

**Jan Siwiec, Tomasz Zaborowski, Olga Jankowska, Kamila Wojas-Krawczyk,
Paweł Krawczyk, Janusz Milanowski**

Klinika Pneumonologii, Onkologii i Alergologii Uniwersytetu Medycznego w Lublinie
Kierownik: prof. dr hab. med. J. Milanowski

Ocena równowagi limfocytów Th1/Th2 oraz ekspresji receptorów dla lipopolisacharydu u chorych na astmę

Evaluation of Th1/Th2 lymphocyte balance and lipopolysaccharide receptor expression in asthma patients

Abstract

Introduction: An increase in the number of asthma patients which has recently been observed depends on their place of residence and their occupation. This suggests that both external factors and genetic predispositions affect the development of the disease. The contact with bacterial lipopolysaccharide (LPS) may suppress the development of asthma among rural inhabitants. The mechanism of LPS effect most probably consists in the activation of macrophages and granulocytes by TLR4 and CD14 receptors for the production of cytokines, which affect Th1/Th2 balance.

The objective of the study was the evaluation of CD14 and TLR4 expression on mononuclear cells and the analysis of Th1/Th2 balance in peripheral blood among asthma patients.

Material and methods: The study group covered 22 patients with bronchial asthma (mean age 45 ± 15), and was conducted by the method of flow cytometry with the use of fluorochrome-labelled monoclonal antibodies. CD14 and TLR expression was assessed in peripheral blood monocytes. Th1/Th2 balance was determined by the measurement of intracellular IL-2, IFN- γ , IL-4 and IL-10 expression in T-helper cells after culture with the stimulation of cytokine production.

Results: A negative correlation was noted between TLR4 expression and the percentage of Th2 lymphocytes, while a positive correlation was observed between expression of TLR4 and percentage of Th1 cells. No relationship was found between CD14 expression on monocytes and the percentage of Th1 and Th2 lymphocytes.

Conclusions: An increased percentage of lymphocytes with TLR4 expression is associated with the change in Th1/Th2 balance in favour of Th1 lymphocytes in asthma patients.

Key words: asthma, Th1/Th2 balance, LPS, TLR4, CD1

Pneumonol. Alergol. Pol. 2009; 77: 123–130

Streszczenie

Wstęp: Obserwowany obecnie wzrost zachorowań na astmę jest zależny od miejsca zamieszkania chorych i wykonywanej przez nich pracy. Sugeruje to, że na występowanie choroby mają wpływ zarówno czynniki zewnętrzne, jak również predyspozycje genetyczne. Kontakt z lipopolisacharydem (LPS) bakteryjnym może hamować rozwój astmy u osób z regionów rolniczych. Prawdopodobny mechanizm działania LPS polega na aktywowaniu makrofagów i granulocytów przez receptory TLR4 i CD14 do wytwarzania cytokin, mających wpływ na równowagę Th1/Th2.

Celem pracy była ocena ekspresji CD14 oraz TLR4 na komórkach jednojądrzastych oraz analiza równowagi Th1/Th2 we krwi obwodowej u chorych na astmę.

Materiał i metody: Grupę badaną stanowiło 22 chorych (wiek średni: 45 ± 15 lat) na astmę oskrzelową. Badanie wykonano metodą cytometrii przepływową za pomocą przeciwciał monoklonalnych znakowanych fluorochromami. Ekspresję CD14 i TLR4 oceniono na wyizolowanych z krwi obwodowej komórkach jednojądrzastych. Równowagę Th1/Th2 określono przez wykonanie pomiaru wewnątrzkomórkowej ekspresji IL-2, IFN- γ , IL-4 i IL-10 w limfocytach T pomocniczych, w hodowlach prowadzonych ze stymulatorami wytwarzania cytokin.

Adres do korespondencji: lek. Jan Siwiec, Klinika Pneumonologii, Onkologii i Alergologii Uniwersytetu Medycznego w Lublinie, ul. Dr. K. Jaczewskiego 8, 20-954 Lublin, tel.: (081) 724 44 31, (081) 724 42 93, faks: (081) 724 48 23, e-mail: pulm.dept@am.lublin.pl

Praca wpłynęła do Redakcji: 13.06.2008 r.
Copyright © 2009 Via Medica
ISSN 0867-7077

Wyniki: Odsetek limfocytów z ekspresją TLR4 korelował istotnie ujemnie z odsetkiem limfocytów Th2 i znamienne dodatnio z odsetkiem limfocytów Th1. Nie stwierdzono zależności między ekspresją CD14 na monocytach a odsetkami limfocytów Th1 i Th2.

Wnioski: Zwiększony odsetek limfocytów z ekspresją TLR4 ma związek z przesunięciem równowagi Th1/Th2 na korzyść limfocytów Th1 u pacjentów z astmą.

Słowa kluczowe: astma, równowaga Th1/Th2, LPS, TLR4, CD14

Pneumonol. Alergol. Pol. 2009; 77: 123–130

Wstęp

Astma jest przewlekłą chorobą zapalną układu oddechowego [1, 2]. Do typowych objawów klinicznych zalicza się duszność, kaszel, świszczący oddech oraz ucisk w klatce piersiowej. Towarzyszy temu również nadreaktywność oskrzeli. W przebiegu choroby występują okresy zaostrzeń i remisji [3]. Lekami z wyboru są glikokortykosteroidy wziewne, których głównym działaniem jest tłumienie reakcji zapalnej [4]. Etiologia astmy jest zróżnicowana i wciąż nie do końca poznana. W złożonych patomechanizmach astmy bierze udział wiele komórek układu odpornościowego wraz z substancjami przez nie wydzielanymi [5, 6]. Można wyodrębnić postać astmy o podłożu alergicznym i niealergicznym.

