

Stężenia eozynofilowego białka kationowego w surowicy i płwocinie a stan kliniczny chorych na mukowiscydozę

Serum and sputum eosinophil cationic protein levels and clinical status in cystic fibrosis patients

Aleksandra Korzeniewska¹, Anna Sołowiecz¹, Piotr Stelmach²,
Agnieszka Sobocińska¹, Iwona Stelmach¹

¹Oddział Kliniczny Interny Dziecięcej i Alergologii III Katedry Pediatrii
Wojewódzki Szpital Specjalistyczny im. M. Kopernika w Łodzi
Kierownik: dr hab. med. I. Stelmach

² Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Summary: Recent studies have emphasized the role of eosinophils and its metabolites in the pathogenesis of lung disease in cystic fibrosis. This study was designed to assess the relationship between serum and sputum ECP levels and clinical status of cystic fibrosis patients.

Material and methods: 30 patients, aged 6–30 with moderate cystic fibrosis were recruited. Spirometry, weight and height, and Shwachman-Kulczycki score were measured, and serum and sputum samples were obtained for measurements of the eosinophil cationic protein (ECP).

Results: We observed significant inverse correlation between sputum ECP levels and BMI ($p < 0.001$) and FEV₁ ($p < 0.001$), and not significant inverse correlation between sputum ECP levels Shwachman-Kulczycki score ($p = 0.057$). There was no significant correlation between sputum ECP levels and FEF25/75% and between serum ECP levels and measured clinical parameters.

Conclusions: Results of this study suggest influence of eosinophil inflammation in respiratory tract on clinical status of CF patients.

Pneumonol. Alergol. Pol. 2006; 74: 372–376

Key words: eosinophil cationic protein, clinical status, cystic fibrosis

Przewlekłe zakażenie bakteryjne, towarzyszące okresowo infekcje wirusowe i toczący się w drogach oddechowych chorych na mukowiscydozę proces zapalny są przyczyną postępującego i nieodwracalnego uszkodzenia mięszu płuca, prowadzącego do przedwczesnego zgonu chorych. Eozynofilowe białko kationowe (*eosinophil cationic protein* - ECP) uznawane jest za swoisty wskaźnik aktywności eozynofilów, a rola oznaczeń ECP jest dobrze udokumentowana w chorobach o podłożu alergicznym [1–3]. Białko to posiada silne właściwości cytotoksyczne, prokoagulacyjne, właściwości hamujące proliferację limfocytów T oraz wykazuje zdolność indukowania wydzielania histaminy z bazofilów. Eozynofilowe białko kationowe w stężeniu powyżej 100 mcg/ml w BAL-u doprowadza do uszkodzenia komórek nabłonkowych dróg oddechowych, odsłonięcia komórek podstawnych i zniszczenia aparatu rzęskowego. W efekcie dochodzi do nasilenia procesu zapalnego, odsłonięcia zakończeń nerwowych i wzrostu nadreaktywności oskrzeli [4]. Koller i wsp. wykazali w wydzielinie dróg oddechowych chorych na mukowiscydozę podwyższone stężenia ECP i EPX w porównaniu z osobami zdrowymi, a ich poziom nie zmieniał się w trakcie zaostrzenia choroby oskrzelowo-płucnej

[5,6]. W kolejnym badaniu Koller i wsp. wykazali korelację stężenia ECP w płwocinie i surowicy chorych na mukowiscydozę, a w dalszych badaniach wykazano również podwyższone stężenia MBP w surowicy i płwocinie chorych na mukowiscydozę oraz wyższe niż u chorych na astmę stężenia ECP [7–10]. Poza dobrze udokumentowanym faktem dominacji neutrofilów w procesie zapalnym w mukowiscydozie, liczne badania podkreślają znaczenie eozynofilów i ich mediatorów w patogenezie zmian w układzie oddechowym, typowych dla przebiegu choroby.

W drogach oddechowych chorych na mukowiscydozę obserwuje się nadmierną odpowiedź zapalną, która silniej niż zakażenie wpływa na proces destrukcji tkanki płucnej. Opisano ekstremalnie wysokie stężenia mediatorów prozapalnych, w szczególności IL-8, TNF- α , MPO, ECP i leukotrienów cysteinylowych, przy jednoczesnych bardzo niskich stężeniach lub nawet braku obecności interleukiny 10 [11–14]. Wyniki niektórych badań sugerują inicjację procesu zapalnego w drogach oddechowych chorych na mukowiscydozę jeszcze przed zadziałaniem czynnika wywołującego odpowiedź zapalną, jakim jest zakażenie [15–17]. Dane literaturowe dowodzą, że w mukowiscydozie mechanizmy procesu

zapalenia są odmienne niż u osób nieobciążonych chorobą [18–20].

