

Eozinofilų adhezijos poveikis bronchų lygiųjų raumenų proliferacijai sergant astma

EFFECT OF EOSINOPHILS ADHESION TO AIRWAY SMOOTH MUSCLE CELLS PROLIFERATION IN ASTHMA

ANDRIUS JANUŠKEVIČIUS¹, IEVA JANULAITYTĖ¹, VIRGINIJA KALINAUSKAITĖ-ŽUKAUSKĖ², AIRIDAS RIMKŪNAS¹, BEATRIČĖ TAMAŠAUSKAITĖ¹, KĘSTUTIS MALAKAUSKAS^{1,2}

¹LSMU MA Pulmonologijos klinikos Pulmonologijos laboratorija, ²LSMU MA Pulmonologijos klinika

Santrauka. Įvadas. Eozinofilinis kvėpavimo takų uždegimas – svarbus astmos patogenezės komponentas. Eozinofilai yra gebančios adhezuoti ląstelės, nes turi pagrindinius adhezijos receptorius – integrinus, kurie ne tik atlieka prisitvirtinimo funkciją, bet gali elgtis kaip signalo perdavėjai abipus komunikuojančių ląstelių. Manoma, kad ne visi eozinofilai pasižymi vienodomis adhezinėmis savybėmis ir priklausomai nuo to gali skirtis savo atliekamomis funkcijomis. Taip pat dėl adhezijos per paviršiaus integrinus eozinofilai yra ne tik užlaikomi plaučių audiniuose greta struktūrinių ląstelių, bet gali pakisti ir jų aktyvumas. Geresnis supratimas apie eozinofilų adhezių savybių svarbą padėtų pritaikyti integrinų arba jų ligandų blokavimą specifiniais antikūnais ir taip valdyti poveikį kvėpavimo takų struktūriniais pokyčiams sergantiesiems astma. **Tyrimo tikslas** – įvertinti eozinofilų adhezių savybių svarbą bronchų lygiųjų raumenų (BLR) ląstelių proliferacijai sergantiesiems astma. **Tyrimo metodai.** Į tyrimą įtraukti septyni naujai diagnozuota astma sergantys pacientai, kurie dar negydyti gliukokortikoidais, ir šeši nerūkantys sveiki asmenys. Eozinofilai iš tiriamųjų periferinio kraujo buvo išskiriami naudojant centrifugavimą aukšto tankio Ficoll gradiente ir magnetinę separaciją. Buvo sudaromos individualiosios kombinuotos kultūros tarp nemirtingos žmogaus BLR ląstelių linijos ir išskirtų eozinofilų, pritaikant ląstelių santykį atitinkamai – 1:6, 1:3 bei 1:1,5 (37 500 BLR ląstelių bei 6 250, 12 500 ir 25 000 eozinofilų). Eozinofilų adhezinės savybės įvertintos matuojant eozinofilų peroksidazės aktyvumą kombinuotose kultūrose. BLR ląstelių proliferacija vertinta praėjus 72 val. po kombinuotos kultūros sudarymo naudojant Alamaro mėlio metodą. **Rezultatai.** Taikant BLR ląstelių ir sergančiųjų astma eozinofilų santykį kombinuotoje kultūroje 1:6 ir 1:3, buvo gauta panaši prisitvirtinusių eozinofilų proporcija: 63,0±6,2 proc. ir 70,9±4,6 proc. nuo visų įpiltų eozinofilų. Padidinus įpiltų sergančiųjų astma eozinofilų skaičių iki santykio 1:1,5, nustatytas patikimas prisitvirtinusių eozinofilų proporcijos sumažėjimas iki 48,9±5,1 proc. ($p<0,05$), galimai dėl per mažo prisitvirtinimui tinkamų vietų skaičiaus. Tuo tarpu matuojant sveikų asmenų eozinofilų adheziją, rezultatai visais atvejais išliko panašūs, atitinkamai – 45,0±4,1 proc., 48,7±5,7 proc. ir 49,5±3,4 proc. Panaši tendencija pastebėta vertinant ir eozinofilų poveikį BLR ląstelių proliferacijai. Sergančiųjų astma grupėje taikant santykį 1:6 ir 1:3, absoliutūs prisitvirtinusių eozinofilų skaičius kito, tačiau poveikis BLR proliferacijai išliko panašus (atitinkamai 13,0±4,1 proc. ir 14,4±2,2 proc. padidėjimas, $p<0,05$), lyginant su kontrolinių BLR ląstelių proliferacija be eozinofilų poveikio. Tuo tarpu padidinus eozinofilų kiekį iki santykio – 1:1,5, statistškai patikimo poveikio proliferacijai nenustatyta. Sveikų asmenų grupėje, taikant santykį – 1:6 ir 1:3, patikimos įtakos BLR ląstelių proliferacijai nerasta, tačiau padidinus eozinofilų skaičių iki santykio 1:1,5, nustatytas patikimas 8,5±3,4 proc. proliferacijos sumažėjimas ($p<0,05$). **Išvados.** Gebančių adhezuoti eozinofilų santykis periferiniame kraujyje yra pastovus, o eozinofilų aktyvumas bei įtaka BLR ląstelių proliferacijai galimai priklauso nuo jų adhezių savybių.

Reikšminiai žodžiai: eozinofilai, adhezija, bronchų lygieji raumenys, proliferacija, astma.

