

Devinto tipo T limfocitų pagalbininkų bei eozinofilų apoptozės vaidmuo sergant alergine astma

Deimantė Hoppenot

LSMU MA Pulmonologijos klinika

2016 metų gegužės 4 d. Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Medicinos akademijos viešame Medicinos mokslo krypties tarybos posėdyje Deimantė Hoppenot sėkmingai apgynė daktaro mokslo laipsnio disertaciją „Devinto tipo T limfocitų pagalbininkų bei eozinofilų apoptozės vaidmuo sergant alergine astma“. Disertacija rengta 2011–2016 m. Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Medicinos akademijos Pulmonologijos klinikoje.

2011–2015 m. mokslinis vadovas: prof. dr. Raimundas Sakalauskas.

2015–2016 m. mokslinis vadovas: prof. dr. Kęstutis Malakauskas.

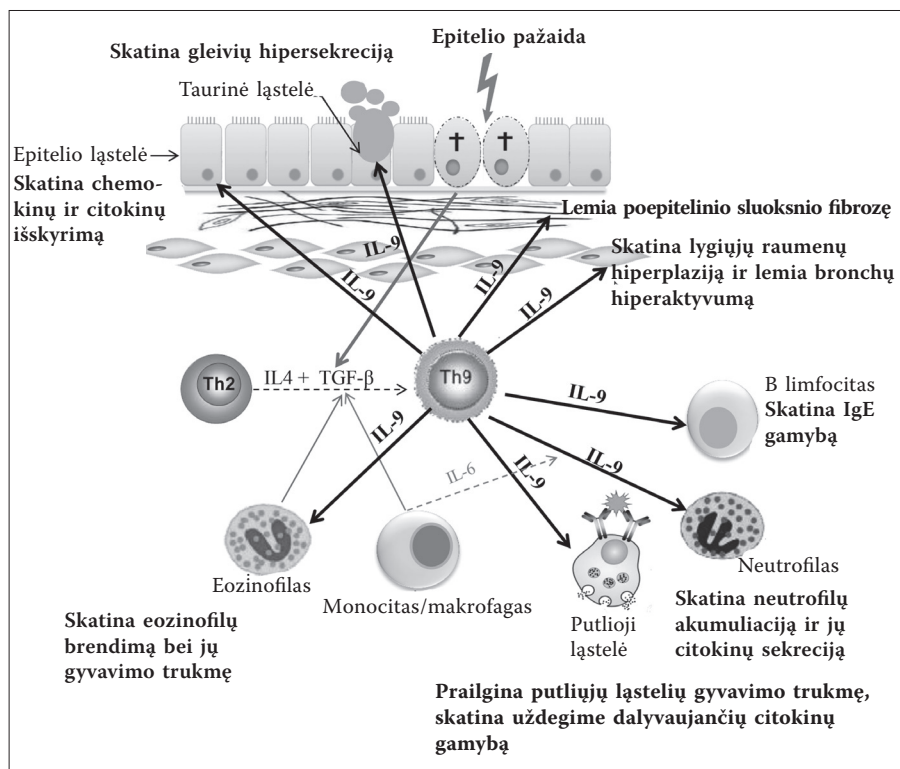
Astma yra lėtinė kvėpavimo takų uždegimo liga, kurios paplitimo ir sergamumo rodikliai pastaraisiais metais pastebimai didėja daugelyje išsivysčiusių šalių, tarp jų – ir Lietuvoje. Astmos metu atsiranda lėtinis neinfekcinis kvėpavimo takų uždegimas, kurį dar labiau sustiprina aplinkos alergenai, orų kaita, kvėpavimo takų infekcijos arba fizinis krūvis. Pasaulio sveikatos organizacijos duomenimis, astma serga apie 300 milijonų žmonių ir sergančiųjų šia liga kasmet vis daugėja. Oficialiais Lietuvos statistikos duomenimis, sergančiųjų astma skaičius per pastaruosius metus taip pat didėja – 2014 m. užregistruota 44,6 astmos atvejų, tenkančių tūkstančiui Lietuvos gyventojų, tuo tarpu 2011 m. buvo užregistruota tik 36,2 atvejų, tenkančių tūkstančiui Lietuvos gyventojų. Nors astma yra viena seniausiai tyrinėjamų ligų, jos patogenezė tebėra nevisiškai aiški. Žinoma, kad astmos patogenezėje dalyvauja įgimto ir įgyto imuniteto komponentai, tačiau sergant astma vykstantys mechanizmai iki šių dienų nėra iki galo aiškūs, todėl tolesni astmos patogenezėje dalyvaujančių ląstelių tyrimai išlieka aktualūs ir svarbūs. Neseniai atrasta T