Celem badania było określenie zależności pomiędzy stężeniami ECP w surowicy i płwocinie a stanem klinicznym chorych na mukowiscydozę.

Material i metody

Badaniem objęto 30 pacjentów w wieku 6–30 lat z rozpoznaną mukowiscydozą.

Kryteria włączenia do badania

Do badania włączono pacjentów obojga płci, w wieku 6–30 lat, z rozpoznaną umiarkowaną postacią mukowiscydozy ($FEV_1 \geq 40\%$ i $\leq 69\%$ wartości należnej). Pacjenci musieli prawidłowo wykonywać polecenia podczas badania spirometrycznego i bodepletyzmograficznego.

Kryteria wyłączenia z badania

1. Zaostrzenie choroby oskrzelowo-płucnej w okresie 4 tygodni poprzedzających badanie.
2. Rozpoznana choroba o podłożu atopowym lub/i astma oskrzelowa na podstawie przynajmniej jednego z następujących kryteriów: dodatni wynik punktowych testów skórnych z powszechnie występującymi alergenami, podwyższone stężenie przeciwciał IgE w surowicy (powyżej normy dla wieku), dodatnia próba rozkurczowa (test odwracalności obturacji po wziewie 200 mcg salbutamolu – wzrost wskaźnika FEV_1 o co najmniej 15% w stosunku do wartości wyjściowej).
3. Podejrzenie alergicznej aspergillozy oskrzelowo-płucnej – na podstawie obecności przynajmniej jednego z następujących kryteriów: dodatni wynik punktowych testów skórnych z *Aspergillus fumigatus*, stężenie przeciwciał IgE w surowicy powyżej 1000 IU/ml, dodatni wynik badania mikologicznego płwociny w kierunku *Aspergillus fumigatus* w trzech odrębnie wykonanych badaniach.

U wszystkich chorych wykonano badanie spirometryczne spoczynkowe (LUNGTEST 1000, MES, Kraków), pomiary masy ciała i wzrostu, oceniono stan kliniczny przy użyciu skali Shwachmana-Kulczyckiego oraz pobrano próbki krwi i płwociny do badań laboratoryjnych.

W badaniu spirometrycznym oceniano następujące wskaźniki wentylacji płuc, wyrażone jako procent wartości należnych dla płci, masy ciała i wzrostu: natężoną objętość wydechową pierwszosekundową (FEV_1) oraz średni przepływ wydechu między 25 a 75% FVC ($FEF_{25/75\%}$). Do analizy wybrano najwyższe wartości z 3 dobrych technicznie zapisów.

Aby ocenić stan odżywienia chorych, wyliczono wskaźnik BMI (*body mass index*), będący ilorazem masy ciała wyrażonej w kilogramach i wysokości ciała podniesionej do drugiej potęgi wyrażonej w metrach (kg/m^2).

Próbki krwi pobrano do oddzielnych próbek surowiczych (S-Monovette, Sarstedt, Niemcy), które pozostawały w temperaturze pokojowej przez 1 godzinę, a następnie zostały odwirowane w 3000 g w temperaturze 4°C przez 10 minut. Przed analizą wszystkie próbki były przechowywane w temperaturze –70°C. Stężenie ECP w surowicy oznaczano metodą immunoenzymatyczną za pomocą gotowych zestawów CAP-System szwedzkiej firmy Pharmacia z Uppsali.

Próbki płwociny pobierano na czczo, po wypłukaniu ust, inhalacji z 5 ml roztworu 0,9-procentowego NaCl, oklepaniu klatki piersiowej i prowokacji kaszlu przy użyciu techniki natężonego wydechu. Natychmiast po pobraniu do płwociny dodano roztwór PBS w stosunku 1 g płwociny: 1 ml roztworu i wymieszano przy użyciu wstrząsarki przez 30 sekund. Następnie mieszaninę odwirowano w 2000 g w temperaturze 4°C przez 20 minut. Po zakończonej procedurze próbki zostały umieszczone w oddzielnych próbkach i natychmiast zamrożone w temperaturze –20°C [11]. Pomiarów stężeń ECP dokonano metodą ELISA, stosując zestawy takie jak przy oznaczaniu mediatorów w surowicy.

