



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas



Lietuvos sveikatos mokslų universitetas

Farmacijos fakultetas

Eozinofilų potipių užląstelinių spąstų formavimosi skirtumai sergant astma

Baigiamasis magistro projektas

Rytė Jurkutė

Projekto autorė

dr. Andrius Januškevičius

Vadovas

Kaunas, 2026



Kauno technologijos universitetas
Cheminės technologijos fakultetas



Lietuvos sveikatos mokslų universitetas
Farmacijos fakultetas

Eozinofilų potipių užląstelinių spąstų formavimosi skirtumai sergant astma

Baigiamasis magistro projektas
Medicininė chemija (6281CX001)

Rytė Jurkutė

Projekto autorė

dr. Andrius Januškevičius

Vadovas

prof. Skaidrius Miliauskas

Recenzentas

Kaunas, 2026



Kauno technologijos universitetas
Cheminės technologijos fakultetas



Lietuvos sveikatos mokslų universitetas
Farmacijos fakultetas

Rytė Jurkutė

Eozinofilų potipių užląstelinių spąstų formavimosi skirtumai sergant astma

Akademinio sąžiningumo deklaracija

Patvirtinu, kad:

1. baigiamąjį projektą parengiau savarankiškai ir sąžiningai, nepažeisdama kitų asmenų autoriaus ar kitų teisių, laikydamasi Lietuvos Respublikos autorių teisių ir gretutinių teisių įstatymo nuostatų, Kauno technologijos universiteto (toliau – KTU) ir Lietuvos sveikatos mokslų universiteto (toliau – LSMU) intelektinės nuosavybės valdymo ir perdavimo nuostatų bei KTU ir LSMU akademinės etikos kodeksuose nustatytų etikos reikalavimų;
2. baigiamajame projekte visi pateikti duomenys ir tyrimų rezultatai yra teisingi ir gauti teisėtai, nei viena šio projekto dalis nėra plagijuota nuo jokių spausdintinių ar elektroninių šaltinių, visos baigiamojo projekto tekste pateiktos citatos ir nuorodos yra nurodytos literatūros sąrašė;
3. įstatymų nenumatytų piniginių sumų už baigiamąjį projektą ar jo dalis niekam nesu mokėjusi;
4. suprantu, kad išaiškėjus nesąžiningumo ar kitų asmenų teisių pažeidimo faktui, man bus taikomos akademinės nuobaudos pagal KTU ar LSMU galiojančią tvarką ir būsiu pašalinta iš KTU ar LSMU, o baigiamasis projektas gali būti pateiktas Akademinės etikos ir procedūrų kontrolieriaus tarnybai nagrinėjant galimą akademinės etikos pažeidimą.

Rytė Jurkutė

Patvirtinta elektroniniu būdu

Jurkutė, Rytė. Eozinofilų potipių užląstelinių spąstų formavimosi skirtumai sergant astma. Baigiamasis magistro projektas / vadovas dr. Andrius Januškevičius; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas; Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, Farmacijos fakultetas.

Studijų kryptis ir sritis (studijų krypčių grupė): chemija, fiziniai mokslai.

Reikšminiai žodžiai: astma, eozinofilai, eozinofilų potipiai, užląsteliniai spąstai, EETozė.

Kaunas, 2026. 53 p.

Santrauka

Astma yra lėtinė uždegiminė kvėpavimo takų liga, kurios patogenezėje svarbų vaidmenį atlieka eozinofilai. Eozinofilai nėra vienalytė ląstelių populiacija, todėl jų potipiai gali atlikti skirtingas funkcijas astmos patogenezėje. Rezidentiniai eozinofilai siejami su audinių homeostazės palaikymu, o uždegiminiai eozinofilai – su uždegiminiu atsaku, audinių pažeidimu ir ligos progresavimu. Vienas iš galimų eozinofilų aktyvumo mechanizmų yra užląstelinių spąstų formavimasis, tačiau šio proceso skirtumai tarp eozinofilų potipių sergant astma nėra ištirti.

Šio darbo tikslas buvo ištirti eozinofilų užląstelinių spąstų formavimosi skirtumus tarp eozinofilų potipių sergant astma. Tyrime dalyvavo 10 astma sergančių pacientų ir 6 sveiki asmenys. Iš periferinio kraujo buvo išskirti eozinofilai, atskirti jų potipiai, įvertintas mitochondrinės ir branduolinės kilmės užląstelinės DNR išsiskyrimas bei ištirta su eozinofilų užląstelinių spąstų formavimusi susijusių genų *PADI4*, *SYK*, *CYBB*, *RAC2* ir *TLR4* raiška.

Nustatyta, kad astmos pacientų rezidentiniai eozinofilai išskyrė didesnę mitochondrinės kilmės užląstelinės DNR kiekį nei uždegiminiai eozinofilai, o stimuliacija granulocitų ir makrofagų kolonijas stimuliuojančiu veiksmu šį procesą sustiprino. Branduolinės kilmės užląstelinių spąstų skirtumai tarp tirtų grupių nebuvo statistiškai reikšmingi. Vertinant su eozinofilų užląstelinių spąstų formavimusi susijusių genų raišką, astma sergančių pacientų grupėje nustatyta didesnė *CYBB* raiška uždegiminiuose eozinofiluose, didesnė *PADI4* raiška rezidentiniuose eozinofiluose ir mažesnė *SYK* raiška uždegiminiuose eozinofiluose. *TLR4* ir *RAC2* raiška tarp eozinofilų potipių reikšmingai nesiskyrė. Lyginant astma sergančius pacientus su sveikais asmenimis, rezidentiniuose eozinofiluose nustatyta padidėjusi *CYBB* ir *PADI4* raiška, o uždegiminiuose – sumažėjusi *SYK* ir *TLR4* raiška.

Tyrimo rezultatai rodo, kad sergant astma uždegiminiai ir rezidentiniai eozinofilai skiriasi pagal mitochondrinės kilmės užląstelinės DNR išsiskyrimą ir su eozinofilų užląstelinių spąstų formavimusi susijusių genų raišką. Tai leidžia manyti, kad šie potipiai gali būti nevienodai įsitraukę į užląstelinių spąstų formavimosi procesus. Šie skirtumai svarbūs geriau suprantant eozinofilų vaidmenį astmos patogenezėje ir ieškant naujų ligos biožymenų ir molekulinį taikinių.

Jurkute, Ryte. Differences in Extracellular Trap Formation among Eosinophil Subtypes in Asthma. Master's Final Degree Project / supervisor Dr. Andrius Januskevicius; Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology; Faculty of Pharmacy, Lithuanian University of Health Sciences.

Study field and area (study field group): Chemistry, Physical Sciences.

Keywords: asthma, eosinophils, eosinophil subtypes, extracellular traps, EETosis.

Kaunas, 2026. 53 pages.

Summary

Asthma is a chronic inflammatory airway disease in which eosinophils play an important role in asthma pathogenesis. Eosinophils are not a homogeneous cell population, therefore, their subtypes may perform different functions in the pathogenesis of asthma. Resident eosinophils are associated with the maintenance of tissue homeostasis, whereas inflammatory eosinophils are linked to the inflammatory response, tissue damage and disease progression. One of the possible mechanisms of eosinophil activity is the formation of extracellular traps. However, differences in this process between eosinophil subtypes in asthma have not been investigated.

The aim of this study was to investigate differences in eosinophil extracellular trap formation between eosinophil subtypes in asthma. The study included 10 patients with asthma and 6 healthy subjects. Eosinophils were isolated from peripheral blood, their subtypes were separated, the release of mitochondrial- and nuclear-derived extracellular DNA was evaluated, and the expression of genes associated with eosinophil extracellular trap formation, including *PADI4*, *SYK*, *CYBB*, *RAC2* and *TLR4*, was assessed.

It was found that resident eosinophils from asthma patients released a higher amount of mitochondrial-derived extracellular DNA than inflammatory eosinophils, while stimulation with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor enhanced this process. Differences in nuclear-derived extracellular trap formation between the studied groups were not statistically significant. Analysis of gene expression in patients with asthma revealed higher *CYBB* expression in inflammatory eosinophils, higher *PADI4* expression in resident eosinophils and lower *SYK* expression in inflammatory eosinophils. *TLR4* and *RAC2* expression did not differ significantly between eosinophil subtypes. When patients with asthma were compared with healthy subjects, increased *CYBB* and *PADI4* expression was observed in resident eosinophils, whereas decreased *SYK* and *TLR4* expression was detected in inflammatory eosinophils.

The results of this study indicate that eosinophil subtypes may differ in extracellular DNA release and in the expression of genes associated with eosinophil extracellular trap formation. These differences are important for a better understanding of the role of eosinophils in asthma pathogenesis and may contribute to the search for new disease biomarkers and molecular targets.

Turinys

Turinys.....	6
Lentelių sąrašas	8
Paveikslų sąrašas	9
Santrumpų sąrašas	10
Įvadas.....	12
1. Literatūros apžvalga	14
1.1. Astmos apibrėžimas, klinikinė raiška ir paplitimas.....	14
1.1.1. Eozinofilinės astmos patogenezė.....	15
1.1.2. Kvėpavimo takų remodeliacija.....	16
1.2. Eozinofilų biologinė reikšmė ir jų vaidmuo astmoje	18
1.2.1. Eozinofilų potipiai	19
1.3. Eozinofilų užląsteliniai spąstai	20
1.4. Užląstelinių spąstų biožymenys	22
1.4.1. Peptidilarginino deiminazė 4	22
1.4.2. Tirozino baltymų kinazė.....	23
1.4.3. NADPH oksidazė	24
1.4.4. Į Toll panašūs receptoriai	25
2. Medžiagos ir tyrimų metodai	26
2.1. Tiriamųjų atranka	26
2.2. Eozinofilų išskyrimas iš periferinio kraujo	26
2.3. Eozinofilų potipių išskyrimas.....	27
2.4. RNR skyrimai	28
2.5. Kopijinės DNR sintezė	28
2.6. Realus laiko polimerazės grandininė reakcija	29
2.7. Užląstelinės DNR kiekybinis nustatymas	30
2.7.1. Mitochondrinės kilmės užląstelinių DNR kiekybinis nustatymas.....	30
2.7.2. Branduolinės kilmės užląstelinių DNR kiekybinis nustatymas.....	31
2.8. Statistinė duomenų analizė	32
3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas.....	33
3.1. Tiriamųjų charakteristika.....	33
3.2. Užląstelinės DNR kiekybinis vertinimas tarp eozinofilų potipių.....	33
3.2.1. Mitochondrinės kilmės užląstelinės DNR kiekybinis vertinimas tarp eozinofilų potipių.....	33
3.2.2. Branduolinės kilmės užląstelinės DNR kiekybinis vertinimas tarp eozinofilų potipių.....	34
3.3. Su EEToze susijusių genų raiškos skirtumų vertinimas tarp eozinofilų potipių	36
3.3.1. <i>PADI4</i> geno raiška tarp eozinofilų potipių.....	36
3.3.2. <i>SYK</i> geno raiška tarp eozinofilų potipių	37
3.3.3. <i>CYBB</i> geno raiška tarp eozinofilų potipių	39
3.3.4. <i>RAC2</i> geno raiška tarp eozinofilų potipių	40
3.3.5. <i>TLR4</i> geno raiška tarp eozinofilų potipių	42
Rekomendacijos.....	44
Išvados	45
Literatūros sąrašas	46
Publikacijų sąrašas	53
Priedai.....	54

1 priedas. Bioetikos leidimas.....	54
------------------------------------	----

Lentelių sąrašas

1 lentelė. Reakcijos mišinio komponentai	29
2 lentelė. Termociklerio programa	29
3 lentelė. Tikro laiko PGR reakcijos mišinys	30
4 lentelė. 7500 Fast Real-Time PCR System aparato programa	30
5 lentelė. Tiriamųjų charakteristika	33

Paveikslų sąrašas

1 pav. Astmos patofiziologija [5].....	15
2 pav. Struktūriniai kvėpavimo takų pokyčiai sergant astma [12].....	17
3 pav. Kraujo tepinėlio mikroskopinis vaizdas	18
4 pav. NETozės, apoptozės ir nekrozės palyginimas [27]	20
5 pav. Skirtingi NETozės tipai: savižudiška, gyvybingoji ir mitochondrinė [29]	21
6 pav. PAD4 inicijuojama chromatinio dekondensacija NETozėje [40]	23
7 pav. Mac-1/Syk signalinio kelio vaidmuo užląstelinių spąstų susidaryme [45]	24
8 pav. Kraujo komponentų pasiskirstymas po centrifugavimo su Ficoll reagentu [55]	27
9 pav. Fazių susidarymas po centrifugavimo	28
10 pav. PicoGreen dsDNR standartinė kreivė.....	31
11 pav. Eozinofilų potipių skirtumai išskiriant mitochondrinius užląstelinius spąstus	34
12 pav. Eozinofilų potipių skirtumai išskiriant branduolinius užląstelinius spąstus	35
13 pav. Su EETOze susijusio <i>PADI4</i> geno raiškos skirtumai tarp eozinofilų potipių.....	36
14 pav. Su EETOze susijusio <i>PADI4</i> geno santykinės raiškos skirtumai sergančių asmenų grupėje, lyginant su sveikais asmenimis.....	36
15 pav. Su EETOze susijusio <i>SYK</i> geno raiškos skirtumai tarp eozinofilų potipių.....	38
16 pav. Su EETOze susijusio <i>SYK</i> geno santykinės raiškos skirtumai sergančių asmenų grupėje, lyginant su sveikais asmenimis.....	38
17 pav. Su EETOze susijusio <i>CYBB</i> geno raiškos skirtumai tarp eozinofilų potipių.....	39
18 pav. Su EETOze susijusio <i>CYBB</i> geno santykinės raiškos skirtumai sergančių asmenų grupėje, lyginant su sveikais asmenimis.....	40
19 pav. Su EETOze susijusio <i>RAC2</i> geno raiškos skirtumai tarp eozinofilų potipių	41
20 pav. Su EETOze susijusio <i>RAC2</i> geno santykinės raiškos skirtumai sergančių asmenų grupėje, lyginant su sveikais asmenimis.....	41
21 pav. Su EETOze susijusio <i>TLR4</i> geno raiškos skirtumai tarp eozinofilų potipių.....	42
22 pav. Su EETOze susijusio <i>TLR4</i> geno santykinės raiškos skirtumai sergančių asmenų grupėje, lyginant su sveikais asmenimis.....	42

Santrumpų sąrašas

CitH3 – citrulinuotas histonas H3;

DAMP (angl. *damage-associated molecular patterns*) – su pažeidimais susiję molekuliniai modeliai;

DPI (angl. *diphenyleneiodonium chloride*) – difenilenjodonio chloridas;

ECM (angl. *extracellular matrix*) – užląstelinis užpildas;

EETozė – procesas, kai eozinofilai išskiria užląstelinius spąstus;

ETozė (angl. *ETosis*) – procesas, kai imuninės ląstelės išskiria užląstelinius spąstus;

FeNO (angl. *fractional exhaled nitric oxide*) – dalinis iškvėptas azoto oksidas;

FEV₁ (angl. forced expiratory volume in 1 s) – priverstinio iškvėpimo tūris per 1 sek.;

GINA (angl. *Global Initiative for Asthma*) – visuotinė astmos iniciatyva;

GM-CSF (angl. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) – granulocitų ir makrofagų kolonijas stimuliuojantis veiksnys;

IgE – imunoglobulinas E;

IL – interleukinas;

ILC2 (angl. *group 2 innate lymphoid cells*) – 2-ojo tipo įgimtos limfoidinės ląstelės;

kDNR – kopijinė DNR;

LPS – lipopolisacharidas;

MACS (angl. *magnetic-activated cell sorting*) – magnetinės separacijos metodas;

MMP (angl. *matrix metalloproteinases*) – metaloproteinazės;

NADPH – nikotinamido adenino dinukleotido fosfatas;

NETozė – procesas, kai neutrofilai išskiria užląstelinius spąstus;

NOX – NADPH oksidazė;

PAMP (angl. *pathogen-associated molecular patterns*) – su patogenais susiję molekuliniai modeliai;

PGR – polimerazės grandininė reakcija;

PRR (angl. *pattern recognition receptors*) – modelių atpažinimo receptoriai;

RDF – reaktyviosios deguonies formos;

rEOS – rezidentiniai eozinofilai;

SYK (angl. *spleen tyrosine kinase*) – blužnies tirozino kinazė arba tirozino baltymų kinazė;
TGF (angl. *transforming growth factor*) – transformuojantis augimo veiksnys;
Th (angl. *T-helper cells*) – T limfocitai pagalbininkai;
TIMP (angl. *tissue inhibitors of metalloproteinases*) – metaloproteinazių inhibitoriai;
TLR (angl. *Toll-like receptors*) – į Toll panašūs receptoriai;
Treg – reguliaciniai T limfocitai;
TSLP (angl. *thymic stromal lymphopoietin*) – užkrūčio liaukos stromos limfopoetinas;
uEOS – uždegiminiai eozinofilai;
VEGF (angl. *vascular endothelial growth factor*) – kraujagyslių endotelio augimo veiksnys.

Įvadas

Astma yra viena iš labiausiai paplitusių lėtinių kvėpavimo takų ligų pasaulyje – ja serga daugiau kaip 300 milijonų žmonių. Šiai ligai būdingi pasikartojantys dusulio, švokštimo, kosulio ir spaudimo krūtinėje epizodai. Ligos metu susiaurėja kvėpavimo takai, sustorėja bronchų sienelės, padidėja gleivių sekrecija, todėl sutrinka oro pašalinimas iš plaučių ir blogėja paciento gyvenimo kokybė. Nors astmos simptomai gali būti kontroliuojami taikant inhaliuojamus steroidus, bronchus plečiančius vaistus ar biologinę terapiją, daliai pacientų liga vis tiek išlieka sunki [1, 2].

Astma yra heterogeniška liga, todėl jos klinikinė raiška ir patofiziologiniai mechanizmai gali skirtis tarp pacientų. Pagal molekulinis mechanizmus išskiriami skirtingi astmos endotipai, iš kurių vienas svarbiausių yra T2-aukšto tipo uždegimu pasižyminti eozinofilinė astma [3]. Šiam endotipui būdingas padidėjęs eozinofilų kiekis bei 2 tipo uždegimo citokinų (IL-4, IL-5 ir IL-13) aktyvumas. IL-5 yra pagrindinis citokinas atsakingas už eozinofilų brendimą, aktyvaciją, migraciją ir išgyvenamumą audiniuose [6, 7]. Patekę į kvėpavimo takus, eozinofilai išskiria citokinus, chemokinus, augimo faktorius ir lipidų mediatorius, kurie palaiko uždegiminį atsaką, skatina imuninių ląstelių pritraukimą ir audinių pažeidimą [9].

Ilgalaikis eozinofilinis uždegimas prisideda prie kvėpavimo takų remodeliacijos vystymosi. Jos metu formuojasi poepitelinė fibrozė, lygiųjų raumenų hipertrofija ir hiperplazija, epitelio pokyčiai, padidėjusi gleivių sekrecija ir angiogenezė kvėpavimo takuose. Šie struktūriniai pokyčiai dažnai yra negrįžtami [10 – 14]. Dėl to svarbu tirti mechanizmus, lemiančius eozinofilų aktyvumą ir jų poveikį kvėpavimo takų audiniams sergant astma.

Eozinofilai yra granulocitams priskiriamos imuninės ląstelės, kurių citoplazminėse granulėse yra biologiškai aktyvių baltymų: didžiojo bazinio baltymo, eozinofilų katijoninio baltymo, eozinofilų peroksidazės ir eozinofilų kilmės neurotoksino [17, 18]. Sergant astma per didelis eozinofilų aktyvumas ir kaupimasis plaučiuose tampa žalingas. Šios ląstelės palaiko 2 tipo uždegimą, pažeidžia kvėpavimo takų epitelį, didina gleivių sekreciją ir prisideda prie bronchų hiperreaktyvumo [9, 22].

Pastaraisiais metais vis daugiau dėmesio skiriama eozinofilų heterogeniškumui. Literatūroje aprašomi rezidentiniai (rEOS) ir uždegiminiai (uEOS) eozinofilų potipiai, kurie skiriasi savo funkcijomis [23]. rEOS siejami su audinių homeostazės palaikymu, galimu 2 tipo uEOS slopinimu, o uEOS, priešingai, siejami su uždegimo palaikymu, citolize ir audinių pažeidimu [24]. Vis dėlto šių potipių biologiniai skirtumai ir jų reikšmė astmos patogenezėje dar nėra iki galo išaiškinti.

ETozė – tai užląstelių spąstų formavimosi procesas, būdingas įvairioms imuninėms ląstelėms. Priklausomai nuo ląstelės tipo, išskiriamos skirtingos ETozės formos: neutrofilų užląstelių spąstų formavimasis vadinamas NEToze, o eozinofilų – EEToze. EETozės metu susidaro eozinofilų užląsteliniai spąstai, sudaryti iš DNR ir granulių baltymų, kurie gali sulaikyti ir neutralizuoti patogenus [25]. Išskiriami keli ETozės tipai: savižudiška ir gyvybingoji. Savižudiškos ETozės metu užląstelių spąstų pagrindą sudaro branduolio DNR. Šio proceso metu vyksta chromatino decondensacija, branduolio membranos irimas, branduolio DNR susimaišymas su granulių baltymais ir plazminės membranos plyšimas. Todėl savižudiška ETozė dažniausiai baigiasi ląstelės žūtimi, o procesas siejamas su NADPH oksidazės aktyvumu ir reaktyviųjų deguonies formų susidarymu [28–30]. Gyvybingosios ETozės metu ląstelė išlieka funkcionali, o į užląstelinę išskiriama mitochondrinė DNR, dažniausiai per pūsleles. Šis procesas vyksta greičiau, ne visada yra susijęs su ląstelės žūtimi ir nebūtinai priklauso nuo NADPH oksidazės [29].

Sergant astma, eozinofilų užląsteliniai spąstai gali tapti audinius pažeidžiančiu veiksnio. Jie didina kvėpavimo takų epitelio pralaidumą, skatina epitelio ląstelių netekimą ir uždegiminių citokinų išsiskyrimą [33]. Be to, eozinofilų užląsteliniai spąstai gali sąveikauti su 2-ojo tipo įgimtomis limfoidinėmis ląstelėmis ir skatinti IL-5 bei IL-13 išsiskyrimą, taip dar labiau stiprinant eozinofilinį uždegimą, gleivių sekreciją ir bronchų hiperreaktyvumą [34]. EETozės metu taip pat susidaro *Charcot-Leyden* kristalai, kurie didina gleivių klampumą ir prisideda prie jų kamščių formavimosi [36].

