

Łukasz Kraszula¹, Makandjou-Ola Eusebio¹, Maciej Kupczyk², Piotr Kuna², Mirosława Pietruczuk¹

¹Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej, II Katedra Chorób Wewnętrznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Kierownik: prof. nadzw. dr hab. n. med. M. Pietruczuk

²Klinika Chorób Wewnętrznych, Astmy i Alergii, II Katedra Chorób Wewnętrznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Kierownik: prof. dr hab. n. med. P. Kuna

Wykorzystanie wielokolorowej cytometrii przepływowej do identyfikacji markerów czynnościowych limfocytów nTreg u chorych na ciężką astmę oskrzelową

The use of multi-color flow cytometry for identification of functional markers of nTregs in patients with severe asthma

Praca finansowana z pracy statutowej nr: 503/1-095-05/503-01.

Abstract

Introduction: At present, severe asthma is a particular clinical problem. An important role is attributed to dysfunction of nTreg subpopulations of lymphocytes in the pathogenesis of asthma. Therefore, the purpose of this study was to identify markers of nTreg cell function in patients with severe and mild to moderate asthma.

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. The diagnosis of asthma was confirmed accordance with generally accepted recommendations (GINA 2008). nTreg immunophenotype CD4/CD25/CD127/FoxP3/GITR/CD152/CCR5/CCR7 was evaluated by multicolor flow cytometry.

Results: We showed a significant reduction in the percentage of nTreg (76%) cells and the expression of CD152 (46.2%) in patients with severe asthma compared with mild-moderate asthma (85.5% and 86.7%; $p < 0.05$). It was observed that the transcription factor FoxP3 expression in nTreg cells positively correlated with FEV1 in patients with severe asthma ($r = 0.53$; $p < 0.05$). It was also found that the ratio nTregCCR5⁺/TeffCCR5⁺ was significantly reduced in patients with severe asthma (0.91) compared with mild-moderate (1.58) asthma and control groups (1.55; $p < 0.001$).

Conclusions: There are phenotypic differences in nTreg lymphocytes between patients with severe and mild-moderate asthma. This fact may confirm nTreg cell dysfunction and indicate that the potential markers (FoxP3, CD152, CCR5), can be used to monitor the effectiveness of treatment of bronchial asthma, especially severe disease.

Key words: asthma, nTreg, FoxP3, CD152, GITR, CCR5, CCR7

Pneumonol. Alergol. Pol. 2012; 80, 5: 389–401

Streszczenie

Wstęp: Ciężka postać astmy oskrzelowej stanowi obecnie szczególny problem kliniczny. W patogenezie astmy istotną rolę przypisuje się dysfunkcji subpopulacji limfocytów nTreg. Dlatego celem pracy była identyfikacja markerów czynnościowych limfocytów nTreg u chorych na astmę ciężką i umiarkowaną–łagodną.

Materiał i metody: Do badania zakwalifikowano 60 pacjentów z rozpoznaną astmą oskrzelową (w tym 30 z ciężką i 30 z umiarkowaną–łagodną postacią choroby). Grupę kontrolną stanowiło 30 zdrowych ochotników. Diagnoza astmy oskrzelowej została postawiona zgodnie z powszechnie akceptowanymi zaleceniami — GINA 2008. Materiałem badanym była krew żylna pobrana na K₂EDTA. Ocenę immunofenotypu CD4/CD25/CD127/FoxP3/GITR/CD152/CCR5/CCR7, limfocytów nTreg wykonano techniką wielokolorowej cytometrii przepływowej.

Adres do korespondencji: dr n. med. Łukasz Kraszula, Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej, II Katedra Chorób Wewnętrznych, ul. Kopcińskiego 22, 90–153 Łódź, tel.: (42) 677 69 81, faks: (42) 678 28 33, e-mail: lukasz.kraszula@umed.lodz.pl

Praca wpłynęła do Redakcji: 12.08.2011 r.
Copyright © 2012 Via Medica
ISSN 0867–7077

Wyniki: Wykazano, znamienne obniżenie odsetka limfocytów nTreg (76%) i ekspresji CD152 (46,2%) u chorych na astmę ciężką w porównaniu z astmą umiarkowaną–łagodną (85,5% i 86,7%; $p < 0,05$). Zaobserwowano, że ekspresja czynnika transkrypcyjnego FoxP3 w limfocytach nTreg dodatnio korelowała z FEV1 u chorych na astmę ciężką ($r = 0,53$; $p < 0,05$). Stwierdzono także, że obliczony współczynnik nTregCCR5⁺/TeffCCR5⁺ był znamienne obniżony u chorych na astmę ciężką (0,91) w porównaniu do astmy umiarkowanej–łagodnej (1,58) i grupy kontrolnej (1,55; $p < 0,001$).

Wnioski: Istnieją różnice fenotypowe w subpopulacji limfocytów nTreg między chorymi na astmę ciężką i umiarkowaną–łagodną. Fakt ten może potwierdzić dysfunkcję limfocytów nTreg i wskazać na potencjalne markery (FoxP3, CD152, CCR5), które mogą być użyte do monitorowania efektywności leczenia astmy oskrzelowej, a zwłaszcza ciężkich postaci choroby.

Słowa kluczowe: astma, nTreg, FoxP3, CD152, GTR, CCR5, CCR7

Pneumonol. Alergol. Pol. 2012; 80, 5: 389–401

Wstęp

Astma oskrzelowa jest chorobą, w której dominuje przewlekły proces zapalny umiejscowiony w drogach oddechowych. W klasycznym ujęciu immunopatomechanizm astmy charakteryzuje się wzmożoną produkcją cytokin przez subpopulację limfocytów Th2, nadprodukcją alergenowo swoistych przeciwciał klasy IgE, obecnością aktywowanych komórek tucznych oraz populacji granulocytów [1]. Astma nie jest chorobą jednorodną — posiada wiele fenotypów, w których patomechanizm jest odmienny od klasycznego. Jednak szczególnym problemem klinicznym jest ciężka astma oskrzelowa, w której może występować oporność na leczenie glikokortykosteroidami [2]. Dlatego wciąż poszukuje się nowych możliwości leczenia ciężkiej postaci choroby i duże nadzieje wiąże się z farmakologiczną lub immunologiczną modyfikacją funkcji limfocytów regulatorowych T CD4⁺.

Limfocyty regulatorowe T CD4⁺ są odpowiedzialne za utrzymanie homeostazy, polegającej na hamowaniu odpowiedzi immunologicznej w stosunku do własnych antygenów i nadmiernej odpowiedzi na czynniki zewnątrzpochodne, w tym alergeny. Subpopulacja limfocytów Treg CD4⁺ nie jest jednorodna fenotypowo i funkcyjnie. Wśród niej można wyróżnić, naturalne limfocyty regulatorowe (nTreg) o podstawowym immunofenotypie, opisywanym jako CD4⁺CD25^{high}CD127^{low}Foxp3⁺ oraz indukowane limfocyty regulatorowe (iTreg) o immunofenotypach — CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺, CD4⁺CD25^{IL-10⁺IL-4⁺}(Tr1), CD4⁺TGF-β⁺(Th3) [3]. Wykazano, że limfocyty regulatorowe mogą sprawować supresyjną funkcję, poprzez oddziaływanie w sposób bezpośredni i pośredni na komórki efektorowe uczestniczące w reakcji zapalnej. Do pełnienia funkcji przez limfocyty Treg potrzebna jest ekspresja cząsteczek, które jednocześnie charakteryzują tę subpopulację. Należą do nich: CD152 (CTLA-4, *cytotoxic T lymphocyte-associated antigen*

4), GTR (*glucocorticoid-induced TNF receptor*), TGF-β (*tumor growth factor-β*), jak i cytokiny: TGF-β czy IL-10 [3, 4].

Zaobserwowano, że limfocyty nTreg mogą wykazywać działanie supresyjne zarówno wewnątrz tkanek limfatycznych, jak i na obwodzie — w miejscach, gdzie dochodzi do reakcji odpornościowej [5]. Uważa się także, że odpowiednia lokalizacja komórek Treg jest niezbędna do prawidłowego działania, a zaburzenia w ich migracji mogą być przyczyną osłabienia właściwości supresyjnych *in vivo*. W migracji limfocytów regulatorowych, do miejsca zapalenia kluczową rolę odgrywają chemokiny i ich receptory. Początkowo uważano, że dla subpopulacji limfocytów nTreg najbardziej charakterystyczne są receptory CCR4 i CCR8. Późniejsze badania dowiodły obecności na ich powierzchni również innych receptorów chemokinowych, takich jak CCR5 czy CCR7 [6, 7]. Wykazano między innymi, że limfocyty Treg pozbawione receptora CCR5 charakteryzują się osłabieniem właściwości supresyjnych, a brak ekspresji receptora CCR7 na tych komórkach hamuje ich migrację do miejsca procesu zapalnego, co przyczynia się do nadmiernej odpowiedzi immunologicznej [6, 7].

