

Eozinofilų įtaka bronchų lygiųjų raumenų remodeliacijai sergant astma

ANDRIUS JANUŠKEVIČIUS, IEVA JANULAITYTĖ, VIRGINIJA KALINAUSKAITĖ-ŽUKAUSKĖ, KĘSTUTIS MALAKAUSKAS
LSMU MA Pulmonologijos klinika

LSMU MA Pulmonologijos klinikos mokslininkų grupė: prof. R. Sakalauskas, doktorantai A. Januškevičius, Ieva Janulaitytė, V. Kalinauskaitė-Žukauskė, dr. D. Hoppenot ir dr. S. Vaitkienė, vadovaujama prof. K. Malakausko ir bendradarbiaudama su Nyderlandų Groningeno universiteto Molekulinės farmakologijos departamentu (atstovas doc. R. Gosens), nuo 2014 m. kovo iki 2016 gruodžio vykdė Lietuvos mokslo tarybos finansuotą projektą „Eozinofilų įtaka bronchų lygiųjų raumenų remodeliacijai sergant astma“ (finansavimo sutarties Nr. MIP-010/2014).

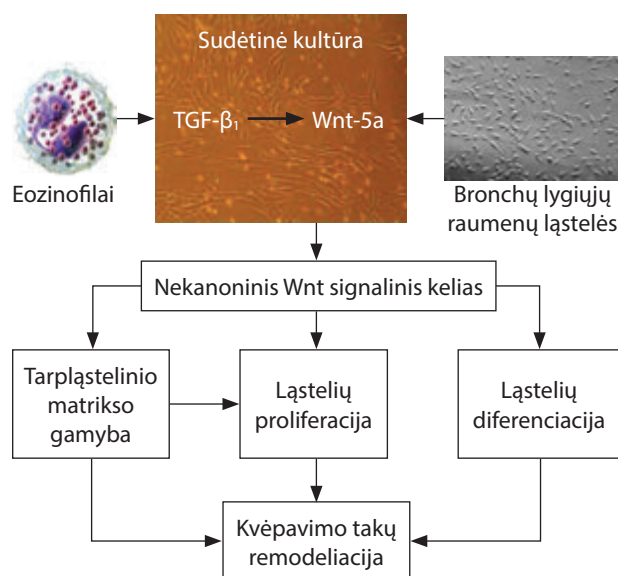
Astma yra lėtinė uždegiminė kvėpavimo takų liga, kuriai būdinga išnykstanti bronchų obstrukcija ir bronchų hiperreaktyvumas, padidėjęs aktyvuotų uždegiminių ląstelių ir uždegiminių mediatorių kiekis. Nors astmos etiologija pakankamai gerai iširta, ligos patogenezė, įskaitant molekulinis ligos išsivystymo mechanizmus, iki šiol nepakankamai iširta. Labiausiai pastebimas ir svarbiausias kvėpavimo takų struktūrinis pokytis yra bronchų lygiųjų raumenų masės padidėjimas ir bronchų spindžio susiaurėjimas. Šiuos pokyčius lemia suintensyvėjusi bronchų lygiųjų raumenų ląstelių proliferacija, padidėjęs ląstelių dydis bei gausesnė tarpląstelinio matrikso baltymų gamyba [1]. Eozinofilai yra pagrindinės uždegiminės ląstelės, įtrauktos į astmos patogenezę bei prisidedančios prie bronchų lygiųjų raumenų remodeliacijos vystymosi. Eozinofilai – tai cirkuliuojantys granulocitai, kurie gali migruoti į kvėpavimo takus, reaguodami į imunologinius ir uždegiminius dirgiklius [2]. Veikiant interleukinui-5 bei CCL11 ir CCL5 citokinams, eozinofilai migruoja į kvėpavimo takus, prisitvirtina prie aktyvuotų endotelio ląstelių ir po diapėdezės proceso gali kontaktuoti su kvėpavimo takų membranoje esančiomis struktūrinėmis ląstelėmis (bronchų lygiųjų raumenų ląstelėmis, plaučių fibroblastais, epitelio ląstelėmis) [3]. Eozinofilai veikia šias ląsteles dvejopai: netiesiogiai, per išskiriamus įvairius citokinus, chemokinus, augimo faktorius arba reaktyviąsias deguonies formas; tiesiogiai (adhezijos būdu), t. y. po jų prisitvirtinimo prie struktūrinių ląstelių adhezijos molekulių per savo paviršinius integrinus [4]. Toks eozinofilų poveikis gali prisidėti prie sutrikusios ląstelių proliferacijos, diferenciacijos, tarpląstelinio matrikso gamybos ir molekulinis signalinių kelių aktyvacijos taip prisidedant prie bronchų lygiųjų raumenų remodeliacijos vystymosi (1 pav.).

