III stadium sarkoidozy niepalący papierosów (23 osoby)

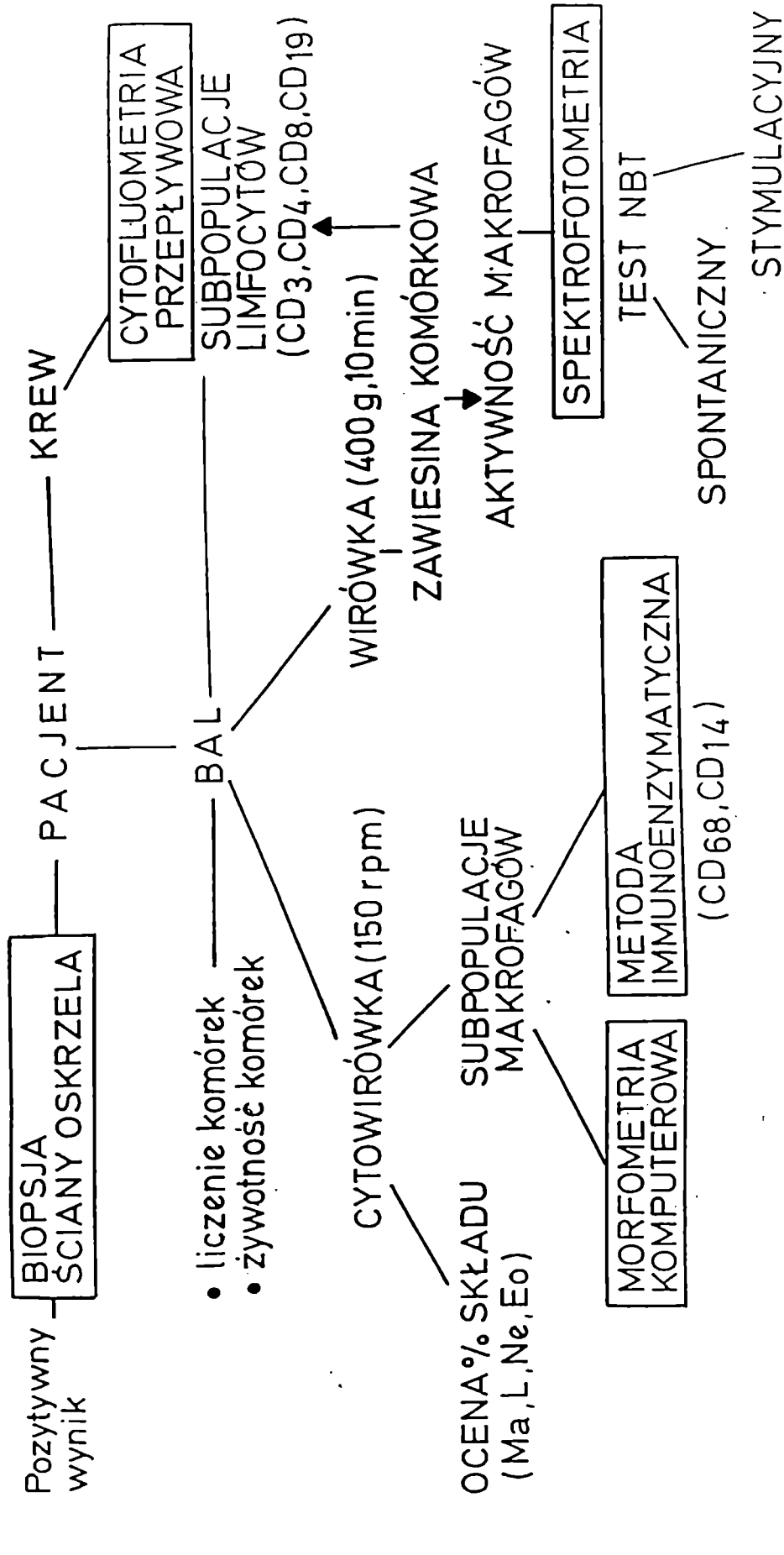
IV grupa pacjenci w II/III stadium sarkoidozy palący papierosy (15 osób)

2. GRUPA KONTROLNA

Stanowiło ją 12 pacjentów ze Szpitala Wojskowego w Krakowie, w wieku 21-24 lat bez objawów patologicznych ze strony układu oddechowego, niepalących papierosów.

Schemat badań komórek przestrzeni oskrzelowo-pęcherzykowej oraz limfocytów krwi obwodowej chorych na sarkoidozę płuc przedstawiono na ryc. 2.

RYC. 2 SCHEMAT BADAŃ BAL i KRWI OBWODOWEJ U PACJENTÓW Z SARKOIDOZĄ PŁUC



3. IZOLACJA KOMÓREK Z POPLUCZYN OSKRZELOWO-PĘCHERZYKOWYCH.

3.1. Popłuczyny oskrzelowo-pęcherzykowe pobierano w znieczuleniu miejscowym 4% keylokainą, przy użyciu giętkiego bronchofiberoskopu, zablokowanego w oskrzeli płatowym lub segmentowym, przez który podawano do przestrzeni oskrzelowo-pęcherzykowej 150-200 ml jałowego 0.9% roztworu chlorku sodu (po odessaniu uzyskiwano 100-150 ml popłuczyn). Materiał otrzymywano w naczyniach szklanych, odpowiednio silikonowanych, aby uniknąć przywierania makrofagów do szkła, w dwóch frakcjach. Zawartość frakcji I (ok.50 ml płynu) stanowiły z reguły elementy komórkowe głównie przestrzeni oskrzelowo-oskrzelikowej, zaś frakcji II (ok.100 ml płynu) popłuczyny głównie oskrzelowo-pęcherzykowe.

3.2. Liczbę bezwzględną komórek w 1 ml popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych określano w komorze Bürkera po podbarwieniu jader komórkowych płynem Türka. Komórki liczone w mikroskopie świetlnym w 50 kwadratach komory. Żywotność komórek badano 0.1% błękitem trypanu; wynosiła powyżej 80%.

3.3. Część popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych z II frakcji (po 200 μ l na preparat) odwirowywano w cytowirówce Shandon "Cytospin 2", (150 r.p.m. 5 min) uzyskując równomiernie rozproszone komórki na szkiełkach podstawowych. Dwa tak otrzymane preparaty barwiono hematoksyliną-eozyną oraz metodą May-Günwald - Giemsa (MGG) (83) i w mikroskopie świetlnym określano proporcje komórek odczynowych przestrzeni oskrzelowo-pęcherzykowej tj. makrofagów, limfocytów, neutrofilów,

eozyneofilów. Dwa następne preparaty utrwalano w acetonie przez 10 min, po czym po zapakowaniu w folie każdego z nich, przechowywano w temperaturze - 40°C (27, 49).

3.4. Połowę objętości II frakcji popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych wirowano (400 g, 10 min), uzyskany osad komórkowy zawieszano w 4ml BSS z 0.1% azydkiem sodu, tak aby w zawieszynie znajdowało się 2×10^6 komórek/ml. Rozdzielano ją do probówek inkubacyjnych po 100 μ l w probówce (38).

3.5. Pozostała połowę II frakcji popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych wirowano (400 g, 10 min), a uzyskany osad komórkowy zawieszano w 4 ml BSS i nawarstwiano na 3 ml limphoprepu. Próbkę wirowano przez 20 min przy obrotach 400g, z granicy faz ściągano warstwę komórek jednojądrzastych (głównie makrofagi), które dwukrotnie płukano w BSS. Po odwirowaniu (400g, 10min) osad komórkowy zawieszano w płynie odżywczym RPMI-1640, komórki liczone w komorze Bürkera, a następnie dodawano taką ilość RPMI, aby w 0.5 ml roztworu znajdowało się 2×10^6 makrofagów. Zawieszinę rozdzielano do probówek inkubacyjnych po 0.5 ml. (40, 74, 76, 84, 97).

4. IZOLACJA LIMFOCYTÓW Z KRWI OBWODOWEJ

Krew żylną pobierano od chorego w ilości: 2ml krwi z dodatkiem 0.2ml 10% EDTA (wersenian sodowy), następnie rozcieńczano dwukrotnie zbuforowanym roztworem soli (BSS). Limfocyty krwi obwodowej izolowano w gradiencie stężeń na limphoprepie (Ficoll-Uropolina) nawarstwiając 4ml krwi na

3 ml limphoprepu. Próbkę wirowano przez 20 min przy obrotach 400 g, z granicy faz ściągano warstwę komórek jednojądrzastych, które zawieszano w BSS i dwukrotnie płukano. Komórki liczone w komorze Bürkera, a następnie dodawano taką ilość BSS z 0.1% azydkiem aby w zawieszynie znajdowało się 2×10^6 komórek/ml. Zawieszinę rozdzielano do próbek inkubacyjnych po 100 μ l w próbkówce (128, 149).

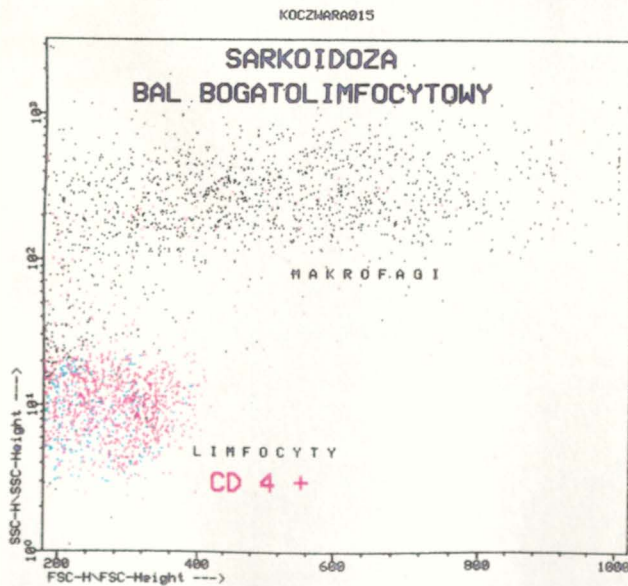
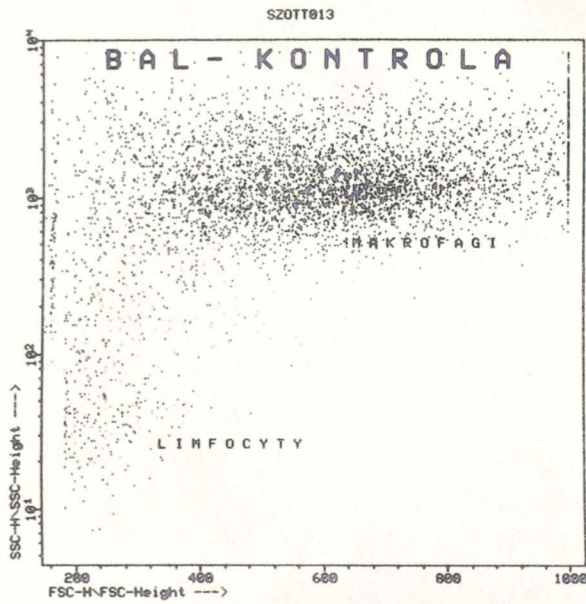
5. OCENA CYTOLOGICZNA POPŁUCZYN OSKRZELOWO-PĘCHERZYKOWYCH (rutynowa)

Skład procentowy komórek odczynowych przestrzeni oskrzelowo-pęcherzykowej liczone na preparatach cytologicznych uzyskanych w cytowirówce "Cytospin 2" po zabarwieniu hematoksyliną-eozyną oraz metoda MGG; w mikroskopie świetlnym liczone od 500 do 1000 komórek w jednym preparacie. Materiał cytologiczny popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych zawierający znaczną domieszkę z górnych dróg oddechowych (liczne komórki nabłonka gruczołowego oskrzeli, oraz płaskiego jamy ustnej), z żywotnością komórek poniżej 80%, nie podlegał analizie immunocytologicznej i cytochemicznej.

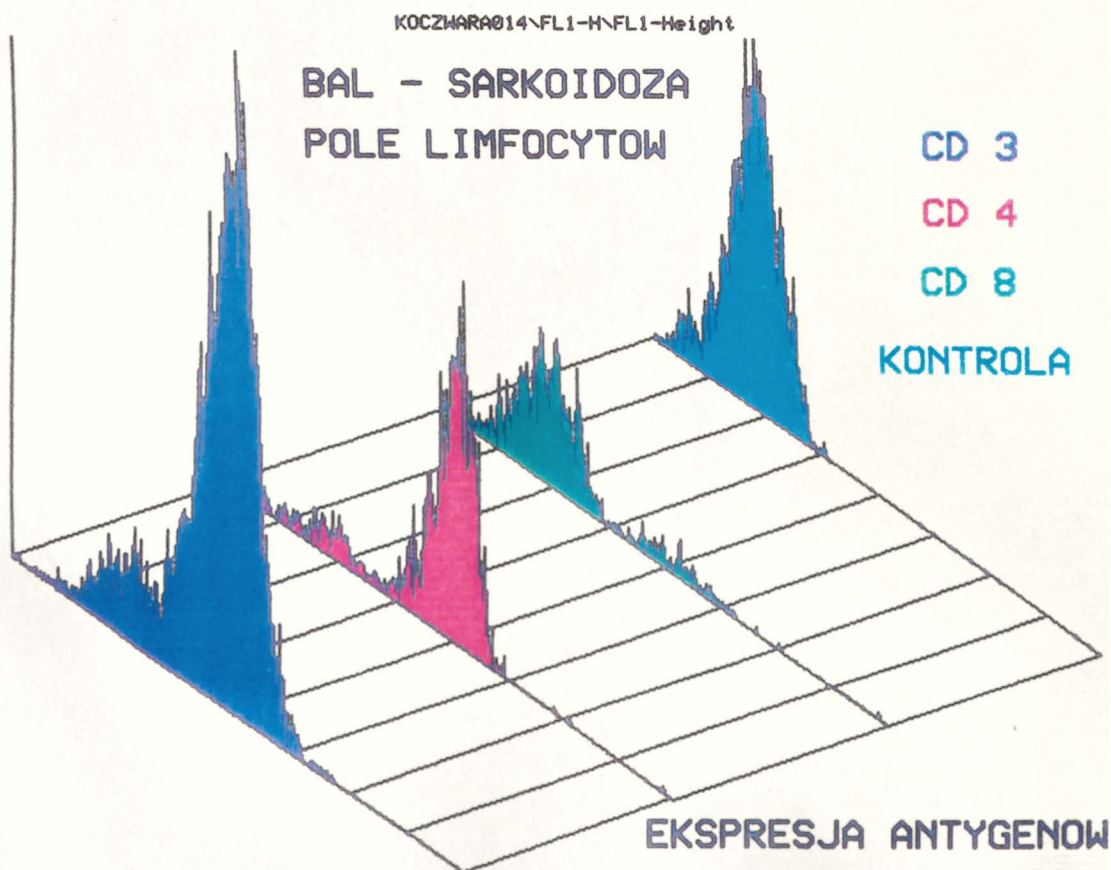
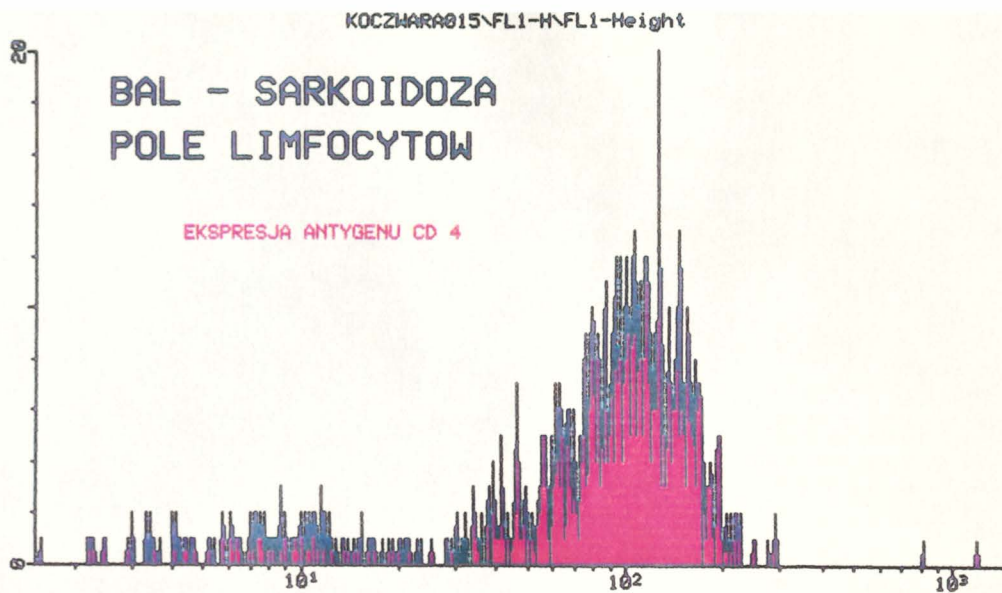
6. OCENA SUBPOPULACJI LIMFOCYTÓW WE KRWI I W POPŁUCZYNACH OSKRZELOWO-PĘCHERZYKOWYCH

Dla oceny subpopulacji limfocytów zastosowano metodę immunofluorescencji pośredniej używając następujących przeciwciał monoklonalnych firmy DAKO: CD₃ (limfocyty T),

CD₄ (limfocyty T-pomocnicze), CD₈ (limfocyty T-supresorowe), CD₁₉ (limfocyty B) (36, 92). Znakowanie limfocytów przeprowadzono w dwóch etapach: w pierwszym do 100 μ l zawiesiny komórkowej dodawano 10 μ l przeciwciała pierwotnego i inkubowano 20 min w temperaturze 4°C, a następnie płukano w BSS z azydkiem. W drugim etapie komórki inkubowano z przeciwciałem wtórnym (antymysim znakowanym izotiocjanianem fluoresceiny) przez 30 min w temperaturze 4°C. Po drugiej inkubacji komórki płukano oraz zawieszano w 0.2 ml BSS z azydkiem i utrwalano przez dodanie 0.2 ml 3% formaliny. Analizę przeprowadzano w cytofluorometrze przepływowym FACS-star-PLUS, firmy Becton Dickinson. Komórki zbierano w pamięci komputera przy stałych parametrach cytofluorometru. Limfocyty krwi obwodowej grupowano, biorąc pod uwagę ich jednakową wielkość (odchylenie katowe promienia laserowego - Forward Scater), oraz zagęszczenie masy komórkowej (odchylenie boczne promienia laserowego - Side Scater). Te same parametry zastosowano dla selekcji populacji limfocytów, makrofagów, oraz neutrofilów w materiale z popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych (Ryc. 3.). Procent komórek pozytywnych określano na podstawie intensywności fluorescencji przedstawionej na cytogramie (Ryc. 4.). Komórki znakowane tylko wtórnym przeciwciałem były zastosowane jako kontrola dla niespecyficznego wiązania (92, 128, 149).



