

Fenotyp makrofagów w płwocinie indukowanej u chorych na astmę.

Macrophage phenotype in induced sputum in asthma subjects.

Joanna Hermanowicz-Salamon, Joanna Domagała-Kulawik,
Marta Maskey-Warzęchowska, Ryszarda Chazan.

Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych, Pneumonologii i Alergologii A M w Warszawie
Kierownik Prof. dr hab. med. R. Chazan

Summary: Macrophages represent the most predominant immune effector cells in the alveolar spaces and conducting airways and are known to express activated phenotype. The study was aimed at assessing the differences in cellular profile and the expression of selected surface markers on sputum macrophages in asthma and healthy subjects.

17 healthy subjects (never smoked) and 10 mild asthma subjects treated with glucocorticosteroids were enrolled into the study. For macrophage phenotyping a immunocytochemistry method was used with commercially available antibodies anti: CD14, CD71, CD11b and CD54. The nonparametric Mann Whitney U test was applied for data comparison, p value <0.05 being regarded as significant. The total number of cells were increased in asthma patients $4.81 \pm 5.27 \times 10^6$ /ml vs healthy $2.8 \pm 2.15 \times 10^6$ /ml and it was statistically significant. Statistically significant increase in the percentage of eosinophils was observed in mild asthma subjects. No differences were found between the proportion in macrophages and lymphocytes. The macrophage phenotype in induced sputum differed in both groups. The expression of CD 11b was higher in asthma group and the difference was statistically significant. The proportion of macrophages with the expression of CD 14, CD 71 and CD54 was comparable in both groups. Macrophage phenotyping during glucocorticosteroid therapy is useful in the assessment of inflammatory process in asthma subject.

Pneumonol. Alergol. Pol. 2006, 74, 101:105

Key words: asthma, macrophages, induced sputum

Makrofagi są komórkami dominującymi w drogach oddechowych a podstawowym ich zadaniem jest zapewnienie homeostazy w przestrzeni pęcherzykowo-oskrzelowej. Makrofagi pełnią tę funkcję tak przez fagocytozę cząsteczek, wydzielanie mediatorów wpływających na chemotaksję innych komórek jak i prezentację antygenów. Makrofagi stanowią pierwszą linię obrony wobec substancji dostających się do płuc. To zjawisko ma szczególne znaczenie w sytuacji narażenia na czynniki wziewne tj. alergenów i dym tytoniowy. Na powierzchni makrofagów dochodzi do ekspresji szeregu receptorów za pomocą których można oceniać ich stan aktywacji. Wiele badań potwierdza, że makrofagi w astmie charakteryzuje stan pobudzenia (14). Ocena tego zjawiska jest jednak złożona z tego powodu, że te komórki mają zdolność zarówno hamowania jak pobudzenia odpowiedzi immunologicznej.

Astma jest przewlekłą chorobą zapalną w przebiegu której dochodzi do zwiększenia rekrutacji i napływu makrofagów do płuc. W patogenezie astmy bardzo dobrze udokumentowano zaburzenie równowagi Th1 i Th2, wyrażające się przewagą oddziaływania cytokin pochodzących od limfocytów o fenotypie Th2 co przyczynia się do promowania

eozyfilowego zapalenia w drogach oddechowych.

Stan zapalny w drogach oddechowych można ocenić za pomocą badania indukowanej płwociny. Jako badanie wystandaryzowane i powtarzalne jest cennym narzędziem w badaniach porównawczych (2).

Celem pracy było oznaczenie składu komórkowego i wybranych antygenów powierzchniowych makrofagów w płwocinie indukowanej u chorych na astmę łagodną leczonych przewlekle glikokortykosteroidami wziewnie w porównaniu do grupy zdrowych osób. Do analizy wybrano następujące receptory: CD14, CD71, CD11b i CD54.

