

Streszczenie pracy doktorskiej lek. Katarzyny Wawrzyckiej-Adamczyk pt.: „Rola markerów odpowiedzi immunologicznej Th17 i Treg w ocenie aktywności ziarniniakowatości z zapaleniem naczyń (GPA)”

Streszczenie

Ziarniniakowatość z zapaleniem naczyń (GPA- *granulomatosis with polyangiitis*) należy do układowych zapaleń naczyń charakteryzujących się obecnością przeciwciał przeciw ziarnistościom neutrofilii (ANCA). Dotyka ona przede wszystkim układu oddechowego i nerek, w których znaleźć można ziarniniaki i objęte stanem zapalnym drobne naczynia krwionośne. Etiopatogeneza choroby jest złożona; stwierdza się w niej liczne zaburzenia czynności układu odpornościowego. Wskazuje się m.in. na zaburzoną tolerancję immunologiczną (wytworzenie autooprzeciwciał), aktywację komplementu i licznych grup komórek zapalnych czy zmiany odsetka subpopulacji limfocytów. Szczególną uwagę w badaniach na ten temat w ostatnich latach poświęca się komórkom Th17 i T regulatorowym (Treg). Wśród licznych mechanizmów komórkowych zaangażowanych w patogenezę GPA poszukuje się także wskaźników aktywności choroby, wspomagających decyzje kliniczne dotyczące intensyfikacji leczenia immunosupresyjnego.

Cele pracy:

- (1) Ocena obrazu odsetkowego limfocytów pomocniczych na podstawie ekspresji powierzchniowych receptorów chemokinowych oraz produkcji cytokin po stymulacji, w grupach chorych: w aktywnej fazie GPA; po 6 miesiącach leczenia indukującego remisję; w okresie długotrwałej remisji GPA oraz wśród osób zdrowych,
- (2) Ocena ilości i potencjału komórek Treg w powyższych grupach celem określenia ich prawdopodobnej roli w okresie zaostrzenia choroby i ich ewentualnych zmian w odpowiedzi na stosowane leczenie.

Metody:

W latach 2013-2016 do badania włączono 19 chorych z zaostrzeniem GPA, 18 chorych w stabilnej (>1 roku) remisji choroby oraz 26 dobranych pod względem płci i wieku, zdrowych ochotników, jako grupę kontrolną. Wszyscy chorzy włączeni do badania byli ANCA+. Kryterium wykluczającym była obecność infekcji lub innego schorzenia autoimmunologicznego. Rozpoznanie było weryfikowane według kryteriów klasyfikacyjnych GPA ACR 1990. Głównym narzędziem oceny aktywności choroby była skala Birmingham Vasculitis Activity Score (BVAS). Zaostrzenie GPA definiowano jako wynik BVAS > 2, a remisję jako BVAS 0. Chorzy z pośrednim wynikiem zostali wyłączeni z badania. Krew do analiz laboratoryjnych była pobierana podczas pierwszej wizyty. Chorzy w zaostrzeniu GPA odbywali następnie comiesięczne wizyty kontrolne. Po pół roku leczenia immunosupresyjnego ponownie pobierano krew do analiz. Limfocyty izolowano z krwi żyłnej. Następnie oceniano obraz odsetkowy subpopulacji limfocytów T metodą cytometrii przepływowej na podstawie ekspresji receptorów chemokinowych (CXCR3, CCR4, CCR6 i CCR10) oraz produkcji cytokin IFN γ , IL-4, IL-22, IL-17A po stymulacji PMA i jonomycyną. Limfocyty Treg identyfikowane były jako komórki CD25^{hi}CD127^{low} lub na podstawie obecności czynnika transkrypcyjnego FoxP3. Dodatkowo analizowano komórki Treg posiadające defektywny (wiążący się z obniżonym potencjałem supresyjnym) wariant czynnika transkrypcyjnego FoxP3. Projekt uzyskał akceptację Komisji Bioetycznej, a osoby biorące w nim udział wyraziły na to pisemną zgodę.

