

Laboratorinė medicina.
2020, t. 22, Nr. 2(86), p. 92–97.

Granzimų B ir perforinų pokyčiai sveikų ir inksto transplantaciją patyrusių pacientų kraujyje

Augustė Riklikaitė¹
Laimutė Jurgauskienė²

Santrauka

Darbo tikslas. Įvertinti citotoksinių CD8⁺ T limfocitų granzimo B ir perforino ekspresijos pokyčius recipientų po inksto transplantacijos kraujyje esant citomegalo viruso (CMV) ir Epšteino-Bar (EBV) infekcijai ir palyginti juos su sveikų donorų kraujo tyrimo rezultatais.

Metodika. Tyrime apibendrinti VUL Santaros klinikose gydytų 53 pacientų, kuriems buvo atlikta pakaitinė inkstų terapija – inksto transplantacija iš gyvų ar mirusių donorų, duomenys. Į kontrolinę grupę atsitiktinai įtraukta 20 asmenų (kraujo donorų), savanoriškai atvykusių duoti kraujo į Kraujo centrą. Taikant tėkmės citometriją įvertinta CD8⁺ T limfocitų granzimo B ir perforinų ekspresija pacientų po inksto transplantacijos veniniame kraujyje ir sveikų donorų kraujyje prieš T limfocitų blastinės transformacijos reakciją ir po jos.

Rezultatai. Ištyrus CMV DNR ir EBV DNR, citomegalo viruso infekcija nustatyta 18 pacientų (34 %), Epšteino-Bar viruso – 4 pacientams (8 %). Tėkmės citometrijos būdu didžiausias granzimo B (33 %) ir perforinų (24 %) ekspresuojančių CD8⁺ T limfocitų kiekis nustatytas esant virusinėms infekcijoms. Kontrolinės grupės sveikų donorų kraujyje nestimuliuotiems mitogenu CD8⁺ T limfocitams buvo įvertinta 14 % granzimo B ir 8 % perforino ekspresija. Atlikus limfocitų blastinės transformacijos reakciją, po stimuliacijos mitogenu – fitohemagliutininu granzimo B ekspresija vidutiniškai padidėjo 8 %, perforino ekspresija – 6 %. Didžiausias granzimo B (29 %) ir perforino (24 %) kiekis nustatytas vyresnių nei 61 metų pacientų amžiaus grupėje, kurioje vyriausias tirtas asmuo buvo 73 metų. Mažiausias granzimo B (22 %) ir perforino (15 %) kiekis įvertintas jaunesnių kaip 40 metų pacientų grupėje, kurioje jauniausias tirtas asmuo buvo 26 metų amžiaus.

Išvados. Citomegalo ir Epšteino-Bar virusai aktyvina CD8⁺ T ląsteles paskatindami didesnę granzimų B ir perforinų ekspresiją nei sveikų asmenų kraujyje. Taip pat didėjančią perforino ir tendencingai didėjančią granzimo B ekspresiją lemia nuo pacientų amžiaus priklausomi T limfocitų subpopuliacijų pokyčiai.

Reikšminiai žodžiai: granzimai, perforinai, ląstelinis imuninis atsakas, inksto transplantacija, fitohemagliutininas, tėkmės citometrija.

ĮVADAS

Pastaraisiais dešimtmečiais atlikti tyrimai įrodo, kad inksto transplantacija (IT), nustačius galutinės stadijos

inkstų ligą, yra viena svarbiausių pakaitinės inkstų terapijos rūšių po hemodializės ir peritoninės dializės [1]. Taikant naujausią gydymą imunosupresiniais vaistais ir tinkamą slaugos

¹Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto Biomedicinos mokslų instituto Fiziologijos, biochemijos, mikrobiologijos ir laboratorinės medicinos katedra, M. K. Čiurlionio g. 21/27, LT-03101 Vilnius

Department of Physiology, Biochemistry, Microbiology and Laboratory Medicine, Institute of Biomedical Sciences, Faculty of Medicine, Vilnius University
El. paštas: riklikaitė@gmail.com

²Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto Klinikinės medicinos instituto Širdies ir kraujagyslių ligų klinika
Clinic of Heart and Vascular Diseases, Institute of Clinical Medicine, Faculty of Medicine, Vilnius University

priežiūra, pacientų išgyvenamumas po inksto transplantacijos siekia 90 % [2]. Ankstyvuojų potransplantaciniu laikotarpiu 8 % pacientų nepasireiškia jokių komplikacijų ir pirmųjų inkstų sutrikimų, tačiau 32 % inksto recipientų diagnozuojama ūminė transplantato disfunkcija, o 47 % pacientų susiduria su neigiamais imunosupresinio gydymo padariniais [3]. Recipientų vartojami imunosupresiniai vaistai gali maskuoti įvairių bakterinių ir virusinių infekcijų eigą ir klininius simptomus, todėl Lietuvoje pacientai po alogeninės inksto transplantacijos yra periodiškai tikrinami dėl transplantato atmetimo reakcijų ir infekcijų sukeliamų komplikacijų.

Šiuo metu inksto biopsija išlieka pagrindinis būdas transplantato atmetimui patvirtinti ir adekvačiai imunoterapijai parinkti [4]. Tačiau biopsija yra invazyvi ir pavojinga paciento sveikatai procedūra, kurią siekiama pakeisti alternatyviais transplantato atmetimo nustatymo būdais. Naujausi moksliniai tyrimai patvirtina, kad tikslingas citotoksinių T limfocitų funkcijos įvertinimas turi didelę prognozinę reikšmę nustatant transplantato atmetimą, diagnozuojant virusines infekcijas ir autoimunines ligas [5].