Material i metody

Do badań zakwalifikowano 17 (9 kobiet i 8 mężczyzn) zdrowych, niepalących ochotników (grupa I) o średniej wieku 30 lat (21-66), oraz 10 chorych na astmę łagodną z potwierdzoną atopią na podstawie punktowych testów skórnych i stężenia IgE całkowitego (grupa II), o średniej wieku 53 lata (29-69). W tej grupie było 8 kobiet i 2 mężczyzn, średni czas trwania choroby wynosił 8 lat, dwie osoby spośród chorych były ex-palaczami. Wskaźnik FEV₁ wynosił powyżej 80% wartości należnej. Do badań włączono osoby bez cech zakażenia dróg oddechowych nie kwalifikowano osób, które były leczone antybiotykiem w ciągu ostatniego miesiąca poprzedzającego badanie.

Tabela 1. Porównanie całkowitej liczby komórek i składu komórkowy w płwocinie indukowanej u chorych na astmę w porównaniu do grupy zdrowych.

Table 1. Comparison of the total cells count and cellular profile in induced sputum in asymptomatic smokers in comparison to healthy subjects.

Badana grupa/ Examined group	Całkowita liczba komórek x 10 ⁶ /ml/ Total cells count x10 ⁶ /ml	Makrofagi%	Makrofagi x 10 ⁶ /ml	PMN%	Eozynofile%	Limfocyty%
Zdrowi /Healthy n=17	2.8±2.15	51.8±24	1.04±0.54	42.03±24.4	1.2±2.75	4.61±4.32
Astma n=10	4.81±5.27	47.4±19.6	2.12±2.36	24±14.62	25.6±13.7	3±2.4
p	*	ns	*	*	*	ns

Opracowanie płwociny. Płwocinę pozyskiwano wg. opisanego wcześniej protokołu (4), z zastosowaniem nebulizatora ultradźwiękowego (DeVilbiss 2000). Uzyskany materiał przekazywano natychmiast do laboratorium gdzie był poddany ocenie makroskopowej i ważony. Następnie do próbek dodawano 0.1% roztwór DDT (Dithiothreitol- Sigma-Aldrich) w dwukrotnie większej objętości. Materiał homogenizowano wstrząsając przez 20 minut. Po dodaniu podwójnej objętości PBS materiał filtrowano i tak przygotowane próbki wirowano przez 10 minut z przyspieszeniem 800g. Komórki zawieszano w roztworze PBS do objętości 1 ml. Żywotność komórek oceniano stosując błękit trypanu. Leukocytozę liczono w komorze Brückera. Rozmazy barwiono metodą May-Grünwald-Giemsa. Oceniano skład komórkowy licząc po 300 komórek w preparacie. Próbki w których liczba komórek nabłonkowych przekraczała 50% i stwierdzano mniej niż 200 komórek nienabłonkowych nie były poddawane dalszym oznaczeniom.

Ocena ekspresji antygenów powierzchniowych na makrofagach.

Badania antygenów powierzchniowych przeprowadzono metodą immunocytochemii –APAAP (fosfataza zasadowa-antyfosfataza zasadowa), kit LSAB2- Dako wg. instrukcji producenta z zastosowaniem przeciwciał przeciw- CD14, CD71, CD11b i CD54 (Dako, Denmark) obliczając odsetek komórek z ekspresją danego antygeny oceniając 200 komórek.

W obliczeniach statystycznych zastosowano test U Manna-Whitneya, dla poszczególnych grup, przyjmując $p < 0.05$ jako statystycznie istotne.

Wyniki

Całkowita liczba komórek w płwocinie w grupie zdrowych wynosiła $2.8 \pm 2.15 \times 10^6$ /ml a w grupie chorych na astmę $4.81 \pm 5.27 \times 10^6$ /ml i różniła się istotnie statystycznie ($p < 0.05$). Analizując skład komórkowy, stwierdzono statystycznie istotne zwiększenie odsetka eozynofilów w grupie chorych na astmę (25.6 ± 13.67 vs 1.2 ± 2.75). Odsetek makrofagów i limfocytów nie różnił się w badanych grupach. U chorych na astmę mniejszy był odsetek neutrofilów. Choć proporcje makrofagów były podobne to stwierdzono, że na skutek większej leukocytozy całkowita liczba makrofagów jest zwiększona w grupie chorych na astmę, co było istotne statystycznie (Tab. 1).

W grupie chorych na astmę w porównaniu do grupy zdrowych zwraca uwagę zwiększona całkowita liczba komórek i jednocześnie zwiększony odsetek eozynofilów w płwocinie indukowanej (Ryc 1 i Ryc 2), co przemawia za utrzymującym się zapaleniem w drogach oddechowych chorych na astmę.

