

Ocena limfocytów regulatorowych T, subpopulacji Tr1 u chorych na astmę, po stymulacji *in vitro*, przy użyciu wielokolorowej cytometrii przepływowej

Induction and assessment of Tr1 regulatory T cell subpopulations, in peripheral blood of patients with asthma using of multicolor flow cytometry

ŁUKASZ KRASZULA¹, MAKANDJOU-OLA EUSEBIO¹, MACIEJ KUPCZYK², PIOTR KUNA², MIROŚŁAWA PIETRUCZUK¹

¹ Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej, II Katedra Chorób Wewnętrznych, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

² Klinika Chorób Wewnętrznych, Astmy i Alergii, II Katedra Chorób Wewnętrznych, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Praca finansowana z programu finansowania badań młodych pracowników nauki i studentów studiów doktoranckich nr: 502-03/1-095-05/502-14-206.

Streszczenie

Wprowadzenie. Ciężka postać astmy oskrzelowej stanowi szczególnie problem kliniczny. W patogenezie astmy istotną rolę przypisuje się dysfunkcji subpopulacji limfocytów regulatorowych Tr1. Dlatego duże nadzieje wiąże się z potencjalnym zastosowaniem terapeutycznym subpopulacji limfocytów Tr1.

Cel pracy. Ocena możliwości indukcji w warunkach *in vitro* limfocytów Tr1, oraz sprawdzenie czy po stymulacji zostanie zachowana równowaga immunologiczna pomiędzy subpopulacjami limfocytów Tr1 i Th2 u pacjentów chorych na astmę, szczególnie ciężką jej postać.

Materiał i metody. Do badania zakwalifikowano sześćdziesięciu pacjentów z rozpoznaną astmą, w tym 30 z ciężką i 30 z umiarkowaną-łagodną postacią choroby. Grupę kontrolną stanowiło 30 zdrowych ochotników. Diagnoza astmy została postawiona zgodnie z powszechnie akceptowanymi zaleceniami - GINA 2014. Materiałem badanym była krew żylna, pobrana na K₂EDTA. Ocenę immunofenotypu CD4/CD25//FoxP3/CD69/IL-10/IL-4, subpopulacji limfocytów Tr1 i Th2 wykonano techniką wielokolorowej cytometrii przepływowej.

Wyniki. U pacjentów chorych na astmę ciężką odsetek i liczba bezwzględna limfocytów Tr1 były znamienne obniżone w porównaniu do grupy chorych z astmą umiarkowaną-łagodną i grupy kontrolnej $p < 0,01$. Nie stwierdzono różnic w odsetku i liczbie bezwzględnej tych komórek pomiędzy grupą chorych na astmę umiarkowaną-łagodną a grupą kontrolną. Wykazano statystycznie znamienne obniżenie współczynnika Tr1/Th2 w grupie chorych na astmę ciężką w porównaniu do grupy chorych z astmą umiarkowaną-łagodną $p < 0,02$.

Wnioski. Wpływ stymulacji na subpopulację limfocytów Tr1 jest znacznie mniejszy u chorych na ciężką astmę. U pacjentów chorych na astmę ciężką zachwiana jest równowaga immunologiczna pomiędzy subpopulacją limfocytów regulatorowych Tr1 a efektorowych Th2.

Słowa kluczowe: *astma, limfocyty Tr1, limfocyty Th2, IL-10*

Summary

Introduction. Severe asthma is a challenging clinical problem. Dysfunction of Tr1 regulatory cells may play an important role in the pathogenesis of asthma. Therefore, there is hope for the therapeutic potential of Tr1 lymphocyte subsets.

Aim. Evaluate the possibility to induce Tr1 lymphocytes *in vitro*, and check if there is a balanced immune response between Th2 and Tr1 lymphocytes in patients with asthma and particularly severe asthma, after stimulation.

Material and methods. The study included sixty patients with asthma (30 with severe and 30 with mild to moderate asthma). The control group comprised 30 healthy volunteers. Asthma was diagnosed in accordance with the Global Initiative For Asthma guidelines (GINA 2014). The phenotype of CD4/CD25//FoxP3/CD69/IL-10/IL-4 Tr1 cells was evaluated by multicolor flow cytometry.

Results. We showed a significant reduction in the percentage and absolute number of Tr1 cells in severe asthma compared with mild-moderate asthma and control group $p < 0.01$. There were no differences in the percentage and absolute number of cells between the group of patients with mild-moderate asthma and control groups. We also found that the ratio of Tr1/Th2 was significantly reduced in patients with severe asthma compared with those with mild-moderate asthma $p < 0.02$. The effect of stimulation on lymphocyte subsets Tr1 is significantly lower in patients with severe asthma.

Conclusions. The effectiveness of stimulated Tr1 lymphocytes was significantly lower in patients with severe asthma. In patients with severe asthma there is an imbalance between the subpopulation of regulatory Tr1 cells and Th2 effector.