limfocitų pagalbininkų subpopuliacijai priklausanti ląstelė (Th9), kuri, manoma, yra viena iš pagrindinių interleukino-9 (IL-9) gamintojų ir dalyvauja alerginio uždegimo patogenezėje. Th9 limfocitai atrasti vykdant eksperimentinius tyrimus su ląstelių kultūromis, po to šios ląstelės atrastos graužikų, o vėliau ir žmogaus organizme. Kadangi tyrimai pradėti vykdyti neseniai, Th9 limfocitų vaidmuo sergant alerginėmis kvėpavimo takų ligomis mažai ištirtas. Ypač mažai mokslinių duomenų apie žmogaus Th9 limfocitus bei jų vaidmenį lėtinio neinfekcinio alerginio uždegimo metu. Lietuvos sveikatos mokslo universiteto Medicinos fakulteto Pulmonologijos klinikoje 2011–2016 m. vykdytas mokslinis tyrimas, kuriame siekta nustatyti devinto tipo T limfocitų pagalbininkų (Th9 limfocitų) bei eozinofilų apoptozės vaidmenį sergant astma.

METODIKA

Iš viso ištirti 53 suaugę sergantieji alergine astma (AA, tiriamoji grupė), 29 – alerginiu rinitu (AR, palyginamoji grupė) bei 36 sveiki asmenys (kontrolinė grupė). Statistinei analizei naudoti

47 alergine astma sergančiųjų, 29 alerginiu rinitu sergančiųjų bei 30 sveikų asmenų duomenys. Visiems tiriamiesiems taikyti šie atrankos kriterijai: nerūkantys 18–50 m. vyrai ir moterys, sergantieji alergine astma ir alerginiu rinitu, kurių simptomų trukmė ≥ 1 metai ir kuriems nustatyti teigiami odos dūrio mėginiai su namų dulkių erkės *Dermatophgoides pteronyssinus* (*D. pteronyssinus*), 5 žolių mišinio ar beržų alergenais, sergantiesiems astma nustatytas teigiamas bronchų provokacijos mėginys su metacholinu ar teigiamas bronchų dilatacijos mėginys, o forsuoto iškvėpimo tūris per pirmąją sekundę (FEV_1) ≥ 70 proc. normos. Į kontrolinę grupę įtraukti nerūkantys sveiki asmenys, kuriems nenustatytas įsijautrinimas alergenams, nesergantys jokiais ūimomis ar lėtinėmis uždegiminėmis bei sisteminėmis ligomis. Visi tyrimo dalyviai informuoti apie mokslinio tyrimo tikslą ir eigą, o sutikimą dalyvauti jame patvirtinę raštu. Tyrimo dalyviams taikyti šie neįtraukimo kriterijai: aktyvūs klinikiniai sezoninės alergijos simptomai, kliniškai reikšmingos nuolatinės alergijos simptomai (pvz., sukeltos katės ar šuns epidermio alergeny), aktyvi infekcija



1 pav. Th9 limfocitų vaidmuo vėlyvosios fazės kvėpavimo takų uždegimo metu sergant astma

vieno mėnesio laikotarpiu, vartojami vaistai iki tyrimo pradžios: gliukokortikoidai (inhaliuojamieji, intranazaliniai, geriamieji) trumpiau nei 1 mėn., antihistamininiai vaistai – trumpiau nei 7 d., trumpai veikiantys β2 agonistai – trumpiau nei 12 val., ilgai veikiantys β2 agonistai – trumpiau nei 24 val., nėštumas, rūkymas. Th9 limfocitai analizuoti tėkmės citometru (FACSCalibur, BD Biosciences, USA). Th9 limfocitai vertinti kaip CD4⁺ IL-9⁺ IFNγ⁻ TGFβ1⁻ IL-4⁺ IL-17⁺ ląstelės. Eozinofilų apoptozė taip pat analizuota tėkmės citometru naudojant CellQuest programinę įrangą, o IL-9 kraujo serume nustatytas imunofermentiniu ELISA metodu pagal gamintojo rekomendacijas.

