

ULOGA EOZINOFILNIH LEUKOCITA U PATOGENEZI BRONHIJALNE ASTME

Danijela Vučević, Tatjana Radosavljević, Gordana Đorđević-Denić

Institut za patološku fiziologiju, Medicinski fakultet, Beograd

Kratak sadržaj: Patogeneza bronhijalne astme nije do kraja razjašnjena. U plućima, perifernoj krvi i sputumu astmatičara prisutan je povećan broj eozinofila. Eozinofilija je identifikovana kao faktor rizika za razvoj opstrukcije vazdušnih puteva. Izrazit eozinofilni zapaljenski infiltrat u bronhijalnoj sluznici i korelacija između broja eozinofilnih leukocita i težine bolesti podržava hipotezu prema kojoj su eozinofili glavne inflamacijske ćelije sposobne da izazovu patofiziološke promene karakteristične za astmu. Aktivirani eozinofili sekretuju široki spektar preformiranih i novosintetisanih medijatora koji dovode do oštećenja bronhijalnog epitela, spazma glatkih mišića bronhija, povećanja sekrecije sluzi i vazodilatacije. Dokazano je da se u toku astmatičnog napada povećava proizvodnja oksidanasa. Brojna istraživanja ukazuju da eozinofili u krvi i vazdušnim putevima osoba obolelih od bronhijalne astme stvaraju veću količinu oksidanasa u odnosu na zdrave osobe.

Ključne reči: eozinofilni leukociti, bronhijalna astma, inflamacija, oksidansi

Bronhijalna astma i hronične opstruktivne bolesti pluća

Bronhijalna astma je inflamacijska bolest koju karakteriše preosetljivost vazdušnih puteva sa vremenim periodima bronhospazma. Radi se o spazmu ili dužim kontrakcijama bronhijalne i bronhiolarne glatke muskulature. *Extrinsic* astma (atopijska, alergijska astma) je mnogo češća od *intrinsic* astme (nealergijske, neatopijske, inflamacijske astme). Bronhijalna astma je veoma složeno oboljenje koje podrazumeva biohemijske, autonomne, imunske, infektivne, endokrine i psihičke faktore različitog stepena u različitim osoba (1).

Smatra se da je inflamacija koja nastaje kao posledica preosetljivosti ili hiperosetljivosti vazdušnih puteva osnovni patofiziološki razlog u svim tipovima astme. Oslobođanje medijatora inflamacije dovodi do spazma glatkih mišića bronhija, vaskularne kongestije, povećane propustljivosti krvnih sudova, edema, stvaranja guste, lepljive sluzi i prestanka funkcije (1).

Po mnogima eozinofilni leukociti su ključne efektorne ćelije u patogenezi ove inflamacijske bolesti vazdušnih puteva (2–4, 9, 47, 48–59). Aktivirani eozinofili sekretuju široki spektar preformiranih i novosintetisanih medijatora koji razaraju integritet bronhijalne sluznice, zaustavljaju pokretanje cilija i dovode do oštećenja i jake sekrecije epitelnih ćelija. Oštećenje epitelnih ćelija je u korelaciji sa preosetljivošću vazdušnih puteva (1, 51, 57, 58). Brojni citokini koje proizvode eozinofili obezbeđuju lokalni mehanizam kojim se pojačava i modulira postojeći zapaljenski proces (5, 55, 56). Metaplazija peharastih ćelija, koja nastaje kao posledica inflamacije disajnih puteva, takođe umnogome doprinosi kliničkoj simptomatologiji, opstrukciji disajnih puteva i mortalitetu (6, 47, 51). Bitne patomorfološke karakteristike bronhijalne astme su i subepitelna fibroza, hipertrofija glatkih mišića i formiranje novih krvnih sudova, što u krajnjem ishodu dovodi do remodelovanja zida disajnih puteva (5, 7, 51, 56).

Osim bronhijalne astme, inflamacija je značajna za razvoj hroničnih opstruktivnih bolesti pluća (HOBP). Ipak, inflamacijski odgovor u HOBP se značajno razlikuje od odgovora u astmi, što je prikazano na tabeli 1. Međutim, neki bolesnici imaju istovremeno i HOBP i astmu, pa inflamacija u njihovim plućima može pokazivati karakteristike obe bolesti (8).

Adresa autora:

Danijela Vučević
Institut za patološku fiziologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu
Dr Subotića 9
11000 Beograd

Table I Karakteristike inflamacije u bronhijalnoj astmi i HOBP

Bolest pluća	Bronhijalna astma	HOBP
Inflamacijske ćelije	Eozinofili Mali porast broja makrofaga Porast broja CD4+ T limfocita Aktivacija mastocita	Neutrofil Veliki porast broja makrofaga Porast broja CD8+ T limfocita Leukotrien B ₄ (LTB ₄)
Medijatori inflamacije	Leukotrien D ₄ (LTD ₄) Interleukin-4 (IL-4) Interleukin-5 (IL-5) Mnogi drugi medijatori	Interleukin-8 (IL-8) Faktor nekroze tumora α (TNF α) Mnogi drugi medijatori Skvamozna metaplazija epitela
Posledice	Fragilan epitel Zadebljanje bazalne membrane Metaplazija sluzi Uvećanje žlezda	Destrukcija parenhima Metaplazija sluzi Uvećanje žlezda
Odgovor na terapiju	Glikokortikoidi inhibiraju inflamaciju	Glikokortikoidi imaju mali efekat ili ne ispoljavaju svoje dejstvo

Table II Diferencijalna dijagnoza bronhijalne astme i HOBP

Bolest pluća	Znaci koji ukazuju na bolest
Bronhijalna astma	Početak u mladosti (često u detinjstvu) Simptomi se menjaju iz dana u dan Simptomi se javljaju noću ili rano ujutru Česta pridruženost alergije, rinitisa i/ili ekcema Pozitivna porodična anamneza za astmu Uglavnom reverzibilno ograničenje protoka vazduha
HOBP	Početak u srednjem životnom dobu Spora progresija simptoma Anamneza o dugotrajnom pušenju Dispnoja pri fizičkom naporu Uglavnom ireverzibilno ograničenje protoka vazduha