Keywords: *asthma, Tr1, Th2, IL-10*

WSTĘP

Badania nad limfocytami regulatorowymi ciągle stanowią interesujące wyzwanie, ze względu na ich możliwy potencjał terapeutyczny. Odkryto wiele subpopulacji regulatorowych limfocytów, używając różnorodnego nazewnictwa do ich opisanie. W 2013 r. opublikowano zalecenia, które pomagają uporządkować nomenklaturę limfocytów regulatorowych zwłaszcza limfocytów wykazujących konstytutywną ekspresję czynnika transkrypcyjnego FoxP3. Proponowana klasyfikacja uwzględnia pochodzenie komórek dlatego na jej podstawie możemy wyróżnić: limfocyty regulatorowe T pochodzące z grasicy (Thymus-derived Treg cell - tT_{reg}), które są głównymi mediatorami centralnej tolerancji immunologicznej, oraz limfocyty T pochodzące z obwodu (Peripherally derived Treg cell - pT_{reg}), które odpowiadają za obwodową tolerancję immunologiczną. Trzeci typ komórek Treg, określany jako (In vitro-induced Treg cell - iT_{reg}) reprezentuje tylko limfocyty regulatorowe indukowane w warunkach *in vitro* [1]. W zależności od posiadanej ekspresji FoxP3 subpopulacje limfocytów pTreg i iTreg dzieli się na dwie grupy: klasyczne komórki $CD4^+ Foxp3^+$ Treg i limfocyty regulatorowe T typu 1 (Tr1) $CD4^+ Foxp3^-$ [2].

Subpopulację limfocytów Tr1 charakteryzuje odmienny profil cytokinowy od klasycznych subpopulacji limfocytów efektorowych o profilu cytokinowym Th2. W odpowiedzi na stymulację antygenem, limfocyty Tr1 mają niewielką zdolność do proliferacji oraz produkcji IL-10 w dużym stężeniu i produkcji niewielkich ilości TGF- β i IL-2. Limfocyty Tr1 nie produkują IL-4 oraz nie wykazują konstytutywnej ekspresji FoxP3 najbardziej charakterystycznego markera służącego do identyfikacji komórek Treg [3].

Subpopulacja limfocytów Tr1 kontroluje przebieg reakcji immunologicznych poprzez produkcję cytokin o właściwościach immunosupresyjnych, IL-10 i TGF β , interakcje „komórka-komórka” oraz poprzez cząsteczki powierzchniowe CTLA-4, ang. Cytotoxic T-lymphocyte-associated antygen 4 i PD-1, ang. Programmed cell death-1 [4].

Wykazano, że subpopulacja limfocytów regulatorowych Tr1 bierze udział w regulacji nabytej odpowiedzi immunologicznej, poprzez hamowanie aktywacji i proliferacji limfocytów T efektorowych. Limfocyty Tr1 hamują także nadmierną odpowiedź immunologiczną na alergenów poprzez hamowanie produkcji cytokin i migracji subpopulacji limfocytów Th2 oraz hamowanie komórek tucznych, bazofili i eozynofili [5].

Tabela I. Charakterystyka badanej grupy

	Astma ciężka (SA)	Astma umiarkowana- łagodna (MA)
n	30	30
wiek - lata (średnia \pm SD)	49 \pm 14,5	42 \pm 13,5
płeć (K/M)	16/14	15/15
czas trwania choroby - lata (średnia \pm SD)	16 \pm 8,7	10 \pm 6,3
Atopia (Tak/Nie)	25/5	26/4
FEV ₁ - l (średnia \pm SD)	2,6 \pm 0,50	3,5 \pm 0,80
FEV ₁ - % (średnia \pm SD)	55% \pm 15,9	89% \pm 16,1
ACT - punkty (średnia \pm SD)	10 \pm 2,9	22 \pm 3,5

Duże nadzieje wiąże się z potencjalnym zastosowaniem terapeutycznym subpopulacji limfocytów Tr1. Jedną z możliwości mogących urzeczywistnić terapeutyczną interwencję przy użyciu tych komórek jest ich indukcja i hodowla w warunkach *in vitro* [6,7]. Terapia immunomodulacyjna wydaje się być szczególnie istotna u pacjentów z ciężkim przebiegiem astmy i takich, którzy nie odpowiadają na standardową terapię sterydową.

Stwierdzono, że w warunkach *in vitro*, u ludzi zdrowych możliwa jest indukcja subpopulacji Tr1 po stymulacji limfocytów $CD4^+$ naiwnych w obecności IL-10, jak i po stymulacji deksametazonem i witaminą D3 [8].

Wykazano, u osób zdrowych, że jednym z czynników gwarantujących prawidłową odpowiedź immunologiczną na alergenów jest zachowanie właściwej proporcji ilościowej pomiędzy subpopulacjami limfocytów Tr1 i Th2. Badania dowodzą, że patologiczna, nadmierna odpowiedź immunologiczna na alergenów może wynikać z zaburzenia równowagi immunologicznej pomiędzy tymi subpopulacjami limfocytów [9].

Z tych względów powstają pytania czy istnieje możliwość indukcji w warunkach *in vitro* limfocytów Tr1, i czy po stymulacji zostanie zachowana równowaga immunologiczna pomiędzy subpopulacjami limfocytów Tr1 i Th2 u pacjentów z astmą a szczególnie ciężką jej postacią.

MATERIAŁ I METODY

Do badania zakwalifikowano sześćdziesięciu pacjentów z rozpoznaną astmą oskrzelową (30 chorych na astmę ciężką i 30 na umiarkowaną-łagodną). Grupę kontrolną stanowiło 30 zdrowych ochotników w tym samym przedziale wiekowym i zbliżonym rozkładzie płci. Z badania wyłączono osoby palące oraz z zakażeniem dróg oddechowych. Na podstawie historii chorób zebrano dane demograficzne i kliniczne. Charakterystykę badanych grup przedstawiono w tabeli I.

Diagnoza astmy oskrzelowej została potwierdzona na podstawie wywiadu i zmienności obturacji dróg oddechowych, zgodnie z powszechnie akceptowanymi zaleceniami - GINA 2014 (<http://ginasthma.org>). Stopień ciężkości choroby oceniono zgodnie z definicją użytą w badaniach grupy ENFUMOSA [10].