Wingless, integrinės-1 (Wnt) signalinis kelias re-

guliuoja įvairius organų vystymosi procesus, todėl sutrikusi jo aktyvacija sąlygoja galimą įvairių ligų išsivystymą [5]. Kumawat ir kt. (2013) pirmą kartą nustatė nekanoninio Wnt signalinio kelio, aktyvuojamo Wnt-5a ligando, ir transformuojančio augimo faktoriaus- β_1 (TGF- β_1) reikšmę bronchų lygiųjų raumenų ląstelių savybėms sergant plaučių ligomis [6]. Šio tyrimo metu buvo norima išsiaiškinti, ar eozinofilai turi įtakos Wnt ligandų raiškai, kuris, kartu su TGF- β_1 galėtų sukelti bronchų lygiųjų raumenų ląstelių aktyvumo pokyčius, įskaitant jų proliferaciją, tarpląstelinio matrikso baltymų gamybą bei įvairių citokininų išskyrimą (1 pav.).

TYRIMO TIKSLAS

Ištirti eozinofilų įtaką bronchų lygiųjų raumenų remodeliacijai sergant astma.



1 pav. Tyrimo teorinės prielaidos

Moksliniai darbai

TYRIMO UŽDAVINIAI

- Įvertinti eozinofilų poveikį bronchų lygiųjų raumenų ląstelėms, nustatant TGF- β_1 ir Wnt-5a) gamybą sergant astma.
- Įvertinti eozinofilų integrinų įtaką bronchų lygiųjų raumenų ląstelių proliferacijai sergant astma.
- Iširti alergeno poveikį eozinofilų integrinų sąveikai su bronchų lygiųjų raumenų ląstelėmis ir Wnt-5a baltymo gamybai.