Pagrindiniai ląstelių pažeidimo mediatoriai, kaupiami $CD8^+$ T efektorinių limfocitų granulose, yra baltymas perforinas, kuris geba įsiterpti ir polimerizuotis ląstelės taikinio membranoje, ir serino proteazės – granzimai, inicijuojantys ląstelių apoptozę [6]. Dėl perforinų veiklos sutrinkdama vandens homeostazė ir sukelia osmosinė ląstelės taikinio žūtis, o granzimai aktyvindami fermentus sukelia endogeninę ląstelių apoptozę ir netiesiogiai prisideda prie DNR fragmentacijos. Veikiant proteoliziniams fermentams – kaspazėms, yra stiprinamas apoptozės signalo perdavimas į mitochondrijas, branduolį ir kitas ląstelių struktūras. Endonukleazų aktyvacija pradeda galutinę ląstelės sunaikinimo fazę, kai sutrūkus deoksiribonukleorūgščiai į viengrandę DNR ląstelė suskyla į atskirus apoptozinius kūnus, kuriuos pašalina fagocitai [7, 8].

Nagrinėjant žmogaus patofiziologinius mechanizmus, labiausiai ištirtas granzimas B. Kartu su perforinu jis gali veikti bakteriocidiskai, naikinti navikines ląsteles, slopinti virusų replikaciją arba dalyvauti ūminėje transplantato atmetimo reakcijoje [9]. Nurodoma, kad imuninio atsako baltymai yra svarbūs žymenys įvertinant ankstyvą pooperacinį persodinto organo funkcionavimą, kadangi atminties $CD8^+$ T limfocitai yra vieni pirmųjų leukocitų, kurie patenka į transplantato vidų ir aktyvina organo atmetimo procesus [10].

Lietuvoje granzimų ir perforinų tyrimai yra atliekami tik moksliniais tikslais, o jų vaidmuo ląsteliname imuniniame atsake nėra galutinai aiškus. Mažai yra žinoma apie granzimų ir perforinų pokyčius sveikų žmonių kraujyje ir tai, kokią įtaką šių baltymų ekspresijai daro pacientų amžius. Plėtojant tyrimus šia tematika, siekiama atrasti ir pritaikyti efektyvesnes organo transplantaciją patyrusių pacientų gydymo ir profilaktikos priemones. $CD8^+$ T limfocitų granzimų ir perforinų ekspresijos įvertinimas recipientų kraujyje galėtų būti papildomas informatyvus rodiklis prognozuojant transplantato atmetimą, reguliuojant imunosupresinį gydymą ir vykdant virusinių infekcijų prevenciją.

TIRIAMOJI MEDŽIAGA IR METODAI

Tyrimas atliktas Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų Laboratorinės medicinos centro (LMC) Imunologijos ir kraujo perpylimo laboratorijoje. Tyrimui apibendrinti inksto transplantaciją patyrusių 53 pacientų, kurių amžius buvo nuo 29 iki 73 metų, duomenys. Tėkmės citometrijos būdu įvertinti tiriamų $CD8^+$ T limfocitų citotoksinių mediatorių granzimų ir perforinų ekspresijos pokyčiai kraujyje. Visiems 53 inkstų recipientams LMC mikrobiologijos laboratorijoje buvo atlikti molekulinės diagnostikos tyrimai siekiant kiekybiškai įvertinti citomegalo viruso (CMV) ir Epšteino–Bar vi-

ruso (EBV) DNR kopijų skaičių kraujo plazmoje.

Į sveikųjų kontrolinę grupę atsitiktinai įtraukta 20 asmenų (kraujo donorų), savanoriškai atvykusių duoti kraujo į VUL Santaros klinikų Kraujo centrą. Ją sudarė 15 vyrų ir 5 moterys, kurių amžius buvo nuo 24 iki 60 metų. Kontrolinės grupės asmenys buvo sveiki, nesergantys sisteminė, infekcinė ir jokia kita virusine liga. Buvo įvertinti $CD8^+$ T limfocitų granzimų ir perforinų ekspresijos pokyčiai tiriamųjų kraujyje, atlikus T limfocitų blastinės transformacijos reakciją (LBR).

Limfocitų žymėjimas monokloniniais antikūnais

Ruošiant mėginius buvo taikoma Becton Dickinson *Immunocytometry Systems* (JAV) rekomenduojama metodika paviršinių bei viduląstelių žymenų ekspresijai nustatyti.

Ištyrimui buvo naudojama 100 ml gerai sumaišyto nesukrešėjusio kraujo, kuris buvo inkubuojamas su IgG_1 , IgG_{2a} , CD3 ir CD8 monokloniniais antikūnais (žr. lentelę). Eritrocitų lizei naudotas (*BD FACS Lysing solution*) reagentas, mėginių plovimui – PBS buferinis tirpalas. Viduląsteliniais žymenims granzimams ir perforinams nustatyti *in vitro* buvo naudojamas limfocitų membranas permeabilizuojantis tirpalas (*BD FACS Permeabilizing solution 2*) ir monokloniniai antikūnai, nukreipti prieš granzimą B ir perforiną. Ląstelių membranos fikacijai naudotas 2 % paraformaldehido tirpalas, paruoštas mėginys buvo vertinamas tėkmės citometru (*BD FACSCalibur*).