Ryc. 3. Wynik badania komórek odczynowych przestrzeni oskrzelowo-pęcherzykowej w cytofluorometrze przepływowym FACS-star-PLUS.



Ryc. 4. Cytogramy subpopulacji limfocytów T przestrzeni oskrzelowo-pęcherzykowej.

7. TEST REDUKCJI BŁĘKITU NITROTETRAZOLIOWEGO (NBT) PRZEZ MAKROFAGI PĘCHERZYKOWE (AM).

7.1. Przeprowadzenie testu NBT - bez stymulacji.

0.1% roztwór NBT w soli fizjologicznej uzyskiwano przez rozpuszczenie barwnika NBT w wodzie destylowanej otrzymując 0.2% roztwór wodny (przechowywany w -20°C), który przed użyciem mieszano z równą objętością 0.3 M roztworu NaCl. Do 0.5 ml zawiesiny makrofagów dodawano 0.5 ml 0.1% roztworu NBT i inkubowano 60 min w temperaturze 37°C . Reakcję przerywano przez dodanie 1 ml 0.1 N HCl. Probówki wirowano (400 g, 10 min) i usuwano płyn z nad osadu. Po wysuszeniu osad komórkowy rozpuszczano dioksanem na gorąco (15 min, 85°C). Standartowo dodawano 1 ml dioksanu do jednej probówki. Straty komórkowe usuwano przez wirowanie (400g, 5 min).

7.2. Test NBT po stymulacji zymosanem.

Równolegle wykonywano ten sam test NBT, po wcześniejszej stymulacji makrofagów zymosanem (firmy Sigma). Dodawano 100 μg zymosanu na 2×10^6 komórek w 0.5 ml RPMI i inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze 37°C . Następnie wykonywano reakcję jak wyżej. Gęstość optyczną (O.D.) uzyskanych roztworów określano w spektrofotometrze przy długości fali 580 nm używając dioksanu jako próbki ślepej. Wyniki testu podawano jako wartość O.D (63).

8. OCENA SUBPOPULACJI MAKROFAGÓW PECHERZYKOWYCH

8.1. Metoda immunoenzymatyczna - biotyna-streptawidyna-fosfataza alkaliczna (B-SA).

Dla oceny subpopulacji makrofagów pęcherzykowych zastosowano następujące przeciwciała monoklonalne firmy DAKO: CD₆₈ - jako marker dojrzałych form makrofagów, CD₁₄ - marker monocytoidalnych form makrofagów. Reakcje przeprowadzano na rozmazach cytologicznych, utrwalonych w acetonie, według instrukcji zamieszczonej w "Quik Staining Kit, Alkaline Phosphatase System 40 (Labelled Avidin-Biotin) K-687. Dla uwidocznienia miejsca reakcji antygen-przeciwciało zastosowano jako chromogen nową fuksynę (New Fuchsin), która w reakcji z fosfatazą alkaliczną wybarwia komórki pozytywne na kolor różowo-czerwony. Po zakończeniu reakcji immunologicznej preparaty podbarwiano hematoksyliną i zamykano w glicerożelu. W mikroskopie świetlnym liczone makrofagi pęcherzykowe z dodatnią reakcją immunoenzymatyczną (66, 92).

8.2. Morfometria komputerowa.

Komputerową analizę morfometryczną dotyczącą pola powierzchni makrofagów pęcherzykowych wykonano na preparatach cytologicznych popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych barwionych hematoksyliną-eozyną, przy użyciu zestawu złożonego z mikroskopu Axiophot, czarno-białej kamery CCD, komputera PCAT 386/33 MHz firmy Optimus, z kartą przetwornika obrazów o rozdzielczości 512x512 pikseli i 256 poziomach szarości. W każdym preparacie określano pole powierzchni 100 makrofagów, a wyniki podawano w μm^2 (86).

W Y N I K I B A D A Ń

Analizę statystyczną wyników badań opracowano przy użyciu programu statystycznego SPSS/PC. Przeprowadzone obliczenia obejmowały:

- a) Określenie współczynników korelacji pomiędzy następującymi parametrami badanymi w popłuczynach oskrzelowo-pęcherzykowych: $CD_4/CD_8 - CD_{14}$, $CD_4/CD_8 - CD_{68}$, $CD_4/CD_8 - NBT$.
- b) Obliczenie regresji wielokrotnej (wyznaczenie funkcji regresji): $CD_4/CD_8 = f(NBT, CD_{68}, CD_{14})$
- c) Porównanie własności statystycznych badanych parametrów przy użyciu testu t-Studenta i testu F-Fischera

Wyniki obliczeń statystycznych

Ad a) Otrzymane współczynniki korelacji na poziomie istotności 0.001 zostały przedstawione w tabeli 1.

Ad b) Porównanie regresji dla zmiennej niezależnej CD_4/CD_8 :

$$CD_4/CD_8 = -1.31814 + 14.27877 \cdot NBT - 0.02758 \cdot CD_{68} + 0.03788 \cdot CD_{14}$$

Po wyeliminowaniu zmiennych nieistotnych dla przyjętego przedziału ufności 95%, równanie to przyjmuje postać:

$$CD_4/CD_8 = -3.16949 + 16.95487 \cdot NBT + 0.03986 \cdot CD_{14}$$

Ad c) W badaniach przy użyciu testu t-Studenta jako znamien-

ny statystycznie przyjęto poziom istotności $p < 0.05$.

W teście Fischera dotyczącym zgodności rozkładów zmiennych losowych większość wyników wskazywała na nieswoistość różnic pomiędzy badanymi rozkładami.

Tab. 1. Wyniki obliczeń współczynników korelacji pomiędzy parametrami badanymi w popłuczynach oskrzelowo-pęcherzykowych.

Korelacja:	Program statystyczny SPSS/PC			
	CD ₄ /CD ₈	CD ₁₄	CD ₆₈	NBT
CD ₄ /CD ₈	1.0000	.8602**	-.7805**	.9174**
CD ₁₄	.8602**	1.0000	-.6555**	.7968**
CD ₆₈	-.7805**	-.6555**	1.0000	-.7686**
NBT	.9174**	.7968**	-.7686**	1.0000
Liczba przypadków:	110	Znamiennosc: * - .01		
		** - .001		

1. Rutynowa ocena cytologiczna a popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych

Rutynową ocenę cytologiczną komórek przestrzeni oskrzelowo-pęcherzykowej, wykonywano celem uzyskania ogólnych danych przeglądowych oraz dla wstępnej selekcji materiału pobranego metoda BAL. Posłużono się następującymi

kryteriami cytologicznymi, dla wykluczenia nieodpowiedniego materiału do dalszych szczegółowych badań:

- cytoliza komórek związana z nieprawidłowym transportem lub dodatkowymi infekcjami w drogach oddechowych
- obecność elementów dróg oddechowych takich, jak: komórki nabłonka gruczołowego oskrzeli, oraz nabłonka płaskiego górnych dróg oddechowych, wysoka liczba neutrofilów, eozynofilów, obfity śluz
- obecność licznych świeżych krwinek czerwonych pochodzących z krwi obwodowej wraz z dodatkową liczbą neutrofilów, limfocytów, monocytów czy eozynofilów
- obecność obfitej flory bakteryjnej lub grzybiczej w materiale otrzymanym metodą BAL.

W ten sposób z ogólnej liczby 197 chorych na sarkoidozę do naszych szczegółowych badań przeznaczono 110 przypadków.

1.1. Średnia liczba komórek odczynowych zawarta w 1 ml popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych u chorych na sarkoidozę płuc była znamienne wyższa w porównaniu z grupą kontrolną we wszystkich grupach badanych chorych ($p < 0.005$). Szczególnie dużą liczbę komórek w 1 ml popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych (średnio $73.6 \times 10^4 \pm 10 \times 10^4$ /ml) zaobserwowano w II/III stadium sarkoidozy w grupie chorych palących papierosy (Tab. 2).

1.2. Analiza składu procentowego poszczególnych komórek odczynowych, tj. makrofagów, limfocytów, neutrofilów, eozy-

Tabela 2

SARKOIDOZA PŁUC

Ogólna liczba komórek w popłuczynach oskrzelowo-
-pęcherzykowych u chorych palących i niepalących.

		Liczba komórek/ml
K O N T R O L A		$12.4 \times 10^4 \pm 8.4 \times 10^4$
SARKOIDOZA I STADIUM	niepalący	$42.9 \times 10^4 \pm 8.9 \times 10^4$
	palący	$46.4 \times 10^4 \pm 3.6 \times 10^4$
SARKOIDOZA II/III STADIUM	niepalacy	$33.4 \times 10^4 \pm 9.8 \times 10^4$
	palący	$73.6 \times 10^4 \pm 10 \times 10^4$

nofilów, wykazała znamiennej wzrost średniego odsetka limfocytów, w porównaniu z grupą kontrolną ($p < 0.0005$), który wynosił powyżej 18% we wszystkich grupach chorych na sarkoidozę płuc.

Znamiennej wzrost procentu neutrofilów średnio do $10.6 \pm 3.2\%$ w porównaniu z grupą kontrolną ($p < 0.005$) zaobserwowano u chorych w II/III stadium sarkoidozy, głównie w grupie chorych palących papierosy. Wzrost ten nie wykazywał znamienności statystycznej w porównaniu do pozostałych grup badanych chorych. Średni procent makrofagów pęcherzykowych był znamiennej niższy w porównaniu z grupą kontrolną we wszystkich grupach badanych chorych na sarkoidozę płuc ($p < 0.0005$). Nie zaobserwowano znamiennych różnic w odsetkach makrofagów pęcherzykowych pomiędzy grupami chorych palących i niepalących papierosów. Średni procent eozynofiliów nie wykazywał znamiennych różnic (Tab. 3).

2. Subpopulacje limfocytów

2.1. Zmiany w zakresie subpopulacji limfocytów przestrzeni oskrzelowo-pęcherzykowej

W badaniach immunocytologicznych z zastosowaniem przeciwciał monoklonalnych oraz metody immunofluorescencji pośredniej, w cytofluorometrze przepływowym FACS-star PLUS oznaczano subpopulacje limfocytów uzyskanych metodą BAL, z dodatnią ekspresją antygenów: $CD_3, CD_4, CD_8, CD_{19}$.

Znamiennej wzrost procentu limfocytów T-pomocniczych w po-

Tabela 3

SARKOIDOZA PŁUC

Obraz cytologiczny w popłuczynach oskrzelowo-pęcherzykowych

u chorych palących i niepalących.

		% komórek napływowych			
		MAKROFAGI	LIMFOCYTY	NEUTROFILE	EOZYNOFILE
K O N T R O L A		95.8±2.9	3.4±2.5	0.5±0.5	0.4±0.3
SARKOIDOZA I STADIUM	niepalący	69.2±10.5	23.7±10.3	3.7±1.2	0.6±0.9
	palacze	71.8±12	21.1±9.8	5.9±5.8	1.7±1.4
SARKOIDOZA II/III STADIUM	niepalący	65.5±16.7	19.3±10.9	6.2±6.7	1.2±1.6
	palacze	76.3±10.9	18.3±10.9	10.6±3.2	1.3±0.6

równaniu z grupą kontrolną i pozostałymi grupami badanych chorych stwierdzono tylko u chorych niepalących w I stadium sarkoidozy ($p < 0.0005$). Chorzy na sarkoidozę płuc niepalący papierosów wykazywali znamienne obniżenie limfocytów T-supresorowych w porównaniu z grupą kontrolną, które było wyraźniej zaznaczone w II/III stadium sarkoidozy (średnio do $9,1 \pm 6,9$, $p < 0.0005$).

Spadek odsetka limfocytów T-supresorowych w grupie chorych palących w porównaniu z grupą chorych niepalących papierosów nie wykazywał znamienności statystycznej (Tab. 4). Znamienny wzrost stosunku limfocytów T CD_4/CD_8 średnio do $3,8 \pm 1,2$ w porównaniu z grupą kontrolną, stwierdzono tylko u chorych niepalących papierosów w I stadium sarkoidozy ($p < 0.0005$). W grupie chorych palących papierosy wykazano znamienne obniżenie stosunku limfocytów CD_4/CD_8 w odniesieniu do wartości CD_4/CD_8 u chorych niepalących papierosów ($p < 0.0005$) (Ryc. 5). Równocześnie w tej samej grupie chorych stwierdzono znamienny wzrost średniej procentowej liczby limfocytów B, w porównaniu z grupą kontrolną ($p < 0.005$), średnio do $16,8 \pm 5,4\%$ w I stadium sarkoidozy i do $15,2 \pm 5,2\%$ w II/III stadium tej choroby (Tab. 4).

2.2. Zmiany w zakresie subpopulacji limfocytów we krwi obwodowej.

Ocena subpopulacji limfocytów we krwi obwodowej pobieranej pacjentom przed zabiegiem płukania oskrzelowo-pęcherzykowego w tym samym dniu, wykazała znamienny staty-

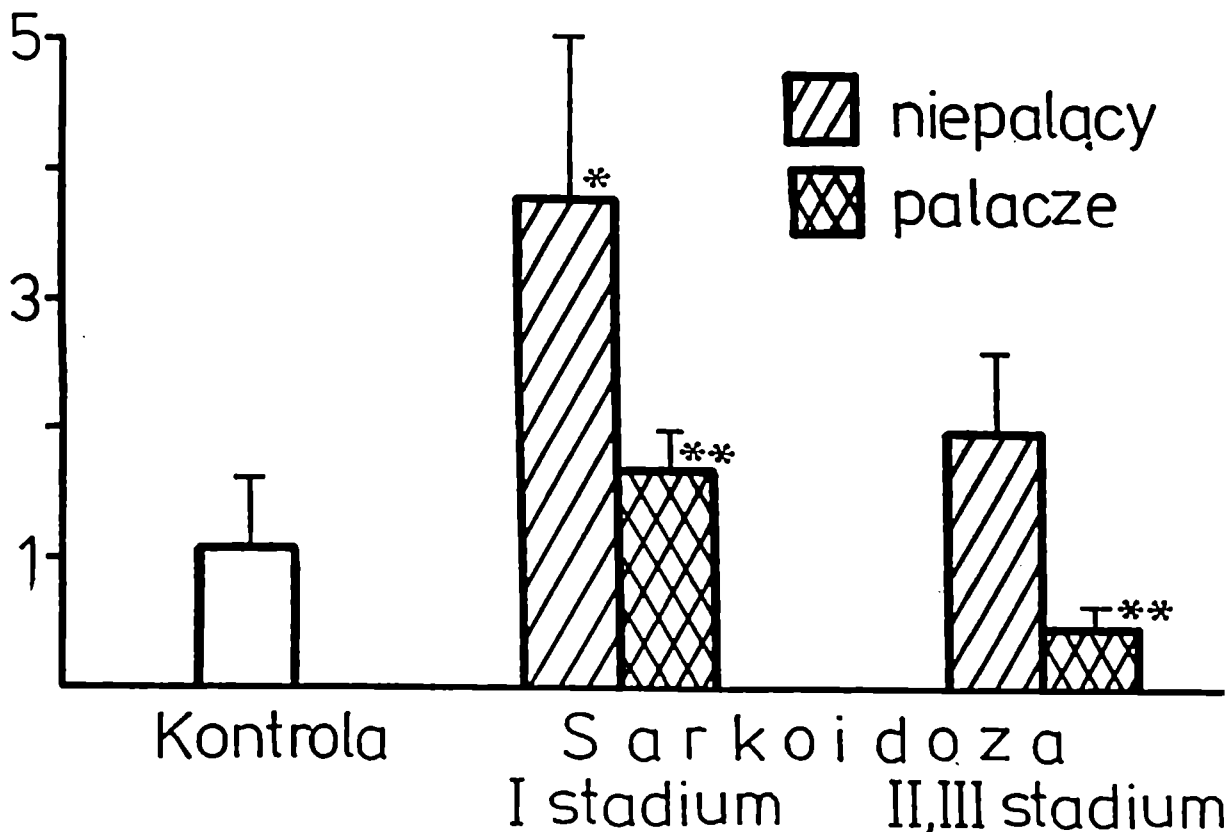
Tabela 4

SARKOIDOZA PŁUC

Subpopulacja limfocytów w popłuczynach oskrzelowo-pęcherzykowych
u chorych palących i niepalących.