Rycina 1. Całkowita liczba komórek w płwocinie indukowanej (wartości średnie).

Figure 1. Total cell count in induced sputum (mean values).

Rycina 2. Skład komórkowy w płwocinie indukowanej (wartości średnie).

Figure 2. Cellular profile in induced sputum (mean values).

Tabela II. Fenotyp makrofagów w płwocinie indukowanej u chorych na astmę w porównaniu do grupy zdrowych.
Table II. Macrophage phenotype data in induced sputum in asymptomatic smokers in comparison to healthy subjects.

	CD14 %	CD71 %	CD11b %	CD54 %
Zdrowi /Healthy n=17	16.64±13.46	51.25±11.23	50.47±8.19	41.30±19.85
Astma n=10	17.9±13.10	49±20.91	57.85±9.88	32.3±19.85
p<0.05*	ns	ns	*	ns

W grupie chorych na astmę stwierdzono zwiększony odsetek komórek z ekspresją receptorów dla CD11b ($p<0.05$), (Ryc 3). W obu grupach nie ujawniono różnic w odsetkach komórek z ekspresją CD14, CD71 i CD54 (Tab. II).

CD11b, którego ekspresja była wyższa w grupie chorych na astmę. Ekspresja pozostałych receptorów CD14, CD71 i CD54 nie różniła się w obu grupach.

Badając tak liczbę komórek, skład komórkowy jak i ekspresję receptorów uwzględnic należy wpływ na oznaczenia kontynuacji leczenia wziewnymi glikokortykosteroidami. Pomimo tego zaobserwowano istotne różnice w ekspresji receptorów CD11b. W opracowaniu Lensmar i wsp. (9), po prowokacji niskimi dawkami alergenu zaobserwowano zwiększenie całkowitej liczby komórek oraz po 24 godzinach od prowokacji wzrost liczby eozynofiliów w popłuczynach oskrzelowo-pęcherzykowych. Po prowokacji zaobserwowano również pewną tendencję do zwiększenia liczby makrofagów i do zwiększenia liczby komórek z ekspresją CD11 i CD14. W opracowaniu Lensmar i wsp.(9) oznaczenia receptorów powierzchniowych wykonywano na komórkach pozyskiwanych z popłuczyn pęcherzykowo-oskrzelowych.

Rycina 3. Wykres ramkowy dla makrofagów z ekspresją CD11b ($p<0.05$).
Figure 3. Rank graph for CD11b expression on macrophages ($p<0.05$).

Na podstawie własnych badań w płwocinie indukowanej w grupie osób palących ale bez cech obturacji stwierdzono wzrost ekspresji CD11b i CD14 oraz CD71 (7). Zaobserwowane zmiany w grupie palących są konsekwencją narażenia na dym tytoniowy także w przebiegu innych przewlekłych chorób zapalnych toczących się w płucach, mogą stanowić niespecyficzną reakcję na różne bodźce (8). Goto i wsp. udowodnił, że substancje niskocząsteczkowe, poniżej 10 mikronów PM10, są fagocytowane przez makrofagi pęcherzykowe (6) i następnie przyczyniają się do uwolnienia ze szpiku niedojrzałych monocytów (16). CD14 to receptor dla lipopolisacharydu, składnika ściany bakterii Gram (-), stwierdzono, że jego ekspresja jest wysoka na monocytach krwi obwodowej i jednocześnie dość niska na dojrzałych makrofagach.

Omówienie

Wiadomo, że eozynofilia płwociny jest cechą astmy i lepszym parametrem określającym aktywność zapalenia niż eozynofilia krwi obwodowej czy wskaźniki pośrednie aktywacji eozynofiliów jak ECP w surowicy (12). Ostatnio podkreśla się niedostateczną supresję procesu zapalnego w astmie, mimo stosowanego leczenia przeciwzapalnego, niezależnie od występowania objawów choroby (13).

Analizując skład komórkowy badanych grup wykazano, że proporcje makrofagów i limfocytów były podobne. Te dane dotyczące składu makrofagów i limfocytów są zgodne z opracowaniami innych autorów (2,3). Zwrócono jednak uwagę, że całkowita liczba makrofagów w płwocinie indukowanej w grupie chorych na astmę była wyższa niż u zdrowych.