Istotną funkcję w mechanizmie astmy pełnią limfocyty pomocnicze (Th, limfocyty CD4+) [7–9]. Istnieją dwie główne subpopulacje limfocytów pomocniczych: Th1 oraz Th2. Główną rolą limfocytów Th1 jest ich udział w reakcjach odpowiedzi komórkowej, między innymi w przebiegu infekcji wirusowych, pierwotniakowych i w nowotworach. Typowymi substancjami przez nie wytwarzanymi są interleukina 2 (IL-2) i interferon gamma (IFN- γ). Limfocyty Th1 posiadają także hamujący wpływ na reakcje alergiczne. Z kolei limfocyty Th2 odgrywają kluczową rolę w reakcjach typu humoralnego, sprzyjając rozwojowi alergii. Charakterystycznymi związkami produkowanymi przez limfocyty Th2 jest interleukina 4 (IL-4) i interleukina 10 (IL-10) [10]. Wśród pacjentów z chorobami alergicznymi równowaga Th1/Th2 jest przesunięta na korzyść Th2.

Uważa się, że problem astmy dotyka około trzystu milionów ludzi na świecie [11]. Wyniki badań epidemiologicznych przeprowadzonych na terenie Polski szacują, że choroba ta dotyczy 4,8–5,4% populacji kraju, a śmiertelność wynosi 2 przypadki zgonów na 100 000 mieszkańców [12–14]. Obecnie obserwuje się tendencję wzrostową zachorowalności na astmę [11]. Duży wzrost liczby osób chorych na astmę sugeruje, że przyczyna tego stanu leży bardziej po stronie czynników zewnętrznych niż predyspozycji genetycznej.

Wielu badaczy rozpoczęło badania mające na celu określenie czynników predysponujących do wystąpienia astmy. W 1989 roku przeprowadzono badanie, w którym stwierdzono istotnie mniejsze występowanie alergii wśród dzieci z rodzin wielodzietnych jako wyraz większej ekspozycji na infekcje [15]. Badanie to stało się podwaliną „teorii higienicznej” powstawania astmy, która głosi, że mniejsze narażenie na mikroorganizmy we wczesnym dzieciństwie powoduje przechylenie równowagi Th1/Th2 w kierunku Th2, co może skutkować powstawaniem alergii. Przeprowadzono badania w szerokim zakresie, w których stwierdzono rzadsze występowanie alergii, a tym samym astmy, wśród dzieci z regionów rolniczych w stosunku do dzieci z miast [16–18]. Podobna obserwacja dotyczyła dorosłych [19]. Odnotowano również istotnie podwyższony poziom endotoksyny w gospodarstwach wiejskich w stosunku do miejskich, a także zmniejszone występowanie astmy oskrzelowej wśród dzieci narażonych na endotoksynę [20, 21].

Toksyny wydzielane przez bakterie można podzielić na endotoksyny oraz egzotoksyny. Endotoksyny to fragmenty ściany komórkowej bakterii. U bakterii Gram-ujemnych jest to lipopolisacharyd (LPS) [22]. Ma on silne działanie immunomodulujące, indukujące odpowiedź ze strony limfocytów B, T, makrofagów, komórek tucznych i dendrytycznych. Uwalniany z bakterii LPS łączy się z postacią rozpuszczalną receptora dla LPS — CD14 (sCD14) [23]. Zjawisko to zachodzi dzięki białku wiążącemu LPS (LBP, *LPS binding protein*). Kompleks LPS-sCD14 zostaje przetransportowany do receptora CD14, występującego na powierzchni neutrofilów oraz makrofagów (mCD14, *membrane bound CD14*). Kompleks LPS-mCD14 łączy się z receptorem TLR4 w towarzystwie białka MD-2, co powoduje przesłanie sygnału do komórki oraz rozpoczęcie produkcji i uwalniania integryn, TNF oraz interleukin przez aktywowanie między innymi czynnika transkrypcyjnego NF- κ B.

Receptory TLR (*toll-like receptor*) biorą udział w licznych procesach immunologicznych [22]. Większość receptorów występuje na powierzchni komórek, mając w części zewnątrzkomórkowej

domeny bogate w leucynę, z kolei domeny w części wewnątrzkomórkowej są identyczne jak w receptorach dla IL-1 (mają domenę *Toll-IL-1R* — TIR). W tej licznej grupie można wyodrębnić receptor TLR4, który jest receptorem dla LPS oraz kwasu lipotejchowego. Receptor ten występuje między innymi na komórkach nabłonka dróg oddechowych, śródbłonku oraz na leukocytach. Pobudzone lipopolisacharydem komórki nabłonka oddechowego wydzielają chemokiny, defensyny i inne cytokiny, których celem jest aktywowanie oraz przyciągnięcie komórek układu odpornościowego. Komórki tuczne — poprzez sygnały z receptorów TLR4 — wytwarzają na ich powierzchni liczne mediatory (histamina, PAF, LTB₄, PGD₂), których celem jest wzmocnienie sygnałów informujących układ immunologiczny o zakażeniu (chemotaksja, pobudzenie limfocytów i makrofagów, zwiększenie przepuszczalności naczyń). Przyciągnięte i wstępnie aktywowane makrofagi i limfocyty, na których powierzchni także występują receptory dla LPS, wydzielają liczne substancje, by zwalczyć infekcję bakteryjną.

Celem pracy była ocena ekspresji CD14 oraz TLR4 na komórkach mononuklearnych oraz analiza równowagi Th1/Th2 przez określenie wewnątrzkomórkowej ekspresji IL-2, IFN- γ , IL-4 i IL-10 w limfocytach T pomocniczych krwi obwodowej u pacjentów chorych na astmę.

Materiał i metody

Charakterystyka badanych pacjentów i preparatyka krwi obwodowej

Badanie zostało przeprowadzone w grupie 22 pacjentów (średni wiek: 45 \pm 15 lat) z astmą (13 osób z astmą atopową, 9 osób z astmą nieatopową), którzy zgłosili się do poradni pulmonologicznej Katedry i Kliniki Pneumonologii, Onkologii i Alergologii Uniwersytetu Medycznego w Lublinie na wizytę kontrolną. Chorzy w ostatnim miesiącu nie wykazywali cech zaostrzenia astmy wymagających antybiotykoterapii i leczenia doustnymi glikokortykosteroidami. Stosowali przewlekłe wziewne leki sterydowe oraz leki rozkurczające oskrzela, nie otrzymywali zaś innych leków wpływających na czynność układu immunologicznego.