Summary. Introduction. Eosinophilic airway inflammation is an important feature in asthma pathogenesis. Eosinophils are adhesive cells, because they have the main adhesion receptors – integrins, that are responsible not only for eosinophils attachment, but also can act as signal-transducers between communicating cells. It is believed that not all eosinophils are characterized by the same adhesive properties and depending on it can have a different functions. Based on it, better understanding of eosinophils adhesion could be adapted on integrins or their ligands blocking with specific antibodies, reducing eosinophils effect to airway structural changes in asthma. **Aim** – to evaluate the importance of eosinophils adhesion to airway smooth muscle (ASM) cells proliferation in asthma. **Methods.** 7 steroids-free asthmatic patients and 6 non-smoking healthy subjects were included into the study. Peripheral blood eosinophils were isolated by using high density Ficoll centrifugation and magnetic separation. An individual combined cell cultured between immortalised airway smooth muscle (ASM) cells and isolated eosinophils was made, by using different ratio (37,500 and 6,250, 12,500 and 25,000 eosinophils respectively). Eosinophils adhesion was evaluated by measuring eosinophils peroxidase activity in combined cell cultures. ASM cells proliferation after 72 h of making combined cell cultures by Alamar blue assay. **Results.** By using the ratio of ASM cells and asthmatic eosinophils 1:6 and 1:3 was received similar attached eosinophils proportion – respectively 63.0±6.2% and 70.9±4.6% from whole added eosinophils. Increasing

Moksliniai darbai ir apžvalgos

added asthmatic eosinophils count to the ratio 1:1.5 was received significantly reduced proportion of attached eosinophils to 48.9 ± 5.1 ($p < 0.05$), probably due to not enough specific adhesive sites. Meanwhile measuring healthy eosinophils adhesion in all cases results maintain similar, respectively 45.0 ± 4.1 , 48.7 ± 5.7 and 49.5 ± 3.4 . Similar tendency noticed measuring eosinophils effect to ASM proliferation. Although in asthmatic patients group after using ratios 1:6 and 1:3 absolute number of attached eosinophils was different, their effect to ASM cells remains the same (respectively increase in 13.0 ± 4.1 and $14.4 \pm 2.2\%$, $p < 0.05$) comparing with proliferation of control ASM cells, without incubation with eosinophils. Whereas after increasing added asthmatic eosinophils count to the ratio 1:1.5 statistically significant effect to cells proliferation was not received. In healthy eosinophils group after using ratios 1:6 and 1:3 significant effect to ASM cells proliferation was not determined, however, after increasing added asthmatic eosinophils count to the ratio 1:1.5 was received significantly reduced ASM cells proliferation by $8.5 \pm 3.4\%$ ($p < 0.05$). **Conclusion.** Adhesive eosinophils ratio in peripheral blood remains stable and eosinophils activity and effect to ASM cells proliferation depends by eosinophils adhesive properties.

Keywords: eosinophils, adhesion, airway smooth muscle, proliferation, asthma.

IVADAS

Eozinofilija kvėpavimo takuose – vienas iš astmą charakterizuojančių požymių. Pastaraisiais metais daugėja publikacijų, kuriose siekiama geriau suprasti procesus, lemiančius jų skaičiaus plaučiuose padidėjimą bei poveikį audiniams. Eozinofilų infiltracija į plaučių audinį yra pagrindinis uždegiminių procesų veiksnys sergant astma. Toks eozinofilų judėjimas iš kraujotakos sistemos yra dinaminis, daugiapakopis procesas, kuris apima ląstelių sukibimo bei riedėjimo kraujagyslių endotelio paviršiumi procesus, pirminę aktyvaciją bei adheziją, galiausiai transendotelinę ir subendotelinę migraciją [1]. Pirminė eozinofilų funkcija yra kovoti su patogenais, suskaidant juos citotoksinių katijoninių baltymų pagalba, kurie saugomi viduląstelinėse granulėse. Nors žinoma, kad dėl šių baltymų eozinofilai gali būti toksiški daugeliui audinių [2], jie taip pat yra svarbus uždegiminių citokinų, chemokininų, augimo veiksnių bei fermentų šaltinis [3], kurių kiekybiniai ir kokybiniai pokyčiai gali sutrikdyti kvėpavimo takų homeostazę bei skatinti remodeliacijos vystymąsi. Dėl šių funkcijų pasiskirstymo eozinofilai gali būti skirstomi į skatinamuosius ardymo procesus arba remodeliacijos vystymąsi.

Eozinofilai yra galinčios adhezuoti ląstelės, nes jų paviršiuje yra ekspresuojami adhezijos receptoriai, kurių pagalba jie prisitvirtina prie užląstelinio užpildo baltymų arba kitos ląstelės paviršiaus bei leidžia eozinofilams atpažinti juos supančią aplinką ir greitai į ją reaguoti. Integrinai yra gausiausi eozinofilų paviršiuje ekspresuojami adhezijos receptoriai [4], o nuo jų aktyvacijos priklauso, ar eozinofilai prisitvirtins prie kraujagyslių endotelio, o taip pat ir transmigracija į plaučius. Integrinai – tai specifinių ląstelės paviršiaus adhezijos receptorių superšeima, kurie prisijungia prie ląstelės paviršiaus adhezijos molekulių, užląstelinio užpildo baltymų arba tirpių ligandų [5, 6]. Tai transmembraniniai $\alpha\beta$ heterodimerai, kuriuos sudaro mažiausiai 18α ir 8β subvienetai, kartu formuojantys 24 skirtingus jų darinius. Prisijungdami užląstelinius ligandus, integrinai perduoda signalą į ląstelės vidų ir atvirkščiai – jų