TYRIMO EIGA

Tyrimas vyko Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Pulmonologijos klinikoje. Atrankos vizito metu (pirmasis vizitas) patikrinti įtraukimo ir neįtraukimo į tyrimą kriterijai, visiems tyrimo dalyvaujantiems pacientams atliktas plaučių funkcijos tyrimas, bronchų provokacija su metacholinu ir alerginiai odos dūrio mėginiai. 24 val. iki bronchų provokacijos su savitu alergenu

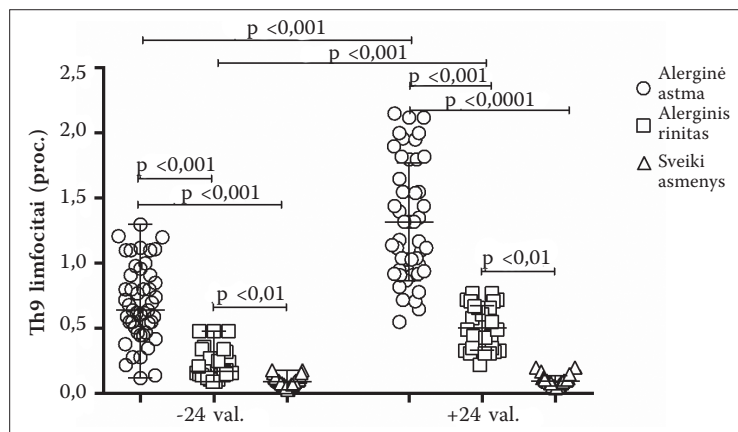
atlikta spirometrija, paimtas periferinis kraujas, atliktas citologinis periferinio kraujo ląstelių tyrimas, tirti periferinio kraujo Th9 limfocitai ir su jų aktyvumu susiję transkripcijos veiksniai STAT6 ir PU.1. Taip pat tirta periferinio kraujo eozinofilų apoptozė bei su ja susijęs transkripcijos veiksnys NF-κB bei užšaldytas serumas citokininų tyrimams. Bronchų provokacija su specifiniu alergenu pradėta 8.00 val. ryte, po jos reguliariai tirta plaučių funkcija. Pakartotinai periferinis kraujas paimtas ir ištirtas praėjus 24 val. po bronchų provokacijos savitu alergenu. Bronchų provokaciją pasirinkta atlikti su namų dulkių erkės *D. pteronyssinus*, 5 žolių mišinio ar beržų alergenais – ne alergenų sezono metu (alergenai pasirinkti pagal odos dūrio mėginių rezultatus, anamnezės bei klinikinius duomenis). Pastarieji alergenai yra vieni iš labiausiai paplitusių oro alergenų Lietuvoje. Visiems sveikiems asmenims bronchų provokacija atlikta su *D. pteronyssinus* alergenu.

Devinto tipo T limfocitų pagalbininkų reikšmė vėlyvosios fazės kvėpavimo takų uždegimo metu

Pagal antigeno tipą su pagrindinio audinių suderinamumo komplekso

(MHC) I ar II klasės molekulių pagalba antigenas pateikiamas naiviesiems CD4⁺T limfocitams. Taip sukeliama specifinis imuninis atsakas. Paskatinti naivieji CD4⁺T limfocitai diferencijuojasi į skirtingus efektorinių T limfocitų pogrupius. Vienas iš naujausiai atrastų ir kol kas mažiausiai tyrinėtų šių pogrupių atstovas – Th9 limfocitas, dalyvaujantis astmos, autoimuninių ir navikinių ligų bei helmintų sukeltų infekcijų patogenezėje. Šių ląstelių vystymuisi būtinas interleukinas-4 (IL-4) bei audinių augimo veiksnys-beta (TGF-β). IL-4 aktyvina transkripcijos veiksnį STAT6. Tuo tarpu TGF-β veikia tiek tiesiogiai aktyvindamas SMAD baltymus, tiek netiesiogiai aktyvindamas transkripcijos veiksnį PU.1 ir tokiu būdu skatina Th9 limfocitų vystymąsi bei aktyvumą. Th9 limfocitai – pagrindinės interleukino 9 (IL-9) ląstelės gamintojos. Šis citokinas skatina gleivių hipersekreciją, taurinių ląstelių hiperplaziją bei fibrozės formavimąsi poepitelinėje bronchų dalyje. IL-9 skatina kitų T limfocitų pogrupių, putliųjų ląstelių vystymąsi bei diferenciaciją, intensyvesnę IgE ir IgG gamybą. Manoma, kad IL-9 lemia didesnę IL-5Rα ekspresiją ant eozinofilų paviršiaus, sąlygodamas sulėtėjusią eozinofilų apoptozę (1 pav.) ir prailgindamas eozinofilų gyvavimo trukmę – taip paryškinamas astmos metu sukeltas alerginis uždegimas.