Do badań immunologicznych pobierano od pacjentów krew obwodową w ilości 10 ml do heparynizowanych strzykawek. Podczas wirowania (700 \times g, 20 min) krwi obwodowej w gradiencie gęstości preparatu Lymphoprep (Nycomed, Norwegia) wyizolowano komórki jednojądrzaste. Następ-

nie komórki z interfazy zostały zebrane i odpłukane zbufozowanym roztworem soli fizjologicznej bez jonów wapnia i magnezu — PBS (Biomed, Lublin).

Ocena ekspresji receptorów dla LPS: CD14 i TLR4 na komórkach jednojądrzastych

Część wyizolowanych komórek w ilości 1 \times 10⁶ na probówkę inkubowano 20 minut w temperaturze pokojowej z zestawem następujących przeciwciał monoklonalnych:

- anti-IgG1 FITC oraz anti-IgG2a PE (Becton Dickinson, USA) — kontrola negatywna;
- anti-CD14 FITC (Becton Dickinson, USA) oraz anti-TLR4 PE (Bio Science, USA) — ocena ekspresji TLR4 na monocytach CD14⁺.

Po zakończeniu inkubacji komórki były dwukrotnie odpłukiwane w PBS i natychmiast analizowane w cytometrze przepływowym.

Oznaczenie ekspresji cytokin wewnątrzkomórkowych w limfocytach Th

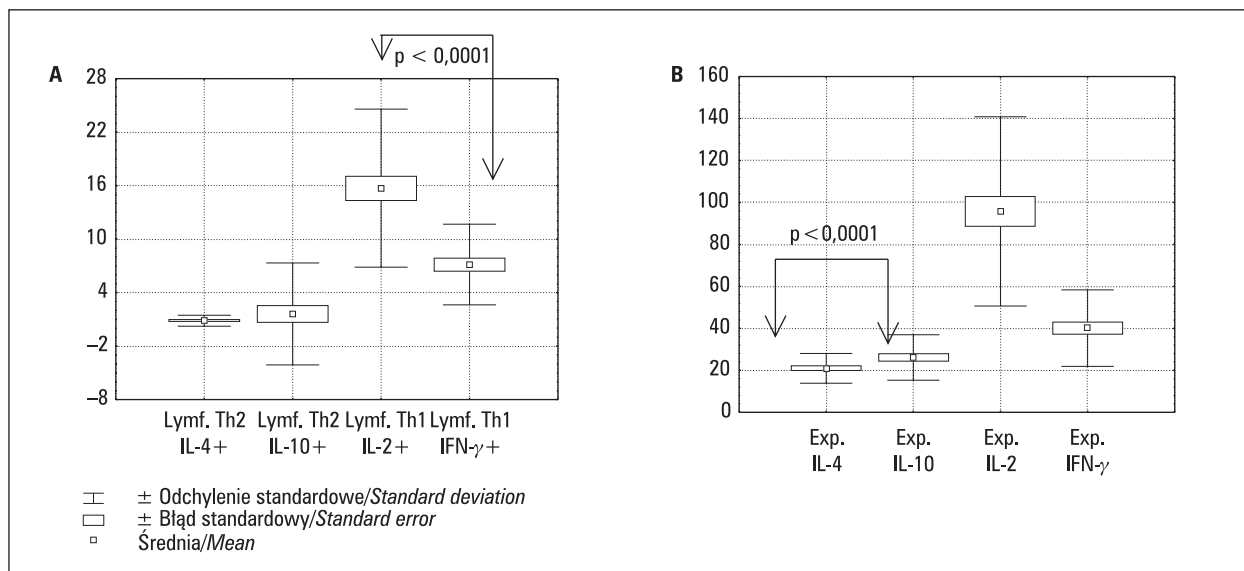
Z pozostałych komórek założono 24-godzinne hodowle komórkowe (37°C, 5-proc. CO₂) w pożywce RPMI z dodatkiem 10-procentowej surowicy cielęcej (FBS, *fetal bovine serum*) (PAA, Austria) oraz zestawu antybiotyków (1% v/v penicylina/streptomycyna) (Sigma, Niemcy). Po upływie 24 godzin bezpośrednio do dołków hodowlanych dodawano *phorbol myristate-acetate* (PMA; 2,5 ng/ml), jonomycynę (2 ng/ml) i brefeldynę (2 ng/ml) (Sigma, Niemcy). Po następnych 5 godzinach komórki z hodowli były zbierane i odpłukiwane w PBS bez Ca²⁺ i Mg²⁺.

Aby określić ekspresję antygeny CD4, użyto przeciwciała monoklonalnego anti-CD4 FITC (Becton Dickinson, USA), z którym inkubowano komórki przez 20 minut w temperaturze pokojowej. W celu utrwalenia znakowania przeciwciałem i permeabilizacji błony komórkowej zastosowano — zgodnie z zaleceniami producenta — zestaw Intra-Prep (Beckman Coulter, USA). Ekspresję cytokin wewnątrzkomórkowych oznaczano za pomocą następujących przeciwciał monoklonalnych (BD Biosciences, Pharmingen, USA):

- *PE-conjugated rat anti-human* IL-2;
- *PE-conjugated mouse anti-human* IL-4;
- *PE-conjugated rat anti-human* IL-10;
- *PE-conjugated mouse anti-human* IFN- γ .

Do oceny ekspresji cytokin wewnątrzkomórkowych zastosowano cytometr przepływowy (FACSCalibur, Becton Dickinson, USA), wyposażony w laser argonowy emitujący wiązkę promieniowania o długości fali 488 nm, i program CellQuest.