Pacjenci zakwalifikowani do grupy chorych na astmę ciężką wymagali stałego leczenia wysokimi dawkami sterydów

wziewnych, (co najmniej 1600 $\mu\text{g}/\text{dobę}$ budezonidu lub beklometazonu, 800 $\mu\text{g}/\text{dobę}$ flutikazonu lub równoważnika). W przypadku przewlekłej doustnej sterydoterapii wymagane dawki leków wynosiły 800 $\mu\text{g}/\text{dobę}$ budezonidu lub beklometazonu, 400 $\mu\text{g}/\text{dobę}$ flutikazonu lub równoważnika. Ponadto pacjenci z astmą ciężką wymagali przewlekłej terapii długo działającym β -agonistą (LABA-long acting β -agonist; formoterol w dawce 9 mcg/dawkę, dwa razy dziennie lub salmeterol 50 mcg/dawkę, dwa razy dziennie) lub doustną teofiliną (200-300 mg jeden lub dwa razy na dobę). Astma w tej grupie pacjentów nie była w pełni kontrolowana a w roku poprzedzającym włączenie do grupy badanej pacjenci ci mieli, co najmniej jedno zaostrzenie choroby.

Przed postawieniem ostatecznego rozpoznania astmy ciężkiej, wykluczono potencjalne choroby współistniejące oraz niestosowanie się pacjentów do zaleceń lekarskich, jako czynniki utrudniające uzyskanie optymalnej kontroli choroby. Pacjenci włączeni do grupy astmy umiarkowanej-łagodnej stosowali maksymalnie 800 $\mu\text{g}/\text{dobę}$ budezonidu lub beklometazonu, 500 $\mu\text{g}/\text{dobę}$ flutikazonu lub równoważnika.

Wszyscy pacjenci włączeni do grup badanych nie otrzymywali, innych niż glikokortykosteroidy, leków immunosupresyjnych. U każdego pacjenta wykonano badanie spirometryczne, punktowe testy skórne oraz test kontroli astmy (ACT). Atopię zdefiniowano, jako co najmniej jeden dodatni wynik ($>3\text{mm}$) w punktowym teście skórnym z panelem alergenów.

Wszyscy pacjenci zostali poinformowani o celu, metodyce badań i wyrazili pisemną zgodę na udział w badaniach. Badania przeprowadzono za zgodą Uczelnianej Komisji Etyki Badań Naukowych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (Numer RNN/17/09/KE).

Materiałem badanym była krew żylna pobrana na wersenian dwupotasowy (K2EDTA). Od każdego pacjenta 8 ml krwi żyłnej nawarstwiano na 12 ml podłoża Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich). Komórki jednojądrzaste (PBMCs) wyizolowano przez wirowanie przy sile 400 g przez 30 minut w gradiencie gęstości. Bezwzględna liczbę i odsetek komórek jednojądrzastych oznaczano na analizatorze pentra DX 120 celem sprawdzenia odsetka żywych, wyizolowanych komórek. Czystość komórkowa pozwalająca na przystąpienie do etapu sortowania musiała być wyższa niż 80% limfocytów.

Sortowanie limfocytów CD4^+ przeprowadzono w procesie separacji negatywnej, przy użyciu zestawu przeciwciał i kuleczek magnetycznych zawartych w zestawie „ CD4^+ T Cell Isolation Kit” zgodnie z procedurą firmową (Miltenyi Biotec, USA).

Bezwzględną liczbę subpopulacji Tr1 i Th2 wyliczono z, odsetka tych komórek, uzyskanego z bramkowania na cytometrze przepływowym oraz bezwzględnej liczby limfocytów, uzyskanej z rozdziału leukocytów, na analizatorze hematologicznym 5-diff.

Hodowla i indukcja regulatorowych limfocytów T, CD4^+

Hodowlę komórkową z wysortowanych limfocytów CD4^+ prowadzono w podłożu RPMI 1640, wzbogaconym w 2mM glutaminę, 5% surowicę płodową-wołową, 10 mM HEPES, 100 U/ml penicyliny i streptomycyny. Komórki hodowano 72 godziny w sterylnych płytkach w temp. 37°C i w atmosferze 5% CO_2 . Celem wyindukowania limfocytów regulatorowych Tr1 użyto następujących stymulatorów: Purified NA/LE Mo-

use Anti-Human CD3; 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ - klon UCHT1 (BD Pharmingen), Purified NA/LE Mouse Anti-Human CD28; 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ - klon CD28.2 (BD Pharmingen) i Recombinant Human IL10; 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (R&D SYSTEMS). Do hodowli dodawano także na okres 4 godzin 1 μL BD GolgiPlug na 1 ml hodowli.