Table III Proteinski sadržaj eozinofilnih granula

Protein	Vrsta granula
Glavni osnovni protein (MBP-major basic protein)	Sekundarne (specifične) granule
Eozinofilni katjonski protein	Sekundarne (specifične) granule
Eozinofilni neurotoksin	Sekundarne (specifične) granule
Eozinofilna peroksidaza	Sekundarne (specifične) granule
Lizozim	Sekundarne (specifične) granule
Kisela fosfataza	Sekundarne (specifične) granule
Arilsulfataza B	Sekundarne (specifične) granule
Katalaza	Sekundarne (specifične) granule
Enoil-CoA hidrataza	Sekundarne (specifične) granule
3-ketoacil-CoA tiolaza	Sekundarne (specifične) granule
β -glukuronidaza	Sekundarne (specifične) granule
Katepsin D	Sekundarne (specifične) granule
Elastaza	Sekundarne (specifične) granule
Granulocitno-monocitni faktor rasta (GM-CSF)	Sekundarne (specifične) granule
Interleukin-2 (IL-2)	Sekundarne (specifične) granule
Interleukin-4 (IL-4)	Sekundarne (specifične) granule
Interleukin-5 (IL-5)	Sekundarne (specifične) granule
Interleukin-6 (IL-6)	Sekundarne (specifične) granule
Faktor nekroze tumora α (TNF α)	Sekundarne (specifične) granule
RANTES	Sekundarne (specifične) granule
Tip II fosfolipaza A ₂	Sekundarne (specifične) granule
Baktericidni protein koji povećava permeabilnost	Sekundarne (specifične) granule
Kisela fosfataza	Male granule
Arilsulfataza B	Male granule
Katalaza	Male granule
Citohrom b ₅₅₈	Male granule
Elastaza	Male granule
Eozinofilni katjonski protein	Male granule
Lizofosfolipaza (Charcot-Leyden kristalni protein)	Primarne (nespecifične granule)
Ciklooksigenaza	Lipidna telašca
5-lipoksigenaza	Lipidna telašca
15-lipoksigenaza	Lipidna telašca
Leukotrien C ₄ sintetaza	Lipidna telašca
Eozinofilna peroksidaza	Lipidna telašca
Esteraza	Lipidna telašca

U nekih bolesnika s hroničnom bronhijalnom astmom jasno razlikovanje ove bolesti od HOBP nije moguće korišćenjem savremenih metoda za imidžing pluća i ispitivanje plućne funkcije. Znaci karakteristični za bronhijalnu astmu i HOBP, koji su važni za diferencijalnu dijagnozu ovih bolesti prikazani su na tabeli II. Međutim, ovi znaci se ne sreću kod svih bolesnika. Na primer, osoba koja nikad nije pušila može da se razboli od HOBP. Takođe, astma može da se razvije u odraslih, pa čak i u starijih osoba (8).

Eozinofilni leukociti i zapaljenje mukoze disajnih puteva

Postoje dokazi o akutnoj i hroničnoj inflamaciji koje su nepravilno raspoređene u disajnim putevima astmatičara (9). Opšte je prihvaćeno da su eozinofili dominantne efektorne ćelije u hroničnoj inflamaciji (2–4, 9, 47, 48–59). Svoju ulogu ostvaruju u toku procesa degranulacije oslobađanjem čitavog niza medijatora i faktora rasta (Tabela III–V).

Table IV Eozinofilni lipidni medijatori

Faktor aktivacije trombocita (PAF-platelet activation factor)
Leukotrien B ₄ (LTB ₄)
Leukotrien C ₄ (LTC ₄)
Tromboksan A ₂ (TXA ₂)
Prostaglandin E ₂ (PGE ₂)
Prostaglandin G ₂ (PGG ₂)
Prostaglandin F _{2α} (PGF _{2α})
Prostaglandin I ₂ (PGI ₂)
5-hidroksieikosatetraenoična kiselina (5-HETE)
12-hidroksieikosatetraenoična kiselina (12-HETE)
15-hidroksieikosatetraenoična kiselina (15-HETE)
5,15-dihidroksieikosatetraenoična kiselina (5,15-diHETE)
8,15-dihidroksieikosatetraenoična kiselina (8,15-diHETE)
14,15-dihidroksieikosatetraenoična kiselina (14,15-diHETE)
Lipoksin A ₄ (LXA ₄)
Lipoksin C ₄ (LXC ₄)
13-hidroksilinolesna kiselina (13-HODE)

Table V Eozinofilni faktori rasta

Faktor nekroze tumora α (TNFα – tumor necrosis factor α)
Faktor nekroze tumora β (TNFβ – tumor necrosis factor β)
Faktor rasta poreklom iz trombocita (PDGF – platelet-derived growth factor)
Faktor rasta vaskularnog endotela (VEGF – vascular endothelial growth factor)
Heparin vezujući epidermski faktor rasta (HB-EGF → heparin-binding epidermal growth factor)
Nervni faktor rasta (NGF – nerve growth factor)
Endotelin (ET – endothelin)

Iz granula eozinofila oslobađaju se katjonski proteini (eozinofilni katjonski protein, eozinofilna peroksidaza, eozinofilni neurotoksin, i dr.), enzimi (fosfolipaza A₂, eozinofilna kolagenaza, katalaza, kiselna fosfataza, histaminaza, itd.) i neuropeptidi (supstanca P, vazoaktivni intestinalni peptid – VIP, i dr.). Najzastupljeniji protein u granulama eozinofila (MBP – major basic protein), deluje toksično na epitel vazdušnih puteva. Pokazano je da MBP izaziva oštećenje pneu-