W badaniach nad limfocytami nTreg największej problemów sprawia jednoznaczna identyfikacja. Wyniki badań wykazały, że nie ma jednego markera, który jest swoisty dla tej populacji komórek. Większość markerów charakterystycznych dla limfocytów nTreg pojawia się również na aktywowanych limfocytach efektorowych [8]. Wykorzystanie techniki wielokolorowej (ośmiokolorowej) cytometrii przepływowej pozwoliło na ocenę populacji limfocytów nTreg wysortowanych z krwi obwodowej. Umożliwiło również jednoczesną ocenę obecności markerów odpowiedzialnych za funkcje oraz receptorów chemokinowych.

Warto podkreślić, że wyniki badań nad limfocytami regulatorowymi T CD4⁺ w patogenezie

astmy są sprzeczne, jednak większość badaczy postuluje, iż istotną rolę w jej przebiegu może odgrywać dysfunkcja naturalnych limfocytów Treg [9, 10]. Dotychczas nie ma wyników prac eksperymentalnych pozwalających na równoczesną ocenę ośmiu charakterystycznych markerów limfocytów nTreg u chorych na astmę. Bazując na przedstawionych danych, celem zaprezentowanych badań była identyfikacja markerów czynnościowych limfocytów nTreg u chorych na astmę ciężką i astmę umiarkowaną–łagodną przy użyciu wielokolorowej cytometrii przepływowej.

Materiał i metody

Do badania zakwalifikowano 60 pacjentów z rozpoznaną astmą oskrzelową (w tym 30 z ciężką i 30 z umiarkowaną i łagodną postacią choroby). Grupę kontrolną stanowiło 30 zdrowych ochotników. Z badania wyłączono osoby palące tytoń i pacjentów w niestabilnym stanie klinicznym. Na podstawie historii chorób zebrano dane demograficzne i kliniczne.

Diagnozę astmy oskrzelowej potwierdzono na podstawie wywiadu i zmienności obturacji dróg oddechowych, zgodnie z powszechnie akceptowanymi zaleceniami — GINA 2008 [1]. Stopień ciężkości choroby oceniono zgodnie z definicją użytą w badaniach grupy ENFUMOSA [11].

Pacjenci zakwalifikowani do grupy chorych na astmę ciężką wymagali stałego leczenia wysokimi dawkami steroidów wziewnych ($\geq 1600 \mu\text{g/d}$. budesonidu lub beklometazonu, $800 \mu\text{g/d}$. flutikazonu lub równoważnika). W przypadku przewlekłej doustnej steroidoterapii wymagane dawki leków wynosiły $800 \mu\text{g/d}$. budesonidu lub beklometazonu, $400 \mu\text{g/d}$. flutikazonu lub równoważnika. Ponadto pacjenci z astmą ciężką wymagali długotrwałej terapii długodziałającym β -agonistą (LABA, *long acting β -agonist*; formoterol w dawce 9 mcg/dawkę, $2 \times \text{d}$. lub salmeterol 50 mcg/dawkę, $2 \times \text{d}$.) lub doustną teofiliną ($200\text{--}300 \text{ mg } 1\text{--}2 \times \text{d}$.). Mimo intensywnej terapii przeciwzapalnej, 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 podstawowej. 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 $800 \mu\text{g/d}$. budesonidu lub beklometazonu, $500 \mu\text{g/d}$. flutikazonu albo równoważnika. Wszy-

Tabela 1. Charakterystyka badanej grupy

Table 1. Characteristics of the study group

	Astma ciężka Severe asthma	Astma umiarkowana–łagodna Mild–moderate asthma
n	30	30
Wiek (lata \pm SD) Age (years \pm SD)	49 \pm 14,5	42 \pm 13,5
Płeć (K : M) Sex (W : M)	16 : 14	15 : 15
Czas trwania choroby (lata \pm SD) Duration of illness (years \pm SD)	16 \pm 8,7	10 \pm 6,3
Atopia (% \pm SD) Atopy (% \pm SD)	82%	88%
FEV ₁ (l \pm SD)	2,6 \pm 0,5	3,5 \pm 0,8
FEV ₁ (% \pm SD)	55% \pm 15,9	89% \pm 16,1
lgE (kUA/L \pm SD)	272 \pm 284	251 \pm 92
ACT (punkty \pm SD) (points \pm SD)	10,4 \pm 2,9	22 \pm 3,5

scy pacjenci włączeni do grup badanych nie otrzymywali innych leków immunosupresyjnych niż glikokortykosteroidy. 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 [12]. Charakterystykę badanych grup przedstawiono w tabeli 1.

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 (K_2EDTA). Od każdego pacjenta 8 ml krwi żyłnej nawarstwiano na 12 ml podłoża Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich). Komórki jednojądrzaste (PBMCs) wyizolowano przez wirowanie 2500 obrotów na minutę przez 30 minut w gradiencie gęstości. Bezwzględna liczbę i odsetek komórek jednojądrzastych oznaczano analizatorem pentra DX 120 w celu sprawdzenia odsetka żywych, wyizolowanych komórek. Czyistość komórkowa pozwalająca na przystąpienie do etapu sortowania musiała być wyższa niż 80% limfocytów.

Procedura sortowania

Limfocyty CD4^+ wyizolowano w procesie separacji negatywnej — procedura jednostopniowa

(Miltenyi Biotec, Stany Zjednoczone). Do wyizolowanych w gradiencie gęstości komórek jednodrzazstych dodano mieszaninę przeciwciał przeciwko antygenom powierzchniowym: anty-CD8, CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, TCR γ/δ i CD235a (glikoforyna A), sprzężonych z biotyną, po czym komórki inkubowano 10 minut w 4°C. Następnie dodano przeciwciała monoklonalne przeciwko biotynie sprzężone z kuleczkami magnetycznymi „MicroBeads” i inkubowano je z komórkami 15 minut w 4°C. W kolejnym etapie magnetycznej separacji zawiesinę komórek przepuszczono przez kolumnę LD. Limfocyty CD4⁺ przepływały przez kolumnę LD i zostały zebrane do próbki natomiast wszystkie komórki niebędące limfocytami CD4⁺ pozostały na kolumnie. Czystość wysortowanej populacji limfocytów CD4⁺ sprawdzano, znakując komórki przeciwciałami anty-CD4 (95% \pm 2,7) zgodnie z procedurą firmową (BD Bioscience), pomiaru dokonywano cytometrem przepływowym BD FACS CANTO II.

Limfocyty o fenotypie CD4⁺CD25⁺ wysortowano w procesie separacji pozytywnej — procedura dwustopniowa (Miltenyi Biotec, Stany Zjednoczone). Do subpopulacji limfocytów CD4⁺ dodano kuleczki magnetyczne „MicroBeads” anty-CD25. Po 15-minutowej inkubacji zawiesinę komórek przepuszczano przez kolumnę MS. Limfocyty CD4⁺CD25⁺ opłaszczane kuleczkami magnetycznymi pozostały na kolumnie, skąd były wypłukiwane za pomocą buforu i tłoczka. Limfocyty CD4⁺CD25⁻, które przeszły przez kolumnę, zostały zebrane do oddzielnej próbki. Czystość wysortowanej populacji sprawdzano, znakując komórki przeciwciałami anty-CD4, CD25 (93,8% \pm 2,45) zgodnie z procedurą firmową (BD Bioscience), pomiaru dokonywano cytometrem przepływowym BD FACS CANTO II.