Užląstelinių spąstų formavimuisi svarbūs ne tik jų struktūriniai komponentai, bet ir ląstelės aktyvaciją reguliuojantys signaliniai keliai. Todėl, siekiant įvertinti EETozės aktyvumą, vien struktūrinių komponentų nustatymo nepakanka – svarbu analizuoti ir su šiuo procesu susijusių genų raiškos pokyčius. Literatūroje su EToze siejami šie baltymai: PAD4, SYK, NADPH oksidazė ir TLR4. Šie baltymai dalyvauja skirtinguose užląstelinių spąstų susidarymo etapuose: chromatino decondensacijoje, uždegiminių signalų perdavime, reaktyviųjų deguonies formų gamyboje ir patogenų atpažinime [40–55].

Šio darbo aktualumas siejamas su tuo, kad eozinofilų užląstelinių spąstų formavimasis potencialiai svarbus astmos patogenezės mechanizmas, tačiau jo skirtumai tarp eozinofilų potipių nėra ištirti. Kadangi rezidentiniai ir uždegiminiai eozinofilai skiriasi savo funkcijomis, galima manyti, kad jų gebėjimas formuoti užląstelinius spąstus taip pat gali skirtis. Šių skirtumų nustatymas galėtų padėti geriau suprasti eozinofilų potipių reikšmę astmos metu ir prisidėti prie naujų biožymenų ar molekulinų taikinių paieškos.

Darbo tikslas – ištirti eozinofilų užląstelinių spąstų formavimosi skirtumus tarp eozinofilų potipių sergant astma.

Darbo uždaviniai:

1. kiekybiškai įvertinti mitochondrinės kilmės užląstelinius spąstus skirtinguose eozinofilų potipiuose sergant astma;
2. kiekybiškai įvertinti branduolinės kilmės užląstelinius spąstus skirtinguose eozinofilų potipiuose sergant astma;
3. nustatyti kiekybinius su EEToze susijusių genų pokyčius tarp eozinofilų potipių sergant astma.

1. Literatūros apžvalga

1.1. Astmos apibrėžimas, klinikinė raiška ir paplitimas

Astma – tai lėtinė uždegiminė kvėpavimo takų liga, kuriai būdingi pasikartojantys simptomai: dusulys, švokštimas, kosulys ir gniaužimo jausmas krūtinėje. Astmos priepuolio metu susiaurėja kvėpavimo takai, nes bronchų sienelės sustorėja ir suintensyvėja gleivių sekrecija, todėl orui sunkiau pasišalinti iš plaučių. Dėl to pacientui tampa sunku kvėpuoti ir tai blogina gyvenimo kokybę [1].

Nors astma yra nepagydoma liga, jos simptomus galima kontroliuoti vartojant inhaliuojamus kortikosteroidus, bronchus plečiančius vaistus arba jų kombinaciją. Vis dėlto ilgalaikis didelių dozių inhaliuojamų steroidų vartojimas gali sukelti vietinius (pavyzdžiui, burnos ar ryklės dirginimą, skausmą, kandidozę) ir/arba sisteminius šalutinius poveikius (pavyzdžiui, osteoporozę, kataraktą ar glaukomą). Todėl šiuolaikinėje medicinoje pacientams, sergantiems sunkia astmos forma, skiriama biologinė terapija, kuri gali padėti palaipsniui sumažinti steroidinių vaistų poreikį [1].

Astmos priepuolius gali sukelti įvairūs veiksniai: alergenai, temperatūros kaita, fizinis krūvis, stiprios emocijos (pvz., juokas, stresas ar pyktis) ar kvėpavimo takų infekcijos (pvz., peršalimas, plaučių uždegimas). Vieni dažniausių astmos simptomus sukeliančių alergenų yra dulkių erkutės, gyvūnų plaukai ar seilės ir žiedadulkės. Taip pat astmos priepuolių gali išprovokuoti aplinkos veiksniai. Oro tarša, aerozoliai, lakūs cheminiai dirgikliai bei tabako dūmai gali sudirginti kvėpavimo takus ir sukelti astmos paūmėjimą. Taip pat yra įrodyta, kad kai kuriems pacientams nesteroidinių vaistų nuo uždegimo vartojimas gali sukelti astmos priepuolius, pavyzdžiui, aspirinas [1].

Astma yra heterogeniška liga, todėl jos klinikinė raiška skirtingiems pacientams gali pasireikšti nevienodai. Išskiriami keli klinikiniai astmos fenotipai: alerginė, nealerginė, fizinio krūvio sukelta bronchokonstrikcija, vėlyvoji ir sunki astma. Kai kuriems pacientams ši liga glaudžiai susijusi su nutukimu, lėtiniu rinosinusu ar nosies polipais. Astma dažniausiai diagnozuojama vaikystėje, tačiau gali būti nustatoma ir gerokai vyresniame amžiuje. Vėlyvoji astma dažniausiai yra nustatoma moterims [1].

Astma nenustatoma remiantis vien pavieniais dusulio epizodais. Pagal GINA rekomendacijas, reikia sudaryti paciento anamnezę ir atlikti kvėpavimo funkcijos tyrimus. Yra renkami duomenys apie pasikartojančius kvėpavimo sutrikimo simptomus, tokius kaip dusulys, švokštimas, kosėjimas ir kitus požymius bei kaip dažnai jie pasireiškia ir kada pasireiškia. Taip pat ieškomas ryšys su astmos priepuolius provokuojančiais veiksniais bei įvertinama šeimos ligų istorija. Astmos diagnozei patvirtinti atliekami ir klinikiniai tyrimai – spirometrija, iškvepiamo azoto monoksido frakcijos nustatymas ir kraujo tyrimai (IgE ir eozinofilų kiekis periferiniame kraujyje) [1].

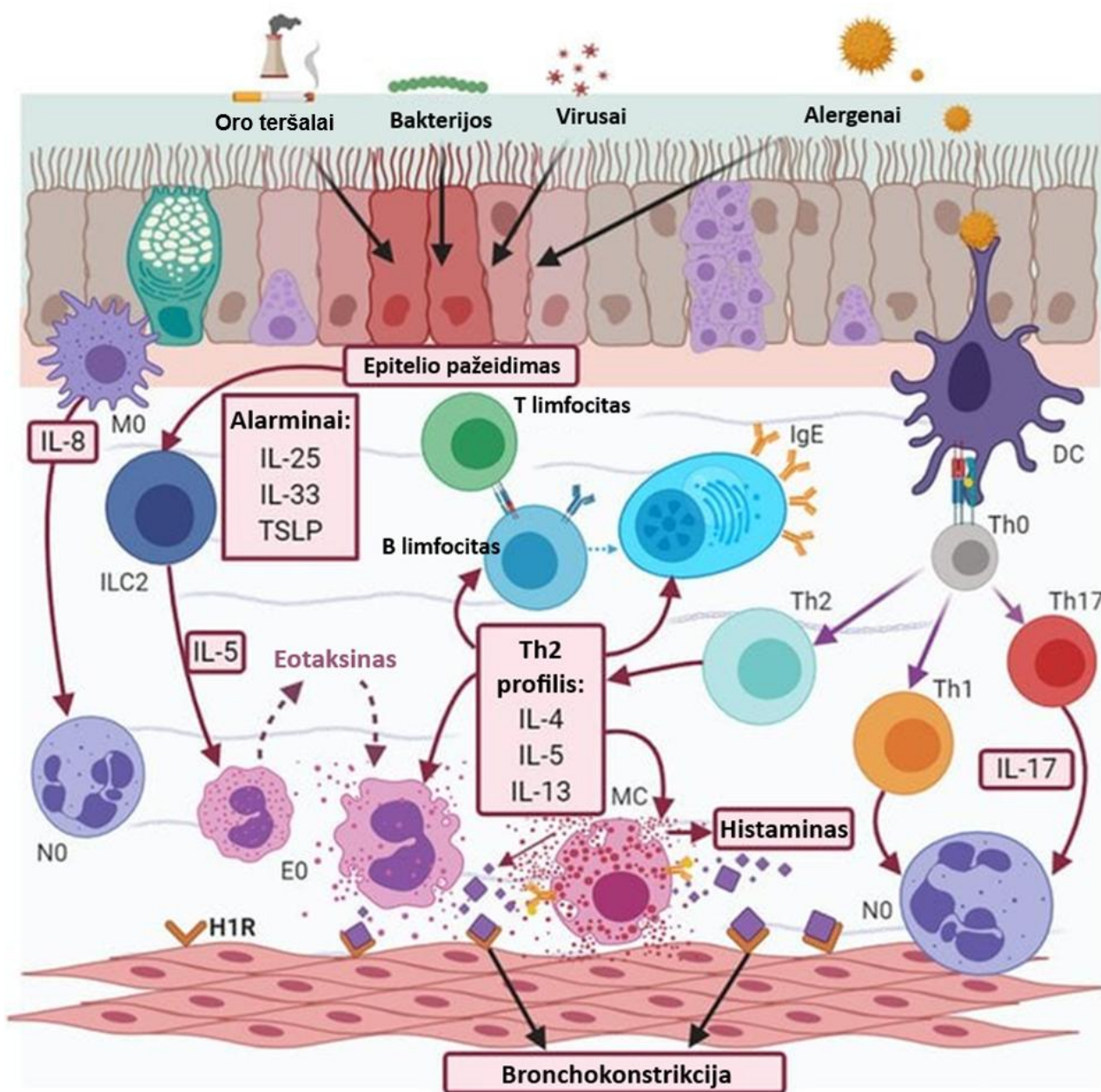
Astma yra viena labiausiai paplitusių lėtinių kvėpavimo ligų visame pasaulyje. Ja serga daugiau nei 300 milijonų žmonių visame pasaulyje, o jos paplitimas svyruoja nuo 1 iki 18 proc. priklausomai nuo šalies. Vidutiniškai 1 iš 10 vaikų ir 1 iš 20 suaugusiųjų turi kliniškai nustatytą astmą. Manoma, kad astma sergančiųjų skaičius tik didės dėl urbanizacijos, gyventojų skaičiaus augimo ir visuomenės senėjimo. Be to, astmos išsivystymui darys įtaką didėjanti oro tarša, rūkymas bei nutukimas [2].

1.1.1. Eozinofilinės astmos patogenezė

Siekiant suprasti astmos patogenezę, yra tiriami jos molekuliniai mechanizmai. Fenotipai apibūdina klinikiškai pastebimus ligos simptomus, o endotipai – biologinį ligos pagrindą. Endotipais ligos klasifikuojamos pagal jas lemiančius patofiziologinius mechanizmus ląstelių ir molekulių lygyje. Astmoje išskiriami du endotipai: T2-aukšta ir T2-žema [3].

T2-žemas endotipas dažniausiai siejamas su neutrofiline arba paucigranulocitine astma. Čia būdingi Th1 ir Th17, kurie išskiria uždegimą skatinančius citokinus: IL-17 ir interferonus, kurie siejami su neutrofiliniu kvėpavimo takų uždegimu. Šis astmos endotipas dažnai pasižymi prastesniu atsaku į kortikosteroidų gydymą [4].

T2-aukšto tipo astmai būdingas padidėjęs eozinofilų kiekis bei 2 tipo uždegimo citokinais, tokie kaip IL-5, IL-4 ir IL-13 (1 pav.). Paprastai eozinofilinė astma skirstoma į atopinę ir neatopinę.



1 pav. Astmos patofiziologija [5]

Atopinė astma dažniausiai nustatoma vaikystėje, tiems, kas turi alergijas. Alergenai patekę į kvėpavimo takus, jį atpažįsta dendritinės ląstelės, kurios pateikia jį kaip antigeną Th0 ląstelėms. Gavusios antigeną, Th0 gali diferencijuoti į Th2, Th1 ir Th17 ląsteles, priklausomai nuo tam tikrų citokinų poveikio. Pagrindinį vaidmenį atlieka Th2, kuris išskiria IL-4, IL-5 ir IL-13. IL-5 skatina eozinofilų proliferaciją bei aktyvaciją kaulų čiulpuose. IL-4 yra kone svarbiausias 2 tipo uždegimo citokinas. Pagrindinė IL-4 funkcija yra skatinti Th2 diferenciaciją ir slopinti Treg, kurios atsakingos už uždegimo slopinimą. IL-13 taip pat yra labai svarbus citokinas, kuris skatina hiperreaktyvumą, taurinių ląstelių hipersekreciją, eozinofiliją ir pats pažeidžia epitelio ląsteles [5, 6]. IL-4 ir IL-13 taip pat turi įtakos eozinofilų kaupimuisi kvėpavimo takuose. IL-4 sustiprina kraujagyslių endotelio adhezijos molekulės (VCAM-1) ekspresiją, todėl eozinofilai lengviau prisitvirtina prie endotelio ir prasiskverbia į audinius. Be to, VCAM-1 gali skatinti eozinofilus degranuliuoti. IL-13, paveikdamas bronchų epitelį, didina eotaksino sekreciją, taip skatindamas eozinofilų chemotaksę į kvėpavimo takus [7, 8].

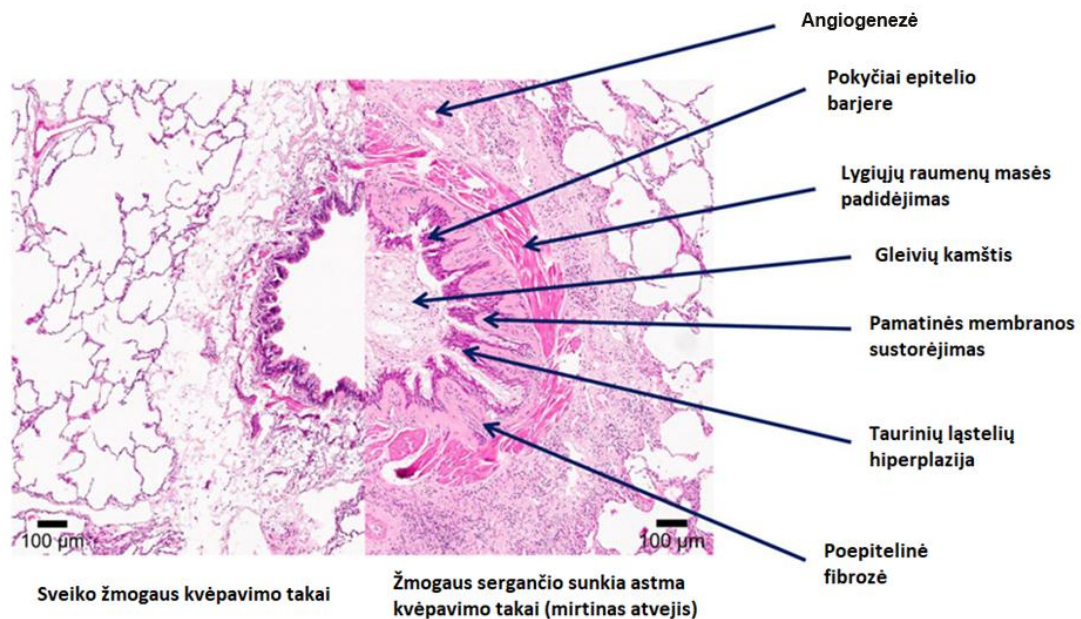
Neatopinė eozinofilinė astma pasižymi eozinofilija, bet nėra reakcijos į alergenų. Oro teršalai, bakterijos, virusai ir kiti aplinkos veiksniai pažeidžia kvėpavimo takų epitelį, kuris išskiria alarminus. Pagrindiniai tokie alarminai yra IL-25, IL-33 ir TSLP. Šios signalinės molekulės aktyvina 2-ojo tipo įgimtas limfoidines ląsteles (angl. *group 2 innate lymphoid cells*, ILC2). Aktyvintos ILC2 išskiria IL-5 ir IL-13 [5, 6].

Patekę į kvėpavimo takus eozinofilai išskiria įvairius citokinus: interleukinus (IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13, IL-16, IL-18), augimo faktorius (TGF- α/β , GM-CSF), chemokinus bei lipidų mediatorius. Šios biologiškai aktyvios medžiagos prisideda prie audinių pažeidimo, imuninių ląstelių chemotaksės ir uždegiminio atsako stiprinimo [9]. Dėl to eozinofilai suformuoja savotišką uždara ciklą, kuriame uždegimas yra palaikomas.

1.1.2. Kvėpavimo takų remodeliacija

Esant lėtiniam uždegimui, kvėpavimo takuose palaipsniui vystosi struktūriniai pokyčiai, dėl kurių sustorėja bronchiolių sienelės, todėl sumažėja plaučių talpa. Šis procesas vadinamas kvėpavimo takų remodeliacija. Jos metu įvyksta tokie pokyčiai, kaip poepitelinė fibrozė, lygiųjų raumenų hipertrofija, epitelio ląstelių pokyčiai, padidėjusi gleivių sekrecija bei angiogenezė [10].

Kvėpavimo takų epitelis yra pradinis remodeliacijos taškas. Epitelio ląstelės atpažįsta aplinkos dirgiklius (teršalus, alergenų ar kitokių patogenų), nes turi modelių atpažinimo receptorių (angl. *pattern recognition receptors*, PRR). Ląstelės, turinčios šiuos receptorių atpažįsta su patogenais susijusius molekulinius modelius (angl. *pathogen-associated molecular patterns*) ir su pažeidimais susijusius molekulinius modelius (angl. *damage-associated molecular patterns*). Suaktyvinus epitelio ląstelių PRR, jos išskiria įvairius citokinus, kurie aktyvuoja 2 tipo uždegimo ląsteles. Pagrindiniai tokie citokinai yra užkrūčio liaukos stromos limfopoetinas (angl. *thymic stromal lymphopoietin*, TSLP), IL-33 ir IL-25. Šie alarminai aktyvuoja fibroblastus, paskatina imuninių ląstelių migraciją į plaučius, plaučių struktūrinių ląstelių proliferaciją bei hiperplaziją ir skatina TGF- β bei VEGF-A ekspresiją [11].



2 pav. Struktūriniai kvėpavimo takų pokyčiai sergant astma [12]

Fibroblastai gamina užląstelinio užpildo (angl. *extracellular matrix*, ECM) baltymus (kolagenas, elastinas, fibronektinas, proteoglikanai ir kiti). Taip pat jie yra atsakingi ir už ECM skaidymą – išskiria metaloproteinazes (angl. *matrix metalloproteinases*, MMP). MMP yra nuo cinko priklausomos endoproteinazės, kurios aktyviai skaido beveik visus ECM baltymus. Jų veiklą slopina metaloproteinazių inhibitoriai (angl. *tissue inhibitors of metalloproteinases*, TIMP), taip reguliuodami perteklinį audinių ardymą [13]. Sutrikus pusiausvyrai tarp MMP ir TIMP, ECM baltymai pradeda kauptis ir sukelia poepitelinę fibrozę. Plaučių struktūra pasidaro standi, sumažėja bronchų elastingumas, todėl jie sunkiau išsiplėčia.

Aplinkos ir vidiniai veiksniai taip pat gali sukelti epitelio ląstelių apoptozę. Tokia žūtis normaliomis sąlygomis paskatina audinių regeneraciją, todėl sekretuojami augimo faktoriai (TGF- β , VEGF-A), kurie padeda atstatyti audinių vientisumą. Tačiau esant nuolatiniam pažeidimui, po kurio seka regeneracija ir stimuliacija augimo faktoriais taip pat gali sukelti kvėpavimo takų remodeliaciją. Tai sukelia audinių patologijas: lygiųjų raumenų hipertrofija, taurinių ląstelių hiperplazija bei angiogenezę. Padidėjęs taurinių ląstelių skaičius epitelyje sukelia gleivių hipersekreciją, o tai formuoja gleivių kamščius bronchiolėse. Lygiųjų raumenų ląstelių skaičius irgi padidėja, todėl tai taip pat prisideda prie bronchų sienelių sustorėjimo. Paprastai kvėpavimo takų lygiųjų raumenų ląstelės yra atsakingos už bronchokonstrikciją, tačiau kai jų masė padidėja, susitraukimai tampa stipresni ir ilgiau trunkantys. Be to, šios ląstelės tampa hiperreaktyvios, todėl reaguoja net į silpniausius dirgiklius (pvz., šaltas oras), o tai pasireiškia dusimu astmos priepuolio metu [11].

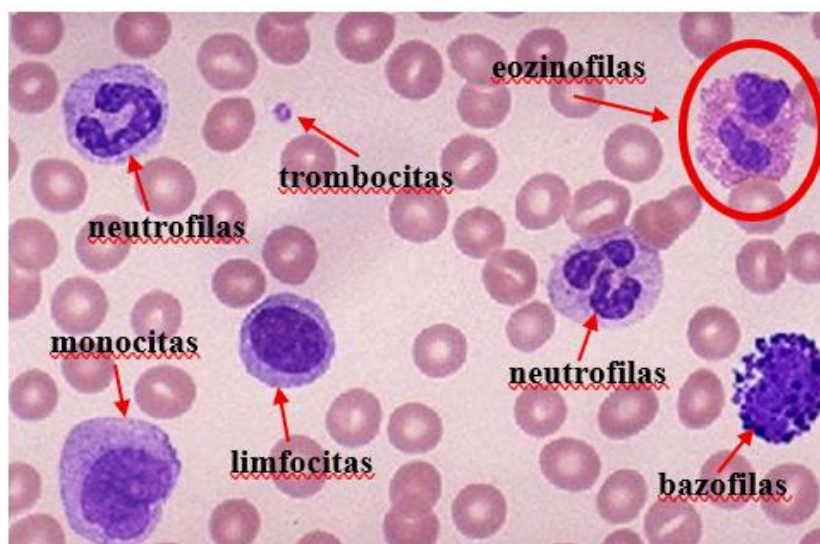
Kvėpavimo takų remodeliacija nėra tik vėlyvas ligos etapas. Pagal naujausius tyrimus, struktūriniai pokyčiai gali atsirasti anksti, dar vaikystėje, net prieš klinikinius simptomus, ir progresuoti laikui bėgant. Taip pat svarbu pabrėžti, kad remodeliacija dažnai yra negrįžtamas audinių pakitimas [12, 14].

1.2. Eozinofilų biologinė reikšmė ir jų vaidmuo astmoje

Leukocitai yra svarbi imuninės sistemos dalis, kuri apsaugo organizmą nuo infekcijų, patogenų ir kitų žalingų veiksnių. Tai periferiniame kraujyje cirkuliuojančios ląstelės, dalyvaujančios imuniniuose procesuose bei padedančios palaikyti organizmo homeostazę. Yra išskiriamos 5 pagrindinės leukocitų rūšys: neutrofilai, bazofilai, monocitai, limfocitai ir eozinofilai [15].