Tabela VI Eozinofilni receptori za hemokine i njihovi endogeni ligandi

Subfamilija hemokina	Nomenklatura	Endogeni ligandi
CXC hemokini	CXCR1	Interleukin-8 (IL-8)
CXC hemokini	CXCR1	Granulocitni protein hemotakse-2 (GCP-2 → granulocyte chemotactic protein-2)
CXC hemokini	CXCR2	Interleukin-8 (IL-8)
CXC hemokini	CXCR2	Granulocitni protein hemotakse-2 (GCP-2 → granulocyte chemotactic protein-2)
CC hemokini	CCR1	Makrofagni inflamacijski protein 1α (MIP1α)
CC hemokini	CCR1	RANTES
CC hemokini	CCR1	Monocitni protein hemotakse-2 (MCP-2 → monocyte chemotactic protein-2)
CC hemokini	CCR1	Monocitni protein hemotakse-3 (MCP-3 → monocyte chemotactic protein-3)
CC hemokini	CCR1	Monocitni protein hemotakse-5 (MCP-5 → monocyte chemotactic protein-5)
CC hemokini	CCR1	Leukotaktin-1
CC hemokini	CCR3	Eotaksin I
CC hemokini	CCR3	Eotaksin II
CC hemokini	CCR3	Leukotaktin-1
CC hemokini	CCR3	Monocitni protein hemotakse-3 (MCP-3 → monocyte chemotactic protein-3)
CC hemokini	CCR3	Monocitni protein hemotakse-4 (MCP-4 → monocyte chemotactic protein-4)
CC hemokini	CCR3	RANTES

mocita (10, 11) i deskvamaciju epitela respiracijskog trakta (12, 13). MBP narušava transport jona u epitelu traheje, što može da izmeni zapreminu i sastav tečnosti koja oblaže vazdušne puteve (14).

Nezaobilazni element aktivacije i efektorne funkcije eozinofila su i novosintetisani lipidni medijatori ciklooksigenaznog puta (prostaglandini i tromboksan A_2) i lipoksigenaznog puta (leukotrieni, lipoksini i dr.). Osim toga, eozinofili stvaraju i citokine (eokine), i to pre svega interleukin-3 (IL-3), IL-5 i granulocitno-monocitni faktor rasta (GM-CSF), koji svojim autokrinim dejstvom održavaju i intenziviraju inflamaciju. U granulama eozinofila utvrđeno je i prisustvo IL-10, IL-11, IL-12, IL-16, interferona γ (INF γ) i faktora koji inhibira migraciju makrofaga (MIF – macrophage migration inhibitory factor). Zapaljenski proces moduliraju i eokini akutne inflamacije (IL-1 α , IL-6, i faktor nekroze tumora α – TNF α), faktor aktivacije trombocita (PAF), kao i hemokini (IL-8, makrofagni inflamacijski protein 1 α – MIF1 α , i dr.) (2–4, 9, 47, 48–59).

Inflamacijski odgovor predstavlja kaskadu događaja koja se manifestuje sekvencionalnom akcijom integrina, selektina, superfamilije imunoglobulina, kadherina, adresina i drugih familija adhezivnih molekula i njihovih receptora. Zapaljenske ćelije se kotrljaju preko endotela posredstvom mehanizama koje obezbeđuju selektini (L, E i P selektini). Zahvaljujući integrinima ostvaruje se čvrsto vezivanje inflamacijskih ćelija za endotel. Naime, na neaktiviranim leukocitima integrini se nalaze u mirujućem stanju i eksprimiraju se na bazalnom nivou. Aktivacijom ćelija stimuliše se i ispoljavanje i aktivacioni status ovih glikoproteinskih membranskih molekula, kao i sekrecija L-selektina. Integrini su uključeni i u kontakte leukocita sa proteinima ekstracelularnog matriksa. Najznačajniji ligandi integrina među proteinima ekstracelularnog matriksa su kolagen, laminin, fibronektin i vitronektin (15, 67).

Eozinofili na svojoj površini ispoljavaju adhezivne molekule važne za povezivanje ovih leukocita u nastanku imunskog odgovora, za usmeravanje njihovog kretanja kroz krvne sudove i za interakciju sa ekstracelularnim matriksom. Subfamiliji β_1 integrina (raniji naziv VLA antigeni – very late activation) pripadaju VLA-4, VLA-5 i VLA-6. U β_2 subfamiliju integrina svrstani su Mac-1 (macrophage-1 antigen koji se još označava i kao CD11b/CD18), leukocitni funkcionalni antigen-1 (skraćeno označen kao LFA-1 ili CD11a/CD18) i p150/95 (CD11c/CD18). $\alpha_4\beta_7$ je takođe integrin ćelijske membrane eozinofila. Na površini eozinofila ispoljeni su i L-selektin i sijaloglikoprotein (Sialil Lewis X). PECAM-1, koji je dobio naziv od početnih slova engleskih reči platelet endothelium cellular adhesion molecule-1, i intercelularni adhezivni molekul-1 (ICAM-1) predstavljaju adhezivne molekule iz superfamilije imunoglobulina takođe ekspimirane na eozinofilima (2, 4, 67).

Eozinofili vezuju imunoglobuline (Ig) preko površinskih receptora. Tako se IgE i IgG vezuju za Fc γ RI, Fc γ RII i Mac-2 receptore, dok se IgA vezuje za Fc α R (4).

Svoje specifične receptore na površini eozinofila imaju i C5a, CR1, CR3 i C1q komponenta komplemента (4).

Brojni površinski receptori eozinofila olakšavaju interakciju ovih ćelija sa citokinima. Na ovaj način svoje delovanje ostvaruju IL-2, CD25, IL-3, IL-5, IL-13, GM-CSF, interferon α (INF α), INF β , INF γ , TNF α , i transformišući faktor rasta β (TGF β) (4, 16).

Na površini eozinofila se mogu uočiti i receptori za hemokine. Vezivanjem za ove receptore hemokini učestvuju u migracijskim kretanjima eozinofila, aktivaciji integrina, indukciji respiracijskog praska, transkripciji citokina (neki od njih), angiogenezi, stvaranju kolagena i proliferaciji hematopoetskih prekursora. Najnovija istraživanja pokazuju da je RANTES (hemokin čiji naziv predstavlja kovanicu dobijenu od početnih slova engleskih reči *regulated upon activation normal T cell expressed and secreted*) pravi hemotaktički faktor u bolesnika sa alergijskom astmom, dok je IL-5 neophodan kofaktor (4, 17).