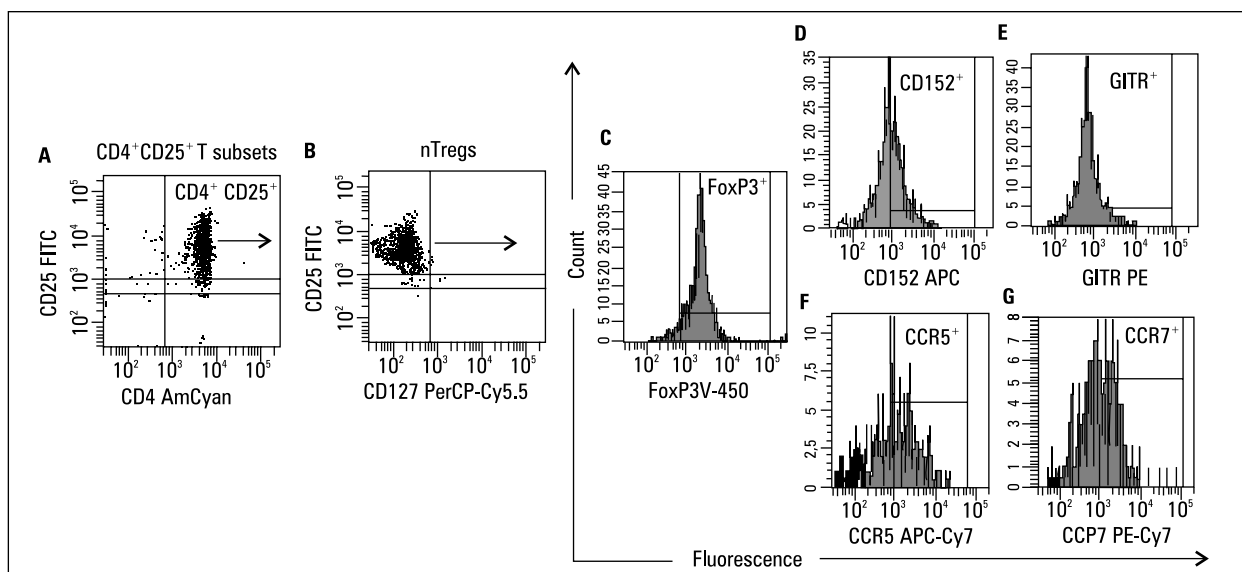
Procedura znakowania komórek

Przeciwciałami monoklonalnymi skierowanymi przeciwko antygenom powierzchniowym CD4, CD25, CD127, GITR, CD152, CCR5, CCR7 w stężeniu zgodnym z procedurą firmową (BD Bioscience) wyznakowano 100 μ l wysortowanych limfocytów. Dobrze wymieszaną zawiesinę komórek inkubowano 20 minut, w ciemności, w temperaturze pokojowej (20–25°C). Następnie komórki utrwalano przez 10 minut odczynnikiem Human FoxP3 Buffer A (BD Pharmingen). W celu zwiększenia przepuszczalności błon komórkowych komórki permeabilizowano buforem C (BD Pharmingen), intensywnie mieszano i inkubowano przez 30 minut w temperaturze pokojowej (20–25°C). Następnie do zawiesiny komórek dodawano przeciwciało anty-FoxP3 w stężeniu zgodnym z procedurą firmową (BD Bioscience). Dobrze wymieszaną zawiesinę wyznakowanych komórek inkubowano 30 minut w ciemności, w temperaturze pokojowej (20–25°C). Do analizy zbierano od 10 000–15 000 limfocytów CD4⁺ i CD4⁺CD25⁺.

Do ustawienia napięć detektorów cytometru wykorzystano BD Cytometer Setup and Tracking Beads (BD Bioscience). Kompensacje dla 8 kolorów wykonano, używając pojedynczo wybarwionej próbki, dla każdego fluorochromu z panelu użytych przeciwciał (tab. 2). Ze względu na równoległe wykorzystanie 8 kanałów cytometru i związanych z tym problemów z wzajemną kompensacją fluorescencji komórek w poszczególnych kanałach, odstąpiono od próby analizy koekspresji markerów GITR, CD152, CCR5, CCR7. Dodatkowo wykonano próbki kontrolne (FMO, *fluorescence minus one*) dla oznaczanych antygenów, ustawiając bramki na wykresach tak, by wszystkie komórki próbki kontrolnej zostały uznane za ujemne. Analizy ekspresji poszczególnych antygenów dokonano przy użyciu oprogramowania FACS DIVA wersja 6.2. Bram-

Tabela 2. Przeciwciała monoklonalne użyte do oceny immunofenotypu subpopulacji naturalnych limfocytów regulatorowych T
Table 2. Monoclonal antibodies used to assess the immunophenotype of natural regulatory T cells

Przeciwciało/Antibody	Fluorochrom/Fluorochrome	Klon/Clone	Producent/Producer
Anty-Human CD4	AmCyan	SK3	BD
Anty-Human CD25	FITC	M-A251	BD Pharmingen
Anty-Human CD127	PerCP-Cy5.5	A019D5	BioLegend
Anty-Human FoxP3	V-450	236A/E7	BD Horizon™
Anty-Human GITR	PE	621	BioLegend
AntyHuman CD152	APC	BNI3	BD Pharmingen
Anty-Human CCR5	APC Cy7	2D7/CCR5	BD Pharmingen
Anty-Human CCR7	PE-Cy7	3D12	BD Pharmingen



Rycina 1. Sposób bramkowania naturalnych limfocytów regulatorowych o immunofenotypie $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}FoxP3^+GITR^+CD152^+CCR5^+CCR7^+$, wysortowanych z krwi obwodowej, przy użyciu 8-kolorowej cytometrii przepływowej. **A.** Ustawienie bramki na subpopulacji limfocytów $CD4^+CD25^{high}$. **B.** Ustawienie bramki na subpopulacji limfocytów $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}$. **C.** Ustawienie bramki na subpopulacji limfocytów nTreg $FoxP3^+$. **D.** Ustawienie bramki na subpopulacji limfocytów nTreg $CD152^+$. **E.** Ustawienie bramki na subpopulacji limfocytów nTreg $GITR^+$. **F.** Ustawienie bramki na subpopulacji limfocytów nTreg $CCR5^+$. **G.** Ustawienie bramki na subpopulacji limfocytów nTreg $CCR7^+$

Figure 1. Gating strategy of natural regulatory T cells $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}FoxP3^+GITR^+CD152^+CCR5^+CCR7^+$ sorting from peripheral blood, by using eight color flow cytometry. **A.** Gate for subsets of $CD4^+CD25^{high}$. **B.** Gate for subsets of $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}$. **C.** Gate for nTreg subsets $FoxP3^+$. **D.** Gate for nTreg subsets $CD152^+$. **E.** Gate for nTreg subsets $GITR^+$. **F.** Gate for nTreg subsets $CCR5^+$. **G.** Gate for nTreg subsets $CCR7^+$

kę dla limfocytów nTreg ustawiono na podstawie immunofenotypu $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}Foxp3^+$, po czym analizowano odsetek komórek z ekspresją antygenów: GITR, CD152, CCR5, CCR7 i średnią intensywność fluorescencji (MFC, *mean fluorescence channel*) (ryc.1).

Uzyskane wyniki badań opracowano statystycznie, korzystając z programu STATISTICA 8.0 PL. Zmienne ilościowe przedstawiono jako medianę, kwartyle górny i dolny, minimum i maksimum. Do porównania dwóch grup niezależnych użyto testu U Manna-Whitneya. Do analizy korelacji obliczano współczynnik rang Spearmana. Za istotne statystycznie uznawano wartości prawdopodobieństwa $p < 0,05$.