Analizując ekspresję receptorów na makrofagach jedyną istotną różnicę stwierdzono dla receptora dla

CD71 to receptor dla transferyny, opisany jako charakterystyczny dla proliferujących makrofagów (17). W ocenie ekspresji CD14, CD71 również nie wykazano różnic w obu grupach, co wskazuje, że w przeciwieństwie do palących w grupie chorych na astmę makrofagi charakteryzują się raczej dojrzałym fenotypem.

CD54 to przeciwciało wiążące się z cząsteczką adhezji- ICAM1. W naszym opracowaniu wykazano,

że ekspresja CD 54 była podobna w grupie chorych na astmę i w grupie zdrowych. Ta obserwacja jest zgodna z wynikami Lensmar i wsp.(10). Podobnie u chorych na astmę wykazano, że ekspresja CD54 nie różniła się w grupie zdrowych.

CD 11b to łańcuch β dla β_2 integryny. β_2 integryny (CD18/11b) leukocytów wiążą się z cząsteczkami immunoglobulinowymi komórek śródbłonka. Ligandami dla nich są białka powierzchniowe ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, jak i białka rozpuszczalne fibrynogen, czynnik X i składniki dopełniacza. Zwiększona ekspresja tego receptora może wskazywać na aktywację makrofagów w przebiegu astmy niezależnie od prowadzonego leczenia przeciwzapalnego. Zwiększony odsetek komórek z ekspresją CD11b wskazuje na możliwość migracji tych komórek.

Rola makrofagów w astmie wydaje się być bardziej złożona niż w rozwoju POCHP, gdzie komórki te stanowią źródło wielu enzymów proteolitycznych i chemokin wpływających na aktywację neutrofilów. Sugeruje się, że makrofagi w przebiegu astmy mają znaczenie tak w aktywacji jak i w supresji odpowiedzi immunologicznej. W warunkach eksperymentalnych wykazano, że makrofagi obciążone alergenem pełnią funkcję immunosupresyjną, utrzymującą się przez dłuższy czas (15). Wykazano, że makrofagi obciążone alergenem aktywowały limfocyty regulatorowe. Ta obserwacja jest szczególnie interesująca z uwagi na zjawisko tolerancji limfocytów wobec swoistego alergenu, które ma znaczenie w skuteczności swoistej immunoterapii.

Wykazano ponadto, że makrofagi pęcherzykowe promując odpowiedź Th1 mogą przyczyniać się do ochrony przed rozwojem zapalenia alergicznego. Na modelach zwierzęcych usunięcie makrofagów przyczyniało się do zwiększenia prezentacji antygeny przez komórki dendrytyczne i nasilenie humoralnej odpowiedzi na inhaledy antygen. Tym samym skutkowało to zwiększoną nadreaktywnością oskrzeli i nasileniem eozynofilowego zapalenia (11). W przebiegu przewlekłych procesów zapalnych dochodzi do apoptozy leukocytów. Makrofagi fagocytują komórki apoptotyczne

i przyczyniają się do wydzielania PGE2 i TGF- β , substancji działających supresyjnie. To działanie ograniczające zapalenie jest procesem aktywnym i nie jest jedynie prostą konsekwencją fagocytozy komórek apoptotycznych, lecz zależy od wydzielanych przez makrofagi substancji (5). W ten sposób fagocytoza apoptotycznych komórek przyczynia się do ograniczenia zapalenia. Można zatem wnioskować, że sposób reagowania makrofagów wobec komórek ulegających apoptozie może przyczyniać się do podtrzymania przewlekłego zapalenia. Wykazano, że makrofagi uzyskane od chorych na astmę charakteryzują się upośledzoną fagocytozą (11). Makrofagi działają jako komórki prezentujące antygen ale w przeciwieństwie do komórek dendrytycznych spełniają tę funkcję tylko w niewielkim stopniu. Fizjologicznie jako komórki prezentujące antygen są mniej sprawne, najprawdopodobniej na skutek niższej ekspresji cząsteczek kostymulujących- CD80 i CD86. Oddziaływanie cząsteczek kostymulujących i połączenie z ligandem CD28 (obwodowe limfocyty) i CTLA-4 (na zaktywowanych limfocytach) wywołuje szereg sygnałów prowadzących do zróżnicowania odpowiedzi (1). Być może zjawisko mniejszej ekspresji na makrofagach cząstek kostymulujących zabezpiecza przed nadmierną aktywacją układu immunologicznego wobec ekspozycji na inhaledy antygeny.