		%				
		CD ₃	CD ₄	CD ₈	CD ₄ /CD ₈	CD ₁₃
K O N T R O L A		75.6±3.1	29.0±5.5	31.2±8.6	1.1±0.5	8.5±3.0
SARKOIDOZA I STADIUM	niepalący	88.5±11.4	73.4±3.4	19.7±2.0	3.8±1.2	6.1±4.3
	palący	60.8±14.5	37.5±16.5	21.3±6.1	1.7±0.3	16.8±5.4
SARKOIDOZA II/III STADIUM	niepalący	21.4±10.2	16.6±11.2	9.1±6.9	2.1±0.6	13.4±2.3
	palący	41.8±4.2	13.1±5.4	29.6±7.4	0.5±0.2	15.2±5.2

CD₄/CD₈



Ryc. 5. Subpopulacje limfocytów T w płucach oskrzelowo-pęcherzykowych.

* - znamieny wzrost stosunku limfocytów T-pomocniczych (CD₄) do limfocytów T-supresorowych (CD₈) w grupie chorych niepalących w I stadium sarkoidozy w porównaniu do grupy kontrolnej ($p < 0.0005$).

** - znamienne obniżenie stosunku CD₄/CD₈ w grupie chorych palących w odniesieniu do wartości CD₄/CD₈ u chorych niepalących ($p < 0.0005$).

stycznie spadek limfocytów T-pomocniczych tylko w grupie chorych niepalących papierosów: w I stadium sarkoidozy średnio do $23,1 \pm 13,0\%$ ($p < 0.0005$), a w II/III stadium średnio do $21,5 \pm 13,8\%$ ($p < 0.0005$).

Rozkład zmiennych losowych procentu limfocytów T-pomocniczych różnił się statystycznie odchyleniami standartowymi pomiędzy grupą chorych palących w II/III stadium sarkoidozy, a grupą kontrolną, co wykazał test Fischera. Natomiast średni procent limfocytów T-supresorowych nie wykazywał istotnych zmian w porównaniu z grupą kontrolną (Tab. 5).

Odwrócenie stosunku limfocytów T-pomocniczych do T-supresorowych, stwierdzono tylko w grupie chorych niepalących papierosów i wynosił on średnio $0,94 \pm 0,5$ w I stadium sarkoidozy, oraz $0,7 \pm 0,2$ w II/III stadium. W tym ostatnim przypadku rozkład zmiennych losowych różnił się statystycznie odchyleniami standartowymi od grupy kontrolnej (Ryc. 6). Procent limfocytów B z dodatnią ekspresją antygenu CD_{19} we krwi obwodowej chorych, był obniżony w porównaniu z grupą kontrolną, ale spadek ten nie wykazywał znamienności statystycznej badanej testem t-Studenta.

3. Aktywność makrofagów pęcherzykowych oznaczana testem redukcji NBT.

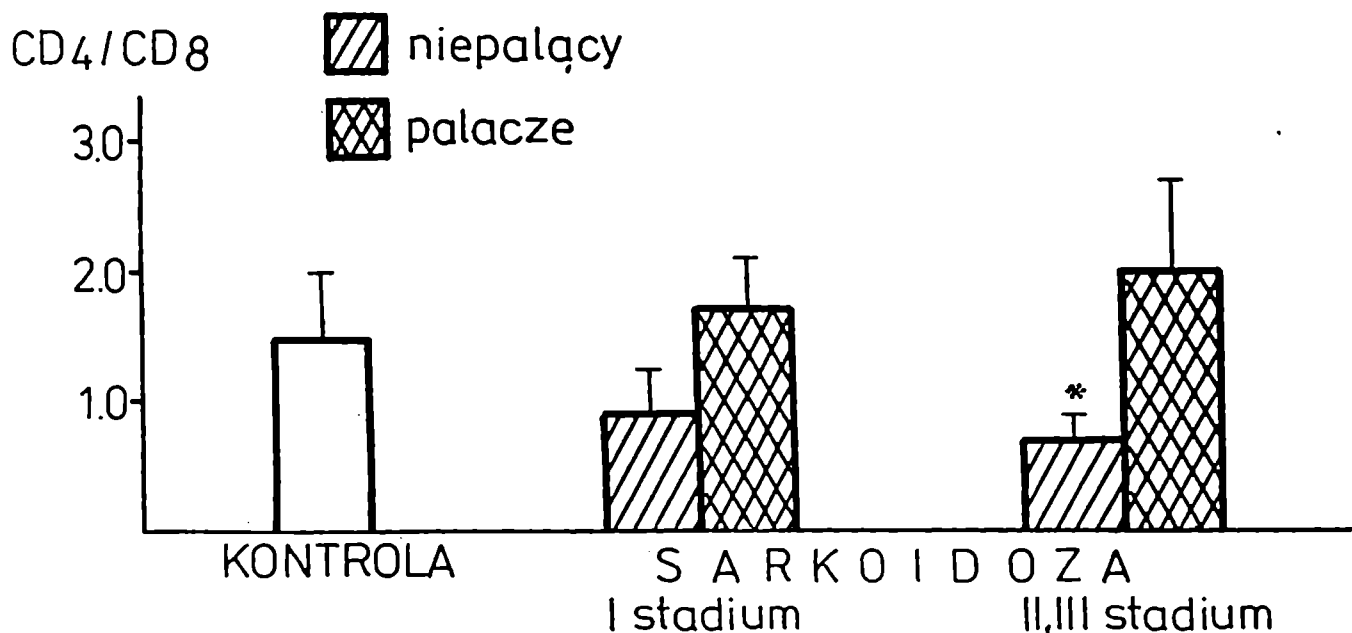
Test NBT określa aktywność NADPH-zależnej oksydazy, stanowiącej końcowy enzym w drodze przemiany glukozy torem pentozowym. Rola tego enzymu polega na generacji H_2O_2 ,

Tabela 5

SARKOIDOZA PŁUC

Subpopulacja limfocytów we krwi obwodowej
u chorych palących i niepalących.

		%				
		CD ₃	CD ₄	CD ₈	CD ₄ /CD ₈	CD ₁₅
K O N T R O L A		75.0±7.0	45.0±10.0	28.0±9.0	1.5±0.5	10.0±5.0
SARKOIDOZA I STADIUM	niepalący	55.2±13.2	23.1±13.0	24.5±7.9	0.94±0.5	7.0±3.8
	palący	65.2±10.1	44.0±10.9	26.3±3.6	1.7±0.4	5.5±2.9
SARKOIDOZA II/III STADIUM	niepalący	50.2±13.4	21.5±13.8	26.6±4.1	0.7±0.2	8.8±7.6
	palący	51.8±14.0	33.8±17.9	21.6±9.5	2.0±0.7	8.0±1.4



Ryc. 6. Subpopulacje limfocytów T w krwi obwodowej.

* - znaczne obniżenie stosunku limfocytów T CD_4/CD_8 w II/III stadium sarkoidozy w grupie chorych niepalących w odniesieniu do wartości CD_4/CD_8 w grupie kontrolnej ($p < 0.005$) i w grupie chorych w II/III stadium sarkoidozy palących papierosy ($p < 0.0005$).

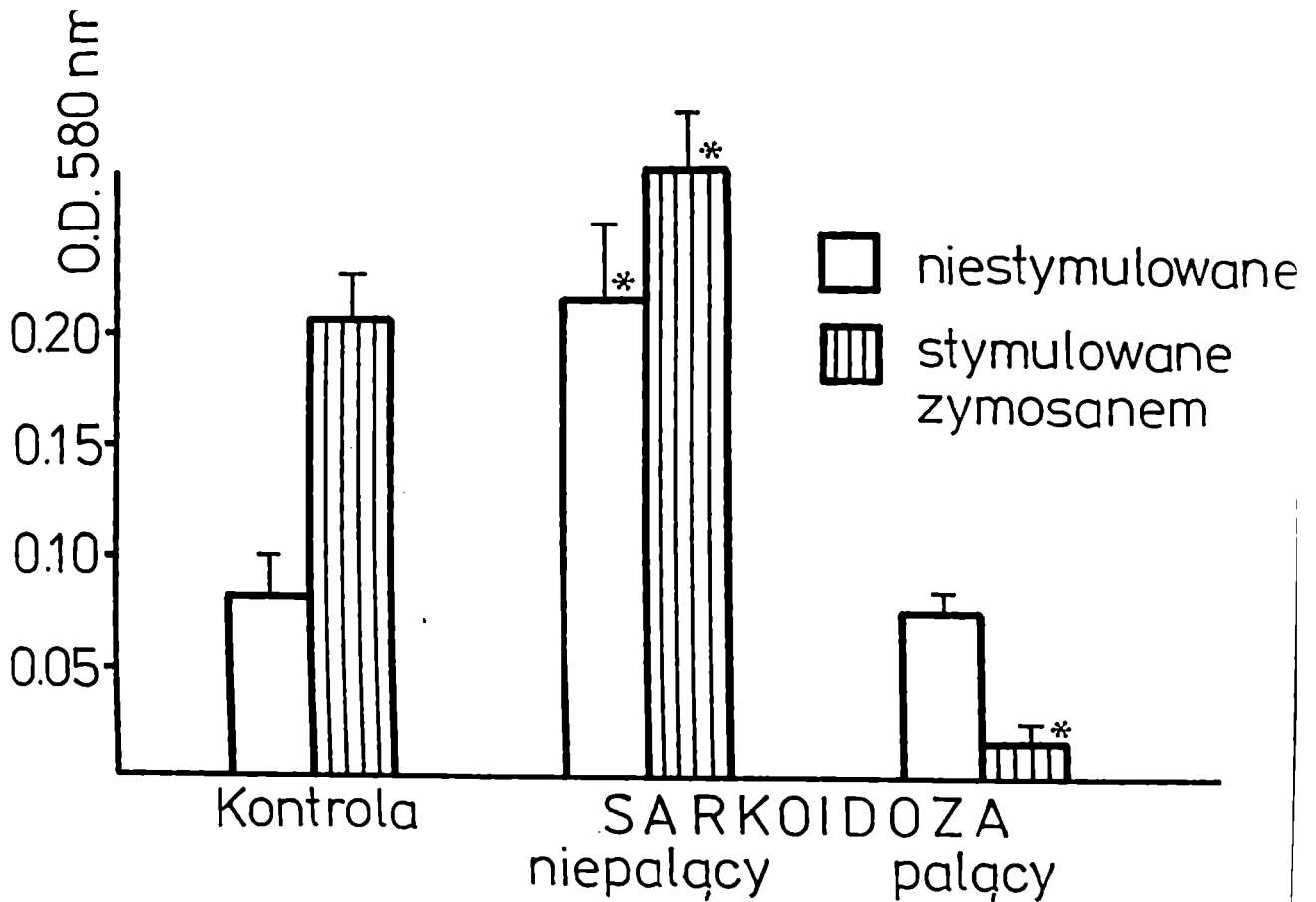
który pod wpływem peroksydaz komórkowych dostarcza aktywnego tlenu (O_2^-).

3.1. Test NBT spontaniczny

Zdolność makrofagów do redukcji błękitu nitrotetrazoliowego oceniano metodą spektrofotometryczną. Badano gęstość optyczną roztworu uzyskanego przez rozpuszczenie dioksanem suchej masy komórkowej zawierającej formazon, tj. produkt reakcji redukcji błękitu nitrotetrazoliowego. Ponieważ test NBT przeprowadzono w tej samej liczbie makrofagów, gęstość optyczna roztworu mierzona w spektrofotometrze była wyrazem intensywności redukcji NBT przez makrofagi pęcherzykowe. Stwierdzono znamienne wzrost spontanicznej redukcji błękitu nitrotetrazoliowego przez makrofagi pęcherzykowe w sarkoidozie płuc u chorych niepalących papierosów, średnio do $0,215 \pm 0.03$ ($p < 0.0005$) w porównaniu z grupą kontrolną. Natomiast w grupie chorych palących papierosy nie stwierdzono znamienych różnic (Ryc. 7).

3.2. Test NBT po stymulacji zymosanem.

Stymulowane zymosanem makrofagi pęcherzykowe u chorych na sarkoidozę płuc niepalących papierosów, osiągały znamienne wyższą aktywność redukcyjną (średnio $0,275 \pm 0.02$) w porównaniu z grupą kontrolną ($p < 0.0005$) oraz w odniesieniu do spontanicznej redukcji NBT przez makrofagi pęcherzykowe w tej samej grupie chorych ($p < 0.005$). W grupie badanych chorych palących papierosy aktywność makrofagów pęcherzykowych mierzona testem NBT po stymulacji



Ryc. 7. Test redukcji NBT przez makrofagi pęcherzykowe (AM) stymulowane i niestymulowane zymosanem.

O.D. - gęstość optyczna roztworu uzyskanego z rozpuszczenia dioksanem produktu redukcji NBT - formazonu.

* - znamienne wzrost spontanicznej redukcji NBT przez AM jak również po stymulacji AM zymosanem w sarkoidozie u chorych niepalących w porównaniu z grupą kontrolną ($p < 0.0005$).

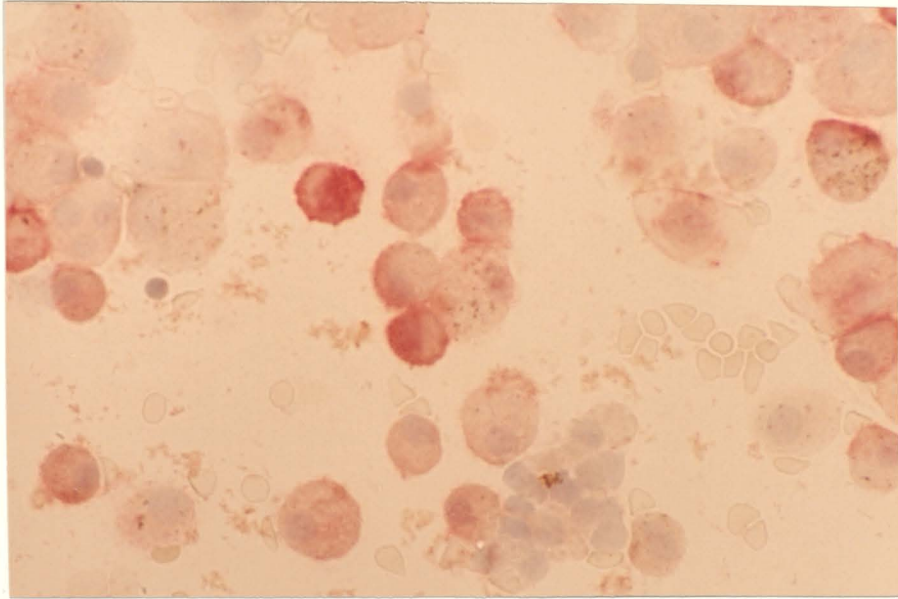
** - w grupie chorych palących znamienne obniżenie redukcji NBT przez AM po stymulacji zymosanem w porównaniu z grupą kontrolną oraz z grupą chorych niepalących palaczy (p < 0.0005).

zymosanem była znamienne niższa w stosunku do grupy kontrolnej ($p < 0.0005$), a także w tej samej grupie chorych w porównaniu do redukcji NBT w warunkach spontanicznych (Ryc. 7).

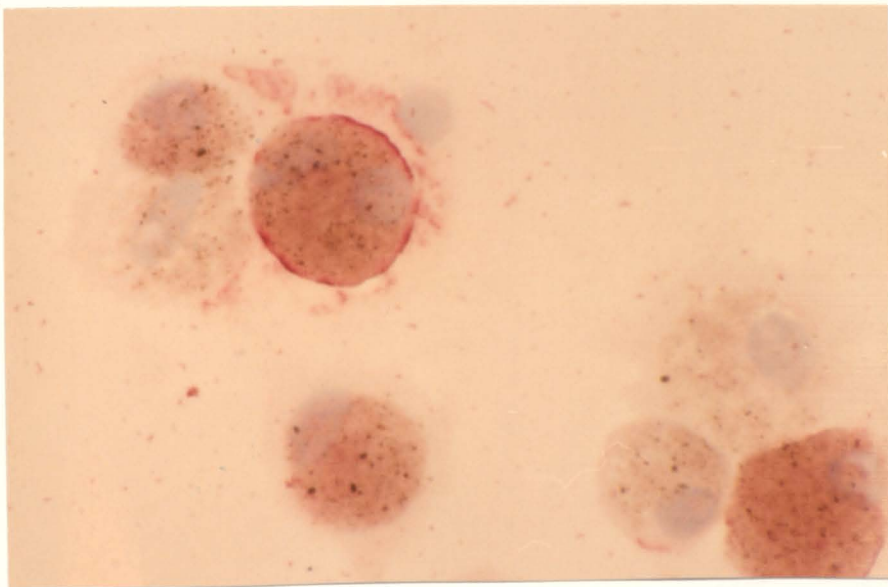
4. Subpopulacje makrofagów pęcherzykowych

Rutynowe badanie cytologiczne komórek odczynowych przestrzeni oskrzelowo - pęcherzykowej, u chorych na sarkoidozę płuc zwróciło uwagę na występowanie różnych form morfologicznych i wielkości makrofagów, ze znaczną jednak przewagą postaci monocytoidalnych tych komórek.

4.1. Celem bliższej oceny określenia subpopulacji makrofagów pęcherzykowych wykorzystano zjawisko zmiany ekspresji antygenów powierzchniowych jak i cytoplazmatycznych komórek immunokompetentnych w miarę ich dojrzewania. Zastosowano przeciwciała monoklonalne skierowane przeciwko antygenom powierzchniowym obecnym na monocytoidalnych formach makrofagów (CD_{14}). Makrofagi z dodatnią ekspresją antygeny CD_{14} , barwiły się na kolor czerwono - ceglasty, intensywniej na obwodzie komórki (w metodzie BS-A) (Zdjęcie 1.). Dla wyznaczenia dojrzałych form makrofagów pęcherzykowych zastosowano przeciwciała monoklonalne skierowane przeciwko cytoplazmatycznemu antygenowi (CD_{68}). Makrofagi z dodatnią ekspresją antygeny CD_{68} barwione metodą immunoenzymatyczną BS-A zawierały czerwono - ceglaste ziarnistości (Zdjęcie 2.).