veikla gali būti reguliuojama iš ląstelės vidaus gautų signalų [5]. Integrinai sudaro tarpmembraninę jungtį tarp užląstelinio ligando (kitos ląstelės arba užpildo baltymų) ir ląstelės citoskeleto aktino mikrofilamentų. Daug skirtingų baltymų citoplazminėje dalyje, tokių kaip talinas, vinkulinas, moezinas ir kiti aktiną prisijungiantys baltymai, tai yra jungtys tarp citoplazminio integrinų domeno ir citoskeleto lemiant kompleksines sąveikas. Užląstelinio ligando prisijungimas sužadina įvairius signalo perdavimo kelius ir valdo ląstelės elgseną, įskaitant adheziją, proliferaciją, išgyvenamumą, apoptozę, formą, poliškumą, migraciją, genų raišką ir diferenciaciją [5, 7, 8].

Migravę per kraujagyslių endotelį eozinofilai patenka į kvėpavimo takus greta BLR sluoksnio arba jungiamojo audinio. Plaučių struktūrinės ląstelės, tokios kaip BLR, fibroblastai, epitelio arba endotelio ląstelės, savo paviršiuje ekspresuoja specifines adhezijos molekules: ICAM-1 ir VCAM-1. Šios molekulės gali atstovauti kaip substratai eozinofilų paviršiaus integrinams $\alpha 4\beta 1$ ir $\alpha M\beta 2$, nuo kurių priklauso eozinofilų perėjimas į aktyviąją stadiją astmos metu [9]. Periferinio kraujo eozinofilai turi sąlyginai trumpą gyvenimo pusperiodį – nuo 8 iki 18 val., tuo tarpu migravusių į atinkamus organus eozinofilų gyvybingumas prailgėja iki šešių dienų [10]. Gyvybingumo prailgėjimas gali būti grindžiamas egzistuojančia sąveikia tarp eozinofilų ir struktūrinių ląstelių arba užląstelinio užpildo baltymų, kuri būdinga tik migravusiems į audinius eozinofilams.

Sergant astma, patikimai padidėja eozinofilų infiltracija į kvėpavimo takus [11]. Tačiau kvėpavimo takų remodeliacija, kurios vystymąsi skatina eozinofilai, priklauso ne tik nuo jų skaičiaus kvėpavimo takuose, bet ir nuo adhezijos bei gyvybingumo, kurie tiesiogiai susiję su jų užlaikymu plaučių audiniuose prieš išmigruojant į bronchų spindį. Šio tyrimo tikslas – išsiaiškinti, ar tiesioginis kontaktas tarp eozinofilų ir BLR ląstelių turi įtakos jų proliferacijai sergant astma, ar tai priklauso nuo gebančių adhezuoti eozinofilų proporcijos bei specifinių sukibimo vietų skaičiaus kombinuotoje kultūroje.

METODAI IR MEDŽIAGOS

Tiriamųjų kontingentas

Bendras tyrimo protokolas patvirtintas Regioninio Biomedicinos tyrimų Etikos komiteto (leidimo Nr. BE-2-13). Visi tiriamieji pasirašė Informuoto asmens sutikimo formą. Į tyrimą įtraukti septyni pacientai, kuriems Lietuvos sveikatos mokslų universiteto ligoninės Kauno klinikų Pulmonologijos klinikoje naujai diagnozuota alerginė astma ir dar negydyti gliukokortikoidais, bei šeši sveiki nerūkantys asmenys (kontrolinė grupė). Alerginė astma buvo diagnozuota remiantis klinikiniais simptomais, ligos anamneze, teigiamais odos dūrio mėginiais prieš dažniausiai pasitaikančius įkvepiamus alergenų bei teigiamu bronchų provokaciniu mėginiu su metacholinu. Sveiki asmenys nesirgo jokiais ligomis ir neturėjo alergijos. Išsamesni tiriamųjų demografiniai ir klinikiniai duomenys pateikiami lentelėje.

Kraujo eozinofilų išskyrimas

Punktuojuant periferinę veną, tiriamųjų kraujas buvo surenkamas į mėgintuvėlius su antikoagulantu EDTA (3×8 ml) ir nedelsiant naudotas eozinofilų išskyrimui.

Eozinofilų išskyrimui buvo pritaikomi centrifugavimo aukšto tankio gradientu (Ficoll, GE Healthcare, Suomija) bei magnetinės separacijos (Miltenyi Biotec, JAV) metodai. Į keturis 15 ml centrifuginio tipo mėgintuvėlius buvo išpilstytas Ficoll gradientas, užpilant kraujo, praskiesto izotoniniu ir netoksišku fosfatinio buferio druskų tirpalu (PBS) (Lonza, Bio Whittaker, Verier, Belgija). Centrifuguota 600 g 30 min. kambario temperatūroje. Po centrifugavimo susidarę viršutiniai vandeningi sluoksniai buvo pašalinti, o apatiniame mėgintuvėlio sluoksnyje susikaupę eritrocitai su granulocitais. Siekiant atskirti granulocitus nuo eritrocitų, buvo atliekama hipotoninė eritrocitų lizė su distiliuotu vandeniu.