Eozinofilai, kaip ir visos imuninės ląstelės, formuojasi iš hematopoetinės kamieninės ląstelės kaulų čiulpuose. Eozinofilų primtakai vystosi iš mieloidinių progenitorinių ląstelių, iš kurių susidaro įgimto imuniteto efektorinės ląstelės. Jų brendimą, diferenciaciją ir išgyvenamumą reguliuoja citokinai, iš kurių svarbiausi yra IL-3, IL-5 ir granulocitų makrofagų kolonijas stimuliuojantis veiksnys (angl. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*, GM-CSF). IL-5 laikomas svarbiausiu eozinofilų vystymąsi reguliuojančiu citokinu, nes skatina jų proliferaciją, diferenciaciją, aktyvaciją, migraciją bei išgyvenamumą audiniuose. IL-3, kuris dar vadinamas daugialiniu kolonijas stimuliuojančiu veiksnium, ir GM-CSF dalyvauja pradiniuose hemopoezės etapuose, skatindami mieloidinių ląstelių augimą ir brendimą. Subrendę eozinofilai yra išskiriami į periferinį kraują, o iš ten migruoja į organus priklausomai nuo specifinių signalų. Dažniausiai migruoja į kvėpavimo takus ir žarnyną, kur išlieka gyvybingi iki 12 dienų [16].

Eozinofilas priskiriamas grūdėtiesiems leukocitams, dar vadinamiems granulocitams. Pats terminas „*eozinofilas*“ kilęs iš dviejų graikiškų žodžių „*eosin*“, reiškiančio raudoną spalvą, ir „*phil*“ – meilę. Mikroskopiškai eozinofilai atpažįstami po dažymo rūgštiniais dažais (pavyzdžiui, eozinu), nes jų citoplazmoje esančios granulės nusidažo rausvai oranžine ar rožine spalva, o ląstelės branduolys yra segmentuotas (3 pav.). Šiose granulėse gausu biologiškai aktyvių medžiagų, tokių kaip didysis bazinis baltymas, eozinofilų katijoninis baltymas, eozinofilų peroksidazė, eozinofilų kilmės neurotoksinas ir kiti [17, 18]. Degranuliuodami eozinofilai išskiria šias medžiagas į aplinką, kurios naikina patogenus. Tačiau per didelis eozinofilų aktyvumas ir gausus jų granulių išsiskyrimas gali pažeisti organizmo audinius.



3 pav. Kraujo tepinėlio mikroskopinis vaizdas

Rausvos ląstelės yra eritrocitai. Eozinofilą iš kitų leukocitų galima atskirti pagal rausvas granules ir segmentuotą branduolį [19]

Literatūroje yra išskiriami keturi eozinofilų degranuliacijos tipai: dalinė degranuliacija (angl. *piecemeal degranulation*), klasikinė egzocitozė, sudėtinė egzocitozė (angl. *compound exocytosis*) ir citolizė. Dalinė degranuliacija apibūdinama kaip lėtas, laipsniškas ir selektyvus granulių išsiskyrimas, kurios nesusilieja su plazmine membrana, o granulių turinys transportinėmis pūslelėmis pernešamas į ląstelės paviršių ir yra išskiriamas į aplinką. Klasikinėje egzocitozėje granulės tiesiogiai susilieja su plazmine membrana, o sudėtinėje egzocitozėje pirmiausia susilieja kelios granulės tarpusavyje ir tik po to jų turinys išskiriamas į ląstelės išorę. Citolizė yra labiau destruktivus procesas. Ji laikoma neapoptotine ląstelių žūties forma, kai ląstelės plazminė membrana suyra ir į užląstelinę aplinką išsiskiria DNR bei granulės. Eozinofilų degranuliacija yra susijusi su užląstelinių spąstų formavimusi. Į išskirtą DNR įsipainioja granulių baltymai, taip sustiprindami užląstelinių spąstų citotoksinį poveikį [20]. Verta paminėti, kad atliktame tyrime buvo vertinama eozinofilų peroksidazės ir mitochondrinės DNR išsiskyrimo kinetika. Gauti rezultatai parodė, kad degranuliacija ir užląstelinių spąstų formavimasis nėra tapatūs procesai, nes eozinofilai pirmiausia išskiria granulių baltymus, o tik vėliau DNR. Be to, manoma, kad šie procesai vyksta skirtingais molekuliniiais keliais, nors tikslus užląstelinių spąstų susidarymo mechanizmas vis dar nėra iki galo išaiškintas ir reikalauja tolimesnių tyrimų [21].

Pagrindinės eozinofilų funkcijos yra kovoti su helmintais ir dalyvauti alerginėse reakcijose. Taip pat, jie prisideda prie audinių remodeliacijos, metabolizmo, epitelio vientisumo bei mikrobiotos pusiausvyros palaikymo, nervų sistemos reguliacijos ir raumenų ir kepenų atstatymo. Tačiau eozinofilai susiję ir su įvairiomis patologijomis. Normaliai periferiniame kraujyje eozinofilai sudaro iki 5 proc. visų leukocitų. Esant patologijai, jų kiekis padidėja virš 500 ląstelių kubiniame mikrolitre ir tai vadinama eozinofilija. Dažniausia to priežastis yra alerginė astma, helmantinės infekcijos, reakcija į vaistus, alerginis rinitas ir kitos eozinofilinės ligos. Kai eozinofilai pradeda kauptis audiniuose, jie gali pažeisti juos. Sunkios astmos atveju eozinofilai yra pagrindinės efektorinės ląstelės, kurios palaiko 2 tipo uždegimą, sukelia kvėpavimo takų lygiųjų raumenų hiperreaktyvumą, pažeidžia epitelio vientisumą, padidina gleivių sekreciją ir bendrai sutrikdo plaučių homeostazę [9, 22].

1.2.1. Eozinofilų potipiai

Eozinofilai laikomi heterogeniškais ląstelėmis. Prieš 10 metų Mesnil'a ir kiti pelių modeliuose išskirtė eozinofilus į potipius: rezidentinius ir uždegiminius [23]. Šie potipiai skiriasi savo funkcijomis ir fenotipu.

Rezidentiniai eozinofilai yra daugiausia atsakingi už homeostazės palaikymą audiniuose. Manoma, kad jie gali slopinti dendritinių ląstelių brendimą, taip stabdydami 2 tipo uždegimą. Šis potipis yra nepriklausomas nuo IL-5, nors laikomas svarbiausiu eozinofilus aktyvuojančiu interleukinu ir pasižymi didesne CD62L raiška [24].

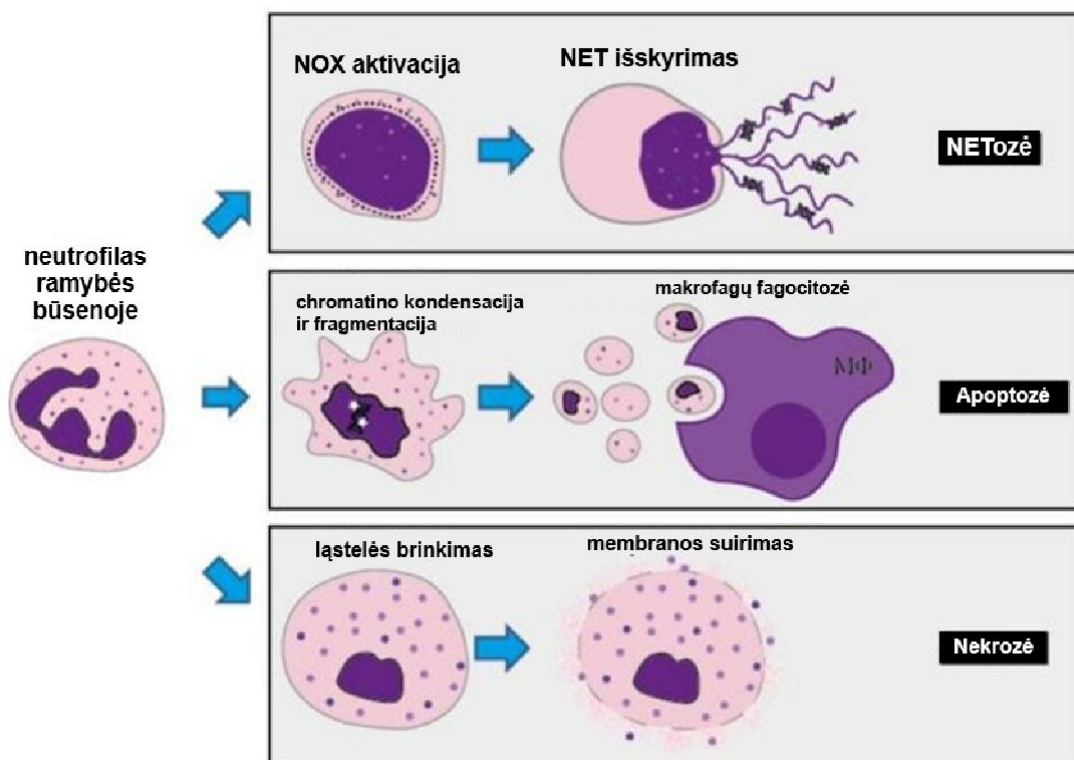
Uždegiminiai eozinofilai yra siejami su uždegimo palaikymu. Jie linkę į citolizę, kurios metu išskiriami dideli kiekiai granulių, kurios pažeidžia audinius. Taip jie sustiprina 2 tipo imuninį atsaką ir skatina bronchų obstrukciją. Nuo rezidentinių eozinofilų atskiriami tuo, kad jų branduolys yra segmentuotas, yra priklausomi nuo IL-5 ir turi mažesnę CD62L raišką [24].

Vis dėlto, eozinofilų potipių biologiniai skirtumai ir jų reikšmė astmos patogenezėje dar nėra iki galo išsiaiškinti.

1.3. Eozinofilų užląsteliniai spąstai

Užląsteliniai spąstai – tai imuninių ląstelių išleistos tinklinės struktūros, kurios sudarytos iš DNR ir granulių baltymų. Pirmą kartą šios struktūros buvo aprašytos 2004 m., kai aktyvuoti neutrofilai išskyrė granulių baltymus ir chromatinio tinklus, kurie savyje įkalino ir neutralizavo bakterijas [25]. Procesas, kai imuninės ląstelės išskiria užląstelinius spąstus, vadinamas EToze (angl. *ETosis*).

ETozė laikomas naujas ląstelės mirties būdas, kuris skiriasi nuo apoptozės ir nekrozės (4 pav.). Apoptozė yra užprogramuota ląstelės mirtis, kuri griežtai reguliuojama kaspazių. Jos metu ląstelė susitraukia, chromatinas kondensuojasi ir įvyksta branduolio fragmentacija, bet membrana išlieka vientisa. Ląstelė suformuoja apoptotinius kūnelius, kuriuos pašalina fagocitai. Proceso metu pašalinamos pasenusios ar pažeistos ląstelės, pavyzdžiui, navikinės ląstelės. Taip sustabdoma nekontroliuojama ląstelių proliferacija. Apoptozę gali sukelti vidiniai (DNR, organelių pažeidimai, netinkamai susilankstę baltymai) arba išoriniai (mirties ligandų prisijungimas) signalai. Šis procesas reikalingas palaikyti audinių homeostazę ir nesukelia uždegimo. Tuo tarpu nekrozė yra nekontroliuojama ląstelių mirtis, sukelta stipraus pažeidimo, toksinų ar deguonies trūkumo. Tai dažniausiai paveikia ne pavienes ląsteles, o grupes jų. Jos metu ląstelė ir jos organelės išbrinksta, plazminė membrana plyšta, todėl ląstelės turinys patenka į užląstelinę erdvę. Dėl to aktyvinama imuninė sistema ir sukeliamas uždegimas [26]. O ETozės metu vyksta tarsi imuninis atsakas į patogenus – ląstelė suformuoja DNR tinklus kartu su granulių baltymais. Išskiriami du ETozės tipai: gyvybingoji ir savižudiška (5 pav.).

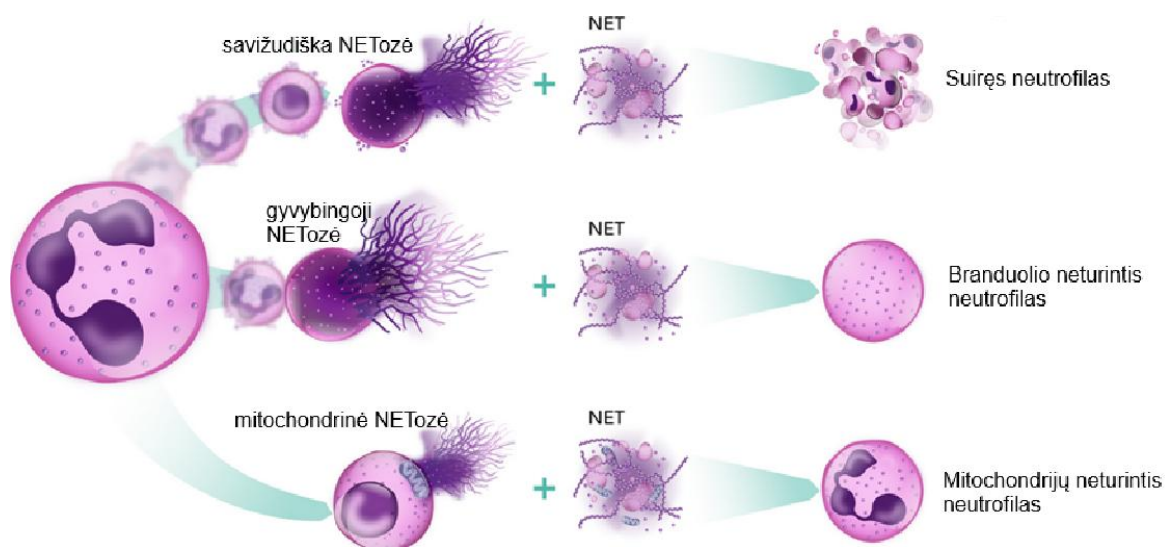


4 pav. NETozės, apoptozės ir nekrozės palyginimas [27]

Savižudiška ETozė yra lėtas procesas, kurio metu chromatinas decondensuojasi, branduolio membrana suyra, DNR susimaišo su granulių baltymais, plazminė membrana įplyšta. Šis procesas yra priklausomas nuo nikotinamido adenino dinukleotido fosfato (NADPH) oksidazės (NOX). NOX yra atsakingas už reaktyviųjų deguonies formų (RDF) gamybą [28, 29]. RDF veikia kaip signalinė

molekulė, kuri inicijuoja ETozės procesą, taip pat slopina kaspazių veiklą [30]. Po šio proceso ląstelė nelieka gyvybinga, todėl šis kelias laikomas savižudišku.

Gyvybingosios ETozės metu ląstelė išlieka gyvybinga. Šis procesas nepriklauso nuo NOX, yra greitesnis, įvyksta per kelias minutes. Jo metu plazminė membrana neplyšta, DNR per pūsleles išskiriama į užląstelinę erdvę, kur susimaišo su granulių baltymais. Tokiai ląstelei nors ir trūksta branduolio, bet ji toliau išlieka funkcionali, gali migruoti ir fagocituoti. Kai kurie literatūros šaltiniai išskiria mitochondrinę ETozę. Šiuo atveju ląstelė išskiria mitochondrinę DNR. Procesas labai greitas ir dažniausiai priklauso nuo RDF [29]. Vis dėlto, mokslininkai ginčijasi, ar užląstelinį spąstų kilmė gali būti mitochondrinė. Tokiam DNR išskyrimui iš mitochondrijų į citoplazmą ir vėliau į užląstelinę erdvę reikėtų daug energijos [31].



5 pav. Skirtingi NETozės tipai: savižudiška, gyvybingoji ir mitochondrinė [29]

Procesas, kai eozinofilai išskiria užląstelinius spąstus vadinamas EETOze (ang. *EETosis*). Šiuose užląsteliniuose spąstuose gausu granulių baltymų, tokių kaip eozinofilų peroksidazė, didysis bazinis baltymas, eozinofilų katijoninis baltymas ir eozinofilų kilmės neurotoksinas. Jie pasižymi antimikrobinu poveikiu, nes sulaiko ir neutralizuoja įvairius patogenus. Tačiau astmos metu vyrauja uždegimas, dėl kurio eozinofilai migruoja ir kaupiasi kvėpavimo takuose, o jų išleisti spąstai tampa žalingi audiniams. Pirmiausia, jie sukelia epitelio ląstelių netekimą (angl. *shedding*), padidina jų pralaidumą bei skatina įvairių uždegiminių citokinų (IL-6, IL-8, IL-1 α , IL-1 β , CXCL-1, CCL24, IL-33 ir TSLP) išsiskyrimą [32]. Antra, EETOzė sustiprina 2 tipo uždegimą. Eozinofilų užląsteliniai spąstai sąveikauja su ILC2, taip skatindami išskirti IL-5 ir IL-13. Šie citokinai atsakingi už eozinofilų aktyvinimą, gleivių sekreciją ir bronchų hiperreaktyvumą [33]. Taip pat, eozinofilų užląsteliniai spąstai gali aktyvuoti plaučių neuroendokrininės ląstelės, sekretuojančius neuropeptidus, kurie paskatina uždegiminių ląstelių migraciją į kvėpavimo takus ir padidina gleivių sekreciją. Plaučių neuroendokrininės ląstelės yra cheminiai jutikliai, sudaro iki 0,4 proc. viso kvėpavimo takų epitelio ir, aptikus hipoksiją ar toksinus, sekretuoja peptidus, reguliuojančius kvėpavimo takų toną, imuninį atsaką ir kamieninių ląstelių regeneraciją [34]. Trečia, vykstant EETOzei, eozinofiluose esantis galektinas-10 kristalizuojasi, sudarydamas *Charcot-Leyden* kristalus [35]. Dideli kristalų kiekiai padaro gleives tirštesnes ir sunkiau pašalinamas, todėl gali prisidėti prie gleivių kamščių formavimosi.

1.4. Užląstelių spąstų biožymenys

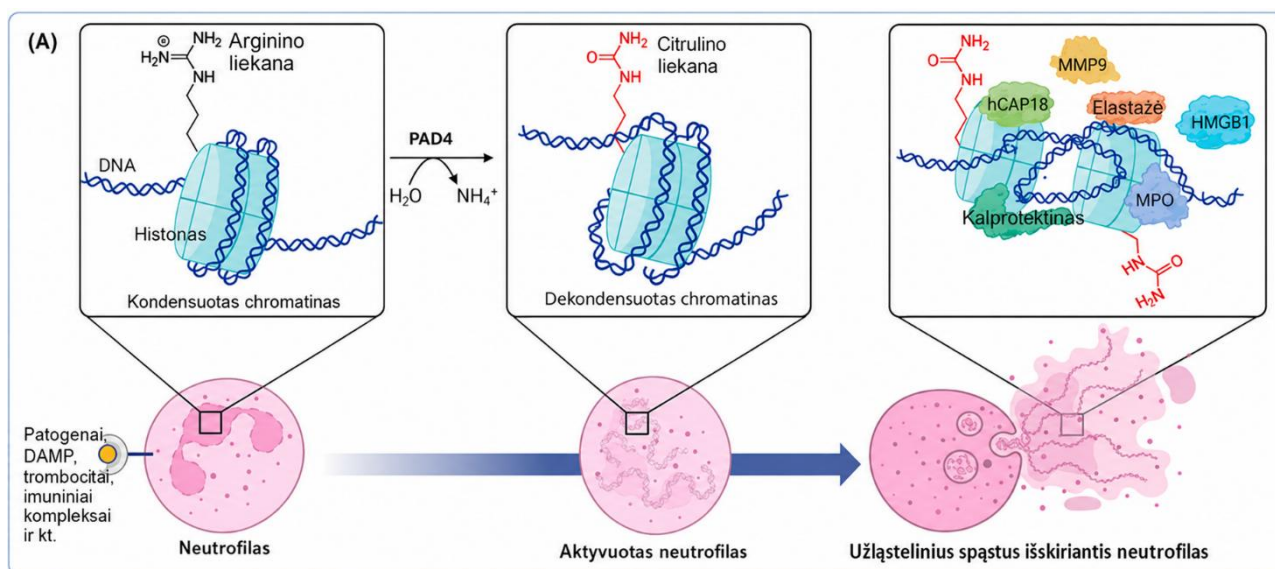
Biožymuo – tai kiekybiškai išmatuojamas biologinis požymis, kuris gali parodyti ligos buvimą, jos eigą ar atsaką į gydymą. Biožymenys yra svarbūs nustatant patologinius procesus, diagnozuojant ligą, stebint ligos aktyvumą ar kuriant vaistus bei medicinos prietaisus. Tai gali būti genai, baltymai, metabolitai, ląstelės, kurių kiekis ir/arba aktyvumas keičiasi prie tam tikros būklės [36]. Geriausiai ištirti NETozės biožymenys dažniausiai atspindi pačią užląstelių spąstų struktūrą: laisvai cirkuliuojanti DNR ir histonai, granuliu baltymai. Specifiškesniais NETozės žymenimis laikomi citrulinuotas histonas H3, neutrofilų elastazė, mieloperoksidazė ir jų kompleksai su DNR [37]. Panašiu principu vertinami ir eozinofilų užląsteliniai spąstai, tačiau jų atpažinimui būdingi eozinofilų granuliu baltymai, tokie kaip didysis bazinis baltymas, eozinofilų peroksidazė, eozinofilų katijoninis baltymas, eozinofilų kilmės neurotoksinas bei citoplazminis baltymas galektinas-10 [38]. Vis dėlto vien tik struktūrinių užląstelių spąstų komponentų vertinimas ne visada leidžia tiksliai nustatyti jų susidarymo mechanizmus. Dėl to svarbu ieškoti ir kitų galimų biožymenų, kurie atspindėtų ne tik pačią užląstelių spąstų struktūrą, bet ir jų formavimąsi reguliuojančius signalinius kelius. Naujų biožymenų paieška gali prisidėti prie naujų signalinių kelių identifikavimo.

1.4.1. Peptidilarginino deiminazė 4

Peptidilarginino deiminazė 4 (angl. *protein-arginine deiminase type 4*, PAD4) yra nuo kalcio jonų priklausomas fermentas, kurį koduoja PADI4. Pagrindinė jo funkcija yra citrulinacija (angl. *citrullination*) – baltymuose esančių arginino liekanų pavertimas citrulinu [39].

PAD4 sudarytas iš dviejų domenų: N-galo ir C-galo. N-galinėje dalyje yra į du imunoglobulinus panašūs subdomenai, kurie padeda palaikyti fermento erdvinę struktūrą ir dalyvauja PAD4 monomerų dimerizacijoje. C-galinė katalizinė sritis turi neigiamai įkrautą U formos substrato prisijungimo griovelį (katalizinę kišenę) ir yra atsakinga už citrulinimą. PAD4 turi penkias kalcio jonų prisijungimo vietas: dvi C-gale ir 3 N-gale. Kalcio jonai, prisijungę prie katalizinės srities, sukelia konformacinius pokyčius, kurie padeda suformuoti aktyvų centrą. N-galinėje dalyje esančios kalcio prisijungimo vietos padeda stabilizuoti aktyvią fermento formą [39].