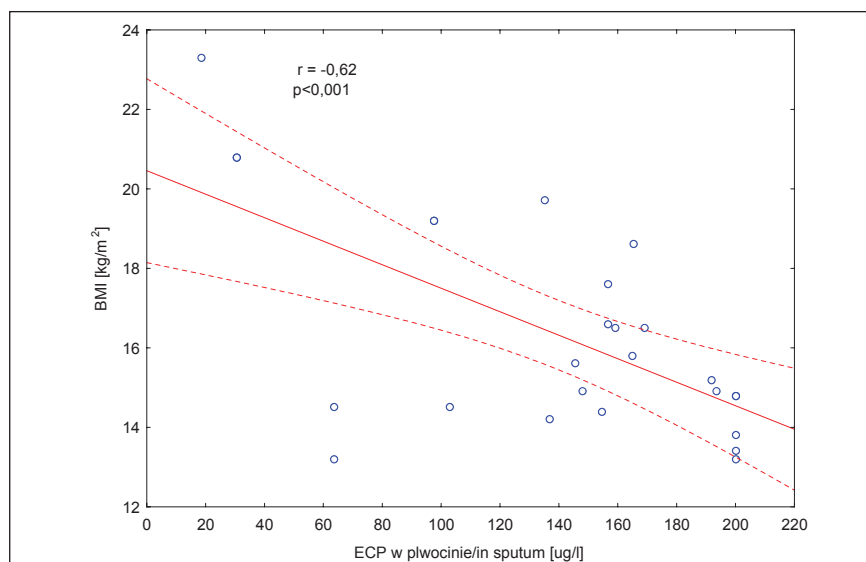
Analiza statystyczna

Dane przedstawiono za pomocą średnich i odchyleń standardowych. Zależności opisano, posługując się współczynnikami korelacji R Pearsona. Dla wszystkich wykorzystanych testów statystycznych przyjęto poziom istotności $\alpha = 0,05$. Analizę statystyczną wykonano przy użyciu programów: SPSS PC 11,5 i STATISTICA 6.0.

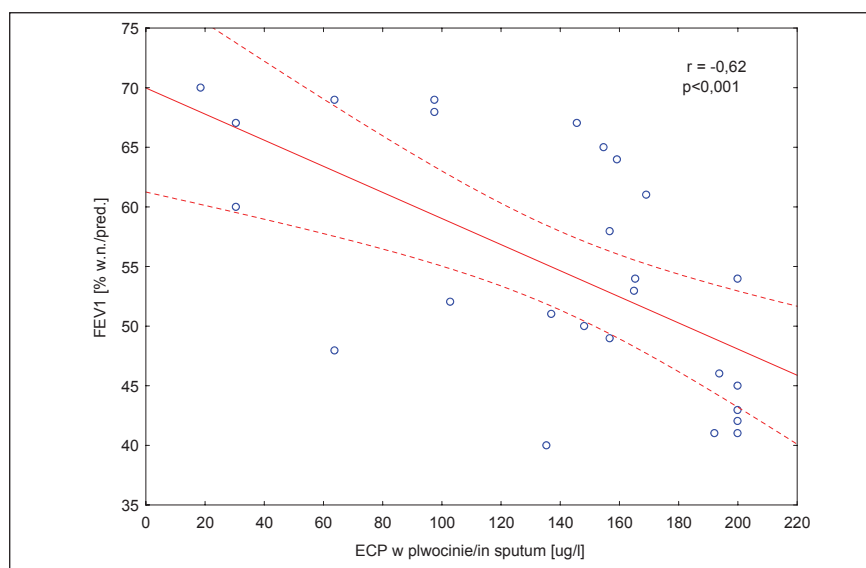
Wyniki

Charakterystyka badanej populacji

Analizie poddano grupę 30 chorych (14 dziewcząt i 16 chłopców) od 6. do 30. roku życia (średnia $\pm$ SD; $16,4 \pm 9,8$). Wartość FEV_1 kształtowała się pomiędzy 40 a 69% wartości należnej ($54,9 \pm 10,2$), wartość $FEF_{25/75}$ pomiędzy 5 a 87% wartości należnej ($32,8 \pm 19,3$). Oceniając stan odżywienia chorych, stwierdzono w badanej grupie wartości BMI od 13,2 do 23,3 kg/m^2 ($16,4 \pm 2,7$). Liczba punktów w skali Shwachmana-Kulczyckiego kształtowała się w granicach 45–85 ($64,6 \pm 10,3$). Wartości surowiczego stężenia ECP w badanej grupie mieściły się w zakresie 5,0–54,4 $\mu g/l$ ($15,9 \pm 11,0$), a stężenia w płwocinie w przedziale 18,7–200,0 $\mu g/l$ ($137,8 \pm 57,3$).



