

Eozinofilai, aktyvindami WNT-5a signalinį kelią, skatina bronchų lygiųjų raumenų kontraktiliškumą sergant astma

EOSINOPHILS ACTIVATE WNT-5A SIGNALING PATHWAY AND PROMOTE AIRWAY SMOOTH MUSCLE CELLS CONTRACTILITY IN ASTHMA

IEVA JANULAITYTĖ¹, ANDRIUS JANUŠKEVIČIUS¹, VIRGINIJA KALINAUSKAITĖ-ŽUKAUSKĖ², ROKAS STONKUS¹, KĘSTUTIS MALAKAUSKAS^{1,2}

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

Santrauka. Įvadas. Astma yra lėtinė uždegiminė plaučių liga, kuriai būdinga kvėpavimo takų eozinofilija. Uždegimas apima ir plaučių struktūrinės ląstelės: bronchų lygiųjų raumenų ląsteles, fibroblastus, kurių aktyvumas valdomas per uždegiminių ląstelių išskiriamus mediatorius. Iki šiol neaišku, kaip eozinofilai veikia bronchų lygiųjų raumenų ląstelių kontraktiliškumą. **Tyrimo tikslas.** Įvertinti eozinofilų įtaką WNT-5a signalinio kelio aktyvumui ir bronchų lygiųjų raumenų ląstelių kontraktiliškumui sergant astma. **Metodai.** Į tyrimą įtraukti penki sergantieji alergine astma ir penki sveiki asmenys. Kraujo eozinofilai išskirti naudojant aukšto tankio centrifugavimą ir magnetinę separaciją. Sudarytos kombinuotosios eozinofilų ir bronchų lygiųjų raumenų ląstelių linijos kultūros. Kontraktiliškumas vertintas naudojant kolageno gelio metodą. Po 24 val. inkubacijos eozinofilai atskirti nuo bronchų lygiųjų raumenų ląstelių ir ląstelės lizuotos. Išskyrus suminę RNR, atlikta genų raiškos analizė taikant TL-PGR. **Rezultatai.** Bronchų lygiųjų raumenų ląstelių kontraktiliškumas po inkubacijos su alergine astma sergančiųjų eozinofilais buvo 5,7 proc. didesnis lyginant su sveikais asmenimis ($p < 0,05$). α -aktino, WNT-5a, TGF- β 1, genų raiška bronchų lygiųjų raumenų ląstelėse po inkubacijos su astma sergančiųjų eozinofilais statistiškai reikšmingai padidėjo, lyginant su sveikų asmenų eozinofilų poveikiu (atitinkamai: α -aktino raiška padidėjo $1,6 \pm 0,1$, lyginant su $1,0 \pm 0,2$; WNT-5a – $1,8 \pm 0,5$, lyginant su $1,0 \pm 0,2$; TGF- β 1 – $2,1 \pm 0,6$, lyginant su $1,1 \pm 0,25$ kartais nuo kontrolinių, eozinofilais neveiktų bronchų lygiųjų raumenų ląstelių, $p < 0,05$). **Išvados.** Eozinofilai skatina bronchų lygiųjų raumenų kontraktiliškumą bei α -aktino geno raišką. Šie pokyčiai gali būti sukelti WNT-5a signalinio kelio aktyvumu.

Reikšminiai žodžiai: eozinofilai, astma, bronchų lygiųjų raumenų ląstelės, kontraktiliškumas.

Summary. Background. Airway eosinophilia is a prominent feature of asthma. The level of airway smooth muscle (ASM) activation is putatively controlled by mediators released. There are studies on eosinophil-induced changes of ASM activity while the exact role of eosinophil in ASM contractility in asthma remains unclear. **Aim.** To evaluate the effect of eosinophils on WNT-5a signaling pathway activation and ASM contractility in asthma. **Methods.** 5 allergic asthma patients (AA) and 5 healthy subjects (HS) were examined. Blood eosinophils were isolated using high-density centrifugation and magnetic separation. Individual combined cultures of eosinophils and healthy immortalized ASM cells were prepared. Contractility was evaluated using collagen gel method. For gene expression analysis ASM cells were lysed and total RNA purified after 24 h of incubation with eosinophils. Gene expression was evaluated using RT-qPCR analysis. **Results.** ASM cells contractility increased 5.7% after incubation with AA eosinophils compared to HS eosinophils ($p < 0.05$). Genes expression of α -actin, WNT-5a, TGF- β 1 was higher in ASM cells after incubation with AA eosinophils compared to HS eosinophils (accordingly: 1.6 ± 0.1 vs. 1.0 ± 0.2 ; 1.8 ± 0.5 vs. 1.0 ± 0.2 ; 2.1 ± 0.6 vs. 1.1 ± 0.3 folds over control; $p < 0.05$). **Conclusions.** Eosinophils promote ASM cells contractility as well as α -actin gene expression and these changes may be induced via WNT-5a signaling pathway.