Różnice w ekspresji antygenów badanych w stosunku do kontroli izotypowej wykazano testem Kołmogorowa-Smirnowa (K-S). Analizę staty-



Rycina 1. Porównanie odsetka limfocytów Th1 wykazujących wewnątrzkomórkową ekspresję poszczególnych cytokin (A); porównanie wewnątrzkomórkowej ekspresji poszczególnych cytokin w limfocytach T pomocniczych (B)

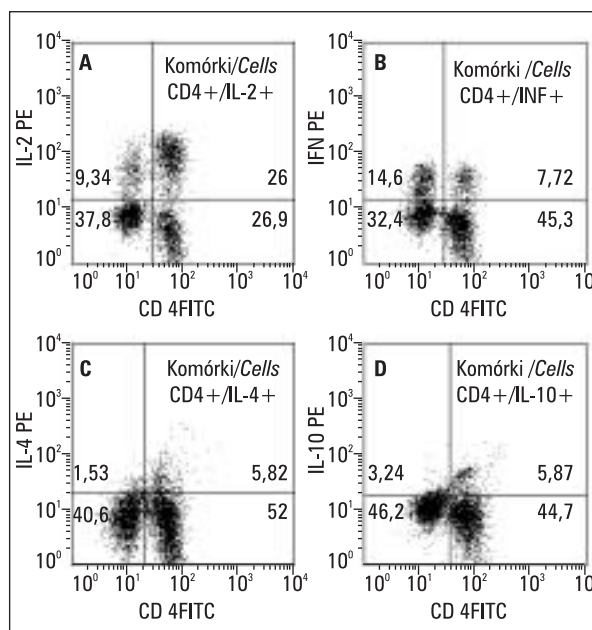
Figure 1. Percentages of Th1 lymphocytes with intracellular expression of different cytokines (A); comparison of intracellular cytokines expression in subpopulation of T-helper lymphocytes (B)

styczną przeprowadzono za pomocą testu Wilcoxon oraz testu korelacji rang Spearmana, wykorzystując program Statistica 5.0 PL. Otrzymane wyniki są przedstawione jako wartości średnie ± odchylenie standardowe. Projekt badawczy został zatwierdzony przez Komisję Bioetyczną.

Wyniki

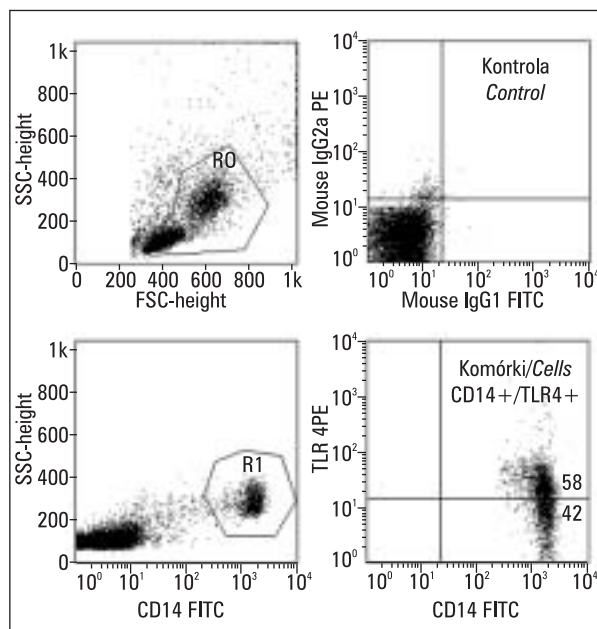
W prezentowanym badaniu komórki CD4-pozytywne wykazujące wewnątrzkomórkową ekspresję IL-2 i IFN-γ zostały zdefiniowane jako limfocyty pomocnicze Th1, zaś komórki CD4-pozytywne wykazujące wewnątrzkomórkową ekspresję IL-4 i IL-10 — jako limfocyty pomocnicze Th2.

Odsetek limfocytów Th1 produkujących IL-2 i IFN-γ we krwi obwodowej był istotnie większy niż odsetek komórek Th2 z ekspresją IL-4 i IL-10. Ponadto odsetek limfocytów Th1 produkujących IL-2 był istotnie większy w porównaniu z odsetkiem komórek z ekspresją IFN-γ. Ekspresje IL-2 i IFN-γ były istotnie większe niż ekspresje IL-4 oraz IL-10, ponadto ekspresja IL-10 była istotnie większa niż ekspresja IL-4 (ryc. 1). Wszystkie wymienione istotności kształtowały się na poziomie $p < 0,0001$. Nie stwierdzono statystycznie istotnej różnicy w odsetkach limfocytów produkujących badane cytokiny w grupie chorych z atopią w porównaniu z grupą pacjentów nieatopowych. Przykładowy obraz analizy cytometrycznej odsetka limfocytów z wewnątrzkomórkową ekspresją badanych cytokin przedstawia rycina 2.



Rycina 2. Przykładowy obraz analizy cytometrycznej odsetka komórek Th wykazujących wewnątrzkomórkową ekspresję IL-2 (A), IFN-γ (B), IL-4 (C) i IL-10 (D) u pacjenta chorego na astmę

Analiza wykazała, że $67,8 \pm 11,6\%$ limfocytów krwi obwodowej miało nieznaczną średnią intensywność fluorescencji (MFI, mean fluorescence intensity) wynoszącą $8,83 \pm 2,35$, ale róż-

