

Badania wybranych fenotypów limfocytów T pochodzących z migdałków gardłowych dzieci chorujących na alergiczny nieżyt nosa i dzieci nieatopowych

Assessments of chosen T lymphocytes phenotypes in nasal associated lymphoid tissue in allergic and non-allergic children

ANNA ZAKRZEWSKA^{1/}, SŁAWOMIR CHRUL^{2/}, DANUTA GRZYCZYŃSKA^{1/}

^{1/}Klinika Otolaryngologii Audiologii i Foniatrii Dziecięcej, Katedra Pediatrii Zabiegowej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

^{2/}Klinika Chorób Dzieci, Pracownia Cytofluorymetrii, I Katedra Pediatrii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Wprowadzenie. Na rozwój chorób alergicznych mają wpływ mechanizmy regulatorowe. Hamują one reakcje IgE-zależne na alergeny u osób nieatopowych. W mechanizmie tym biorą udział limfocyty regulatorowe CD4+ oraz CD8+. Istnieją doniesienia o znaczeniu niedoborów limfocytów CD4+CD25+ we krwi obwodowej w rozwoju chorób alergicznych, natomiast brak jest informacji o ich znaczeniu w tkance limfatycznej związanej z błonami śluzowymi.

Cel pracy. Celem pracy było zbadanie fenotypów CD4+CD25+ oraz CD8+CD25+ limfocytów T migdałka gardłowego u dzieci chorujących na alergiczny nieżyt nosa.

Materiał i metody. Badaniami objęto 46 dzieci, w wieku od 4 do 9 lat, płci obojga, 25 chorujących na przewlekły alergiczny nieżyt nosa wywołany alergenami roztoczy kurzu oraz 21 dzieci bez cech atopii. Na podstawie badań cytofluorymetrycznych oceniono liczbę komórek wykazujących ekspresję antygenów CD3, CD3CD4, CD3CD8, CD4CD25, CD4CD152, CD8CD25, CD8CD152. Przeprowadzono analizę statystyczną różnic ilościowych poszczególnych fenotypów limfocytów w obu grupach badawczych.

Wyniki. Stwierdzono istotne różnice liczby limfocytów T o fenotypie CD8CD25 w migdałku gardłowym dzieci chorujących na alergiczny nieżyt nosa z porównaniem z dziećmi nieatopowymi.

Stwierdzono istotne różnice dotyczące fenotypu CD8+CD25+ pomiędzy dziećmi chorującymi na alergiczny nieżyt nosa a dziećmi bez cech atopii ($p < 0,05$). Różnice nieistotne statystycznie dotyczyły fenotypu CD8+CD152+. Nie stwierdzono istotnych różnic dotyczących badanych fenotypów limfocytów CD4+.

Wnioski. W tkance limfatycznej związanej z błoną śluzową nosa dzieci chorujących na alergiczny nieżyt nosa stwierdzono mniej limfocytów o fenotypie CD8+CD25+ oraz CD8+CD152+ niż u dzieci nieatopowych. Uzyskane wyniki mogą wskazywać na udział regulacji CD4 i CD8 zależnej w syntezie IgE w tkance limfatycznej związanej z błoną śluzową nosa.

Słowa kluczowe: migdałek gardłowy, limfocyty CD4+CD25+, CD8+CD25+, alergiczny nieżyt nosa, dzieci

Introduction. The role of regulatory mechanism of CD4+ and CD8+ lymphocytes, suppressing IgE-dependent reactions in non-atopic subjects, in development of allergy diseases has been confirmed. The decrease of CD4+CD25+ in blood in allergic patients was recognized to play a prominent role in the maintenance of immunological balance. However, the role of CD4+CD8+ regulatory components in mucosal lymphoid tissue is still unknown.

Aim. We aimed to analyze the percentage of CD4+CD25+ and CD8+CD25+ T lymphocytes present in adenoids of allergic and non-allergic children.

Material and methods. 25 children suffering from allergic rhinitis and 21 non-allergic children were qualified to the study. Adenoid tissue obtained during adenoidectomy was assessed. The number of CD3+, CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD4+CD25+, CD4+CD152+, CD8+CD25+, CD8+CD152+ cells in adenoids tissue was analyzed by flow cytometry.