Key words: eosinophils, asthma, airway smooth muscle cells, contractility.

IVADAS

Astma – viena plačiausiai paplitusių lėtinių kvėpavimo takų ligų, kuria 2017 m. sirgo apie 300 milijonų žmonių visame pasaulyje. Sergant šia liga, nuolatinis kvėpavimo takų uždegimas sąlygoja padidėjusį bronchų reaktyvumą ir struktūrinius kvėpavimo takų pokyčius, kitaip dar vadinamus remodeliacija. Kvėpavimo takų remodeliacija apibūdinama kaip struktūriniai epitelio pokyčiai, subepitelinė fibrozė, padidėjusi bronchų lygiųjų raumenų masė, sumažėjęs atstumas tarp bronchų lygiųjų raumenų ir epitelio sluoksnių, liaukinių ir taurinių ląstelių hiperplazija, kraujagyslių tinklo pokyčiai, sutrikusi užląstelinio užpildo homeostazė bei edema [1]. Astmos patogenezėje dalyvauja CD4+ T limfocitai, eozinofilai, neutrofilai ir putliosios ląstelės. Sergant astma, eozinofilai migruoja į kvėpavimo takus, jungiamojo audinio bei bronchų lygiųjų raumenų sluoksnius ir didina vietinę transformuojančio augimo veiksnio $\beta 1$ (angl. *Transforming Growth Factor*, TGF- $\beta 1$) koncentraciją bei išskiria kitus svarbius citokinus, chemokinus ir augimo veiksnius. Manoma, kad eozinofilai yra itin svarbūs vystantis bronchų obstrukcijai, tačiau kaip jie veikia bronchų lygiųjų raumenų kontraktiškumą, kol kas nežinoma.

TYRIMO MEDŽIAGA IR METODAI

2017–2018 m. Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Medicinos akademijos (LSMU MA) Pulmonologijos klinikos Pulmonologijos laboratorijoje, gavus Kauno regioninio Biomedicininų tyrimų Etikos komiteto leidimą Nr. BE-2-13, atliktas mokslinis tyrimas (Nr. NCT03388359). Visi asmenys, pakviesti dalyvauti tyrime, supažindinti su tyrimo protokolu (Nr.

1 lentelė. Tiriamųjų demografiniai ir klinikiniai duomenys

	Alerginės astmos grupė (n=5)	Kontrolinė grupė (n=5)
Amžius (metais)	24±2	30±2
Lytis, vyrai/moterys (n)	3/2	0/5
Įsijautrinimas <i>D. pteronyssinus</i> (n)	5	–
Eozinofilų skaičius kraujyje ($\times 10^9$)	0,48±0,07*	0,20±0,03
FEV ₁ (l)	3,29±0,20*	4,14±0,22
FEV ₁ (proc. būtinojo dydžio)	87±5*	112±7
PD ₂₀ (μg)	131 [#]	–

Duomenys pateikiami kaip vidurkis ± standartinės paklaidos vidurkis; *p<0,05; [#] geometrinis vidurkis. FEV₁ – iškvepiamo oro tūris per 1 sek. PD₂₀ – provokacinė metacholino dozė, sukelianti 20 proc. FEV₁ sumažėjimą.

PSUL-010/2014) ir apsisprendimą dalyvauti patvirtino pasirašydami informuoto asmens sutikimo formas.

Tiriamieji. Iš viso tyrime dalyvavo 10 tiriamųjų: penki asmenys, kuriems buvo diagnozuota alerginė astma, bet dar negydyti įkvepiamaisiais gliukokortikoidais, bei penki sveiki, nerūkantys asmenys (kontrolinė grupė). Visi tiriamieji, kuriems nustatyta alerginė astma, buvo įsijautrinę *Dermatophagoides pteronyssinus* namų dulkių erkėms (1 lentelė).