Zdjęcie 1. Makrofagi pęcherzykowe z dodatnią ekspresją antygeny CD₁₄. Pow. x 300.



Zdjęcie 2. Makrofagi pęcherzykowe z dodatnią ekspresją antygeny CD₆₈. Pow. x 600

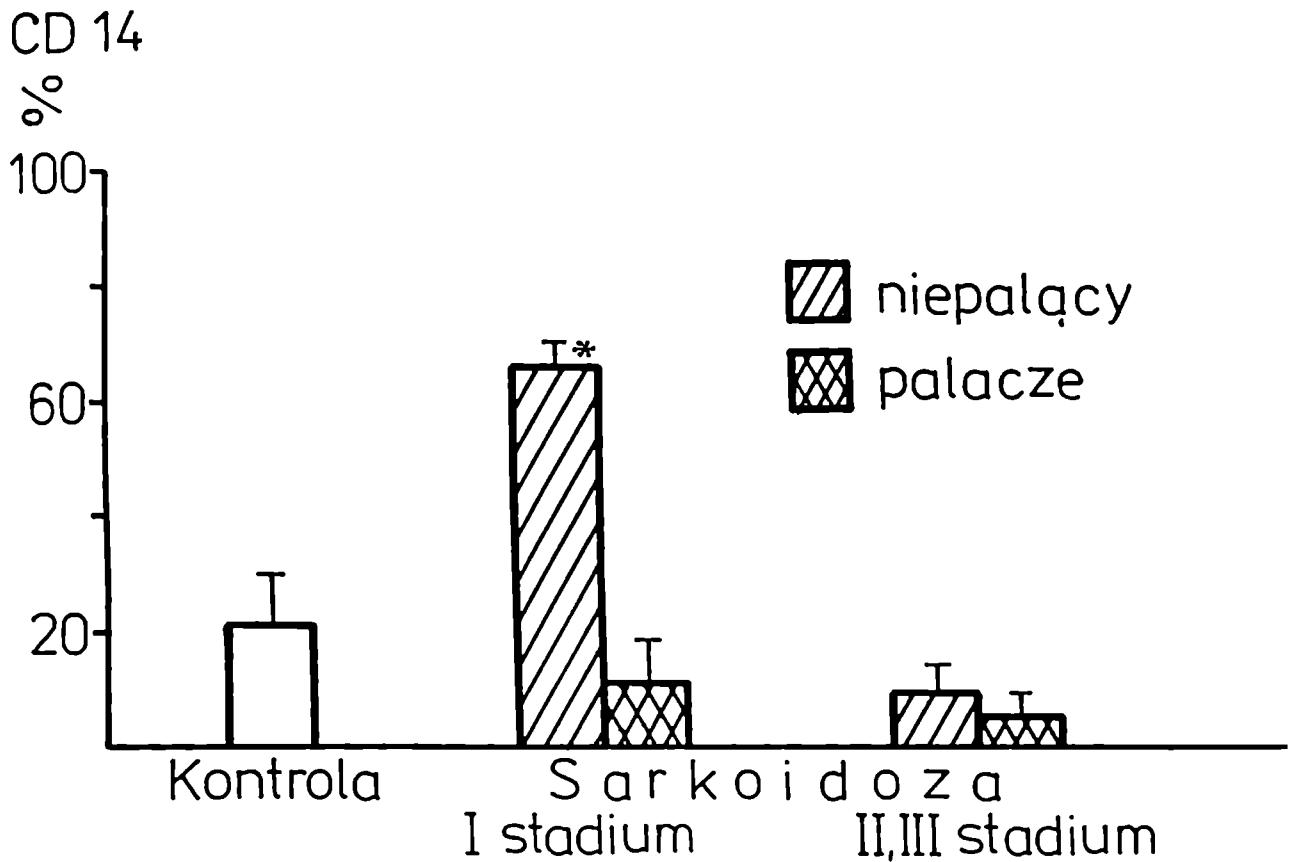
Stwierdzono, że znamiennej wzrost procentu makrofagów pęcherzykowych z dodatnią ekspresją antygenu CD₁₄, w porównaniu z grupą kontrolną, występował tylko w I stadium sarkoidozy w grupie chorych niepalących i wynosił średnio $61,6 \pm 2,2\%$ ($p < 0.0005$).

Natomiast u chorych w tym samym stadium choroby palących papierosy, oraz u wszystkich chorych w II/III stadium sarkoidozy średni procent makrofagów pęcherzykowych z dodatnią ekspresją antygenu CD₁₄ był znamiennej niższy w stosunku do chorych w I stadium sarkoidozy niepalących papierosów ($p < 0.0005$) oraz w porównaniu z grupą kontrolną ($p < 0.005$) (Ryc.8).

Procent makrofagów pęcherzykowych z dodatnią ekspresją antygenu CD₆₈ był znamiennej niższy u chorych niepalących w I stadium sarkoidozy w porównaniu z grupą kontrolną ($p < 0.0005$). Natomiast u chorych palących papierosy w I stadium sarkoidozy oraz u wszystkich chorych w II/III stadium choroby procent makrofagów pęcherzykowych z dodatnią ekspresją antygenu CD₆₈ był wysoki, zbliżony do grupy kontrolnej (Ryc. 9).

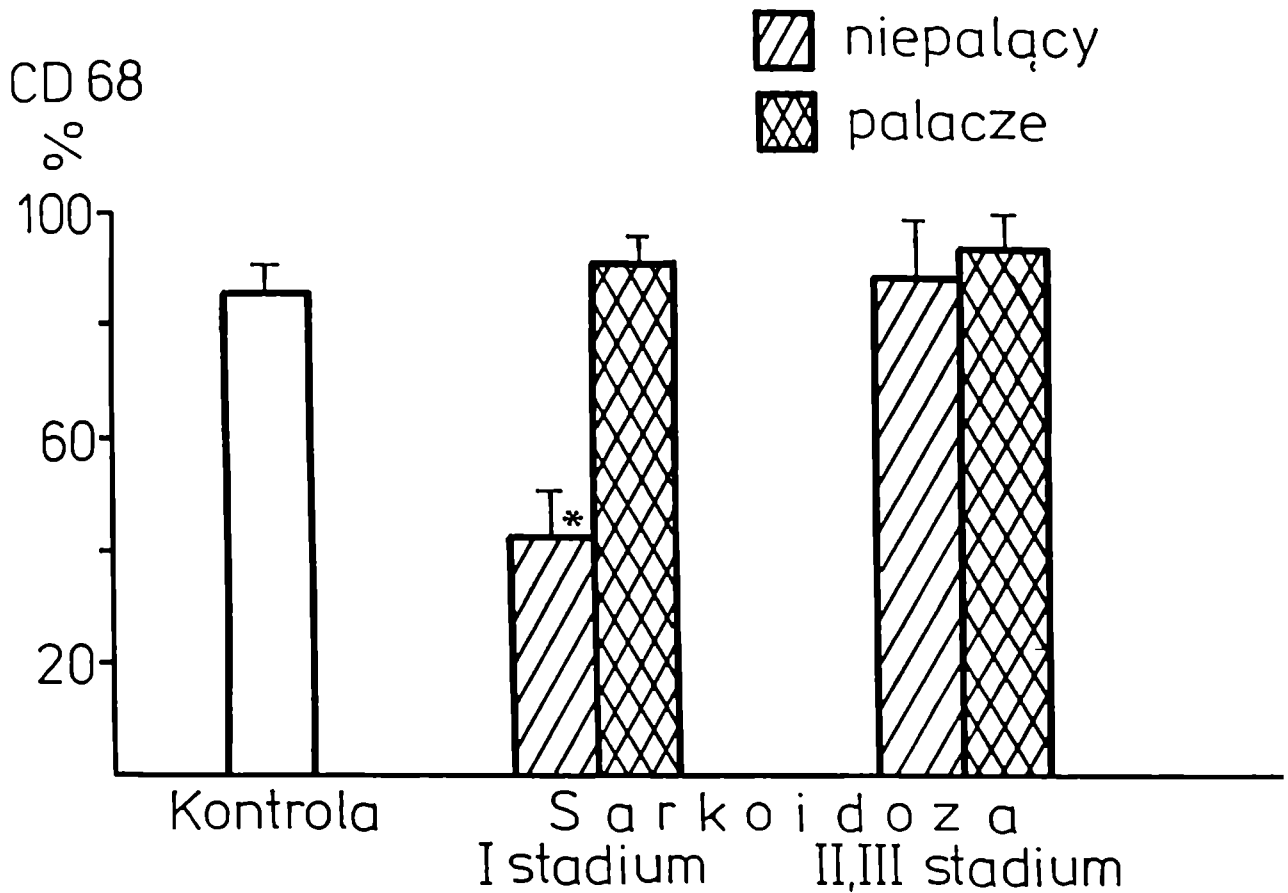
4.2. Morfometria komputerowa

Komputerowa analiza pola powierzchni makrofagów pęcherzykowych wykazała znamiennej spadek średniej powierzchni makrofagów wynikający z przewagi monocytoidalnych form tych komórek, tylko w I stadium sarkoidozy u chorych niepalących w porównaniu z grupą kontrolną ($p < 0.005$). Na-



Ryc. 8. Makrofagi pęcherzykowe (AM) z dodatnią ekspresją antygeny CD₁₄.

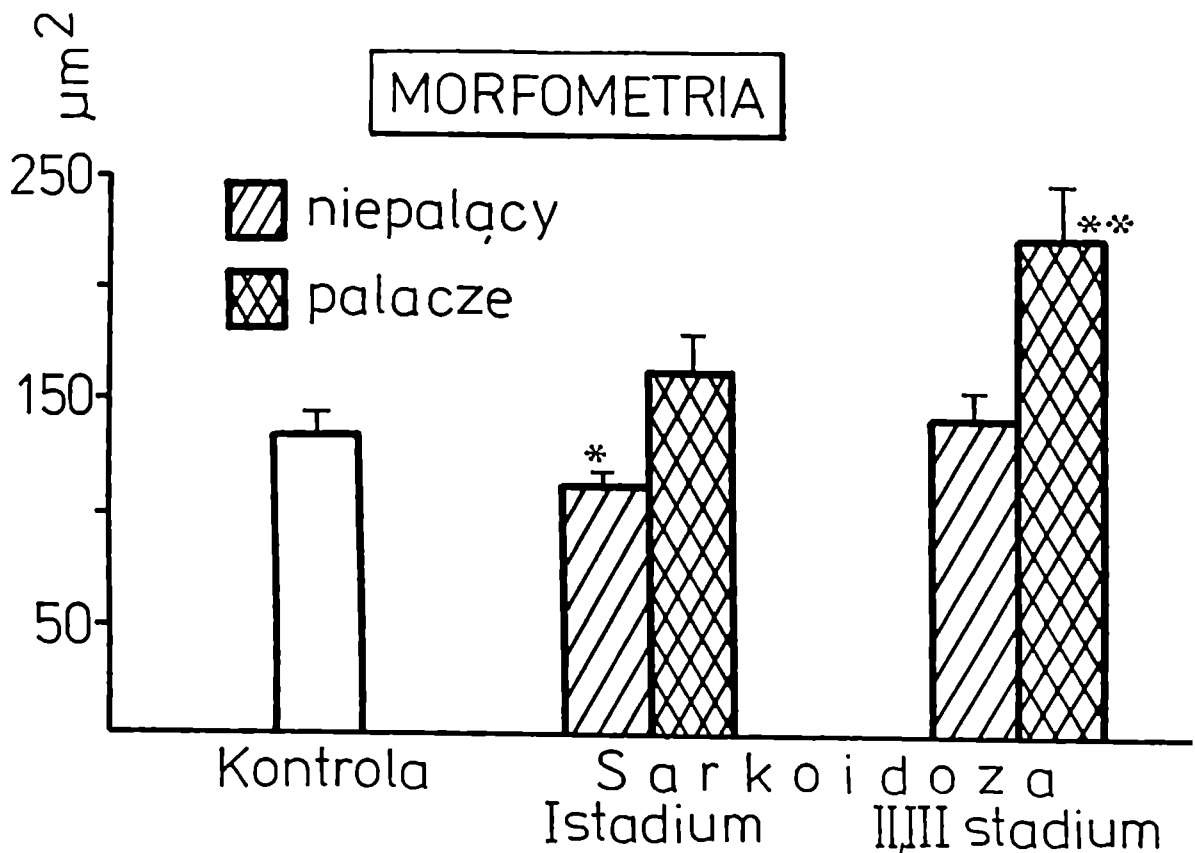
* - znamienne wzrost procentowej liczby AM z dodatnią ekspresją antygeny CD₁₄ w grupie chorych niepalących w I stadium sarkoidozy w porównaniu z grupą kontrolną ($p < 0.0005$) oraz z pozostałymi grupami badanych chorych ($p < 0.0005$).



Ryc. 9. Makrofagi pęcherzykowe (AM) z dodatnią ekspresją antygeny CD₆₈

* - znamienne obniżenie procentowe liczby AM z dodatnią ekspresją antygeny CD₆₈ w grupie chorych niepalących w I stadium sarkoidozy w porównaniu z grupą kontrolną ($p < 0.0005$) oraz z pozostałymi grupami badanych chorych ($p < 0.0005$).

tomiaŝ w grupie chorych palących papierosy w II/III stadium sarkoidozy stwierdzono znamienny wzrost ŝredniej wielkoŝci makrofagów pęcherzykowych w porównaniu z grupą kontrolną ($p < 0.0005$) co wynika z występowania w przewodzie makrofagów duŝych, często obładowanych składnikami dymu tytoniowego (Ryc. 10.).



Ryc. 10. Morfometria makrofagów pęcherzykowych (AM).

* - znamienne obniżenie średniej powierzchni AM w grupie chorych niepalących w I stadium sarkoidozy w porównaniu z grupą kontrolną ($p < 0.005$).

** - znamienny wzrost średniej powierzchni AM u chorych palących w II/III stadium sarkoidozy w porównaniu z grupą kontrolną ($p < 0.0005$) oraz z pozostałymi grupami badanych chorych ($p < 0.0005$).

D Y S K U S J A I O M Ó W I E N I E W Y N I K Ó W

We wstępie do niniejszej pracy zwrócono uwagę na występowanie zaburzeń immunologicznych w tkance płucnej, oraz we krwi obwodowej u chorych na sarkoidozę. Obecny stan wiedzy na temat zmian w zakresie subpopulacji i aktywności komórek przestrzeni oskrzelowo-pęcherzykowej w sarkoidozie płuc wynika z osiągnięć naukowych ostatnich dziesięciu lat, w związku z zastosowaniem nowoczesnych metod badawczych. Należą do nich przede wszystkim bronchofiberoskopia i uzyskiwanie świeżego materiału z przestrzeni oskrzelowo-pęcherzykowej, dzięki czemu można było zastosować liczne przeciwciała monoklonalne do oznaczania subpopulacji komórkowych i ich aktywności sekrecyjnej z zastosowaniem metod immunoenzymatycznych, lub cytofluorometrii przepływowej. Analiza porównawcza składu komórkowego popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych i materiału biopsyjnego tkanki płucnej wykazała wysoką zbieżność wyników obu metod wskazując tym samym, iż prawidłowo wykonane badanie popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych dobrze odzwierciedla zmiany zachodzące w płucach (57, 60,109).

We współczesnym piśmiennictwie spotyka się różne opinie na temat znaczenia wielu wskaźników cytologicznych oznaczanych w popłuczynach oskrzelowo-pęcherzykowych

uważanych za charakterystyczne dla sarkoidozy płuc, takich jak: zwiększenie odsetka limfocytów, oraz wysoki wskaźnik CD_4/CD_8 . Należy jednak podkreślić iż znane są przypadki sarkoidozy bez charakterystycznego limfocytarnego nacieku śródpecherzykowego. Również określenie subtypów makrofagów które miałyby być typowe dla sarkoidozy, np. z dodatnią ekspresją antygenu RFD₁, oraz często podkreślany wzrost odsetka monocytoidalnych form makrofagów CD₁₄ dodatnich, nie są na tyle swoiste, aby na podstawie poszczególnych wskaźników rozpoznać sarkoidozę (3, 111). Trudności w ustaleniu rozpoznania sarkoidozy, jak również monitorowania leczenia na podstawie wyników badań cytologicznych z określeniem subpopulacji i aktywności komórek napływowych przestrzeni oskrzelowo-pecherzykowej, wynikają przede wszystkim z braku standaryzacji samej metody BAL, oraz niejednorodnych grup badanych chorych (105, 109, 118). Z przeprowadzonych przez nas badań wynika, że zarówno skład poszczególnych populacji komórek, jak również ich aktywność wykazują znaczne różnice w zależności od fazy choroby, wpływu dodatkowych czynników takich jak: leczenie sterydami, palenie papierosów, współistniejące infekcje dróg oddechowych, czy zanieczyszczenie środowiska.

W naszej pracy, ze względu na cytowane znaczne rozbieżności w wynikach badań komórek uzyskiwanych metodą BAL w płucnej postaci sarkoidozy, oraz w ich interpretacji, staraliśmy się przede wszystkim ujednoczyć grupę badanych chorych. Do analizy wyników wybraliśmy grupę chorych bez do-

datkowych infekcji w drogach oddechowych, oraz nie leczonych sterydami. Zwróciliśmy uwagę na wpływ stopnia zaawansowania choroby, opierając się na stadiach sarkoidozy określonych na podstawie obrazu rentgenowskiego klatki piersiowej, oraz przewlekłego palenia papierosów na subpopulacje i aktywność komórek przestrzeni oskrzelowo-pęcherzykowej. Ponieważ badani przez nas pacjenci, byli w większości stałymi mieszkańcami Krakowa, uwzględniliśmy również wpływ zanieczyszczenia środowiska na skład poszczególnych populacji komórek przestrzeni oskrzelowo-pęcherzykowej.