PAD4 turi labai svarbų elementą, kuris jam padeda patekti į branduolį – branduolio lokalizacijos signalą (angl. *nuclear localization signal*, NLS). NLS yra trumpa aminorūgščių seka, kuri nukreipia PAD4 į branduolį. Fermentas, patekęs į branduolį, katalizuoja histonų citrulinaciją. Chromatinas įprastai yra kondensuotos būsenos, nes histonų arginino liekanos yra teigiamai įkrautos ir stipriai sąveikauja su neigiamai įkrauta DNR. Įvykus histonų citrulinacijai, histonų teigiamas krūvis sumažėja, ryšys tarp histonų ir DNR susilpnėja ir tai sukelia chromatinio dekondensaciją. Branduolio viduje padidėja mechaninis spaudimas, nes standžiai supakuotas chromatinas išsiskleidžia, o laisvi histonai ardo branduolio apvalkalą ir plazminę membraną. Galiausiai branduolio membrana plyšta ir DNR susimaišo su citoplazmos komponentais (6 pav.) [40].



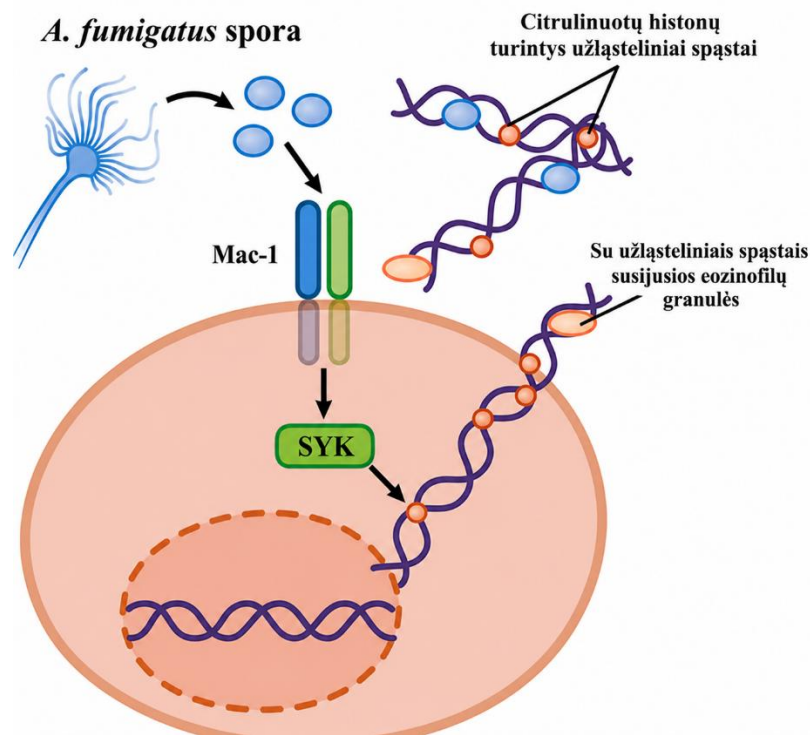
6 pav. PAD4 inicijuojama chromatino decondensacija NETozėje [40]

1.4.2. Tirozino baltymų kinazė

Tirozino baltymų kinazė arba blužnies tirozino kinazė (angl. *spleen tyrosine kinase*, SYK) yra nereceptorinė tirozino kinazė, kurią ekspresuoja visos hematopoetinės linijos ląstelės. Ši kinazė atlieka svarbų vaidmenį tiek įgimame, tiek įgytame imuniniame atsake perduodant viduląstelinį signalą [41].

SYK sudaro du SH2 domenai N-gale ir vienas katalizinis kinazės domenas (SH1) C-gale. SH2 domenai jungiasi prie fosforilintų imunoreceptorių tirozino pagrindu veikiančių aktyvinimo motyvų (angl. *immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*, ITAMs). ITAMs yra aminorūgščių sekos, randamos imuninių ląstelių receptoriuose, tokiuose kaip B ląstelių, Fc, C tipo laktinų, ir Toll panašaus receptoriaus 4 ir kitų. Įprastai SYK yra autoinhibicinės konformacijos ir yra neaktyvus, nes SH2 domenai sąveikauja su kataliziniu domenu ir taip riboja jo aktyvumą. Prisijungęs prie fosforilintų ITAMs, SYK yra fosforilinamas, tampa aktyvus ir gali fosforilinti kitus substratus. Taip įjungiamos įvairios signalinės kaskados: PI3K – AKT, MAPK ir NF-κB bei kalcio signalinius kelius. Per šiuos viduląstelinius kelius ląstelė gali būti aktyvuojama, skatinama gaminti citokinus, fagocituoti, degranuluoti, migruoti, diferencijuoti ar proliferuoti [42].

Tyrimai su *Aspergillus fumigatus* parodė, kad šis grybelis paskatina eozinofilus išskirti užląstelinis spąstus per CD11b integrino ir SYK kinazės kelią (7 pav.). Tai rodo, kad SYK gali veikti kaip svarbus signalinis tarpininkas tarp patogeno atpažinimo ir galutinio atsako. Aktyvavus SYK, įjungiami viduląsteliniai signaliniai keliai, kurie galimai skatina branduolio struktūros pokyčius, chromatino decondensaciją, branduolio apvalkalo irimą ir DNR išsiskyrimą. Literatūroje aprašoma, kad *A. fumigatus* sukelta EETozė nevyksta nuo NOX priklausomų mechanizmų [43, 44].



7 pav. Mac-1/Syk signalinio kelio vaidmuo užląstelinųjų spąstų susidaryme [45]

1.4.3. NADPH oksidazė

NADPH oksidazių šeimą sudaro 7 nariai: NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5, taip pat DUOX1 ir DUOX2. Būtent NOX2 yra pagrindinė NADPH oksidazė fagocituojančiose ląstelėse ir yra siejama su EToze [46].

NOX2 yra membraninių baltymų kompleksas, kurį sudaro 6 subvienetai: membraniniai (gp91phox ir p22phox) ir citoplazminiai (p47phox, p67phox, p40phox ir Rac2). Pagrindinis katalizinis subvienetas yra gp91phox, kuris gamina RDF, o p22phox jį stabilizuoja. Kartu jie sudaro NOX2 komplekso branduolį, vadinamą flavocitochromu b_{558} . gp91phox membraniniame domene yra du hema, o citoplazminiame – FAD ir NADPH prisijungimo sritys, kurios reikalingi elektronų pernašai per membraną. Žmogaus gp91phox baltymą koduoja *CYBB* genas. Citoplazminiai subvienetai reguliuoja ir aktyvina RDF sintezės procesą: p47phox yra atsakingas už NOX2 komplekso surinkimą, p67phox jungiasi su gp91phox ir skatina elektronų pernašą iš NADPH į FAD centrą, o p40phox daugiau veikia kaip reguliacinis baltymas. Rac2 taip pat prisideda prie komplekso aktyvacijos, sąveikaudamas su p67phox. Rac2 yra maža GTPazė, kuri priklauso Rho baltymų šeimai. Žmogaus Rac2 baltymą koduoja *RAC2* genas. Ramybės būsenoje membraniniai subvienetai yra atsiskyrę nuo citoplazminių, tačiau suaktyvėjus ląstelei šios dalys susijungia ir suformuoja aktyvų fermentą [47, 48].

Fagocituojančiose ląstelėse NOX2 gali aktyvinti tiek išoriniai (LPS, grybeliai), tiek vidiniai (IL-8, GM-CSF, imuniniai kompleksai) dirgikliai. Aktyvuotas NOX sintetina RDF dideliais kiekiais, kurios veikia kaip signalinės molekulės ir prisideda prie DNR pažeidimo, chromatino decondensacijos ir ETozės [30].

1.4.4. Į Toll panašūs receptoriai

Į Toll panašūs receptoriai (angl. *Toll-like receptors*, TLR) yra membraniniai įgimto imuniteto receptoriai, kurie priklauso PRR šeimai. Šie receptoriai atpažįsta PAMP ir DAMP, aktyvuoja viduląstelines signalines kaskadas (MAPK, NF- κ B), taip skatindami imuninių ląstelių brendimą, migravimą ir išgyvenamumą. Šiuo metu žinoma dešimt funkciškai aktyvių žmogaus TLR, iš kurių TLR4 laikomas vienu svarbiausių astmos patogenezėje [49].

TLR4 sudaro trys domenai: citoplazminis, membraninis ir užląstelinis. Užląstelinis domenas sudarytas iš leucinu turtingų sričių, kurios dalyvauja ligando atpažinime. Pagrindinis TLR4 agonistas yra lipopolisacharidas (LPS). LPS yra endotoksinas, kuris randamas gramneigiamų bakterijų išorinėje membranoje ir veikia kaip apsauginis bakterijų barjeras. Kadangi, LPS negali tiesiogiai prisijungti prie receptoriaus, jis jungiasi prie koreceptoriaus – mieloidinio diferenciacijos faktoriaus 2 (MD-2). Susiformavęs TLR4, MD-2 ir LPS kompleksas dimerizuojasi ir taip aktyvuojamas receptorių. Citoplazminį domeną sudaro Toll/IL-1 receptorių, prie kurio jungiasi adaptoriniai baltymai: MyD88, TIRAP (Mal), TRIF (TICAM-1) ir TRAM (TICAM-2). Šie adaptoriniai baltymai inicijuoja viduląstelines signalines kaskadas, aktyvuojančias transkripcijos veiksnius (NF- κ B, AP-1 ir IRF3), dėl to ląstelėje skatinama gaminti uždegimą skatinančius citokinus [50, 51]. Be to, TLR4 gali būti aktyvinamas endogeninių pažeidimo molekulių, pavyzdžiui, histonų, šiluminio šoko baltymų, kurie priskiriami DAMP [52].

TLR4 aktyvavimas gali būti siejamas su užląstelinių spąstų išskyrimu. Tyrimai rodo, kad LPS aktyvindamas TLR4 skatina NOX2 gaminti RDF. RDF yra svarbus ETozės inicijavimo komponentas ląstelėse, kaip buvo anksčiau minėta. TLR4 blokavimas sumažina RDF gamybą, todėl sumažėja neutrofilų gebėjimas formuoti užląstelinius spąstus [53, 54].

2. Medžiagos ir tyrimų metodai

2.1. Tiriamųjų atranka

Tiriamųjų asmenų atranką konsultavo Lietuvos sveikatos universitetinės ligoninės Kauno klinikų gydytojas pulmonologas. Į tyrimą įtraukti 16 asmenų: 10 sergančių astma ir 6 sveiki asmenys (kontrolės). Tyrime dalyvavę asmenys buvo supažindinti su tyrimo eiga ir pasirašė tai patvirtinanti sutikimą. Tyrimas patvirtintas regioninio biomedicininio tyrimų etikos komiteto (1 priedas).

Bendri tyrimo kriterijai dalyviams:

- pilnametis (≥ 18 metų);
- nerūkantys tyrimo metu;
- raštiškai patvirtina, kad sutinka dalyvauti tyrime.

Papildomi sveikų asmenų atrankos kriterijai:

- neserga rinitu;
- neturi astmos simptomų;
- plaučių funkcijos rodikliai atitinka normą;
- neigiamas bronchų provokacijos mėginys su metacholinu;
- neigiamas odos dūrio testas.

Papildomi asmenų, sergančių astma, atrankos kriterijai:

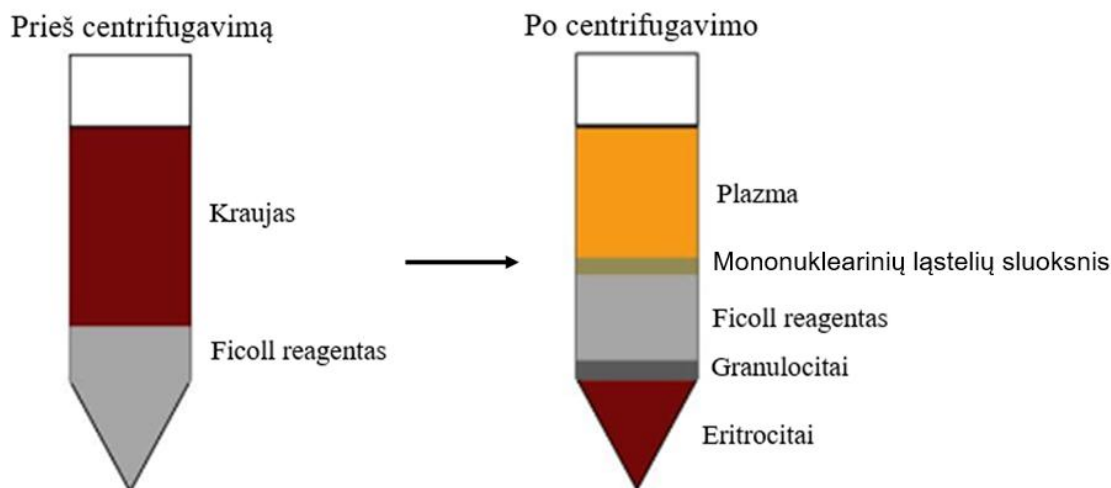
- naujai nustatyta ir negydyta astma;
- simptomai vyraavo metus ar ilgiau;
- teigiamas bronchų provokacijos mėginys su metacholinu.

2.2. Eozinofilų išskyrimas iš periferinio kraujo

Eozinofilai išskirti iš tiriamųjų periferinio kraujo. Periferiniam kraujui paimti naudoti vakuuminiai kraujo mėgintuvėliai su K₂EDTA priedu (3×15 ml) (BD Vacutainer, Becton Dickinson, JK).

Tiriamųjų kraujas sumaišomas su 1X fosfatinio buferio druskų tirpalu (PBS) (Gibco, Thermo Fisher Scientific) ir lėtai, plona srovele palei mėgintuvėlio sienelę, pilamas ant 2,5 ml Ficoll reagento (Cytiva Sweden AB, Upsala, Švedija). 15 ml Falcon tipo mėgintuvėliai centrifuguojami $400 \times g$ 30 min. 20 °C temperatūroje. Po centrifugavimo susidaro 5 sluoksniai: plazma, periferinio kraujo mononuklearinės ląstelės, Ficoll gradientas, granulocitai ir eritrocitai (8 pav.). Nusiurbiami pirmieji trys sluoksniai, o mėgintuvėlyje lieka granulocitai ir eritrocitai. Granulocitai išgryninami pritaikant hipotoninę eritrocitų lizę – lizavimas vandeniui iki 10 sek. ir druskų pusiausvyros atstatymas naudojant 2X PBS tirpalą. Po lizavimo mėginys centrifuguojamas $400 \times g$ 10 min. 20 °C temperatūroje. Procesas kartojamas, kol mėgintuvėlio dugne lieka tik baltas granulocitų sluoksnis. Naudojant automatinį ląstelių skaitytuvą ADAM-MC yra įvertinamas gautų granulocitų kiekis bei gyvybingumas.

PBS yra izotoninis tirpalas pH 7,4, kuris artimas fiziologiniam žmogaus kraujo pH. 2X PBS tirpalas padeda atstatyti izotoninę aplinką po lizavimo su vandeniui, tam, kad būtų išvengta granulocitų lizės.



8 pav. Kraujo komponentų pasiskirstymas po centrifugavimo su Ficoll reagentu [55]

Eozinofilai nuo kitų granulocitų išgryninami naudojant magnetinės separacijos metodą (angl. *magnetic-activated cell sorting*, MACS) ir eozinofilų išskyrimo rinkinį (Eosinophil Isolation Kit human, Miltenyi Biotec, Vokietija). Granulocitai resuspenduojami su šaltu MACS buferiu ir paveikiami biotinu konjuguotais monokloniniais antikūnais prieš CD2, CD14, CD16, CD19, CD56, CD123 ir CD235a (glikoforinas A). Šie antikūnai pažymi visas ląsteles, išskyrus eozinofilus. Inkubacija vyksta 10 min. 4°C temperatūroje. Po to paveikiami anti-biotino antikūnais pažymėtais magnetiniais karoliukais ir inkubuojami 15 min. 4°C temperatūroje. Po inkubacijos mėginys centrifuguojamas $400 \times g$ 10 min. 20 °C temperatūroje ir nupilamas supernatantas. Granulocitai resuspenduojami su šaltu MACS buferiu ir praleidžiami pro specialią magnetinę kolonėlę (LS Columns, Miltenyi Biotec, Vokietija), pritvirtintą prie magnetinio stovo. Ląstelės, kurios pažymėtos magnetiniais karoliukais, yra sulaikomos kolonėlėje, o nepažymėtos (šiuo atveju – eozinofilai) prateka ir yra surenkamos į naują mėgintuvėlį. Kolonėlė plaunama naudojant MACS buferį. Išmatuojamas gautų eozinofilų kiekis ir gyvybingumas naudojant automatinį ląstelių skaitytuvą ADAM-MC.

MACS buferis gaminamas MACS BSA Stock tirpalą (Miltenyi Biotec, Vokietija) praskiedžiant autoMACS Rinsing tirpalu (Miltenyi Biotec, Vokietija) santykiu 1:20. MACS buferio sudėtis: PBS pH 7,2, 0,5% jaučio serumo albuminas (BSA) ir 2 mM EDTA. Šis buferis užtikrina ląstelių gyvybingumą, sumažina nespecifinį prisijungimą ir apsaugo nuo ląstelių agregacijos magnetinės separacijos metu.

2.3. Eozinofilų potipių išskyrimas

Eozinofilai paveikiami magnetine žyme pažymėtais antikūnais prieš adhezinę molekulę CD62L (L-selektinas) (Miltenyi Biotec, Vokietija), kurio raiška būdinga tik rezidentinių eozinofilų potypiui. Inkubacija vyksta 15 min. 4 °C temperatūroje. Naudojant MACS metodą eozinofilai išskirstomi į potipius, kolonėlėje pasilieka žymėti rezidentiniai eozinofilai, o nežymėti uždegiminiai eozinofilai surenkami į atskirą mėgintuvėlį. Išėmus kolonėlę iš magneto ir įdėjus į naują mėgintuvėlį, yra surenkami rezidentiniai eozinofilai. Kolonėlė plaunama naudojant MACS buferį. Atliekamas potipių gyvybingumo ir kiekio patikrinimas naudojant automatinį ląstelių skaitytuvą ADAM-MC.

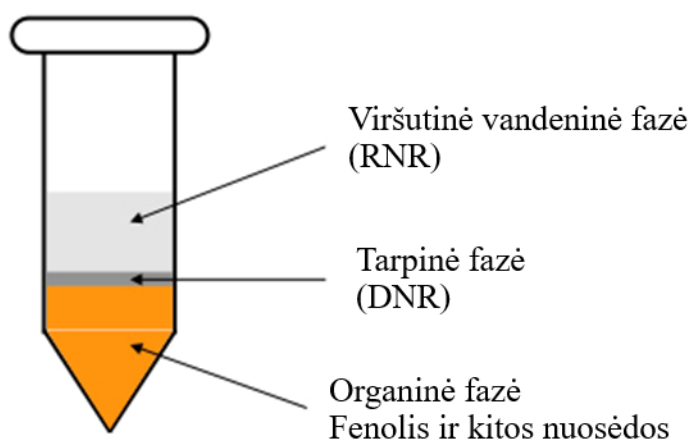
Gauti eozinofilų potipiai resuspenduoti su RNAlater stabilizavimo tirpalu (Ambion, Thermo Fisher Scientific, JAV) ir laikyti -80 °C temperatūroje tolimesniems tyrimams.

2.4. RNR skyrimai

Pirmiausia pašalintas RNAlater tirpalas nuo eozinofilų potipių. Mėginiai resuspenduojami su 500 µL PBS ir centrifuguojami $1000 \times g$ 10 min. Po centrifugavimo atsargiai pašalinamas supernatantas.

RNR išskyrimams naudotas miRNeasy mini rinkinys (QIAGEN GmbH, Vokietija). Išskirti eozinofilų potipiai resuspenduojami su 700 µL QIAzol lizės reagentu, kuris lizuoja ląsteles ir slopina RNazių veiklą. Inkubuojama 5 min. kambario temperatūroje. Tada užpilama 140 µL chloroformo, mikrocentrifuginiai mėgintuvėliai tvirtai uždaromi ir vorteksuojami 15 sek. Inkubuojama 3 min. kambario temperatūroje. Po to centrifuguojama $12\,000 \times g$ 4 °C temperatūroje 15 min. Po centrifugavimo susidaro 3 fazės: viršutinė (RNR), tarpinė (DNR) ir organinė fazė (9 pav.). Atsargiai surenkamas viršutinis sluoksnis, vengiant paimti tarpinės, ir resuspenduojamas naujame 1,5 mL mikrocentrifuginiame mėgintuvėlyje su 96 proc. etanolium. Iki 700 µl mėginio užpilama ant RNeasy Mini kolonėlės, kuri yra 2 ml surinkimo mėgintuvėlyje. Centrifuguojama $8000 \times g$, 15 sek. Pratekėjęs skystis pro kolonėlę išpilamas ir procesas kartojamas, kol visas mėginys praleidžiamas pro kolonėlę. Papildomai atliekamas DNR priemaišų pašalinimas: mėginys 15 min. inkubuojamas su Dnaze. Tada kolonėlė užpilama RWT buferiu ir centrifuguojama 15 sek. $8000 \times g$, o pratekėjęs skystis pašalinamas. Toliau kolonėlė plaunama RPE buferiu, centrifuguojama 15 sek. $8000 \times g$, pratekėjęs skystis pašalinamas. Plovimas RWT buferiu pašalina baltymų, DNR, fenolio priemaišas, o RPE buferiu – galutinai išplauna druskas ir išgrynina RNR. Procesas pakartojamas, tik antrą kartą centrifuguojama 2 min. Tam, kad geriau išdžiūtų kolonėlės membrana, tuščia kolonėlė centrifuguojama maksimaliu greičiu 1 min. Tada kolonėlė įdedama į naują ependorfą, atsargiai užpilama 50 µl RNase-free vandens arti membranos, bet noliečiant jos ir centrifuguojama 1 min. $8000 \times g$. Taip surenkama RNR į mikrocentrifuginį mėgintuvėlį.

Išgautos RNR kiekis ir kokybė vertinti naudojant NanoDrop2000 spektrofotometrą.



9 pav. Fazių susidarymas po centrifugavimo

2.5. Kopijinės DNR sintezė

Kopijinės DNR (kDNR) sintezei iš RNR naudotas High-Capacity cDNA Reverse Transcription rinkinys (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, JAV) taikant atvirkštinės transkripcijos polimerazės grandininę reakciją (PGR).

Pirmiausia paruošiamas reakcijos mišinys (1 lentelė). Vienai reakcijai reikia 10 μ L reakcijos mišinio ir 10 μ L RNR mėginio.

1 lentelė. Reakcijos mišinio komponentai

Komponentas	Tūris (μ L)
10X RT buferis	2
25X dNTP (100 mM)	0,8
10X RT atsitiktiniai pradmenys	2
MultiScribe™ atvirkštinė transkriptazė	1
Vanduo be nukleazų	4,2
Iš viso	10

Į mėgintuvėlius įpilama 10 μ L reakcijos mišinio ir jame švelniai resuspenduojama RNR. Mėgintuvėliai sandariai uždaromi, sustatomi į termociklerį ir užstatoma programa (2 lentelė).