Tyrimo eiga. Atrankos vizito metu įvertinti tiriamųjų įtraukimo, neįtraukimo kriterijai, atliktas fizinis tiriamųjų asmenų tyrimas, spirometrija, bronchų provokacinis mėginys su metacholinu bei alerginiai odos dūrio mėginiai. Atrinkti asmenys į LSMU Pulmonologijos kliniką atvyko suplanuotiems vizitams, kurių metu buvo atlikta spirometrija, paimtas periferinio kraujo mėginys.

Eozinofilų išskyrimas iš periferinio kraujo. Į vakuuminius mėgintuvėlius su antikoagulantu EDTA paimta kiekvieno tiriamojo periferinio kraujo, iš kurio aukšto tankio centrifugavimo (Ficoll-Paque PLUS, GE Healthcare, Suomija) bei magnetinės separacijos (Human Eosinophil isolation kit, MACS, Miltenyi Biotec, JAV) metodais išskirti eozinofilai.

Kombinuotųjų kultūrų sudarymas. Tyrimui panaudota nemirtingų bronchų lygiųjų raumenų ląstelių linija, pasižyminti pastovia žmogaus telomerazės atvirkštinės transkriptazės geno hTERT raiška [2]. Bronchų lygiųjų raumenų ląstelės augintos šešių šulinėlių plokštelėje. Po 72 val. auginimo, panaudojant DMEM (GIBCO® by Life Technologies, Peislis, Jungtinė Karalystė) auginimo terpę su 10 proc. embrioninio jaučio serumo (FBS), 1 proc. L-glutaminu, 2 proc. penicilino/streptomocino mišiniu ir 1 proc. fungizonu, mitybinė terpė pakeista į dalijimąsi stabdančią DMEM (ITS, GIBCO® by Life Technologies, Peislis, Jungtinė Karalystė) terpę su 1 proc. insulino-transferino-seleno mišiniu, 1 proc. L-glutaminu, 2 proc. penicilino/streptomocino mišiniu ir 1 proc. amfotericinu B. Į šulinėlį su bronchų lygiųjų raumenų ląstelėmis įpilti iš periferinio kraujo išskirti eozinofilai.

Kontraktiškumo vertinimas. Pagal parengtą protokolą paruoštas kolageno gelis [3] ir 24 šulinėlių plokštelėse užsėtos bronchų lygiųjų raumenų ląstelės. Į šulinėlius supilstyti iš periferinio kraujo išskirti eozinofilai. Po 24 val. inkubacijos vertintas gelio susitraukimas procentais lyginant su kontrolinės grupės geliais, kuriuose buvo tik bronchų lygiųjų raumenų ląstelės.

RNR išskyrimas. Bronchų lygiųjų raumenų ląstelių kombinuotoji kultūra su eozinofilais inkubuota 24 val. Po inkubacijos nuo bronchų lygiųjų raumenų ląstelių atskirti prisitvirtinę eozinofilai. Tiek bronchų lygiųjų raumenų ląstelės, tiek eozinofilai homogenizuoti, išskirta suminė RNR, panaudojant komercinį rinkinį (RNeasy mini kit, Qiagen, Nyderlandai) pagal gamin-

Moksliniai darbai ir apžvalgos

2 lentelė. Pradmenys, panaudoti tikrojo laiko polimerazės grandininei reakcijai

Pavadinimas	Tiesiaeigis pradmuo 5'-3'	Atvirkštinis pradmuo 5'-3'
18S	CGCCGCTAGAGGTGAAATTC	TTGGCAAATGCTTTCGCTC
α -aktinas	TGGGTGACGAAGCACAGAGC	CTTCAGGGGCAACACGAAGC
TGF- β 1	GTACCTGAACCCGTGTTGCT	GAACCCGTTGATGTCCACTT
WNT-5a	GGGTGGGAACCAAGAAAAT	TGGAACCTACCCATCCATA

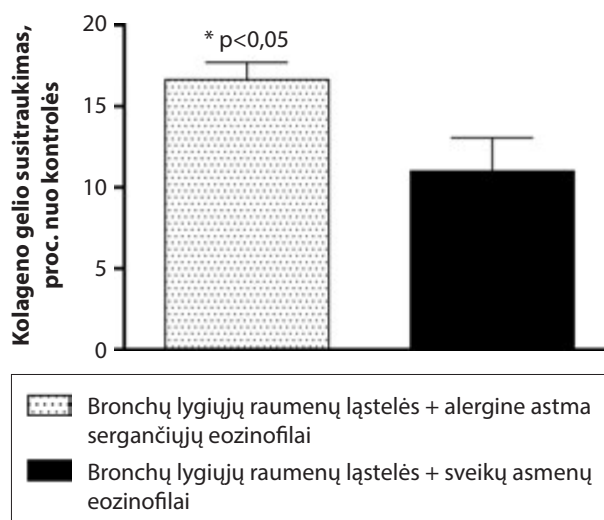
tojo protokolą. Išvalius nuo DNR priemaišų, mėginys saugotas -80°C temperatūroje tolesniems tyrimams.