Badanie płwociny indukowanej dostarcza danych jakościowych i ilościowych o wskaźnikach komórkowych. Materiał pochodzi głównie z centralnych dróg oddechowych. Ocena ekspresji wybranych antygenów makrofagów płwociny może być przydatna w zrozumieniu roli tych komórek w rozwoju i podtrzymaniu przewlekłego zapalenia u chorych na astmę.

Wnioski

Ocena receptorów powierzchniowych makrofagów w płwocinie indukowanej u chorych na astmę łągodną, przewlekłe leczonych glikokortykosteroidami ma znaczenie w ocenie aktywności procesu zapalnego i wymaga dalszych badań.

Piśmiennictwo:

1. Balbo P. i wsp. Differential role of CD80 and CD86 on alveolar macrophages in the presentation of allergen to T lymphocytes in asthma. *Clin Exp Allergy* 2001,31,625-636.
2. Belda J. i wsp. Induced sputum cell counts in healthy adults. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000;161,475-478.
3. Cianchetti S. i wsp. Granulocyte markers in hypertonic and isotonic saline-induced sputum of asthmatic subjects. *Eur Respir J*.2004,24,1018-1024.
4. Domagała-Kulawik J. i wsp. The cellular composition and macrophage phenotype in induced sputum in smokers and ex-smokers with COPD. *Chest*, 2003 ;123,1054-1050.
5. Fadok V.A. i wsp. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J. Clin. Invest* 1998 101,890-898.
6. Goto Y, H. i wsp. Particulate matter air pollution stimulates monocyte release from the bone marrow. *AJRCCM* 2004; 170: 898-903.
7. Hermanowicz – Salamon i wsp. Wpływ palenia tytoniu na skład komórkowy i wybrane antygeny powierzchniowe makrofagów w płwocinie indukowanej. *Magazyn Alergologiczny*, 2005, 4.
8. Krombach F. i wsp. Characterization and quantification of alveolar monocyte-like cells in human chronic inflammatory lung disease. *Eur Respir J*, 1996; 9, 984-991.
9. Lensmar C. i wsp. Airway inflammation and altered alveolar macrophage phenotype pattern after repeated low-dose allergen exposure of atopic asthmatic subjects. *Clin Exp Allergy*, 1999; 29, 1632-1640.
10. Lensmar C.G. i wsp. Leukocyte counts and macrophage phenotypes in induced sputum and bronchoalveolar lavage fluid from normal subjects. *Eur Respir J*, 1998;12,595-600.
11. Peters-Golden M. The alveolar macrophage. The forgotten cell in asthma. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2004,31,3-7.
12. Pizzichini E. i wsp. Measuring airway inflammation in asthma: eosinophils and eosinophilic cationic protein in induced sputum compared with peripheral blood. *J. Allergy Clin Immunol.* 1997,99,539-544.
13. Pumputiene I. i wsp. T cell and eosinophil activation in mild and moderate atopic and nonatopic children's asthma in remission. *Allergy* 2006, 61, 43-48.
14. Viksman M.Y. i wsp. Phenotypic analysis of alveolar macrophages and monocytes in allergic airway inflammation. Evidence for activation of alveolar macrophages, but not peripheral blood monocytes, in subjects with allergic rhinitis and asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1997,155,858-863.
15. Vissors J.L.M. i wsp. Macrophages induce an allergen specific and long-term suppression in a mouse asthma model. *Eur Respir. J.* 2005,26,1040-1046.
16. Wan C. T. i wsp. The human bone marrow response to acute air pollution caused by forest fires. *AJRCCM*, 2000; 161, 1213-1217.
17. Woodward J.E. i wsp. Anti-transferrin receptor monoclonal antibody: a novel immunosuppressant. *Transplantation*, 1998,65,6-9.

joanhesa@poczta.klinika.pl