2 lentelė. Termociklerio programa

Žingsnis	Temperatūra (°C)	Laikas (min.)
1	25	10
2	37	120
3	85	5
4	4	Laikyti iki atvėsimo

Atvirkštinė transkriptazė yra fermentas, kuris sintetina kDNR grandinę iš RNR matricos. RT buferis palaiko tinkamą pH ir druskų santykį, kuris reikalingas fermento aktyvumui. Į dNTP sudėti įeina dATP, dCTP, dGTP ir dTTP nukleotidai, kurie yra kaip „statybiniai blokai“ reikalingi naujai DNR grandinei sintetinti. Atsitiktiniai pradmenys jungiasi prie įvairių RNR matricos vietų, kurie suteikia pradžios tašką fermentui.

Pirmame žingsnyje pradmenys prisijungia prie RNR. Antrame žingsnyje temperatūra pakeliama iki 37 °C, o tai sudaro optimalias sąlygas fermentui veikti. Tada atvirkštinė transkriptazė jungiasi prie pradmenų ir pradeda kDNR sintezę, naudodama nukleotidus. Trečiame žingsnyje temperatūra dar pakeliama iki 85 °C, 5 min. Tokia temperatūra inaktyvuoja fermento veiklą ir sustabdo sintezės reakciją. Ketvirtame žingsnyje mėginys atšaldomas, kas padeda stabilizuoti kDNR.

2.6. Realus laiko polimerazės grandininė reakcija

Pirmiausia paruošiamas tikro laiko PGR reakcijos mišinys (3 lentelė). Kiekvienam genui ruošiamas atskiras reakcijos pradmenų ir zondų mišinys. Vienai reakcijai reikia 9 μ L tikro laiko PGR reakcijos mišinio ir 1 μ L kDNR. Mišinys paskirstomas po 96 šulinėlių plokštelę ir tada įpilama kDNR į atitinkamus šulinėlius. Po to, ant plokštelės užklijuojama optiškai skaidri plėvelė. Plėvelė apsaugo mėginius nuo išgaravimo ir užteršimo. Plokštelė centrifuguojama 1000 $\times$ g, 1 min., siekiant grąžinti mėginius į šulinėlių dugnus.

3 lentelė. Tikro laiko PGR reakcijos mišinys

Komponentas	Tūris (µL)
TaqMan™ Fast Advanced Master Mix (2X)	5
TaqMan™ Assay (20X) (pradmenų ir zondų mišinys)	0,5
Vanduo be nukleazių	3,5
Iš viso	9

Paruošta plokštelė įdedama į tikro laiko PGR aparatą (7500 Fast Real-Time PCR system) ir nustatoma programa (4 lentelė).

4 lentelė. 7500 Fast Real-Time PCR System aparato programa

Žingsnis	Temperatūra (°C)	Laikas (sek.)
Polimerazės aktyvacija	95	20
40 ciklų:		
Denatūracija	95	3
Pradmenų prisijungimas / grandinės ilginimas	60	30

Genų raiškos rezultatai vaizduojami amplifikacijos grafike, kuriame matomi fluorescenciniai signalai, kurie užfiksuoti po kiekvieno ciklo pabaigos (Ct).

Genų raiškai eozinofilų potipiuose įvertinti buvo apskaičiuota ΔC_t reikšmė pagal formulę:

$$\Delta C_t = C_t (\text{kontrolinis genas}) - C_t (\text{tiriamasis genas}).$$

Kontrolinis genas: *GAPDH* (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, JAV).

Tiriamieji genai: *PADI4*, *SYK*, *TLR4*, *CYBB* ir *RAC2* (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, JAV).

Santykinei genų raiškai tarp astmos pacientų ir sveikų asmenų eozinofilų potipių palyginti buvo taikyta $2^{\Delta \Delta C_t}$ formulė. Šioje formulėje neigiamas ženklas prieš $\Delta \Delta C_t$ nebuvo taikomas, nes $\Delta \Delta C_t$ buvo apskaičiuojamas kaip kontrolinės grupės ir tiriamosios grupės ΔC_t reikšmių skirtumas, o ne atvirkščiai.

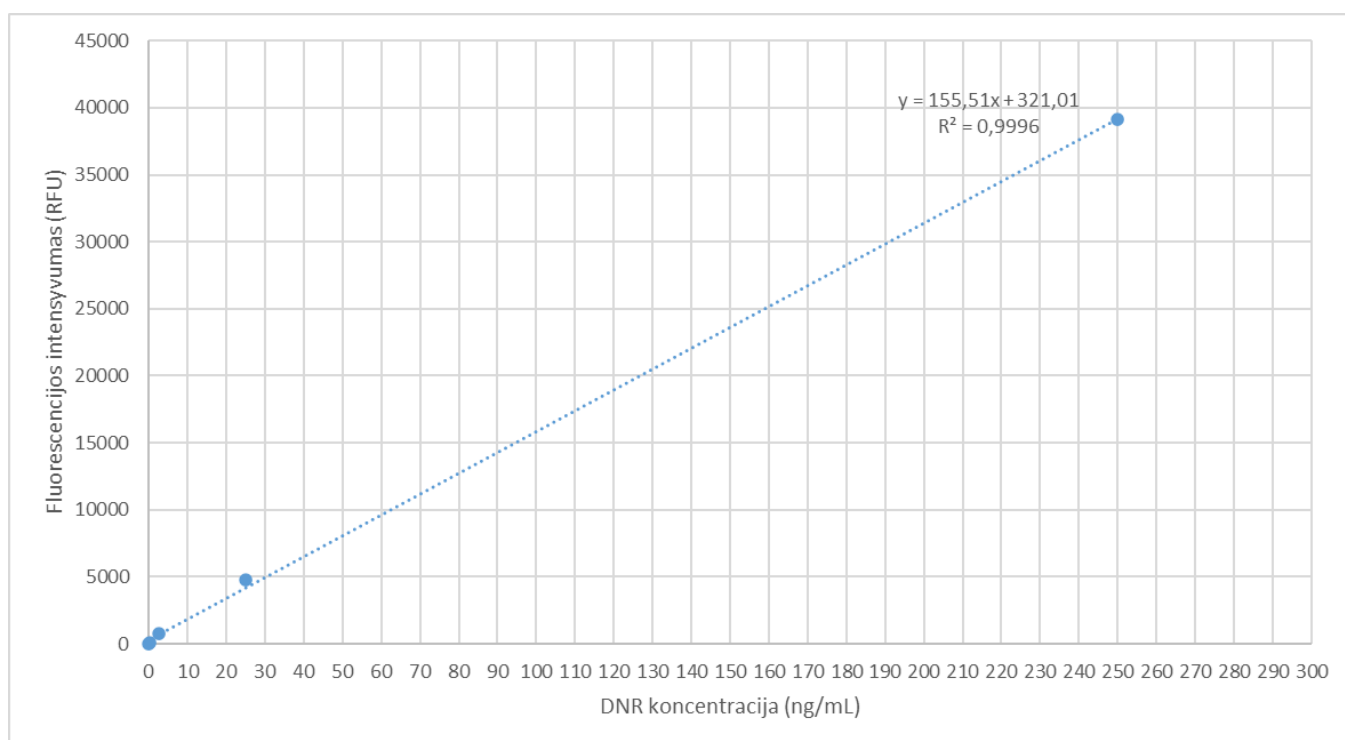
2.7. Užląstelinės DNR kiekybinis nustatymas

2.7.1. Mitochondrinės kilmės užląstelinių DNR kiekybinis nustatymas

Tyrime buvo vertintos dvi sąlygos: nestimuluoti eozinofilai ir eozinofilai, paveikti GM-CSF. Eozinofilų potipiai resuspenduoti HBSS tirpale ir paskirstyti po 2×10^5 ląstelių/šulinėlyje 96 juodoje šulinėlių plokštelėje su skaidriu dugnu. Į atitinkamus šulinėlius įpilta 25 ng/ml GM-CSF ir inkubuota 15 min. Kaip neigiama kontrolė buvo naudotas 20 µM difenilenjodonio chloridas (angl. *diphenyleneiodonium chloride*, DPI). Užląstelinės DNR aptikimui naudoti PicoGreen dažai. Fluorescencija matuota po 2 min. nuo dažo įpilimo naudojant Tecan Infinite Nano+ fluorimetą. Metodas buvo adaptuotas remiantis Yousefi ir kitų atliktu eksperimentu [56].

PicoGreen dažai paruošiami Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA reagentą praskiedžiant 1X TE buferiu santykiu 1:200. 1X TE buferį pasigaminti reikia 20X TE praskiesti su steriliu vandeniu santykiu 1:20. Paruošti dažai turi būti saugomi nuo šviesos ir sunaudoti per kelias valandas po pagaminimo, nes lengvai degraduoja šviesoje.

Standartinę kreivę sudaryti naudotas λ DNR standartas iš Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay rinkinio (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, JAV). Iš standarto paruoštas 2000 ng/ml pradinis DNR tirpalas, kuris toliau praskiestas iki 500 ng/ml. Iš šio tirpalo atlikti serijiniai 1:10 skiedimai, gaunant 50, 5, 0,5 ir 0,05 ng/ml DNR standartus. Į kiekvieną šulinėlį įpilta po 100 µl DNR standarto ir po 100 µl paruoštų PicoGreen dažų. Kontrolei naudotas 1X TE buferis. Galutinės DNR koncentracijos šulinėliuose: 250, 25, 2,5, 0,25, 0,025 ir 0 ng/mL. Inkubacija su dažais tamsoje vyko 2 min. ir po to matuota fluorescencija Tecan Infinite Nano+ fluorimetru. Iš kalibracinės kreivės gauta regresijos lygtis, kuri buvo naudota DNR koncentracijai apskaičiuoti mėginiuose (10 pav.).



10 pav. PicoGreen dsDNR standartinė kreivė

Tiriamųjų mėginių DNR koncentracija apskaičiuota pagal formulę:

$$x = \frac{y - 321,01}{155,51};$$

y – fluorescencijos intensyvumas;

x – DNR koncentracija (ng/ml).

2.7.2. Branduolinės kilmės užląstelinės DNR kiekybinis nustatymas

Eozinofilų potipiai resuspenduoti RPMI (Gibco, Thermo Fisher Scientific, JAV) terpėje, paskirstyti po 2×10^5 ląstelių/šulinėlyje 96 šulinėlių plokštelėje ir paveikti 2 µmol/l A23187 (kalcio jonoforu). Eozinofilai inkubuoti 24 val. 37 °C temperatūroje. Po inkubacijos į atitinkamus šulinėlius buvo įpilta

3,05 U/ μ L DNazės arba kontrolinio tirpalo (H_2O) ir mėginiai inkubuoti 90 min. 37 °C temperatūroje. Po inkubacijos terpė atsargiai pašalinta ir pakeista HBSS (Gibco, Thermo Fisher Scientific, JAV) buferiu. Į kiekvieną šulinėlį buvo įpilta po 20 μ l fluorescencinių mikrokaroliukų tirpalo ir plokštelė purtoma 3 min. 800 rpm greičiu. Iškart po purtymo iš kiekvieno šulinėlio paimta po 10 μ l mėginio ir resuspenduota 100 μ l PBS. Resuspendavimas vyko fluorescencijos matavimui skirtoje plokštelėje (96 šulinėlių juoda plokštelė su skaidriu dugnu). Fluorescencija matuota naudojant Tecan Infinite Nano+ fluorimetą.

Fluorescenciniai mikrokaroliukai (Sigma-Aldrich, Merck, JAV) buvo sulfato grupėmis modifikuoti mikrokaroliukai, kurie pasižymėjo neigiamu krūviu. Fluoresuojančių mikrokaroliukų tirpalui paruošti reikėjo sulfato grupėmis modifikuoti mikrokaroliukus praskiesti su PBS santykiu 1:20.

Iš gautų rezultatų apskaičiuotas santykinis fluorescencijos intensyvumas. Kiekvieno mėginio kontrolinės reikšmės buvo normalizuotos pagal atitinkamo DNaze paveikto mėginio fluorescencijos reikšmę. Rezultatai apskaičiuoti pagal formulę:

$$\text{Santykinė fluorescencija (\%)} = \frac{\text{DNaze paveikto mėginio fluorescencija}}{\text{Kontrolinio mėginio fluorescencija}}.$$

DNaze paveikto mėginio fluorescencijos reikšmė laikyta 100 proc., o kontrolinio mėginio fluorescencijos sumažėjimas žemiau 100 proc. rodė didesnį mikrokaroliukų prisijungimą prie užląstelinų spąstų. Kadangi užląsteliniai spąstai sulaiko fluorescencinius mikrokaroliukus, mažiau mikrokaroliukų yra paimama su terpe, todėl išmatuojama mažesnė santykinė fluorescencija. Metodas buvo adaptuotas pagal Uekis ir kitus, atsižvelgiant į šio tyrimo eksperimentines sąlygas [57].

2.8. Statistinė duomenų analizė

Statistinė duomenų analizė atlikta naudojant GraphPad Prism 8.0.1 programą („GraphPad Software Inc.“, San Diegas, JAV). Tyrime buvo analizuojamos dvi tiriamųjų grupės: astmos pacientai ir sveiki asmenys. Kiekvienoje grupėje buvo vertinti du eozinofilų potipiai – uEOS ir rEOS. Skirtumams tarp priklausomų grupių, lyginant uEOS ir rEOS toje pačioje tiriamųjų grupėje, įvertinti naudotas Vilkoksono (angl. Wilcoxon) suderintų porų testas. Skirtumams tarp nepriklausomų grupių, lyginant astma sergančių pacientų ir sveikų asmenų tų pačių eozinofilų potipių duomenis, įvertinti naudotas Mann–Whitney U testas. Santykinę genų raišką įvertinti naudotas vienos imties t testas (angl. *one-sample t test*), siekiant nustatyti, ar astmos pacientų genų raiška reikšmingai skyrėsi nuo sveikų asmenų grupės reikšmės. Statistiškai reikšmingu skirtumu laikyta, kai $p < 0,05$.

3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas

3.1. Tiriamųjų charakteristika

Į tyrimą buvo įtraukta 16 asmenų: 10 astmos pacientų ir 6 sveiki asmenys (kontrolės). Astmos pacientai buvo vyresni, pasižymėjo didesniais IgE, eozinofilų, FeNO ir KMI rodikliais, bet sumažėjusiais FEV₁ (L) ir FEV₁ (proc.), lyginant su sveikais asmenimis. Asmenų, dalyvavusių tyrime, klinikiniai duomenys pavaizduoti 5 lentelėje.

5 lentelė. Tiriamųjų charakteristika

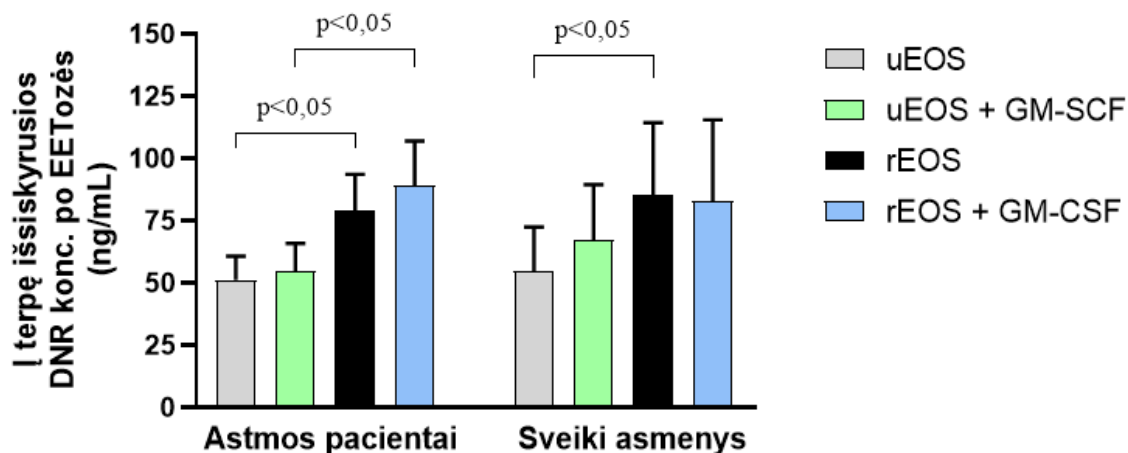
*p < 0,05 lyginant su sveikais asmenimis; b.d. – būtiną dydžio; V – vyras; M – moteris; FeNO – dalinis iškvėptas azoto oksidas; FEV₁ – priverstinio iškvėpimo tūris per 1 sek.; IgE – imunoglobulinas E
Duomenys pateikti kaip vidurkis ± standartinės paklaidos vidurkis

Charakteristika	Astmos pacientai	Sveiki asmenys (kontrolės)
Skaičius, n	10	6
Lytis, V/M	1/9	3/3
Amžius, metai	48,70 ± 5,67*	27,33 ± 1,45
KMI, kg/m ²	31,37 ± 1,82*	20,90 ± 1,74
FEV ₁ , L	2,06 ± 0,27*	4,36 ± 0,30
FEV ₁ , proc. b.d.	71,50 ± 7,07*	103,50 ± 3,59
FeNO, ppb	55,39 ± 16,15*	12,92 ± 4,46
Kraujo eozinofilai, × 10 ⁹ /L	0,396 ± 0,038*	0,138 ± 0,021
IgE, IU/mL	334,90 ± 135,90*	15,42 ± 7,46

3.2. Užląstelinės DNR kiekybinis vertinimas tarp eozinofilų potipių

3.2.1. Mitochondrinės kilmės užląstelinės DNR kiekybinis vertinimas tarp eozinofilų potipių

Atlikus mitochondrinės kilmės užląstelinės DNR kiekybinį įvertinimą po EETozės nustatyta, kad astma sergančių pacientų rezidentiniai eozinofilai (rEOS) į terpę išskyrė statistiškai reikšmingai didesnę DNR kiekį nei uždegiminiai eozinofilai (uEOS): 78,98 ± 14,69 ng/mL ir 51,13 ± 9,74 ng/mL (p < 0,05). Reikšmingas skirtumas išliko ir po GM-CSF stimuliacijos – rEOS + GM-CSF grupėje DNR kiekis buvo reikšmingai didesnis nei uEOS + GM-CSF: 89,29 ± 17,74 ng/mL ir 54,81 ± 11,09 ng/mL (p < 0,05). Sveikų asmenų rEOS išskyrė reikšmingai didesnę užląstelinės DNR kiekį nei uEOS: 85,25 ± 29,22 ng/mL ir 54,65 ± 17,95 ng/mL (p < 0,05). Tačiau po GM-CSF stimuliacijos reikšmingo skirtumo tarp uEOS + GM-CSF ir rEOS + GM-CSF nenustatyta: 67,34 ± 22,28 ir 82,97 ± 32,61 ng/mL. Taip pat, skirtumų tarp astmos pacientų ir sveikų asmenų eozinofilų potipių nebuvo nustatyta (11 pav.).



11 pav. Eozinofilų potipių skirtumai išskiriant mitochondrinius užląstelinius spąstus
 Astmos pacientai n = 10; sveikų asmenų n = 6; uEOS – uždegiminiai eozinofilai; rEOS – rezidentiniai eozinofilai; GM-CSF – granulocitų ir makrofagų kolonijas stimuliuojantis veiksnys

Gauti rezultatai rodo, kad rEOS išskyrė didesnę užląstelinės DNR kiekį nei uEOS, tiek astma sergančių pacientų, tiek sveikų asmenų grupėse. Literatūroje rašoma, kad eozinofilai gali greitai išskirti mitochondrinę DNR, ir šis procesas ne visada yra susijęs su eozinofilų žūtimi [56]. Todėl padidėjęs DNR kiekis terpėje gali atspindėti aktyvesnį eozinofilų funkcinį atsaką.

Ankstesni tyrimai parodė, kad užląsteliniai spąstai buvo aptinkti alergine astma sergančių pacientų kvėpavimo takuose, todėl EETozė gali būti svarbi astmos uždegiminėje aplinkoje [58]. Mūsų tyrime nustatytas didesnis rEOS išskiriamos mitochondrinės DNR kiekis leidžia manyti, kad šis eozinofilų potipis efektyviau išskiria užląstelinius spąstus nei uEOS. Tai yra įdomu, nes literatūroje rEOS dažniau apibūdinami kaip homeostazę palaikantis potipis, o uEOS labiau siejami su uždegiminiu atsaku.

GM-CSF poveikis šiame tyrime buvo nevienareikšmis. Astma sergančių pacientų grupėje skirtumas tarp rEOS ir uEOS išliko ir po GM-CSF stimuliacijos, tačiau sveikų asmenų grupėje po stimuliacijos reikšmingo skirtumo nenustatyta. Literatūroje GM-CSF dažniausiai aprašomas kaip už eozinofilų brendimą, išgyvenimą, aktyvumą ir kaupimąsi kvėpavimo takuose atsakingas veiksnys [59]. Vis dėlto EETozės sužadinimui reikalinga ne tik GM-CSF stimuliacija, bet ir papildomi aktyvinantys signalai. Todėl galima manyti, kad GM-CSF šiame tyrime veikė ne kaip pagrindinis EETozę sukeliantis dirgiklis, tačiau galimai prisidėjo prie eozinofilų funkcinio aktyvumo pokyčių.

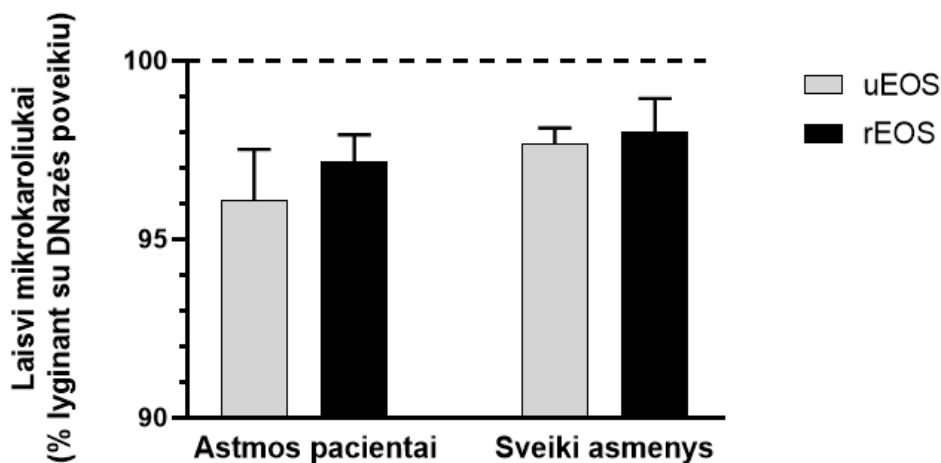
Tyrimai apie eozinofilų išgyvenamumą parodė, kad net po 24 val. inkubacijos didžioji dalis eozinofilų išliko gyvybingi [60]. Taip pat, atliekant šį eksperimentą, eozinofilai buvo paveikti DPI, kuris sumažino fluorescencijos intensyvumą. Taigi, remiantis literatūra ir DPI eksperimento rezultatais, galima manyti, kad mūsų tyrime nustatyti fluorescencijos pokyčiai nėra vien ląstelių žūties atspindys, o gali rodyti aktyvų DNR išsiskyrimą.