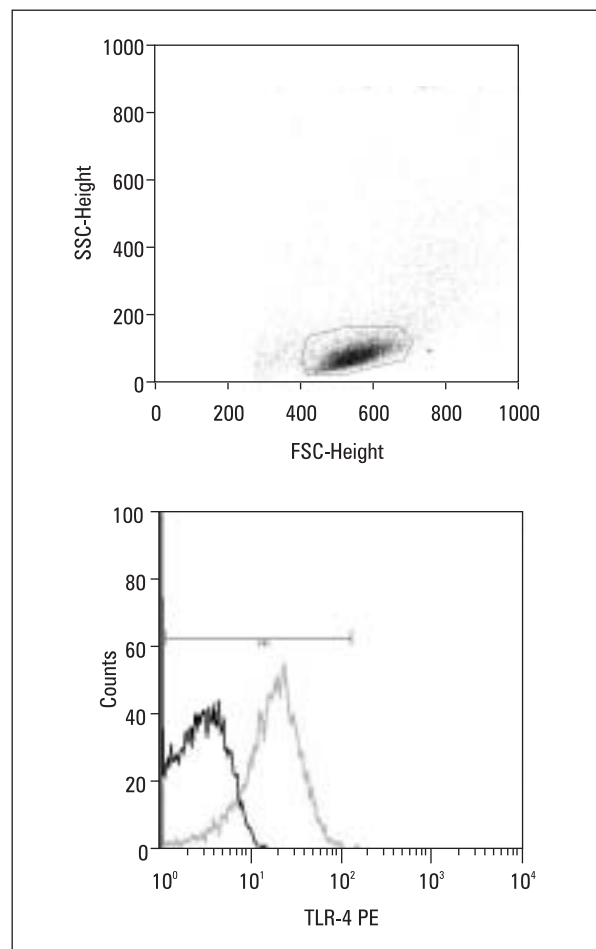


Rycina 3. Przykładowy obraz analizy cytometrycznej ekspresji receptora TLR4 na monocytach krwi obwodowej. Komórki jednojądrzaste z bramki R0 były analizowane pod względem parametru SSC (*side scattered light*) i obecności antygenu CD14. Ocena ekspresji receptora TLR4 została oceniona w grupie komórek CD14-pozytywnych

Figure 3. The representative flow cytometry analysis of TLR4 receptor expression on monocytes isolated from peripheral blood. The mononuclear cells from gate R0 were analysed according their SSC parameter and CD14 antigen expression. The expression of TLR4 receptor was estimated only among CD14-positive cells

niącą się od kontroli izotypowej ekspresję TLR4 (Test K-S $p < 0,001$). Odsetek monocytów wykazujących ekspresję TLR4 wynosił $20,8 \pm 25,1\%$. Ekspresja TLR4 była istotnie większa na monocytach krwi obwodowej ($176,8 \pm 82,1$ MFI) niż na limfocytach ($p < 0,0001$). Z kolei ekspresja antygenu CD14 na monocytach krwi obwodowej wynosiła średnio $1264,2 \pm 226,9$ MFI. Przykładowy obraz analizy cytometrycznej ekspresji receptora TLR4 na monocytach i limfocytach krwi obwodowej został przedstawiony na rycinach 3 i 4.

U pacjentów zaobserwowano istotnie ujemną korelację między odsetkiem limfocytów Th2 z wewnątrzkomórkową ekspresją IL-4 ($R = -0,429$; $p < 0,05$; ryc. 5) oraz IL-10 ($R = -0,462$; $p < 0,05$) a ekspresją TLR4 na limfocytach. Stwierdzono także istotną negatywną korelację między odsetkiem monocytów wykazujących ekspresję TLR4 a odsetkiem komórek CD4⁺ produkujących IL-4 ($R = -0,44$; $p < 0,05$). Z kolei odsetek limfocytów Th1 z wewnątrzkomórkową ekspresją IL-2 dodatnio korelował z ekspresją TLR4 na limfocytach ($R = 0,404$; $p = 0,06$; ryc. 5).



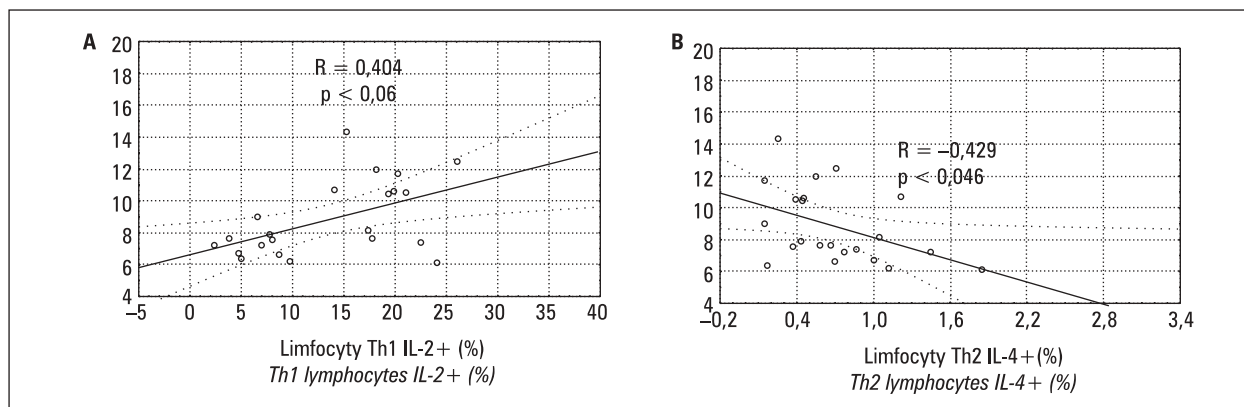
Rycina 4. Przykładowy obraz analizy cytometrycznej ekspresji TLR4 na limfocytach krwi obwodowej: ■ limfocyty z kontroli negatywnej, ■ limfocyty z próbki badanej

Figure 4. The representative flow cytometry analysis of TLR4 receptor expression on peripheral blood lymphocytes: ■ negative control; ■ examined sample

Nie odnotowano statystycznie istotnych korelacji między odsetkami limfocytów Th1 i Th2 a ekspresją antygenu CD14 na monocytach krwi obwodowej. Wykazano jedynie, że ekspresja wewnątrzkomórkowa IL-10 w limfocytach Th2 istotnie dodatnio korelowała z ekspresją cząsteczki CD14 na monocytach ($R = 0,438$; $p < 0,05$).

Omówienie

Badania epidemiologiczne chorych na astmę nie dały jasnego obrazu tego, jaki wpływ na przebieg kliniczny choroby ma narażenie pacjentów na działanie lipopolisacharydu [22]. Wiadomo jednak, że antygenowa stymulacja układu odpornościowego, w tym także bakteryjnym lipopolisacharydem, odgrywa istotną rolę w wypracowaniu podstawowych mechanizmów ochronnych w rozwoju astmy.



