

Sergant astma po sąveikos su bronchų lygiųjų raumenų ląstelėmis didėja eozinofilų gyvybingumas

EOSINOPHILS VIABILITY INCREASES AFTER THEIR INTERACTION WITH AIRWAY SMOOTH MUSCLE CELLS IN ASTHMA

ANDRIUS JANUŠKEVIČIUS¹, IEVA JANULAITYTĖ¹, KĘSTUTIS MALAKAUSKAS^{1,2}

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

Santrauka. Įvadas. Periferiniame kraujyje cirkuliuojančių eozinofilų gyvybingumas yra mažesnis lyginant su migravusių į kvėpavimo takus. Todėl galima daryti prielaidą, kad eozinofilų sąveika su plaučių struktūrinėmis ląstelėmis gali prailginti jų gyvybingumą ir aktyvumą, taip sąlygodama kvėpavimo takų remodeliacijos vystymąsi sergant astma. **Tikslas.** Įvertinti bronchų lygiųjų raumenų ląstelių poveikį eozinofilų gyvybingumui sergant astma. **Metodai.** Periferinio kraujo eozinofilai buvo izoliuoti iš penkių sergančiųjų astma ir keturių sveikų asmenų, pritaikant centrifugavimą aukšto tankio gradiente ir magnetinės separacijos metodus bei nedelsiant sudaromos individualios kombinuotosios kultūros su nemirtinga sveikų bronchų lygiųjų raumenų ląstelių linija. Eozinofilų skaičius bei gyvybingumas buvo nustatomas naudojant automatinį ADAM ląstelių skaičiuotuvą. **Rezultatai.** Sergančiųjų astma kraujo eozinofilų gyvybingumas vidutiniškai buvo $9 \pm 1,7$ proc. ($p < 0,05$) didesnis lyginant su sveikų asmenų eozinofilais. Po eozinofilų kontakto su bronchų lygiųjų raumenų ląstelėmis tiek sergančiųjų astma, tiek sveikų asmenų eozinofilų gyvybingumas statistiškai patikimai padidėjo, atitinkamai – $33,0 \pm 7,6$ proc. ir $29,8 \pm 10,7$ proc. ($p < 0,05$). **Išvados.** Eozinofilų sąveika su bronchų lygiųjų raumenų ląstelėmis labiau sąlygoja eozinofilų gyvybingumo padidėjimą sergančiųjų astma grupėje.

Reikšminiai žodžiai: eozinofilai, bronchų lygiųjų raumenų ląstelės, gyvybingumas, adhezija.

Summary. Background. Viability of peripheral blood eosinophils are significantly lower than airway eosinophils. It may be assumed that direct contact between eosinophils and pulmonary structural cells increase eosinophils survival and activity thus enhancing the development of airway remodeling in asthma. **Aim.** To investigate the viability of eosinophils after their interaction with airway smooth muscle cells in asthma. **Methods.** Blood eosinophils were isolated from 5 asthma patients and 4 not atopic healthy individuals combining high density centrifugation and magnetic separation methods. Individual combined cell cultures with immortalized human healthy ASM cells were prepared. The number and viability of eosinophils were analyzed via automatic cell counter ADAM. **Results.** Viability of asthmatic eosinophils is increased by $9 \pm 1.7\%$ ($p < 0.05$) comparing with healthy eosinophils. Eosinophil interaction with airway smooth muscle cells significantly increased viability of eosinophils in both, asthma and healthy groups, respectively by $33.0 \pm 7.6\%$ and $29.8 \pm 10.7\%$ ($p < 0.05$). **Conclusion.** Eosinophil viability is increased after their contact with airway smooth muscle cells, more pronounced in asthma patients.

Key words: eosinophils, airway smooth muscle cells, viability, adhesion.

