

Periferinio kraujo neutrofilų ir eozinofilų aktyvumas alergeno sukeltos vėlyvos fazės kvėpavimo takų uždegimo metu sergant astma

Simona Lavinskienė

LSMU MA Pulmonologijos ir imunologijos klinika

2014 metų gruodžio 19 d. Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Medicinos akademijos (LSMU MA) viešajame Biologijos mokslo krypties tarybos posėdyje Simona Lavinskienė apgynė daktaro mokslo laipsnio disertaciją „Periferinio kraujo neutrofilų ir eozinofilų aktyvumas alergeno sukeltos vėlyvos fazės kvėpavimo takų uždegimo metu sergant astma“. Mokslinė vadovė – dr. Jolanta Jeroch, mokslinis konsultantas – prof. Kęstutis Malakauskas. Disertacija rengta 2010–2014 metais LSMU MA Pulmonologijos ir imunologijos klinikoje.

Astma yra lėtinė kvėpavimo takų uždegimo liga, kuriai būdingas padidėjęs bronchų reaktyvumas, pasikartojantys sutrikusio bronchų laidumo epizodai, išnykstantys savaime ar gydant; pasireikiantys veržimu krūtinėje, švokštimu, dusuliu ar kosuliu. Eksperimentiniai bei klinikiniai tyrimai parodė, kad lėtinis neinfekcinis kvėpavimo takų uždegimas – svarbiausia astmos patogenezės grandis, lemianti šios ligos klinikinę eigą, sunkumą bei skiriamo gydymo efektyvumą. Neabejojama, kad bronchų gleivinės infiltracija T limfocitais ir eozinofilais – centrinė patomorfologinė ašis, pradedanti imuninio atsako kaskadą, būdingą astmai. Tačiau šis mechanizmas ne visuomet gali paaiškinti astmos metu esančio kvėpavimo takų uždegimo bei klinikinių simptomų įvairumą, eigos ypatumus ir net skirtingą atsaką į gydymą. Todėl įvairių šalių mokslininkai nenuilsdami ieško naujų astmos patogenezės veiksnių. Naujausiais tyrimais mokslininkai nustatė, kad, sergant alergine astma, vyrauja ne tik eozinofilai ir jų sąlygotas uždegimas – jų patogenezėje svarbios ir kitos ląstelės. Sergantiems alerginėmis kvėpavimo ligomis, ypač nekontroliuojama ar paūmėjusia astma, nustatoma intensyvi neutrofilų infiltracija kvėpavimo takuose.

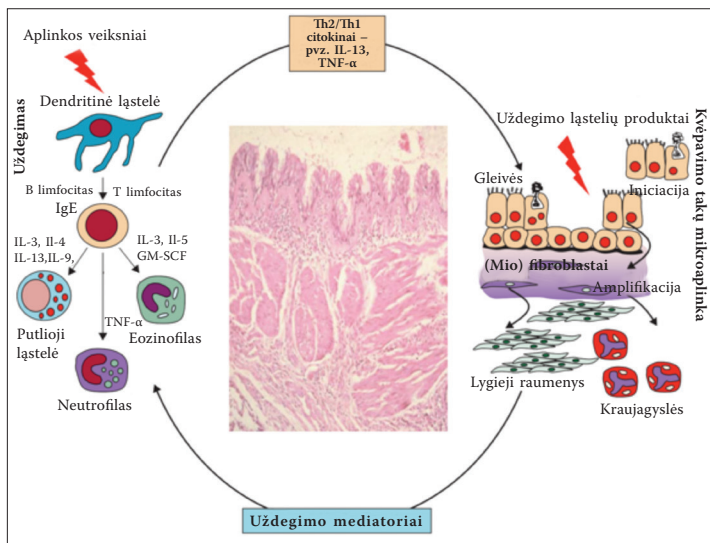
Alergeno sukelta ankstyva bronchų obstrukcija sergantiems astma išsivysto per kelias minutes po alergeno įkvėpimo. Bronchų obstrukcija išsivysto dėl imunoglobulino (Ig) E sąlygotos putliųjų ląstelių aktyvacijos ir įvairių mediatorių išsiskyrimo (histamino, leukotrienų, prostaglandino D2, bradikinino), kurie ir sukelia ūminį plaučių

funkcijos sutrikimą bei astmos simptomus. Daliai pacientų alergeno sukeltos ankstyvos fazės kvėpavimo takų uždegimas yra lydimas vėlyvos fazės kvėpavimo takų uždegimo, kai po alergeno patekimo į kvėpavimo takus yra praėjusios 2–7 valandos. Vėlyvos fazės uždegimo svarbiausi veikėjai – eozinofilai, neutrofilai, T limfocitai pagalbininkai bei makrofagai – ne tik susikaupia uždegimo židinyje, bet išskiria tarpininkus, žalojančius kvėpavimo takų audinius, kurie skatina lėtinį uždegimą (1 pav.).