Eozinofili i njihovi produkti su prisutni u krvi, disajnim putevima, pljuvački i u bronhoalveolarnom lavatu (BAL) osoba obolelih od bronhijalne astme. U astmatičara eozinofilija je u korelaciji sa stepenom opstrukcije i težinom bolesti (2, 4).

O procesima koji dovode do aktivacije eozinofila *in vivo* još uvek se relativno malo zna. Osnovna karakteristika eozinofilne funkcije je da je za nju neophodan »priming« eozinofila, što prevedeno sa engleskog jezika znači »prvi sloj, prvo premazivanje«. *Priming* bi mogao da se posmatra kao međusobni uticaj modulacijskih i aktivacijskih signala. Aktivacija eozinofilnih receptora preko adhezivnih molekula, komponenti komplemента i imunoglobulina bi mogla da bude uključena u ove događaje. Receptori eozinofila su potentni signalni molekuli *in vitro*, ali svoju optimalnu funkciju postižu tek nakon priminga sa citokinima i hemotaksinima. IL-5 i GM-CSF priming eozinofila neophodan je za odgovore ovih ćelija, uključujući sintezu i oslobađanje bioaktivnih medijatora, što doprinosi povećanoj bronhijalnoj reaktivnosti (18). Smatra se da cirkulišući eozinofili dobijaju povećanu sposobnost da sekretuju IL-5 kad stignu u pluća, gde su stimulisani i drugim citokinima, kao što su IL-2 i IL-4 (19).

Migracija eozinofila iz cirkulacije u plućno tkivo se odigrava nakon njihove adhezije za vaskularne endotelne ćelije, komponente ekstracelularnog matriksa i tkivne ćelije. Kretanje ćelija u zapaljensko područje se sastoji iz rolovanja (kotrljanja), čvrste adhezije i transendotelne migracije. Eozinofilna dijapedeza na mesto inflamacije je regulisana citokinima podstaknutom i pojačanom ekspresijom endotelnih ad-

hezivnih molekula. Na površini endotelnih ćelija utvrđeno je prisustvo vaskularnog adhezivnog molekula-1 (VCAM-1), ICAM-1, ICAM-2, PECAM-1, E-selektina, P-selektina, fibronektina i laminina (20). Svaki od ovih molekula ima svoj odgovarajući ligand na eozinofilima i bazofilima (LFA-1, Mac-1, VLA-4, L-selektin) (21). Specifična ekspresija VLA-4 na eozinofilima i limfocitima, i njeno odsustvo na neutrofilima doveli su do hipoteze da je VCAM-1 predominantni endotelni regulator hronične inflamacije bronhijalne mukoze (22). IL-4 dovodi do povećane ekspresije VCAM-1 na endotelnim ćelijama (23). Povećana endotelna ekspresija VCAM-1, E-selektina i ICAM-1 je povezana sa alergijskim zapaljenjem pluća (2). Lutman i saradnici (24) su eksperimentalno pokazali da IL-4 i IL-13 pojačavaju efekat TNF α na eozinofilnu aktivaciju, kao i sinergistički efekat ovih citokina sa IL-5 na eozinofilnu aktivaciju.

IL-5 pojačava adheziju humanih eozinofila za vaskularni endotel i dovodi do hiperreaktivnosti donjih disajnih puteva (25). Receptor IL-5 pripada familiji tipa 1 citokinskih receptora. α subjedinica (β lanac koji koriste i IL-3 i GM-CSF za signalnu transdukciju) ovog visokoafinitetnog receptora se aktivira nakon vezivanja IL-5 za receptorski IL-5 α lanac (IL-5R α), i time započinje serija intracelularnih događaja. Na ovaj način tirozinskom fosforilacijom Janus kinaze 2 (JAK2) i proteina STAT1 α (signal transducer and activators of transcription 1 α) aktivira se JAK-STAT put. Familiju STAT proteina čini sedam članova (STAT 1 α , STAT 1 β i STAT 2–6). Osim JAK2, IL-5 aktivira i druge tirozin kinaze (lyn, hck, yes, btk, tec, c-fes). JAK2 i c-fes su direktno udružene sa β c subjedinicom GM-CSF/IL-3/IL-5 receptora, sugerišući da je njihova aktivacija rani događaj citokinske signalizacije (26, 27). JAK kinaze su neophodne za aktivaciju STAT proteina koji se nalaze u latentnom obliku u citoplazmi. Nakon aktivacije, odnosno fosforilacije, STAT proteini formiraju homodimere i heterodimere, translociraju se u jedro, vezuju za određenu sekvencu dezoksiribonukleinske kiseline (DNK) i regulišu transkripciju. U humanim eozinofilima IL-5 indukuje dva DNK-vezujuća kompleksa koji sadrže tirozin fosforilisane proteine. Jedan od ova dva DNK-vezujuća kompleksa sadrži STAT1 α verovatno kao dimer. Međutim, IL-5 pored indukcije STAT proteina indukuje i mnoge druge nuklearne proteine. Dugotrajna stimulacija ovim citokinom dovodi do indukcije transkripcionog faktora c-myc u humanim eozinofilima. IL-5 preko ras puta indukuje transkripcione faktore c-fos i c-jun, p21 ras, raf, MAPKK (p41 i p45) i MAPK (p44). S obzirom da do sada nije identifikovan apsolutno eozinofilni specifični regulacijski DNK element i transkripcioni faktor, moguće je da je specifična signalizacija rezultat specifične kombinacije transkripcionih faktora (25).