Genų raiškos vertinimas. α -aktino, WNT-5a, TGF- β 1 genų raiškos vertintos atliekant tikrojo laiko polimerazės grandininę reakciją (TL-PGR), panaudojant komercinį rinkinį (Power SYBR[®] Green RNA-to-Ct™ 1-Step Kit, Applied Biosystems, Kalifornija, JAV) pagal gamintojo protokolą: kopijinė DNR sintetinta pagal RNR matricą atvirkštinės transkripcijos metu 48°C temperatūroje 30 min.; DNR polimerazė aktyvinta 95°C temperatūroje 10 min.; vėliau kopijinė DNR denatūruota esant 95°C karščiui 15 sek. ir prijungti specifiniai pradmenys; naujos DNR grandinės sintezė vyko 60°C temperatūroje 1 min. Procesas vykdytas 42 pasikartojančius ciklus. Tyrime panaudoti 18S, α -aktino, WNT-5a, TGF- β 1 genų pradmenys, kurių sekos pateikiamos 2 lentelėje. Endogeninės 18S ribosominės mikro-RNR koncentracija skirtinguose mėginiuose nekinta, todėl šio geno raiška panaudota normalizuojant tiriamų genų raišką kaip referentinis genas.

Matematinė statistinė duomenų analizė. Matematinė statistinė duomenų analizė atlikta statistiniu programos paketu „GraphPad Prism 6 for Windows“ (GraphPad Prism for Windows, 6.05 versija, JAV, 2014). Normalumas patikrintas naudojant Šapiro-Vilko (angl. *Shapiro-Wilks*) testą. Duomenys pateikti kaip vidurkis ir standartinės paklaidos vidurkis arba kaip mediana ir reikšmių ribos. Neatitikus normaliojo skirstinio kriterijų dėl nukrypusio kintamųjų pasiskirstymo, buvo naudojami neparametriniai kriterijai. Skirtumai tarp dviejų nepriklausomų grupių vertinti naudojant Mano-Vitnio U (angl. *Mann-Whitney U*) testą. Tikrinant statistines hipotezes, duomenų skirtumas buvo priskiriamas statistiškai reikšmingam, kai statistinis patikimumas $p < 0,05$.

REZULTATAI

Bronchų lygiųjų raumenų ląstelių kontraktiškumas. Siekiant įvertinti bronchų lygiųjų raumenų ląstelių kontraktiškumą, buvo naudojami kolageno geliai. Ant kolageno gelio užpilti iš periferinio kraujo išskirti tiriamųjų – astma sergančių bei sveikų asmenų – eozinofilai. Gauti rezultatai lyginti tarpusavyje. Kontroliniai kolageno geliai, pagal kuriuos apskaičiuoti skirtumai, inkubuoti 24 val. tik su bronchų lygiųjų

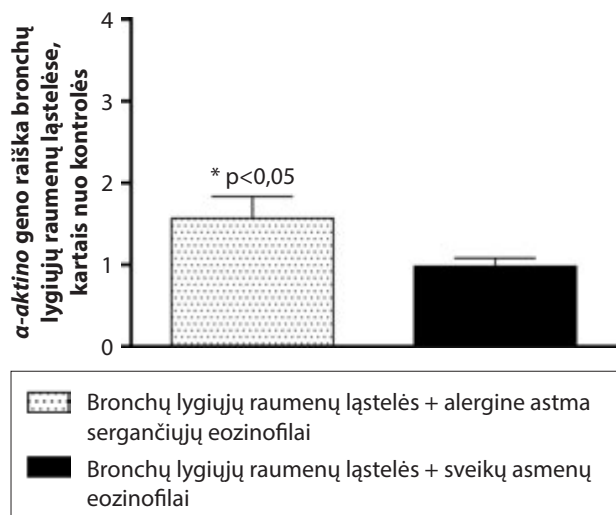


1 pav. Kolageno gelio kontraktiškumas (pateikiama procentais, vidurkis ir standartinės paklaidos vidurkis)