Results. The number of CD8+CD25+ was significantly different in allergic versus non-allergic groups ($p < 0,05$). Differences, although statistically insignificant, in CD8+CD152+ T cells was also confirmed. No significant differences were detected in the number of the study phenotypes CD4+.

Conclusions. Less CD8+CD25+ and CD8+CD152+ cells were detected in the lymphatic tissue associated with nasal mucosa of children suffering from allergic rhinitis than in the non-allergic children. The results suggest that the mechanisms affecting regulators of IgE synthesis in the lymphatic tissue differ from those prevailing in the blood.

Key words: adenoid, CD4+CD25+-, CD8+CD25+cells, allergic rhinitis, children

WSTĘP

Aktywacja limfocytów pomocniczych T typu 2 (Th2) odgrywa dominującą rolę w rozwoju uczulenia na alergeny takie, jak pyłki roślin, sierść kota czy też roztocze kurzu domowego, co prowadzi do rozwoju chorób alergicznych, w tym alergicznego nieżytu nosa, astmy czy też atopowego zapalenia skóry. Pomimo wielu badań, uwzględniających zarówno predyspozycje genetyczne jak i wpływ czynników środowiskowych, nie udało się wyjaśnić problemu, dlaczego tylko niektórzy ludzie rozwijają odpowiedź typu Th2, a inni nie. Jedną z teorii wyjaśniających rozwój chorób alergicznych oparta jest o działanie mechanizmów regulatorowych hamujące reakcje IgE-zależne na alergeny u osób nieatopowych [1,2]. W mechanizmie tym biorą udział limfocyty regulatorowe o fenotypie CD4+ oraz CD8+. CD4 jest markerem pomocniczych limfocytów T, które oddziałując na limfocyty B powodują produkcję immunoglobulin, albo poprzez działanie cytokin aktywują inne komórki. Mechanizm blokowania reakcji IgE zależnych poprzez limfocyty T CD8+ jest związany z interferonem gamma (INF-gamma). Polega on albo na bezpośrednim hamującym wpływie INF-gamma (z komórek CD8+) na produkcję IgE przez limfocyty B, albo pośrednio na zmianie fenotypu limfocytów Th2 w Th1 [3].

Molekuła CD25 jest częścią receptora IL-2. Limfocyty T CD4+, które posiadają receptor dla IL-2 stanowią jeden z rodzajów limfocytów regulatorowych, które stwierdzane są we krwi obwodowej a powstają w grasicy [4-6]. Uważa się, że komórki te blokują potencjalnie patologiczne, Th2-zależne reakcje na alergeny. Jednakże obecność antygeny CD25 jest cechą charakterystyczną wszystkich aktywowanych limfocytów T.

Tkanka limfatyczna związana z błoną śluzową nosa jest miejscem, w którym działanie czynników uruchamiających lub blokujących odpowiedź typu IgE na kontakt z alergenem jest bardzo prawdopodobne. W wielu badaniach wykazano liczne dowody wyraźnie większej aktywności immunologicznej w obrębie migdałka gardłowego u dzieci chorujących na alergiczny nieżyt nosa niż u pacjentów nieatopowych, u których częstość i rodzaj dolegliwości infekcyjnych była bardzo zbliżona [7-9].

Mechanizmy regulacyjne w obwodowych narządach limfatycznych leżące u podstaw rozwoju choroby alergicznej są nadal niejednoznaczne, dlatego postanowiono ocenić limfocyty T o fenotypie CD4+CD25+ oraz CD8+CD25+ izolowane z migdałków gardłowych dzieci chorujących na alergiczny nieżyt nosa oraz u dzieci nieatopowych.

MATERIAŁ I METODY

Pacjenci

Badaniami objęto 46 dzieci w wieku od 4 do 10 lat (średnia wieku 6,82±2,07) płci obojga (26 chłopców oraz 19 dziewcząt). U 25 dzieci stwierdzono alergiczny nieżyt nosa, w tym u pięciorga rozpoznano astmę oskrzelową (średnia wieku 7,14±1,96). U wszystkich stwierdzono uczulenie na roztocza kurzu domowego, u 16 na pyłki traw, 9 drzew, oraz chwastów, 10 dzieci wykazywało nadwrażliwość na pleśń a 7 na alergeny kota.