Wyniki:

Badane grupy nie różniły się między sobą podstawowymi parametrami demograficznymi. Spośród chorych w zaostrzeniu 13 osiągnęło remisję po 6 miesiącach leczenia. Z pozostałych: 2 zmarło w trakcie badania, a 4 nadal prezentowało objawy choroby pomimo leczenia. W całej grupie chorych z GPA obserwowano: względną limfopenię, podwyższony odsetek komórek CD8⁺ oraz ekspansję limfocytów o typie Th17 (zarówno komórek IL-17⁺IFN γ -IL-4⁻ jak i komórek efektorowych CXCR3-

CCR4+CCR6+CCR10-). Zaostrzenie choroby wiązało się przede wszystkim z obniżeniem odsetka komórek T regulatorowych. Faza stabilnej remisji choroby charakteryzowała się zmianą proporcji komórek CD4+ dziewiczych do efektorowych pamięci CD4+ na korzyść drugiej z nich oraz obniżeniem bezwzględnej liczby limfocytów T i CD4+. Ponadto u chorych odsetek limfocytów Treg przewyższał nie tylko wartości dla grupy w zaostrzeniu, ale również grupy kontrolnej.

Związek aktywności choroby z limfocytami Treg potwierdzono również wysokim wskaźnikiem korelacji Spearmana między odsetkiem komórek CD25hiCD127low a wynikiem w skali BVAS oraz stężeniem CRP. Ponowna analiza immunofenotypu po 6-miesięcznym leczeniu indukującym remisję chorych z zaostrzeniem, pomimo braku objawów klinicznych (BVAS 0) nie wykazała różnic w żadnym z analizowanych parametrów komórkowych.

Wnioski:

Zaostrzenie ziarniniakowości z zapaleniem naczyń wiąże się z istotną deplecją limfocytów T regulatorowych. Wejście w stabilną remisję charakteryzuje się z kolei znacznym wzrostem tej subpopulacji limfocytów. Podobne zmiany nie są jednak kompensowane spadkiem limfocytów Th17. Ich ekspansja nie zależy od aktywności choroby; może leżeć u podstaw patomechanizmu choroby. W efekcie stosunek komórek Treg do Th17 pozostaje obniżony w całej grupie GPA, co sugeruje, że równowaga między nimi, w przeciwieństwie do innych chorób z autoagresji, może mieć bardziej złożony charakter. Wszelkie zmiany immunofenotypowe zachodzące podczas wejścia w fazę remisji obserwowane są dopiero w dłuższej niż 6 miesięcy perspektywie od ustąpienia objawów chorobowych, świadcząc o głębokim zaburzeniu odpowiedzi komórkowej w ostrej fazie GPA i dużej „bezwładności” procesu chorobowego. Można przypuszczać, że odsetek komórek T regulatorowych mógłby stanowić marker aktywności ziarniniakowości z zapaleniem naczyń.

Summary

Granulomatosis with polyangiitis (GPA) is a systemic vasculitis characterized by the presence of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA). GPA mainly affects the respiratory tract and kidneys, where both granulomas and inflamed small blood vessels can be found. The etiopathogenesis of the disease is complex and during its progression multiple dysfunctions of the immune system occur. Those include: impaired immune tolerance (autoantibodies-mediated inflammation), increased complement activation, proliferation of various cell types, as well as altered representation of lymphocyte subsets. Lately particular attention has been paid to misrepresentation of Th17 and T regulatory (Treg) cells. Clinical characteristics of GPA patients is focused on vasculitis activity evaluation which now is based mainly on scales and non-specific laboratory markers. In recent years research efforts are focused on finding potential disease activity markers as this would support difficult clinical decisions regarding to immunosuppression intensification. We tried to look for them among percentages of different T helper and T regulatory cells.