raumenų ląstelėmis. Vertinant eozinofilų įtaką gelio susitraukimui, gelio skersmens sutrumpėjimas vertintas po 24 val. procentais nuo kontrolinių gelių, kuriuose nebuvo eozinofilų. Nustatyta, kad sergančiųjų astma eozinofilai sukėlė didesnę bronchų lygiųjų raumenų ląstelių susitraukimą nei sveikų asmenų: atitinkamai gelis susitraukė $16,7 \pm 1,1$ proc. ir $11,0 \pm 2,2$ proc. ($p < 0,05$) lyginant su geliais, ant kurių nebuvo užpilti eozinofilai (1 pav.).

α -aktino geno raiška bronchų lygiųjų raumenų ląstelėse. Bronchų lygiųjų raumenų ląstelės, fenotipiškai veikiant aplinkos veiksniams, skirstomos į proliferuojančias ir kontraktines. Siekiant išsiaiškinti, ar eozinofilai lemia α -aktino geno raiškos pokyčius, buvo sudarytos kombinuotosios bronchų lygiųjų raumenų ir eozinofilų ląstelių kultūros. Po 24 val. inkubacijos eozinofilai atskirti nuo bronchų lygiųjų raumenų ląstelių ir, išskyrus RNR, atlikta TL-PGR. Nustatėme, kad astma sergančiųjų eozinofilai reikšmingai skatino α -aktino geno raišką bronchų lygiųjų raumenų ląstelėse, lyginant su sveikų asmenų eozinofilų poveikiu: atitinkamai – $1,6 \pm 0,1$ ir $1,0 \pm 0,2$ karto nuo kontrolės, $p < 0,05$ (2 pav.).

WNT-5a ir TGF- β 1 genų raiškos bronchų lygiųjų raumenų ląstelėse. Iškėlus hipotezę, kad WNT-5a ir TGF- β 1 signalinis kelias gali būti reikšmingas ne tik



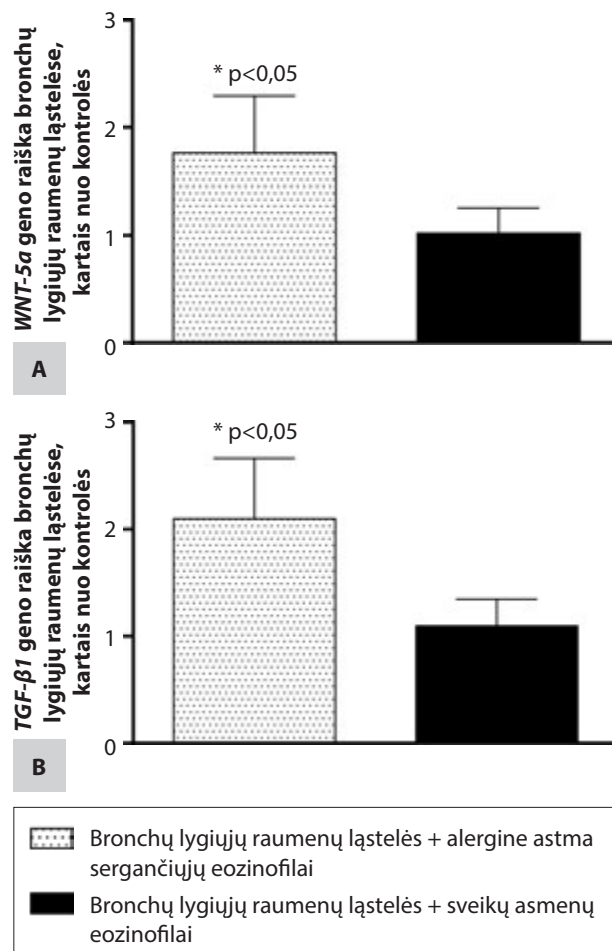
2 pav. α -aktino geno raiška bronchų lygiųjų raumenų ląstelėse (pateikiama kartais nuo kontrolės, vidurkis ir standartinės paklaidos vidurkis)