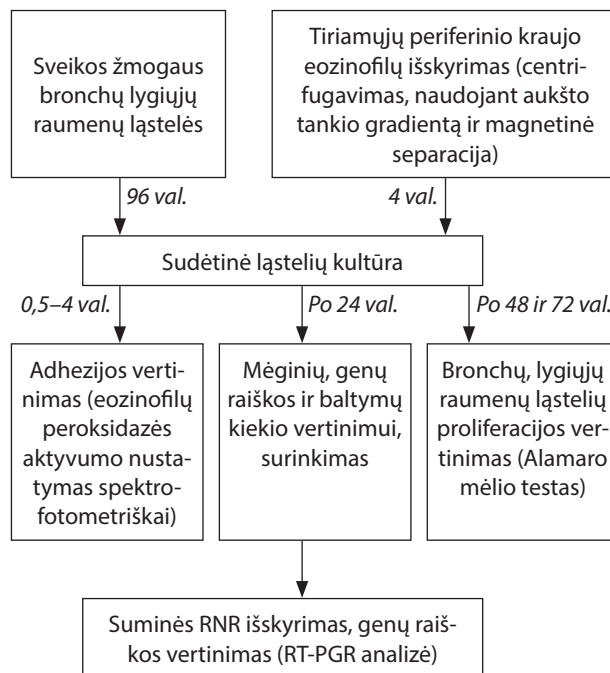
TIRIAMŪJŲ KONTINGENTAS

Moksliniame tyrime dalyvavo 19–49 metų nerūkantys asmenys, kurie tirti ir gydyti LSMUL KK Pulmonologijos klinikoje. Iš viso į tyrimą įtraukti 39 asmenys: 22 sergantieji astma ir 17 sveiki asmenys (kontrolinė grupė). Kiekvienas iš tiriamųjų pasirašė informuoto asmens sutikimo formą bei atitiko įtraukimo ir neįtraukimo kriterijus. Beveik visiems astma sergantiesiems pacientams nustatytas didesnis eozinofilų kiekis periferiniame kraujyje bei padidėjęs eozinofilų skaičius indukuotuose skrepliuose. Kiekvienam tiriamajam atliktas inhaliacinis bronchų provokacinis mėginys su namų dulkių erkių *Dermatophagoides pteronyssinus* alergenu didėjančiomis koncentracijomis (0,1, 1,0, 10,0 ir 33,3 IR/ml). Mėginys laikomas teigiamu, kai FEV1 nuo pradinės vertės sumažėja ne mažiau 20 proc. Siekiant įgyvendinti tyrime iškeltus uždavinius, buvo sudaromos individualios tiriamųjų kraujo eozinofilų ir linijinių bronchų lygiųjų raumenų ląstelių sudėtinės kultūros imituojuojant *in vivo* vykstančią šių dviejų ląstelių tipų tarpusavio sąveiką.

TYRIMO EIGA

Atvykti į Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Pulmonologijos kliniką tiriamieji buvo kviečiami du kartus. Atrankos vizito metu (pirmas vizitas) patikrinti įtraukimo, neįtraukimo kriterijai, atliktas plaučių funkcijos tyrimas, bronchų provokacinis mėginys su metacholinu ir alerginiai odos dūrio mėginiai. Antro vizito metu atlikta spirometrija prieš ir po bronchų provokacinio mėginio su specifiniu alergenu *D. pteronyssinus*, paimta periferinio kraujo, indikuoti skrepliai, išskiriami eozinofilai ir sudaromos sudėtinės ląstelių kultūros su bronchų lygiųjų raumenų ląstelėmis.

Po sudėtinių kultūrų sudarymo vertinama eozinofilų adhezija prie bronchų lygiųjų raumenų ląstelių laiko etapais (nuo 30 iki 240 min.) matuojant eozinofilų peroksidazės (EPO) aktyvumą spektrofotometrinio metodu, naudojant specifinį EPO substratą. Bronchų lygiųjų raumenų ląstelių proliferacija po sąveikos su eozinofilais matuota vertinant *AlamarBlue*® reagento redukciją, priklausančią nuo ląstelių metabolinio aktyvumo praėjus 48 ir 72 val. nuo sudėtinės kultūros sudarymo. Renkami mėginiai augimo faktorių, už eozinofilų adheziją prie bronchų lygiųjų raumenų



2 pav. Darbo planas ir tyrimo metodika

ląstelių atsakingų paviršiaus integrinų, tarpląstelinio matriksio baltymų įvertinimui bei genų raiškos analizei. WNT-5A ir TGF- β_1 , paviršiaus integrinų, kolageno ir fibronektino genų raiškos vertintos realaus laiko polimerazinės grandininės reakcijos (RL-PGR) metodu (2 pav.).

PAGRINDINIAI REZULTATAI

Eozinofilų integrinų raiška

Nustatėme, kad iš astma sergančių asmenų eozinofilų išskirtoje mRNR integrinų subvienetų raiška buvo padidėjusi atitinkamai: α_4 raiška – $3,7 \pm 1,0$ karto, α_M raiška – $4,6 \pm 1,4$, β_1 raiška – $4,1 \pm 1,1$, β_2 raiška – $16,8 \pm 4,9$ karto lyginant su sveikų asmenų eozinofilais. Taip pat nustatėme, kad didesnis eozinofilų integrinų α_4 , α_M , β_1 ir β_2 mRNR kiekis lėmė padidėjusią jų adheziją prie bronchų lygiųjų raumenų ląstelių. Kiekvienam tiriamajam buvo sudaryta sudėtinė kultūra su eozinofilais, išskirtais iš asmens periferinio kraujo, ir bronchų lygiųjų raumenų ląstelėmis. Po 24 val. inkubacinio laikotarpio pastebėjome, kad sergančiųjų astma eozinofiluose buvo $6,0 \pm 1,8$ karto didesnis integrino α_4 mRNR kiekis, lyginant su eozinofilais, kurie nebuvo inkubuojami sudėtinėje kultūroje ($p < 0,05$). Kitų integrinų raiškai, tiek sveikų, tiek sergančiųjų astma grupėse sudėtinės kultūros sudarymas įtakos neturėjo.