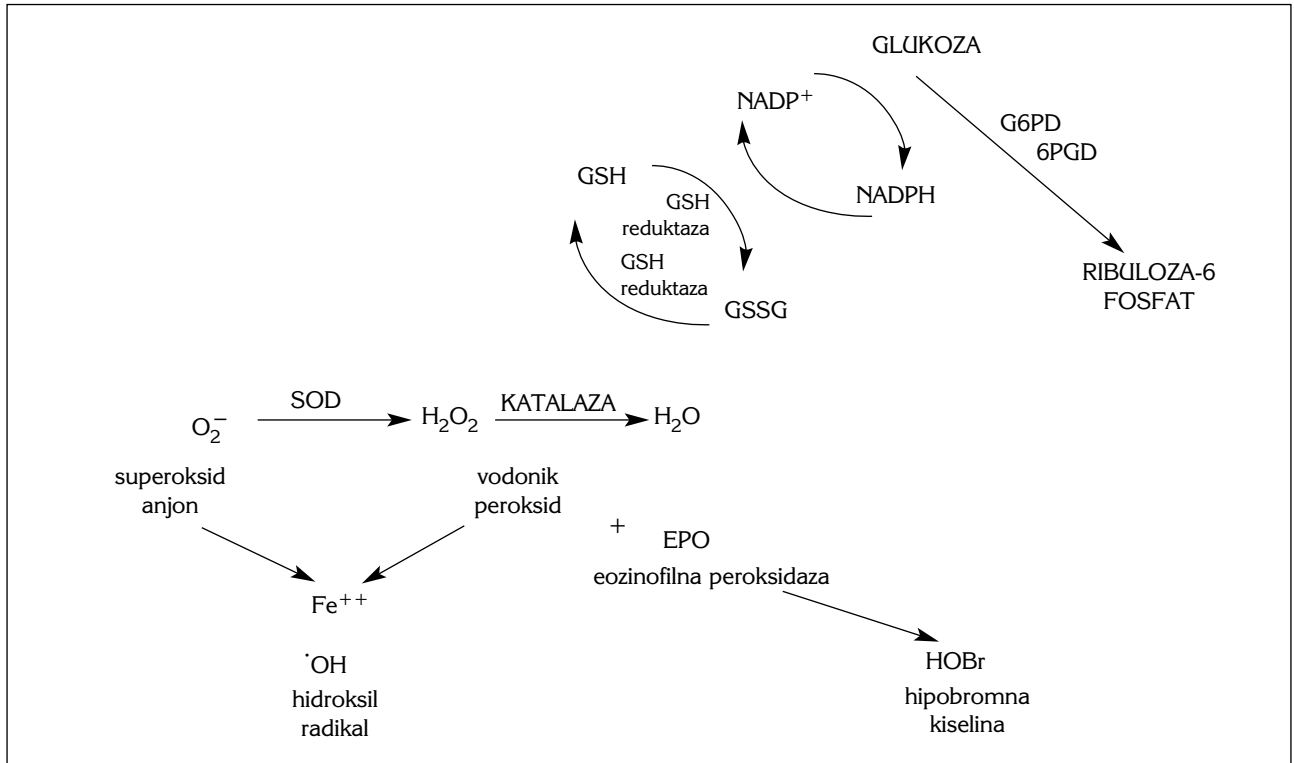
Eozinofilna apoptoza u hroničnoj inflamaciji bronhijalne mukoze

Broj eozinofila *in vivo* je regulisan ne samo produkcijom eozinofila u kostnoj srži, već i stepenom eozinofilne apoptoze, koja predstavlja najčešći oblik fiziološke ćelijske smrti. Bcl-2 (B-cell leukemia oncogene-2) familija gena kodira heterogenu grupu proteina koji predstavljaju ključne intracelularne modulatore (regulatore) ćelijskog umiranja po tipu apoptoze (28, 29). Otkrićem Bcl 2 gena, Bcl 2 familija proteina postaje posebno istraživana oblast zbog izuzetnog značaja za razumevanje molekulsko-bioloških mehanizama koji leže u osnovi procesa apoptoze. Poslednjih godina naročito se istražuju antiapoptozni članovi Bcl 2 familije proteina (29–34).

Odložena eozinofilna apoptoza se smatra jednim od najodgovornijih mehanizama koji doprinose eozinofiliji. U ljudi izgleda da je IL-5 specifičan faktor preživljavanja eozinofila, pa nije iznenađujuća činjenica da su eozinofilija i visoka ekspresija IL-5 udružene u hroničnoj inflamaciji bronhijalne mukoze. Eozinofilna apoptoza može biti odložena IL-om 5 kojeg sekretuju susedne ćelije, ali i autokrinom produkcijom ovog citokina. Izgleda da stimulacija eozinofila IL-om 5 dovodi do indukcije Bcl-xl (Bcl-2-regulated factor xl), koji je važan antiapoptotski gen. Postoje istraživanja gde je verifikovana povećana ekspresija Bcl-2 nakon tretiranja eozinofila IL-om 5 (35). Antiapoptozno dejstvo Bcl 2 proteina zasniva se na mogućnosti da veže Bax (Bcl 2-associated x) protein u formi heterodimera i tako onemogućuje stvaranje proapoptoznih Bax/Bax homodimera. Tokom indukcije procesa apoptoze, homodimeri Bax proteina formiraju kanale na membranama mitohondrija. Putem ovih kanala mitohondrije napuštaju molekuli citohroma c, koji su od posebne važnosti za aktivaciju izvršne faze procesa apoptoze (36). Na osnovu ovih saznanja, većina autora kao glavnu biološku ulogu Bcl 2 proteina u inhibiciji procesa apoptoze smatra njegovu sposobnost vezivanja za Bax protein i heterodimerizacionu neutralizaciju njegovog proapoptoznog dejstva (37–39). U *in vitro* uslovima je dokazano da je preživljavanje eozinofila produženo kada se inkubiraju u kulturama sa eozinofilnim citokinima kao što su IL-3, IL-5 i GM-CSF (35).