sutrikusiai užląstelinio užpildo baltymų sintezei, bet ir bronchų lygiųjų raumenų ląstelių kontraktiškumui bei α -aktino raiškai, įvertinti *WNT-5a* bei *TGF- β 1* genų raiškos pokyčiai bronchų lygiųjų raumenų ląstelėse. Nustatėme, kad eozinofilai padidino *WNT-5a* ir *TGF- β 1* genų raišką bronchų lygiųjų raumenų ląstelėse, lyginant su ląstelėmis, kurios nebuvo inkubuotos su eozinofilais. Taip pat nustatėme, kad astma sergančiųjų eozinofilai reikšmingai padidino *WNT-5a* ir *TGF- β 1* genų raiškas bronchų lygiųjų raumenų ląstelėse lyginant su sveikų asmenų eozinofilų poveikiu: atitinkamai – *WNT-5a* $1,8 \pm 0,5$ ir $1,0 \pm 0,2$ ($p < 0,05$), *TGF- β 1* $2,1 \pm 0,6$ ir $1,1 \pm 0,3$ karto nuo kontrolės, $p < 0,05$ (3 pav., A, B).

TGF- β 1 geno raiška eozinofiluose. Eozinofilai, sergant astma, yra vienos pagrindinių ląstelių, sintetinančių TGF- β 1, atsakingą už bronchų lygiųjų raumenų proliferaciją, migraciją bei užląstelinio užpildo baltymų sutrikusią sintezę. Nustatėme, kad *TGF- β 1* raiška periferinio kraujo eozinofiluose buvo 1,19 karto didesnė astma sergantiesiems lyginant su sveikais asmenimis ($p < 0,05$).

APTARIMAS

Eozinofilai sudaro apie 5 proc. sveiko žmogaus leukocitų, tačiau, sergant astma bei esant 2 tipo T limfocitų pagalbininkų valdomam uždegimui, eozinofilų skaičius išauga ir jie tampa pagrindinėmis uždegiminėmis ląstelėmis. Subrendę kaulų čiulpuose eozinofilai krauju bei adhezijos molekulių pagalba, veikiant eotaksinams, migruoja per kraujyslės sienelę į audinius. Astma sergančių asmenų migruojančių ir į audinius migravusių eozinofilų aktyvumas skiriasi nuo sveikų asmenų. Iš kaulų čiulpų periferiniu krauju migruojantys subrendę eozinofilai intensyviau degra-



3 pav. A – *WNT-5a* geno raiška bronchų lygiųjų raumenų ląstelėse; B – *TGF- β 1* geno raiška bronchų lygiųjų raumenų ląstelėse (rezultatai pateikiami kartais nuo kontrolės, vidurkis ir standartinės paklaidos vidurkis)

nuoliuoja bei gamina įvairius citokinus, augimo veiksnius, mažėja eozinofilų apoptozė [4–6]. Nustatėme, kad astma sergančiųjų eozinofiluose *TGF- β 1* geno raiška buvo didesnė lyginant su sveikais asmenimis. Tai rodo, kad astma sergančių asmenų eozinofilai yra aktyvesni. Tyrimo metu naudojome unikalų bronchų lygiųjų raumenų ląstelių ir tiriamųjų periferinio kraujo eozinofilų modelį, todėl galėjome stebėti bei įvertinti tiesioginę šių ląstelių sąveiką *in vitro*, atkartojant procesus, vykstančius *in vivo*. Kadangi tyrime naudojome eozinofilus, išskirtus iš tiriamųjų periferinio kraujo, rezultatai tiksliai gali ir neatkartoti *in vivo* sąlygų, tačiau eozinofilų aktyvacija pagrinde vyksta periferiniame kraujyje, kur yra daugiausia eozinofilus aktyvuojančių mediatorių.

Su TGF- β susiję signaliniai keliai dalyvauja ląstelių proliferacijoje, diferenciacijoje, metabolizme ir apoptozėje [7]. Nustatėme, kad bronchų lygiųjų raumenų ląstelės, inkubuotos su alergine astma sergančiųjų eozinofilais, pasižymėjo intensyvesne *TGF- β 1* geno raiška (3 pav. B). Bronchų lygiųjų raumenų ląstelės geba gaminti ir išskirti TGF- β 1, kuris reikšmingai

Moksliniai darbai ir apžvalgos

prisideda prie kvėpavimo takų remodeliacijos procesų [8]. Bronchų lygiųjų raumenų ląstelės, išskyrusios TGF- β 1, gamina prokolageną I, kuris yra pagrindinė fibrotinio audinio sudedamoji dalis.