21 dzieci stanowiących grupę porównawczą nie wykazywało cech atopii, nie stwierdzano też u nich rodzinnego występowania chorób alergicznych (średnia wieku 6,68±2,43).

Wszystkie dzieci leczono operacyjnie w Klinice Otolaryngologii Dziecięcej z ustalonych uprzednio wskazań do usunięcia migdałka gardłowego. Do przedstawionych badań wybrano tylko te dzieci, które w okresie 3 tygodni poprzedzających adenotomię nie chorowały na ostrą infekcję górnych dróg oddechowych, nie stwierdzono u nich alergizacji paciorkowcowej oraz nie otrzymywały w tym czasie steroidów systemowych i donosowych a także leczenia immunostymulacyjnego. Wszystkie badane dzieci miały ocenianą morfologię krwi w zakresie białego i czerwonego obrazu z analizą liczby granulocytów kwasochłonnych.

Ocena limfocytów z migdałków gardłowych

Migdałki bezpośrednio po usunięciu umieszczano w 0,9% NaCl o temperaturze 4°C. Następnie w małej ilości buforu RPMI lub PBS na szalce Petriego cięto je ostrym nożem oraz przecierano przez sitko (40 mikrometrów) do próbki przepłukując tym samym buforem. Po przetarciu komórki zawieszano w płynie do objętości 10-15 ml i odwirowywano dwukrotnie Zawiesinę komórek o gęstości ok. 2x10⁶/ml barwiono stosując p-ciała monoklonalne sprzężone z fluorochromami CD4 FITC, CD8FITC, CD25PE, CD152PE, CD3 PerCp (BD BIOSCIENCES). Następnie płukano i utrwalano Cellfixem (BD BIOSCIENCES).

Akwizycję i analizę znakowanych komórek prowadzono przy użyciu cytometru przepływowego FACSCalibur firmy Becton Dickinson stosując bramkę CD3/SSC.

Analiza statystyczna

Przeprowadzono analizę ocenianych wartości wykorzystując pakiet STATISTICA 6. Zastosowano nieparametryczną analizę wykorzystując test par Wilcoxona, ustalając znamienne różnice ilości poszczególnych fenotypów limfocytów w za-

leżności od obecności lub braku choroby alergicznej na poziomie $p < 0,05$.

Test korelacji rang Spaermann'a zastosowano dla oceny korelacji pomiędzy fenotypami limfocytów T a liczbą granulocytów kwasochłonnych w morfologii krwi.

WYNIKI

Oceniono liczbę limfocytów T o fenotypie CD3+CD4+, CD4+CD25+, CD3+CD8+, CD8+CD25+ oraz CD3+CD4+, CD4+CD152+, CD3+CD8+, CD8+CD152+ u dzieci chorujących na alergiczny nieżyt nosa oraz u dzieci bez cech atopii. Podstawowe statystyki opisowe przedstawiono w tabeli I.

Przeprowadzona analiza statystyczna dotycząca różnic ilościowych poszczególnych fenotypów badanych limfocytów T pozwoliła na stwierdzenie istotnych statystycznie różnic pomiędzy liczebnością populacji komórek CD8+CD25+ u dzieci zdrowych a dziećmi chorującymi na alergiczny nieżyt nosa ($p < 0,05$).

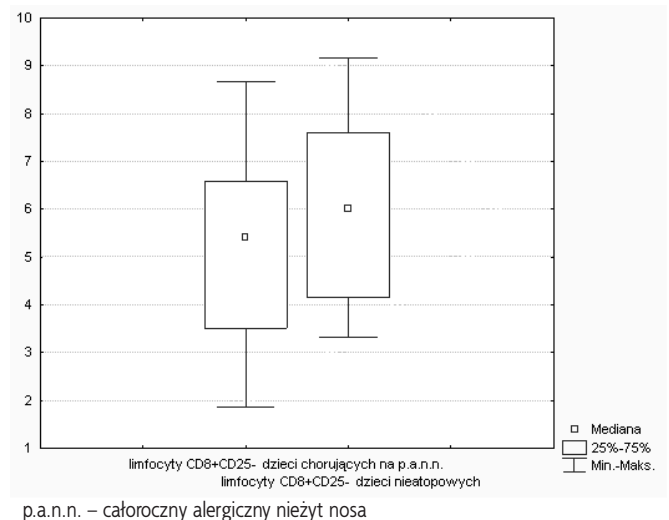
Dla limfocytów o fenotypie CD3CD4 wartość $p = 0,91$, dla CD4+CD25+ $p = 0,4$, dla CD3+CD8+ $p = 0,78$, dla CD4+CD152+ $p = 0,87$, natomiast dla limfocytów o fenotypie CD8CD152 $p = 0,061$.