ĮVADAS

Astma – tai lėtinė uždegiminė kvėpavimo takų liga, kuriai būdinga grįžtamoji kvėpavimo takų obstrukcija ir padidėjęs bronchų reaktyvumas, dažniausiai sukeliamas įvairių nespecifinių dirgiklių arba alergenų [1]. Astmai būdingas kvėpavimo takų uždegimas pasižymi eozinofilų infiltracija į kvėpavimo takus. Ligos metu eozinofilai kaupiasi audiniuose ir daugiau nei 100 kartų gali viršyti normos ribas kraujyje. Eozinofilai dalyvauja uždegiminiame procese kaip efektorinės ląstelės bei skatina įgimtą imuninį atsaką. Lėtinis uždegimas skatina kvėpavimo takų struktūrinius pokyčius

ir lemia kvėpavimo takų remodeliacijos išsivystymą. Remodeliacijai būdingas padidėjęs kvėpavimo takų sienelės skersmuo, lygiųjų raumenų hipertrofija ir hiperplazija, padidėjusi užląstelinio užpildo baltymų sintezė ir jų kaupimasis [2].

Eozinofilai yra vienos svarbiausių ląstelių, dalyvaujančių astmos patogenezeje, išsivystančių iš CD34+ ląstelių. Eozinofilai turi antrinių granulių, kurių sudėtyje yra keturi pagrindiniai baltymai, kitaip dar vadinami audinių pažeidimo ir bronchų reaktyvumo tarpininkais [3], pvz., katijoninis baltymas (ECP), didysis bazinis baltymas (MBP), peroksidazė (EPO),

neurotoksinas (EDN). Taip pat eozinofilai išskiria aktyvius deguonies junginius, kurie pažeidžia kvėpavimo takų epitelį, plaučių parenchimą, kraujagysles bei nervus [4]. Dėl įvairių citokinų (IL-5, IL-3, GM-CSF), chemokinų (eotaksinas, RANTES) ir adhezinių molekulių (ICAM-1, VCAM-1) poveikio eozinofilai susitelkia kvėpavimo takuose. Astmos metu eozinofilai plaučių audinyje išgyvena iki 8–12 dienų, tuo tarpu kraujyje – tik apie 5 val. Taip dėl sulėtėjusios eozinofilų apoptozės eozinofilai geba pažeisti kvėpavimo takų audinius. Eozinofilai, išskirdami audinių pažeidimo ir bronchų reaktyvumo tarpininkus, reaktyviasias deguonies formas, citokinus, sukelia stiprų plaučių audinio uždegimą ir pažeidimą [5, 6].

Eozinofilų veikimo keliai ir jų įtaka kvėpavimo takų remodeliacijai, sergant astma, nepakankamai ištirti. Įvertinus jų aktyvų dalyvavimą lėtiniame kvėpavimo takų uždegime, sergant astma, sąveiką su struktūrinėmis plaučių ląstelėmis (pvz., bronchų lygiųjų raumenų ląstelėmis, fibroblastais, epitelio ląstelėmis), svarbu nustatyti mechanizmus, lemiančius ilgesnį jų išgyvenamumą plaučių audinyje. Šiame tyrime siekėme įvertinti eozinofilų gyvybingumo pokyčius po sąveikos su bronchų lygiųjų raumenų ląstelėmis *in vitro* sąlygomis bei nustatyti eozinofilų gyvybingumo pokyčius po skirtingų inkubacijos periodų.

METODAI IR MEDŽIAGOS

Tyrimo eiga

Į tyrimą įtraukti penki sergantys astma ir įkvėpamųjų gliukokortikoidų neįvartojantys pacientai bei keturi sveiki asmenys (kontrolinė grupė). Tiriamųjų demografiniai ir klinikiniai duomenys pateikiami 1 lentelėje. Atvykti į Kauno klinikų Pulmonologijos kliniką tiriamieji buvo kviečiami du kartus. Pirmo vizito metu tiriamieji buvo supažindinti su regioninio biomedicininio tyrimų etikos komiteto patvirtinto (leidimo Nr. BE-2-13) tyrimo protokolu bei buvo patikrinti įtraukimo, neįtraukimo į tyrimą kriterijai, atliktas fizinis tiriamųjų ištyrimas, spirometrija, bronchų provokacija su metacholinu ir alerginiai odos dūrio mėginiai. Antro vizito metu paimtas periferinis kraujas. Eozinofilų išskyrimo iš periferinio kraujo trukmė – apie 4 val., nedelsiant po to vertintas eozinofilų gyvybingumas bei sudarytos kombinuotosios kultūros su bronchų lygiųjų raumenų ląstelėmis. Eozinofilų gyvybingumas buvo vertinamas praėjus 24, 48 ir 72 val. po kombinuotųjų kultūrų sudarymo. Terpė su eozinofilais buvo nusiurbama į atskirus mėgintuvėlius, centrifuguojama bei resuspenduojama šiltoje mitybinėje terpėje. Surinktų eozinofilų gyvybingumas buvo matuojamas pritaikant propidžio jodido fluorescencinius matavimus automatinio ADAM ląstelių skaičiuotuvu (Witec AG, Šveicarija).