Rycina 5. Korelacja między odsetkiem limfocytów Th1 z wewnątrzkomórkową ekspresją IL-2 a ekspresją receptora TLR4 na limfocytach (A); korelacja między odsetkiem limfocytów Th2 z wewnątrzkomórkową ekspresją IL-4 a ekspresją receptora TLR4 na limfocytach (B)

Figure 5. The correlation between the percentage of Th1 lymphocytes with intracellular expression of IL-2 and the expression of TLR4 receptor on lymphocytes (A); the correlation between the percentage of Th2 lymphocytes with intracellular expression of IL-4 and the expression of TLR4 receptor on lymphocytes (B)

Powstała „teoria higieniczna”, zgodnie z którą częstsze narażenie na infekcje ma ochronny wpływ i zmniejsza ryzyko występowania astmy, natomiast mniejsza ekspozycja na czynniki bakteryjne sprzyja przesunięciu równowagi Th1/Th2 w kierunku Th2. Teoria ta znalazła potwierdzenie w badaniach rodzin o niższym statusie społeczno-ekonomicznym oraz rodzin wielodzietnych, gdzie obserwowano rzadsze występowanie alergii oraz astmy oskrzelowej wśród dzieci [15].

Dane z literatury sugerują, że oprócz badań populacyjnych i środowiskowych, które zwróciły uwagę badaczy na tę zależność, zaobserwowano również wpływ polimorfizmów genów dla receptora TLR4 oraz cząsteczki CD14 na zdolność limfocytów biorących udział w reakcji alergicznej do wytwarzania różnych cytokin. Występowanie tych polimorfizmów może wpływać na nieprawidłowe funkcjonowanie procesów immunologicznych, przyczyniając się tym samym do powstawania atopii, a nawet astmy [24–31]. Fageras i wsp. zaobserwowali zależność między zmniejszonym wytwarzaniem IL-12 i IL-10 przez limfocyty stymulowane LPS a pewną formą polimorficzną genu receptora TLR4, którego obecność korelowała dodatkowo ze zwiększoną częstością występowania astmy [24]. Na podstawie swoich badań autorzy ci wysunęli tezę o osłabieniu szlaku Th2 i przesunięciu odpowiedzi immunologicznej w kierunku Th1 u dzieci chorych na astmę. W wyniku reakcji na LPS komórki układu odpornościowego wydzielają różne substancje, które sprzyjają powstawaniu limfocytów cytotoksycznych i Th1, a także hamowaniu powstawania IgE min. przez IL-12, zwiększanie wydzielania IFN- α , IFN- γ [22, 23]. Badania przeprowadzone przez Koch i wsp. udowodniły osłabioną odpowiedź Th1 po stymula-

cji lipopolisacharydem u dorosłych pacjentów chorych na astmę [28]. Wy tłumaczeniem tego zjawiska może być stwierdzone przez badaczy zmniejszenie ekspresji receptora TLR4 na limfocytach CD4+ w grupie badanych pacjentów.

Celem niniejszej pracy było określenie zależności między równowagą Th1/Th2 w astmie a ekspresją cząsteczki CD14 oraz receptora TLR4 na komórkach jednojądrzastych poddanych stymulacji lipopolisacharydem. LPS działa nieswoiście aktywująco na limfocyty i makrofagi, wiążąc się ze specyficznym, krążącym we krwi białkiem LBP. Białko to pośredniczy w przeniesieniu LPS na receptorową cząsteczkę CD14, która w ostatecznym etapie ułatwia interakcję LPS z docelowym receptorem — TLR4. Wykorzystując metodykę cytometrii przepływowej, w prezentowanym badaniu stwierdzono dodatnią korelację między odsetkiem limfocytów pomocniczych Th1, wytwarzających IL-2 lub IFN- γ , a odsetkiem komórek jednojądrzastych, wykazujących ekspresję TLR4. Jednocześnie zaobserwowano negatywną zależność między odsetkami limfocytów Th2 a ekspresją TLR4 na komórkach jednojądrzastych. Wyniki te wskazują jednoznacznie na istnienie odpowiedzi typu Th1 we krwi obwodowej w badanej grupie pacjentów, która dodatkowo koreluje ze zwiększoną ekspresją receptora TLR4. Nie znaleziono natomiast zależności między ekspresją antygeny CD14 a równowagą Th1/Th2. Shirai i wsp. zaobserwowali również obniżony poziom Th2 we krwi obwodowej wśród osób chorych na astmę oraz z atopią w stosunku do zdrowej grupy kontrolnej [32]. Niestety, nasze badania koncentrują się na oznaczeniu równowagi Th1/Th2 w grupie pacjentów z astmą, tymczasem w świetle badań Shirai wskazane byłoby

określenie równowagi Th1/Th2 również w grupie osób zdrowych oraz określenie różnic między grupą chorych na astmę a grupą osób zdrowych.

Badania wpływu LPS na wytwarzanie przez limfocyty różnych cytokin przeprowadzili Koch i wsp. [28]. Ocenili równowagę Th1/Th2 u pacjentów z astmą w odniesieniu do stymulacji komórek różnymi stężeniami LPS i zaobserwowali osłabienie odpowiedzi typu Th1 pod wpływem LPS, wyrażające się redukcją wytwarzania odpowiednich cytokin. LPS nie wywierał natomiast tak istotnego wpływu na populację komórek Th2 w badanej grupie pacjentów.

W prezentowanej pracy stwierdzono przewagę odpowiedzi typu Th1 nad Th2, co jest prawdopodobnie związane ze wzrostem odsetka komórek jednojądrzastych z ekspresją receptora TLR4, natomiast ekspresja cząsteczki CD14 pozostawała bez istotnego związku z populacją limfocytów Th1. TLR4 jest głównym receptorem dla lipopolisacharydu. Po analizie wyników naszych badań wydaje się, że nie tylko narażenie na lipopolisacharyd, ale również poziom ekspresji receptorów dla LPS może determinować rodzaj wzbudzonej odpowiedzi immunologicznej u chorych na astmę. Ekspresja TLR4 na komórkach jednojądrzastych może ponadto korelować z poziomem egzogenego LPS i oddziaływać na równowagę Th1/Th2 w odwrotny sposób niż w wypadku samego LPS.