Eozinofilni leukociti i oksidacijsko oštećenje u bronhijalnoj astmi

Pluća predstavljaju primarno ciljano tkivo za oksidacijsko oštećenje zbog svoje lokalizacije, anatomije i funkcije. Kod naglog povećanja broja i količine oksidantasa, u uslovima tzv. oksidacijskog stresa, prirodni zaštitni mehanizmi popuštaju. Dokazano je da se u toku astmatičnog napada povećava proizvodnja oksidantasa. Brojna istraživanja ukazuju da eozinofili u krvi i vazдушnim putevima osoba obolelih od bronhijalne astme stvaraju veću količinu reaktivnih kiseoničkih



Slika 1 Reaktivne kiseoničke vrste i plućni antioksidacijski mehanizmi

vrsta (RKV) u odnosu na zdrave osobe (4, 8, 46, 50, 51, 57, 58, 61–66, 68, 69). Metaboliti kiseonika čiji izvor su i eozinofili, direktno oštećuju proteinske plućnog matriksa i/ili slabe funkciju antiproteaza i/ili inaktiviraju enzime uključene u sintezu elastina i obnovu plućnog tkiva. RKV eozinofila podstiču sekreciju sluzi i bronhokonstrikciju. Tako npr., vodonik peroksid (H_2O_2) kontrahuje glatki mišić disajnih puteva *in vitro*, a izoprostan $F_{2\alpha}$ -III, koji se stvara delovanjem slobodnih radikala u toku peroksidacije arahidonske kiseline, je snažan konstriktor disajnih puteva čoveka (8, 40, 41).

U izdahnutom vazduhu astmatičara zabeležene su povišene vrednosti H_2O_2 i azot monoksida (NO) (42, 43). NO je veoma reaktivan i nestabilan oksidans. U sintezi NO učestvuje enzim NO sintetaza (NOS). Inducibilna forma ovog enzima (iNOS), koja je odgovorna za citotoksične i biocidne efekte NO, prisutna je u eozinofilnim leukocitima. Aktivira se bakterijskim lipopolisaharidima i određenim citokinima (INF_γ , $TNF\alpha$ i $IL1\beta$). Inducibilnoj NOS je za maksimalnu produkciju NO potrebno 8–12 sati, a količine NO koje se tom prilikom produkuju su znatne (15, 44).

Oksidansi eozinofila mogu da reaguju i sa lipidima i nukleinskim kiselinama, što može da dovede do disfunkcije ili smrti ćelije. Takođe, u uslovima oksidacijskog stresa aktivacijom transkripcionog faktora NF-kappaB koji upravlja ekspresijom različitih infla-

macijskih gena važnih za bronhijalnu astmu, kao što su $IL-8$ i $TNF\alpha$, dodatno se podstiče zapaljenski proces (8, 60).

Singlet kiseonik (1O_2), superoksid anjon ($O_2^{\cdot-}$), H_2O_2 i hidroksil radikal ($\cdot OH$) su RKV koje eozinofili stvaraju u toku respiracijskog praska. U prisustvu H_2O_2 katalitičkim dejstvom eozinofilne peroksidaze dolazi do oksidacije halogenih elemenata i stvaranja reaktivnih kiselina (hipobromne, bromovodonične i jodovodonične kiseline) (16). Istraživanje na miševima inficiranim Toksokarom kanis (*Toxocara canis*) je pokazalo da se eozinofilna peroksidaza taloži u plućnom parenhimu i miokardu, što može da dovede do oštećenja srca i pluća (45).

Zaključak

Patogeneza bronhijalne astme nije do kraja razjašnjena. Ono što se sa sigurnošću zna je da eozinofili bitno doprinose njenom nastanku. Kompleksan patofiziološki supstrat ove bolesti otkriva nova polja istraživanja interakcija eozinofilnih medijatora i citokina sa medijatorima i citokinima drugih inflamacijskih ćelija. Takođe, nameće se potreba za dodatnim proučavanjem kako inhibicije aktivnosti $IL-4$ i $IL-5$, tako i pojačavanja aktivnosti $IL-10$, $IL-12$ i IFN_γ , tj. što uspešnijeg imitiranja njihovih dejstava u cilju pronalazanja efikasnijih lekova u terapiji bronhijalne astme.

THE ROLE OF EOSINOPHILIC LEUKOCYTES IN PATHOGENESIS OF BRONCHIAL ASTHMA

Danijela Vučević, Tatjana Radosavljević, Gordana Đorđević-Denić

Institut za patološku fiziologiju, Medicinski fakultet, Beograd

Summary: Pathogenesis of bronchial asthma has not been completely understood. Eosinophilic leukocytes accumulate in high numbers in the lungs, blood and sputum of asthmatic patients. Peripheral blood eosinophilia has been identified as a risk factor for the development of airway obstruction. Prominent eosinophilic inflammatory infiltrate in the bronchial mucosa and correlation between eosinophil numbers and disease severity supports the hypothesis that eosinophils are central inflammatory cells capable of inducing pathophysiological features of asthma. Activated eosinophils secrete a wide range of preformed and newly generated mediators that damage the bronchial epithelium, contract smooth muscle, increase mucous secretion and cause vasodilation. There is ample evidence that oxidants generation is increased during an asthma exacerbation. Many investigations indicate that airway and blood eosinophils produce more oxidants in asthmatic patients compared with control subjects.