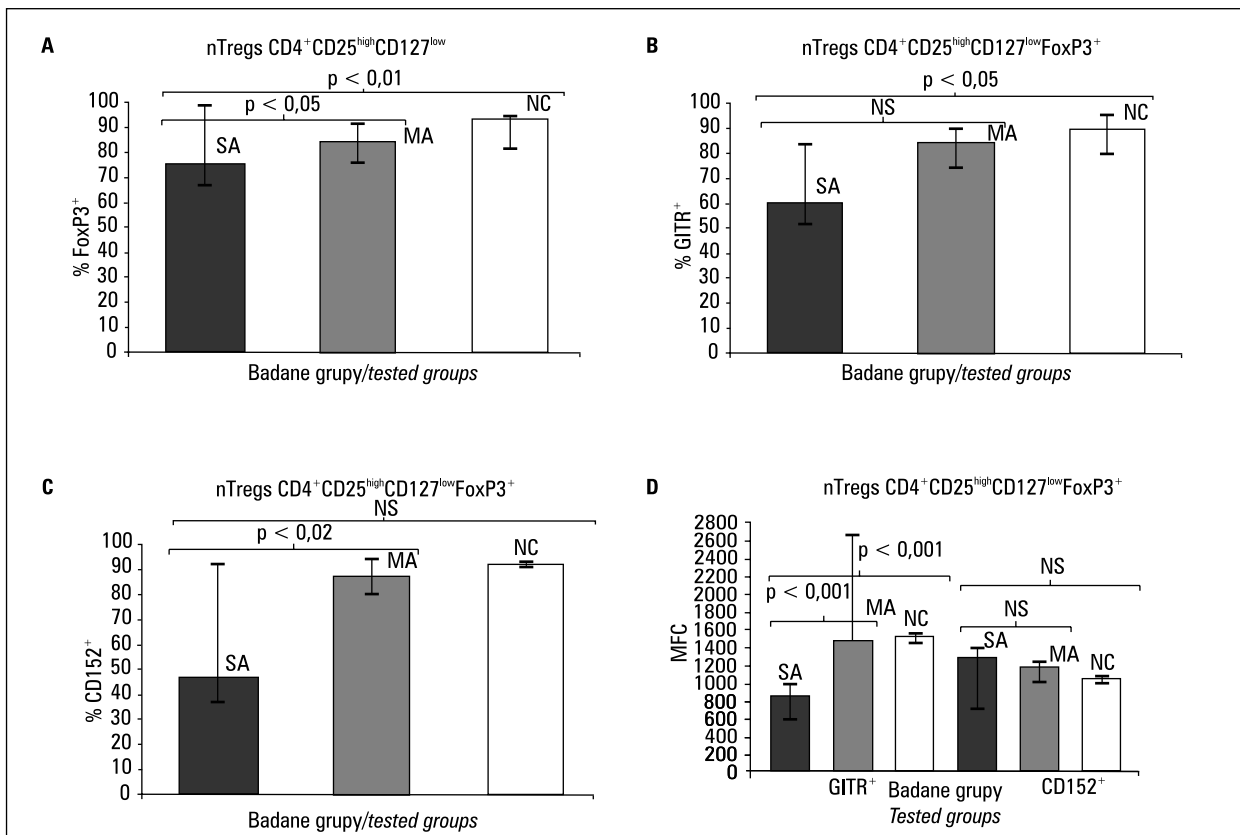
Wyniki

Wykazano, że odsetek naturalnych limfocytów regulatorowych $CD4^+$, jak i ekspresja markerów, które odpowiadają za ich funkcję, są obniżone u chorych na ciężką astmę oskrzelową, w porównaniu z chorymi na astmę umiarkowaną-łagodną i osobami z grupy kontrolnej.

Wykazano statystycznie znamienne obniżenie odsetka limfocytów nTreg o immunofenotypie

$CD4^+CD25^{high}CD127^{low}FoxP3^+$ u chorych na ciężką astmę oskrzelową, w porównaniu z grupą chorych na astmę umiarkowaną-łagodną ($p < 0,05$) i badanymi z grupy kontrolnej ($p < 0,01$) (ryc. 2A, tab. 3). Dodatkowo odsetek limfocytów nTreg $FoxP3^+$ dodatkowo korelował z odsetkiem wartości należytnej FEV1 u chorych na astmę ciężką ($r = 0,53$; $p < 0,05$). Nie wykazano jednak takiej zależności u chorych na astmę umiarkowaną-łagodną. Wykazano brak różnicy w odsetku limfocytów nTreg z ekspresją GITR między chorymi na astmę ciężką a umiarkowaną-łagodną. Statystycznie znamiennej różnicy w ekspresji GITR zaobserwowano jedynie między grupą chorych na astmę ciężką a grupą kontrolną ($p < 0,05$) (ryc. 2B, tab. 3). Wykazano statystycznie znamiennej różnicy w odsetku komórek nTreg z ekspresją antygeny CD152 między grupą chorych na astmę ciężką a umiarkowaną-łagodną ($p < 0,05$). Nie stwierdzono natomiast różnicy w ekspresji CD152 między chorymi na astmę ciężką a grupą kontrolną (ryc. 2C, tab. 3).

Wykazano znamiennej niższą intensywność fluorescencji (MFC) dla receptora GITR u chorych na astmę ciężką, w porównaniu z chorymi na astmę umiarkowaną-łagodną i osobami z grupy kontrolnej (ryc. 2D, tab. 3). Nie stwierdzono natomiast



Rycina 2. Porównanie odsetka naturalnych limfocytów regulatorowych CD4⁺CD25⁺CD127^{low}FoxP3⁺ i ekspresji markerów czynnościowych GITR, CD152 na limfocytach nTreg oraz wskaźnika średniej intensywności fluorescencji (MFC) dla GITR i CD152 u chorych na astmę ciężką (SA), umiarkowaną–łagodną (MA) i w grupie kontrolnej (NC)

Figure 2. Comparison of the percentage natural regulatory T lymphocytes, CD4⁺CD25⁺CD127^{low}FoxP3⁺ and expression of antigens GITR, CD152 on nTregs and Mean Fluorescence Channel (MFC) for GITR and CD152 on nTregs in patients with severe asthma (SA), mild-moderate (MA) and the control group (NC)

różnicy w intensywności fluorescencji dla CD152 między badanymi grupami (ryc. 2D, tab. 3).

Analizując ekspresję receptorów chemokinowych CCR5 i CCR7 na limfocytach nTreg wysortowanych z krwi obwodowej, nie stwierdzono znamiennej różnicy pomiędzy badanymi grupami (ryc. 3A, tab.4).

Nie wykazano także statystycznie istotnej różnicy w intensywności fluorescencji (MFC) dla receptorów CCR5 i CCR7 na limfocytach nTreg oraz między grupą chorych na astmę ciężką i umiarkowaną–łagodną (ryc. 3B, tab. 4). Stwierdzono natomiast znamienne niższą intensywności fluorescencji dla receptorów CCR5 (p < 0,001) i CCR7 (p < 0,05) na limfocytach nTreg pomiędzy chorymi na astmę ciężką a grupą kontrolną (ryc. 3B, tab. 4).

Poddano także analizie ekspresję receptorów chemokinowych na limfocytach efektorowych. Stwierdzono że odsetek komórek CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺CCR5⁺ jest znamienne wyższy u chorych na astmę ciężką, w porównaniu z pozostałymi grupami (p < 0,01) (ryc. 4A, tab. 5). Nie zaobserwowano natomiast znamiennej statystycznie różnicy w odsetku lim-

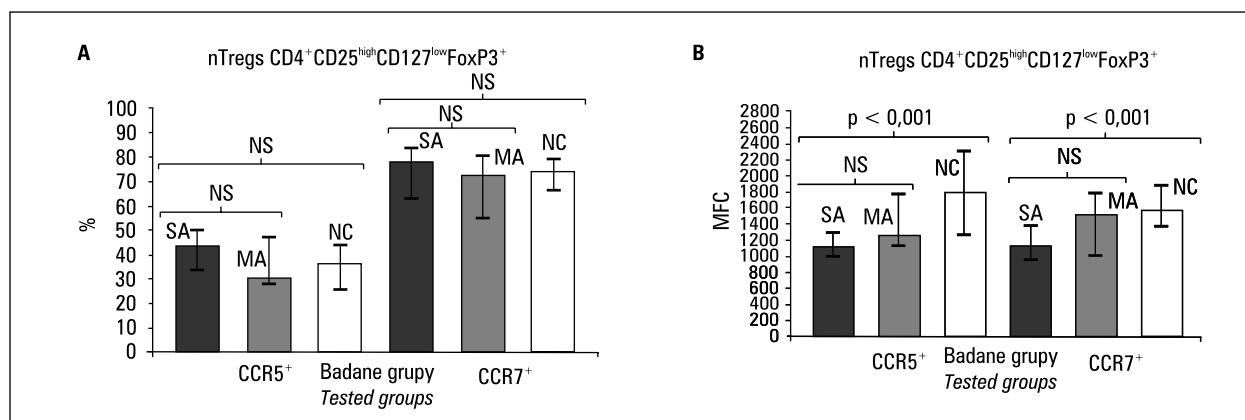
focytów CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺CCR7⁺ pomiędzy badanymi grupami (ryc. 4A, tab. 5). Nie wykazano także statystycznie istotnej różnicy w intensywności fluorescencji (MFC) dla receptorów CCR5 i CCR7 na limfocytach Teff między grupą chorych na astmę ciężką i umiarkowaną–łagodną (ryc. 4B, tab. 5). Dowiedziono natomiast znamienne niższej intensywności fluorescencji dla receptorów CCR5 (p < 0,001) i CCR7 (p < 0,05) na limfocytach Teff pomiędzy chorymi na astmę ciężką a grupą kontrolną (ryc. 4B, tab. 5).