3.2.2. Branduolinės kilmės užląstelinių DNR kiekybinis vertinimas tarp eozinofilų potipių

Laisvų mikrokaroliukų kiekis buvo vertintas astmos pacientų ir sveikų asmenų uEOS bei rEOS išskirtuose užląsteliniuose spąstuose. Kadangi didesnis laisvų mikrokaroliukų kiekis rodo mažesnį jų

įtraukimą į užląstelinių spąstų struktūras, šis rodiklis yra atvirkščiai proporcingas išskirtų užląstelinių spąstų kiekiui.

Astmos pacientų uEOS mėginiuose nustatytas laisvų mikrokaroliukų kiekis buvo $96,10 \pm 1,43$ proc., o rEOS mėginiuose – $97,18 \pm 0,75$ proc., o sveikų asmenų uEOS – $97,68 \pm 0,44$ proc. ir rEOS – $98,01 \pm 0,94$ proc. Statistiškai reikšmingų skirtumų tarp tirtų grupių nenustatyta, bet pastebėta tendencija, jog abiejose tiriamųjų grupėse uEOS geba išskirti didesnę užląstelinių spąstų nei rEOS. Taip pat, pastebėta tendencija, kad astmos pacientų eozinofilai išskiria didesnę užląstelinių spąstų kiekį nei sveikų asmenų eozinofilai, nes jų mėginiuose nustatytas mažesnis laisvų mikrokaroliukų kiekis (12 pav.).



12 pav. Eozinofilų potipių skirtumai išskiriant branduolinius užląstelinius spąstus

Astmos pacientai $n = 10$; sveikų asmenų $n = 6$; uEOS – uždegiminiai eozinofilai; rEOS – rezidentiniai eozinofilai

Nors statistiškai reikšmingų skirtumų nenustatyta, šio eksperimento rezultatai rodo galimą tendenciją, kad astmos metu eozinofilai gali būti labiau aktyvuoti ir labiau linkę formuoti užląstelinius spąstus. Vis dėlto šiai tendencijai patvirtinti reikėtų įtraukti didesnę tiriamųjų imtį. Choi ir kiti nustatė, kad sunkia eozinofiline astma sergančių pacientų eozinofilai pasižymėjo didesniu užląstelinių spąstų formavimu, o šis rodiklis buvo susijęs su prastesne plaučių funkcija ir didesniu eozinofilų aktyvumo žymeniu EDN [32]. Todėl pastebėta tendencija, kad astmos pacientų eozinofilai išskyrė daugiau užląstelinių spąstų nei sveikų asmenų eozinofilai, gali būti siejama su padidėjusiu eozinofilų aktyvumu astmoje.

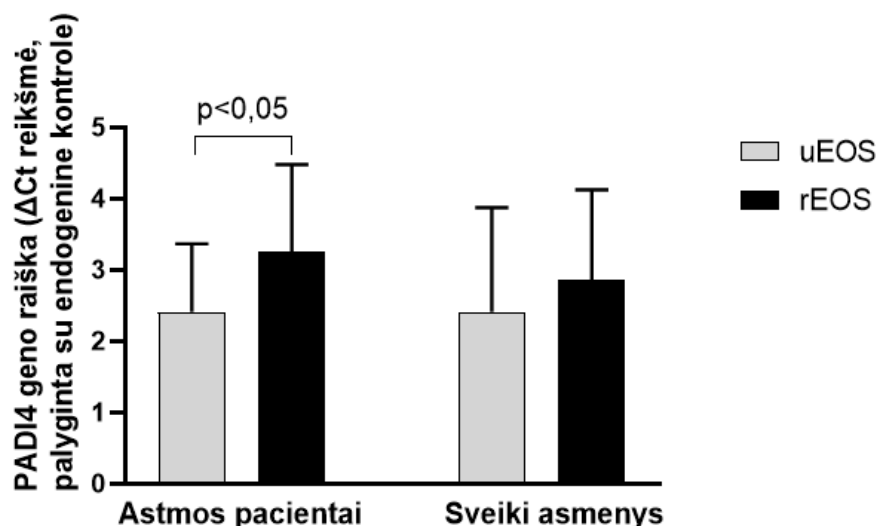
Taip pat pastebėta tendencija, kad uEOS galėjo formuoti daugiau užląstelinių spąstų nei rEOS, o tai gali būti siejama su skirtingomis šių eozinofilų potipių funkcijomis: rEOS – homeostazės palaikymu, o uEOS – uždegimo palaikymu. Todėl galima manyti, kad uždegimo metu uEOS yra labiau linkęs išskirti branduolinės kilmės užląstelinius spąstus.

Visgi, mūsų tyrime nenustatyta reikšmingų skirtumų tarp astma sergančių ir kontrolinės grupės. Tam įtakos galėjo turėti per maža tiriamųjų imtis.

3.3. Su EEToze susijusių genų raiškos skirtumų vertinimas tarp eozinofilų potipių

3.3.1. *PADI4* geno raiška tarp eozinofilų potipių

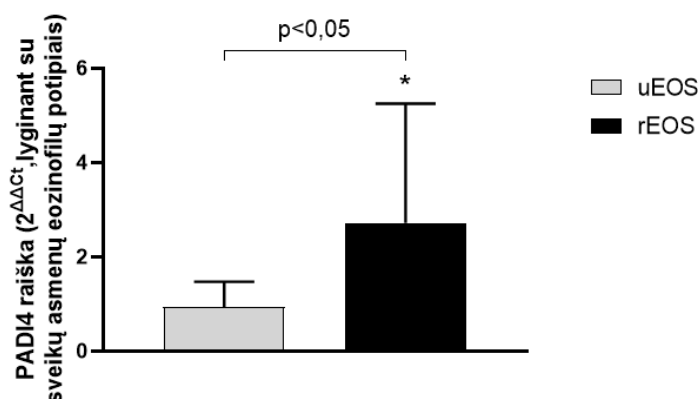
Palyginus *PADI4* geno raišką tarp eozinofilų potipių, nustatyta, kad astma sergančių pacientų rEOS pasižymėjo reikšmingai didesne šio geno raiška nei uEOS: $2,41 \pm 0,29$ ir $3,25 \pm 0,37$ ($p < 0,05$). Tuo tarpu, sveikų asmenų grupėje *PADI4* raiška tarp uEOS ir rEOS reikšmingai nesiskyrė: $2,42 \pm 0,52$ ir $2,87 \pm 0,45$ ($p > 0,05$) (13 pav.).



13 pav. Su EEToze susijusio *PADI4* geno raiškos skirtumai tarp eozinofilų potipių

Astmos pacientai $n = 10$; sveikų asmenų $n = 6$; uEOS – uždegiminiai eozinofilai; rEOS – rezidentiniai eozinofilai; EETozė – eozinofilų užląstelių spąstų išskyrimo procesas. Kuo didesnė ΔCt , tuo didesnė geno raiška

Įvertinus *PADI4* geno raiškos skirtumus astmos pacientų grupėje, lyginant su sveikais asmenimis, nustatyta, kad astmos pacientų rEOS *PADI4* raiška buvo reikšmingai didesnė, lyginant su sveikais asmenimis: $2,72 \pm 0,76$ ($p < 0,05$), o uEOS *PADI4* raiška reikšmingai nesiskyrė: $0,94 \pm 0,16$ ($p > 0,05$) (14 pav.).



14 pav. Su EEToze susijusio *PADI4* geno santykinės raiškos skirtumai sergančių asmenų grupėje, lyginant su sveikais asmenimis

Astmos pacientai $n = 10$; sveikų asmenų $n = 6$; uEOS – uždegiminiai eozinofilai; rEOS – rezidentiniai eozinofilai; EETozė – eozinofilų užląstelių spąstų išskyrimo procesas; * $p < 0,05$ lyginant su sveikais asmenimis

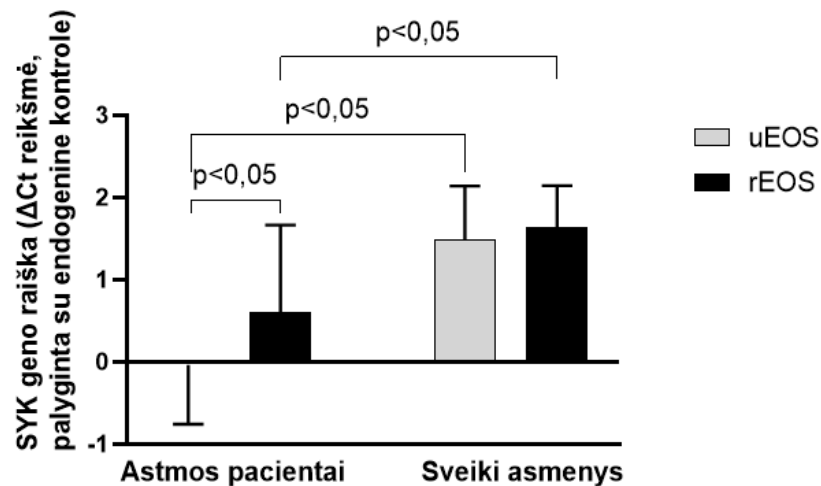
PADI4 genas koduoja PAD4 fermentą, kuris katalizuoja histonų arginino citrulinaciją, taip susilpninami ryšiai tarp histonų ir DNR. Ankstesni tyrimai parodė, kad PAD4 vaidina svarbų vaidmenį chromatinio dekonkondensacijoje ir gali prisidėti prie užląstelinių spąstų formavimosi. Atliktame tyrime su HL-60 granulocitinėmis ląstelėmis ir periferinio kraujo neutrofilais buvo aptikta, kad šios ląstelės ekspresuoja didelį kiekį PAD4, o fermento slopinimas sumažino histonų citrulinaciją ir užląstelinių spąstų formavimąsi [61]. Kitame tyrime buvo palyginti pelių neutrofilai, turintys PAD4 geną ir neturintys jo (PAD-/-). Rezultatai parodė, kad PAD-/- neutrofilai paveikti lipopolisaharidais (LPS), PMA, H₂O₂ ar bakterijomis nesugebėjo citrulinuoti histonų, dekonkondensuoti chromatinio ir suformuoti spąstus. Be to, PAD-/- pelės buvo jautresnės bakterinei infekcijai [62]. Šie eksperimentai rodo ryšį tarp PAD4, histonų citrulinacijos ir užląstelinių spąstų susidarymo ir jų funkcinio vaidmens įgimtame imunitete.

Nors ETozė pirmiausia buvo aprašyta neutrofiluose, naujesni tyrimai rodo, kad PAD4 yra svarbus ir eozinofilų užląstelinių spąstų formavimuisi. Tyrime su vainikinės arterijos trombais buvo ieškota citrulinuoto histono H3 signalo (CitH3) leukocitų praturtintose vietose. Didžioji CitH3 signalo dalis kolokalizavosi su mieloperoksidaze, kuri siejama su neutrofilais, tačiau dalis H3Cit signalo kolokalizavosi ir su eozinofilų peroksidaze, o tai rodė užląstelinių spąstų buvimą. Toliau tyrime iš sveikų donorų buvo išskirti eozinofilai, kurie gebėjo formuoti užląstelinius spąstus kartu su CitH3, o selektyvus PAD4 inhibitorius GSK484 šį procesą slopino [63]. Tokie rezultatai rodo, kad PAD4 gali prisidėti prie EETozės. Tyrime su astmos pacientais, taip pat buvo įrodyta, kad PAD4 inhibitorius GSK484 dalinai slopino EETozę. Be to, sunkia astma sergančių pacientų eozinofilai pasižymėjo intensyvesne degranuliacija, o EETozė tarp sunkios ir nesunkios astmos pacientų reikšmingai nesiskyrė [64].

Mūsų atliktame tyrime nustatyta reikšmingai didesnė *PADI4* raiška rEOS potipyje, palyginti su uEOS, bei padidėjusi santykinė *PADI4* raiška astma sergančių pacientų rEOS, lyginant su sveikų asmenų rEOS, leidžia manyti, kad rEOS gali turėti didesnį polinkį aktyvuoti su PAD4 susijusią EETozę. *PADI4* raiškos padidėjimas pastebėtas ne tik lyginant astma sergančių pacientų eozinofilų potipius tarpusavyje, bet ir rEOS potipį lyginant tarp astma sergančių bei sveikų asmenų. Todėl galima manyti, kad *PADI4* raiškos pokytis yra labiau būdingas būtent astma sergančių pacientų rEOS potypiui.

3.3.2. *SYK* geno raiška tarp eozinofilų potipių

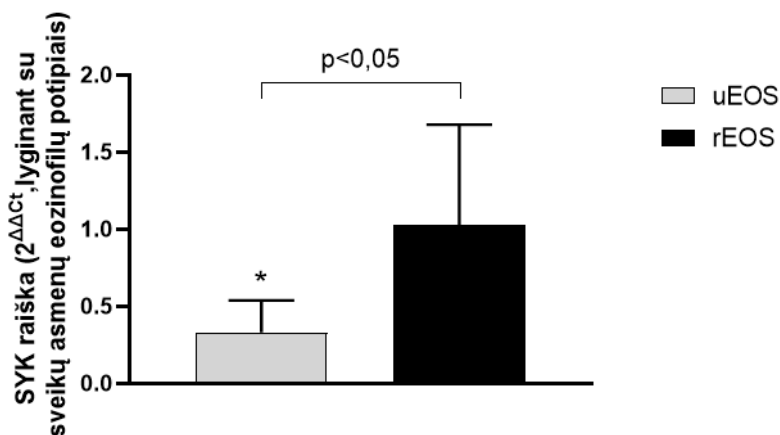
Palyginus *SYK* geno raišką tarp eozinofilų potipių, nustatyta, kad astmos pacientų uEOS pasižymėjo mažesne šio geno raiška nei rEOS: $-0,035 \pm 0,22$ ir $0,60 \pm 0,32$ ($p < 0,05$). Sveikų asmenų tiek uEOS, tiek rEOS pasižymėjo reikšmingai didesne *SYK* raiška nei astmos pacientų eozinofilų potipiai: $1,49 \pm 0,23$ ir $1,64 \pm 0,18$ ($p < 0,05$) (15 pav.).



15 pav. Su EEToze susijusio *SYK* geno raiškos skirtumai tarp eozinofilų potipių

Astmos pacientai $n = 10$; sveikų asmenų $n = 6$; uEOS – uždegiminiai eozinofilai; rEOS – rezidentiniai eozinofilai; EETozė – eozinofilų užląstelinių spastų išskyrimo procesas. Kuo didesnė ΔCt , tuo didesnė geno raiška

Įvertinus *SYK* geno raiškos skirtumus astma sergančių asmenų lyginant su sveikais asmenimis, nustatyta, kad astma sergančiųjų uEOS *SYK* raiška reikšmingai mažesnė, lyginant su sveikais asmenimis: $0,33 \pm 0,062$ ($p < 0,05$), o rEOS *SYK* raiška reikšmingai nesiskyrė: $1,03 \pm 0,19$ (16 pav.).



16 pav. Su EEToze susijusio *SYK* geno santykinės raiškos skirtumai sergančių asmenų grupėje, lyginant su sveikais asmenimis

Astmos pacientai $n = 10$; sveikų asmenų $n = 6$; uEOS – uždegiminiai eozinofilai; rEOS – rezidentiniai eozinofilai; EETozė – eozinofilų užląstelinių spastų išskyrimo procesas; * $p < 0,05$ lyginant su sveikais asmenimis

SYK genas koduoja blužnies tirozino kinazę SYK, kuri dalyvauja viduląstelinių signalų perdavime ir imuninių ląstelių aktyvijoje. Atliktame tyrime su nosies polipais, nustatyta, kad alerginiu rinitu sergančių asmenų nosies polipuose rasta daugiau SYK teigiamų ląstelių nei nealerginiuose polipuose, o daugiausia iš SYK teigiamų ląstelių buvo eozinofilai [65]. Tai rodo, kad SYK galimai yra susijęs su eozinofilų aktyvacija uždegiminiuose audiniuose.

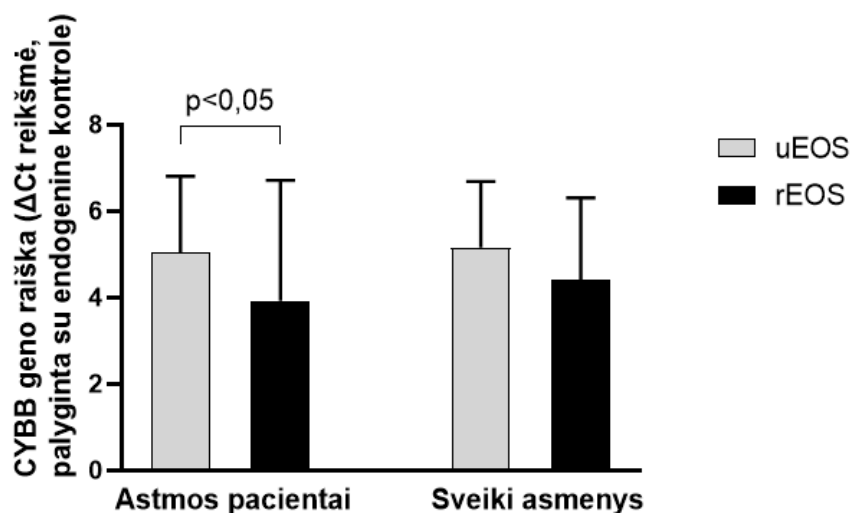
Tyrimuose su *Aspergillus fumigatus* parodytas SYK ryšys su EEToze. Tyrimuose su alergine bronchopulmonine aspergilioze sergančiais pacientais buvo nustatyta, kad jų bronchų sekretuose yra gausu branduolinių histonų turinčių EET. Tada atlikus *in vitro* tyrimą, kuriame žmogaus eozinofilai

buvo paveikti *A. fumigatus grybeliu*, nustatė, kad EETozės procesas yra savižudiško tipo ir susijęs per CD11b integrino ir SYK signalinį kelią [43]. Barroso ir kiti papildė supratimą apie SYK vaidmenį eozinofilų užląstelių spąstų formavimąsi, kai eozinofilai paveikiami *Aspergillus fumigatus*. Jie nustatė, kad užląstelių spąstų formavimasis priklauso nuo SYK, PI3Kδ/Akt, p38 MAPK ir kalcio signalinių kelių [44]. Šie rezultatai rodo, kad SYK gali būti vienas iš ankstyvų eozinofilų aktyvacijos signalinių komponentų, prisidedančių prie užląstelių spąstų formavimosi uždegiminėje kvėpavimo takų aplinkoje.

Mūsų atliktame tyrime nustatyta, kad astma sergančių pacientų uEOS *SYK* raiška buvo mažesnė nei rEOS, o sveikų asmenų eozinofilų potipiuose *SYK* raiška buvo didesnė nei astma sergančių pacientų, o tai parodo, kad astmos metu SYK signalinis kelias skirtinguose eozinofilų potipiuose gali būti reguliuojamas nevienodai.

3.3.3. *CYBB* geno raiška tarp eozinofilų potipių

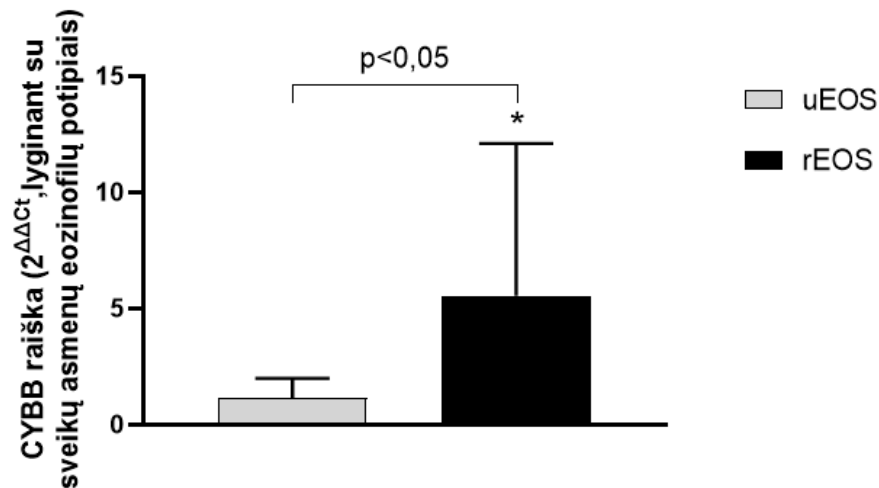
Palyginus *CYBB* geno raišką tarp eozinofilų potipių, nustatyta, kad astmos pacientų uEOS pasižymėjo statistiškai reikšmingai didesne *CYBB* raiška nei rEOS: $5,04 \pm 0,56$ ir $3,93 \pm 0,88$ ($p < 0,05$). Sveikų asmenų *CYBB* raiška tarp uEOS ir rEOS potipių reikšmingai nesiskyrė: $5,16 \pm 0,58$ ir $4,42 \pm 0,72$ ($p > 0,05$) (17 pav.).



17 pav. Su EEToze susijusio *CYBB* geno raiškos skirtumai tarp eozinofilų potipių

Astmos pacientai $n = 10$; sveikų asmenų $n = 6$; uEOS – uždegiminiai eozinofilai; rEOS – rezidentiniai eozinofilai; EETozė – eozinofilų užląstelių spąstų išskyrimo procesas. Kuo didesnė ΔCt , tuo didesnė geno raiška

Įvertinus *CYBB* geno raiškos skirtumus astma sergančių asmenų grupėje, lyginant su sveikais asmenimis, nustatyta, kad astma sergančiųjų rEOS *CYBB* raiška reikšmingai didesnė, lyginant su sveikais asmenimis: $5,549 \pm 1,978$ ($p < 0,05$), o uEOS *CYBB* raiška reikšmingai nesiskyrė: $1,13 \pm 0,26$ ($p > 0,05$) (18 pav.).