Key words: eosinophilic leukocytes, bronchial asthma, inflammation, oxidants

Literatura

- Đorđević-Denić G. Patološka fiziologija respiracijskog sistema. U: Beleslin BB., Protić S, Đorđević-Denić G (ured.) i saradnici. Specijalna patološka fiziologija, Zавод за udžbenike i nastavna sredstva, Beograd, 2003: 119–42.
- Ulfman LH, Kuijper PHM, Van der Linden JAM, Lammers JJ, Zwaginga JJ, Koenderman L. Characterization of eosinophil to TNF- α -activated endothelium under flow conditions: α_4 integrins mediate initial attachment and E-selectin mediates rolling. *J Immunol* 1999; 163: 343–50.
- Nakajima H. CD4-positive T-lymphocytes and interleukin-5 mediate antigen-induced eosinophil infiltration into the mouse trachea. *Am Rev Respir Dis* 1992; 146: 374.
- Adolphson CR, Gleich GJ. Eosinophils. In: Holgate S, Church K (eds). *Allergy*. Gower Medical, London, 1993: 6.1–6.12.
- Savić N. Određivanje koncentracije interleukina-4 i interleukina-5 u serumu bolesnika sa bronhijalnom astmom i njihov dijagnostički i prognostički značaj. Magistarska teza, Beograd, Univerzitet u Beogradu, 2001.
- Hawker KM, Johnson PRA, Hughes JM, Black JL. Interleukin-4 inhibits mitogen-induced proliferation of human airway smooth muscle in culture. *Am J Physiol* 1998; 275: 469–77.
- Đorđević-Denić G. Medijatori anafilaktičke reakcije u toku plućnih bolesti. *Deč Pulm* 1993; 1, 1–2: 11–16.
- Lenfant C, Khaltaev N. Global strategy for the diagnosis, management and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: National heart, lung and blood institute/World health organization (NHLBI/WHO) Workshop 2001; 2701: 28–57.
- Jovičić Ž. Chronic inflammation in bronchial asthma. *Medicinska istraživanja* 1999; 33 (3): 15–20.
- Ayars GH. Eosinophil-and eosinophil granule-mediated pneumocyte injury. *J Allergy Clin Immunol* 1985; 76: 595.
- Hisamatsu K. Cytotoxicity of human eosinophil granule major basic protein to the human nasal sinus mucosa in vitro. *J Allergy Clin Immunol* 1990; 86: 52.
- Frigas E, Loegering DA, Gleich GJ. Cytotoxic effects of the guinea pig eosinophil major basic protein on tracheal epithelium. *Lab Invest* 1980; 42: 35.
- Motojima S. Toxicity of eosinophil cationic proteins for guinea pig tracheal epithelium in vitro. *Am Rev Respir Dis* 1989; 139: 801.
- Jacoby DB. Effect of human eosinophil major basic protein on ion transport in dog tracheal epithelium. *Am Rev Respir Dis* 1988; 137: 13.
- Maravić-Stojković V, Radak Đ, Dimković S. Endotel u aterosklerozi. U: Radak Đ, Maravić-Stojković V. ured. *Limnologija u genezi i terapiji ateroskleroze*. Beograd, 2004: 31–41.
- Litchfield MT, Lee TH. Asthma cells and cytokines. *J Asthma* 1992; 29(3): 181–91.
- Venge J, Lampinen M, Hakansson L, Rak S, Venge P. Identification of IL-5 and RANTES as the major eosinophil chemoattractants in the asthmatic lung. *J Allerg Clin Immunol* 1996; 97: 1110–15.
- Bracke M, Dubois GR, Bolt K, Bruijnzeel PLB, Vaerman JP, Lammers JWJ. Differential effects of the T helper cell type 2-derived cytokines IL-4 and IL-5 on ligand binding to IgG and IgA receptors expressed by human eosinophils. *J Immunol* 1997; 159: 1459–65.

19. Lai CKW, Ho ASS, Chan CHS, Tang J, Leung JCK, Lai KN. Interleukin-5 messenger RNA expression in peripheral blood CD4+ cells in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 97: 1320–6.
20. Bochner BS, Schleimer RP. The role of adhesion molecules in human eosinophil and basophil recruitment. *J Allergy Clin Immunol* 1994; 94: 427–38.
21. Wardlaw AJ, Symon FS, Walsh GM. Eosinophil adhesion in allergic inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 1994; 94: 1183–9.
22. Barks JL, McQuillan JJ, Iadernasco MF. TNF- α and IL-4 synergistically increase vascular cell adhesion molecule-1 expression in cultured vascular smooth muscle cells. *J Immunol* 1997; 159: 4532–8.
23. Dickensheets HL, Donnelly PR. IFN- γ and IL-10 inhibit induction of IL-1 receptor type I and type II gene expression by IL-4 and IL-13 in human monocytes. *J Immunol* 1997; 159: 6226–33.
24. Lutmann W, Matthiesen T, Matthys H, Virchow JC Jr. Synergistic effects of interleukin-4 or interleukin-13 and tumor necrosis factor-alpha on eosinophilic activation in vitro. *Am J Resp Cell Mol Biol* 1999; 20(3): 474–80.
25. Wang P, Wu P, Cheewatrakoolpon G, Myers JG, Egan RW, Billah MM. Selective inhibition of IL-5 receptor α -chain gene transcription by IL-5, IL-13 and granulocyte-macrophage colony stimulating factor in human blood eosinophils. *J Immunol* 1998; 160: 4427–32.
26. Abbas KA. Cellular and molecular immunology, W.B. Saunders Company, 1997: 249–78.
27. Van der Bruggen T, Koenderman L. Signal transduction in eosinophils. *Clin and Exp Allergy* 1996; 26: 880–91.
28. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998; 281 (5381): 1322–26.
29. Brajušković G, Škaro Milić A, Cerović S, Marjanović S, Knežević Ušaj S, Čizmić M, et al. Familija Bcl 2 proteina kod malignih bolesti. *Vojnosanit Pregl* 2004; 61(3): 305–10.
30. Makin G, Hickman JA. Apoptosis and cancer chemotherapy. *Cell Tissue Res* 2000; 301 (1): 143–52.
31. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995; 267 (5203): 1456–62.
32. Katoch B, Sebastian S, Sahdev S, Padh H, Hasnain SE, Begum R. Programmed cell death and its clinical implications. *Indian J Exp Biol* 2002; 40(5): 513–24.
33. Rutledge SE, Chin JW, Schepartz A. A view to a kill: ligands for Bcl-2 family proteins. *Curr Opin Chem Biol* 2002; 6 (4): 479–85.
34. Mareel M, Leroy A. Clinical, cellular and molecular aspects of cancer invasion. *Physiol Rev* 2003; 83(2): 337–76.
35. Adachi T, Motojima S, Hirata A, Fukuda T, Kihara N, Kosaku A. Eosinophil apoptosis caused by theophylline, glucocorticoids and macrolides after stimulation with IL-5. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 6 (98): 207–15.
36. Korsmeyer SJ. Bcl-2 gene family and the regulation of programmed cell death. *Cancer Res* 1999; 59 (7 suppl): 1693s–700s.
37. Korsmeyer SJ, Shutter JR, Veis DJ, Merry DE, Oltvai ZN. Bcl 2/Bax: a rheostat that regulates an anti-oxidant pathway and cell death. *Semin Cancer Biol* 1993; 4(6): 327–32.
38. Reed JC, Miyashita T, Takayama S, Wang HG, Sato T, Krajewski S. Bcl-2 family proteins: regulators of cell death involved in the pathogenesis of cancer and resistance to therapy. *J Cell Biochem* 1996; 60(1): 23–32.
39. Murphy KM, Ranganathan V, Farnsworth ML, Kavallaris M, Lock RB. Bcl-2 inhibits Bax translocation from cytosol to mitochondria during drug-induced apoptosis of human tumor cells. *Cell Death Differ* 2000; 7(1): 102–11.
40. Pratico D, Basili S, Vieri M, Cordova C, Violi F, Fitzgerald GA. Chronic obstructive pulmonary disease is associated with an increase of isoprostane F2 α -III, an index of oxidant stress. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158:1709–14.
41. Montuschi P, Collins JV, Ciabattini G, Lazzeri N, Corradi M, Kharitonov SA, et al. Exhaled 8-isoprostane as an *in vivo* biomarker of lung oxidative stress in patients with COPD and healthy smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162:1175–7.
42. Dekhuijzen PN, Aben KK, Dekker I, Aarts LP, Wielders PL, Van Herwaarden CL, et al. Increased exhalation of hydrogen peroxide in patients with stable and unstable chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154: 813–16.
43. Maziak W, Loukides S, Culpitt S, Sullivan P, Kharitonov SA, Barnes PJ. Exhaled nitric oxide in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 998–1002.
44. Jukema JW. New insights into atherosclerosis. *Cardiologie* 2000; 7: 37–40.
45. Dimayuga E, Stober M, Kayes SG. Eosinophil peroxidase levels in hearts and lungs of mice infected with *Toxocara canis*. *J Parasitol* 1991; 77: 461.
46. Bowler RP, Crapo JD. Oxidative stress in allergic respiratory diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110: 349–56.
47. Lawrence T, Willoughby DA, Gilroy DW. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. *Immunology* 2002; 2: 787–95.
48. Domachowske JB, Bonville CA, Easton AJ, Rosenberg HF. Pulmonary eosinophilia in mice devoid of interleukin-30. *J Leukoc Biol* 2002; 71: 966–72.