Stwierdzono, że obliczony współczynnik nTregCCR5⁺/TeffCCR5⁺ jest znamienne obniżony u chorych na astmę ciężką, w porównaniu z chorymi na astmę umiarkowaną–łagodną i osobami z grupy kontrolnej (p < 0,001) (ryc. 5A, tab. 6). Nie zaobserwowano znamienych różnic między badanymi grupami dla współczynników nTreg/Teff i nTregCCR7⁺/TeffCCR7⁺ (ryc. 5B, tab. 6). Nie stwierdzono także znamienych statystycznie różnic w wyliczonych wskaźnikach MFC nTregCCR5⁺/MFC TeffCCR5⁺ i MFC nTregCCR7⁺/MFC TeffCCR7⁺ między badanymi grupami (ryc. 5A i 5B, tab. 6).

Tabela 3. Zmienne (mediana, dolny i górny kwartył, minimum i maksimum) opisujące odsetek naturalnych limfocytów regulatorowych T CD4⁺, ekspresję ich markerów czynnościowych GITR, CD152 oraz wskaźnik średniej intensywności fluorescencji (MFC) GITR, CD152 na limfocytach nTreg

Table 3. Variable (median, lower and upper quartile, minimum and maximum) describing the percentage of natural T regulatory cells CD4⁺, expression their markers GITR, CD152 and mean fluorescence intensity (MFC) for GITR, CD152, on nTregs

nTreg	Charakterystyki liczbowe <i>Numerical characteristics</i>	Astma ciężka <i>Severe asthma</i>	Astma umiarkowana–łagodna <i>Mild–moderate asthma</i>	Grupa kontrolna <i>Control group</i>
% CD4 ⁺ CD25 ^{high} CD127 ^{low} FoxP3 ⁺	Mediana/ <i>Median</i>	76,0	85,5	93,6
	Dolny i górny kwartył <i>Lower and upper quartile</i>	57,5–81,7	78,9–93,1	84,4–95,7
	Min.–Maks./ <i>Min–Max</i>	24,7–96,2	63,2–98,1	59,0–96,6
% CD4 ⁺ CD25 ^{high} CD127 ^{low} FoxP3 ⁺ GITR ⁺	Mediana/ <i>Median</i>	60,1	83,9	89,0
	Dolny i górny kwartył <i>Lower and upper quartile</i>	51,4–83,1	74,3–90,5	77,1–90,1
	Min.–Maks./ <i>Min–Max</i>	21,1–95,5	43,6–95,6	70,3–93,2
% CD4 ⁺ CD25 ^{high} CD127 ^{low} FoxP3 ⁺ CD152 ⁺	Mediana/ <i>Median</i>	46,2	86,7	91,4
	Dolny i górny kwartył <i>Lower and upper quartile</i>	36,5–92,2	79,5–93,6	88,4–91,5
	Min.–Maks./ <i>Min–Max</i>	23,8–96,6	67,7–95,1	75,9–92,1
MFC nTreg GITR ⁺	Mediana/ <i>Median</i>	830	1470	1508
	Dolny i górny kwartył <i>Lower and upper quartile</i>	570–990	612–2664	1445–1535
	Min.–Maks./ <i>Min–Max</i>	519–2734	590–3720	760–1754
MFC nTreg CD152 ⁺	Mediana/ <i>Median</i>	1274	1166	1040
	Dolny i górny kwartył <i>Lower and upper quartile</i>	700–1400	990–1230	987–1060
	Min.–Maks./ <i>Min–Max</i>	500–1470	847–1290	880–1093



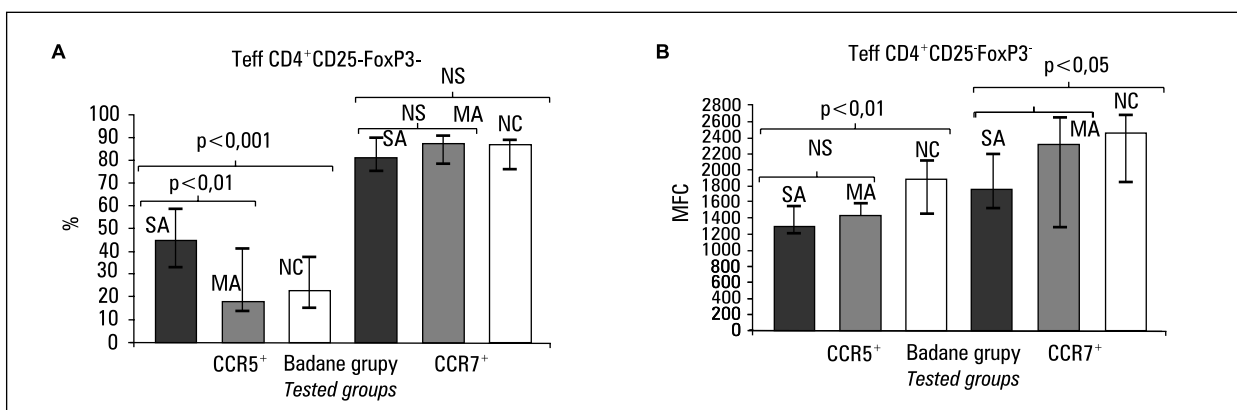
Rycina 3. Porównanie odsetka limfocytów nTreg z ekspresją receptorów chemokinowych CCR5 i CCR7 oraz wskaźnika średniej intensywności fluorescencji (MFC) dla CCR5 i CCR7 u chorych na astmę ciężką (SA), umiarkowaną–łagodną (MA) i w grupie kontrolnej (NC)

Figure 3. Comparison of the percentage nTreg cells expressing the chemokine receptors CCR5 and CCR7 and Mean Fluorescence Channel (MFC) for CCR5 and CCR7 in patients with severe asthma (SA), mild-moderate (MA) and the control group (NC)

Tabela 4. Zmienne (mediana, dolny i górny kwartył, minimum, maksimum) opisujące odsetek limfocytów nTreg z ekspresją receptorów chemokinowych CCR5 i CCR7 oraz wskaźnik średniej intensywności fluorescencji (MFC) dla CCR5 i CCR7 na limfocytach nTreg

Table 4. Variable (median, lower and upper quartile, minimum, maximum) describing percentage of nTreg cells expressing chemokine receptors CCR5 and CCR7 mean fluorescence intensity (MFC) for CCR5 and CCR7 on nTregs

nTreg	Charakterystyki liczbowe <i>Numerical characteristics</i>	Astma ciężka <i>Severe asthma</i>	Astma umiarkowana– łagodna <i>Mild–moderate asthma</i>	Grupa kontrolna <i>Control group</i>
% CD4 ⁺ CD25 ^{high} CD127 ^{low} FoxP3 ⁺ CCR5 ⁺	Mediana/ <i>Median</i> Dolny i górny kwartył <i>Lower and upper quartile</i> Min.–Maks./ <i>Min–Max</i>	43,5 33,3–50,0 13,5–85,5	30,3 27,9–47,9 10,0–88,9	36,8 26,0–44,3 20,0–76,7
% CD4 ⁺ CD25 ^{high} CD127 ^{low} FoxP3 ⁺ CCR7 ⁺	Mediana/ <i>Median</i> Dolny i górny kwartył <i>Lower and upper quartile</i> Min.–Maks./ <i>Min–Max</i>	78,9 63,3–84,0 37,7–87,1	72,5 54,7–81,6 40,2–92,9	74,5 66,7–79,6 50,0–98,0
MFC nTreg CCR5 ⁺	Mediana/ <i>Median</i> Dolny i górny kwartył <i>Lower and upper quartile</i> Min.–Maks./ <i>Min–Max</i>	1120 1015–1306 864–1842	1262 1124–1788 758–2629	1812 1261–2350 962–3694
MFC nTreg CCR7 ⁺	Mediana/ <i>Median</i> Dolny i górny kwartył <i>Lower and upper quartile</i> Min.–Maks./ <i>Min–Max</i>	1130 957–1381 708–1724	1519 1002–1797 688–2199	1576 1387–1876 1106–2898



Rycina 4. Porównanie odsetka limfocytów T CD4⁺ efektorowych z ekspresją receptorów chemokinowych CCR5 i CCR7 oraz wskaźnika średniej intensywności fluorescencji (MFC) dla CCR5 i CCR7 u chorych na astmę ciężką (SA), umiarkowaną–łagodną (MA) i w grupie kontrolnej (NC)

Figure 4. Comparison of the percentage T CD4⁺ effector lymphocytes expressing the chemokine receptors CCR5 and CCR7 and Mean Fluorescence Channel (MFC) for CCR5 and CCR7 in patients with severe asthma (SA), mild-moderate (MA) and the control group (NC)