Limfocitų blastinės transformacijos reakcija

Ištyrimui buvo naudojamas standartinis tankio gradientas *Lymphoprep*, kuris padėjo atskirti mononuklearines ląsteles nuo kitų kraujo komponentų. Goriajevo kameroje šviesiniu mikroskopu buvo apskaičiuojama limfocitų koncentracija (pageidaujama koncentracija $15\text{--}25 \times 10^6$ limf./ml). Į ląstelių

Lentelė. Monokloninių antikūnų (MAk) charakteristikos
Table. Characteristics of monoclonal antibodies

MAk pagal CD klasifikaciją	Konjuguotas fluorochromas	Specifiškumas
CD3	PerCP	T limfocitų žymuo
CD8	APC	CTL žymuo, silpniau ekspresuojamas dalies NK ląstelių
IgG_1	FITC	Specifinis pelių ląstelių žymuo, kurio neturi žmogaus ląstelės
IgG_{2a}	PE	Specifinis pelių ląstelių žymuo, kurio neturi žmogaus ląstelės
Granzimas B	FITC	Citotoksinis mediatorius, ekspresuojamas T limfocitų ir NK ląstelių
Perforinas	PE	Citotoksinis mediatorius, ekspresuojamas T limfocitų ir NK ląstelių

sėjimo buteliukus buvo pilama 2,8 ml terpės RPMI-1640 su HEPES, l-gliutaminu ir antibiotikais, 20 % veršiuo serumo, 200 l paruoštos ląstelių suspensijos (limfocitų). *In vitro* limfocitų blastinės transformacijos reakcijai naudotas mitogenas – fitohemagliutinas (PHA). Savaiminei transformacijai nustatyti buvo ruošiamas kontrolinis mėginys be mitogeno.

Limfocitų kultūros buvo inkubuojamos 18 valandų 37 °C temperatūroje CO₂ inkubatoriuje. Po inkubacijos limfocitai analogiškai buvo žymimi monokloniniais antikūnais ir vertinami tėkmės citometru.

Duomenų analizė tėkmės citometru

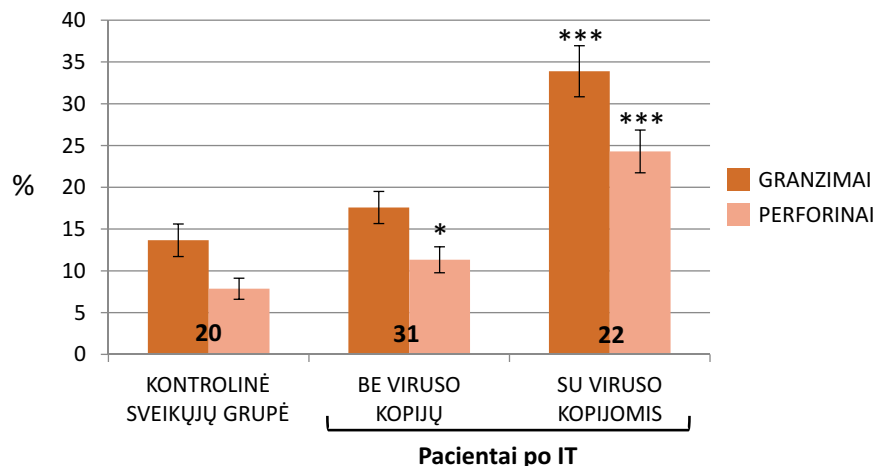
Ląstelės buvo analizuojamos *CellQuest Pro* programine įranga. Analizuota po 10 000 ląstelių kiekviename mėginyje tiriant paviršinius ir viduląstelinis žymenis.

Prieš tiriant mėginį visada buvo atliekama neigiama nespecifinės fluorescencijos kontrolė su izotipiniais reagentais prieš žmogaus organizme nesančius antigenus. Naudojant izotipinius neigiamos kontrolės reagentus (IgG₁ ir IgG_{2a}) buvo patikrinama, ar nėra nespecifinio antikūnų jungimosi prie tiriamųjų ląstelių populiacijų.

Bendram T limfocitų identifikavimui buvo naudoti monokloniniai antikūnai, suderinti su konjuguotais fluorochromais: anti-CD3 (PerCP), anti-CD8 (APC), anti-granzimas B (FITC), anti-perforinas (PE). Išsamiau tirta citotoksinių limfocitų subpopuliacija, ekspresuojanti CD8 žymenį.

Statistinė duomenų analizė

Statistinė duomenų analizė atlikta naudojant programų paketus *Microsoft Office Excel 2016* ir *RStudio*. Kiekybiniais kintamiesiems atlikta aprašomoji statistika: nustatyta padėties charakteristika – vidurkis ir mediana, bei sklaidos charakteristika – standartinis nuokrypis (SD) bei vidurkio standartinė paklaida (angl. *standard error*, SE). Duomenų normalumo sąlyga patikrinta taikant *Shapiro-Wilk* testą, dispersijų lygybės sąlyga – taikant *F* testą. Vidurkių skirtumo tarp grupių statistinis reikšmingumas įvertintas neparimetriniu *Mann-Whitney U* testu, skirtu nepriklausomoms imtims lyginti, ir *Wilcoxon* testu, skirtu poruotoms priklausomoms imtims lyginti. Vertinant statistinį reikšmingumą buvo taikomas 95 % pasikliovimo intervalas ir rezultatai buvo laikomi statistiškai reikšmingais, jei $p < 0,05$.