Granulocitai resuspenduoti su šaltu MACS buferiu (PBS pH 7,2; 0,5 proc. jaučio serumo albumino (BSA) ir 2 mM EDTA), žymėti biotinu konjuguotais monokloniniais antikūnais prieš CD2, CD14, CD16, CD19, CD56, CD123 ir CD235A (angl. *Biotin-Antibody Cocktail*) 10 min. kambario temperatūroje bei su magnetine žyme konjuoguotais antikūnais prieš biotiną (angl. *Anti-Biotin MicroBeads*) 15 min. kambario temperatūroje. Po inkubacijos granulocitai buvo centrifuguoti bei frakcionuoti magnetinėse kolonėlėse. Eozinofilai atskirti neigiamos selekcijos būdu. Gyvybingumas vertintas naudojant automatinį ląstelių skaičiuotuvą ADAM (Witec AB, Vokietija) pagal gamintojų protokolą.

Bronchų lygiųjų raumenų ląstelės

Eksperimentams naudota sveikų stabiliai telomerezės atvirkštinę transkriptazę ekspresuojančių žmogaus

1 lentelė. Klinikiniai ir demografiniai tiriamųjų duomenys

	Sergantieji astma	Sveiki asmenys
Skaicius	7	6
Lytis (vyrai/moterys)	4/3	6/0
Amžius (metais)	26 ± 3	32 ± 4
FEV ₁ (l)	3,78 ± 0,34	3,70 ± 0,12
FEV ₁ (proc. būtinojo dydžio)	88,86 ± 3,36*	114,20 ± 5,56
PD ₂₀ (µg)	0,12 ± 0,03	–
Kraujo eozinofilų skaičius, ×10 ⁹ /l	0,36 ± 0,08*	0,2 ± 0,05
FeNO, ppb	60,73±11,48*	11,53±2,11
IgE, IU/ml	147,70 ± 19,50*	23,17 ± 9,32

Duomenys pateikiami apskaičiuavus vidurkį ± standartinės paklaidos vidurkį; *p<0,05, lyginant su sveikų asmenų grupe; FEV₁ – iškvėpamo oro tūris per 1 sek.; PD₂₀ – provokacinė metacholino dozė, sukelianti 20 proc. FEV₁ sumažėjimą; FeNO – azoto monoksido frakcija iškvėpamame ore; IgE – imunoglobulinas E.

BLR ląstelių linija [12]. Visiems eksperimentams naudotos ląstelės, po jų atšildymo persėtos ne daugiau nei šešis kartus, siekiant išvengti galimų aktyvumo pokyčių dėl ląstelių senėjimo proceso. Ląstelės auginamos 75 cm² ploto auginimo lėkštelėse (Falcon®; Corning) CO₂ 5 proc. koncentracijos bei 37 °C temperatūroje, keičiant mitybos terpę kas tris dienas. Eksperimentams ląstelės auginamos 24 šulinėlių polkštelėse (CytoOne®; StarLab) naudojant Dulbeko modifikuotą Eagle mitybos terpę (DMEM) (GIBCO®; Life Technologies, Peislis), papildytą streptomycinu/penicilinu (2 proc. v/v; GIBCO®; Life Technologies), amfotericinu B (1 proc. v/v; GIBCO®; Life Technologies) ir karščiu inaktyvuotu jaučio serumu (FBS) (10 proc. v/v; GIBCO®; Life Technologies). Eksperimentų dieną mitybos terpė pakeista į DMEM be FBS, tačiau su antibiotikų mišiniu bei insulino, transferino, seleno (ITS) reagentu (GIBCO®; Life Technologies).

Kombinuotų kultūrų auginimas

Visiems eksperimentams buvo sudarytos individualios kombinuotos kultūros tarp išskirtų eozinofilų ir BLR ląstelių. Remiantis gamintojų rekomendacijomis bei eksperimentiniu planu, 24 šulinėlių plokštelėse eksperimentų dieną būna užaugę apie 37500 BLR ląstelių. Eksperimentai buvo suskirstyti į tris dalis, kuriose buvo naudojamas skirtingas gyvybingų eozinofilų/BLR ląstelių santykis – 1:6 (į šulinėlį pridedant 6 250 eozinofilų), 1:3 (pridedant 12 500 eozinofilų), 1:1,5 (pridedant 25 000 eozinofilų). Kombinuotos kultūros auginamos mitybinėje DMEM terpėje be FBS.

Eozinofilų adhezijos vertinimas

Eozinofilų adhezija buvo vertinta praėjus 1 val. nuo kombinuotų kultūrų su BLR ląstelėmis sudarymo, pašalinus neprikibusius eozinofilus juos nusiurbiant bei praplaunant šulinėlių su šiltu PBS tirpalu. Eozinofilų adhezija buvo paremta jų viduląstelinės peroksidazės (EPO) aktyvumo matavimais kombinuotose kultūrose [13], naudojant specifinį EPO substratą (1 mM H₂O₂, 1 mM *o*-fenilendiaminas, 0,1 proc. Tritonas X-100, ruošiant Tris buferyje; pH 8.0). Didelis prisitvirtinusių eozinofilų skaičius lemia suminį EPO aktyvumo padidėjimą bei intensyvesnę *o*-fenilendiamino oksidaciją. Šviesos absorbcija matuota praėjus 0,5 val. nuo EPO substrato panaudojimo kombinuotoje kultūroje, reakciją sustabdžius 4 M H₂SO₄ tirpalu. Vertinta esant 490 nm bangos ilgiui naudojant šviesos spektrofotometrą. Rezultatai išreikšti adhezavusių eozinofilų skaičiumi procentais nuo visų į lėkštelę įpiltų eozinofilų, pritaikant tiesinę kalibracinės kreivės lygtį (visų įpiltų eozinofilų EPO substrato oksidacijos reikšmės).