Nie bez znaczenia pozostaje również poziom narażenia organizmu na lipopolisacharyd. Eisenbarth i wsp. w badaniach na mysich modelach zaobserwowali, że niski poziom wziewnego lipopolisacharydu powodował aktywację limfocytów Th2 poprzez receptor TLR, przy dodatkowym współudziale grupy mieloidalnych komórek dendrytycznych [33]. Z kolei inhalacje wysokiego stężenia LPS stymulowały rozwój odpowiedzi typu Th1. Dane te sugerują, że stężenie LPS ma istotny wpływ na rodzaj wzbudzonej odpowiedzi immunologicznej.

Wiele badań przeprowadzonych na modelach mysich udowodniło, że nie tylko LPS i ekspresja TLR odgrywają istotną rolę w patomechanizmie astmy (w rozwoju zapalenia), ale przede wszystkim współdziałanie antygeny i endotoksyny [34]. Lipopolisacharyd, w zależności od modelu zwierzęcego, może wykazywać różny wpływ na proces zapalny w drogach oddechowych. Jung i wsp. udowodnili, że po podaniu antygeny dochodziło do znacznego nasilania objawów stanu zapalnego u szczepów myszy z niedoborem ekspresji TLR4. Z kolei Hollingsworth i wsp. oceniali wpływ niskich dawek LPS i różny czas ekspozycji układu immunologicznego myszy na antygen [35]. Stwierdzili, że krótkoterminowa ekspozycja na alergen nie powodowała różnic w reakcji immunologicznej u myszy z niedoborem TLR4 i w grupie kontrolnej. Natomiast

długoterminowa ekspozycja na alergen skutkowała znacznym wzrostem markerów aktywnego procesu zapalnego u myszy z niedoborem TLR4.

Wnioski

Podsumowując, wydaje się, że limfocyty Th1 mogą konstytutywnie wykazywać ekspresję cząsteczki TLR4. Opierając się na tym założeniu, wykazana w pracy korelacja między ekspresją TLR4 a zdolnością limfocytów do produkcji odpowiednich cytokin może być wynikiem charakterystycznego dla limfocytów Th1 fenotypu i nie mieć istotnego związku z indukcją wytwarzania IL-2 i INF- γ przez lipopolisacharyd oddziałujący przez receptor TLR4.

Mimo licznych badań nad astmą nie udało się w pełni wytłumaczyć zależności między immunologią a stanem klinicznym pacjenta. Teoria zaburzenia równowagi Th1/Th2 na rzecz Th2 bywa dyskusyjna. Są doniesienia wskazujące, że przewaga limfocytów Th1 wpływa na zaostrzenie astmy, natomiast podwyższony poziom Th2, między innymi w robaczycach zmniejsza ryzyko zaostrzeń. Rozpoczęto poszukiwania czynników, które mają wpływ na regulację Th1/Th2. Do takich czynników należą limfocyty regulatorowe (Treg; CD4⁺, CD25^{high}), które poprzez białko regulatorowe foxP3 i wydzielany TGF β wpływają hamująco na limfocyty Th1 i Th2. Obserwowano wyrastanie dzieci z alergii z wyższym poziomem Treg, a także wzrost Th2 indukowanych alergenami, spowodowane blokowaniem Treg. Treg mogą poprzez komórki dendrytyczne tłumić reakcje alergiczne na antygeny bakteryjne [36]. Stwierdzono także obniżony poziom Treg w atopii, zwłaszcza w okresie pylenia wraz z odbiciem w równowadze Th1/Th2, lub w czasie zaostrzenia astmy [37, 38]. Pełen mechanizm jeszcze wymaga odkrycia, a sprzeczne informacje mogą wynikać z okresu, w jakim została pobrana krew do badań [36].

Liczne badania kliniczne potwierdzają zależność pomiędzy wpływem lipopolisacharydu na powstawanie astmy a stopniem jej nasilenia. Nie do końca poznane jest oddziaływanie receptora TLR4 na regulację Th1/Th2 w tej chorobie. Wydaje się, że jest to proces bardzo złożony, zależny od wielu czynników, między innymi polimorfizmu odpowiednich receptorów, rodzaju i stężenia LPS, obecności antygeny oraz okresu ekspozycji. Zaprezentowane w niniejszej pracy dane pozostają w związku z wynikami badań przeprowadzonych w licznych ośrodkach, zajmujących się patomechanizmem astmy oskrzelowej. Otrzymane wyniki wskazują na złożoność problemu, zagadnienie to wymaga bowiem dalszych badań, w tym przeprowadzenia oznaczeń u osób zdrowych.