Dyskusja

Pomimo licznych prac nad udziałem limfocytów nTreg w patogenezie wielu chorób, nie ma badań charakteryzujących subpopulację o immunofenotypie CD4⁺CD25^{high}CD127^{low}FoxP3⁺GITR⁺CD152⁺CCR5⁺CCR7⁺ w ciężkiej astmie oskrzelo-

wej. Wyniki zaprezentowanych badań wykazały użyteczność wielokolorowej cytometrii przepływową w charakterystyce immunofenotypu CD4⁺CD25^{high}CD127^{low}FoxP3⁺GITR⁺CD152⁺CCR5⁺CCR7⁺ komórek nTreg. Wykazany obniżony odsetek limfocytów nTreg, jak i zmniejszona ekspresja markerów, które odpowiadają za ich

Tabela 5. Zmienne (mediana, dolny i górny kwartył, minimum, maksimum) opisujące odsetek limfocytów efektorowych T CD4⁺ z ekspresją receptorów chemokinowych CCR5 i CCR7 oraz wskaźnik średniej intensywności fluorescencji (MFC) dla CCR5 i CCR7 na limfocytach efektorowych T CD4⁺

Table 5. Variable (median, lower and upper quartile, minimum, maximum) describing percentage of effector lymphocytes T CD4⁺ with expression chemokine receptors CCR5 and CCR7 and mean fluorescence intensity (MFC) for CCR5 and CCR7 on effector lymphocytes T CD4⁺

Teff	Charakterystyki liczbowe <i>Numerical characteristics</i>	Astma ciężka <i>Severe asthma</i>	Astma umiarkowana– łagodna <i>Mild–moderate asthma</i>	Grupa kontrolna <i>Control group</i>
CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ CCR5 ⁺	Mediana/ <i>Median</i>	44,9	17,8	22,6
	Dolny i górny kwartył <i>Lower and upper quartile</i>	33,0–59,1	13,0–41,8	15,2–37,8
	Min.–Maks./ <i>Min–Max</i>	13,8–72,8	11,2–57,5	8,6–48,7
CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ CCR7 ⁺	Mediana/ <i>Median</i>	81,3	87,1	86,8
	Dolny i górny kwartył <i>Lower and upper quartile</i>	75,7–90,2	78,6–90,9	76,1–89,5
	Min.–Maks./ <i>Min–Max</i>	66,8–94,9	65,2–94,9	63,4–96,2
MFC Teff CCR5 ⁺	Mediana/ <i>Median</i>	1293	1424	1869
	Dolny i górny kwartył <i>Lower and upper quartile</i>	1203–1545	1135–1576	1456–2098
	Min.–Maks./ <i>Min–Max</i>	1013–2301	899–2547	1043–3523
MFC Teff CCR7 ⁺	Mediana	1759	2313	2454
	Dolny i górny kwartył <i>Lower and upper quartile</i>	1505–2198	1273–2649	1824–2654
	Min.–Maks./ <i>Min–Max</i>	1061–3888	1005–3791	1484–3293

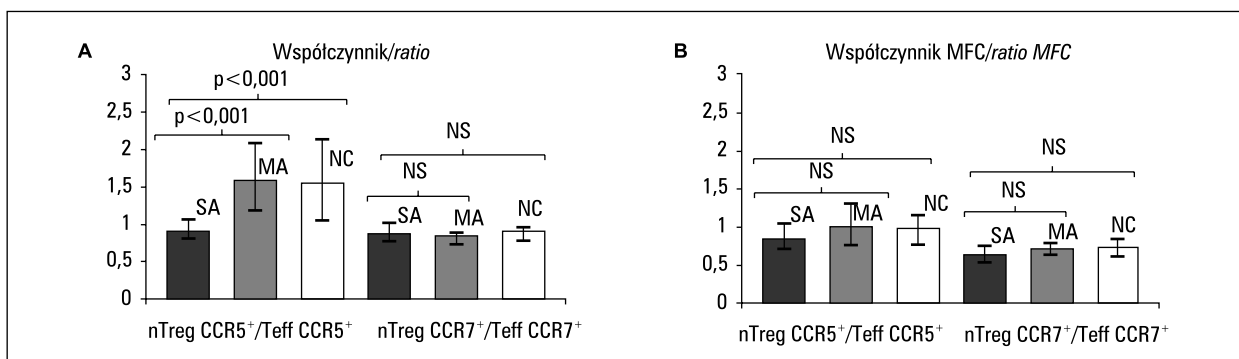
funkcję GITR⁺, CD152⁺, może wskazywać na zaburzony mechanizm działania tych komórek u chorych na astmę ciężką. Wyniki badań innych autorów są często sprzeczne, co może być spowodowane różnicami w doborze grup badanych, występowaniem różnych fenotypów astmy — zwłaszcza ciężkiej jej postaci — a także w metodyce badań. Należy podkreślić, że nie wszyscy badacze oznaczali ekspresję czynnika transkrypcyjnego FoxP3. Uważa się, że brak oceny ekspresji FoxP3, strategicznego markera charakteryzującego limfocyty nTreg, ogranicza jednoznaczny identyfikację i rozdzielenie tej subpopulacji od limfocytów efektorowych.

W przeprowadzonych przez Shi i wsp. badaniach na wysortowanych limfocytach CD4⁺CD25⁺ nie wykazano różnicy w liczbie naturalnych limfocytów regulatorowych we krwi obwodowej, w grupie chorych na astmę i wśród osób zdrowych. Zaobserwowano natomiast wzrost liczby limfocytów nTreg w zaostrzeniach choroby. U chorych na astmę, ze stabilną postacią choroby, liczba limfocytów Treg nie uległa istotnym zmianom i komórki te wykazywały zdolność do supresji proliferacji limfocytów T efektorowych oraz do hamowania produkcji cytokin przez limfocyty Th1 i Th2.

W badaniach tych nie oznaczano jednak w limfocytach nTreg obecności czynnika transkrypcyjnego FoxP3 [13].

Xue i wsp wykazali natomiast obniżenie odsetka limfocytów nTreg i ekspresji mRNA dla genu FoxP3 w limfocytach nTreg u chorych na astmę, zwłaszcza w okresie zaostrzenia choroby [14]. Podobne wyniki uzyskali Mamessier i wsp., którzy również zaobserwowali obniżenie odsetka limfocytów Treg podczas nasilenia choroby [15].

Wielu badaczy podkreśla rolę także innych cząsteczek, które są potrzebne do pełnienia funkcji przez limfocyty nTreg, nie tylko FoxP3. Cząsteczka CD152 (CTLA-4) działa jako negatywny regulator odpowiedzi immunologicznej. Wyniki badań u pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów potwierdzają, że nieprawidłowa ekspresja CD152 jest przyczyną zaburzenia supresyjnej funkcji limfocytów Treg [16, 17]. Ważne znaczenie w działaniu supresyjnym komórek nTreg odgrywa także transbłonowe białko typu I należące do rodziny receptorów TNF (GITR), które konstytutywnie występuje na powierzchni limfocytów nTreg [18]. O roli tego receptora mogą świadczyć badania przeprowadzone na hodowlach ludzkich lim-



Rycina.5. Porównanie współczynników ekspresji receptorów CCR5⁺ i CCR7⁺ naturalnych limfocytów regulatorowych do ekspresji receptorów CCR5⁺ i CCR7⁺ limfocytów efektorowych. Porównanie współczynników średniej intensywności fluorescencji (MFC) dla receptorów chemokinowych CCR5 i CCR7 na limfocytach nTreg do średniej intensywności fluorescencji (MFC) CCR5 i CCR7 na limfocytach T CD4⁺ efektorowych

Figure 5. Comparison of the coefficients for natural regulatory cells expressing the chemokine receptors CCR5⁺ and CCR7⁺ to effector lymphocytes expressing the receptors CCR5⁺ and CCR7⁺. Comparison coefficients mean fluorescence intensity (MFC) for the chemokine receptors CCR5 and CCR7 on nTregs to mean fluorescence intensity (MFC) for CCR5 and CCR7 on T CD4⁺ effector lymphocytes

Tabela 6. Zmienne (mediana, dolny i górny kwartyl, minimum i maksimum) opisujące współczynniki ekspresji receptorów CCR5⁺ i CCR7⁺ naturalnych limfocytów regulatorowych do ekspresji receptorów CCR5⁺ i CCR7⁺ limfocytów efektorowych. Współczynniki średniej intensywności fluorescencji (MFC) dla receptorów chemokinowych CCR5 i CCR7 na limfocytach nTreg do średniej intensywności fluorescencji (MFC) CCR5 i CCR7 na limfocytach T CD4⁺ efektorowych