WNT (*Wingless/Integrase-1*) signalinis kelias atlieka daugybę funkcijų – nuo embriono vystymosi iki suaugusio žmogaus audinių homeostazės/pusiausvyros palaikymo. WNT-5a skatina transkripciją genų, atsakingų už ląstelės diferenciaciją ir proliferaciją. WNT ligandai -3a, -5a, -6, -10a susiję su 2 tipo T limfocitų pagalbininkų medijuojama astma. WNT ligandai, tokie kaip, WNT-5a ir WNT-5b, geba aktyvuoti nekanoninį WNT signalinį kelią, kuris nepriklauso nuo β -katenino, tačiau įtraukia kalcio jonus ir Jun N-terminalinę kinazę, taip reguliuojant ląstelių kontraktiškumą, poliškumą ir migraciją [9]. Nustatyta, kad WNT-5a geno raiška du kartus didesnė bronchų lygiųjų raumenų ląstelėse, išskirtose iš astma sergančiųjų kvėpavimo takų, lyginant su sveikų asmenų bronchų biopsine medžiaga [10]. Tyrimo metu įvertinę WNT-5a geno raišką bronchų lygiųjų raumenų ląstelėse, nustatėme, kad šio geno raiška minėtose ląstelėse po inkubacijos su alergine astma sergančiųjų eozinofilais statistiškai reikšmingai padidėjo, lyginant su sveikų asmenų eozinofilų poveikiu bei kontrolinių ląstelių, kurios nebuvo inkubuotos su eozinofilais (3 pav., A), rezultatais. Taigi, galima tvirtinti, kad mūsų *in vitro* tyrimas neprieštarauja radiniams *in vivo*.

Nustatėme, kad eozinofilai bronchų lygiųjų raumenų ląstelėse aktyvina WNT-5a ir TGF- β 1 signalinį kelią, dėl ko padidėja bronchų lygiųjų raumenų ląstelių α -aktino geno raiška bei kontraktiškumas. Padidėjusi TGF- β raiška astmos metu aktyvina TGF- β receptorius bronchų lygiųjų raumenų ląstelėse, kurios sukelia didesnę WNT-5a ligando raišką bei nekanoninio WNT signalinio kelio aktyvavimą. Tiek TGF- β receptorius, tiek WNT-5a gali aktyvinti WNT/GSK3 β / β -katenino kompleksą, kuris savo ruožtu gali sukelti ląstelių susitraukimą [11].

Kontraktiškumas yra tiesiogiai susijęs su kontraktinio aparato baltymais – aktinu ir miozinu. Aktino gijos yra 5–9 nm skersmens baltyminės struktūros, išsidėsčiusios ląstelės pakraštyje. Aktino gijų funkcija – palaikyti ląstelės formą, taip pat svarbi judėjimui: raumenų susitraukimui, fagocitozei, ląstelės dalijimuisi, pūslelių pernašai ir organelių judėjimui citozolyje, citozolio srovėms sudaryti; α -aktinas randamas raumenų ląstelėse ir yra svarbus ląstelės judėjimui bei kontraktiškumui. Aktino polimerizacija valdoma ląstelės membranos depoliarizacijos metu per kalcio jonus bei per WNT-5a / TGF- β 1 signalinį kelią ir sukelia raumens susitraukimą. Bronchų lygiųjų raumenų susitraukimas apibūdinamas kaip pastovi pusiausvyra tarp endogeninių spazmogenų ir bronchodilatatorių. Esant lėtiniam uždegimui, bronchų lygiųjų raumenų

ląstelės negali pasiekti pusiausvyros tarp spazmogenų ir dilatatorių, todėl mažėja raumens audinio ląstelių plastiškumas ir didėja nuo laiko priklausomas kvėpavimo takų reaktyvumas, o šie veiksniai lemia astmos sunkumą [12]. Tyrimo metu nustatėme, kad bronchų lygiųjų raumenų ląstelės nevienodai reaguoja į skirtingus eozinofilus, nors tiek sveikų, tiek astma sergančiųjų asmenų eozinofilai pakeitė kolageno gelio skersmenį, tačiau didesnę poveikį sukėlė astma sergančiųjų eozinofilai. Ankstesniuose moksliniuose tyrimuose įrodėme, kad eozinofilai, adhezuodami prie bronchų lygiųjų raumenų ląstelių, gali skatinti šių proliferaciją ir užląstelinio užpildo baltymų sintezę bei didinti TGF- β 1 ir WNT-5a raišką [13]. Taip pat nustatėme, kad šie procesai gali būti valdomi blokuojant ant eozinofilų membranos esančių adhezijos molekulių integrinus [14]. Manoma, kad aktino polimerizacija gali veikti ne tik per kalcio jonų signalinį kelią, kuris inicijuojamas ląstelės membranos depoliarizacijos metu, bet ir per WNT-5a/ TGF- β signalinį kelią, todėl reikalingi tolesni tyrimai, siekiant išsiaiškinti eozinofilų sukeltos kvėpavimo takų remodeliacijos mechanizmus sergant astma.