Do podstawowych wyników analizy naszego materiału należą dane stwierdzające, iż we wszystkich grupach badanych chorych na sarkoidozę płuc, niezależnie od stopnia zaawansowania choroby znamienne wzrastała całkowita liczba komórek odczynowych uzyskiwanych metodą BAL. Dane te potwierdza również wielu autorów: Behera (11), Lecossier (72), Pande (101) i Spurzem (135). Jednak największy wzrost liczby tych komórek stwierdziliśmy w grupie chorych palących papierosy w II/III stadium sarkoidozy. Próbę wyjaśnienia tych zjawisk należy wiązać z synergistycznym wpływem palenia papierosów i przewlekłej, miejscowej stymulacji antygenowej w sarkoidozie płuc na liczbę komórek w przestrzeni oskrzelowo-pęcherzykowej (21, 88). Należy jednak zwrócić uwagę, że wzrost liczby komórek nie musi być związany ze wzrostem ich aktywności. Jak wykazały nasze dalsze badania, składniki dymu tytoniowego zmniejszają aktywność limfocytów i makrofagów tkanki płucnej. Zbliżone obserwacje podał również Cherniack

(21). W tej samej grupie chorych zaobserwowaliśmy także znamienne wzrost odsetka neutrofilów w porównaniu do grupy kontrolnej i do pozostałych grup badanych przez nas chorych. Wzrost ten wynosił średnio $10,6 \pm 3,2\%$. Podkreśla się obecnie, iż wzrost neutrofilów w II/III stadium sarkoidozy, może być jednym z ważnych patomechanizmów, a zarazem wskaźnikiem procesów włóknienia i miejscowego uszkodzenia tkanki płucnej (21, 74). Takie zmiany patologiczne powstają w związku z wydzielaniem przez te komórki bardzo aktywnych proteaz: elastazy, kolagenazy oraz kwaśnych hydrolaz rozkładających mukopolisacharydy. Oprócz tego neutrofile wytwarzają wolne rodniki tlenowe, które potęgują niszczące działanie elastazy, ponieważ hamują potencjalną antyelastazę, jaką jest α_1 -antytrypsyna (69, 109). Stąd nasze wyniki mogą wskazywać na zwiększone ryzyko powikłań procesem włóknienia i destrukcji tkanki płucnej u chorych w II/III stadium sarkoidozy przewlekle palących papierosy. Określenie wczesnych wskaźników tego niepomyślnego dla podstawowej funkcji układu oddechowego powikłania choroby, jest jednym z najważniejszych czynników prognostycznych. Należy podkreślić również częstość tego procesu, który występuje u około 10% chorych na sarkoidozę. Najwcześniej można wykazać cechy włóknienia stosując znakowane przeciwciała przeciw kolagenowi. Uwidacznia się wówczas, już we wczesnych stadiach tworzenia się ziarniniaka, sieć otaczających go delikatnych włókien. Makrofagi pęcherzykowe pełnią tu rolę kluczową wydzielając szereg substancji stymulujących rozwój fi-

broblastów, m.in. IL-1, TNF (119, 120, 126). Istotnym spostrzeżeniem jest, iż czynniki te wydzielane są w płucach chorych na sarkoidozę, natomiast nie stwierdza się ich w płuczynach oskrzelowo-pęcherzykowych osób zdrowych (8, 15, 126). Poza tymi substancjami makrofagi pęcherzykowe uwalniają pewne ilości fibronektyny i makrofagowego czynnika wzrostu (14, 93, 141) również wpływających na włóknienie (122, 129, 130, 139).

Problemem nadal dyskutowanym w piśmiennictwie jest patomechanizm tworzenia się ziarniniaków, które poprzedza zawsze odczyn zapalny pęcherzyków płucnych (tzw. alveolitis) (39, 60, 72). Ogólna liczba komórek wzrasta, przede wszystkim na skutek powiększenia puli limfocytów.

Sprawa limfocytozy przestrzeni oskrzelowo-pęcherzykowej zajmuje główne miejsce w literaturze. Procent limfocytów uznawany za patologiczny jest różnie oceniany przez autorów. Laviolette (71) przyjmuje wartości limfocytozy powyżej 14% jako podwyższone. W pracy Li i wsp. (74) średni procent limfocytów w sarkoidozie wynosił $29 \pm 1,1\%$, podobne wyniki uzyskał Peterson (102), który podaje średni procent limfocytów $23 \pm 1,5\%$ jako patologiczny w płucnej postaci sarkoidozy.

Lecossier (72) wykazał duży rozrzut w odsetkach limfocytów: średnio $49,2 \pm 17,1\%$ u chorych na sarkoidozę. Scappaticci (127) wyróżnił grupę chorych w I stadium sarkoidozy z nasilonym odczynem zapalnym pęcherzyków, u których stwierdził średnio $41,82 \pm 7,25\%$ limfocytów i ze zmniejszonym odczynem

zapalnym pęcherzyków płucnych, u których procent limfocytów wynosił $10,46 \pm 7,98\%$. W naszych wynikach badań we wszystkich grupach chorych na sarkoidozę odsetek limfocytów w popłuczynach oskrzelowo-pęcherzykowych był powyżej 18%. Najwyższy procent limfocytów stwierdziliśmy w grupie chorych niepalących papierosów w I stadium sarkoidozy, który wynosił średnio $23,7 \pm 10,3$, wzrost ten jednak nie był znamieny statystycznie w porównaniu do pozostałych grup badanych chorych. Najwyższa limfocytoza w II grupie chorych może wynikać z umiejscowienia procesu chorobowego w I stadium sarkoidozy głównie w pęcherzykach płucnych (71, 76, 105), oraz jak widzimy na podstawie naszych danych supresyjnego wpływu palenia papierosów na miejscową odpowiedź komórkową tkanki płucnej (25, 31, 32). Z przeglądu licznych publikacji, dotyczących prognostycznego znaczenia limfocytozy w popłuczynach oskrzelowo-pęcherzykowych, nie można wyciągnąć jednoznacznych wniosków (10, 38, 72, 102, 135). Peterson i wsp. (102) badali parametry cytologiczne u chorych z różnymi postaciami sarkoidozy i wykazali dodatnią korelację pomiędzy limfocytozą powyżej 30%, a stopniem zaawansowania zmian radiologicznych w płucach. Laviolette (71) wyróżnił dwie grupy chorych na sarkoidozę płuc: z limfocytozą powyżej 30% i poniżej 30% wszystkich komórek przestrzeni oskrzelowo-pęcherzykowej. W wyniku długolej obserwacji tych chorych stwierdził, że liczba limfocytów nie jest wskaźnikiem prognostycznym, co do pogorszenia się funkcji oddechowej, ani też odpowiedzi na leczenie. Na podstawie tych danych można

sądzić, że w prognozowaniu przebiegu sarkoidozy istotne znaczenie ma nie tyle ogólna liczba limfocytów, co odsetek limfocytów T, a w tym głównie subpopulacji limfocytów T-pomocniczych (38, 111, 143). Według większości autorów, limfocyty T-pomocnicze stanowią w sarkoidozie średnio 73% wszystkich limfocytów przestrzeni oskrzelowo-pęcherzykowej (38, 50, 71, 72).

Wydaje się, iż dla przeprowadzenia właściwego porównania danych co do składu komórkowego przestrzeni oskrzelowo-pęcherzykowej przedstawianych przez poszczególnych autorów, niezbędna jest bliższa analiza tzw. grup kontrolnych. Nasze dane odnoszące się do grupy kontrolnej osób zamieszkałych w Krakowie, nie mogą być w pełni porównywalne z wynikami innych autorów: Baughman (10), Cherniak (21), Duffy (38), Lecossier (72), Yamada (149), posiadającymi bardziej wyselekcjonowany materiał tj. ludzi zdrowych. W Krakowie nie jest możliwe znalezienie grupy osób nie narażonych na działanie skażonego powietrza, w tym także przez pyły miejskie. W związku z tym stwierdziliśmy, że liczba limfocytów T helper jest w naszych przypadkach niższa, a liczba limfocytów T-supresorowych nieco wyższa, co w efekcie powoduje, że wskaźnik CD_4/CD_8 o wartości $1,1 \pm 0,5$ jest dwukrotnie niższy w odniesieniu do grupy złożonej z osób zdrowych, nie narażonych na działanie skażonego powietrza.

Innymi czynnikami, które według naszych obserwacji należy brać pod uwagę w ocenie znaczenia prognostycznego limfocytozy są: stadium choroby oraz palenie papierosów,

o czym już wzmiankowano powyżej. Charakterystyczny dla sarkoidozy wzrost limfocytów T-pomocniczych w naszej grupie badanych chorych występował tylko w I stadium sarkoidozy u chorych niepalących i wynosił średnio $73,3 \pm 3,4\%$. W grupie chorych na sarkoidozę u przewlekle palących papierosy stwierdzaliśmy obniżenie procentu limfocytów z dodatnią ekspresją dla antygenu CD_4 , średnio do $37,5 \pm 16,5\%$ w I stadium choroby i do $13,1 \pm 5,4\%$ w II i III stadium sarkoidozy. Również w grupie chorych palących zaobserwowaliśmy wzrost limfocytów T supresorowych. Powyższe wyniki naszych badań, wskazują, iż przewlekle palenie papierosów może obniżyć miejscową odpowiedź komórkową tkanki płucnej, u chorych na sarkoidozę. Jest to zgodne z naszymi uprzednimi badaniami nad zmianami w składzie komórek odczynowych przestrzeni oskrzelowo-pęcherzykowej u palących papierosy (23, 26, 31, 32). W tym zakresie nasze wyniki są zbliżone do wyników badań Cherniacka i wsp. (21). Porównywali oni grupę osób zdrowych palących i niepalących papierosów i stwierdzili w grupie zdrowych palaczy znamienne obniżenie limfocytów T-pomocniczych i wzrost limfocytów T-supresorowych, co w efekcie obniżyło wartość CD_4/CD_8 średnio do $1,64 \pm 0,29$ u zdrowych palaczy. Baughman i wsp. (9) podkreślają bardzo szeroki zakres w jakim mieści się wartość stosunku limfocytów CD_4/CD_8 w popłuczynach oskrzelowo-pęcherzykowych u chorych na sarkoidozę oceniając go między od 0,7 do 30. Jednak większość autorów: Duffy (38), Nagai (91), Poulter (111), Tomic (143), przyjmuje podwyższoną wartość CD_4/CD_8 średnio powyżej 3,5

jako jeden z najważniejszych wskaźników charakteryzujących subpopulacje komórek przestrzeni oskrzelowo-pęcherzykowej w płucnej postaci sarkoidozy.

Wśród innych czynników wpływających na różnice stosunku CD_4/CD_8 jest aktywność makrofagów. Scapaticci (127) wykazał dodatnią korelację pomiędzy zwiększonym wydzielaniem przez makrofagi pęcherzykowe TNF a wartością CD_4/CD_8 , która wynosiła średnio 6,41 u chorych na sarkoidozę z wysokim poziomem TNF w popłuczynach oskrzelowo-pęcherzkowych. Wielu autorów zwraca uwagę na zależność wskaźnika CD_4/CD_8 od aktywności procesu chorobowego, oraz leczenia sterydami (4, 5, 12). Na temat prognostycznego znaczenia wartości tego wskaźnika w sarkoidozie płuc, istnieje jednak wiele rozbieżności. Verstraeten (145) zaobserwował samoistną remisję sarkoidozy u chorych z wyjściową wysoką wartością CD_4/CD_8 średnio do $9,3 \pm 3,2$, natomiast inni autorzy twierdzą zgodnie, że jest to zły czynnik rokowniczy i u tych pacjentów należy włączyć leczenie sterydami (18, 38, 102).

W naszych badaniach wzrost stosunku CD_4/CD_8 stwierdziliśmy tylko w grupie chorych niepalących, a najwyższe wartości obserwowaliśmy w I stadium sarkoidozy. W II/III stadium sarkoidozy u chorych przewlekłe palących papierosy występowało nawet odwrócenie stosunku CD_4/CD_8 , który wynosił średnio $0,5 \pm 0,2$. Wydaje się zatem, że tzw. alveolitis, w którym występuje przewaga limfocytów T-supresorowych nie powinno wykluczać pewnych postaci sarkoidozy. Potwierdza to Quint (116) opisując cztery przypadki sarkoidozy płuc

stwierdzonej na podstawie badania radiologicznego, histologicznego i objawów klinicznych. W przypadkach tych wskaźnik CD_4/CD_8 był niższy od 1,0. Również w grupie chorych na sarkoidozę leczonych sterydami wzrasta liczba limfocytów T-supresorowych, co w efekcie obniża wartość CD_4/CD_8 (12). Van Maarseveen (81) zwraca uwagę na obecność w przestrzeni oskrzelowo-pęcherzykowej limfocytów T-supresorowych przylegających do makrofagów u chorych leczonych sterydami, co może mieć znaczenie w hamowaniu ich aktywności.

Zwiększonej liczbie limfocytów T-pomocniczych w popłuczynach oskrzelowo-pęcherzykowych chorych na sarkoidozę, towarzyszy wzrost liczby limfocytów B we krwi obwodowej, które wykazują zdolność do produkcji immunoglobulin (109). Uważa się, że hipergammaglobulinemia poliklonalna we krwi obwodowej jest spowodowana pobudzeniem limfocytów B w ziarninie sarkoidalnej. Badania w hodowlach tkankowych potwierdziły, że uczynnione limfocyty T pomocnicze mogą bezpośrednio pobudzać komórki B do syntezy immunoglobulin, poprzez wydzielanie czynnika wzrostu komórek B (BCGF) i czynnika różnicującego komórki B (BCDF). Obie substancje są konieczne dla powstania komórek syntetyzujących immunoglobuliny. Przyjmuje się, iż w ten sposób dochodzi pod wpływem tego samego czynnika (antygeny?) do wytworzenia ziarniniaka sarkoidalnego, jak również poliklonalnej aktywacji komórek B i wytwarzania immunoglobulin (65, 67, 98, 109). W grupie badanych przez nas osób znamienny wzrost odsetka limfocytów B w popłuczynach oskrzelowo-pęcherzykowych obser-

wowaliśmy w I stadium sarkoidozy u chorych palących papierosy i u wszystkich chorych w II/III stadium. Cherniack (21) opisuje wzrost odsetka limfocytów B w popłuczynach oskrzelowo-pęcherzykowych u osób zdrowych przewlekle palących papierosy. Podobny związek palenia papierosów z poziomem limfocytów B stwierdziliśmy w grupie badanych przez nas chorych na sarkoidozę płuc, a uprzednio w badaniach przeprowadzonych u chorych z pylicą azbestową i krzemową (23, 26, 32). Mechanizm wpływu składników dymu tytoniowego na wzrost liczby limfocytów B nie jest znany i wymaga dalszych badań, szczególnie dotyczących przyczyn wzrostu aktywności tych komórek u przewlekłych palaczy papierosów.

Istotnymi wskaźnikami charakteryzującymi chorych na sarkoidozę są zmiany w subpopulacjach limfocytów krwi obwodowej. Badania chorych na sarkoidozę wykazały osłabienie w różnym stopniu nadwrażliwości skórnej typu późnego w stosunku do tuberkuliny i innych antygenów (9, 1055-109). Ponadto określając subpopulacje limfocytów T krwi obwodowej stwierdzono obniżenie limfocytów T-pomocniczych, a wzrost limfocytów T-supresorowych co w efekcie prowadzi do obniżenia wartości CD_4/CD_8 poniżej 1,0 (13). Przyczyna tego zaburzenia leży przypuszczalnie w zjawisku migracji limfocytów T-pomocniczych z krążenia do miejsc rozwijającej się ziarniny (16, 109). Zaburzenia w dystrybucji komórek immunologicznych stanowią obecnie najbardziej prawdopodobne wyjaśnienie pozornej niezgodności między wzmożoną miejscową reakcją komórkową tkanki płucnej, a zmniejszeniem odporności

komórkowej w krwi obwodowej (11, 39, 105).

Odwrócenie proporcji limfocytów T we krwi obwodowej, jak na to wskazują nasze badania, nie występuje u wszystkich chorych na sarkoidozę i jej stopień zależy od zaawansowania choroby jak również wpływu dodatkowych czynników, jak np. palenie papierosów, narażenie na działanie pyłów organicznych i nieorganicznych (23, 24, 26, 31).

Próby wyjaśnienia przyczyn różnic w wartościach CD_4/CD_8 wskazują na ich złożony mechanizm. W grupie chorych palących papierosy wartość CD_4/CD_8 była wyższa od 1,0 niezależnie od stadium choroby. Może to wynikać ze zmniejszonej redystrybucji limfocytów T do tkanki płucnej w sarkoidozie, ze względu na supresyjny wpływ składników dymu tytoniowego na komórki odczynowe przestrzeni oskrzelowo-pęcherzykowej. Nie jest to zapewne jedyny mechanizm, ponieważ Cherniack i wsp. (21) oceniając subpopulacje limfocytów we krwi obwodowej u zdrowych przewlekłych palaczy, również stwierdzili wzrost stosunku limfocytów CD_4/CD_8 średnio do $2,34 \pm 0,19$ w porównaniu do grupy kontrolnej zdrowych niepalących papierosów, u których wartość CD_4/CD_8 wynosiła średnio $1,82 \pm 0,14$. Znamienne obniżenie limfocytów T-pomocniczych we krwi obwodowej badanych przez nas chorych stwierdziliśmy tylko w zaawansowanym stadium sarkoidozy w grupie chorych niepalących. Prawdopodobnie wynika to z ciągłego napływu limfocytów T-pomocniczych do aktywnej ziarniny sarkoidalnej (56, 60, 87).