1 lentelė. Klinikiniai ir demografiniai tiriamųjų duomenys

	Astma sergantys pacientai	Sveiki asmenys
Vyrai, moterys (n)	1/4	2/2
Amžius (metai)	36 ± 3	24 ± 1
FEV ₁ (L)	3,92 ± 0,23	3,70 ± 0,21
FEV ₁ (proc. būtinojo dydžio)	106,1 ± 4,9	100,7 ± 2,7
PD ₂₀ (μg)	0,11 [#]	–

Duomenys pateikiami kaip vidurkis ± standartinės paklaidos vidurkis; # geometrinis vidurkis; FEV₁ – iškvėpamo oro tūris per 1 sek.; PD20 – provokacinė metacholino dozė, sukianti 20 proc. FEV₁ sumažėjimą.

Mėginių paruošimas

Periferinis kraujas

Kraujo ląstelių mėginiai. Į mėgintuvėlius su antikoaguliantu EDTA (2×10 ml) paimta periferinio kraujo, kuris nedelsiant buvo naudotas eozinofilų funkcinių savybių tyrimams.

Eozinofilų išskyrimas iš periferinio kraujo

Eozinofilų išskyrimui naudotas aukšto tankio gradientas (Ficoll, GE Healthcare, Suomija). Aukšto tankio gradientas buvo išpilstomas į 50 ml Falcon tipo mėgintuvėlius, o ant paviršiaus užpilama periferinio kraujo, praskiesto fosfatinio buferio druskų tirpalu (PBS) (Lonza, Bio Whittaker, Verier, Belgija). PBS yra izotoninis, tinkamo pH ir netoksiškas ląstelėms.

Centrifuguota 1200 g 30 min. 22 °C temperatūroje. Po centrifugavimo susidaręs viršutinis frakcionuotas sluoksnis (Munoz ir Leff, 2006) buvo pašalintas. Apatiniame mėgintuvėlio sluoksnyje buvo susikaupę eritrocitai su granulocitais, norint juos atskirti, buvo atliekama hipotoninė eritrocitų lizė su distiliuotu vandeniu. Lizuojant eritrocitus, druskų koncentracija sumažėja, todėl atstatymui buvo naudojamas du kartus didesnės koncentracijos PBS tirpalas. Centrifuguota 300 g, 22 °C temperatūroje, 10 min. Centrifugavimas buvo kartotas tiek kartų, kad eritrocitai visiškai lizuotų ir išryškėtų baltas eozinofilų sluoksnis.

Granulocitai resuspenduoti šaltame MACS buferyje (kuriame yra: PBS pH 7,2, 0,5 proc. jaučio serumo albuminas (BSA) ir 2 mM EDTA skiedžiant MACS BSA Stock Solution 1 : 20 su autoMACSR Rinsing Solution) (40 μL – 10⁷ visų ląstelių) Eozinofilai išskiriami naudojant specilizuotą rinkinį (Eosinophil Isolation Kit, Human, MACS, Miltenyi Biotec, JAV), remiantis nurodytu protokolu: 10 min. inkubacija 4 °C temperatūroje su *Biotin-Antibody Cocktail* (biotinu konjuguoti monokloniniai antikūnai prieš CD2, CD14, CD16, CD19, CD56, CD123 ir CD235A (glikoforinas A) (10 μL – 10⁷ visų ląstelių) bei tolimesnė 15 min. inkubacija 4 °C temperatūroje su *Anti-Biotin MicroBeads* (konjuguoti su monokloniniais antikūnais prieš biotiną, izotipas:

pelės imunoglobulinas G₁ (IgG1) (20 µL – 10⁷ visų ląstelių).