1 pav. Pacientų po inksto transplantacijos (pagal CMV ir EBV kopijų skaičių kraujyje) ir kontrolinės grupės efektorinių baltymų granzimų ir perforinų kiekio CD8⁺ T limfocitų populiacijoje palyginimas. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ statistinis patikimumas, palyginus su kontroline grupe

Fig. 1. Comparison of the amount of effector proteins granzyme B and perforin in the CD8⁺ T lymphocyte population of patients after kidney transplantation (based on the number of CMV and EBV copies in the blood) and the normal control. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ statistical significance

TYRIMO REZULTATAI IR APTARIMAS

Granzimų ir perforinų ekspresijos pokyčiai esant CMV ir EBV infekcijoms

Siekiant įvertinti imunokompetentinių ląstelių – T limfocitų aktyvumą pacientų po inksto transplantacijos kraujyje, kaip ląstelinio imuniteto diagnostiniai žymenys buvo pasirinkti CD8⁺ T limfocitų išskiriami efektoriniai baltymai granzimai ir perforinai. Šiam tyrimui taip pat buvo naudojami VUL Santaros klinikų Mikrobiologijos laboratorijos atliktų inkstų recipientams CMV DNR ir EBV DNR tyrimų duomenys. Apibendrinus gautus rezultatus, CMV infekcija nustatyta 18 pacientų (34 %), EBV – 4 pacientams (8 %); 31 (58 %) pacientui nerasta nė vienos virusinės infekcijos.

Kadangi literatūros šaltiniuose nėra nurodyta, kokia granzimų ir perforinų ekspresija būdinga sveikam organizmui, buvo sudaryta 20 kraujo donorų grupė, kuriai tėkmės citometru įvertinta šių citotoksinių baltymų ekspresija periferiniame kraujyje. Lyginant pacientų po IT, kuriems buvo nustatyta CMV ar EBV infekcija ($n=22$), ir kontrolinės grupės duomenis, gauti statistiškai reikšmingi $p < 0,05$ skirtumai (1 pav.). Didžiausias granzimus B ($33,8 \pm 14$ %) ir perforinus ($24,3 \pm 12$ %) ekspresuojančių CD8⁺ T limfocitų kiekis nustatytas virusinių infekcijų atveju, atitinkamai kontrolinėje grupėje granzimo B ekspresija buvo 20 %, o

perforino – 16 % mažesnė. Tokie rezultatai patvirtina daugumos mokslininkų išvada, kad po kontakto su virusiniu patogeno antigenai specifiniai CD8⁺ T limfocitai virsta ilgaamžėmis atminties ląstelėmis, kurios proliferuoja, auga ir visą gyvenimą cirkuliuoja šeiminingo kraujyje slopindamos infekcinio agento reaktyvumą [11, 12]. Didesnis atminties T ląstelių kiekis atitinkamai lemia didesnę citotoksinių efektorinių T ląstelių (CTL) antivirusinę gynybą, dėl to pacientų kraujyje, kuriame buvo nustatyta CMV ir EBV DNR, granzimų B ir perforinų ekspresija buvo 16–20 % didesnė nei kontrolinės grupės. Panašus tyrimas atliktas 2008 metais, juo siekta palyginti „besiilsinčių“ (angl. *resting*) ir aktyvintų CD8⁺ T limfocitų disocijuotų baltymų granzimų B ir perforinų produkciją sveikų ir ŽIV infekuotų pacientų kraujyje. Buvo pastebėta, kad kraujyje cirkuliuojantys ŽIV žymenys ir su virusu susiję baltymai aktyvina CD8⁺ T ląsteles paskatindami didesnę granzimų ir perforinų sekreciją nei sveikų asmenų kraujyje [18].

Mažesnė granzimo B ir perforino produkcija kraujyje buvo tų pacientų po IT, kuriems CMV ir EBV infekcija nenustatyta. Apskaičiuota, jog šių tiriamųjų imtyje ($n=31$) CD8⁺ T limfocitams būdinga 18 % granzimo B ir 11 % perforino ekspresija, tačiau palyginus gautus rezultatus su kontroline grupe statistiškai patikimas skirtumas ($p < 0,05$) nustatytas tik tarp baltymų perforinų.

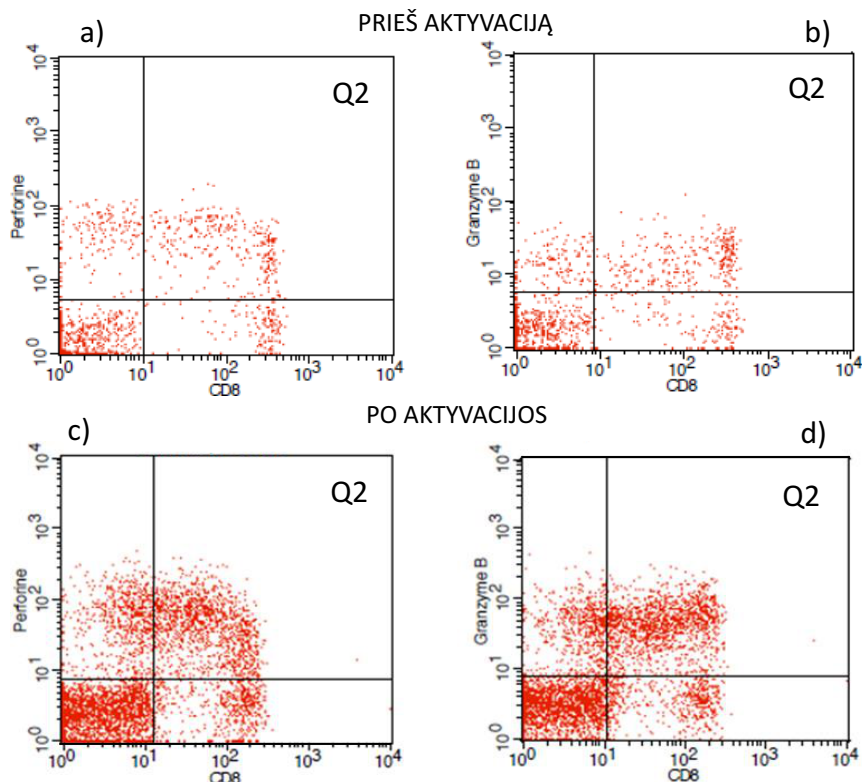
Nemažai autorių nurodo granzimų ir perforinų svarbą identifikuojant ūminį transplantato atmetimą