18 pav. Su EEToze susijusio *CYBB* geno santykinės raiškos skirtumai sergančių asmenų grupėje, lyginant su sveikais asmenimis

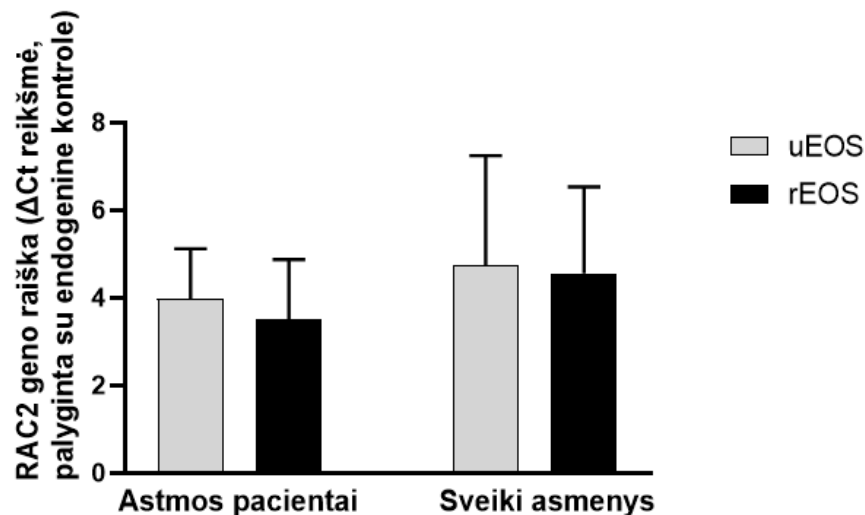
Astmos pacientai $n = 10$; sveikų asmenų $n = 6$; uEOS – uždegiminiai eozinofilai; rEOS – rezidentiniai eozinofilai; EETozė – eozinofilų užląstelių spąstų išskyrimo procesas; $*p < 0,05$ lyginant su sveikais asmenimis

CYBB genas koduoja gp91phox, dar vadinamą NOX2, kuris yra vienas iš pagrindinių NADPH oksidazės komplekso komponentų. NOX kompleksas dalyvauja superoksido ir RDF susidaryme, kurios svarbios tiek antimikrobiniam atsakui, tiek viduląstelių kelių aktyvinimui. Užląstelių spąstų formavimasis siejamas su RDF gamyba. Tyrime su ovalbuminu sukeltos astmos eksperimentinio modelio pelių kvėpavimo takuose buvo parodyta, kad užląstelių spąstų formavimasis sumažėjo, kai pelės buvo gydytos DPI, kuris yra NOX inhibitorius [66]. Kitame tyrime buvo tirti pacientai, sergantys lėtine granulomatine liga, kuriai būdinga *CYBB* geno mutacija. Sergančiųjų neutrofilai nesugebėjo formuoti užląstelių spąstų ir jų RDF gamyba buvo sutrikusi. Tuo tarpu eozinofilai iš to paties paciento vis dar galėjo iš dalies formuoti užląstelių spąstus ir gaminti RDF, tačiau šie procesai buvo visiškai nuslopinti DPI [67]. Šie rezultatai rodo, kad NOX slopinimas yra tiesiogiai susijęs su EETozės procesu.

Mūsų tyrime nustatyta, kad astma sergančių pacientų rEOS potipyje *CYBB* raiška buvo reikšmingai padidėjusi, palyginti su sveikų asmenų rEOS, tačiau lyginant potipius tarpusavyje, uEOS *CYBB* raiška buvo didesnė nei rEOS. Tai atitinka uEOS uždegiminį pobūdį ir galimą aktyvesnę RDF susidarymo mechanizmą. Vis dėlto, *CYBB* raiškos padidėjimas astma sergančių pacientų rEOS, palyginti su sveikų asmenų rEOS, rodo, kad ligos sąlygomis ir rEOS potipis gali būti susijęs su oksidacinio atsako mechanizmais.

3.3.4. *RAC2* geno raiška tarp eozinofilų potipių

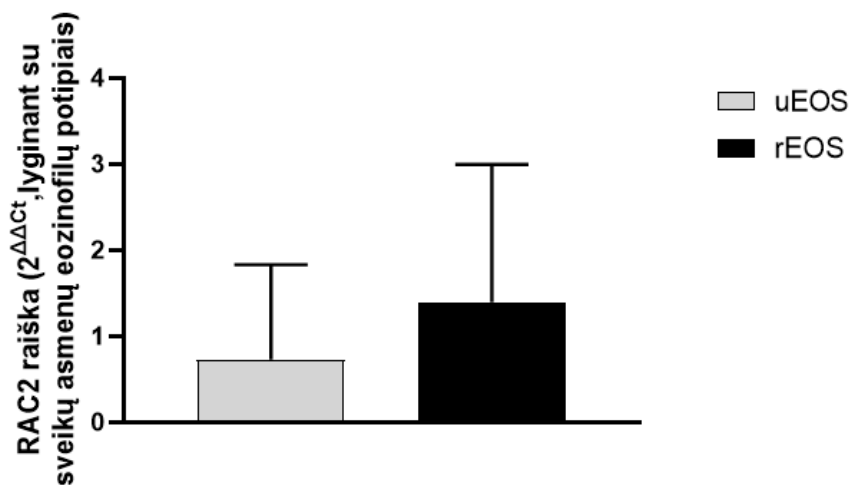
Palyginus *RAC2* geno raišką tarp eozinofilų potipių, statistškai reikšmingų skirtumų nenustatyta nei astma sergančių pacientų, nei sveikų asmenų grupėse. Astma sergančių pacientų grupėje *RAC2* raiška uEOS buvo $3,98 \pm 0,35$, rEOS – $3,51 \pm 0,41$, o sveikų asmenų grupėje atitinkamai $4,74 \pm 0,95$ ir $4,57 \pm 0,75$ ($p > 0,05$) (19 pav.).



19 pav. Su EETOze susijusio *RAC2* geno raiškos skirtumai tarp eozinofilų potipių

Astmos pacientai $n = 10$; sveikų asmenų $n = 6$; uEOS – uždegiminiai eozinofilai; rEOS – rezidentiniai eozinofilai; EETOzė – eozinofilų užląstelių spąstų išskyrimo procesas. Kuo didesnė ΔCt , tuo didesnė geno raiška

Įvertinus *RAC2* raiškos skirtumus astma sergančių asmenų grupėje, lyginant su sveikais asmenimis, reikšmingų pokyčių nenustatyta nei uEOS, nei rEOS. uEOS *RAC2* geno santykinė raiška buvo $0,73 \pm 0,33$, o rEOS – $1,39 \pm 0,48$ (20 pav.).



20 pav. Su EETOze susijusio *RAC2* geno santykinės raiškos skirtumai sergančių asmenų grupėje, lyginant su sveikais asmenimis

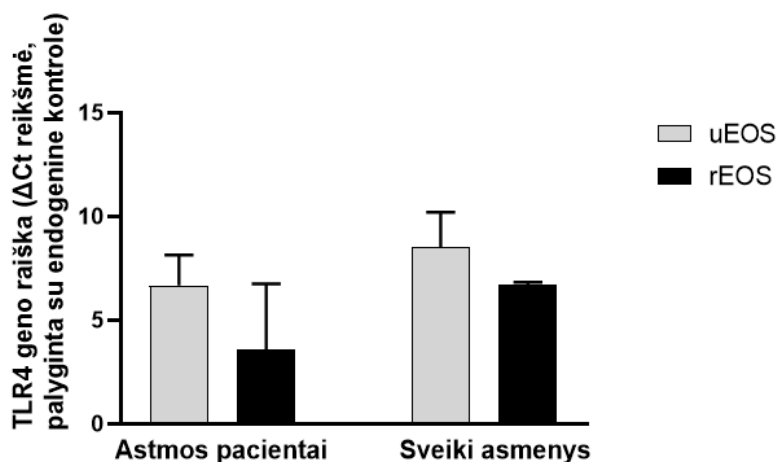
Astmos pacientai $n = 10$; sveikų asmenų $n = 6$; uEOS – uždegiminiai eozinofilai; rEOS – rezidentiniai eozinofilai; EETOzė – eozinofilų užląstelių spąstų išskyrimo procesas; $*p < 0,05$ lyginant su sveikais asmenimis

RAC2 genas koduoja mažą Rho šeimos GTPazę Rac2, kuri yra ekspresuojama hematopoetinių ląstelių ir reikalinga NOX aktyvinimui. Kaip jau buvo minėta, užląstelių spąstų gamybai reikalingas RDF. Tyrime su pelių neutrofilais buvo tiriamas Rac2 vaidmuo užląstelių spąstų formavime. Rezultatai parodė, kad neutrofiluose, kuriuose nėra Rac2, buvo sumažėjęs citrulinuotų histonų H3 kiekis ir sutrikęs užląstelių spąstų formavimasis [68].

Mūsų atliktame tyrime nebuvo nustatyta skirtumų tarp eozinofilų potipių ar tarp astma sergančių ir sveikų asmenų. Tai galėjo būti dėl per mažos tiriamųjų imties, todėl sunkiau buvo nustatyti silpnesnius *RAC2* raiškos pokyčius. Taip pat, *RAC2* vaidmuo EETozėje galimai labiau pasireiškia ne per geno raiškos pokyčius, o per baltymo aktyvaciją, GTP/GDP būsenas ir NOX komplekso reguliavimą.

3.3.5. *TLR4* geno raiška tarp eozinofilų potipių

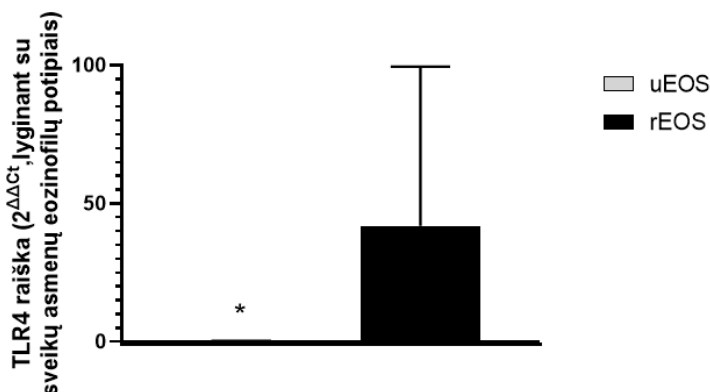
Palyginus *TLR4* geno raišką tarp eozinofilų potipių, statistiškai reikšmingų skirtumų nenustatyta nei tarp astmos pacientų, nei sveikų asmenų eozinofilų potipių. Astma sergančių pacientų grupėje *TLR4* raiška uEOS buvo $6,67 \pm 0,74$, rEOS – $3,59 \pm 1,58$, o sveikų asmenų grupėje atitinkamai $8,50 \pm 0,85$ ir $6,70 \pm 0,07$ ($p > 0,05$) (21 pav.).



21 pav. Su EEToze susijusio *TLR4* geno raiškos skirtumai tarp eozinofilų potipių

Astmos pacientai $n = 10$; sveikų asmenų $n = 6$; uEOS – uždegiminiai eozinofilai; rEOS – rezidentiniai eozinofilai; EETozė – eozinofilų užląstelinių spąstų išskyrimo procesas. Kuo didesnė ΔCt , tuo didesnė geno raiška

Įvertinus *TLR4* raiškos skirtumus astma sergančių asmenų grupėje, lyginant su sveikais asmenimis, nustatyta, kad uEOS potipyje *TLR4* geno raiška buvo reikšmingai sumažėjusi: $0,14 \pm 0,05$ ($p < 0,05$), o rEOS statistiškai reikšmingai nesiskyrė: $41,79 \pm 28,84$ ($p > 0,05$) (22 pav.).



22 pav. Su EEToze susijusio *TLR4* geno santykinės raiškos skirtumai sergančių asmenų grupėje, lyginant su sveikais asmenimis

Astmos pacientai $n = 10$; sveikų asmenų $n = 6$; uEOS – uždegiminiai eozinofilai; rEOS – rezidentiniai eozinofilai; EETozė – eozinofilų užląstelinių spąstų išskyrimo procesas; * $p < 0,05$ lyginant su sveikais asmenimis

TLR4 genas koduoja TLR4 receptorių, kuris priklauso įgimto imuniteto atpažinimo receptoriams ir atpažįsta bakterijų LPS bei kai kuriuos endogeninius DAMP. Tyrime, kuriame buvo analizuoti eozinofilinės kilmės EoL-1 ląstelių linija, rezultatai parodė, kad diferencijuotose EoL-1 ląstelėse *TLR4* raiška padidėjo tiek iRNR, tiek baltymo lygiu. Taip pat, atlikus analizę su iš žmogaus virkštelės kraujo CD34+ ląstelių išskirtais subrendusiais eozinofilais, buvo nustatyta, kad subrendusiuose eozinofiluose TLR4 buvo labiausiai ekspresuojamas TLR šeimos receptorių. Be to, TLR4 ligandai (LPS ir palmitino rūgštis) aktyvino eozinofilus, skatino uždegiminių mediatorių raišką ir MAPK viduląstelių kelių aktyvaciją [69]. Šie rezultatai rodo, kad TLR4 gali būti svarbus eozinofilų atsakui į uždegimą.

TLR4 molekulinis kelias atlieka vaidmenį užląstelių spąstų formavime. Atliktame tyrime su *TLR4* stokojančiais neutrofilais nustatyta, kad receptoriaus trūkumas sumažino neutrofilų gebėjimą formuoti DNR spąstus [70]. Nors rezultatai gauti neutrofiluose, jie rodo, kad TLR4 signalinis kelias gali būti susijęs su užląstelių spąstų formavimosi mechanizmais.

Mūsų tyrime astma sergančių pacientų uEOS potipyje *TLR4* raiška buvo sumažėjusi, palyginti su sveikų asmenų uEOS. Todėl galima manyti, kad astmos metu uEOS atsakas per TLR4 gali būti pakitęs. Kadangi TLR4 dalyvauja atpažįstant tiek mikrobinės kilmės, tiek audinių pažeidimo signalus, sumažėjusi jo raiška uEOS gali būti susijusi su pakitusiu šių ląstelių jautrumu uždegiminės aplinkos signalams.

Rekomendacijos

1. Tolimesniuose tyrimuose tikslinga vertinti ne tik užląstelinės DNR išsiskyrimą ir su EEToze susijusių genų raišką, bet ir kitus eozinofilų aktyvumo rodiklius, tokius kaip degranuliaciją, reaktyviųjų deguonies formų susidarymą, citokinų sekreciją ir ląstelių gyvybingumą.
2. Remiantis šio tyrimo rezultatais, tolimesniuose eozinofilų potipių EETozės tyrimuose rekomenduojama užląstelinės DNR išsiskyrimą papildomai įvertinti taikant konfokalinę mikroskopiją. Tai leistų patvirtinti, ar išmatuota užląstelinė DNR yra susijusi su užląstelinių spąstų struktūrų susidarymu.

Išvados

1. Astma sergančių pacientų rezidentiniai eozinofilai išskyrė daugiau mitochondrinės kilmės užląstelinės DNR, lyginant su uždegiminiais eozinofilais, o stimuliacija granulocitų ir makrofagų kolonijas stimuliuojančiu veiksnio šį procesą sustiprino.
2. Branduolinės kilmės užląstelinių spąstų susidarymo skirtumai tarp rezidentinių ir uždegiminių eozinofilų nebuvo statistiškai reikšmingi, tačiau abiejose tiriamųjų grupėse stebėta tendencija, kad uždegiminiai eozinofilai gali būti labiau linkę formuoti branduolinės kilmės užląstelinius spąstus nei rezidentiniai. Šiai tendencijai patvirtinti reikalingi didesnės imties tyrimai.
3. Astma sergančių pacientų eozinofilų potipiai skyrėsi pagal su eozinofilų užląstelinių spąstų formavimusi susijusių genų raišką – uždegiminiai eozinofilai pasižymėjo didesne *CYBB* ir mažesne *SYK* raiška, o rezidentiniai – didesne *PADI4* raiška. Lyginant su sveikais asmenimis, astmos pacientų rezidentiniuose eozinofiluose nustatyta padidėjusi *CYBB* ir *PADI4* raiška, o uždegiminiuose – sumažėjusi *SYK* ir *TLR4* raiška.

Literatūros sąrašas

1. GLOBAL INITIATIVE FOR ASTHMA. *Global Strategy for Asthma Management and Prevention*, 2025. Prieiga per internetą: https://ginasthma.org/wp-content/uploads/2025/11/GINA-2025-Update-25_11_08-WMS.pdf [žiūrėta 2026-04-09].
2. JAYASOORIYA, S. M.; DEVEREUX, G.; SORIANO, J. B.; SINGH, N.; MASEKELA, R. ir kt. Asthma: epidemiology, risk factors, and opportunities for prevention and treatment. *The Lancet Respiratory Medicine*, t. 13 (2025), nr. 8, p. 725–738. Prieiga per internetą: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213260024003837> [žiūrėta 2026-04-09].
3. KURUVILLA, M. E.; LEE, F. E. ir LEE, G. B. Understanding Asthma Phenotypes, Endotypes, and Mechanisms of Disease. *Clinical reviews in allergy & immunology*, t. 56 (2019), nr. 2, p. 219–233.
4. LIU, T.; WOODRUFF, P. G. ir ZHOU, X. Advances in non-type 2 severe asthma: from molecular insights to novel treatment strategies. *European Respiratory Journal*, t. 64 (2024), nr. 2. Prieiga per internetą: <https://publications.ersnet.org/content/erj/64/2/2300826> [žiūrėta 2026-04-15].
5. PAVÓN-ROMERO, G. F.; SERRANO-PÉREZ, N. H.; GARCÍA-SÁNCHEZ, L.; RAMÍREZ-JIMÉNEZ, F. ir TERÁN, L. M. Neuroimmune Pathophysiology in Asthma. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, t. Volume 9 (2021). Prieiga per internetą: <https://www.frontiersin.org/journals/cell-and-developmental-biology/articles/10.3389/fcell.2021.663535> [žiūrėta 2026-04-15].
6. XIE, C.; YANG, J.; GUL, A.; LI, Y.; ZHANG, R. ir kt. Immunologic aspects of asthma: from molecular mechanisms to disease pathophysiology and clinical translation. *Frontiers in Immunology*, t. Volume 15 - 2024 (2024). Prieiga per internetą: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2024.1478624> [žiūrėta 2026-05-12].
7. PELAIA, C.; HEFFLER, E.; CRIMI, C.; MAGLIO, A.; VATRELLA, A. ir kt. Interleukins 4 and 13 in Asthma: Key Pathophysiologic Cytokines and Druggable Molecular Targets. *Frontiers in Pharmacology*, t. Volume 13 - 2022 (2022). Prieiga per internetą: <https://www.frontiersin.org/journals/pharmacology/articles/10.3389/fphar.2022.851940> [žiūrėta 2026-05-14].
8. NAKAGOME, K. ir NAGATA, M. The Possible Roles of IL-4/IL-13 in the Development of Eosinophil-Predominant Severe Asthma. *Biomolecules*, t. 14 (2024), nr. 5, p. 546. doi: 10.3390/biom14050546.
9. SANCHEZ SANTOS, A.; SOCORRO AVILA, I.; GALVAN FERNANDEZ, H.; CAZORLA RIVERO, S.; LEMES CASTELLANO, A. ir kt. Eosinophils: old cells, new directions. *Frontiers in Medicine*, t. Volume 11 - 2024 (2025). Prieiga per internetą: <https://www.frontiersin.org/journals/medicine/articles/10.3389/fmed.2024.1470381> [žiūrėta 2026-05-13].
10. HOUGH, K. P.; CURTISS, M. L.; BLAIN, T. J.; LIU, R.; TREVOR, J. ir kt. Airway Remodeling in Asthma. *Frontiers in medicine*, t. Volume 7 (2020). Prieiga per internetą: <https://www.frontiersin.org/journals/medicine/articles/10.3389/fmed.2020.00191> [žiūrėta 2026-04-16].

11. VARRICCHI, G.; BRIGHTLING, C. E.; GRAINGE, C.; LAMBRECHT, B. N. ir CHANEZ, P. Airway remodelling in asthma and the epithelium: on the edge of a new era. *European Respiratory Journal*, t. 63 (2024), nr. 4. Prieiga per internetą: <https://publications.ersnet.org/content/erj/63/4/2301619> [žiūrėta 2026-04-16].
12. HSIEH, A.; ASSADINIA, N. ir HACKETT, T. Airway remodeling heterogeneity in asthma and its relationship to disease outcomes. *Frontiers in physiology*, t. Volume 14 (2023). Prieiga per internetą: <https://www.frontiersin.org/journals/physiology/articles/10.3389/fphys.2023.1113100> [žiūrėta 2026-04-16].
13. CABRAL-PACHECO, G.; GARZA-VELOZ, I.; CASTRUITA-DE LA ROSA, C.; RAMIREZ-ACUÑA, J. M.; PEREZ-ROMERO, B. ir kt. The Roles of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Human Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, t. 21 (2020), nr. 24. Prieiga per internetą: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/24/9739> [žiūrėta 2026-04-16].
14. TIOTIU, A.; STEIROPOULOS, P.; NOVAKOVA, S.; NEDEVA, D.; NOVAKOVA, P. ir kt. Airway Remodeling in Asthma: Mechanisms, Diagnosis, Treatment, and Future Directions. *Archivos de Bronconeumologia*, t. 61 (2025), nr. 1, p. 31–40. Prieiga per internetą: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300289624003673> [žiūrėta 2026-05-15].
15. TIGNER, A.; IBRAHIM, S. A. ir MURRAY, I. V. Histology, White Blood Cell. Iš: *StatPearlsTreasure Island (FL): StatPearls Publishing LLC*, 2026. Prieiga per internetą: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK563148/> [žiūrėta 2026-04-18].
16. WECHSLER, M. E.; MUNITZ, A.; ACKERMAN, S. J.; DRAKE, M. G.; JACKSON, D. J. ir kt. Eosinophils in Health and Disease: A State-of-the-Art Review. *Mayo Clinic proceedings*, t. 96 (2021), nr. 10, p. 2694–2707. Prieiga per internetą: <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2021.04.025> [žiūrėta 2026-04-18].
17. KANURU, S. ir SAPRA, A. Eosinophilia. Iš: *StatPearlsTreasure Island (FL): StatPearls Publishing LLC*, 2026. Prieiga per internetą: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560929/> [žiūrėta 2026-04-18].
18. VIEIRA, B. M.; XAVIER-ELSAS, P.; MOURA-NETO, V. ir GASPAR-ELSAS, M. Eosinophil Biology Today—A Primer for Basic and Clinical Investigators. *Immunology*, t. 178 (2026), nr. 1, p. 79–96. Prieiga per internetą: <https://doi.org/10.1111/imm.70104> [žiūrėta 2026-05-05].
19. KHANDAN KHADEM-REZA, Z. ir KARIMIAN, A. *Design a new algorithm to count white blood cells for classification leukemic blood image using machine vision system*. Mashhad, Iran: IEEE, 2016. Prieiga per internetą: https://www.researchgate.net/publication/312036591_Design_a_new_algorithm_to_count_white_blood_cells_for_classification_leukemic_blood_image_using_machine_vision_system [žiūrėta 2026-04-18].
20. FETTRELET, T.; GIGON, L.; KARAULOV, A.; YOUSEFI, S. ir SIMON, H. The Enigma of Eosinophil Degranulation. *International journal of molecular sciences*, t. 22 (2021), nr. 13, p. 7091. doi: 10.3390/ijms22137091. Prieiga per internetą: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5004964/> [žiūrėta 2026-05-08].
21. GERMIC, N.; FETTRELET, T.; STOJKOV, D.; HOSSEINI, A.; HORN, M. P. ir kt. The Release Kinetics of Eosinophil Peroxidase and Mitochondrial DNA Is Different in Association with