Piśmiennictwo

1. Fireman P. Understanding asthma pathophysiology. *Allergy Asthma Proc.* 2003; 24: 79–83.
2. Boushey H.A., Fahy J.V. Basic mechanisms of asthma. *Environ. Health Perspect.* 1995; 103 Suppl 6: 229–233.
3. Bullens D.M. Measuring T cell cytokines in allergic upper and lower airway inflammation: can we move to the clinic? *Inflamm. Allergy Drug Targets* 2007; 6: 81–90.
4. Chazan R. Kortykosteroidy w leczeniu obturacji dróg oddechowych. *Pneumonol. Alergol. Pol.* 2008; 76: 96–101.
5. Dąbrowski M.P., Stankiewicz W., Chciałowski A. The role of immunoregulatory disorders in pathogenesis of bronchial asthma. *Pol. Merkur. Lek.* 2003; 14: 522–523.
6. Maddox L., Schwartz D.A. The pathophysiology of asthma. *Annu. Rev. Med.* 2002; 53: 477–498.
7. Colavita A.M., Reinach A.J., Peters S.P. Contributing factors to the pathobiology of asthma. The Th1/Th2 paradigm. *Clin. Chest Med.* 2000; 21: 263–277.
8. Larché M., Robinson D.S., Kay A.B. The role of T lymphocytes in the pathogenesis of asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2003; 111: 450–463.
9. Del Prete G. Human Th1 and Th2 lymphocytes: their role in the pathophysiology of atopy. *Allergy* 1992; 47: 450–455.
10. Hamelmann E., Wahn U., Gelfand E.W. Role of the Th2 cytokines in the development of allergen-induced airway inflammation and hyperresponsiveness. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 1999; 118: 90–94.
11. Masoli M., Fabian D., Holt S., Beasley R., Global Initiative for Asthma (GINA) Program. The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report. *Allergy* 2004; 59: 469–478.
12. Liebhart J., Malolepszy J., Wojtyniak B., Pisiewicz K., Plusa T., Gladysz U. Polish Multicentre Study of Epidemiology of Allergic Diseases.: Prevalence and risk factors for asthma in Poland: results from the PMSEAD study. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 2007; 17: 367–374.
13. Smoliński B. Epidemiologia nieżytyłów nosa, astmy i AZS na podstawie badań ECRHS i ISAAC w Polsce. *Alergia* 2007; 33: 10–12.
14. Niedożytko M., Porzezińska M., Chęłmińska M., Gruchała-Niedożytko M., Łata J., Jassem E. Analiza zgonów z powodu obturacyjnych chorób płuc w latach 2001–2004 w województwie pomorskim. *Pneumonol. Alergol. Pol.* 2007; 75: 40–45.
15. Strachan D.P. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ* 1989; 299: 1259–1260.
16. Braun-Fahrlander C., Gassner M., Grize L. i wsp. Prevalence of hay fever and allergic sensitization in farmer's children and their peers living in the same rural community. SCARPOL team. Swiss Study on Childhood Allergy and Respiratory Symptoms with Respect to Air Pollution. *Clin. Exp. Allergy* 1999; 29: 28–34.
17. Riedler J., Eder W., Oberfeld G., Schreuer M. Austrian children living on a farm have less hay fever, asthma and allergic sensitization. *Clin. Exp. Allergy* 2000; 30: 194–200.
18. Riedler J., Braun-Fahrlander C., Eder W. i wsp. ALEX Study Team. Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey. *Lancet* 2001; 358: 1129–1133.
19. Eduard W., Douwes J., Omenaas E., Heederik D. Do farming exposures cause or prevent asthma? Results from a study of adult Norwegian farmers. *Thorax* 2004; 59: 381–386.
20. von Mutius E., Braun-Fahrlander C., Schierl R. i wsp. Exposure to endotoxin or other bacterial components might protect against the development of atopy. *Clin. Exp. Allergy* 2000; 30: 1230–1234.
21. Braun-Fahrlander C., Riedler J., Herz U. i wsp. Allergy and Endotoxin Study Team. Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. *N. Engl. J. Med.* 2002; 347: 869–877.
22. Gołąb J., Jakóbsiak M., Lasek W. *Immunologia*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2005; 134–138.
23. Żeromski J. *Immunologia*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2000; 229–232.
24. Fagerås Böttcher M., Hmani-Aifa M., Lindström A. i wsp. A TLR4 polymorphism is associated with asthma and reduced lipopolysaccharide-induced interleukin-12(p70) responses in Swedish children. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2004; 114: 561–567.
25. Smit L.A., Bongers S.I., Ruven H.J. i wsp. Atopy and new-onset asthma in young Danish farmers and CD14, TLR2, and TLR4 genetic polymorphisms: a nested case-control study. *Clin. Exp. Allergy* 2007; 37: 1602–1608.
26. Lachheb J., Dhifallah I.B., Chelbi H., Hamzaoui K., Hamzaoui A. Toll-like receptors and CD14 genes polymorphisms and susceptibility to asthma in Tunisian children. *Tissue Antigens* 2008; 71: 417–425.
27. Sağkesen C., Karaaslan C., Keskin O. i wsp. The effect of polymorphisms at the CD14 promoter and the TLR4 gene on asthma phenotypes in Turkish children with asthma. *Allergy* 2005; 60: 1485–1492.
28. Koch A., Knobloch J., Dammhayn C. i wsp. Effect of bacterial endotoxin LPS on expression of INF-gamma and IL-5 in T-lymphocytes from asthmatics. *Clin. Immunol.* 2007; 125: 194–204.
29. Schwartz D.A. TLR4 and LPS hyporesponsiveness in humans. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 2002; 205: 221–227.
30. Adjers K., Karjalainen J., Pessi T., Eklund C., Hurme M. Epistatic effect of TLR4 and IL4 genes on the risk of asthma in females. 1: *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2005; 138: 251–256.
31. Raby B.A., Klimecki W.T., Laprise C. i wsp. Polymorphisms in toll-like receptor 4 are not associated with asthma or atopy-related phenotypes. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2002; 166: 1449–1456.
32. Shirai T., Suzuki K., Inui N., Suda T., Chida K., Nakamura H. Th1/Th2 profile in peripheral blood in atopic cough and atopic asthma. *Clin. Exp. Allergy* 2003; 33: 84–89.
33. Eisenbarth S.C., Piggott D.A., Huleatt J.W., Visintin I., Herrick C.A., Bottomly K. Lipopolysaccharide-enhanced, toll-like receptor 4-dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen. *J. Exp. Med.* 2002; 196: 1645–1651.
34. Jung Y.W., Schoeb T.R., Weaver C.T., Chaplin D.D. Antigen and lipopolysaccharide play synergistic roles in the effector phase of airway inflammation in mice. *Am. J. Pathol.* 2006; 168: 1425–1434.
35. Hollingsworth J.W., Whitehead G.S., Lin K.L. TLR4 signaling attenuates ongoing allergic inflammation. *J. Immunol.* 2006; 176: 5856–5862.
36. van Oosterhout A.J., Bloksma N. Regulatory T-lymphocytes in asthma. *Eur. Respir. J.* 2005; 26: 918–932.
37. Bousquet J., Anto J.M., Bachert C. i wsp. Factors responsible for differences between asymptomatic subjects and patients presenting an IgE sensitization to allergens. A GA2LEN project. *Allergy* 2006; 61: 671–680.
38. Zhang Q., Qian F.H., Liu H. i wsp. Expression of surface markers on peripheral CD4+CD25high T cells in patients with atopic asthma: role of inhaled corticosteroid. *Chin. Med. J.* 2008; 121: 205–212.