Table 6. Variable (median, lower and upper quartile, minimum and maximum) describing coefficients for natural regulatory cells expressing the chemokine receptors CCR5⁺ and CCR7⁺ to T CD4⁺ effector lymphocytes expressing the receptors CCR5⁺ and CCR7⁺. Mean fluorescence intensity (MFC) for the chemokine receptors CCR5 and CCR7 on nTregs to mean fluorescence intensity (MFC) for CCR5 and CCR7 on T CD4⁺ effector lymphocytes

Współczynnik Coefficient	Charakterystyki liczbowe Numerical characteristics	Astma ciężka Severe asthma	Astma umiarkowana– łagodna Mild–moderate asthma	Grupa kontrolna Control group
nTreg/Teff	Mediana/Median	0,12	0,11	0,11
	Dolny i górny kwartyl Lower and upper quartile	0,09–0,14	0,09–0,12	0,07–0,13
	Min.–Maks./Min–Max	0,05–0,27	0,06–0,2	0,03–0,18
nTreg CCR5 ⁺ /Teff CCR5 ⁺	Mediana/Median	0,91	1,58	1,55
	Dolny i górny kwartyl Lower and upper quartile	0,81–1,08	1,17–2,1	1,05–2,14
	Min.–Maks./Min–Max	0,61–1,62	0,63–3,07	0,55–3,01
nTreg CCR7 ⁺ /Teff CCR7 ⁺	Mediana/Median	0,87	0,85	0,91
	Dolny i górny kwartyl Lower and upper quartile	0,77–1,02	0,74–0,9	0,77–0,95
	Min.–Maks./Min–Max	0,49–1,24	0,5–1,08	0,67–1,15
MFC nTregCCR5 ⁺ /MFC Teff CCR5 ⁺	Mediana/Median	0,84	0,99	0,98
	Dolny i górny kwartyl Lower and upper quartile	0,69–1,04	0,75–1,29	0,75–1,15
	Min.–Maks./Min–Max	0,58–1,16	0,48–1,90	0,55–2,42
MFC nTreg CCR7 ⁺ /MFC Teff CCR7 ⁺	Mediana/Median	0,63	0,70	0,72
	Dolny i górny kwartyl Lower and upper quartile	0,54–0,75	0,62–0,79	0,61–0,85
	Min.–Maks./Min–Max	0,41–0,88	0,54–0,84	0,53–1,11

focytów, do których dodano przeciwciała blokujące cząstkę GITR, co spowodowało obniżenie zdolności supresyjnych komórek Treg. W zaprezentowanych badaniach wykazano, że limfocyty nTreg charakteryzują się niższą ekspresją CD152 u chorych astmę ciężką. Zmiany takiej nie zaobserwowano natomiast w ekspresji GITR. Zhang i wsp. wykazali, że u chorych na astmę limfocyty nTreg charakteryzują się ekspresją CD152, GITR, TLR4 (*toll-like receptor 4*), LAP/TGF- β 1 (*latency-associated peptide*) i FoxP3 [19]. Nie stwierdzono jednak znamiennych różnic w odsetku limfocytów nTreg FoxP3⁺ i ekspresji CD152⁺ i GITR⁺ między pacjentami z ostrą i stabilną postacią astmy a grupą kontrolną [19].

Uważa się, że dysfunkcja limfocytów nTreg może prowadzić do rozwoju cięższej postaci astmy. Wyniki przedstawionych badań są zgodne z tą koncepcją, czego dowodem jest wykazana współzależność między odsetkiem limfocytów nTreg FoxP3⁺ a odsetkiem wartości należnej FEV1 u chorych na astmę ciężką. W zaprezentowanych badaniach dowiedziono, że wraz ze wzrostem odsetka komórek nTreg wzrasta natężona pojemność jednostekowa. Oznacza to, że u pacjentów z ciężką postacią choroby zwiększenie liczby komórek nTreg może wpłynąć na poprawę stanu klinicznego.

Tak jak wspomniano we wstępie, aby pełnić swoją funkcję, limfocyty nTreg muszą się przemieszczać, a do tego niezbędne są receptory chemokinowe. Wiadomo, że aktywowane limfocyty pomocnicze Th1, cytotoksyczne Tc1, regulatorowe T wykazują ekspresję receptora chemokinowego CCR5. Sugeruje się, że receptor CCR5 pośredniczy w migracji komórek efektorowych do miejsca zapalenia i z jednej strony może odgrywać rolę prozapalną, z drugiej, gdy występuje na powierzchni limfocytów regulatorowych, może odgrywać rolę przeciwzapalną [20]. Prozapalną funkcję tego receptora potwierdzają badania, w których wykazano ekspresję CCR5 na limfocytach T efektorowych, w błonie maziowej u pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów, a także w ośrodkowym układzie nerwowym u myszy z doświadczalnym autoimmunizacyjnym zapaleniem mózgu i rdzenia kręgowego (EAE, *experimental autoimmune encephalomyelitis*) [21, 22]. Stwierdzono także, że receptor CCR5 uczestniczy w migracji limfocytów T do wysp trzustkowych i jego ekspresja koreluje z ciężkością cukrzycy w zwierzęcym modelu doświadczalnym [23]. Wykazano również, że brak ekspresji CCR5 upośledza migrację limfocytów efektorowych do miejsc infekcji wirusowych i pasożytniczych (*Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondii*) [24–26].

Dowodów na przeciwzapalną rolę receptora chemokinowego CCR5 dostarczają badania, w których wykazano, że jego brak jest związany z naciekaniami tkanek gospodarza przez alloreaktywne limfocyty T, które działają cytotoksycznie. W badaniach na myszach wykazano, że limfocyty regulatorowe CD4⁺CD25⁺ pozbawione receptora CCR5 na swej powierzchni są mniej efektywne w zapobieganiu reakcji immunologicznej spowodowanej chorobą przeszczep przeciwko gospodarzowi (GVHD) [7]. Kallikourdis i wsp. wykazali natomiast, że limfocyty regulatorowe można podzielić na dwie subpopulacje: o silnych (CCR5⁺) i słabych (CCR5⁻) właściwościach supresyjnych. Na podstawie uzyskanych wyników badacze stwierdzili, że limfocyty regulatorowe pozbawione receptora CCR5 charakteryzują się mniejszą efektywnością w utrzymaniu tolerancji immunologicznej między matką a płodem. Wyniki te sugerują, że limfocyty Treg CCR5⁺ mogą stanowić subpopulację efektorową limfocytów regulatorowych [27]. Wydaje się, że brak równowagi pomiędzy dwoma subpopulacjami limfocytów Treg CCR5⁺ o właściwościach przeciwzapalnych i Teff CCR5⁺ o właściwościach prozapalnych wpływa na nasilenie procesu zapalnego. Potwierdzeniem tego faktu mogą być wyniki przedstawionych badań. Zaobserwowane przez autorów niniejszej pracy obniżenie współczynnika limfocytów nTreg CCR5⁺ do Teff CCR5⁺, jak i zwiększony odsetek limfocytów efektorowych z ekspresją CCR5, może sugerować zaburzenie równowagi immunologicznej pomiędzy tymi subpopulacjami w astmie o ciężkim przebiegu. Wyniki zaprezentowanych badań sugerują także przewagę prozapalnej funkcji tego receptora, co może skutkować nasileniem reakcji zapalnej i rozwojem cięższej postaci astmy. W pracy Casasa i wsp. wykazano, że ekspresja receptora CCR5 na limfocytach CD4, była podobna zarówno u pacjentów z alergią, jak i w grupie kontrolnej [28].

Wiadomo, że receptor chemokinowy CCR7 spełnia ważną rolę w inicjacji nabytej odpowiedzi immunologicznej, pośredniczy bowiem w migracji limfocytów T dziewiczych i regulatorowych do wtórnych narządów limfatycznych. Sugeruje się jednak, że receptor CCR7 może mieć także znaczenie w regulacji odpowiedzi immunologicznej [29]. Wykazano, że brak ekspresji receptora CCR7 na limfocytach nTreg jest przyczyną nadmiernego nasilenia odpowiedzi immunologicznej, co jest spowodowane defektem w przemieszczaniu się tych komórek do węzłów chłonnych, a w konsekwencji uniemożliwia ich działanie w miejscu zapalnym [6]. W zaprezentowanych badaniach nie wykazano różnic między analizowanymi grupami

w odsetku limfocytów nTreg CCR7⁺ i współczynnika nTreg CCR7⁺ do Teff CCR7⁺, co sugeruje, że u pacjentów z ciężką astmą oskrzelową migracja limfocytów nTreg do wtórnych narządów limfaticznych nie powinna być zaburzona na poziomie komórkowym.