Proliferacijos vertinimas Alamaro mėlio metodu

BLR ląstelių proliferacija vertinta praėjus 72 val. nuo kombinuotų ląstelių kultūrų su eozinofilais sudarymo. Proliferacija vertinta naudojant Alamaro mėlio reagentą (10 proc. v/v; Invitrogen™; Life Technologies), praskiestą Hanco balansuotame druskų tirpale (GIBCO®; Life Technologies). Alamaro mėlis gali būti redukuojamas metabolinio ląstelių aktyvumo metu išsiskiriančių redukuojančių agentų. Redukcijos intensyvumas vertintas matuojant šviesos absorbciją šviesos spektrofotometru esant 570 nm ir 600 nm bangos ilgiui. Rezultatai pateikti BLR ląstelių skaičiaus padidėjimu (proliferacija) kombinuotoje kultūroje, remiantis Alamaro mėlio virsmo iš oksiduotos formos į redukuotą intensyvumu. Kontrolė – BLR ląstelės be sąveikos su eozinofilais.

Statistinės analizės metodai

Statistinė analizė atlikta naudojant *GraphPad Prism 6*, skirtą *Windows* operacinei sistemai (versija 6.05, 2014, programinė priemonė Graphpad, Sandiegos, JAV). Duomenys pateikti apskaičiuotus vidurkius ± standartinės paklaidos vidurki. Duomenys tarp astmos ir sveikų asmenų grupių laikyti tarpusavyje nesusijusiais, kuriems vertinti taikytas Mann-Whitney U-testas. Duomenys, gauti naudojant to paties tiriamojo asmens periferinio kraujo eozinofilus, bet skirtingu santykiu su BLR ląstelėmis, laikyti tarpusavyje susijusiais, kurių vertinimui naudotas Wilkoxsono suderintos poros testas. Duomenys statistiškai patikimi, kurių p reikšmė buvo mažesnė kaip 0,05.

REZULTATAI

Tiriamųjų demografiniai ir klinikiniai duomenys

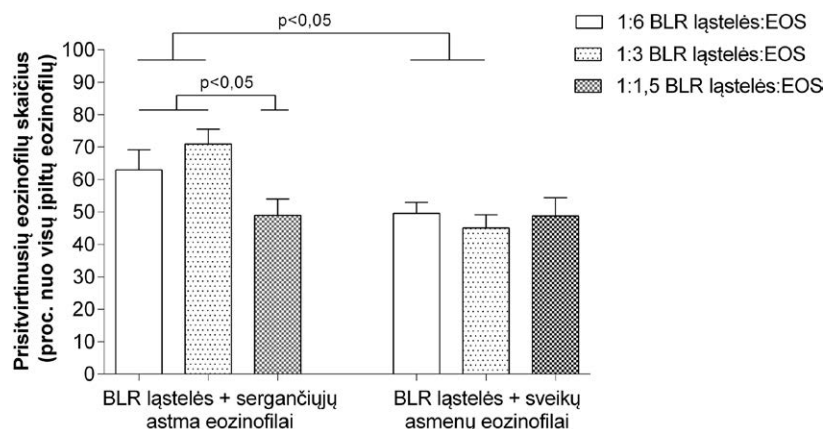
Į tyrimą buvo įtraukta 13 tiriamųjų – septyni sergantieji naujai diagnozuota alergine astma bei 6 sveiki nerūkantys asmenys. Sveikų asmenų grupę sudarė tik moterys, tačiau literatūrinių duomenų apie nuo lyties priklausomus eozinofilų aktyvumo pokyčius nėra. Sergančiųjų astma grupėje buvo nustatyta patikimai mažesnė FEV₁ reikšmė – 114,2 ± 5,6 proc. būtinojo dydžio sveikų asmenų grupėje ir 88,9 ± 3,4 proc. būtinojo dydžio sergančiųjų astma grupėje. Nustatytas atitinkamai didelis kraujo eozinofilų skaičius (0,36 ± 0,08 × 10⁹/l, lyginant su 0,2 ± 0,05 × 10⁹/l), FeNO koncentracija (60,73 ± 11,48 ppb, lyginant su 11,53 ± 2,11 ppb) ir IgE koncentracija (147,70 ± 19,50 IU/ml, lyginant su 23,17 ± 9,32 IU/ml) (1 lentelė).

Eozinofilų adhezijos vertinimas

Ekspirimentai buvo atliekami taikant skirtingą BLR ląstelių ir eozinofilų santykį kombinuotoje kultūroje, atitinkamai – 1:6, 1:3 ir 1:1,5 kaip nurodyta metodinėje dalyje. Naudojant santykį kombinuotoje kultūroje 1:6 ir 1:3, gautas panašus prisitvirtinusių eozinofilų skaičius, atitinkamai – 63,0 ± 6,2 proc. ir 70,9 ± 4,6 proc. nuo visų įpiltų eozinofilų. Padidinus sergančiųjų astma eozinofilų skaičių iki santykio 1:1,5 nustatytas patikimas prisitvirtinusių eozinofilų skaičiaus sumažėjimas iki 48,9 ± 5,1 proc. (p < 0,05). Tuo tarpu matuojant sveikų asmenų eozinofilų adheziją, rezultatai visais atvejais išliko panašūs, atitinkamai – 45,0 ± 4,1 proc., 48,7 ± 5,7 proc. ir 49,5 ± 3,4 proc. (p > 0,05) (1 pav.).