Po inkubacijos eozinofilai buvo atskiriami magnetinės separacijos metodu. Paruošiamos MS kolonėlės (Miltenyi Biotec, JAV) įstatant jas į magnetinio lauko stovą *MACS Separation* (MACS Multistand, Miltenyi Biotec, JAV). Prieš atskyrimą filtras (30 µm Miltenyi Biotec, JAV) buvo praplaunamas MACS buferiu, kad sudrėktų visa filtru esanti medžiaga. Paruošta ląstelių suspensija buvo pilama ant MS kolonėlės. Magnetiškai pažymėtos ląstelės liko MS kolonėlėje, o eozinofilai ją perėjo, nes nebuvo pažymėti magnetine žyme.

Išskirta eozinofilų suspensija buvo centrifuguojama 400 g, 10 min., 25 °C temperatūroje ir resuspenduojama 1,1 ml DMEM mitybinėje terpėje. Vėliau 100 µl ląstelių suspensijos buvo panaudojama ląstelių skaičiaus ir gyvybingumo vertinimui, naudojant automatinį ląstelių skaičiuotuvą ADAM (Witec AB, Vokietija), o likusi suspensija, padalijus į atskiras grupes, naudota tolesniems eksperimentams.

Eozinofilų gyvybingumo vertinimas

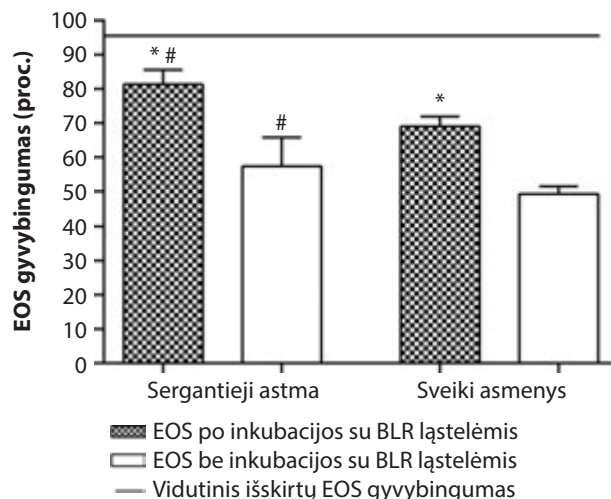
Praėjus 24, 48 ir 72 val. nuo eozinofilų ir bronchų lygiųjų raumenų ląstelių kombinuotųjų kultūrų sudarymo, terpė su eozinofilais buvo nusiurbama į supilama į atskirus mėgintuvėlius. Bronchų lygiųjų raumenų ląstelės buvo praplaunamos 1 ml PBS tirpalu su 1 mM EDTA koncentracija ir inkubuojama 3 min. Vėliau PBS tirpalas buvo surenkamas, sumaišomas su surinkta terpe bei centrifuguojamas 300 g, 22 °C temperatūroje, 10 min. Nucentrifuguoti eozinofilai buvo resuspenduojami 200 µl šilta DMEM terpe bei jų gyvybingumas matuojamas naudojant automatinį ADAM ląstelių skaičiuotuvą (Witec AG, Šveicarija).

Gyvybingumo nustatymas paremtas fluorescuojančio dažo propidžio jodido (PI), kuris prisijungia prie ląstelių branduolių ir skleidžia fluorescencijos šviesą, naudojimu. Gyvybingumo nustatymui naudoti du mėginiai: vienas bendram eozinofilų skaičiui nustatyti (naudotas PI kartu su ląstelių membraną laidinančia medžiaga), antras – negyvų eozinofilų skaičiui nustatyti (naudojamas tik PI). Eozinofilų gyvybingumas vertintas remiantis formule: gyvybingumas (proc.) = (A–B)/A × 100, čia A – visas eozinofilų skaičius, o B – negyvų eozinofilų skaičius.

REZULTATAI

Sąveika su bronchų lygiųjų raumenų ląstelėmis didina eozinofilų gyvybingumą

Norėdami patvirtinti prielaidą, kad į plaučių audinį migravusių eozinofilų gyvybingumas patikimai padidėja, lyginant su laisvai periferiniame kraujyje cirkuliuojančiais eozinofilais, atlikome jų gyvybingumo nustatymą, naudodami PI reagentą. Eozinofilų gyvybingumas buvo lyginamas tarp kontrolinės gru-



1 pav. Sąveikos su bronchų lygiųjų raumenų ląstelėmis įtaka eozinofilų gyvybingumui

Rezultatai pateikiami kaip vidurkis ± standartinis nuokrypis. Sergančiųjų astma n=5, sveikų asmenų n= 4. Inkubacijos laikotarpis – 24 val. *p<0,05 lyginant su eozinofilais be inkubacijos su bronchų lygiųjų raumenų ląstelėmis. # p<0,05 lyginant su tos pačios grupės sveikų asmenų eozinofilais. Santrumpos: EOS – eozinofilai; BLR – bronchų lygiųjų raumenų ląstelės.