Įvertinus ląstelių aktyvumą ir raišką nustatyta, kad prieš provokaciją savitu alergenu sergantiesiems alergine astma (AA) ir alerginiu rinitu (AR) periferinio kraujo Th9 limfocitų raiška ir serumo IL-9 koncentracija yra didesnė palyginti su sveikais asmenimis. Taip pat nustatyta, kad AA ir AR grupėse prieš bronchų provokaciją alergenu transkripcijos veiksnio STAT6 ir PU.1 raiška periferinio kraujo Th9 limfocituose buvo intensyvesnė palyginti su sveikų asmenų grupe. Alergeno sukeltos vėlyvosios fazės kvėpavimo takų uždegimo metu AA grupėje nustatytas didesnis periferinio kraujo Th9 limfocitų skaičius, lyginant su sveikų asmenų kontroline grupe bei pradiniais AA duomenimis (2 pav.), tuo tarpu sveikų asmenų grupėje Th9 limfocitų raiška nekito (3 pav.). Panašūs pokyčiai buvo abie-



2 pav. Kraujo Th9 limfocitų raiška 24 val. prieš ir po provokacijos savituoju alergenu

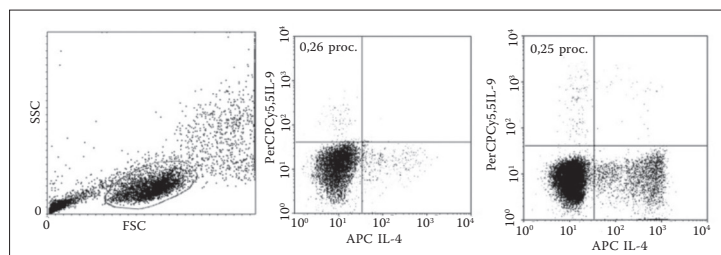
Jose grupėse tiriant serumo IL-9 (4 pav.) kiekį. Tik AA grupėje tiek prieš provokaciją alergenu, tiek alergeno sukulto vėlyvosios fazės kvėpavimo takų uždegimo metu nustatytos sąsajos tarp periferinio kraujo Th9 limfocitų skaičiaus bei serumo IL-9 kiekio. Alergeno sukulto vėlyvosios fazės kvėpavimo takų uždegimo metu AA grupėje nustatyta didesnė transkripcijos veiksnio PU.1 (5 pav.) ir STAT6 (6 pav.) raiška periferinio kraujo Th9 limfocituose lyginant su AR grupe bei pradiniais AA duomenimis. Įdomu tai, kad tik AA grupės tiriamiesiems, praėjus 24 val. po bronchų provokacijos savituoju alergenu, nustatytas ryšys tarp serumo IL-9 kiekio bei periferinio kraujo PU.1 raiškos Th9 limfocituose. Tyrimo rezultatai parodė ryšį tarp Th9 limfocitų raiškos ir p-STAT6 bei PU.1 raiškos taip pat tik AA sergančiųjų grupėje.

Sergančiųjų alergine astma pogrupyje, kuriems po bronchų provokacijos alergenu išsivystė ir ankstyvoji, ir vėlyvoji bronchų obstrukcija, 24 val. prieš provokaciją ir po jos stebėta intensyvesnė Th9 limfocitų raiška bei didesnė serumo IL-9 koncentracija, palyginti su AA sergančiais pacientais, kuriems vystėsi tik izoliuota ankstyvoji bronchų obstrukcija.