Aims

(1) Evaluation of the T helper cell phenotype in patients in the exacerbation of GPA prior any treatment and the same patients after 6 months of the remission-induction therapy, as well as in patients with long lasting disease remission. T helper phenotype is assessed based on the surface chemokine receptors expression and the production of cytokines after stimulation with PMA.

(2) Analysis of the number of Th17 and Treg cells in the above mentioned groups in order to assess their possible role in disease exacerbation and its response to the immunosuppressive therapy.

Methods

The study was conducted between 2013 and 2016 and consisted of 19 patients with exacerbation of GPA, 18 patients in stable (> 1 year) disease remission and 26 age and sex matched healthy volunteers

as controls. All patients in the study were ANCA positive. The exclusion criteria were: the presence of any infection or the existence of another autoimmune disease. The GPA diagnosis was verified according to the GPA classification criteria by The American College of Rheumatology (1990). The main tool to assess disease activity in GPA patients was Birmingham Vasculitis Activity Score (BVAS). GPA exacerbation was defined as a result of BVAS > 2 and remission was considered for a score of BVAS = 0. Patients with intermediate result were excluded from the study. Blood samples from patients were collected during their first visit. The patients in exacerbation of GPA were followed up during the first months of immunosuppressive therapy on the monthly basis. After 6 months blood was collected for final analysis. Lymphocytes were isolated from venous blood. Lymphocytes immunophenotyping was performed by using fluorescence-activated cell sorting to detect the presence/absence of chemokine receptors (CXCR3, CCR4, CCR6 and CCR10) expression and by assessing cytokine production (IFN γ , IL-4, IL-22 and IL-17) after stimulation with PMA and ionomycin. Treg cells were identified as CD25^{hi}CD127^{low} and FoxP3 (transcription factor) positive. Moreover, Treg cells were analyzed for the presence of a defective variant of FoxP3, which is involved in reduced suppression potential. The project was approved by the Local Ethic Committee and all participants signed study written consent.

Results

Study groups did not differ in their basic demographic parameters (sex, age, age at disease onset, duration of illness, glucocorticoids dosage). 13 patients with exacerbation of GPA achieved remission after 6 months of immunosuppressive therapy (2 died during the study, 4 still exhibited disease symptoms despite the treatment). Findings in all GPA patients included: a relative lymphopenia, an increased percentage of CD8⁺ lymphocytes and expansion of the Th17 (both IL-17⁺IL-4-IFN γ - and effector memory cells CXCR3⁻ CCR4⁺CCR6⁺CCR10⁻). The exacerbation of GPA was primarily associated with a reduction in the percentage of Treg cells. Interestingly, the 6 months of the immunosuppressive treatment, despite the absence of clinical symptoms in patients (BVAS 0), did not change any of the analyzed cellular parameters; Treg levels remained low. Stable remission of GPA was characterized by an overall decrease in the number of CD4⁺ T lymphocytes compared to the healthy volunteers, as well as an altered proportions of CD4⁺ effector memory and CD4⁺ naïve cells, where the population of naïve cells prevailed. Furthermore, in patients in stable remission the percentage of Treg lymphocytes were higher than in the other groups, including the healthy volunteers. Those findings were confirmed by the high Spearman correlation coefficient between Treg cell percentage and BVAS result. There was no significant difference in the percentage of Th1 and Th2 cells between the studied groups.

Conclusions

Exacerbation of GPA is associated with a significant depletion of Treg cells and stable remission is characterized by a significant increase in the Treg percentage. These changes are not compensated by Th17 cells. Expansion of Th17 is not dependent on disease activity. As a result, the ratio of Treg to Th17 cells is lowered in the whole GPA group, suggesting that the balance between these subsets in the GPA, in contrast to other autoimmune diseases, may be more complex. Any immunophenotype changes occurring during entering the stable remission are observed after few months after the disappearance of clinical symptoms proving prominent abnormalities of cellular response in the acute phase of the GPA, as well as the big "inertia" of the inflammatory process in this disease entity. On the basis of these results can be assumed that the percentage of Treg cells may be a potential indicator of the disease activity in GPA.