Procedura znakowania komórek

100 μl zawiesiny stymulowanych limfocytów po hodowli wyznakowano przeciwciałami monoklonalnymi, skierowanymi przeciwko antygenom powierzchniowym CD4 (PacifBlue, klon RPA-T4), CD25 (PE-Cy 7, klon M-A251), CD69 (APC Cy7, klon FN50) w stężeniu zgodnym z procedurą firmową (BD Bioscience). Dobrze wymieszaną zawiesinę komórek inkubowano 20 minut, w ciemności, w temperaturze pokojowej (od 20°C do 25°C). Następnie komórki utrwalano przez 10 minut, odczynnikiem Cytofix/Cytoperm (BD Pharmingen), w temperaturze 4°C. Celem zwiększenia przepuszczalności błon komórkowych, komórki permeabilizowano odczynnikiem 1 x Perm/Wash (BD Pharmingen), intensywnie mieszano i inkubowano przez 30 minut w temperaturze pokojowej (od 20°C do 25°C). Następnie do zawiesiny komórek dodawano przeciwciała anti-IL-4 (PerCP, klon MP4-25D2, Bio Legend), IL-10 (PE, klon JES3-19F1), FoxP3 (Alexa Fluor 488, klon 259D/C7) w stężeniu zgodnym z procedurą firmową (BD Bioscience). Dobrze wymieszaną zawiesinę wyznakowanych komórek inkubowano 30 minut w ciemności, w temperaturze pokojowej (od 20°C do 25°C). Do analizy zbierano od 10.000-15.000 limfocytów CD4^+ .

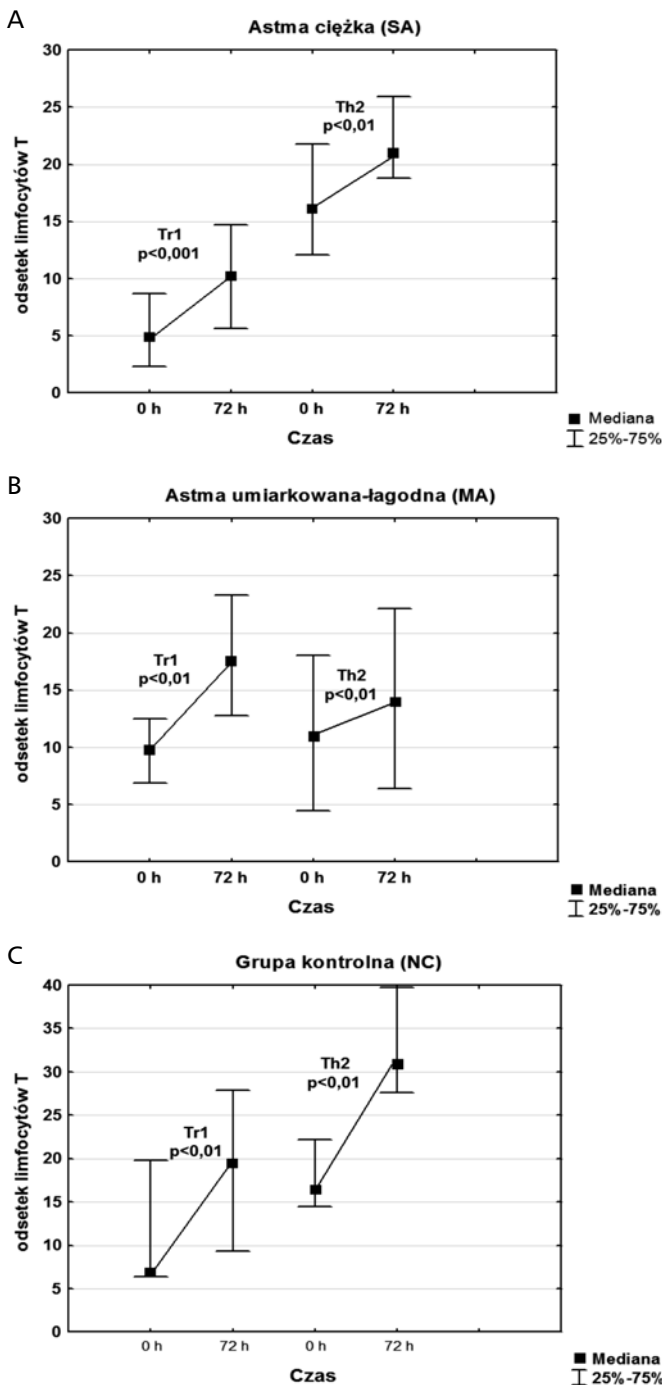
Do ustawienia napięć detektorów cytometru wykorzystano BD Cytometer Setup and Tracking Beads (BD Bioscience). Kompensacje dla 6 kolorów wykonano używając pojedynczo wybarwionej próbki, dla każdego fluorochromu z panelu użytych przeciwciał. Dodatkowo wykonano próbki kontrolne (FMO, Fluorescence Minus One) dla oznaczanych antygenów, ustawiając bramki na wykresach tak, by wszystkie komórki z próbki kontrolnej zostały uznane za ujemne. Analizę ekspresji poszczególnych antygenów dokonano przy użyciu oprogramowania FACS DIVA wersja 6.2. Bramkę dla limfocytów Tr1 ustawiono w oparciu o immunofenotyp $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{FoxP3}^+\text{IL-10}^+\text{IL-4}^-$, bramkę dla subpopulacji limfocytów efektorowych Th2 ustawiono w oparciu o immunofenotyp $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{FoxP3}^-\text{CD69}^+\text{IL-4}^+\text{IL-10}^+$, po czym analizowano odsetek komórek z ekspresją poszczególnych antygenów.

Uzyskane wyniki badań opracowano statystycznie w oparciu o program STATISTICA 10 PL. Zmienne ilościowe przedstawiono, jako medianę, kwartyle górny i dolny. Test Kruskala-Wallis'a używano w celu porównania wielu grup niezależnych. Do porównania dwóch grup niezależnych użyto testu U Manna-Whitneya. Do weryfikacji istotności wpływu stymulatorów na oceniane subpopulacje komórek wykorzystano test kolejności par Wilcozona. Za istotne statystycznie uznawano wartości prawdopodobieństwa $p < 0,05$.