Mokslininkai teigia, kad alergeno sukeltos vėlyvos fazės kvėpavimo takų uždegimas puikiai atspindi astmos patogenezę, tačiau nėra pilnai ir visapusiškai įvertintos pagrindinių ląstelių (eozinofilų bei neutrofilų) funkcijos, kaip chemotaksis, fagocitozė, reaktyvių deguonies formų susidarymas, degranuliacija bei apoptozė. Nėra aišku, kaip pakitusios periferinio kraujo neutrofilų bei eozinofilų funkcijos ir šių ląstelių išskiriamos aktyvios medžiagos sąlygoja neutrofiliją bei eozinofiliją kvėpavimo takuose alergeno sukeltos vėlyvos fazės kvėpavimo takų uždegimo metu. Todėl buvo svarbu kompleksiskai ištirti ir įvertinti minėtas neutrofilų ir eozinofilų funkcijas prieš ir po bronchų provokacijos alergenu.

DARBO MOKSLINIS NAUJUMAS

Mokslininkai neabejoja, jog eozinofilai ir neutrofilai yra vienos svarbiausių ląstelių, dalyvaujančių astmos patogenezėje, kurią labiausiai atspindi vėlyva kvėpavimo takų



1 pav. Astmos patogenezė (pagal Holgate ir Polorosa, 2006)

uždegimo fazė, išsivystanti praėjus kelioms valandoms po alergeno įkvėpimo. Pasaulinėje literatūroje publikuojami darbai, nagrinėja atskirus kvėpavimo takų neutrofilų ir eozinofilų aktyvumo pokyčius. Ypač mažai darbų apie periferinio kraujo neutrofilų ir eozinofilų funkcijas bei jų ryšį su šių ląstelių pagausėjimu kvėpavimo takuose, sergant astma. Taip pat nėra tyrimų, vertinančių periferinio kraujo uždegimo ląstelių (neutrofilų ir eozinofilų) funkcijų alergeno sukeltos vėlyvos fazės kvėpavimo takų uždegimo metu. Todėl LSMU Pulmonologijos ir imunologijos klinikos Pulmonologijos laboratorijoje sėkmingai įdiegtas bronchų provokacijos specifiniu alergenu modelis, leido įvertinti dinamiškus periferinio kraujo neutrofilų ir eozinofilų aktyvumo pokyčius praėjus 7 ir 24 val. po alergeno įkvėpimo sergant alergine astma. Moksliniame darbe pateikiami rezultatai suteikia naujų duomenų apie sergančiųjų alergine astma periferinio kraujo neutrofilų ir eozinofilų funkcinę savybių ypatumus ir parodo jų pokyčius alergeno sukeltos vėlyvos fazės kvėpavimo takų uždegimo metu.

Mokslinio darbo tikslas buvo įvertinti periferinio kraujo neutrofilų ir eozinofilų funkcinę aktyvumą alergeno sukeltos vėlyvos fazės kvėpavimo takų uždegimo metu sergant astma.

Tikslo įgyvendinimui buvo išskirti šie **uždaviniai**:

- Įvertinti periferinio kraujo neutrofilų funkcijų aktyvumą (chemotaksį, fagocitozę, savaiminį reaktyvių deguonies formų susidarymą ir apoptozę) alergeno sukeltos vėlyvos fazės kvėpavimo takų uždegimo metu sergant astma.
- Nustatyti sąsajas tarp periferinio kraujo neutrofilų aktyvumo (chemotaksio ir apoptozės) bei kvėpavimo takų neutrofilijos alergeno sukeltos vėlyvos fazės uždegimo metu.
- Nustatyti alergeno sukeltus periferinio kraujo eozinofilų chemotaksio, savaiminio reaktyvių deguonies formų susidarymo, degranuliacijos ir apoptozės po-

kyčius vėlyvos fazės kvėpavimo takų uždegimo metu sergant astma.

- Įvertinti sąsajas tarp periferinio kraujo eozinofilų chemotaksio, apoptozės ir alergeno sukeltos vėlyvos fazės kvėpavimo takų uždegimo eozinofilijos.

TIRIAMŪJŲ KONTINGENTAS

Dalyvauti moksliniame tyrime atrinkti 155 nerūkantys asmenys, kuriuos tyrė ir gydė gydytojas alergologas ir klinikinis imunologas 2010–2014 metais LSMUL KK Pulmonologijos ir imunologijos klinikos ambulatoriniame kabinete. Iš jų: 60 sergančių alergine astma; 55 sergančių alerginiu rinitu (palyginamoji grupė); 40 sveikų asmenų (kontrolinė grupė).