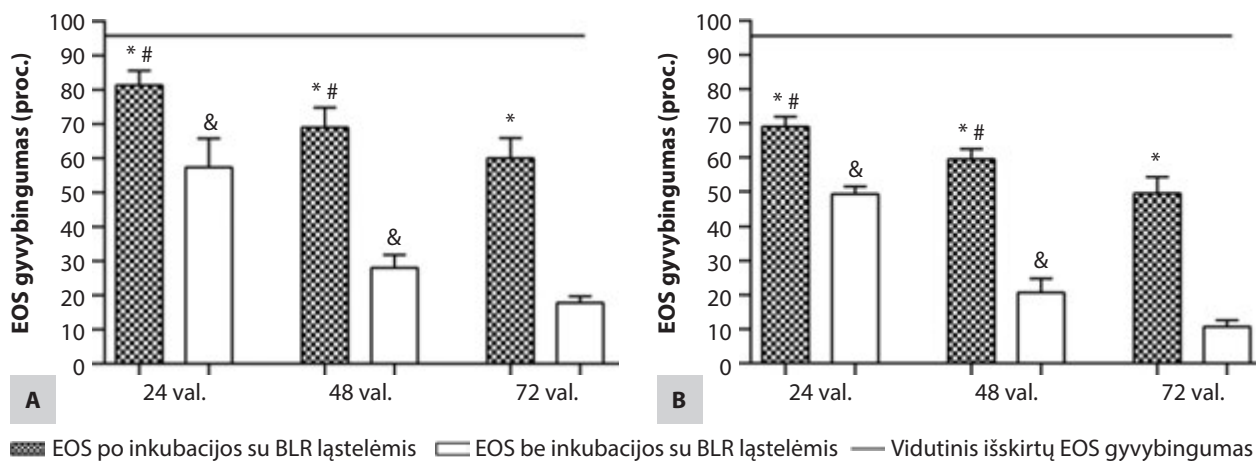
pės – 24 val. inkubuotos lėkštelėje be bronchų lygiųjų raumenų ląstelių ir tiriamosios grupės, kuri tą patį laikotarpį buvo inkubuota su bronchų lygiųjų raumenų ląstelėmis. Atlikus eksperimentus, nustatyta, kad sergančiųjų astma eozinofilai po 24 val. inkubacijos su bronchų lygiųjų raumenų ląstelėmis pasižymėjo 82,0±4,2 proc. gyvybingumu, kuris buvo patikimai didesnis lyginant su sveikų asmenų eozinofilų gyvybingumu (69,5±2,9 proc., p<0,05), tuo tarpu tiesioginė sąveika su bronchų lygiųjų raumenų ląstelėmis skatino eozinofilų gyvybingumą abiejose grupėse: sergančiųjų astma eozinofilų, kurie nebuvo inkubuojami su bronchų lygiųjų raumenų ląstelėmis, gyvybingumas nustatytas atitinkamai – 55,0±8,4 proc. (p>0,05, lyginant su eozinofilais po sąveikos su bronchų lygiųjų raumenų ląstelėmis), tuo tarpu sveikų asmenų eozinofilų gyvybingumas buvo 49,0±2,2 proc. (p>0,05, lyginant su eozinofilais po sąveikos su bronchų lygiųjų raumenų ląstelėmis). Visais atvejais eozinofilų gyvybingumas po 24 val. nuo jų išskyrimo iš periferinio kraujo buvo mažesnis, lyginant su ką tik išskirtais eozinofilais, kurių gyvybingumas vidutiniškai siekė 96±1,6 proc. (1 pav.).