Apibendrinus galima teigti, kad eozinofilai aktyvina WNT-5a signalinį kelią bronchų lygiųjų raumenų ląstelėse, todėl padidėja bronchų lygiųjų raumenų ląstelių α -aktino geno raiška ir kontraktiškumas. Astma sergančiųjų eozinofilai buvo aktyvesni nei sveikų asmenų, jų TGF- β 1 raiška buvo didesnė. Eozinofilai aktyvina nekanoninio WNT-5a ir TGF- β 1 signalinius kelius, kurie yra atsakingi už remodeliacijos procesus bronchų lygiųjų raumenų ląstelėse, tačiau lieka neaišku, kaip tiksliai eozinofilai prisideda prie patogenezinių procesų bronchų lygiųjų raumenų ląstelėse sergant astma. Todėl reikalingi tolesni tyrimai, siekiant išsiaiškinti eozinofilų sukeltos bronchų lygiųjų raumenų ląstelių remodeliacijos mechanizmus sergant astma.

Gauta 2018 03 20

Priimta 2018 04 05

LITERATŪRA

1. Bergeron C, Tulic MK, Hamid Q. Airway remodelling in asthma: from benchside to clinical practice. *Can Respir J*. 2010; 17(4):e85-93.
2. Halayko AJ, Tran T, Ji SY, Yamasaki A, Gosens R. Airway smooth muscle phenotype and function: interactions with current asthma therapies. *Curr Drug Targets*. 2006; 7(5):525-40.
3. Sakota Y, Ozawa Y, Yamashita H, Tanaka H, Inagaki N. Collagen gel contraction assay using human bronchial smooth muscle cells and its application for evaluation of inhibitory effect of formoterol. *Biol Pharm Bull*. 2014; 37(6):1014-20.
4. Hoppenot D, Malakauskas K, Lavinskiene, Sakalauskas R. p-STAT6, PU.1, and NF- κ B are involved in allergen-induced late-phase airway inflammation in asthma patients. *BMC Pulm Med*. 2015; 15:122.
5. Lavinskiene S, Malakauskas K, Jeroch J, Hoppenot D, Sakalauskas R. Functional activity of peripheral blood eosinophils in allergen-induced late-phase airway inflammation in asthma patients. *J Inflamm*. 2015; 12:25.

Moksliniai darbai ir apžvalgos

6. **Hoppenot D, Malakauskas K, Lavinskiene S, Bajoriūnienė I, Kalinauskaitė V, Sakalauskas R.** Peripheral blood Th9 cells and eosinophil apoptosis in asthma patients. *Medicina*. 2015;51(1):10-7.
7. **Crane JL, Cao X.** Bone marrow mesenchymal stem cells and TGF- β signaling in bone remodeling. *J Clin Invest*. 2014; 124(2):466-72.
8. **Bosse Y, Stankova J, Rola-Pleszczynski M.** Transforming growth factor-beta1 in asthmatic airway smooth muscle enlargement: is fibroblast growth factor-2 required? *Clin Exp Allergy*. 2010; 40(5):710-24.
9. **Ulrich F, Carretero-Ortega J, Menendez J, Narvaez C, Sun B, Lancaster E, et al.** Reck enables cerebrovascular development by promoting canonical Wnt signaling. *Development*. 2016; 143(1):147-59.
10. **Kumawat K, Gosens R.** WNT-5A: signaling and functions in health and disease. *Cell Mol Life Sci*. 2016; 73(3):567-87.
11. **Baarsma HA, Königshoff M.** 'WNT-er is coming': WNT signalling in chronic lung diseases. *Thorax*. 2017; 72(8):746-59.
12. **Doeing DC, Solway J.** Airway smooth muscle in the pathophysiology and treatment of asthma. *J Appl Physiol*. 2013; 114(7):834-43.
13. **Januskevicius A, Vaitkiene S, Gosens R, Janulaityte I, Hoppenot D, Sakalauskas R, et al.** Eosinophils enhance WNT-5a and TGF-beta1 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.
14. **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*. 2016; 7:680.