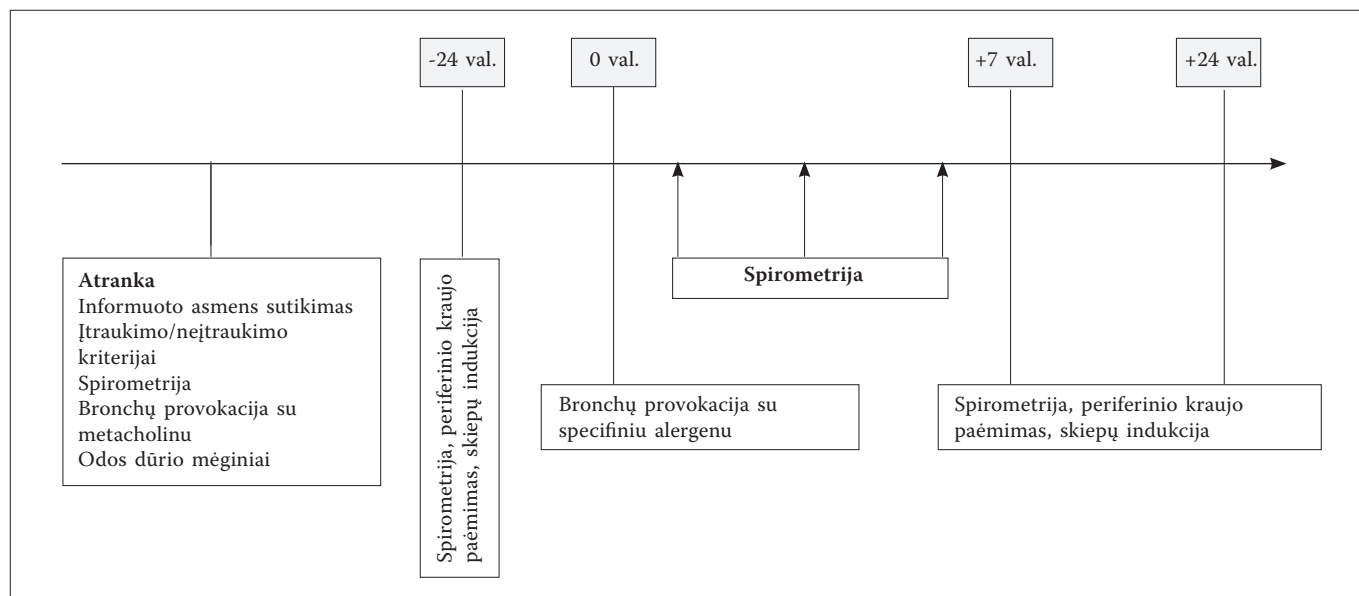
Mokslinis tyrimas sudarytas iš dviejų dalių:

- Neutrofilų aktyvumo tyrimas buvo Lietuvos mokslų tarybos Nacionalinės mokslo programos „Lėtinės neinfekcinės ligos“ finansuojamo projekto „Uždegimo ląstelių fenotipo ir funkcijų ypatumai alerginių kvėpavimo ligų eigos prognozavimui“ (LIG-18/2010) dalis. Tyrimas vykdytas gavus Kauno regioninio Biomedicininį tyrimų etikos komiteto leidimą (Nr. P1-48/2004).
- Eozinofilų aktyvumo tyrimas buvo Lietuvos mokslų tarybos Nacionalinės mokslo programos „Lėtinės neinfekcinės ligos“ finansuojamo projekto „Th9 limfocitų raiškos ir eozinofilų aktyvumo reikšmė alerginių kvėpavimo ligų eigos prognozavimui“ (LIG-08/2012) dalis. Tyrimas vykdytas gavus Kauno regioninio Biomedicininį tyrimų etikos komiteto leidimą (Nr. BE-2-23).

TYRIMO EIGA

Atvykti į Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Pulmonologijos ir imunologijos kliniką tiriamieji asmenys buvo kviečiami 3 kartus. Atrankos vizito metu (pirmas vizitas) patikrinti įtraukimo/neįtraukimo kriterijai, atliktas plaučių funkcijos tyrimas, bronchų provokacija su metacholinu ir alerginiai odos dūrio mėginiai. 24 val. iki bronchų provokacijos su specifiniu alergenu atlikta spirometrija, paimtas periferinis kraujas, indukuoti skrepliai, atliktas citologinis periferinio kraujo ir indukuotų skreplių ląstelių tyrimas, vertintos periferinio kraujo neutrofilų ir eozinofilų funkcinės savybės, užšaldyti biologiniai mėginiai citokinų tyrimams.

Bronchų provokacija su specifiniu alergenu pradėta 8:00 valandą ryte, po jos kartotinai tirta plaučių funkcija: kas 10 min. pirmąją valandą, vėliau 6 valandas – kas valandą. Periferinio kraujo paėmimas bei skreplių indukcija kartoti 7 ir 24 val. po bronchų provokacijos alergenu, atlikti periferinio kraujo, indukuotų skreplių citologinis tyrimai, vertintos periferinio kraujo neutrofilų ir eozinofilų funkcinės savybės, užšaldyti biologiniai mėginiai citokinų tyrimams (2 pav.).