Eozinofilų gyvybingumas laipsniškai mažėja kintant inkubacijos periodui

Eozinofilai nėra proliferuojančios ląstelės, todėl jos nuolat diferencijuojasi iš hematopoetinių kamieninių ląstelių kaulų čiulpuose. Eozinofilų gyvybingumas yra ribotas ir priklauso nuo išgyvenamumą skatinamųjų signalų. Siekėme išsiaiškinti, kaip kinta eozinofilų gyvybingumas po sąveikos su bronchų lygiųjų raumenų ląstelėmis laiko perioduose nuo 24 ir 72 val.

Atlikę gyvybingumo vertinimą, nustatėme, kad ser-

Moksliniai darbai



2 pav. Eozinofilų gyvybingumo pokytis po skirtingų inkubacijos periodų: A – sergančiųjų astma eozinofilų gyvybingumas; B – sveikų asmenų eozinofilų gyvybingumas

Rezultatai pateikiami vidurkis ± standartinis nuokrypis. Sergančiųjų astma n=5, sveikų tiriamųjų n=4. *p<0,05 lyginant su eozinofilais be inkubacijos su bronchų lygiųjų raumenų ląstelėmis; #, & p<0,05 lyginant su tos pačios grupės eozinofilų gyvybingumu po skirtingų inkubacinių periodų. Santrumpos: EOS – eozinofilai; BLR – bronchų lygiųjų raumenų ląstelės.

gančiųjų astma eozinofilų, kurie buvo kombinuotoje kultūroje su bronchų lygiųjų raumenų ląstelėmis, gyvybingumas patikimai sumažėja nuo 82,0±4,2 proc. (po 24 val.) iki 69,0±5,8 proc. (po 48 val.) ir 57,0±5,9 proc. (po 72 val.) (p<0,05). Tuo tarpu eozinofilų, kurie neturėjo kontakto su bronchų lygiųjų raumenų ląstelėmis, gyvybingumas mažėjo patikimai greičiau: gyvybingumas po 24 val. buvo 55,0±8,4 proc., po 48 val. – 28,0±3,8 proc., po 72 val. – 18,0±1,9 proc. (p<0,05) (2 pav. A). Visuose laiko atskaitos taškuose eozinofilų, kurie turėjo sąveikos su bronchų lygiųjų raumenų ląstelėmis gyvybingumas buvo aukštesnis, lyginant su kontroliniais, be sąveikos su bronchų lygiųjų raumenų ląstelėmis, eozinofilais (p<0,05).

Stebint gyvybingumą eozinofilų, išskirtų iš kontrolinės sveikų asmenų grupės, buvo nustatomas žymiai mažesnis eozinofilų gyvybingumas visuose laiko perioduose. Nustatyta, kad sveikų asmenų eozinofilų, kurie buvo kombinuotoje kultūroje su bronchų lygiųjų raumenų ląstelėmis, gyvybingumas patikimai sumažėja nuo 69,5±2,9 proc. (po 24 val.) iki 60,0±3,0 proc. (po 48 val.) ir 50,5±4,8 proc. (po 72 val.) (p<0,05). Tačiau eozinofilų, kurie neturėjo kontakto su bronchų lygiųjų raumenų ląstelėmis, gyvybingumas mažėjo labiau: gyvybingumas po 24 val. buvo 49,0±2,2 proc.; po 48 val. – 21,0±4,0 proc.; po 72 val. – 11,5±1,9 proc. (p<0,05). Taip pat visais atvejais eozinofilų, kurie buvo inkubuoti su bronchų lygiųjų raumenų ląstelėmis, gyvybingumas buvo didesnis, lyginant su kontroliniais, be sąveikos su bronchų lygiųjų raumenų ląstelėmis, eozinofilais (p<0,05) (2 pav. B).

REZULTATŲ APTARIMAS

Eozinofilai yra viena pagrindinių ląstelių, dalyvaujančių alerginės astmos patogenezėje ir kvėpavimo

takų remodeliacijoje. Jie išskiria įvairius citokinus, chemokinus ir augimo faktorius, netiesioginiai veikiančius ir plaučių struktūrinės ląsteles. Tačiau galima ir tiesioginė eozinofilų sąveika su bronchų lygiųjų raumenų ląstelėmis adhezijos principu [7]. Eozinofilų adhezija prie bronchų lygiųjų raumenų ląstelių vyksta ligando – receptoriaus jungimosi principu, eozinofilai turi paviršinių integrinų, kurie gali jungtis prie bronchų lygiųjų raumenų ląstelių adhezijos molekulių ICAM-1 ir VCAM-1. Pristvirtinę eozinofilai pasižymi stipresniu aktyvumu [8] bei galimai didesniu gyvybingumu, nes eozinofilų pristvirtinimas prie kitos ląstelės paviršiaus atpažįstamas kaip per integrinus perduodamas išgyvenamumo signalas.