Eozinofilų adhezija

Eozinofilų adhezija prie bronchų lygiųjų raumenų ląstelių buvo reikšmingai padidėjusi astma sergančiųjų grupėje visais vertintais laiko etapais (nuo 30 iki 240 min.) lyginant su sveikų asmenų grupės eozinofilų

adhezijos reikšmėmis. Nustatėme, kad integrinų blokavimas su RGDS peptidu procentine dalimi reikšmingai sumažino eozinofilų adheziją abiejose tiriamųjų grupėse. Kontrolinės grupės adhezijos reikšmė sumažėjo vidutiniškai $9,54 \pm 0,71$ proc., o integrinų blokavimas astma sergančiųjų grupėje adheziją sumažino vidutiniškai $13,53 \pm 2,70$ proc. Taip pat nustatėme, kad inhaliacinis bronchų provokacinis mėginys su specifiniu alergenu lėmė padidėjusią astma sergančiųjų eozinofilų adheziją.

TGF- β_1 kiekybiniai matavimai

Nustatėme didesnę TGF- β_1 geno raišką sergančiųjų astma eozinofiluose lyginant su sveikų asmenų. Inhaliacinis bronchų provokacinis mėginys su specifiniu alergenu dar labiau padidino skirtumus tarp tiriamųjų grupių. Taip pat nustatėme, kad eozinofilai didina TGF- β_1 geno raišką bronchų lygiųjų raumenų ląstelėse abiejų grupių sudėtinėse kultūrose, tačiau astma sergančiųjų grupėje padidėjimas buvo reikšmingai didesnis. Eozinofilų integrinų blokavimas sumažino jų įtaką bronchų lygiųjų raumenų ląstelėms abiejų tiriamųjų grupėse. Šie duomenys buvo patvirtinti baltymų koncentracijos tyrimais iš surinkto sudėtinės kultūros supernatanto, kurie atitiko gautus genų raiškos rezultatus

Eozinofilai skatina WNT-5a ir tarpląstelinio matrikso baltymų gamybą

Praėjus 24 val. po sudėtinės kultūros sudarymo su sergančiųjų astma eozinofilais, nustatyta, kad WNT-5a geno raiška bronchų lygiųjų raumenų ląstelėse padidėjo $4,80 \pm 1,34$ karto, kolageno geno raiška – $2,13 \pm 0,23$ karto, lyginant su bronchų lygiųjų raumenų ląstelėmis be sąveikos su eozinofilais. Nerasta reikšmingų genų raiškos pokyčių bronchų lygiųjų raumenų ląstelėse po inkubacijos su eozinofilais išskirtais iš sveikų asmenų. Taip pat nustatyta, kad eozinofilai, išskirti tiek iš astma sergančiųjų, tiek iš sveikų asmenų, reikšmingai padidino fibronektino geno raišką bronchų lygiųjų raumenų ląstelėse lyginant su kontrolinėmis bronchų lygiųjų raumenų ląstelėmis, be sąveikos su eozinofilais, atitinkamai $1,71 \pm 0,25$ ir $1,73 \pm 0,20$ karto. Sumažėjusi eozinofilų adhezija prie bronchų lygiųjų raumenų ląstelių arba tarpląstelinio matrikso baltymų paviršiaus, blokuojant RGDS peptidu, turėjo reikšmingą WNT-5a, fibronektino ir kolageno genų raiškos slopinamąjį poveikį.

Eozinofilų sukelta bronchų lygiųjų raumenų ląstelių proliferacija

Sergančiųjų astma eozinofilai labiau skatino bronchų lygiųjų raumenų ląstelių proliferaciją, lyginant su sveikų asmenų eozinofilais, atitinkamai – 21 ir 5 proc. Po bronchų lygiųjų raumenų ląstelių inkubacijos su eozinofilais, kurių integrinai buvo blokuoti, šių ląste-

lių proliferacija sumažėjo nuo 21 iki 10,5 proc. ribos astma sergančiųjų grupėje, o sveikų asmenų grupėje proliferacija sumažėjo nuo 5 iki 2,15 proc.