Obliczono wartość odsetkową, jaką stanowią limfocyty T o fenotypie CD4+CD25+ oraz CD4+CD152+ w ogólnej puli limfocytów T CD4+ migdałka gardłowego, a także CD8+CD25+ oraz CD8+CD152+ w puli limfocytów T CD8+. Podstawowe charakterystyki statystyczne oraz istotność statystyczną różnic procentowych tych fenotypów limfocytów T w migdałkach gardłowych dzieci chorujących na alergiczny nieżyt nosa i dzieci bez cech atopii przedstawiono w tabeli II.

Tabela II. Różnice odsetkowego udziału ocenianych fenotypów limfocytów w puli limfocytów T CD4+ oraz CD8+ pomiędzy dziećmi chorującymi na alergiczny nieżyt nosa a dziećmi nieatopowymi

Proteina	Dzieci alergiczne	Dzieci bez cech atopii	Istotność
%CD4CD25	x-24,43 +/-3,59	x-23,45 +/-3,49	$p > 0,05$
%CD8CD25	x-26,34 +/-8,52	x-32,07 +/-12,97	$p < 0,05$
%CD4CD152	x-8,85 +/-2,83	x-19,06 +/-7,96	$p > 0,05$
%CD8CD152	x-8,67 +/-2,53	x-22,26 +/-8,56	$p = 0,062$

Stwierdzono istotne statystycznie różnice pomiędzy procentowym udziałem limfocytów T o fenotypie CD8+CD25+ w migdałku gardłowym dzieci chorujących na alergiczny nieżyt nosa i dzieci nie wykazujących cech atopii. Podobnie, choć nieznamienne statystycznie, większy udział procentowy stanowiły u dzieci chorujących na alergiczny nieżyt nosa limfocyty T CD8+ wykazujące błonową ekspresję CD152.



Rycina 1. Linie limfocytów T CD8+CD25+ migdałka gardłowego w badanych grupach dzieci

Tabela I. Wielkości populacji badanych fenotypów limfocytów T z migdałków gardłowych

Liczba dzieci	Dzieci bez cech atopii			Proteina	Liczba dzieci	Dzieci chorujące na alergiczny nieżyt nosa		
	Liczba komórek					Liczba komórek		
	Mediana	Minimum	Maksimum			Mediana	Minimum	Maksimum
25	78,88	67,91	88,86	CD3+CD4+	21	78,61	65,6	87,33
25	18,85	15,31	24,77	CD4+ CD25+	21	18,41	13,22	22,83
25	20,28	9,87	28,34	CD3+CD8+	21	20,66	8,58	34,30
25	5,39	1,87	8,67	CD8+ CD25+	21	6,0	3,31	9,16
25	78,63	67,62	88,85	CD3+CD4+	21	78,83	65,07	87,44
25	6,92	2,63	10,85	CD4+ CD152+	21	6,38	4,75	12,64
25	19,81	9,62	28,90	CD3+CD8+	21	20,53	8,88	34,98
25	4,0	1,29	7,49	CD8+ CD152+	21	3,93	2,57	9,67
25	4,5	1,0	28,0	Granul. kwas.	21	3,0	2,0	10,0

Nie ustalono korelacji pomiędzy wzrostem liczby granulocytów kwasochłonnych w morfologii krwi badanych dzieci a liczbą limfocytów T CD8+CD25+ lub CD8+CD152+ w migdałku gardłowym dzieci chorujących na alergiczny nieżyt nosa $p > 0,05$.

DYSKUSJA

W przeprowadzonych badaniach stwierdzono znamienne większą liczbę limfocytów o fenotypie CD8+CD25+ u dzieci bez cech atopii w porównaniu z dziećmi chorującymi na alergiczny nieżyt nosa. Różnice pomiędzy dziećmi atopowymi i nieatopowymi, lecz nieznamienne statystycznie, dotyczyły także populacji CD8+CD152+ limfocytów T migdałka gardłowego. Nie wykazano natomiast różnic pomiędzy liczbą limfocytów T o fenotypie CD4+CD25+ w migdałku gardłowym dzieci atopowych i nieatopowych.