49. Kips JC, O'Connor BJ, Langley SJ, Woodcock A, Kerstjens HAM, Postma DS, et al. Effect of SCH55700, a humanized antihuman interleukin-5 antibody in severe persistent asthma. *Am J Res Crit Care Med* 2003; 167: 1655–59.
50. Williams TJ. The eosinophil enigma. *J Clin Invest* 2004; 113 (4): 507–9.
51. Tobin MJ. Asthma, airway biology, and nasal disorders in AJRCCM 2003. *Am J Res Crit Care Med* 2004; 169 (2): 265–76.
52. Flood-Page P, Menzies-Gow A, Phipps S, Ying S, Wangoo A, Ludwig MS, et al. Anti-IL-5 treatment reduces deposition of ECM proteins in the bronchial subepithelial basement membrane of mild atopic asthmatic. *J Clin Invest* 2003; 112 (7): 1029–36.
53. Kay BA, Menzies-Gow. Eosinophils and interleukin-5: the debate continues. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167 (12): 1586–7.
54. Flood-Page PT, Menzies-Gow AN, Kay AB, Robinson DS. Eosinophil's role remains uncertain as anti-interleukin-5 only partially depletes numbers in asthmatic airway. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167: 199–204.
55. Kanazawa H, Nomura S, Yoshikawa J. Role of microvascular permeability on physiologic differences in asthma and eosinophilic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 169 (10): 1125–30.
56. Grootendorst DC, Rabe KF. Mechanisms of bronchial hyperreactivity in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Proceedings of the ATS* 2004; 1 (2): 77–87.
57. Brightling CE, Pavord ID, Flood-Page PT, Menzies-Gow AN, Kay AB, Robinson DS. Eosinophils in asthma and airway hyperresponsiveness. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 169 (1): 131–3.
58. Busse WW, Kelly AEB. Is the eosinophil a »humpty dumpty« cell in asthma? *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167 (2): 102–3.
59. Liu LY, Sedgwick JB, Bates ME, Vrtis RF, Gern JE, Kita H, et al. Decreased expression of membrane IL-5 receptor α on human eosinophils: I. Loss of membrane IL-5 receptor α on airway eosinophils and increased soluble IL-5 receptor α in the airway after allergen. *J Immunol* 2002; 169: 6452–58.
60. Gagliardo R, Chanez P, Mathieu M, Bruno A, Costanzo G, Gougat C, et al. Persistent activation of nuclear factor-kappaB signaling pathway in severe uncontrolled asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168: 1190–8.
61. Rahman I. Oxidative stress, transcription factors and chromatin remodelling in lung inflammation. *Biochem Pharm* 2002; 64: 935–42.
62. Chow CW, Abreu MTH, Suzuki T, Downey GP. Oxidative stress and acute lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003; 29: 427–31.
63. Urso ML, Clarkson PM. Oxidative stress, exercise and antioxidant supplementation. *Toxicology* 2003; 189: 41–54.
64. Heunks LMA, Dekhuijzen PNR. Respiratory muscle function and free radicals: from cell to COPD. *Thorax* 2000; 55: 704–16.
65. Del Donno M, Verduri A. Oxidants and antioxidants in pulmonary diseases. *European Respiratory News supplemental issue* 2000: 1–48.
66. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002; 82: 47–930.
67. Popper HH, Pailer S, Wurzing G, Feldner H, Hesse C, Eber E. Expression of adhesion molecules in allergic lung diseases. *Virchows Arch* 2002; 440 (2): 172–80.
68. Piotrowski WJ, Marezak J. Cellular sources of oxidants in the lung. *Int J Occup Med Environ Health* 2000; 13 (4): 369–830.
69. Klings ES, Farber HW. Role of free radicals in the pathogenesis of acute chest syndrome in sickle cell disease. *Respir Res* 2001; 2: 280–5.

Rad primljen: 9. 8. 2004

Prihvaćen za štampu: 25. 8. 2004