Didesnis ląstelės gyvybingumas yra neatsiejamas nuo apoptozės – genetiškai užprogramuotos, natūralios ląstelių mirties. Tai biologiškai svarbus procesas, reikalingas audinių, organų bei kraujo ląstelių sistemų homeostazės palaikymui. Mažesnis apoptozę patiriančių eozinofilų skaičius lemia didesnę gyvybingumą bei aktyvių eozinofilų kiekį kvėpavimo takuose, kurie prisideda prie kvėpavimo takų remodeliacijos vystymosi sergant astma. Nustatyta keletas signalinių kelių, pasižyminčių antiapoptotiniu veikimu, tokių kaip, Wnt/β-katenino, NF-κB, MAPK, PI3K/Akt/mTOR [9]. Apoptozę slopinamieji signaliniai keliai aktyvuojami išskiriamų augimo faktorių, citokininų, hormonų ir užląstelinio užpildo baltymų, kurie skatina ląstelių išgyvenamumą.

Eozinofilų išgyvenamumo pusperiodis kvėpavimo takuose gali būti svarbus veiksnys siekiant nustatyti astmos eigą bei fenotipų ypatumus. Žinoma, kad sergančiųjų astma periferinio kraujo eozinofilai dėl ankstyvosios apoptozės geba išgyventi ilgiau nei sveikų asmenų eozinofilai [10, 11]. Tačiau šių eozinofilų apoptozė buvo matuojama netrukus po jų išskyrimo

iš periferinio kraujo. Šiuo tyrimu nustatėme, kad periferiniame kraujyje cirkuliuojantys apoptozę slopinamieji mediatoriai veikia eozinofilus iki 24 val., o vėliau jų išgyvenamumas drastiškai krenta (1, 2 pav.). Sergant astma, antiapoptotinių mediatorių, tokių kaip interleukinas (IL)-5, IL-9, IL-13, granuliocitų-makrofagų kolonijas stimuliuojamasis faktorius ir CCL tipo citokinų koncentracija kvėpavimo takuose skiriasi nuo nustatomų kraujyje. Tai reiškia, kad eozinofilų, patekusių į kvėpavimo takus, išgyvenamumui įtakos turi ir kiti veiksniai, tokie kaip sąveika su plaučių struktūrinėmis ląstelėmis.

Šiame tyrime naudojome unikalų periferinio kraujo eozinofilų ir bronchų lygiųjų raumenų ląstelių modelį, kurio metu galime stebėti tiesioginę šių dviejų ląstelių sąveiką *in vitro*, atkartojančią natūraliai vykstančius procesus *in vivo*. Nustatėme, kad kombinuotosios kultūros su bronchų lygiųjų raumenų ląstelėmis sudarymas žymiai padidino eozinofilų gyvybingumą tiek sergančiųjų astma, tiek ir sveikų asmenų grupėse (1 pav.). Tai rodo, kad sąveika su struktūrinėmis ląstelėmis arba jų išskirtais užląstelinio užpildo baltymais yra svarbus veiksnys, skatinantis eozinofilų gyvybingumą. Eozinofilų paviršiaus integrinų reikšmė yra dvejopa: jų pagalba eozinofilai prisitvirtina prie ląstelės taikinio bei nuo jų priklauso signalo perdavimas, įtraukiant ląstelės citoskeletą [12]. Tam, kad ląstelės normaliai funkcionuotų, reikalinga sąveika su jas supančia aplinka. Eozinofilų atpažįstami aplinkos signalai perduodami per išorinius integrinus, todėl jų sąveika su užląstelinio užpildo baltymų arba struktūrinių ląstelių adhezijos molekulių specifiniais aminorūgščių motyvais, tokiais kaip, Ar-Gly-Asp (RGD), atpažįstama kaip ląstelių išgyvenamumą skatinamieji signalai.