Na udział subpopulacji limfocytów CD8+ w hamowaniu odpowiedzi IgE na drodze interakcji z komórkami dendrytycznymi produkującymi IL-12 zwraca uwagę Kemeny i MacAry [10,11].

Rolę tej generacji komórek CD8+, która moduluje syntezę IgE w przebiegu immunoterapii swoistej podkreśla Jutel oceniając ich działanie jako warunek skutecznego leczenia [12].

W przedstawionych badaniach nie zaobserwowano różnic, związanych z obecnością lub brakiem atopii, w populacji komórek migdałka o fenotypie CD4+CD25+.

W badaniach Ling dotyczących krwi obwodowej pacjentów z pyłkowicą stwierdzono wyraźnie mniejszą liczbę tych komórek niż u osób zdrowych. Limfocyty te, mające fenotyp regulatorowych, były mniej liczne nawet poza okresem ekspozycji na alergeny pyłkowe [3]. Limfocyty T o fenotypie CD4+CD25+ produkowane są w grasicy, ale autorzy nie wykluczają możliwości ich powstania także w obwodowym układzie immunologicznym [3,4].

W przedstawionych badaniach dotyczących migdałka gardłowego liczba limfocytów T CD4+CD25+ była bardzo zbliżona do stwierdzonej u dzieci chorujących na alergiczny nieżyt nosa i nieatopowych. Thornton w swoich badaniach udowodnił, że efektorowa funkcja supresyjna CD4+CD25+ jest niespecyficzna dla antygeny [13].

Ustalono, że limfocyty regulatorowe CD4+CD25+ mają prawie zawsze ekspresję CTLA4 (CD152) [13-15]. Brak natomiast jednoznacznych doniesień

dotyczących ekspresji CD152 na limfocytach CD8+, ale obecność tej proteiny na powierzchni pobudzonych komórek zawsze uruchamia procesy cytotoksyczne. Regulatorowe limfocyty T CD25+ hamują tak samo produkcję cytokin i proliferację konwencjonalnych CD25-CD4+limfocytów T jak przez CD8+ kontrolowanych limfocytów T Th1 [16,17].

W prezentowanych badaniach w migdałku gardłowym, będącym częścią NALT, istotnie mniejsza liczba limfocytów T o fenotypie CD8+CD25+, także CD8+CD152+ występowała u dzieci chorujących na przewlekły nieżyt nosa wywołany alergenami roztoczy. Nie obserwowano natomiast różnic liczby komórek o fenotypie CD4+CD152+. Badania prowadzone były poza okresem ekspozycji na pyłki roślin od jesieni do wiosny, a badane dzieci prezentowały objawy alergicznego nieżyty nosa o miernym nasileniu.

Migdałek gardłowy nie posiada naczyń limfatycznych doprowadzających, a limfocyty T z krwi obwodowej dostają się do wnętrza migdałka poprzez naczynia żyłne z wysokim nabłonkiem. Aktywny transport tych limfocytów, z udziałem ICAM-1 jest znacznie skuteczniejszy dla limfocytów CD8+ niż CD4+ [18,19].

W kontekście wyżej wymienionych spostrzeżeń uzyskane wyniki mogą wskazywać na inne w tkance limfatycznej (zależne od limfocytów CD8+CD25+) niż we krwi obwodowej (zależne od limfocytów CD4+CD25+) mechanizmy wpływające także na regulację syntezy IgE.

Jednakże opisywana w piśmiennictwie bardzo istotna różnica limfocytów regulatorowych CD4+CD25+ we krwi obwodowej u pacjentów z pyłkowicą wskazuje na potrzebę sprawdzenia przedstawionych badań w migdałku gardłowym porównawczo u dzieci chorujących na sezonowy nieżyt nosa, wywołany alergenami pyłków roślin i całoroczny nieżyt nosa, wywołany alergenami roztoczy.

WNIOSKI

Stwierdzono istotne różnice liczby limfocytów T o fenotypie CD8 CD25 w migdałku gardłowym dzieci chorujących na alergiczny nieżyt nosa z porównaniu z dziećmi nieatopowymi.