Obok zmian w subpopulacjach limfocytów, do chara-

kterystycznych cech sarkoidozy, należą zmiany w aktywności i w proporcjonalnym udziale różnych subpopulacji makrofagów pęcherzykowych.

W popłuczynach oskrzelowo-pęcherzykowych makrofagi są najliczniejszą populacją komórek, w warunkach fizjologicznych, stanowiąc 90-95% puli wszystkich komórek napływowych (1, 2, 11). W stanach patologicznych liczba makrofagów podlega wybitnym zmianom. Stanowisko niektórych autorów, iż liczba makrofagów może być charakterystyczna dla poszczególnych jednostek chorobowych nie znajduje obecnie potwierdzenia (1, 2, 6, 11). Natomiast określenie aktywności tych komórek stanowi bardzo ważny element oceny miejscowej odczynowości tkanki płucnej w poszczególnych chorobach śródmiąższowych płuc (20, 28, 140). W sarkoidozie odsetek makrofagów obniża się w odniesieniu do limfocytów. Jednakże liczba makrofagów wzrasta w porównaniu do grupy kontrolnej, ze względu na wzrost bezwzględnej liczby komórek w przestrzeni oskrzelowo-pęcherzykowej chorych na sarkoidozę (2, 11, 15, 17, 18). Proces tworzenia ziarniniaków sarkoidalnych jest modulowany, poza limfocytami T-pomocniczymi, głównie przez makrofagi pęcherzykowe; stąd zmiany w ich subpopulacjach oraz aktywności warunkują przebieg i rokowania w płucnej postaci sarkoidozy (3, 7, 18, 33, 60, 70, 111, 134).

Badana przez nas zdolność makrofagów, wyizolowanych z popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych, do redukcji błękitu nitrotetrazoliowego (NBT) zarówno w warunkach spon-

tanicznych jak i po stymulacji zymosanem, różniła się w poszczególnych grupach chorych. Zwiększona zdolność makrofagów pęcherzykowych do redukcji błękitu nitrotetrazoliowego, zarówno w warunkach spontanicznych jak i po stymulacji zymosanem stwierdziliśmy tylko w grupie chorych niepalących papierosów. Natomiast w grupie chorych palących papierosy aktywność redukcyjna makrofagów była niska, zbliżona do grupy kontrolnej, a po stymulacji makrofagów zymosanem aktywność ta jeszcze zmalała. Można przypuszczać, iż stymulacja makrofagów narażonych na działanie szeregu substancji toksycznych, obciążonych cząsteczkami dymu tytoniowego, prowadziła do ich degeneracji i rozpadu, a w konsekwencji do spadku liczby makrofagów zdolnych do redukcji NBT. W dostępnym nam piśmiennictwie nie znaleźliśmy danych odnośnie wykonywania testu NBT w sarkoidozie płuc. Wielu autorów podkreśla natomiast zwiększoną zdolność makrofagów pęcherzykowych do produkcji wolnych rodników w sarkoidozie: Maier (82), Nielsen (84), Strausz (138), co może mieć znaczenie w opisywanych procesach destrukcyjnych tkanki płucnej. Wehle (147), porównując aktywność esterazy w makrofagach w grupie chorych palących i niepalących papierosów stwierdził, że u przewlekłych palaczy aktywność tego enzymu maleje. Efekt supresyjnego działania składników dymu tytoniowego na aktywność makrofagów, był tematem wcześniejszych naszych doniesień (22, 23, 24, 25, 31, 32).

Makrofagi pęcherzykowe, jak wspomniano we wstępie, nie stanowią jednorodnej grupy komórek. W sarkoidozie płuc

występują głównie subtypy makrofagów posiadających antygen komórek dendrytycznych (RFD_1) (3, 5, 6, 60, 134). Znaczną, znamioną przewagę monocytoidalnych form makrofagów stwierdziliśmy głównie w I stadium sarkoidozy w grupie chorych niepalących papierosów. W tej grupie chorych około 70% makrofagów wykazywało dodatnią ekspresję antygeny charakterystycznego dla monocytów CD_{14} . Wzrost odsetka monocytoidalnych form makrofagów, korelował dodatnio z ich wysoką aktywnością redukcji NBT, jak również wykazywał dodatnią korelację z wysokimi wartościami wskaźnika CD_4/CD_8 limfocytów z przestrzeni oskrzelowo-pęcherzykowej. Podobne wyniki badań uzyskał Agostini (1), który stwierdził, że wzrost makrofagów pęcherzykowych CD_{14} -dodatnich, dodatnio korelował z ich zwiększoną zdolnością do produkcji koagenolitycznej metaloproteazy (IV-case) także ze wzrostem limfocytów T, oraz zwiększeniem wartości CD_4/CD_8 . W świetle tych danych wydaje się, że obecność makrofagów pęcherzykowych z dodatnią ekspresją antygeny CD_{14} , jest ważnym czynnikiem wzrostu ich aktywności. Barth i wsp. (7) posługując się antygenem proliferacyjnym (Ki-67) wykazali, w grupie chorych na sarkoidozę, wzrost makrofagów pęcherzykowych Ki-67 - dodatnich, czyli zdolnych do proliferacji. Wyniki te dodatnio korelowały zarówno z liczbą limfocytów jak i z wartością CD_4/CD_8 .

Obok monocytoidalnych, aktywnych form makrofagów, w sarkoidozie płuc obecne są makrofagi dojrzałe, zwane komórkami efektorowymi. Posiadają one na swej powierzchni antygen oznaczany jako RFD_7 lub CD_{68} . Odsetek tej subpopula-

cji makrofagów w sarkoidozie jest niski (2, 60, 111, 134). Wyniki naszych badań są tylko częściowo zgodne z wyżej wymienionymi, gdyż jedynie w grupie chorych w I stadium sarkoidozy niepalących papierosów stwierdzamy niski odsetek makrofagów CD₆₈-dodatnich. Natomiast w grupie chorych, przewlekłe palących papierosy odsetek makrofagów z dodatnią ekspresją antygeny CD₆₈ znamienne wzrastał. Cytologicznie można było je rozpoznać jako duże lub olbrzymie makrofagi obciążone składnikami dymu tytoniowego koloru brunatnego, niebarwiące się w reakcji immunoenzymatycznej z przeciwciałem anti-CD₁₄, których aktywność badana testem NBT była bardzo niska, a po stymulacji zymozanem spadała prawie do zera.

Poulter i wsp. (111) wyróżnili trzecią pulę makrofagów pęcherzykowych w sarkoidozie z dodatnią ekspresją antygenów RFD₁ i RFD₇, które prawdopodobnie wywierają efekt supresyjny na limfocyty przestrzeni oskrzelowo-pęcherzykowej. Byłaby to populacja makrofagów pełniących miejscowo, w tkance płucnej, bardzo istotne funkcje regulujące aktywność komórek napływowych.

Poszukując innych wskaźników pozwalających na zróżnicowanie subpopulacji makrofagów w sarkoidozie przeprowadziliśmy liczne pomiary metodą cytomorfometrii. Oparto je o komputerową analizę obrazu, szczególnie dla obliczenia powierzchni komórek. Wyniki pomiarów przeprowadzonych u osób w grupie kontrolnej wykazały, że średnia powierzchnia makrofagów wynosiła około 140 μm^2 i była wyższa w porównaniu do

grupy kontrolnej ocenianej przez Van Meira (86), który podał średnią powierzchnię makrofagów w grupie osób zdrowych wynoszącą około $109,61 \pm 5,1 \mu\text{m}^2$. Można przypuszczać, iż różnice te odnoszą się do zwiększonej ekspozycji na pyły stałych mieszkańców Krakowa i większej aktywacji makrofagów płucnych, przyjmujących w tych warunkach formę komórek dużych lub olbrzymich wielojądrzastych (23, 25, 31).

W sarkoidozie, obserwowany jest stały dopływ świeżych monocytów z krwi obwodowej do przestrzeni oskrzelowo-pęcherzykowej, co powoduje, iż średnie pole powierzchni makrofagów maleje. Przeprowadzone przez nas pomiary dotyczące różnych stanów patologicznych płuc potwierdzają to spostrzeżenie, jednak nie we wszystkich grupach badanych chorych i nie w każdym przypadku. Na wielkość średniej powierzchni makrofagów w sarkoidozie ma znaczny wpływ nałogowe palenie papierosów, jak i stopień zaawansowania choroby. Makrofagi obciążone składnikami dymu tytoniowego znacznie powiększają swoją powierzchnię, której średnia wartość wzrasta 2-krotnie w porównaniu do grupy kontrolnej Van Meira (86), a 1,5 krotnie w porównaniu do mieszkańców Krakowa bez patologicznych zmian w płucach. W II/III stadium sarkoidozy, również w grupie chorych niepalących, zwiększa się powierzchnia makrofagów. Można przypuszczać, że wynika to ze zwiększonej migracji monocytoidalnych form makrofagów do tkanki śródmiąższowej płuc w miejscu tworzenia ziarniniaków (60, 105, 109).

Badania nasze pozwalają stwierdzić, iż w sarkoido-

nie istnieje ścisła, dodatnia korelacja pomiędzy aktywnością makrofagów pęcherzykowych, dodatnia ekspresja antygenu CD_{14} na ich powierzchni, a wzrostem limfocytów T, z przewagą limfocytów T-pomocniczych i wysoką wartością CD_4/CD_8 w przestrzeni oskrzelowo-pęcherzykowej. Dane te są w większości zgodne z danymi innych autorów (1, 7, 111). Dla oceny komórek uzyskiwanych metodą BAL w sarkoidozie, należy wziąć pod uwagę szereg dodatkowych czynników, które mogą zmieniać ich parametry morfologiczne i czynnościowe. Jednoznaczne określenie wyżej wymienionych parametrów charakteryzujących sarkoidozę jest trudne. W interpretacji wyników badań, które powinno się przeprowadzać indywidualnie w każdym przypadku należy brać pod uwagę także poprawne pobranie materiału metodą BAL, obecność dodatkowych infekcji w drogach oddechowych, wcześniejsze leczenie chorego (sterydy, antybiotyki), jego narażenie na wdychanie pyłów organicznych i nieorganicznych, a także stopień zaawansowania i aktywność sarkoidozy. Nieuwzględnienie tych czynników w pracach dotyczących przebiegu i rokowania sarkoidozy płuc sprawia, iż wyniki nie są jednoznaczne.

W N I O S K I

1. Badania cytoimmunologiczne przeprowadzone u chorych na sarkoidozę w oparciu o ocenę komórek uzyskanych z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego wskazują na znamienne różnice w ich składzie i aktywności w zależności od stadium sarkoidozy oraz wpływu dodatkowych czynników takich jak: palenie papierosów i zanieczyszczenie pyłami powietrza.

2a. I stadium sarkoidozy, w grupie chorych niepalących papierosów, charakteryzuje się:

- wysokim odsetkiem limfocytów, głównie limfocytów T-pomocniczych,

- obecnością licznych monocytoidalnych form makrofagów wykazujących dodatnią ekspresję antygeny CD₁₄, oraz zdolnością do redukcji błękitu nitrotetrazoliowego.

2b. II/III stadium sarkoidozy u chorych niepalących cechuje:

- obniżenie odsetka limfocytów T-pomocniczych, oraz zmniejszenie wartości stosunku CD₄/CD₈

- niższa aktywność makrofagów pęcherzykowych w zakresie redukcji błękitu nitrotetrazoliowego i występowanie licznych form makrofagów z dodatnią ekspresją antygeny CD₆₈.

3. W grupie chorych na sarkoidozę palących papierosy stwierdzono:

- największy wzrost ogólnej liczby komórek w przestrzeni oskrzelowo-pęcherzykowej, a zwłaszcza neutrofilów

- zaburzenie stosunku CD_4/CD_8 w II/III stadium sarkoidozy, oraz wzrost odsetka limfocytów B

- w morfometrycznej analizie makrofagów, stwierdzono znamienne przewagę dużych form makrofagów, zawierających depozyty cząsteczek pochodzących z dymu tytoniowego, cechujących się dodatnią ekspresją antygenu CD_{68} i niską aktywnością redukcji NBT.

4. Przeprowadzone równoległe badania krwi obwodowej w tych samych grupach chorych wykazały:

- brak zmian w subpopulacjach limfocytów w I stadium sarkoidozy

- odwrócenie wskaźnika CD_4/CD_8 w II/III stadium sarkoidozy w grupie chorych niepalących

5. Badanie popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych jest metodą pozwalającą na ocenę miejscowej odczynowości tkanki płucnej. Równoległe wykonywane badania krwi u tych samych chorych nie wykazały tak znamienych różnic w subpopulacjach limfocytów. Wyniki badań mogą mieć znaczenie w diagnostyce, ocenie postępu leczenia i w monitorowaniu przebiegu płucnej postaci sarkoidozy.

W interpretacji wyników należy uwzględnić ewentualny wpływ różnych czynników zewnętrznych, które mogą modyfikować uzyskane dane.

S T R E S Z C Z E N I E

Celem pracy była ocena liczby, proporcji oraz aktywności komórek odczynowych przestrzeni oskrzelowo-pęcherzykowej a także w krwi obwodowej u chorych w różnych okresach zaawansowania płucnej postaci sarkoidozy. Szczególną uwagę zwrócono na zależność zmian poszczególnych populacji komórek od stadium sarkoidozy, oraz wpływu dodatkowych czynników takich jak: palenie papierosów czy zanieczyszczenie środowiska.

Spośród 278 chorych, do szczegółowej analizy testów immunocytoologicznych i cytochemicznych wybrano grupę 110 chorych, ze zweryfikowanym rozpoznaniem sarkoidozy, nie leczonych sterydami i bez dodatkowych infekcji w drogach oddechowych. Wydzielono grupy w I i w II/III stadium sarkoidozy, a wśród nich chorych palących i niepalących papierosów. Kontrolę stanowili pacjenci bez objawów patologicznych ze strony układu oddechowego, niepalacy papierosów, w tym głównie mieszkańcy Krakowa.

Zastosowano następujące metody badań:

- cytologiczne badanie rutynowe liczby i proporcji populacji komórek odczynowych w popłuczynach oskrzelowo-pęcherzykowych, tj. makrofagów, limfocytów, neutrofilów, eozynofilów,
- immunocytoologiczną ocenę subpopulacji limfocytów przy

użyciu przeciwciał monoklonalnych CD_3 , CD_4 , CD_8 , CD_{19} oraz w metodzie immunofluorescencji pośredniej z zastosowaniem cytofluorometru przepływowego FACS-star-PLUS, tak w materiale z płuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych jak i z krwi obwodowej u tych samych chorych.

- ocenę monocytomakrofagów przeprowadzono przy pomocy:

a) cytomorfometrii używając zestawu złożonego z mikroskopu Axiophot, czarno-białej kamery CCD i komputera PCAT 386/33MHz firmy Optimus.

b) techniki immunoenzymatycznej: biotyna-streptawidyna-fosfataza alkaliczna (B-SA), przy użyciu przeciwciał monoklonalnych firmy DAKO CD_{68} i CD_{14} .

c) testu redukcji błękitu nitrotetrazoliowego (NBT), którego wyniki oceniano metodą spektrofotometryczną.

Z przeprowadzonych badań wynika, że zarówno skład jak i aktywność poszczególnych populacji komórek przestrzeni oskrzelowo-pęcherzykowej wykazują znaczne różnice w zależności od stadium sarkoidozy, oraz wpływu dodatkowych czynników takich, jak palenie papierosów, zanieczyszczenie pyłami, leczenie sterydami czy dodatkowych infekcji w drogach oddechowych.

W I stadium sarkoidozy stwierdzono: wzrost ogólnej liczby komórek, wysoki odsetek limfocytów, w tym obecność głównie T pomocniczych, jak również wzrost wskaźnika CD_4/CD_8 , obecność licznych monocytoidalnych form makrofagów wykazujących w 65% dodatnią ekspresję antygenu CD_{14} , oraz wysoką aktywność redukcji błękitu nitrotetrazoliowego.

Średnie pole powierzchni makrofagów było mniejsze w porównaniu z grupą kontrolną.

W II/III stadium sarkoidozy zaobserwowano: obniżenie odsetka limfocytów T-pomocniczych oraz zmniejszenie wartości stosunku CD_4/CD_8 , a także niższą aktywność makrofagów pęcherzykowych w zakresie redukcji błękitu nitrotrazoliowego, oraz spadek puli monocytoidalnych form makrofagów, a przewagę form dojrzałych z dodatnią ekspresją antygeny CD_{68} . Średnie pole powierzchni makrofagów w tej grupie chorych było wyższe.

W grupie chorych na sarkoidozę i palących papierosy w II/III stadium sarkoidozy stwierdzono: wzrost ogólnej liczby komórek przestrzeni oskrzelowo-pęcherzykowej, w tym zwiększenie odsetka neutrofilów, zmiany w subpopulacji limfocytów T-pomocniczych i T-supresorowych na korzyść komórek T-supresorowych, z odwróceniem stosunku limfocytów CD_4/CD_8 średnio do 0,5. Zaobserwowano również znamienny wzrost limfocytów B. Badania cytomorfometryczne wskazują też na zmiany wielkości makrofagów pęcherzykowych i przewagę form dużych, zawierających cząsteczki dymu tytoniowego. Makrofagi te cechowały się dodatnią ekspresją antygeny CD_{68} i niską aktywnością redukcyjną badaną testem NBT.

Badania krwi obwodowej wykazały: w I stadium sarkoidozy brak charakterystycznych zmian w proporcji limfocytów T chorych, natomiast wyraźne, opisane wcześniej, różnice występują w popłuczynach oskrzelowo-pęcherzykowych u tych samych chorych. W miarę trwania procesu chorobowego

w II/III stadium sarkoidozy proporcje te ulegają odwróceniu i wskaźnik CD_4/CD_8 wynosił średnio 0,7 w grupie chorych niepalących papierosów.