Tyrime naudojome periferinio kraujo eozinofilus, todėl rezultatai gali nevisiškai atsikartoti *in vivo* sąlygomis, kur sąveiką su bronchų lygiųjų raumenų ląstelėmis patiria tik eozinofilai, migravę į kvėpavimo takus. Tačiau šis modelis yra pakankamai patikimas, nes nustatyta, jog pirminė eozinofilų aktyvacija įvyksta dar periferiniame kraujyje, nes čia yra didžiausia aktyvuojančių mediatorių koncentracija.

Apibendrinus, galima teigti, kad sergančiųjų astma eozinofilų gyvybingumas yra didesnis, lyginant su sveikų asmenų eozinofilais. Eozinofilų kontaktas su bronchų lygiųjų raumenų ląstelėmis turėjo gyvybingumą skatinančios įtakos tiek sergančiųjų astma, tiek sveikų asmenų grupėse, tik astmos grupėje jis buvo statistiškai reikšmingai didesnis nei sveikųjų grupėje. Šie duomenys rodo, kad lėtinis kvėpavimo takų užde-

gimas, sergant astma, iš dalies formuojasi dėl ilgesnio migravusių eozinofilų gyvybingumo ir sąveikos su plaučių struktūrinėmis ląstelėmis. Nors sveikų asmenų plaučiuose eozinofilų neaptinkama arba aptinkami itin maži jų kiekiai, eksperimentinėmis sąlygomis šių eozinofilų gyvybingumo padidėjimas pastebimas todėl, kad eozinofilai, nors yra mažiau aktyvūs, turi išreikštus tuos pačius paviršiaus receptorius kaip ir sergančiųjų astma eozinofilai, o kontaktas su kita ląstele taip pat atpažįstamas kaip išgyvenamumo signalas. Tačiau lieka neaišku, kokie konkretūs molekuliniai signaliniai keliai yra įtraukti reguliuojant eozinofilų išgyvenamumą, kokį vaidmenį sąveikaudami su eozinofilais vaidina užląstelinio užpildo baltymai. Todėl reikalingi tolesni tyrimai, siekiant išsiaiškinti eozinofilų sukeltos kvėpavimo takų remodeliacijos mechanizmus sergant astma.

Gauta 2017 09 14

Priimta 2017 09 21

LITERATŪRA

1. Sircar G, Saha B, Bhattacharya SG, Saha S. Allergic asthma biomarkers using systems approaches. *Frontiers in genetics*. 2013;4.
2. Bergeron C, Tulic MK, Hamid Q. Airway remodeling in asthma: from benchside to clinical practice. *Canadian respiratory journal*. 2010;17:e85-e93.
3. Trivedi S, Lloyd C. Eosinophils in the pathogenesis of allergic airways disease. *Cellular and molecular life sciences*. 2007;64:1269-89.
4. Schuijs MJ, Willart MA, Hammad H, Lambrecht BN. Cytokine targets in airway inflammation. *Current opinion in pharmacology*. 2013;13:351-61.
5. Busse W, Elias J, Sheppard D, Banks-Schlegel S. Airway remodeling and repair. *Am J Respir Crit Care Med*, 1999; 160:1035-42.
6. Rosenberg HF, Dyer KD, Foster PS. Eosinophils: changing perspectives in health and disease. *Nature Reviews Immunology*. 2013;13:9.
7. Halwani R, Vazquez-Tello A, Sumi Y, Pureza MA, Bahammam A, Al-Jahdali H et al. Eosinophils induce airway smooth muscle cell proliferation. *J Allergy Clin Immunol*, 2013;33:595-604.
8. 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.
9. Ilmarinen P, Kankaanranta H. Eosinophil apoptosis as a therapeutic target in allergic asthma. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*. 2014;114:109-17.
10. Schwartz C, Willebrand R, Huber S, Rupec RA, Wu D, Locksley R et al. Eosinophil-specific deletion of IκBα in mice reveals a critical role of NF-κB-induced Bcl-x L for inhibition of apoptosis. *Blood*, 2015;125:3896-904.
11. 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 (Lond)*, 2015;12:25.
12. Ross TD, Coon BG, Yun S, Baeyens N, Tanaka K, Ouyang M et al. Integrins in mechanotransduction. *Curr Opin Cell Biol*, 2013;25:613-8.