[13–15]. Jų teigimu, šie baltymai yra tikslūs žymenys, padedantys įvertinti ankstyvą trasplantuoto organo pooperacinį funkcionavimą, išvengti tokių invazyvių procedūrų kaip audinių biopsija [16]. Atlikdami šią studiją mes netyrėme pacientų, kuriems pasireiškė ūminis organo atmetimas arba persodinto inksto nepakankamumo epizodai, tačiau mūsų gauti rezultatai leidžia įvertinti recipientų aloimuninę reakciją į pačią organo transplantaciją. Kitaip tariant, pacientų po IT kraujyje, kuriame virusų DNR neaptikta, visgi buvo nustatyta didesnė granzimo B ir statistiškai reikšmingai didesnė perforino ekspresija, palyginti su kontroline sveikų žmonių grupe. Manome, kad didesnę citotoksinių baltymų produkciją galėjo paskatinti organo persodinimo procedūra kaip chirurginė intervencija į recipiento imuninės apsaugos mechanizmus.

Sveikų žmonių T limfocitų atsako į nespecifinį mitogeną įvertinimas

Atlikus tėkmės citometrijos tyrimus sveikų žmonių kraujyje, rezultatai prieš LBR ir po LBR pavaizduoti taškinėse diagramose (2 pav.). Prieš blastinės transformacijos reakciją CD8⁺ T limfocitų subpopuliacija, ekspresuojanti perforiną, matoma Q2 kvadrante (CD8⁺ perforinas⁺ 8 %) (2 pav., a)), granzimą B – Q2 kvadrante (CD8⁺ granzimas B⁺ 14 %) (2 pav., b)). Analogiškai rezultatai pavaizduoti diagramose po T limfocitų stimuliacijos mitogenu: T limfocitų pažeidimo mediatoriaus perforino ekspresija padidėjo 1,75 karto, arba 6 % (CD8⁺perforinas⁺ 14 %) (2 pav., c)), granzimo B ekspresija vidutiniškai padidėjo 1,5 karto, arba 8 % (CD8⁺granzimas B⁺ 22 %) (2 pav., d)).

Palyginus pacientų po IT, kuriems nustatyta CMV ar EBV infekcija, ir kontrolinės grupės efektorinių baltymų granzimų ir perforinų kiekio CD8⁺ T limfocitų populiacijoje rezultatus, nustatyti statistiškai reikšmingi vidurkių skirtumai $p < 0,001$ tiek prieš LBR, tiek po jos (3 pav.). Šie duomenys parodo, kad fitohemagliutinu (PHA) aktyvinti sveikų žmonių CD8⁺ T limfocitai pasižymi mažesne granzimų ir perforinų ekspresija nei ta pati T limfocitų subpopuliacija recipientų kraujyje. Tokius rezultatus galėtų paaiškinti pirmiau aptarti veiksniai: invazinė organo persodinimo procedūra, CTL antivirusinė gynyba ir su virusais susiję baltymai skatina didesnę granzimų ir perforinų sekreciją nei mūsų darbe naudotas mitogenas PHA.



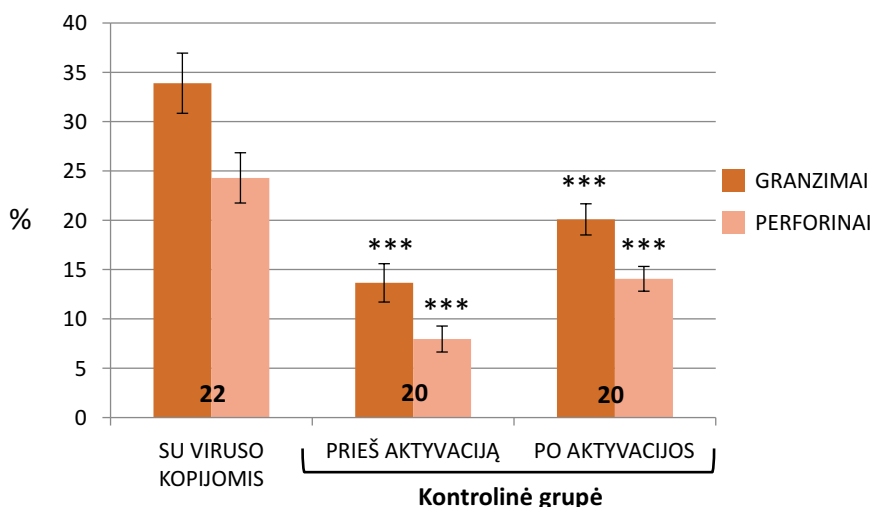
2 pav. CD8⁺ T limfocitų ekspresuojamų baltymų granzimų ir perforinų identifikavimas tėkmės citometru, naudojant anti-CD8 (APC), anti-granzimo B (FITC) ir anti-perforino (PE) monokloninius antikūnus

Fig. 2. Identification of granzyme and perforin expression by the flow cytometry using anti-CD8 (APC), anti-granzyme B (FITC), and anti-perforin (PE) monoclonal antibodies

Ši prielaida pasitvirtino tėkmės citometru ištyrus pacientų po IT kraujo mėginius, kuriuose virusų DNR nerasta, ir kontrolinės grupės mėginius po LBR. Granzimų ir perforinų pokyčiai kraujyje tarp tiriamų imčių buvo statistiškai nereikšmingi $p > 0,05$.