- Eosinophil Extracellular Trap Formation. *Cells*, t. 10 (2021), nr. 2, p. 306. doi: 10.3390/cells10020306.
22. WEAVER, M.; GLASS, B.; APLANALP, C.; PATEL, G.; MAZHIL, J. ir kt. Review of Peripheral Blood Eosinophilia: Workup and Differential Diagnosis. *Hemato*, t. 5 (2024), nr. 1, p. 81–108. Prieiga per internetą: <https://www.mdpi.com/2673-6357/5/1/8> [žiūrėta 2026-05-15].
23. MESNIL, C.; RAULIER, S.; PAULISSEN, G.; XIAO, X.; BIRRELL, M. A. ir kt. Lung-resident eosinophils represent a distinct regulatory eosinophil subset. *The Journal of clinical investigation*, t. 126 (2016), nr. 9, p. 3279–3295. Prieiga per internetą: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5004964/> [žiūrėta 2026-05-09].
24. NOVOSAD, J.; KRČMOVÁ, I.; SOUČEK, O.; DRAHOŠOVÁ, M.; SEDLÁK, V. ir kt. Subsets of Eosinophils in Asthma, a Challenge for Precise Treatment. *International journal of molecular sciences*, t. 24 (2023), nr. 6, p. 5716. doi: 10.3390/ijms24065716.
25. BRINKMANN, V.; REICHARD, U.; GOOSMANN, C.; FAULER, B.; UHLEMANN, Y. ir kt. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science (New York, N.Y.)*, t. 303 (2004), nr. 5663, p. 1532–1535. Prieiga per internetą: <https://www.nature.com/articles/s12276-018-0136-8> [žiūrėta 2026-05-12].
26. COSTIGAN, A.; HOLLVILLE, E. ir MARTIN, S. J. Discriminating Between Apoptosis, Necrosis, Necroptosis, and Ferroptosis by Microscopy and Flow Cytometry. *Current protocols*, t. 3 (2023), nr. 12, p. e951. Prieiga per internetą: <https://doi.org/10.1002/cpz1.951>.
27. LEBEN, R.; OSTENDORF, L.; VAN KOPPEN, S.; RAKHYMZHAN, A.; HAUSER, A. E. ir kt. Phasor-Based Endogenous NAD(P)H Fluorescence Lifetime Imaging Unravels Specific Enzymatic Activity of Neutrophil Granulocytes Preceding NETosis. *International journal of molecular sciences*, t. 19 (2018), nr. 4, p. 1018. doi: 10.3390/ijms19041018.
28. VERMOT, A.; PETIT-HÄRTLEIN, I.; SMITH, S. M. E. ir FIESCHI, F. NADPH Oxidases (NOX): An Overview from Discovery, Molecular Mechanisms to Physiology and Pathology. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, t. 10 (2021), nr. 6, p. 890. doi: 10.3390/antiox10060890.
29. RETTER, A.; SINGER, M. ir ANNANE, D. “The NET effect”: Neutrophil extracellular traps—a potential key component of the dysregulated host immune response in sepsis. *Critical Care*, t. 29 (2025), nr. 1, p. 59. Prieiga per internetą: <https://doi.org/10.1186/s13054-025-05283-0> [žiūrėta 2026-05-13].
30. AZZOUZ, D. ir PALANIYAR, N. How Do ROS Induce NETosis? Oxidative DNA Damage, DNA Repair, and Chromatin Decondensation. *Biomolecules*, t. 14 (2024), nr. 10, p. 1307. doi: 10.3390/biom14101307.
31. SHEN, K.; ZHANG, M.; ZHAO, R.; LI, Y.; LI, C. ir kt. Eosinophil extracellular traps in asthma: implications for pathogenesis and therapy. *Respiratory research*, t. 24 (2023), nr. 1, p. 231–4. Prieiga per internetą: <https://doi.org/10.1186/s12931-023-02504-4>.
32. CHOI, Y.; LE PHAM, D.; LEE, D.; LEE, S.; KIM, S. ir kt. Biological function of eosinophil extracellular traps in patients with severe eosinophilic asthma. *Experimental & molecular medicine*, t. 50 (2018), nr. 8, p. 1–8. Prieiga per internetą: <https://www.nature.com/articles/s12276-018-0136-8> [žiūrėta 2026-05-12].

33. CHOI, Y.; KIM, Y.; LEE, H.; MUN, J.; SIM, S. ir kt. Eosinophil extracellular traps activate type 2 innate lymphoid cells through stimulating airway epithelium in severe asthma. *Allergy*, t. 75 (2020), nr. 1, p. 95–103. Prieiga per internetą: <https://doi.org/10.1111/all.13997>.
34. LU, Y.; HUANG, Y.; LI, J.; HUANG, J.; ZHANG, L. ir kt. Eosinophil extracellular traps drive asthma progression through neuro-immune signals. *Nature cell biology*, t. 23 (2021), nr. 10, p. 1060–1072. Prieiga per internetą: <https://doi.org/10.1038/s41556-021-00762-2>.
35. RODRÍGUEZ-ALCÁZAR, J. F.; ATAIDE, M. A.; ENGELS, G.; SCHMITT-MABMUNYO, C.; GARBI, N. ir kt. Charcot-Leyden Crystals Activate the NLRP3 Inflammasome and Cause IL-1 β Inflammation in Human Macrophages. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, t. 202 (2019), nr. 2, p. 550–558. Prieiga per internetą: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1800107>.
36. CALIFF, R. M. Biomarker definitions and their applications. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)*, t. 243 (2018), nr. 3, p. 213–221. Prieiga per internetą: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29405771/> [žiūrėta 2026-05-08].
37. SCHOEN, J.; MUÑOZ-BECERRA, M.; KNOPF, J.; NDUKWE, F.; LEPPKES, M. ir kt. The chronicles of inflammation: uncovering of distinct patterns of NET degradation products. *Frontiers in Drug Discovery*, t. Volume 4 - 2024 (2024). Prieiga per internetą: <https://www.frontiersin.org/journals/drug-discovery/articles/10.3389/fddsv.2024.1404103> [žiūrėta 2026-05-10].
38. ZHANG, J.; QIU, Y.; LIU, Y.; MO, S.; NIE, M. ir kt. Eosinophil extracellular traps formation is correlated with cancer prognosis by tumor microenvironment remodeling. *Scientific Reports*, t. 15 (2025), nr. 1, p. 40209. Prieiga per internetą: <https://doi.org/10.1038/s41598-025-24010-x>.
39. LIU, X.; ARFMAN, T.; WICHAPONG, K.; REUTELINGSPERGER, C. P. M.; VOORBERG, J. ir kt. PAD4 takes charge during neutrophil activation: Impact of PAD4 mediated NET formation on immune-mediated disease. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*, t. 19 (2021), nr. 7, p. 1607–1617.
40. MOON, D. O. Natural Products Targeting PAD4 in NETosis: Structural and Mechanistic Insights into Direct and Indirect Inhibition. *Biomolecules*, t. 16 (2026), nr. 3, p. 420. doi: 10.3390/biom16030420.
41. BRADSHAW, W. J.; HARRIS, G.; GILEADI, O. ir KATIS, V. L. The mechanism of allosteric activation of SYK kinase derived from multiple phospho-ITAM-bound structures. *Structure (London, England : 1993)*, t. 32 (2024), nr. 12, p. 2337–2351.e4. Prieiga per internetą: <https://doi.org/10.1016/j.str.2024.09.024>.
42. ZHANG, S.; WANG, L.; LU, Y.; GUO, C.; ZHANG, T. ir kt. Targeting spleen tyrosine kinase (SYK): structure, mechanisms and drug discovery. *Drug discovery today*, t. 30 (2025), nr. 1, p. 104257. Prieiga per internetą: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2024.104257>.
43. MUNIZ, V. S.; SILVA, J. C.; BRAGA, Y. A. V.; MELO, R. C. N.; UEKI, S. ir kt. Eosinophils release extracellular DNA traps in response to *Aspergillus fumigatus*. *The Journal of allergy and clinical immunology*, t. 141 (2018), nr. 2, p. 571–585.e7. Prieiga per internetą: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.07.048>.
44. BARROSO, M. V.; GROPILO, I.; DETONI, M. A. A.; THOMPSON-SOUZA, G. A.; MUNIZ, V. S. ir kt. Structural and Signaling Events Driving *Aspergillus fumigatus*-Induced Human

Eosinophil Extracellular Trap Release. *Frontiers in microbiology*, t. 12 (2021), p. 633696. Prieiga per internetą: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2021.633696/full> [žiūrėta 2026-05-10].

45. SILVA, J. d. C.; THOMPSON-SOUZA, G. d. A.; BARROSO, M. V.; NEVES, J. S. ir FIGUEIREDO, R. T. Neutrophil and Eosinophil DNA Extracellular Trap Formation: Lessons From Pathogenic Fungi. *Frontiers in Microbiology*, t. Volume 12 - 2021 (2021). Prieiga per internetą: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2021.634043> [žiūrėta 2026-05-10].

46. LEIDING, J. W.; MATHEWS, C. E.; ARNOLD, D. E. ir CHEN, J. The Role of NADPH Oxidase 2 in Leukocytes. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, t. 14 (2025), nr. 3, p. 309. doi: 10.3390/antiox14030309.

47. PACLET, M.; LAURANS, S. ir DUPRÉ-CROCHET, S. Regulation of Neutrophil NADPH Oxidase, NOX2: A Crucial Effector in Neutrophil Phenotype and Function. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, t. Volume 10 - 2022 (2022). Prieiga per internetą: <https://www.frontiersin.org/journals/cell-and-developmental-biology/articles/10.3389/fcell.2022.945749> [žiūrėta 2026-05-12].

48. NORENG, S.; OTA, N.; SUN, Y.; HO, H.; JOHNSON, M. ir kt. Structure of the core human NADPH oxidase NOX2. *Nature Communications*, t. 13 (2022), nr. 1, p. 6079. Prieiga per internetą: <https://doi.org/10.1038/s41467-022-33711-0>.

49. XU, X.; YU, R.; YANG, Z.; LI, C.; XIONG, H. ir kt. Toll-like receptor-mediated immune imbalance in asthma: controversies, breakthroughs, and future directions. *Frontiers in Immunology*, t. Volume 16 - 2025 (2025). Prieiga per internetą: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2025.1605185> [žiūrėta 2026-05-10].

50. LI, X.; LI, X.; HUANG, P.; ZHANG, F.; DU, J. K. ir kt. Acetylation of TIR domains in the TLR4-Mal-MyD88 complex regulates immune responses in sepsis. *The EMBO journal*, t. 43 (2024), nr. 21, p. 4954–4983. Prieiga per internetą: <https://doi.org/10.1038/s44318-024-00237-8>.

51. MANSOURI, A.; AKTHAR, I. ir MIYAMOTO, A. TLR2 and TLR4 bridge physiological and pathological inflammation in the reproductive system. *Communications Biology*, t. 8 (2025), nr. 1, p. 1008. Prieiga per internetą: <https://doi.org/10.1038/s42003-025-08424-x>.

52. KIM, H.; KIM, H.; LEE, J. ir HWANGBO, C. Toll-like receptor 4 (TLR4): new insight immune and aging. *Immunity & ageing : I & A*, t. 20 (2023), nr. 1, p. 67–3. Prieiga per internetą: <https://doi.org/10.1186/s12979-023-00383-3>.

53. KHAN, M. A.; FARAHVASH, A.; DOUDA, D. N.; LICHT, J.; GRASEMANN, H. ir kt. JNK Activation Turns on LPS- and Gram-Negative Bacteria-Induced NADPH Oxidase-Dependent Suicidal NETosis. *Scientific Reports*, t. 7 (2017), nr. 1, p. 3409. Prieiga per internetą: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03257-z>.

54. JIANG, L.; SU, Z.; ZHANG, Y.; LIU, H. ir WANG, H. LPS promotes the production of ROS in neutrophils to regulate their killing activity against Mycobacterium tuberculosis. *Scientific Reports*, t. 15 (2025), nr. 1, p. 26785. Prieiga per internetą: <https://doi.org/10.1038/s41598-025-12232-y>.

55. FISH, A. The Role of Macrophages in Resistance to Caseous Lymphadenitis. *Honors College* (2015), p. 214. Prieiga per internetą: https://304129310_The_Role_of_Macrophages_in_Resistance_to_Caseous_Lymphadenitis [žiūrėta 2026-05-18].
56. YOUSEFI, S.; GOLD, J. A.; ANDINA, N.; LEE, J. J.; KELLY, A. M. ir kt. Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense. *Nature medicine*, t. 14 (2008), nr. 9, p. 949–953. Prieiga per internetą: <https://doi.org/10.1038/nm.1855>.
57. UEKI, S.; KONNO, Y.; TAKEDA, M.; MORITOKI, Y.; HIROKAWA, M. ir kt. Eosinophil extracellular trap cell death-derived DNA traps: Their presence in secretions and functional attributes. *The Journal of allergy and clinical immunology*, t. 137 (2016), nr. 1, p. 258–267. Prieiga per internetą: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.10.046>.
58. DWORSKI, R.; SIMON, H.; HOSKINS, A. ir YOUSEFI, S. Eosinophil and neutrophil extracellular DNA traps in human allergic asthmatic airways. *The Journal of allergy and clinical immunology*, t. 127 (2011), nr. 5, p. 1260–1266. Prieiga per internetą: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.12.1102>.
59. NOBS, S. P.; KAYHAN, M. ir KOPF, M. GM-CSF intrinsically controls eosinophil accumulation in the setting of allergic airway inflammation. *The Journal of allergy and clinical immunology*, t. 143 (2019), nr. 4, p. 1513–1524.e2. Prieiga per internetą: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.08.044>.
60. JANUSKEVICIUS, A.; JURKEVICIUTE, E.; JANULAITYTE, I.; KALINAUSKAITE-ZUKAUSKE, V.; MILIAUSKAS, S. ir kt. Blood Eosinophils Subtypes and Their Survivability in Asthma Patients. *Cells*, t. 9 (2020), nr. 5, p. 1248. doi: 10.3390/cells9051248. Prieiga per internetą: <https://doi.org/10.3390/cells9051248>.
61. WANG, Y.; LI, M.; STADLER, S.; CORRELL, S.; LI, P. ir kt. Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *The Journal of cell biology*, t. 184 (2009), nr. 2, p. 205–213. Prieiga per internetą: <https://doi.org/10.1083/jcb.200806072>.
62. LI, P.; LI, M.; LINDBERG, M. R.; KENNETT, M. J.; XIONG, N. ir kt. PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. *The Journal of experimental medicine*, t. 207 (2010), nr. 9, p. 1853–1862. Prieiga per internetą: <https://doi.org/10.1084/jem.20100239>.
63. MARTINOD, K.; DENORME, F.; MEYERS, S.; CRESCENTE, M.; VAN BRUGGEN, S. ir kt. Involvement of peptidylarginine deiminase 4 in eosinophil extracellular trap formation and contribution to citrullinated histone signal in thrombi. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, t. 22 (2024), nr. 6, p. 1649–1659. Prieiga per internetą: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1538783624001120> [žiūrėta 2026-05-17].
64. KIM, H. J.; SIM, M. S.; LEE, D. H.; KIM, C.; CHOI, Y. ir kt. Lysophosphatidylserine induces eosinophil extracellular trap formation and degranulation: Implications in severe asthma. *Allergy*, t. 75 (2020), nr. 12, p. 3159–3170. Prieiga per internetą: <https://doi.org/10.1111/all.14450>.
65. HAMAJIMA, Y.; FUJIEDA, S.; SUNAGA, H.; YAMADA, T.; MORIBE, K. ir kt. Expression of Syk is associated with nasal polyp in patients with allergic rhinitis. *Auris Nasus Larynx*, t. 34 (2007), nr. 1, p. 49–56. Prieiga per internetą: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0385814606001507> [žiūrėta 2026-05-17].

66. SILVEIRA, J. S.; ANTUNES, G. L.; KAIBER, D. B.; DA COSTA, M. S.; MARQUES, E. P. ir kt. Reactive oxygen species are involved in eosinophil extracellular traps release and in airway inflammation in asthma. *Journal of cellular physiology*, t. 234 (2019), nr. 12, p. 23633–23646. Prieiga per internetą: <https://doi.org/10.1002/jcp.28931>.
67. MIYABE, Y.; YANO, M.; FUKUCHI, M.; WATANABE, K.; MORITOKI, Y. ir kt. Neutrophil and eosinophil ETosis-mediated extracellular trap formation in a patient with chronic granulomatous disease. *Allergology international : official journal of the Japanese Society of Allergology*, t. 72 (2023), nr. 1, p. 176–178. Prieiga per internetą: <https://doi.org/10.1016/j.alit.2022.08.003>.
68. GAVILLET, M.; MARTINOD, K.; RENELLA, R.; WAGNER, D. D. ir WILLIAMS, D. A. A key role for Rac and Pak signaling in neutrophil extracellular traps (NETs) formation defines a new potential therapeutic target. *American Journal of Hematology*, t. 93 (2018), nr. 2, p. 269–276. Prieiga per internetą: <https://doi.org/10.1182/ajh.25185>.
69. YOON, J.; UM, H.; JANG, J.; BAE, Y.; PARK, W. ir kt. Eosinophil Activation by Toll-Like Receptor 4 Ligands Regulates Macrophage Polarization. *Frontiers in cell and developmental biology*, t. 7 (2019), p. 329. Prieiga per internetą: <https://www.frontiersin.org/journals/cell-and-developmental-biology/articles/10.3389/fcell.2019.00329/full> [žiūrėta 2026-05-18].
70. TADIE, J.; BAE, H.; JIANG, S.; PARK, D. W.; BELL, C. P. ir kt. HMGB1 promotes neutrophil extracellular trap formation through interactions with Toll-like receptor 4. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, t. 304 (2013), nr. 5, p. 342. Prieiga per internetą: <https://doi.org/10.1152/ajplung.00034.2013>.

Publikacijų sąrašas

Mokslinių tyrimų rezultatų skelbimas konferencijose

Rytė Jurkutė, Andrius Januškevičius, Eglė Vasylė, Airidas Rimkūnas, Jolita Palačionytė, Virginija Kalinauskaitė-Žukauskė, Kęstutis Malakauskas. „Eozinofilų potipių užląstelinių spąstų formavimosi skirtumai sergant astma“. Žodinis pranešimas skaitytas konferencijoje „Pulmonologija ir alergologija 2026“. Konferencija vyko 2026 m. gegužės 29 d.

Priedai

1 priedas. Bioetikos leidimas

Pasirašyta komiteto elektroniniu parašu
GINTAUTAS GUMBREVIČIUS
Data: 2023-09-28 15:54:13 GMT+3



KAUNO REGIONINIS BIOMEDICININIŲ TYRIMŲ ETIKOS KOMITETAS
Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, A. Mickievičiaus g. 9, LT-44307 Kaunas, tel. +370 37 32 72 29; el. paštas: kaunoetk@lsmu.lt
PRITARIMAS
BIOMEDICININIO TYRIMO PAPILDYMAI/PRATĖSIMAI
2023-09-28 Nr. P3-BE-2-58/2020

Biomedicininio tyrimo pavadinimas: „Eozinofilų potipių nekoduojančių RNR analizė ir jų pokyčių reikšmė kvėpavimo takų remodeliacijai sergant astma“	
Pagrindinis tyrėjas:	Prof. dr. Kęstutis Malakauskas
Biomedicininio tyrimo vieta:	Lietuvos sveikatos mokslų universiteto ligoninė Kauno klinikos Pulmonologijos klinika
Adresas:	Eivenių g. 4, LT-50161 Kaunas

Peržiūrėti šie [✓] su minėtu tyrimu susiję dokumentai:

- [✓] Biomedicininio tyrimo „Eozinofilų potipių nekoduojančių RNR analizė ir jų pokyčių reikšmė kvėpavimo takų remodeliacijai sergant astma“ pagrindinio tyrėjo prašymas dėl leidimo papildyti biomedicininį tyrimą;
- [✓] Paraiška biomedicininiam tyrimui „Eozinofilų potipių nekoduojančių RNR analizė ir jų pokyčių reikšmė kvėpavimo takų remodeliacijai sergant astma“;
- [✓] Biomedicininio tyrimo „Eozinofilų potipių nekoduojančių RNR analizė ir jų pokyčių reikšmė kvėpavimo takų remodeliacijai sergant astma“ protokolas (nr. 1 versija: 5 data: 2023-05-29);
- [✓] Biomedicininio tyrimo „Eozinofilų potipių nekoduojančių RNR analizė ir jų pokyčių reikšmė kvėpavimo takų remodeliacijai sergant astma“ protokolo santrauka (nr. 1 versija: 5 data: 2023-05-29);
- [✓] Biomedicininio tyrimo „Eozinofilų potipių nekoduojančių RNR analizė ir jų pokyčių reikšmė kvėpavimo takų remodeliacijai sergant astma“ informuoto asmens sutikimo forma sveikiems asmenims (versija nr. 5, data 2023-05-29);
- [✓] Biomedicininio tyrimo „Eozinofilų potipių nekoduojančių RNR analizė ir jų pokyčių reikšmė kvėpavimo takų remodeliacijai sergant astma“ informuoto asmens sutikimo forma sergantiems (versija nr. 5, data 2023-05-29);
- [✓] Oscilometrijos aparato CE sertifikatas.
- [✓] Nutarta: Pritarti biomedicininio tyrimo papildymui/pratėsimui

Kauno regioninio biomedicininių tyrimų etikos komiteto nariai		
Nr.	Vardas, pavardė	Veiklos sritys
1.	Doc. dr. Gintautas Gumbrevičius	Klinikinė farmakologija
2.	Prof. dr. Kęstutis Petrikonis	Neurologija
3.	Dr. Saulius Raugėlė	Chirurgija
4.	Dr. Lina Jankauskaitė	Pediatrija
5.	Prof. dr. Džilda Veličkienė	Endokrinologija
6.	Doc. dr. Eimantas Pečiūnas	Visuomenės sveikata
7.	Aušra Degutytė	Visuomenės sveikata
8.	Dr. Žydrūnė Luneckaitė	Visuomenės sveikata
9.	Viktorija Bučinskaitė	Teisė

Kauno regioninis biomedicininių tyrimų etikos komitetas dirba vadovaudamasis etikos principais nustatytais biomedicininių tyrimų Etikos įstatyme, Helsinkio deklaracijoje, vaistų tyrinėjimo Geros klinikinės praktikos taisyklėmis.

Pirmininkas



doc. dr. Gintautas Gumbrevičius