IŠVADOS

Gavus eksperimentinių tyrimų rezultatus, padarytos tokios išvados:

- Dėl intensyvesnės paviršiaus integrinų raiškos eozinofilai pasižymi stabilesne ir tvirtesne adhezija prie bronchų lygiųjų raumenų ląstelių sergant astma.
- Sergant astma eozinofilai skatina Wnt-5a ir TGF- β_1 genų raišką bronchų lygiųjų raumenų ląstelėse ir sąlygoja padidėjusią fibronektino ir kolageno gamybą.
- Sergančiųjų astma eozinofilai labiau skatina bronchų lygiųjų raumenų ląstelių proliferaciją, lyginant su sveikų asmenų eozinofilais, patikimai prisidedami prie bronchų lygiųjų raumenų remodeliacijos vystymosi.
- Eozinofilų integrinų blokavimas patikimai slopina jų adhezija bei įtaką Wnt-5a, TGF- β_1 , tarpląstelinio matrikso baltymų genų raiškai bei bronchų lygiųjų raumenų ląstelių proliferacijai sergant astma.
- Inhaliacinis bronchų provokacinis mėginys su specifiniu alergenu skatino eozinofilų aktyvumą, įskaitant jų adheziją bei įtaką bronchų lygiųjų raumenų ląstelių proliferacijai.

PRAKTIŠKŲ TYRIMŲ REIKŠMĖ

Šio mokslinio tyrimo rezultatai suteikia naujos informacijos apie astmos patogenezę. Nustatėme, kad:

1. Eozinofilų poveikis bronchų lygiųjų raumenų ląstelėms, sergant astma yra svarbi tiesioginė jų adhezija per integrinų-ligando sąveiką.
2. Padidėjusi tarpląstelinio matrikso gamyba sergant astma priklauso nuo eozinofilų aktyvuojamo TGF- β_1 -Wnt signalinių kelių tarpusavio sąveikos.
3. Bronchų lygiųjų raumenų remodeliacija gali būti iš dalies kontroliuojama blokuojant eozinofilų integrinus ir taip slopinant jų adheziją prie bronchų lygiųjų raumenų ląstelių bei nuo integrinų priklausomą signalo perdavimą.

REZULTATŲ SKLAIDA

Remiantis gautais rezultatais, publikuoti du straipsniai užsienyje leidžiamuose periodiniuose mokslo leidiniuose, turinčiuose cituojamumo rodiklį (Impact factor) Clarivate Analytics (buvusi Thomson Reuters) Web of Science duomenų bazėje:

- Januskevicius A, Gosens R, Sakalauskas R, Vaitkiene S, Janulaityte I, Halayko AJ, Hoppenot D, Malakauskas K. Suppression of Eosinophil Integrins Prevents Remodeling of Airway Smooth

Moksliniai darbai

Muscle in Asthma. *Frontiers in Physiology*. 2016; 7:680.

- Januskevicius A, Vaitkiene S, Gosens R, Janulaityte I, Hoppenot D, Sakalauskas R, Malakauskas K. 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 pulmonary medicine*. 2016 Jun 13;16(1):94.

Taip pat pristatyta 11 mokslinių tezių – trys Lietuvos ir aštuonios užsienyje vykusiose tarptautinėse konferencijose, publikuoti trys mokslo populiarinimo darbai tyrimo tematika. Tyrimo metu gauti rezultatai buvo panaudoti dviem bakalauro ir dviem magistro baigiamiesiems darbams.

LITERATŪRA

1. Araujo BB, Dolhnikoff M, Silva LF, Elliot J, Lindeman JH, Ferreira DS, et al. Extracellular matrix components and regulators in the airway smooth muscle in asthma. *Eur Respir J*. 2008; 32(1):61-9.
2. Possa SS, Leick EA, Prado CM, Martins MA, Tibério IF. Eosinophilic inflammation in allergic asthma. *Front Pharmacol*. 2013; 4:46.
3. Doeing DC, Solway J. Airway smooth muscle in the pathophysiology and treatment of asthma. *J Appl Physiol*. 2013; 114(7):834-43.
4. 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.
5. Sharma S, Tantisira K, Carey V, Murphy AJ, Lasky-Su J, Celedón JC, et al. A role for Wnt signaling genes in the pathogenesis of impaired lung function in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010; 181(4):328-36.
6. Kumawat K, Menzen MH, Bos IS, Baarsma HA, Borger P, Roth M, et al. Noncanonical WNT-5A signaling regulates TGF-beta-induced extracellular matrix production by airway smooth muscle cells. *FASEB J*. 2013; 27(4):1631-43.