Tyrinėjant ląstelinį imunitetą atlikta nemažai darbų, kuriuose buvo

vertinamas įvairių nespecifinių mitogenų poveikis T limfocitams [17]. Be mūsų darbe naudoto fitohemagliutinino (PHA), imunodeficitu diagnostikai ir atsako į imunoterapiją vertinimui yra naudojami tuberkulinas (PPD) ir gamtoje randamas *Phytolacca americana* (PA) mitogenas. 2008 metais iš kraujo donorų išskirtoms mononukle-



3 pav. Inksto transplantaciją patyrusių pacientų, kuriems nustatyta CMV ar EBV infekcija, ir kontrolinės grupės efektorinių baltymų granzimų ir perforinų kiekio CD8⁺ T limfocitų populiacijoje palyginimas; *** $p < 0,001$ statistinis patikimumas

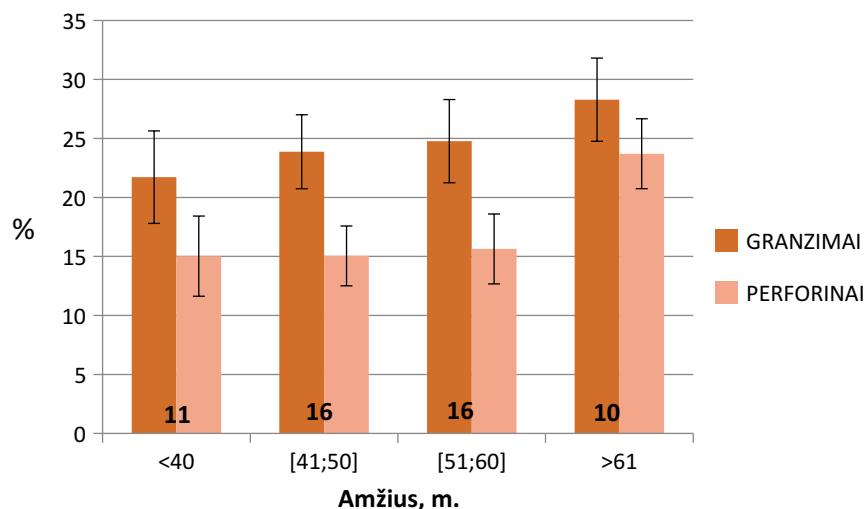
Fig. 3. Comparison of post-renal transplant patients with CMV or EBV infection and normal control of effector proteins granzyme and perforin in the CD8⁺ T lymphocyte population; *** $p < 0.001$ statistical significance

arinėms ląstelėms stimuliuoti kaip polikloniniai aktyviekiai buvo panaudoti CEF šeimos (citomegalo, Epšteino-Bar, *Influenza* virusu) aminorūgščių junginiai [18]. Palyginti su fitohemagliutininu, CEF šeimos baltymai yra specifiskesni, dažniau ir plačiau naudojami moksliniams tyrimams, nes yra padengti labiausiai pasaulyje paplitusių CMV, EBV ir *Influenza* virusų antigenų determinantėmis.

Granzimų ir perforinų ekspresijos sąsaja su pacientų amžiumi

Siekiant įvertinti, kokie yra ląstelinio imuninio atsako ir pagrindinių ląstelių pažeidimo mediatorių granzimų ir perforinų ekspresijos pokyčiai lyginant skirtingo amžiaus pacientų grupes, atitinkamai buvo sudarytos keturios tiriamųjų imtys: mažiau nei 40 metų amžiaus pacientai ($n=11$), nuo 41 iki 50 metų amžiaus ($n=16$), nuo 51 iki 60 metų amžiaus ($n=16$) ir vyresni nei 61 metų ($n=10$). Visiems tiriamiesiems buvo atlikta inksto persodinimo operacija ir tėkmės citometru nustatyta $CD8^+$ T limfocitų granzimų ir perforinų ekspresija (4 pav.).

Didžiausias granzimo B ($29,4 \pm 4\%$) ir perforino ($23,7 \pm 3\%$) kiekis nustatytas vyresnių nei 61 metų pacientų grupėje, kurioje vyriausias tirtas asmuo buvo 73 metų. Mažiausias granzimo B ($21,7 \pm 4\%$) ir perforino ($15,02 \pm 3\%$) kiekis nustatytas <40 metų pacientų grupėje, kurioje jauniausias tirtas asmuo buvo 26 metų amžiaus. Svarbu paminėti, jog buvo nustatytas tendencingas granzimo B ekspresijos didėjimas su kiekvienu pacientų amžiaus intervalu, tačiau didesnis perforinų kiekis kraujyje aptiktas tik vyriausioje >61 metų amžiaus grupėje. Literatūroje nurodoma, kad bendras leukocitų ir absoliutus limfocitų skaičius yra didžiausias iš karto po gimimo ir su kiekvienais metais tendencingai mažėja. Nepaisant absoliučių baltojo kraujo (leukocitų) reikšmių, limfocitų populiacijų santykis nuolat kinta ir su amžiumi įprastai daugėja T limfocitų (atitinkamai $CD4^+$ ir $CD8^+$ subpopuliacijos), progresyviai mažėja B limfocitų. Atliktoje studijoje tėkmės citometru buvo išanalizuoti 114 vaikų ir 84 suaugusių žmonių limfocitiniai žymenys, kurie parodė su amžiumi didėjantį T limfocitų kiekį ir reikšmingai nekintantį $CD4/CD8$ limfocitų santykį [19]. Kiti mokslininkai nurodo, kad senėjimas mažina imuninio atsako įvairovę, specifiškumą, imuninę atmintį ir blogina limfocitų gebėjimą specifiškai atpažinti epitopus. Tokius pokyčius