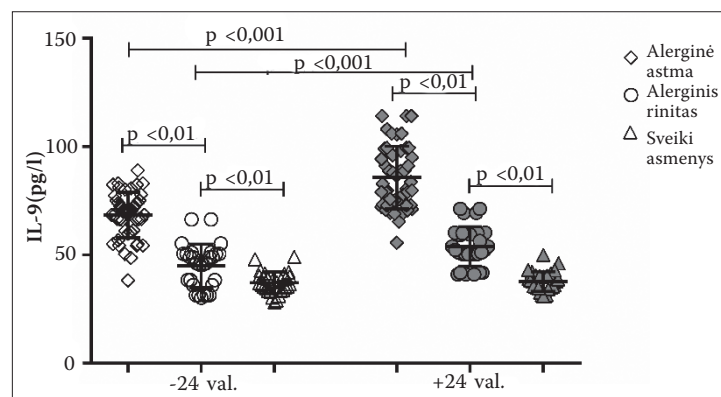
Periferinio kraujo eozinofilų apoptozė ir transkripcijos veiksnio NF-κB raiška periferinio kraujo eozinofiluose alergeno sukulto vėlyvosios fazės kvėpavimo takų uždegimo metu

24 val. prieš bronchų provokaciją savituoju alergenu AA bei AR grupių tiriamiesiems, palyginti su sveikais asmenimis, nustatyta sulėtėjusi periferinio kraujo eozinofilų apoptozė. Alergeno sukulto vėlyvosios fazės kvėpavimo takų uždegimo metu apoptozės pažeistų eozinofilų skaičius dar labiau sumažėjo šiose abiejose grupėse palyginti su sveikais asmenimis bei pradiniais AA ir AR duomenimis (7 pav.).

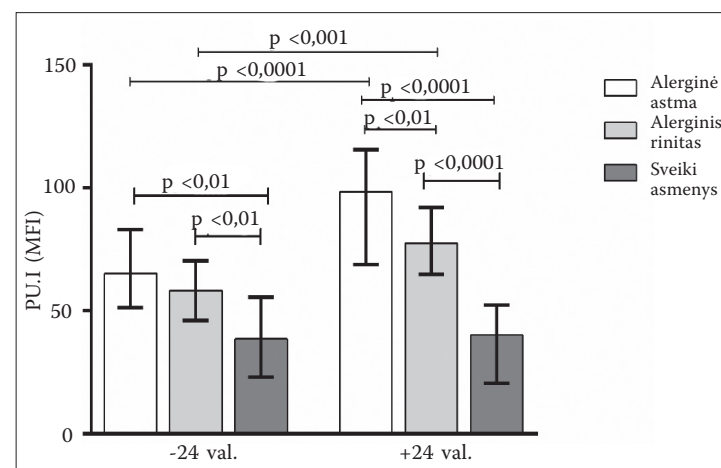
Prieš provokaciją savituoju alergenu AA ir AR grupių tiriamiesiems nustatyta intensyvesnė transkripcijos veiksnio NF-κB raiška periferinio kraujo eozinofiluose palyginti su sveikais asmenimis. Alergeno sukulto vėlyvosios fazės kvėpavimo takų uždegimo metu AA grupės tiriamiesiems nustatyta didesnė transkripcijos veiksnio



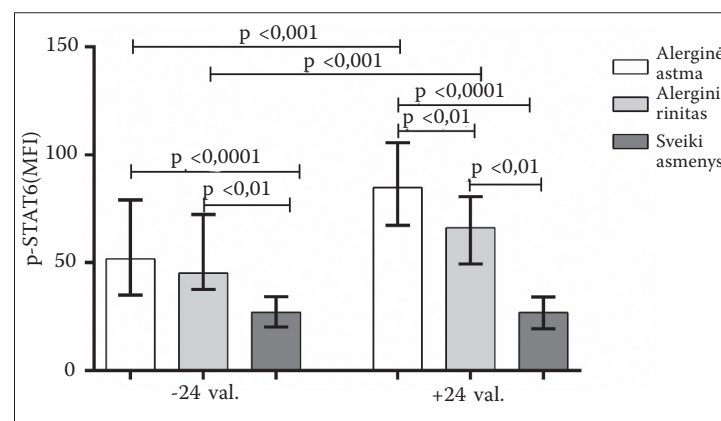
3 pav. Th9 limfocitai prieš (A) ir po (B) bronchų provokacijos specifiniu alergenu