WYNIKI

Analizując wyniki przeprowadzonych badań zaobserwowano, że we wszystkich grupach badanych zarówno w przypadku odsetka limfocytów Tr1 o immunofenotypie $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{FoxP3}^+\text{IL-10}^+\text{IL-4}^-$, jaki i limfocytów efektorowych Th2 o immunofenotypie $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{FoxP3}^-\text{CD69}^+\text{IL-4}^+\text{IL-10}^+$ po stymulacji wystąpił istotny wzrost odsetka tych komórek (ryc. 1A-C).

Ponadto zaobserwowano że odsetek indukowanych limfocytów regulatorowych Tr1 o immunofenotypie CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺IL-10⁺IL-4⁻; różnił się znamienne pomiędzy badanymi grupami. U pacjentów chorych na astmę ciężką odsetek limfocytów regulatorowych Tr1 (10,2% (5,6-14,7)) był znamienne obniżony w porównaniu do grupy z astmą umiarkowaną-łagodną (17,5% (12,8-23,5)) i grupy kontrolnej (19,5% (9,3-27,9)), p<0,01 (ryc. 2A). Nie stwierdzono



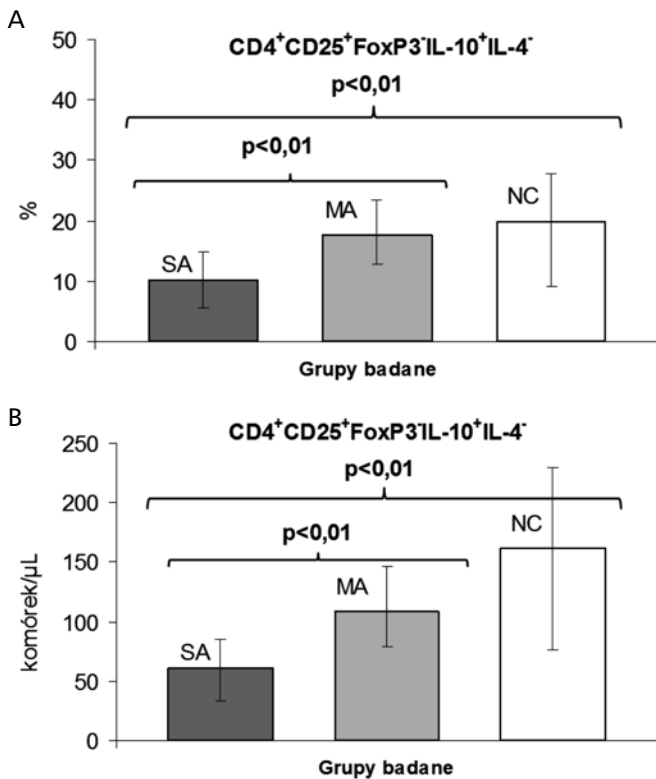
Ryc. 1. Zmiana odsetka limfocytów Tr1 o immunofenotypie CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺IL-10⁺IL-4⁻i Th2 o immunofenotypie CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺CD69⁺IL-4⁻IL-10⁺ po zastosowaniu stymulacji anty-CD3; 10 μg/ml, anty-CD28; 1 μg/ml, w obecności IL10; 0,1 μg/ml, w grupie chorych na A. astmę ciężką, B. umiarkowaną-łagodną, C. w grupie kontrolnej. Wyniki przedstawiono, jako medianę, dolny i górny kwartył oraz podano wartość p – istotność statystyczna

różnic w odsetku tych komórek pomiędzy grupą pacjentów chorych na astmę umiarkowaną-łagodną a grupą kontrolną.

Stwierdzono także, że bezwzględna liczba indukowanych limfocytów regulatorowych Tr1 o immunofenotypie CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺IL-10⁺IL-4⁻; jest znamienne statystycznie obniżona u pacjentów chorych na astmę ciężką (61 kom/μL (33-85)) w porównaniu do grupy z astmą umiarkowaną-łagodną (108 kom/μL (79-147)) i grupy kontrolnej (162 kom/μL (77-230), p<0,01 (ryc. 2B). Nie stwierdzono różnic w liczbie bezwzględnej limfocytów regulatorowych Tr1 pomiędzy grupą chorych na astmę umiarkowaną-łagodną a grupą kontrolną.

Wykazano, statystycznie istotną różnicę pomiędzy badanymi grupami w odsetku limfocytów efektorowych Th2 o immunofenotypie CD4⁺CD25⁺FoxP3⁻CD69⁺IL-4⁻IL-10⁺. Pacjenci chorzy na astmę ciężką (20,9% (18,8-25,9)) i umiarkowaną-łagodną (14,0% (6,4-22,2)) charakteryzowali się znamienne niższym odsetkiem limfocytów efektorowych w porównaniu do grupy kontrolnej (30,9% (27,6-39,7)), p<0,05. Zaobserwowano także znamienne wzrost odsetka subpopulacji limfocytów Th2 w grupie pacjentów chorych na astmę ciężką w porównaniu do grupy chorych z astmą umiarkowaną-łagodną (ryc. 3A).