4 pav. Granzimų ir perforinų ekspresijos pokyčiai kraujyje pagal pacientų amžiaus grupes

Fig. 4. Age-related expression of granzyme B and perforin

paskatina po lytinės brandos prasidedanti užkrūčio liaukos involiucija, o pagrindinė šios liaukos funkcija yra diferencijuoti T limfocitus [17]. Be to, vyresniame amžiuje, sergant lėtinėmis virusinėmis infekcijomis (ypač CMV infekcija), ženkliai sumažėja naivių T limfocitų skaičius, o jų sąskaita padidėja citotoksinių efektorinių T ląstelių – CTL. Mokslininkai nurodo, kad vyresnio amžiaus žmonių kraujyje $CD8^+$ subpopuliacija gali sudaryti net 45 % visų T limfocitų [20]. Tai galėtų pagrįsti mūsų tyrimo rezultatus, kad didėjančią perforino ir tendencingai didėjančią granzimo B ekspresiją lemia nuo pacientų amžiaus priklausomi T limfocitų subpopuliacijų pokyčiai.

Svarbu paminėti tai, jog visose tiriamųjų grupėse taikant tėkmės citometriją vidutinė granzimų B ekspresija nustatyta 1,5–2 kartus patikimai ($p<0,05$) didesnė nei perforinų. Autorių nuomone, nepaisant gerai ištirtų granzimų ir perforinų sinerginių ryšių, vis daugiau studijų įrodo, kad granzimai B ir tikslinės ląstelės vidų gali patekti savarankiškai vykdydami membranos receptorių endocitozę [12]. Ne visiems mediatoriams granzimams reikia perforino suformuotos poros, kiti geba jungtis prie membranoje išitvirtintų svetimų baltymų makrokompleksų [6]. Nustatyta, kad efektyvi granzimo B ekspresija efektorinės ląstelės paviršiuje gali inicijuoti manozės 6-fosfato receptorių (MPR) atlikti perforinų funkciją [21]. Be to, kelios serino proteazės gali patekti į tikslinę ląstelę pro vieno perforino suformuotą transmembraninį kanalą. Tokie rezultatai paaiškina, kodėl granzimų kiekis tiriamojame medžiagoje (kraujyje, likvoro, BAL skystyje) dažniausiai būna didesnis nei perfori-

nų. Autoriai tai pagrindžia pateikdami skirtingus šių efektorinių molekulių reguliacinius mechanizmus. Griežta perforino ekspresijos kontrolė užtikrina eukariotinių ląstelių vientisumą: poros plazminėje membranoje sukelia osmosinį stresą, todėl yra greitai „užtaisomos“, o patys transmembraniniai kanalai elektroniniu mikroskopu yra sunkiai aptinkami ir vizualizuojami [12, 21].

IŠVADOS

Apibendrinant šio tyrimo rezultatus galima teigti, kad patikimai didžiausia citotoksinių baltymų ekspresija nustatyta pacientų po IT kraujyje esant CMV ar EBV infekcijoms. Bendras 37 % virusų paplitimas tiriamųjų populiacijoje yra siejamas su imunosupresija, o mažas viruso kopijų skaičius pacientų kraujyje – su antivirusinių vaistų vartojimu. Granzimų ir perforinų skirtumai pagal virusinės infekcijos tipus nebuvo nustatyti dėl mažos EBV infekuotų pacientų imties. Kita vertus, atlikti tyrimai parodė su amžiumi didėjančią perforino ir tendencingai didėjančią granzimo B ekspresiją. Remiantis mokslinė literatūra, tokius ląstelinio imuninio atsako baltymų pokyčius lemia su amžiumi didėjantis $CD8^+$ T limfocitų ir atitinkamai citotoksinių efektorinių T ląstelių (CTL) skaičius kraujyje. Visose tiriamųjų grupėse nustatyta, kad granzimo B ekspresija kraujyje yra statistškai reikšmingai didesnė nei perforino. Tokius rezultatus pagrindžia žinios apie efektorinių molekulių reguliacinius mechanizmus ir apoptozės signalo perdavimą organizme. ♦

Gauta: 2020 06 06
Priimta spaudai: 2020 06 30

Summary

MEASUREMENT OF GRANZYME B AND PERFORIN IN PATIENTS' BLOOD AFTER KIDNEY TRANSPLANTATION COMPARED TO NORMAL CONTROLS

Augustė Riklikaitė, Laimutė Jurgauskienė

Cytoplasmic granule toxins are predominantly a membrane-disrupting protein known as perforin and a family of structurally related serine proteases (granzymes) are secreted by cytotoxic CD8⁺ T cells and together induce apoptosis of the target cell.

The aim of this study was to evaluate the expression of granzyme B and perforin in cytomegalovirus (CMV) and Epstein-Barr virus (EBV) infected patients' blood after kidney transplantation. For this purpose blood samples of 53 patients with kidney transplant and 20 healthy blood donors were collected.

Method. Expression of granzyme B and perforin was quantified by flow cytometry. The blastic transformation of lymphocytes assay was performed in parallel challenging T lymphocytes from 20 healthy donors. Phytohemaggluti-

nin (PHA) was used to stimulate CD8⁺ T cells.