Badania finansowane przez Uniwersytet Medyczny w Łodzi w ramach tematu badawczego 502-11-215

Piśmiennictwo

1. Holt GP, Sly PD. Emerging concept of T-cell regulation in asthma and allergy. *Allergy Clin Immunol Int* 2003; 15: 255-60.
2. Mason D, Powrie F. Control of immune pathology by regulatory T cells *Curr Opin Immunol* 1998; 10: 649-55.
3. Ling EM, Smith T, Nguyen XD, Pridgeon C, Dallman M, Arbery J, Carr VA, Robinson DS. Relation of CD4+CD25+ regulatory T-cell suppression of allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease. *Lancet* 2004; 363: 608-15.
4. Maloy KJ, Powrie F. Regulatory T cells In the control of immune pathology. *Nature Immunol* 2001; 2: 816-22.
5. Cottrez F, Hurst SD, Coffman RL, Groux H. T regulatory cells inhibit a Th2-specific response In vivo. *J Immunol* 2000; 165: 4848-53.
6. Bellinghausen I, Klostermann B, Knop J, Saloga J. Human CD4+CD25+ T cells derived from the majority of atopic donors are able to suppress Th1 and Th2 cytokine production. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111: 862-68.
7. Papatziomos G, van der Ploeg, Hemloun C, Patwardhan A, Scheynius A. Increased occurrence of IgE+ and FcεRI+ cells in adenoids from atopic children. *Allergy* 1999; 54: 916-23.
8. Fokkens WJ, VinkeJG, de Jong SS, Bogaert DP, Kleinjan A, Eichhorn E. Differences in cellular infiltrates in the adenoid of allergic children compared with age- and gender-matched controls. *Cin Exp Allergy* 1998; 28: 187-95.
9. Zakrzewska A, GryczyńskaD, Kobos J, Górski P. Expression of Fas-L and CTLA4 in adenoids has predictive value for allergic rhinitis development in children. *Int Arch Allergy Immunol* 2006; 140: 223-30.
10. Kemeny DM. CD8 Tc1 and Tc2 cell subsets inhibit IgE responses through the interaction with Il-12 producing Dcs. *Alergia Astma Immunol* 2000; 5(supl 2): 66-67.
11. MacAry PA, Holmes BJ, Kemeny DM. Ovalbumin-specific, MHC class I-restricted, alpha beta-positive, TC1 and Tc2 CD8 cell clones mediate the in vivo inhibition of rat IgE. *Immunol* 1998; 160: 580-7.
12. Jutel M, Muller Up, Fricker M, Rihs S, Pichler WJ, Dahinden C. Influence of bee venom immunotherapy on degranulation and leukotriene generation in human blood basophils. *Clin Exp Allergy* 1996; 25: 1205-10.
13. Horton AM, Shevach EM. Suppressor effector function of CD4+CD25+immunoregulatory T cells is antygen nonspecific. *J Immunol* 2000; 164: 183-89.
14. Jonuleit HE, Schmidt H, Kakirman H i wsp. Infectious tolerance: human CD25+regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4+ T helper cells. *J Exp Med* 2002; 196: 255-9.
15. Chai J, Tsang JY, Lechlerr, Simpson E, Dyson J, Scott D. CD4+CD25+ T cells as immunoregulatory T cells In vitro. *Eur J Immunol* 2002; 32: 2365-72.
16. Thornton AM, Shevach EM. CD4+CD25+immuno-regulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med* 1998; 188: 287-94.
17. Piccirillo CA, Shevach EM. Cutting Edg: control of CD8+Tcell activation by CD4+CD25+ immunoregulatory cells. *J Immunol* 2001; 167: 1137-42.
18. Slavin-Chiorini D, Catalfammo N, Kudo-Sainto BL. Amplification of the lytic potential of effector/memory CD8+ cells by Victor-based enhancement of ICAM-1 (CD45) in target cells: implification for intratumoral vaccine therapy. *Can Gene Ther* 2004; 111: 5-68
19. Ridan M, Becker P, Past R. Differences In lymphocyte subset In the Wall of high endothelial venules and lymphatics of human palatoinae tonsils. *Scan J Immunol* 2000; 51: 372-76.