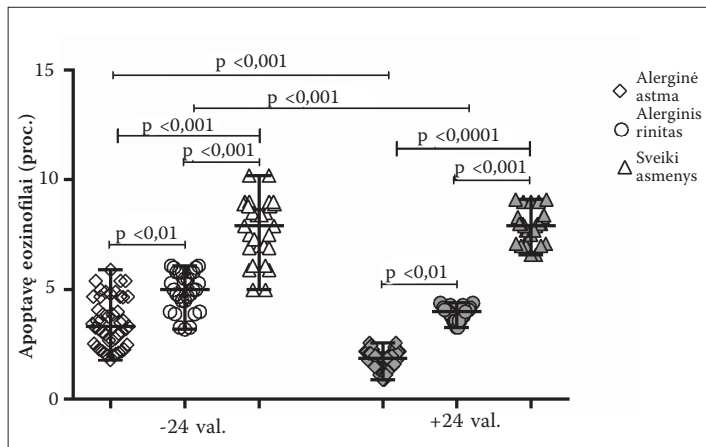
4 pav. Serumo IL-9 koncentracija 24 val. prieš ir po provokacijos savituoju alergenu



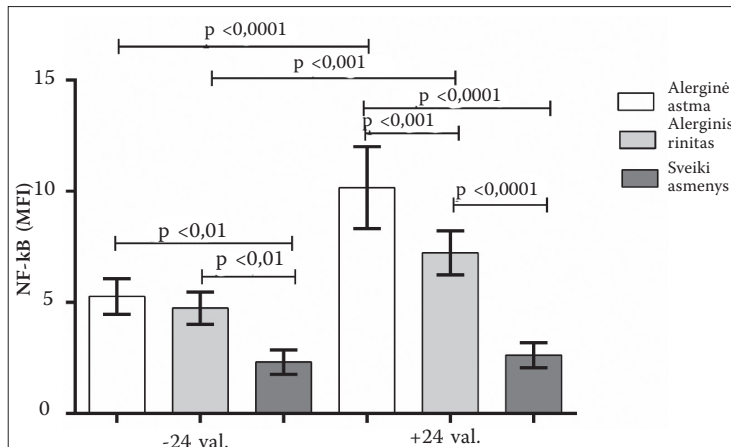
5 pav. Transkripcijos veiksnio PU.1 raiška Th9 limfocituose 24 val. prieš ir po provokacijos savituoju alergenu



6 pav. Transkripcijos veiksnio STAT6 raiška Th9 limfocituose 24 val. prieš ir po provokacijos savituoju alergenu



7 pav. Kraujo eozinofilų apoptozė 24 val. prieš ir po provokacijos savituoju alergenu



8 pav. Transkripcijos veiksnio NF-κB raiška kraujo eozinofiluose 24 val. prieš ir po provokacijos savituoju alergenu

NF-κB raiška periferinio kraujo eozinofiluose palyginti su AR grupe bei pradiniais duomenimis (8 pav.). Reikia pabrėžti, kad tik AA grupės tiriamiesiems nustatytos statistiškai reikšmingos sąsajos tarp NF-κB raiškos periferinio kraujo eozinofiluose ir apoptavusių eozinofilų kiekio periferiniame kraujyje 24 val. prieš ir 24 val. po bronchų provokacijos alergenu. AA grupės tiriamųjų serumo IL-9 kiekis koreliavo su apoptozės pažeistų periferinio kraujo eozinofilų skaičiumi 24 val. prieš ir po bronchų provokacijos alergenu.

Prieš bronchų provokaciją alergenu ir po jos abiejų AA pogrupių tiriamiesiems (tiek sergančių AA, kuriems išsivystė tik ankstyvoji bronchų obstrukcija, tiek sergančių AA, kuriems išsivystė ir ankstyvoji, ir vėlyvoji bronchų obstrukcija) nustatytas reikšmingai mažesnis apoptozės pažeistų periferinio kraujo eozinofilų skaičius palyginti su sveikais asmenimis. Palyginus abu AA pogrupius, nustatytas ženkliai mažesnis apoptozės pažeistų eozinofilų skaičius AA turinčios ankstyvąją ir vėlyvąją bronchų obstrukciją pogrupyje palyginti su sergančiais AA, kuriems išsivystė tik izoliuota ankstyva bronchų obstrukcija tiek 24 val. prieš, tiek po provokacijos savituoju alergenu.