Results. The comparison of the incidence of CMV and EBV infections among kidney recipients revealed that CMV infection was detected in the blood of 18 patients and EBV was found in the blood of 4 patients. Examination of CD8⁺ T lymphocyte granzyme B and perforin counts showed that the percentage of these proteins in kidney transplant patients with CMV or EBV infection was significantly 13–17% higher than in patients without copies of the viruses. The blastic transformation of lymphocytes assay in the blood of healthy donors showed that statistically significantly higher number of CD8⁺ T lymphocyte granzyme B and perforin was obtained after stimulation than before the stimulation. Unstimulated T lymphocytes showed 14% granzyme B and 8% perforin expression. Mitogen stimulation resulted 8% in-

crease of granzyme B expression and 6% increase of perforin expression. Age-related evaluation showed that the highest expression of granzyme B and perforin was found in the oldest group of patients and the lowest expression was found in the youngest group of patients.

Conclusions. Comparing the changes of granzyme B and perforin in kidney recipients and in healthy donors, a significant increase of granzyme B and perforin expression was observed in virus-infected patients than in healthy donors' blood before and after stimulation with a non-specific mitogen. These data suggest that PHA-activated healthy human CD8⁺ T lymphocytes have lower expression of granzymes B and perforins than the same subpopulation of T lymphocytes in the blood of kidney recipients has. A remarkable observation in this study was that the increasing expression of perforin and the tendentious increase in granzyme B were associated with age-related changes in T lymphocyte subpopulations.

Keywords: granzyme B, perforin, kidney transplant, CMV, EBV, flow cytometry.

LITERATŪRA

- Humar A, Matas AJ. Surgical complications after kidney transplantation. *Semin Dial* 2005; 18(6): 505–10.
- Guillermo G, Harden PN, Jeremy R. The global role of kidney transplantation. *Int Soc Nephrol* 2012; 81: 425–7.
- Dalinkėvičienė E, Kuzminskis V, Petrulienė K, Skarupskienė I, Bagdonavičiūtė G. Ten-year experience of kidney transplantation at the Hospital of Kaunas University of Medicine: demography, complications, graft and patient survival. *Medicina* 2010; 46(8): 538–43.
- Čergelytė I, Gerikienė V, Rimševičius L, Miglinas M. Pacientų gyvybinių veiklų vertinimas ir komplikacijų prevencijos būdai ankstyvuoju periodu po inksto transplantacijos. *Medicinos teorija ir praktika* 2014; 20(3): 244–50.
- Griffiths GM, Mueller C. Expression of perforin and granzymes in vivo: potential diagnostic markers for activated cytotoxic cells. *Immunol Today* 1991; 12(11): 415–9.
- Afonina IS, Cullen SP, Martin SJ. Cytotoxic and non-cytotoxic roles of the CTL/NK protease granzyme B. *Immunol Rev* 2010; 235: 105–16.
- Susanto O, Trapani JA, Brasacchio D. Controversies in granzyme biology. *Tissue Antigens* 2012; 80(6): 477–87.
- Lesauskaitė V, Ivanovienė L. Programuota ląstelių mirtis: molekuliniai mechanizmai ir jų nustatymo metodai. *Medicina* 2002; 38(9): 869–78.
- Adomaitienė D, Janulevičiūtė N, Kazakevičius R, Vaičiuvėnas V. Klinikinės imunologijos įvadas. Vadovėlis aukštojo mokykloms. 2001.
- Choy JC. Granzymes and perforin in solid organ transplant rejection. *Cell Death Differ* 2010; 17: 567–76.
- Arlene H, Abul KA. T-Cell costimulation – biology, therapeutic potential and challenges. *New Engl J Med* 2006; 355: 973–5.
- Rock MT, Yoder SM, Wright PF, Talbot TR, Edwards K, Crowe JE. Differential regulation of granzyme and perforin in effector and memory T cells following smallpox immunization. *J Immunol* 2005; 174: 3757–64.
- Tzannou I, Papadopoulou A, Naik S, Leung K, Martinez CA, Ramos CA, et al. Off-the-shelf virus-specific T cells to treat BK virus, human herpesvirus 6, cytomegalovirus, Epstein-Barr virus and adenovirus infections after allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation. *J Clin Oncol* 2017; 35(31): 3547–57.
- Snydman DR. Epidemiology of infections after solid-organ transplantation. *Clin Infect Dis* 2001; 33(Suppl 1): S5–8.
- Arthurs S, Eid AJ, Pedersen RA, Kremers WK, Cosio FG, Patel R, et al. Delayed-onset primary cytomegalovirus disease and the risk of allograft failure and mortality after kidney transplantation. *Clin Infect Dis* 2008; 46(6): 840–46.
- Galante NZ, Camara NO, Kallas EG, Salomão R, Pacheco-Silva A, Medina-Pestana J. Noninvasive immune monitoring assessed by flow cytometry and real time RT-PCR in urine of renal transplantation recipients. *Transpl Immunol* 2006; 16: 73–80.
- Hsu CCS, Leevy CM. Inhibition of PHA-stimulated lymphocyte transformation by plasma from patients with advanced alcoholic cirrhosis. *Clin Exp Immunol* 1971; 8(5): 749–60.
- Kuerten S, Nowacki TM, Kleen TO, Asaad R, Lehmann PV, Tary-Lehmann M. Dissociated production of perforin, granzyme B, and IFN-gamma by HIV-specific CD8 cells in HIV Infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2008; 24(1): 62–71.
- Hulstaert F, Hannet I, Deneys V, Munhyeshuli V, Reichert T, Bruyere M, et al. Age-related changes in human blood lymphocyte subpopulations. *Clin Immunol Immunopathol* 1994; 70(2): 152–8.
- Uppa S, Verma S, Dhot PS. Normal values of CD4 and CD8 lymphocyte subsets in healthy Indian adults and the effects of sex, age, ethnicity, and smoking. *Clin Cytome* 2003; 52: 32–6.
- Trapani JA, Smyth MJ. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 735–47.