2 pav. Tyrimo eiga

IŠVADOS

- Prieš bronchų provokaciją alergenu, sergančiųjų alergine astma periferinio kraujo neutrofilų chemotaksis ir reaktyvių deguonies formų susidarymas nustatytas intensyvesnis, o fagocitozė ir apoptozė silpnesnė, lyginant su sergančių alerginiu rinitu ir sveikų asmenų. Alergeno sukeltos vėlyvos fazės kvėpavimo takų uždegimas sergant astma skatina dar intensyvesnę periferinio kraujo neutrofilų chemotaksį, fagocitozę, didesnę reaktyvių deguonies formų susidarymą bei silpnesnę apoptozę.
- Praėjus 24 val. po bronchų provokacijos su alergenu, suintensyvėjęs sergančiųjų astma periferinio kraujo neutrofilų chemotaksis ir susilpnėjusi apoptozė buvo susiję su pagausėjusiu neutrofilų kiekiu indukuotuose skrepliuose. Suintensyvėjęs periferinio kraujo neutrofilų chemotaksis siejosi su padidėjusia IL-8 koncentracija kraujo serume ir indukuotų skreplių supernatante. Tuo tarpu pagausėjęs neutrofilų kiekis indukuotuose skrepliuose buvo susijęs su padidėjusia IL-8 koncentracija indukuotų skreplių supernatante.
- Periferinio kraujo eozinofilų funkcijos sergant alergine astma yra pakitusios, lyginant su sergančiaisiais alerginiu rinitu ir sveikais asmenimis, o alergeno sukeltos vėlyvos fazės kvėpavimo takų uždegimas skatina dar ryškesnius periferinio kraujo eozinofilų aktyvumo pokyčius: intensyvėja chemotaksis ir reaktyvių deguonies formų susidarymas, stiprėja degranuliacija bei susilpnėja apoptozė, lyginant su sergančiaisiais alerginiu rinitu ir sveikais asmenimis.
- Praėjus 24 val. po bronchų provokacijos alergenu intensyvesnis periferinio kraujo eozinofilų chemotaksis sergant astma buvo susijęs su pagausėjusiu eozinofilų kiekiu indukuotuose skrepliuose bei padidėjusia IL-5 koncentracija indukuotų skreplių supernatante. Tuo

tarpu susilpnėjusi periferinio kraujo eozinofilų apoptozė siejosi su pagausėjusiu eozinofilų kiekiu indukuotuose skrepliuose.

DARBO PRAKTINĖ REIKŠMĖ

Šio mokslinio tyrimo rezultatai suteikia naujos informacijos apie alerginės astmos patogenezę. Tyrimo metu nustatėme, kad įkvėptas alergenas aktyvina periferinio kraujo neutrofilų ir eozinofilų funkcijas – chemotaksį, fagocitozę, reaktyvių deguonies formų susidarymą, degranuliaciją bei silpnina apoptozę – vėlyvos fazės kvėpavimo takų uždegimo metu. Šių ląstelių aktyvumo pokyčiai yra susiję su kvėpavimo takų neutrofilija ir eozinofilija. Todėl nustatyti periferinio kraujo neutrofilų ir eozinofilų aktyvumo pokyčiai sudaro prielaidas šias ląsteles taikyti astmos eigos prognozavimui ir stebėjimui.

PADEKA

Darbo autorė dėkinga mokslinio darbo vadovei dr. Jolantai Jeroch už nuoseklų bei konstruktyvų vadovavimą atliekant mokslinį tiriamąjį darbą. Mokslinio darbo konsultantui prof. dr. Kęstučiui Malakauskui už idėjas, meilę mokslui, optimizmą ir pagalbą, kada jos labiausiai reikėjo. Pulmonologijos ir imunologijos klinikos vadovui prof. dr. Raimundui Sakalauskui už suteiktą galimybę atlikti disertacinį darbą, už puikias darbo ir technines sąlygas mokslinio tiriamojo darbo įgyvendinimui. Taip pat Pulmonologijos ir imunologijos klinikos gydytojams dr. Ievai Bajoriūnienai, dokt. Deimantei Hoppenot, dr. Mindaugui Vaitkui ir dokt. Editai Gasiūnienei už klinikinį mokslinio darbo vykdymą, patarimus rengiant mokslines publikacijas. O taip pat Pulmonologijos ir imunologijos klinikos Pulmonologijos laboratorijos kolektyvui: Ievai, Augustei, Justinai už ilgus vakarus eksperimentuojant kartu bei gerą nuotaiką.