Wykazano ponadto, że pacjenci z astmą ciężką (125 kom/μL (112-154)) i umiarkowaną-łagodną (88 kom/μL (40-138)) charakteryzowali się znamienne obniżoną liczbą bezwzględnych limfocytów efektorowych Th2 w porównaniu do grupy kontrolnej (256 kom/μL (228-328)), p<0,05. W przypad-



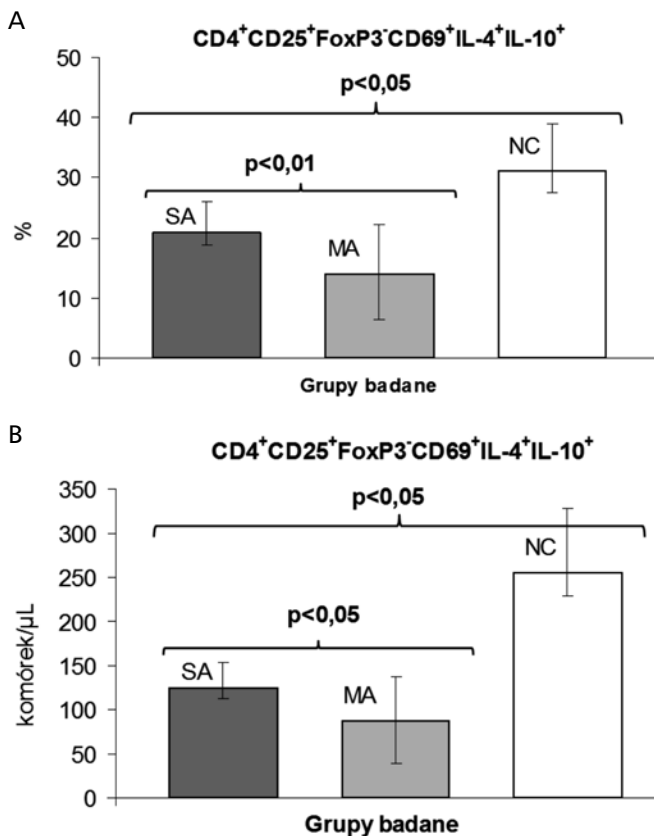
Ryc. 2. Porównanie odsetka (A) i liczb bezwzględnych (B) indukowanych limfocytów Tr1 o immunofenotypie CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺IL-10⁺IL-4⁻u chorych na astmę ciężką (SA), umiarkowaną-łagodną (MA) i w grupie kontrolnej (NC). Wyniki przedstawiono jako medianę, dolny i górny kwartył oraz podano wartość p – istotność statystyczna

ku liczb bezwzględnych zaobserwowano także znamienne wzrost subpopulacji limfocytów Th2 w grupie pacjentów chorych na astmę ciężką w porównaniu do grupy chorych z astmą umiarkowaną-łagodną (ryc. 3B).

Poddano analizie współczynnik indukowanych limfocytów regulatorowych Tr1 do limfocytów efektorowych Th2. Wykazano statystycznie znamienne obniżenie współczynnika Tr1/Th2 pomiędzy grupą chorych na astmę ciężką (0,5 (0,2-0,8)) a umiarkowaną-łagodną (0,9 (0,5-4,2)). Nie wykazano różnic we współczynniku Tr1/Th2 pomiędzy grupą chorych na astmę ciężką i umiarkowaną-łagodną a grupą kontrolną (0,7 (0,3-0,9)) (ryc. 4).

DYSKUSJA

Pacjenci z astmą ze względu na brak możliwości wyleczenia choroby podlegają do końca życia standardowej terapii farmakologicznej, przeciwzapalnej i objawowej, co w większości przypadków pozwala na osiągnięcie dobrej kontroli choroby. Jednak istnieje grupa pacjentów chorych na astmę ciężką, u których choroba nie jest kontrolowana w zadowalającym stopniu. Dodatkowo często występująca oporność na terapię sterydową w tej grupie chorych, w porównaniu do astmy łagodnej powodują, że ciężka astma stanowi poważnym problemem klinicznym [11, 12]. Stąd potrzeba poszukiwania nowych, metod terapii tej postaci choroby.



Ryc. 3. Porównanie odsetka (A) i liczb bezwzględnych (B) efektorowych limfocytów Th2 o immunofenotypie CD4+CD25+FoxP3-CD69+IL-4+IL-10+ u chorych na astmę ciężką (SA), umiarkowaną-łagodną (MA) i w grupie kontrolnej (NC). Wyniki przedstawiono jako medianę, dolny i górny kwartył oraz podano wartość p – istotność statystyczna

Limfocyty regulatorowe Tr1 ze względu na swoją supresyjną funkcję stanowią obiecującą populację komórek, która może posłużyć do modulowania patologicznej odpowiedzi immunologicznej i może być wykorzystana jako narzędzie terapeutyczne, efektywniejsze w leczeniu ciężkich postaci astmy od terapii konwencjonalnej [4].

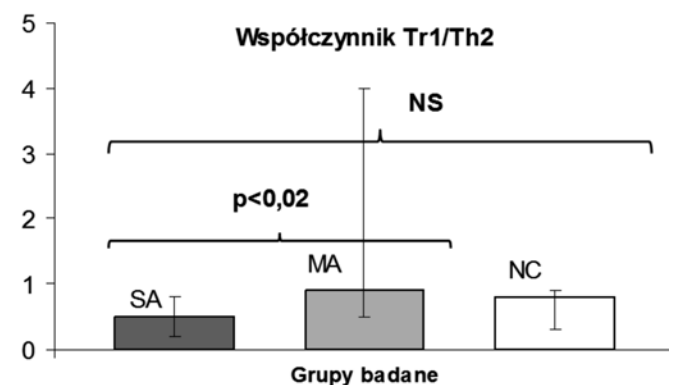
Faktem dodatkowo przemawiającym za koniecznością badań nad tą subpopulacją komórek u pacjentów chorych na astmę, są prace, w których wykazano, że subpopulacja limfocytów regulatorowych Tr1 może odpowiadać za tolerancję i kontrolę odpowiedzi immunologicznej w drogach oddechowych [13]. Dowodem na to są dane literaturowe, z których wynika, że komórki dendrytyczne układu oddechowego wytwarzają IL-10, która jest niezbędna do indukcji subpopulacji limfocytów regulatorowych Tr1 [14].