Eozinofilų įtakos bronchų lygiųjų raumenų ląstelių proliferacijai vertinimas

Sergančiųjų astma grupėje, naudojant santykį 1:6 ir 1:3, proliferacija padidėjo atitinkamai – 13,0 ± 4,1 proc.



1 pav. Nuo integrinų priklausomo eozinofilų prisitvirtinimo kombinuotoje kultūroje intensyvumas naudojant skirtingą ląstelių santykį

Rezultatai pateikiami apskaičiuotus vidurkius ± standartinės paklaidos vidurki. Sergančiųjų naujai diagnozuota alergine astma n=7, sveikų asmenų n=6. Rezultatai vertinti praėjus 1 val. nuo kombinuotos kultūros augimo pradžios. BLR – bronchų lygieji raumenys. Statistinis patikimumas p < 0,05. EOS – eozinofilai.

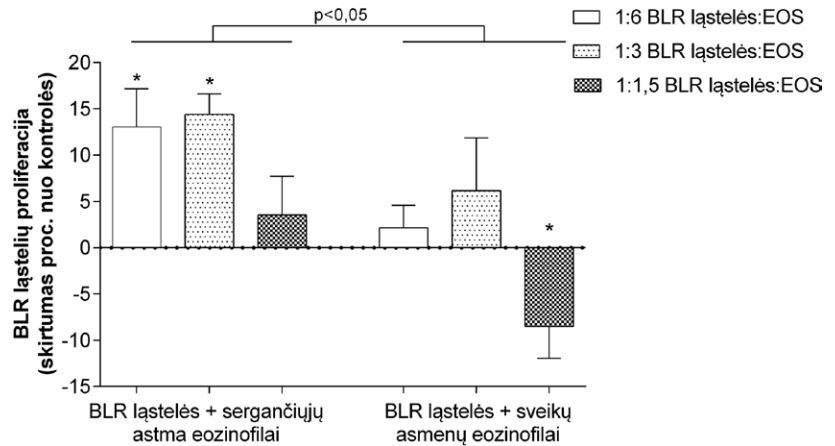
ir $14,4 \pm 2,2$ proc. ($p < 0,05$), lyginant su BLR ląstelių proliferacija be eozinofilų poveikio. Tuo tarpu padidinus eozinofilų kiekį iki santykio 1:1,5, statistškai patikimo poveikio nenustatyta. Sveikų asmenų grupėje, naudojant santykį 1:6 ir 1:3, patikimos įtakos BLR ląstelių proliferacijai nenustatyta, tačiau, padidinus eozinofilų skaičių iki santykio 1:1,5, nustatytas patikimas $8,5 \pm 3,4$ proc. proliferacijos sumažėjimas ($p < 0,05$) (2 pav.).

REZULTATŲ APITARIMAS

Šio tyrimo tikslas – nustatyti, kokią įtaką BLR remodeliacijai gali turėti pakitusi sergančiųjų astma eozinofilų adhezija bei jų aktyvumas, siejamas su intensyvesne infiltracija į kvėpavimo takus. Šiam tikslui įgyvendinti ištyrėme eozinofilų adheziją prie BLR ląstelių, naudojant skirtingus šių dviejų ląstelių tipų santykio modelius, bei įvertinome BLR ląstelių proliferacijos pokyčius šiose kombinuotose kultūrose, rodančius BLR hiperplaziją kvėpavimo takuose sergant astma. Nustatėme, kad gebančių adhezuoti eozinofilų santykis periferiniame kraujyje yra pastovus, o eozinofilų aktyvumas bei įtaka BLR ląstelių proliferacijai galimai priklauso nuo jų adheziinių savybių.

Astmos heterogeniškumas bei fenotipų gausa lemia nuolatinį poreikį gerinti jai skirtų terapinių priemonių veiksmingumą bei atrasti naujus, labiau specifiskus gydymo būdus. Vis dažniau gydymas nukreipiamas į ligos simptomų atsiradimo priežastis, viena jų – vyraujantis eozinofilinis kvėpavimo takų uždegimas. Siekiant suprasti jų įtaką kvėpavimo takų remodeliacijos vystymuisi, naudotas unikalus kombinuotų kultūrų modelis tarp sergančiųjų astma periferinio kraujo eozinofilų bei sveikų BLR ląstelių, kuomet galime stebėti tiesioginės sąveikos įtaką abiejų ląstelių fiziologinio aktyvumo pokyčiams. Pirmą kartą tokio tipo eksperimentus atliko Hughes su komanda [14], įrodydami, kad eozinofilai gali prisitvirtinti prie BLR ląstelių adhezijos molekulių ICAM-1 ir VCAM-1, tačiau išsamesni tyrimai nebuvo atlikti. Šio tyrimo metu siekėme išsiaiškinti ne tik tai, kaip pakinta eozinofilų ir BLR ląstelių aktyvumas po tiesioginės jų sąveikos, tačiau įvertinti ir laisvų adhezijai tinkamų vietų skaičiaus įtaką bei gebančių adhezuoti kraujo eozinofilų santykį.