Na podstawie powyższych wyników można stwierdzić, iż cytologiczny obraz popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych jest charakterystyczny zwykle już we wczesnych etapach sarkoidozy, natomiast w pełni typowy obraz krwi, pojawia się dopiero w następnych etapach choroby. Oddziaływanie dodatkowych czynników zewnętrznych może zmieniać aktywność i skład subpopulacji komórek przestrzeni oskrzelowo-pęcherzykowej chorych na płucną postać sarkoidozy. Dlatego jest konieczna indywidualna interpretacja uzyskanych danych w każdym badanym przypadku.

P I Ś M I E N N I C T W O

1. Agostini C., Garbisa S., Trentin L., Zambello R., Fastelli G., Onisto M., Cipriani A., Festi G., Casara D., Semenzato G.: Pulmonary alveolar macrophages from patients with active sarcoidosis express type IV collagenolytic proteinase. An enzymatic mechanism for influx of mononuclear phagocytes at sites of disease activity. *J. Clin. Invest.*, 1989, 84, 605.
2. Agostini C., Trentin L., Zambello R., Luca M., Masciarelli M., Cipriani A., Marcer G., Semenzato G.: Pulmonary alveolar macrophages in patients with sarcoidosis and hypersensitivity pneumonitis: characterization by monoclonal antibodies. *J. Clin. Immunol.*, 1987, 7, 64.
3. Ainslie G.M., Poulter L.W., du Bois R.M.: Relation between immunocytological features of bronchoalveolar lavage fluid and clinical indices in sarcoidosis. *Thorax*, 1989, 44, 501.
4. Alberts C., Van der Mark Th.W., Jansen H.M.: Budesonide, inhaled therapy for pulmonary sarcoidosis. *Eur. Respir. J.*, 1992, 5, 268.

5. Andersson O., Bronnegard M., Sonnenfeld T., Schmekel B., Lund J., Ripe E., Gustafsson J.A.: Glucocorticoid receptor mRNA expression in pulmonary alveolar macrophages in sarcoidosis. *Chest*, 1991, 99, 1336.
6. Andreesen R., Gadd S., Costabel U., Leser H.G., Speth V., Cesnik B., Atkins R.C.: Human macrophage maturation and heterogeneity: restricted expression of late differentiation antigens in situ. *Cell Tissue Res.*, 1988, 253, 271.
7. Barth J., Kreipe H., Kiemle-Kalle J., Radzun H.J., Petermann W.: Proliferation of alveolar macrophages in pulmonary sarcoidosis correlates with markers of lymphocyte activity in bronchoalveolar lavage fluid. *Pneumologie*. 1990, 44 Suppl. 1, 224.
8. Barth J., Kreipe H., Radzun H.J., Petermann W.: Interleukin 1 secretion from alveolar macrophages in pulmonary sarcoidosis. *Pneumologie*, 1990, 44 Suppl. 1, 215.
9. Baughman R.P.: Sarcoidosis. Usual and unusual manifestation. *Chest*, 1988, 94, 165.
10. Baughman R.P., Lower E.E.: The effect of corticosteroid or methotrexate therapy on lung lymphocytes and macrophages in sarcoidosis. *Am. Rev. Resp. Dis.* 1990, 142, 1268.
11. Behera D., D'Souza G., Rajwanshi A., Jindal S.K.: Bronchoalveolar lavage - cellular characteristics in patients with idiopathic pulmonary fibrosis and sarcoidosis. *Indian J. Chest Dis. Allied. Sci.* 1990, 32, 107.

12. Bencic D., Batinic D., Cucevic I., Boranic M., Miculinic N.: The role of T-lymphocyte subpopulation in bronchoalveolar lavage in pulmonary parenchyma diseases. *Sarcoidosis*, 1990, 7, 106.
13. Bertran G., Arzt E., Resnik E., Mosca C., Nahmod V.: Inhibition of interferon gamma production by peripheral blood mononuclear leukocytes of patients with sarcoidosis. Pathogenic implication. *Chest*, 1992, 101, 996.
14. Blaschke E., Eklund A., Hernbrand R.: Extracellular matrix components in bronchoalveolar lavage fluid in sarcoidosis and their relationship to signs of alveolitis. *Am.Rev. Respir. Dis.*, 1990, 141, 1020.
15. Du Bois R.M.: The alveolar macrophage in sarcoidosis. *Sarcoidosis*, 1990, 7, 15.
16. Du Bois R.M.: Recent advances in the immunology of interstitial lung disease. *Clin. Exp. Allergy*, 1991, 21, 9.
17. Brain J.D.: Lung macrophages: how many kinds are there? What do they do? *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1988, 137, 510.
18. Brannen A. L., Chandler D. B.: Alveolar macrophage subpopulations responsiveness to chemotactic stimuli. *Am. J. Pathol.*, 1988, 132, 161.
19. Broulik P.D., Votava V., Pacovsky V.: The tubular maximum for calcium reabsorption in patients with chronic active thoracic sarcoidosis. *Eur. Respir. J.*, 1990, 3, 447.

20. Capelli A., Lusuardi M., Carli S., Donner C.F.: Acid phosphatase (EC 3.1.3.2.) activity in alveolar macrophages from patients with active sarcoidosis. Chest, 1991, 99, 546.
21. Cherniack R.M., Banks D.E., Bell D.Y., Davis G.S., Hughes J.M., King T.E.Jr.: Bronchoalveolar lavage constituents in healthy individuals, idiopathic pulmonary fibrosis, and selected comparison groups. Am. Rev. Resp. Dis., 1990, 141, 169.
22. Chłap Z., Czarnobilska E.: Activity of broncho-alveolar cell population in chronic interstitial lung disorders. Pathology Research and Practice, 1987, 182 477.
23. Chłap Z., Czarnobilska E., Gil K., Kędra D., Kopiński P.: Examination of bronchoalveolar cell population as an indicator of air pollution. 4th International Conference on Bronchoalveolar Lavage, Umea - Sweden, June 17-19, 1993.
24. Chłap Z., Czarnobilska E., Kopiński P., Gil K.: The flow cytometric assesment of the reactiv cells of the bronchoalveolar space. XII Congress of the Polish Society of Pathologists. Olsztyn, September, 24-26, Pat. Pol., 1992, 43, 104.
25. Chłap Z., Czarnobilska, E., Matzke E.: Aktywność populacji komórek przestrzeni oskrzelikowo-pecherzykowej jako wskaźnik zanieczyszczenia powietrza. Folia Medica Cracoviensia, 1992, T XXXIII, Zeszyt 1, 2.

26. Chłap Z., Owskiński J.: Możliwości i ograniczenia metody płukania oskrzelikowo - pęcherzykowego (BAL) w cytologicznej ocenie śródmiąższowych zmian w płucach. PTL, 1989, XLIV, 63.
27. Chosia M., Marsan C., Gaulier A., Mirebeau I., Pore G.: Etude en simple et double immunomarquage de sous-populations lymphocytaires du lavage broncho-alvéolaire. Rev.Fr.Lab., 1990, 216, 51.
28. Cichocki T., Litwin J.A., Szotowa W., Hanicka M., Gutkowska P., Zebrak J., Czeczótko E.: Histochemical observations on pulmonaty macrophages in cystic fibrosis. Z.Kinderheilk. 1974, 116, 127.
29. Cichocki T., Zembala M., Ptak W.: The role macrophages in the cytotoxic killing of tumour cells in vitro. Pathologica, 1975, 67, 377.
30. Czarnobilska E., Kędra D., Szot W., Chłap Z.: Morphometrical and cytoimmunological appraisal of macrophages of bronchio - alveolar space in parenchymal lung diseases. The Ninth European Anatomical Congress, Kraków, Poland, September, 14-18, 1992, 52.
31. Czarnobilska E., Kopiński P., Chłap Z.: Analiza czynników wpływających na zmiany w obrazie komórek immunokompetentnych w BAL u pacjentów z sarkoidozą. XXIV Zjazd Polskiego Towarzystwa Ftizjopneumonologicznego, Warszawa, Wrzesień, 7-9, 1992, 55.
32. Czarnobilska E., Kopiński P., Pituch-Noworolska A., Chłap Z.: Reactivity of bronchoalveolar space cells in lung asbestosis. Pat. Pol., 1992, 43, 19.

33. Deguchi Y., Kishimoto S.: Enhancement of c-sis proto-oncogene transcription in bronchoalveolar mononuclear cells from patients with pulmonary sarcoidosis. *J. Clin. Pathol.* 1990, 43, 295.
34. Djuric O., Dostanic D.: Clinico-radiological manifestations of sarcoidosis in older patients. *Eur. Resp. J.*, 1992, 5, 267.
35. Domagała-Kulawik J.: Płukanie oskrzeli i pęcherzyków płucnych - znaczenie w diagnostyce chorób płuc. *Pol. Arch. Med. Wewn.*, 1984, 71, 119.
36. Dominique S., Bouchonnet F., Smiejan J.M., Hance A.J.: Expression of surface antigens distinguishing "naive" and previously activated lymphocytes in bronchoalveolar lavage fluid. *Thorax*, 1990, 45, 391.
37. Dostanic D., Djuric O.: Cardiac sarcoidosis. *Eur. Respir. J.*, 1992, 5, 267.
38. Duffy A.M., Stevens M.W., Mc Lennan G: The immunogold staining technique for the measurement of lymphocyte subpopulations in bronchoalveolar lavage fluid. *Acta cytologica*, 1986, 30, 152.
39. Dugas M., Wallaert B., Tonnel A.B., Voisin C.: From subclinical alveolitis to granulomatosis. Sequential evaluation of pulmonary involvement in extrathoracic sarcoidosis. *Chest*, 1989, 96, 931.
40. Eden E., Turino G.M.: Interleukin 1 secretion from human alveolar macrophages in lung disease. *J. of Clin. Immunol.*, 1986, 6, 326.

41. Fireman E., Ben Efraim S., Messer G., Dabush S., Greif J., Topilsky M.: Cell-free supernatants of sarcoid alveolar macrophages suppress proliferation of sarcoid alveolar fibroblasts. Clin. Immunol. Immunopathol. 1991, 59, 368.
42. Firlik M., Sikora J.: Płukanie oskrzelowo-pęcherzykowe u chorych na sarkoidozę płuc z I stopniem zaawansowania zmian radiologicznych. Pneum. Pol., 1990, LVIII, 365.
43. Gaik A., Brzezińska-Błaszczyk E., Jarzębska M., Prochowski M., Kurczewska M.: Reaktywność mastocytów płuc i granulocytów zasadochłonnych krwi obwodowej u chorych na sarkoidozę i astmę oskrzelową. Pneumonol. Alergol. Pol., 1992, 60, 23.
44. Galve de Rochemonteix B., Nicod L.P., Junod A.F., Dayer J.M.: Characterization of specific 20 to 25-kD interleukin-1 inhibitor from cultured human lung macrophages. Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 1990, 3, 355.
45. Gerli R., Darwish S.: Memory phenotype of alveolar T cells in sarcoidosis. Chest, 1990, 98, 250.
46. Gerli R., Galandrini R., Agea E. Bini P. Tognellini R.: Pathogenetic and clinical significance of the adhesion molecule expression on T cells of the lung in sarcoid alveolitis. Medicina Firenze, 1990, 10, 38.
47. Golstein R.A.: Clinical role of broncho-alveolar lavage in adults with pulmonary disease. Am. Rev. Resp. Dis. 1990, 142, 482.

48. Van de Graaf E.A., Out T.A., Hol B.E.A., Jansen H.M., Alberts C.: Local complement activation and inflammation in pulmonary sarcoidosis. *Eur. Respir. J.*, 1992, 5, 397.
49. Gregory C.D., Shah L.P., Lee H., Golding R.: Analysis of lymphocyte subpopulations in cytocentrifuge preparations. *Medical Laboratory Sciences*, 1986, 43, 59.
50. Grunewald J., Eklund A., Ohrn M., Olerup O., Persson U., Wigzell H.: Compartmentalized V α 2.3⁺ CD4⁺ T cells in HLA-DR3⁺ sarcoidosis patients. *Eur. Respir. J.*, 1992, 5, 397.
51. Gupta S.K., Gupta S.: Sarcoidosis in India: a review of 125 biopsy-proven cases from eastern India. *Sarcoidosis*, 1990, 7, 43.
52. Hajduk B., Malecka G., Derentowicz P., Roszkowski W.: Review of diseases with the cellular system of inflammatory infiltrates. *Pneumonol. Pol.*, 1990, 58, 269.
53. Hancock W.W., Muller W.A., Cotran R.S.: Interleukin 2 receptors are expressed by alveolar macrophages during pulmonary sarcoidosis and are inducible by lymphokine treatment of normal human lung macrophages, blood monocytes cell lines. *J. Immunol.*, 1987, 138, 185.
54. Haslam P.L., Parker D.J., Townsend P.J.: Increases in HLA-DQ, DP, DR, and allergic alveolitis compared with fibrosing alveolitis. *Chest*, 1990, 97, 651.

55. Hol B.E.A., Hintzen R.Q., Van Lier R.A.W., Alberts C., Out T.A., Jansen H.M.: Soluble and cellular markers of T-cell activation in patients with pulmonary sarcoidosis. *Eur. Respir. J.*, 1992, 5, 397.
56. Holter J.F., Park H.K., Sjoerdsma K.W., Kataria Y.P.,: Noviable autologous bronchoalveolar lavage cell preparations induce intradermal epithelioid cell granulomas in sarcoidosis patients., *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1992, 145, 864.
57. Huang Z.B., Eden E.: Effect of bronchoalveolar lavage fluid from patients with sarcoidosis or AIDS on interleukin 1 beta release from alveolar macrophages. *Chest*, 1990, 98, 576.
58. Itoh A., Yamaguchi E., Kuzumaki N., Okazaki N., Furuya K., Abe S., Kawakami Y.: Expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor mRNA by inflammatory cells in the sarcoid lung. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, 1990, 3, 245.
59. Izumi T.: Sarcoidosis in the 1990s: avenues for the future. *Respiration*, 1990, 57, 176.
60. James D.G.: What makes granulomas tick? *Thorax*, 1991, 46, 734.
61. Jones K.P., Edwards J.H., Reynolds S.P., Peters T.J., Davies B.H.: A comparison of albumin and urea as reference markers in bronchoalveolar lavage fluid from patients with interstitial lung disease. *Eur. Respir. J.*, 1990, 3, 152.

62. Jones K.P., Reynolds S.P., Capper S.J., Kalinka S., Edwards J.H., Davies B.H.: Measurement of interleukin-6 in bronchoalveolar lavage fluid by radioimmunoassay: differences between patients with interstitial lung disease and control subjects. *Clin. Exp. Immunol.* 1991, 83, 30.
63. Kabbur M.B., Jain N.C., Zinkl J.G., Farver T.B.: Heterogeneity in phagocytic and nitro-blue tetrazolium reductive properties of neutrophils from cows. *Am. J. Vet. Res.*, 1991, 52, 2023.
64. Kaneshima H., Nagai S., Teshigawara K., Takeuchi M., Izumi T.: Differential expression between interleukin 1 (Il-1) and Tumour Necrosing Factor (TNF) gen in patients with pulmonary sarcoidosis. *Eur. Respir. J.*, 1992, 5, 501.
65. Keicho N., Kitamura K., Takaku F., Yotsumoto H.: Serum concentration of soluble interleukin -2 receptor as a sensitive parameter of disease actyvity in sarcoidosis. *Chest.* 1990, 98, 1125.
66. Kelly P.M., Bliss E., Morton J.A., Burns J., Mc Gee J.O.: Monoclonal antibody EBM/11: high cellular specificity for human macrophages. *J. Clin. Pathol.* 1988, 41, 510.
67. Khomenko I., Gergert V.: Density of surface antigens on blood cells of patients with lung sarcoidosis. *Eur. Respir. J.*, 1992, 5, 234.

68. Kido M., Kajiki A., Hiraoka K., Horie A.: Sarcoid reaction observed in worker with a history of asbestos exposure. *Sangyo-Ika-Daigaku-Zasshi*, 1990, 12, 355.
69. Klech H., Hutter C.: Side-effects and safety of BAL. *Eur. Respir. J.* 1990, 3, 939.
70. Kreipe H., Radzun H.J., Heidorn K., Barth J., Kiemle-Kallee J., Petermann W., Gerdes J., Parwaresch M.R.: Proliferation, macrophage colony-stimulating factor, and macrophages in active sarcoidosis. *Lab. Invest.*, 1990, 62, 697.
71. Laviolette M., La Forge J., Tennina S., Boulet L.P.: Prognostic value of bronchoalveolar lavage lymphocyte count in recently diagnosed pulmonary sarcoidosis. *Chest*, 1991, 100, 380.
72. Lecossier D., Valeyre D., Loiseau A., Battesti J.P., Soler P., Hance A.J.: T-lymphocytes recovered by bronchoalveolar lavage from normal subjects and patients with sarcoidosis are refractory to proliferative signals. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1988, 137, 592.
73. Lee T.H., Crea A.E., Gant V., Spur B.W., Marron B.E., Nicolaou K.C., Reardon E., Brezinski M., Serhan C.N.: Identification of lipoxin A4 and its relationship to the sulfidopeptide leukotrienes C4, D4, and E4 in the bronchoalveolar lavage fluids obtained from patients with selected pulmonary diseases. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1990, 141, 1453.