Wykazano, że limfocyty regulatorowe Tr1 biorą udział w regulacji nadmiernej odpowiedzi immunologicznej, co odbywa się głównie poprzez produkcję IL-10 [15]. Dowodem potwierdzającym ten fakt są badania, w których po dodaniu do hodowli limfocytów Tr1 przeciwciał blokujących IL-10 zaobserwowano ograniczenie ich zdolności supresyjnej [16].

Funkcja IL-10 jest zasadnicza w astmie. IL-10 jest cytokiną o działaniu plejotropowym, hamuje aktywację i produkcję cytokin przez komórki tuczne oraz przeżycie i produkcję cytokin przez eozynofile. Interleukina 10 działa supresyjnie na funkcje komórek prezentujących antygen (APC) i hamuje aktywację subpopulacji limfocytów o profilu cytokinowym Th2 [15].

W przeprowadzonych badaniach wykazaliśmy, że możliwa jest indukcja subpopulacji limfocytów Tr1 po stymulacji przeciwciałami anti-CD3/anti-CD28 w obecności IL-10, u pacjentów chorych na astmę. Jednak indukcja limfocytów Tr1 jest możliwa w znacznie mniejszym stopniu w ciężkiej astmie niż w astmie umiarkowanej-łagodnej i grupie kontrolnej. Najwyższa liczba limfocytów Tr1 w grupie kontrolnej pozwala nam wnioskować, że przez właściwe dobranie warunków środowiskowych hodowli istnieje możliwość generacji subpopulacji limfocytów Tr1.

Inni badacze wykazali, że możliwa jest hodowla subpopulacji Tr1 w warunkach *in vitro* po stymulacji naiwnych



Ryc. 4. Porównanie współczynnika Tr1/Th2 u chorych na astmę ciężką (SA), umiarkowaną-łagodną (MA) i w grupie kontrolnej (NC). Wyniki przedstawiono jako medianę, dolny i górny kwartył oraz podano wartość p – istotność statystyczna

limfocytów CD4⁺, w obecności IL-10, interferonu α (IFN- α), lub w obecności zarówno IL-4 jak i IL-10 [17,18]. Barrata i wsp. wykazali, że deksametazon i witamina D3 mogą indukować konwersję dziewiczych limfocytów CD4⁺ w subpopulację limfocytów Tr1 [8]. Badania te przeprowadzono jedynie w grupie osób zdrowych.

Natomiast Matsumoto i wsp. badali rolę subpopulacji limfocytów CD4⁺ produkujących IL-10, u dorosłych osób z astmą przez analizę tej subpopulacji komórek u chorych na astmę łagodną, ciężką o stabilnym i niestabilnym przebiegu [19]. Liczbę limfocytów CD4⁺ produkujących IL-10 oznaczano przy użyciu cytometrii przepływowej po uprzedniej hodowli ze stymulacją anty-CD3/anty-CD28. Liczba limfocytów CD4⁺ produkujących IL-10 była niższa u pacjentów z niestabilną postacią astmy ciężkiej niż u pacjentów z astmą ciężką o stabilnym przebiegu i umiarkowaną-łagodną. Na jednoznacznej identyfikację subpopulacji limfocytów regulatorowych Tr1 w tym badaniu, nie pozwoliła niewielka liczba markerów immunofenotypowych zastosowanych do identyfikacji subpopulacji limfocytów regulatorowych. Dlatego badacze Ci analizowali zarówno całą populację limfocytów regulatorowych T, w tym Tr1, jak i efektorowych.

Uzyskane przez nas wyniki badań wskazują na deficyt ilościowy subpopulacji limfocytów regulatorowych Tr1, zwłaszcza u pacjentów z ciężką postacią astmy co może mieć związek z opornością na stosowaną terapię glikokortykosteroidami.

Potwierdzają to doniesienie Karagiannidis i wsp., którzy wykazali, że glikokortykosteroidy promują wydzielanie IL-10 oraz różnicowanie limfocytów efektorowych w regulatorowe Tr1 poprzez mechanizm zależny od FOXP3 [20]. W naszych badaniach zaobserwowaliśmy, że pomimo stosowania u pacjentów z astmą ciężką wysokich dawek sterydów wziewnych, a także doustnej sterydoterapii odsetek jak i liczba bezwzględna limfocytów Tr1 były najniższe.

Uważa się, że wielkość współczynnika limfocytów regulatorowych Tr1 do efektorowych Th2 jest związana z rozwojem fizjologicznej lub nadmiernej, alergicznej odpowiedzi układu immunologicznego. Akdis i wsp. stwierdzili, że rozwój nadmiernej odpowiedzi immunologicznej na antygeny środowiskowe może być związany z zachwianiem równowagi pomiędzy alergenowo-swoistymi limfocytami regulatorowymi

mi Tr1 i efektorowymi Th2. Powyższe stwierdzenie oparto o doświadczenia, w których blokowano supresyjną aktywność subpopulacji komórek Tr1, co prowadziło do zwiększonej aktywacji limfocytów o profilu cytokinowym Th2 *ex vivo*. Obiecującym z terapeutycznego punktu widzenia wydaje się być fakt, że subpopulacja limfocytów Tr1 była obecna u chorych z alergią tyle, że w mniejszej ilości [9].