Eozinofilai gali veikti dvejopai: būti ardančiosios efektorinės ląstelės ir ardyti kitas struktūras per išskiriamus citotoksinius katijoninius baltymus, arba dalyvauti uždegiminiuose procesuose, išskiriant remodeliacijos vystymąsi skatinamuosius mediatorius [15, 16]. Pastaroji jų funkcija laikoma svarbiausia



2 pav. Eozinofilų poveikis BLR ląstelių proliferacijai naudojant skirtingą ląstelių santykį kombinuotose kultūrose

Rezultatai pateikiami apskaičiuavus vidurkį \pm standartinės paklaidos vidurkį. Sergančiųjų naujai diagnozuota alergine astma $n=7$, sveikų asmenų $n=6$. Rezultatai vertinti praėjus 72 val. nuo kombinuotos kultūros augimo pradžios. BLR – bronchų lygieji raumenys; kontrolė – BLR ląstelės be sąveikos su eozinofilais. EOS – eozinofilai. *Statistinis patikimumas $p < 0,05$ lyginant su kontrole.

astmos patogenezėi. Žinoma, kad astmos metu eozinofilų aktyvumas kinta [17] ir didesnė jų dalis migruoja iš kraujo į sergančiųjų astma kvėpavimo takus [18]. Tam, kad eozinofilai galėtų prisitvirtinti prie kraujagyslių endotelio bei migruoti į plaučių audinius, dalis jų paviršiaus integrinų turi būti dalinai arba pilnai aktyvioje konformacijoje, tam, kad atsilaisvintų aktyvusis integrinų centras. Atliktais eksperimentais įrodyta, kad sergančiųjų astma eozinofilų adhezija yra intensyvesnė, lyginant su sveikų asmenų eozinofilais (1 pav.) [19]. Nors tai susiję ir su intensyvesne jų paviršiaus integrinų ekspresija [20], tačiau tikėtina, kad dėl chemoatraktantų, tokių kaip eotaksinas, veikimo daugiau paviršiaus integrinų yra aktyvioje konformacijoje. Integrinai yra sudaryti ir dviejų grandinių – α ir β , kurių suartėjimas ir susijungimas plazminėje eozinofilų membranoje lemia dimerų susidarymą, o galiausiai specifinių vietų atsipalaidavimą, prie kurių gali jungtis ligandai. Ligandus gali atstoti užląstelinio užpildo baltymų, pagrinde fibronektino, specifiniai Arg-Gly-Asp (RGD) aminorūgščių motyvai, arba ląstelių ICAM-1 ir VCAM-1 adhezijos molekulės [21]. Tiek mūsų naudotoje kombinuotoje kultūroje *in vitro*, tiek plaučių audiniuose *in vivo*, struktūrinės ląstelės, pvz., BLR ląstelės arba plaučių fibroblastai, pasižymi minėtų adhezijos molekulių ekspresija bei patys išskiria užląstelinio užpildo baltymus, užtikrinant visas sąlygas eozinofilų adhezijai. Vertindami adheziją *in vitro* modelyje, pastebėjome iki šiol mokslininkų neaptartą tendenciją, kad išlaikant pastovias sąlygas, eozinofilų adhezija priklauso nuo jų įpilamo kiekio į kombinuotą kultūrą. Tai reiškia, kad, nesant pakankamam laisvų adhezijos vietų skaičiaus, aktyvintas eozinofilas negalėtų prisitvirtinti plaučių audinyje. Tai rodo naują galimą tyrimų kryptį, vertinant plaučių struktūrinių

Moksliniai darbai ir apžvalgos

ląstelių adhezijos molekulių ekspresijos pokyčius bei užląstelinio užpildo baltymų remodeliaciją sergant astma, nes nustatytas padidėjęs eozinofilų kiekis plaučių audiniuose signalizuoja ir galimus pokyčius šiose srityse.

Manome, kad tam, jog sergant astma eozinofilai veiktų arba ardančiai, arba skatintų remodeliacijos vystymąsi, reikia tiek kokybinių, tiek kiekybinių eozinofilų pokyčių kvėpavimo takuose. Jeigu suvaldyti eozinofilų aktyvumo pokyčius, sergant astma, yra itin sudėtinga, gali padėti kombinuotas gydymas su siekiu sumažinti jų skaičių kvėpavimo takuose. Vertinant gautus tyrimo duomenis, nustatyta, kad eozinofilai skatina BLR ląstelių proliferaciją iki tam tikro lygio, kada padidėjęs eozinofilų kiekis neturi teigiamos įtakos jų proliferacijai. Galima daryti išvadą, kad eozinofilų skatinamą remodeliacijos procesą užgožia didėjantis ardančiųjų eozinofilų santykis (2 pav.). Nors santykio nepakanka, kad poveikis proliferacijai taptų neigiamas, galima daryti išvadą, kad tiek adhezavę, tiek cirkuliuojantys eozinofilai yra pakankamai aktyvuoti dar kraujyje, todėl netgi neprisitvirtinę eozinofilai yra pakankamai aktyvūs. Įdomesni rezultatai sveikų asmenų grupėje, kur nustatyta, kad eozinofilų adhezija nepriklauso nuo santykio su BLR ląstelėmis, nes tik apie pusės eozinofilų integrinai buvo pakankamai aktyvioje konformacijoje, kad galėtų adhezuoti. Tai dalinai rodo jų įtaką BLR ląstelių proliferacijai, kur pastebima, kad aktyvių remodeliaciją skatinančių eozinofilų kiekio, naudojant santykį 1:6 bei 1:3, nepakanka, kad būtų pasiektas patikimas BLR ląstelių proliferacijos padidėjimas. Tuo tarpu nustatytas proliferacijos sumažėjimas, padidinus eozinofilų kiekį iki santykio 1:1,5, rodo, kad didžioji dalis eozinofilų normaliomis sąlygomis atlieka ardomąją funkciją ir nėra atsvaros neutralizuojant jų poveikį remodeliaciją skatinamaisiais eozinofilais. Tai iš dalies patvirtina teoriją, kad dėl vyraujančio lėtinio uždegimo, sergant astma pakinta eozinofilų aktyvacija ir adhezinės savybės bei santykis tarp remodeliacija arba ardymo procesus skatinamųjų kraujo eozinofilų.