74. Li Z.H., Hou X.M., Li B.J.: Cytological examination of bronchoalveolar lavage fluid and its clinical significance in patients with diffuse interstitial lung diseases. *Chung- Hua- Nei- Ko- Tsa- Chih*, 1990, 29, 59.
75. Li X.Y., Brown G.M., Lamb D., Donaldson K.: Secretion of plasminogen activator inhibitor by normal rat pleural leukocytes in cultur. *Lung*, 1990, 168, 309.
76. Lipińska R., Sokolnicka I., Skopińska-Różewska E., Pirożyński M., Piasecki Z., Roszkowski W.: Analiza składu komórkowego płynu oskrzelowo-pęcherzykowego. I. Wykrywanie populacji makrofagów. *Pneumonol. Alergol. Pol.*, 1991, 59, 7.
77. Lowery W.S., Whitlock W.L., Dietrich R.A., Fine J.M.: Sarcoidosis complicated by HIV infection: three case reports and a review of the literature. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1990, 142, 887.
78. Luisetti M., Bacchella L.L., Meloni F., Venturini R., Barbano L., Anchisi F., Manara G., Aprile C.: Procollagen propeptides in patients with sarcoidosis. *Eur. Respir. J.*, 1992, 5, 235.
79. Luisetti M., Bulgheroni A., Bacchella L., Pasturenzi L., Aprile C.: Elevated serum procollagen III aminopeptide levels in sarcoidosis. *Chest.*, 1990, 98, 1414.

80. Luisetti M., Pasturenzi L., Martinetti M., Semenzato G., Cipriani A., Peona V., Bulgheroni A., Finco O., Daielli C., Donnetta A.M., Tommasini A., Leo G., Guccia M.: HLA and sarcoidosis in Italian patients belonging to two different areas. *Eur. Respir. J.*, 1992, 5, 234.
81. Van Maarseveen T.C., Mullink H., Stam J., de Groot J.: Macrophage T-suppressor cell interference in the lungs of steroid-treated sarcoidosis patients. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1991, 143, 839.
82. Maier K., Leuschel L., Costabel U.: Increased levels of oxidized methionine residues in bronchoalveolar lavage fluid proteins from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1991, 143, 271.
83. Marsan C., Cava E., Épaillard B.: Aspects cytologiques de macrophages dans les liquides organiques. *Rev. Fr. Lab.* 1991, 221, 43.
84. Martinet Y., Yamauchi K., Crystal R.G.: Differential expression of the tumor necrosis factor/cachectin gene by blood and lung mononuclear phagocytes. *Am., Rev. Respir. Dis.* 1988 138, 659.
85. Meier-Sydow J., Kronenberger H., Rust M.: Transbronchial biopsy of the lung and bronchoalveolar lavage in the diagnosis of sarcoidosis. *Probl. Tuberk.* 1990, 25.
86. Van Meir F: Planimetry of bronchoalveolar macrophages. Importance of preparation and staining techniques. *Analytical and Quantitative Cytology and Histology*, 1991, 13 261.

87. Muller-Quernheim J.: Immunopathogenesis of sarcoidosis: current practical knowledge. *Z. Gesamte Inn. Med.* 1990, 45, 573.
88. Mylius E.A., Gullvag B.: Alveolar macrophage count as an indicator of lung reaction to industrial air pollution. *Acta Cytologica*, 1986, 30,157.
89. Muthiah M.M., Macfarlane J.T.: Current concepts in the management of sarcoidosis. *Drugs*. 1990, 40, 231.
90. Nagai S., Aung H., Takeuchi M., Kusume K., Izumi T.: Il-1 and Il-1 inhibitory activity in the culture supernatants of alveolar macrophages from patients with interstitial lung diseases. *Chest*, 1991, 99, 674.
91. Nagai S., Satake N., Kaneshima H., Kawatani A., Takeuchi M., Izumi T.: Expression of adhesion molecules on lung T cells and macrophages in patients with pulmonary sarcoidosis. *Eur. Respir. J.* 1992, 5, 501.
92. Nakstad B., Lyberg T., Baklien K., Boye N.P.: Antigenic specificity of human alveolar macrophages and blood monocytes studied by an immunofluorescence technique. *J. Pathol.*, 1989, 157, 99.
93. Nakstad B., Boye N.P., Lyberg T.: Distribution of bronchoalveolar cells and fibronectin levels in bronchoalveolar lavage fluids from patients with lung disorders. *Scand J. Clin. Lab. Invest.* 1990, 50, 587.

94. Nielsen H., Frederiksen J., Sherson D., Milman N.: Comparison of alveolar macrophage and blood monocyte oxidative burst response in pulmonary sarcoidosis. *APMIS*, 1990, 98, 401.
95. Ogushi F., Sone S., Singh S.M., Tani K., Ozaki T., Yasuoka S., Ogura T., Honda M.: Elevated level of soluble interleukin 2 receptor in bronchoalveolar lavage fluid from sarcoidosis patients. *Jpn J. Med.* 1991, 30, 113.
96. Ohdama S.: The role of chemotactic factor in the pathogenesis of sarcoid granuloma formation. *Nippon-Kyobu-Shikkan-Gakkai-Zasshi.*, 1990, 28, 457.
97. Okano A., Sato A., Chida K., Iwata M., Yasuda K., Shichi I., Suda T.: Improvement in alveolar macrophage function after therapeutic lung lavage in pulmonary alveolar proteinosis. *Nippon-Kyobu-Shikkan-Gakkai-Zasshi*, 1990, 28, 723.
98. Oklek K., Ziora D., Niepsuj G., Jastrzebski D.: Cell count and immunoglobulin level in the bronchoalveolar lavage fluid in patients with sarcoidosis. *Pneumonol. Pol.*, 1990, 58, 17.
99. Oremek G., Siekmeier R., Kronenberger U.E.H., Kullmer T.: Activity of angiotensin converting enzyme and effect of sample storage in patients with lung fibrosis, sarcoidosis and chronic bronchitis. *Eur. Respir. J.* 1992, 5, 398.

100. Van Oud Alblas A. B., Van Furth R.: Origin, kinetics, and characteristics of pulmonary macrophages in the normal steady state. *J. Exp. Med.*, 1979, 149, 1504.
101. Pande J.N., Sharma S.K., Verma K.: Value of enumerating cellular constituents of bronchoalveolar lavage fluid in differentiating sarcoidosis and cryptogenic fibrosing alveolitis. *Sarcoidosis*, 1990, 7, 96.
102. Peterson M. W., Nugent K. M., Jolles H., Monick M., Hunninghake G. W.: Uniformity of bronchoalveolar lavage in patients with pulmonary sarcoidosis. *Am. Rev. Resp. Dis.*, 1988, 137, 79.
103. Pettersen H.B., Johnson E., Garred P., Hetland G., Osen S.S., Mollnes T.E.: Quantification of non-activated (native) complement C9 synthesized by alveolar macrophages from patients with sarcoidosis. *Scand. J. Immunol.*: 1990, 31, 657.
104. Pettersen H.B., Johnson E., Osen S.S.: Phagocytosis of agarose beads by receptors for C3b (CR1) and iC3b (CR3) on alveolar macrophages from patients with sarcoidosis. *Scand J. Immunol.* 1990, 32, 669.
105. Pirożyński M., Cieśliski J.: Patogeneza sarkoidozy układu oddechowego. *Pneum.Pol.* 1989, LVII, 2.
106. Płusa T., Chcialowski A., Piechota W., Pirożyński.: Activity of angiotensin I converting enzyme in sarcoidosis, atopic bronchial asthma and acute bronchitis. *Allergol. Immunopathol. Madr.* 1990, 18, 217.

107. Piłusa T., Pirożyński M., Piechota W.: Aktywność enzymu konwertującego angiotensynę I w surowicy i materiale z płukania oskrzelikowo-pęcherzykowego chorych na sarkoidozę i raka płuca. *Pneumonol. Alergol. Pol.* 1991, 59, 7.
108. Piłusa T., Tchórzewski H.: In vivo evaluation of bronchoalveolar lavage (BAL) fluid in atopic bronchial asthma, chronic bronchitis and sarcoidosis patients. *Allerg. Immunol. Leipz.* 1990, 36, 11.
109. Podwysocki B.: Immunopatogeneza i immunologia sarkoidozy płuc. *PTL*, 1989, XLIV, 34-35, 779.
110. Poulter L.W.: Changes in lung macrophages during disease. *FEMS Microbiol. Immunol.* 1990, 2, 327.
111. Poulter L.W., Rossi G.A., Bjermer L., Costabel U., Israel-Biet D., Klech H., Pohl W., Velluti G.: The value of bronchoalveolar lavage in the diagnosis and prognosis of sarcoidosis. *Eur. Respir. J.* 1990, 3, 943.
112. Prior C., Barbee R.A., Evans P.M., Townsend P.J., Primett Z.S., Fyhrquist F., Gronhagen-Riska C., Haslam P.L.: Lavage versus serum measurements of lysozyme, angiotensyn converting enzyme and other inflammatory markers in pulmonary sarcoidosis. *Eur. Respir. J.* 1990, 3, 1146.
113. Prior C., Haslam P.L.: Increased levels of serum interferon-gamma in pulmonary sarcoidosis and relationship with response to corticosteroid therapy. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1991, 143, 53.

114. Prior C., Spiteri M.A., Herold M., Knight R.A., Clarke S.W.: Enhanced spontaneous release of Il-1, Il-6, TNF-alpha and GM-CSF by bronchoalveolar cells in pulmonary sarcoidosis. *Eur. Respir. J.* 1992, 5, 234.
115. Quigley C., Donnelly S., FitzGerald MX.: Analysis of sarcoid chest x-rays over 5 years using a computerised information system. *Eur. Respir. J.*, 1992. 5, 267.
116. Quint L., Sadoun D., Valeyre D., Soler P., Georges R., Battesti J.P.: CD8 + T-cell lymphocytic alveolitis in sarcoidosis. 4 cases. *Presse Med.* 1991, 20, 593.
117. Rankin J.A., Huang S.S., Sostman H.D., Gee J.B., Reynolds H.Y.: An analysis of the inter-relationships among multiple bronchoalveolar lavage and serum determinations, physiologic tests, and clinical disease activity in patients with sarcoidosis. *Sarcoidosis*, 1991, 8, 19.
118. Rizzato G., Montemurro L., Fraioli P.: Sarcoid relapse after withdrawal of steroid therapy. *Eur. Respir. J.*, 1992, 5, 268.
119. Robbins R.A., Russ W.D., Thomas K.R., Rasmussen J.K., Kay H.D.: Complement component C5 Is required for release of alveolar macrophage-derived neutrophil chemotactic activity. *Am. Rev. Resp. Dis.*, 1987, 135, 659.
120. Robinson B.W., Rose A.H.: Pulmonary gamma interferon production in patients with fibrosing alveolitis. *Thorax*, 1990, 45, 105.

121. De Rose V., Crivellari M.T., Vigano T., Folco G.C., Trentin L., Masciarelli M., Semenzato G., Pozzi E., Gialdroni-Grassi G.: Metabolism of arachidonic acid in human alveolar macrophages from patients with sarcoidosis. *Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukotriene Res.* 1991, 21, 445.
122. Rossman M.D., Maida B.T., Douglas S.D.: Monocyt-derived macrophage and alveolar macrophage fibronectin production and cathepsin D activity. *Cell. Immunol.*, 1990, 126, 268.
123. Rottoli P., Rottoli L., Gonnelli S., Zacchei F., Coviello G., Piccolo L., Panzardi G., Solitro S., Gennari C., Vagliasindi M.: Changes in calcium metabolism and bone density in sarcoidosis. *Eur. Respir. J.*, 1992, 5, 267.
124. Rowińska-Zakrzewska E., Wiatr E., Pirożyński M.: Śródmiąższowe choroby płuc. CMKP, Warszawa 1991.
125. Santos I.F., Oliveira L., Ferro R., Teles de Araujo A., Cantinho G., Godinho F., Freitas e Costa M.: The pulmonary epithelium permeability (PEP) in the management of sarcoidosis. *Eur. Respir. J.*, 1992, 5, 268.
126. Sato T., Kudo K., Aotsuka S., Kabe J.: Spontaneous production of interleukin-1 alpha and beta by alveolar cells from patients with sarcoidosis. *Nippon-Kyobu-Shikkan-Gakkai-Zasshi.* 1990, 28, 1149.

127. Scappaticci E., Libertucci D., Bottomicca F., Da Col R., Silvestro L., Tetta C., Camussi G.: Platelet-activating factor in bronchoalveolar lavage from patients with sarcoidosis. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1992, 146, 433.
128. Senju M., Hulstaert F., Lowder J., Jewell D.P.: Flow cytometric analysis of peripheral blood lymphocytes in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut*, 1991, 32, 779.
129. Sibille Y., Martinot J.B., Polonski L.L., Wallaert B., Demusis M., Rankin J.A., Voisin C., Gee J.B.: Phagocyte enzymes in bronchoalveolar lavage from patients with pulmonary sarcoidosis and collagen vascular disorders. *Eur. Respir. J.*, 1990, 3, 609.
130. Shaw R.J., Benedict S.H., Clark R.A.F., King T.E.jr: Pathogenesis of pulmonary fibrosis in interstitial lung disease: Alveolar macrophage PDGF (B) gene activation and up-regulation by interferon gamma. *Am.Rev.Resp. Dis.*, 1991, 143, 167.
131. Spatafora M., Merendino A., Chiappara G., Gjomarkaj M., Melis M., Bellia V., Bonsignore G.: Lung compartmentalization of increased TNF releasing ability by mononuclear phagocytes in pulmonary sarcoidosis. *Chest*, 1989, 96, 542.
132. Specks U., Martin W.J., Rohrbach M.S.: Bronchoalveolar lavage fluid angiotensin-converting enzyme in interstitial lung diseases. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1990, 141, 117.

133. Spiteri M.A., Clarke S.W., Poulter L.W.: Alveolar macrophages that suppress T-cell responses may be crucial to the outcome of pulmonary sarcoidosis. *Eur. Respir. J.*, 1992, 5, 394.
134. Spiteri M., Poulter L.W., James D.G.: The macrophage in granuloma formation. *Sarcoidosis* 1989, 6, 12.
135. Spurzem J.R., Salitini C., Crystal R.G.: Functional significance of anti-T-lymphocyte antibodies in Sarcoidosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1988, 137, 600.
136. Stepling H., Muhlburger M., Muller Quernheim J., Hurter T.: Reproducibility of differential bronchoalveolar lavage cytology in sarcoidosis in relation to elapsed time between bronchoalveolar lavage and sample processing. *Pneumologie*, 1990, 44 Suppl.1, 565.
137. Strausz J., Mannel D.N., Pfeifer S., Borkowski A., Ferlinz R., Muller-Quernheim J.: Spontaneous monokine release by alveolar macrophages in chronic sarcoidosis. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 1991, 96, 68.
138. Strausz J., Muller-Quernheim J., Stepling H., Nagel M., Ferlinz R.: Oxygen radical production by alveolar macrophages in sarcoidosis in relation to activity status of bronchoalveolar lavage lymphocytes. *Pneumologie*, 1990, 44 Suppl. 1, 222.
139. Suwabe A., Nakamura H., Yakuwa N., Takahashi K., Yasui S.: Theregulation of lung fibroblast proliferation by alveolar macrophages. *Japanese Journal of Thoracis Diseases*, 1988, 26, 629.

140. Szklarz E.: Expression of HLA-DR antigens, Fc IgG and C3 receptors on lung macrophages in sarcoidosis and idiopathic lung fibrosis. Arch. Immunol. Thor. Exp. Warsz., 1990, 38, 185.
141. Tani K., Yasuoka S., Ogushi F., Noda Y., Asada K., Ozaki T., Ogura T.: Fibroblast growth-stimulating activity in bronchoalveolar lavage fluid with pulmonary sarcoidosis. Jpn J. Med. 1990, 29, 576.
142. Tazi A., Nioche S., Chastre J., Smiejan J.M., Hance A.J.: Spontaneous release of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) by alveolar macrophages in the course of bacterial pneumonia and sarcoidosis. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 1991, 4, 140
143. Tomic I., Colic M., Lilic D., Dujic A., Dangubic V.: Analysis of immunocompetent cells in bronchoalveolar lavage in patients with sarcoidosis. Plucne Bolesti, 1990, 42, 92.
144. Vallee D., Muller P., de Wall N., Atay Z.: Value of bronchoalveolar lavage and findings of cytologic studies in the diagnosis of interstitial lung diseases. Pneumologie, 1990, 44 Suppl 1, 301.
145. Verstraeten A., Demedts M., Verwilghen J., van den Eeckhout A., Marien G., Lacquet L.M., Ceuppens J.L.: Predictive value of bronchoalveolar lavage in pulmonary sarcoidosis. Chest, 1990, 98, 560.

146. Wallaert B.: Value of bronchoalveolar lavage in the diagnosis and management of diffuse interstitial fibrosing lung diseases. *Rev. Prat.* 1991, 41, 1267.
147. Wehle K., Pfitzer P.: Nonspecific esterase activity of human alveolar macrophages in routine cytology. *Acta cytologica*, 1988 32, 153.
148. Weiss W.: The Cigarette Factor in Asbestosis. *Chest*, 97, 769.
149. Yamada M., Tamura N., Shiral T.: Flow cytometric analyses of lymphocyte subsets in the broncho-alveolar lavage fluid and peripheral blood of healthy volunteers. *Scan J. Immunol.*, 1986, 24, 559.
150. Yamaguchi E., Okazaki N., Itoh A., Furuya K., Abe S., Kawakami Y.: Enhanced expression of CD2 antigen on lung T cells. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1991, 143, 829.
151. Załęska J., Pirożyński M., Sokolnicka I., Derentowicz P., Radwan L., Roszkowski W., Rowińska-Zakrzewska E.: Rola BAL w podejmowaniu decyzji o leczeniu u chorych na sarkoidozę. *Pneum. Pol.* 1990, 58, 167.
152. Zych D., Krychniak W., Pawlicka L., Radwan L.: Częstość występowania i przebieg zmian włóknistych u chorych na sarkoidozę płuc. *Pneum. Pol.*, 1989, LVII, 2, 100.