APIBENDRINIMAS

Įvertinus uždegime dalyvaujančių ląstelių raišką bei funkcijas nustatyta, kad alerginės kvėpavimo ligos (alerginė astma ir alerginis rinitas) skiriasi ne tik klinikiniais požymiais, bet ir uždegimo ląstelių raiška bei jų aktyvumu. Šių uždegime dalyvaujančių ląstelių ypatumai lemia lėtinį kvėpavimo takų uždegimo pobūdį bei patofiziologines ligos savybes. Šis perspektyvusis mokslinis tyrimas suteikė žinių apie naujas astmos patogenezėje dalyvaujančias ląsteles – Th9 limfocitus. Tyrimo rezultatai parodė, kad Th9 limfocitai bei su jais susiję transkripcijos veiksniai ir IL-9 yra reikšmingi vykstant vėlyvosios fazės kvėpavimo takų uždegimui sergantiesiems alergine astma. Nustatyta, kad šios ląstelės taip pat yra susijusios su sulėtėjusia eozinofilų apoptoze ypač vėlyvosios fazės kvėpavimo takų uždegimo metu sergantiesiems alergine astma.

PADĖKA

Dėkoju visiems, kurie nors menkiausia dalele, geru žodžiu ar geromis mintimis prisidėjo prie šios disertacijos rengimo. Labai dėkoju prof. Raimundui Sakalauskui – už suteiktas galimybes, diskusijas ir įvairiapusę pagalbą. Dėkoju prof. Kęstučiui Malakauskui – už tai, kad išmokė suprasti mokslinį tekstą, už kantrybę mokant rašyti straipsnius, už visą skirtą laiką, už „prilaikymą ant žemės“, už mokslines idėjas, už geranoriškumą bei bendradarbiavimą. Taip pat nuoširdžiai dėkoju visam Pulmonologijos klinikos bei Pulmonologijos laboratorijos kolektyvui už visapusišką pagalbą visu doktorantūros laikotarpiu.

LITERATŪRA

1. Marinho S, Simpson A, Marsden P, Smith JA, Custovic A: Quantification of atopy, lung function and airway hypersensitivity in adults. *Clinical and translational allergy* 2011, 1(1):16.
2. Global initiative for asthma (GINA). Global strategy for asthma management and prevention: NHLBI/WHO workshop report. National Institutes of Health, National Heart, Lung and Blood Institute, Bethesda (2002) Revised 2015. Available from: <http://www.ginasthma.org/>
3. Kim HY, DeKruyff RH, Umetsu DT: The many paths to asthma: phenotype shaped by innate and adaptive immunity. *Nature immunology* 2010, 11(7):577-584.
4. Veldhoen M, Uytendhove C, van Snick J, Helmsby H, Westendorf A, Buer J, Martin B, Wilhelm C, Stockinger B: Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nature immunology* 2008, 9(12):1341-1346.
5. Jones CP, Gregory LG, Causton B, Campbell GA, Lloyd CM: Activin A and TGF-beta promote T(H)9 cell-mediated pulmonary allergic pathology. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2012, 129(4):1000-1010 e1003.
6. Jones CP, Gregory LG, Causton B, Campbell GA, Lloyd CM: Activin A and TGF-beta promote T(H)9 cell-mediated pulmonary allergic pathology. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2012, 129(4):1000-1010 e1003.
7. Yao W, Tepper RS, Kaplan MH: Predisposition to the development of IL-9-secreting T cells in atopic infants. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2011, 128(6):1357-1360 e1355.
8. Devos S, Cormont F, Vrtala S, Hooghe-Peters E, Pirson F, Snick J: Allergen-induced interleukin-9 production in vitro: correlation with atopy in human adults and comparison with interleukin-5 and interleukin-13. *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 2006, 36(2):174-182.
9. Licona-Limon P, Hena-Mejia J, Temann AU, Gagliani N, Licona-Limon I, Ishigame H, Hao L, Herbert DR, Flavell RA: Th9 Cells Drive Host Immunity against Gastrointestinal Worm Infection. *Immunity* 2013, 39(4):744-757.
10. Ciccia F, Guggino G, Rizzo A, Manzo A, Vitolo B, La Manna MP, Giardina G, Sireci G, Dieli F, Montecucco CM et al: Potential involvement of IL-9 and Th9 cells in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 2015, 54(12):2264-2272.

Kiti literatūros šaltiniai (iš viso 20) redakcijoje.