IŠVADOS

Nustatėme, kad egzistuoja pastovus adhezuoti gebančių eozinofilų kiekis periferiniame kraujyje, kuris pakinta sergant astma, taip pat pastebėjome, kad, esant astmai, eozinofilų adhezija pakinta ir tai turi įtakos jų poveikiui BLR ląstelių proliferacijai. Taip pat sergančiųjų astma eozinofilai galimai labiau pasižymi remodeliaciją skatinamosiomis savybėmis, lyginant su sveikų asmenų eozinofilais, kurie labiau

skatina ardančiuosius procesus, išskirdami citotoksinius baltymus.

Gauta 2019 03 01

Priimta 2019 04 03

LITERATŪRA

1. **Konya V, Peinhaupt M, Heinemann A.** Adhesion of eosinophils to endothelial cells or substrates under flow conditions. *Methods Mol Biol.* 2014; 1178:143-56.
2. **Rothenberg ME, Hogan SP.** The eosinophil. *Annu Rev Immunol.* 2006; 24:147-74.
3. **McBrien CN, Menzies-Gow A.** The biology of eosinophils and their role in asthma. *Front Med (Lausanne).* 2017; 4:93.
4. **Johansson MW, Kelly EA, Busse WW, Jarjour NN, Mosher DF.** Up-regulation and activation of eosinophil integrins in blood and airway after segmental lung antigen challenge. *J Immunol.* 2008; 180(11):7622-35.
5. **Luo B-H, Carman CV, Springer TA.** Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annu Rev Immunol.* 2007; 25:619-47.
6. **Hynes RO.** Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell.* 2002; 110(6):673-87.
7. **Streuli CH.** Integrins and cell-fate determination. *J Cell Sci.* 2009; 122(2):171-7.
8. **Huttenlocher A, Horwitz AR.** Integrins in cell migration. *Cold Spring Harbor Perspect Biol.* 2011; 3(9):a005074.
9. **Johansson MW.** Eosinophil activation status in separate compartments and association with asthma. *Front Med (Lausanne).* 2017; 4:75.
10. **Marichal T, Mesnil C, Bureau F.** Homeostatic eosinophils: characteristics and functions. *Front Med (Lausanne).* 2017; 4:101.
11. **George L, Brightling CE.** Eosinophilic airway inflammation: role in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Ther Adv Chronic Dis.* 2016; 7(1):34-51.
12. **Gosens R, Stelmack GL, Dueck G, McNeill KD, Yamasaki A, Gerthoffer WT, et al.** Role of caveolin-1 in p42/p44 MAP kinase activation and proliferation of human airway smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2006; 291(3):L523-34.
13. **White SR, Kulp GV, Spaethe SM, Van Alstyne E, Leff AR.** A kinetic assay for eosinophil peroxidase activity in eosinophils and eosinophil conditioned media. *J Immunol Methods.* 1991; 144(2):257-63.
14. **Hughes JM, Arthur CA, Baracho S, Carlin SM, Hawker KM, Johnson PR, et al.** Human eosinophil-airway smooth muscle cell interactions. *Mediators Inflamm.* 2000; 9(2):93-9.
15. **Furuta GT, Atkins FD, Lee NA, Lee JJ.** Changing roles of eosinophils in health and disease. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2014; 113(1):3-8.
16. **Kita H.** Eosinophils: multifaceted biological properties and roles in health and disease. *Immunol Rev.* 2011; 242(1):161-77.
17. **Johansson MW.** Activation states of blood eosinophils in asthma. *Clin Exp Allergy.* 2014; 44(4):482-98.
18. **Possa SS, Leick EA, Prado CM, Martins MA, Tibério IFLC.** Eosinophilic inflammation in allergic asthma. *Front Pharmacol.* 2013; 4:46.
19. **Januskevicius A, Vaitkiene S, Gosens R, Janulaityte I, Hoppenot D, Sakalauskas R, et al.** Eosinophils enhance WNT-5a and TGF- β 1 genes expression in airway smooth muscle cells and promote their proliferation by increased extracellular matrix proteins production in asthma. *BMC Pulm Med.* 2016; 16(1):94.
20. **Januskevicius A, Gosens R, Sakalauskas R, Vaitkiene S, Janulaityte I, Halayko AJ, et al.** Suppression of eosinophil integrins prevents remodeling of airway smooth muscle in asthma. *Front Physiol.* 2017; 7:680.
21. **Barthel SR, Johansson MW, McNamee DM, Mosher DF.** Roles of integrin activation in eosinophil function and the eosinophilic inflammation of asthma. *J Leukoc Biol.* 2008; 83(1):1-12.