W przeprowadzonych przez nas badaniach zaobserwowaliśmy także, że w hodowli *in vitro* dochodzi do zachwiania równowagi immunologicznej pomiędzy subpopulacjami Tr1 i Th2 u pacjentów chorych na ciężką astmę. Najniższa wartość współczynnika w tej grupie chorych była spowodowana głównie mniejszą możliwością indukcji subpopulacji limfocytów Tr1 w porównaniu do pozostałych grup badanych.

W naszych badaniach nie bez znaczenia pozostaje fakt zastosowania techniki wielokolorowej cytometrii przepływowej. Oceniana ekspresja charakterystycznych markerów czynnościowych i wydzielanych interleukin (łącznie 6 markerów) subpopulacji limfocytów regulatorowych Tr1 i efektorowych Th2 u chorych na ciężką i umiarkowaną-łagodną astmę przy użyciu wielokolorowej cytometrii przepływowej pozwoliła na jednoznaczną identyfikację tych komórek. Należy podkreślić, że właściwa identyfikacja limfocytów regulatorowych Tr1 i efektorowych Th2 wymaga zastosowania technik o wysokiej swoistości, do których niewątpliwie należy cytometria przepływowa. Wielokolorowa cytometria przepływowa jest na dzień dzisiejszy najbardziej skuteczną metodą do identyfikacji markerów czynnościowych komórek niezależnie od ich liczby.

WNIOSKI

1. Wpływ stymulacji na subpopulację limfocytów Tr1 jest znacznie mniejszy u chorych na ciężką astmę, co może ograniczać wykorzystanie tej metody w interwencji terapeutycznej.
2. U pacjentów chorych na astmę ciężką w hodowli *in vitro* dochodzi do zachwiania równowagi immunologicznej pomiędzy subpopulacją limfocytów regulatorowych Tr1 a efektorowych Th2, co może ograniczyć terapeutyczne wykorzystanie tej metody indukcji limfocytów Tr1.

Piśmiennictwo

1. Abbas AK, Benoist C, Bluestone JA i wsp. Regulatory T cells: recommendations to simplify the nomenclature. *Nat Immunol* 2013; 14: 307-8.
2. Zeng H, Zhang R, Jin B i wsp. Type 1 regulatory T cells: a new mechanism of peripheral immune tolerance. *Cell Mol Immunol* 2015; doi: 10.1038/cmi.2015.44.
3. Burchell JT, Strickland DH, Stumbles PA. The role of dendritic cells and regulatory T cells in the regulation of allergic asthma. *Pharmacol Ther* 2010; 125: 1-10.
4. Gregori S, Goudy KS, Roncarolo MG. The cellular and molecular mechanisms of immuno-suppression by human type 1 regulatory T cells. *Front Immunol* 2012; 3: 30.
5. Zhang H, Kong H, Zeng X i wsp. Subsets of regulatory T cells and their roles in allergy. *J Transl Med* 2014; 12: 125.
6. Pellerin L, Jenks JA, Begin P i wsp. Regulatory T cells and their roles in immune dysregulation and allergy. *Immunol Res* 2014; 58: 358-68.
7. Akdis CA, Akdis M. Mechanisms and treatment of allergic disease in the big picture of regulatory T cells. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 123: 735-46.
8. Barrat FJ, Cua DJ, Boonstra A i wsp. In vitro generation of interleukin 10-producing regulatory CD4(+) T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1)- and Th2-inducing cytokines. *J Exp Med* 2002; 195: 603-16.
9. Akdis M, Verhagen J, Taylor A i wsp. Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific T regulatory 1 and T helper 2 cells. *J Exp Med* 2004; 199: 1567-75.
10. The ENFUMOSA cross-sectional European multicentre study of the clinical phenotype of chronic severe asthma. European Network for Understanding Mechanisms of Severe Asthma. *Eur Respir J* 2003; 22: 470-7.
11. Caminati M, Senna G, Guerriero M i wsp. Omalizumab for severe allergic asthma in clinical trials and real-life studies: what we know and what we should address. *Pulm Pharmacol Ther* 2015; 31: 28-35.

12. Barnes PJ. Mechanisms and resistance in glucocorticoid control of inflammation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2010; 120: 76-85.
13. Akdis CA, Akdis M. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy and immune tolerance to allergens. *World Allergy Organ J* 2015; 8: 17.
14. Akbari O, Stock P, DeKruyff RH i wsp. Role of regulatory T cells in allergy and asthma. *Curr Opin Immunol* 2003; 15: 627-33.
15. Hawrylowicz CM, O'Garra A. Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 271-83.
16. Cottrez F, Hurst SD, Coffman RL i wsp. T regulatory cells 1 inhibit a Th2-specific response in vivo. *J Immunol* 2000; 165: 4848-53.
17. Groux H, O'Garra A, Bigler M i wsp. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 1997; 389: 737-42.
18. Groux H, Sornasse T, Cottrez F i wsp. Induction of human T helper cell type 1 differentiation results in loss of IFN-gamma receptor beta-chain expression. *J Immunol* 1997; 158: 5627-31.
19. Matsumoto K, Inoue H, Fukuyama S i wsp. Decrease of interleukin-10-producing T cells in the peripheral blood of severe unstable atopic asthmatics. *Int Arch Allergy Immunol* 2004; 134: 295-302.
20. Karagiannidis C, Akdis M, Holopainen P i wsp. Glucocorticoids upregulate FOXP3 expression and regulatory T cells in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114: 1425-33.