Dane z piśmiennictwa wskazują na immunoregulacyjną rolę receptorów CCR5 i CCR7, toteż ich zmniejszona liczba na powierzchni limfocytów regulatorowych i efektorowych może osłabiać migrację, natomiast zwiększona liczba — nasilać migrację tych komórek do miejsc, gdzie trwa odpowiedź immunologiczna. Wykazana w przedstawionych badaniach niższa intensywność fluorescencji (MFC) dla receptorów chemokinowych na limfocytach nTreg i Teff u chorych na ciężką astmę może wskazywać pośrednio na zmniejszoną gęstość tych receptorów na ich powierzchni. Mniejsza liczba receptorów prowadzi do słabszej odpowiedzi tych komórek na agonistów receptorów chemokinowych, a co z tego wynika — do mniejszej zdolności przemieszczania się tych komórek do miejsc objętych reakcją zapalną.

Oceniana ekspresja charakterystycznych markerów czynnościowych i receptorów chemokinowych subpopulacji naturalnych limfocytów regulatorowych u chorych na ciężką i umiarkowaną łagodną astmę przy użyciu wielokolorowej cytometrii przepływowej pozwoliła na potwierdzenie, że jest to optymalna metoda do scharakteryzowania komórek nTreg i oddzielenia ich od limfocytów efektorowych. Stwierdzony obniżony odsetek limfocytów nTreg o immunofenotypie CD4⁺CD25^{hi}CD127^{low}FoxP3⁺GITR⁺ oraz zaburzenie równowagi immunologicznej pomiędzy subpopulacjami limfocytów regulatorowych i efektorowych z ekspresją receptora chemokinowego CCR5 mogą potwierdzać ich dysfunkcję. Nie można także wykluczyć deplecji subpopulacji indukowanych limfocytów regulatorowych i zmniejszonej ekspresji markerów, które odpowiadają za ich funkcję u chorych na astmę.

Wnioski

1. Wielokolorowa cytometria przepływowa umożliwia jednoznaczny identyfikację limfocytów nTreg poprzez ocenę wielu markerów, w tym czynnika transkrypcyjnego FoxP3, co pozwala na oddzielenie naturalnych limfocytów regulatorowych od efektorowych.

2. Istnieją różnice fenotypowe między grupą chorych na astmę ciężką i umiarkowaną łagodną polegające na obniżeniu ekspresji markerów czynnościowych subpopulacji limfocytów nTreg, co może potwierdzić ich dysfunkcję.

3. FoxP3, CD152 i CCR5 mogą się stać markarami efektywności leczenia, zwłaszcza ciężkich postaci astmy. Wyniki przedstawionych badań sugerują, że indukcja limfocytów nTreg z wysoką ekspresją FoxP3 i aktywnością supresyjną stwarza nowe możliwości terapeutyczne, zwłaszcza w ciężkiej astmie.

Konflikt interesów

Autorzy nie zgłaszają konfliktu interesów.

Piśmiennictwo

- Bateman E.D., Hurd S.S., Barnes P.J. i wsp. Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary. *Eur. Respir. J.* 2008; 31: 143–178.
- Holgate S.T., Holloway J., Wilson S. i wsp. Understanding the pathophysiology of severe asthma to generate new therapeutic opportunities. *J. Allergy. Clin. Immunol.* 2006; 117: 496–506.
- Sakaguchi S., Wing K., Yamaguchi T. Dynamics of peripheral tolerance and immune regulation mediated by Treg. *Eur. J. Immunol.* 2009; 39: 2331–2336.
- Sakaguchi S., Yamaguchi T., Nomura T. i wsp. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 2008; 133: 775–787.
- Huehn J., Hamann A. Homing to suppress: address codes for Treg migration. *Trends. Immunol.* 2005; 26: 632–636.
- Schneider M.A., Meingassner J.G., Lipp M. i wsp. CCR7 is required for the in vivo function of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells. *J. Exp. Med.* 2007; 204: 735–745.
- Wysocki C.A., Jiang Q., Panoskaltis-Mortari A. i wsp. Critical role for CCR5 in the function of donor CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells during acute graft-versus-host disease. *Blood* 2005; 106: 3300–3307.
- Seddiki N., Santner-Nanan B., Martinson J. i wsp. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J. Exp. Med.* 2006; 203: 1693–1700.
- van Oosterhout A.J., Bloksma N. Regulatory T-lymphocytes in asthma. *Eur. Respir. J.* 2005; 26: 918–932.
- Seroogy C.M., Gern J.E. The role of T regulatory cells in asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2005; 116: 996–999.
- 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: 470–477.
- Kuprys-Lipinska I., Elgalal A., Kuna P. Skin prick test with inhaled allergens in the general population of Lodz province. *Pneumonol. Alergol. Pol.* 2009; 77: 229–234.
- Shi H.Z., Qin X.J.: CD4CD25 regulatory T lymphocytes in allergy and asthma. *Allergy* 2005; 60: 986–995.
- Xue K., Zhou Y., Xiong S. i wsp. Analysis of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells and Foxp3 mRNA in the peripheral blood of patients with asthma. *J. Huazhong. Univ. Sci. Technolog. Med. Sci.* 2007; 27: 31–33.
- Mamessier E., Milhe F., Guillot C. i wsp. T-cell activation in occupational asthma and rhinitis. *Allergy* 2007; 62: 162–169.
- Ehrenstein M.R., Evans J.G., Singh A. i wsp. Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFalpha therapy. *J. Exp. Med.* 2004; 200: 277–285.
- Flores-Borja F., Jury EC., Mauri C. i wsp. Defects in CTLA-4 are associated with abnormal regulatory T cell function in rheumatoid arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2008; 105: 19396–19401.
- Motta A.C., Vissers J.L., Gras R. i wsp. GITR signaling potentiates airway hyperresponsiveness by enhancing Th2 cell activity in a mouse model of asthma. *Respir. Res.* 2009; 10: 93.
- Zhang Q., Qian F.H., Liu H. i wsp. Expression of surface markers on peripheral CD4⁺CD25^{high} T cells in patients with atopic asthma: role of inhaled corticosteroid. *Chin. Med. J.* 2008; 121: 205–212.
- D'Ambrosio D., Panina-Bordignon P., Sinigaglia F. Chemokine receptors in inflammation: an overview. *J. Immunol. Methods.* 2003; 273: 3–13.
- Bagaeva L.V., Williams L.P., Segal B.M. IL-12 dependent/IFN gamma independent expression of CCR5 by myelin-reactive T

- cells correlates with encephalitogenicity. *J. Neuroimmunol.* 2003; 137: 109–116.
22. Wang CR., Liu MF. Regulation of CCR5 expression and MIP-1alpha production in CD4+ T cells from patients with rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Immunol.* 2003; 132: 371–378.
 23. Carvalho-Pinto C., Garcia MI., Gomez L. i wsp. Leukocyte attraction through the CCR5 receptor controls progress from insulinitis to diabetes in non-obese diabetic mice. *Eur. J. Immunol.* 2004; 34: 548–557.
 24. Glass W.G., Lane T.E. Functional expression of chemokine receptor CCR5 on CD4(+) T cells during virus-induced central nervous system disease. *J. Virol.* 2003; 77: 191–198.
 25. Luangsay S., Kasper L.H., Rachinel N. i wsp. CCR5 mediates specific migration of *Toxoplasma gondii*-primed CD8 lymphocytes to inflammatory intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 2003; 125: 491–500.
 26. Machado F.S., Koyama N.S., Carregaro V. i wsp. CCR5 plays a critical role in the development of myocarditis and host protection in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *J. Infect. Dis.* 2005; 191: 627–636.
 27. Kallikourdis M., Andersen K.G., Welch K.A. i wsp. Alloantigen-enhanced accumulation of CCR5+ «effector» regulatory T cells in the gravid uterus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2007; 104: 594–599.
 28. Casas R., Lindau C., Zetterstrom O. i wsp. Downregulation of CXCR6 and CXCR3 in lymphocytes from birch-allergic patients. *Scand. J. Immunol.* 2008; 68: 351–361.
 29. Worbs T., Forster R. A key role for CCR7 in establishing central and peripheral tolerance. *Trends. Immunol.* 2007; 28: 274–280.