Rycina 1. Korelacje pomiędzy stężeniem ECP w płwocinie a BMI
Figure 1. Correlation between sputum ECP levels and BMI



Rycina 2. Korelacje pomiędzy stężeniem ECP w płwocinie a FEV1%
Figure 2. Correlation between sputum ECP levels and FEV1%

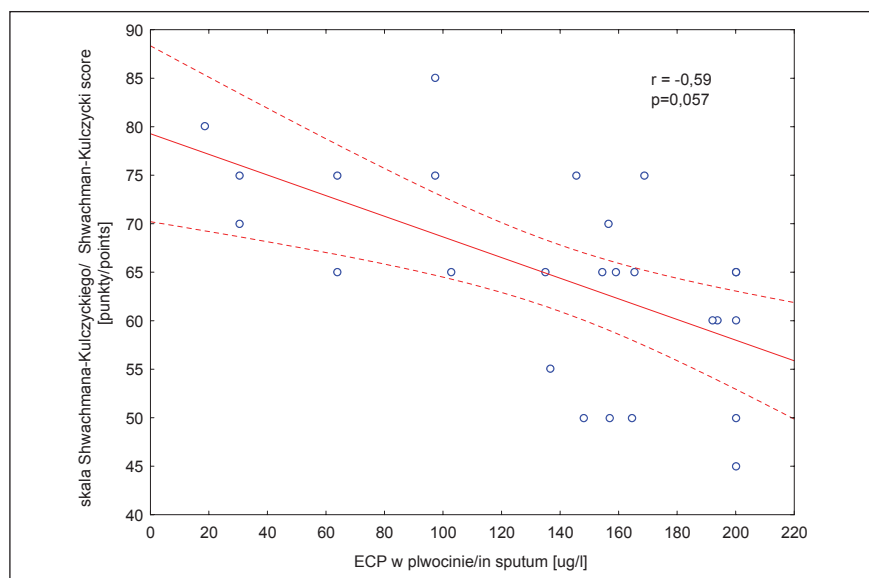
Korelacje pomiędzy stanem klinicznym a stężeniami ECP

Zaobserwowano istotną statystycznie korelację pomiędzy stężeniem ECP w płwocinie a BMI ($p < 0,001$) (ryc. 1) oraz FEV1% ($p < 0,001$) (ryc. 2). Wyższe stężenia ECP korelowały z gorszym stanem odżywienia i mniejszymi wartościami FEV1%. Zaobserwowano zaznaczoną, ale nieistotną statystycznie odwrotną zależność pomiędzy stężeniem ECP w płwocinie a punkcją w skali Shwachmana-Kulczyckiego ($p = 0,057$) (ryc. 3). Nie obserwowano korelacji pomiędzy stężeniami ECP w płwocinie a FEF25/75%. Nie wykazano istotnych zależności pomiędzy surowiczym stężeniem ECP a badanymi parametrami oceny stanu klinicznego chorych.

Omówienie

Badania przeprowadzone u chorych na mukowiscydozę wykazały podwyższone stężenie ECP

w surowicy i w płwocinie, przy prawidłowych wartościach eozynofilii [5–10]. Wyniki tych badań dowodzą istotnej roli eozynofili i ich mediatorów w patogenezie uszkodzenia tkanki płucnej w przebiegu choroby. W prezentowanym badaniu wykazano istotną zależność pomiędzy stężeniem ECP w płwocinie a czynnością płuc i stanem odżywienia; zależność pomiędzy ECP a skalą Shwachmana-Kulczyckiego nie była istotna statystycznie. Pomimo że znane są liczne badania wykazujące wysokie stężenia ECP w płwocinie chorych na mukowiscydozę, to dane na temat korelacji stężenia ECP w płwocinie z parametrami klinicznymi są bardzo skąpe. Halmerbauer i wsp. wykazali istotną zależność pomiędzy wysokimi stężeniami mediatorów eozynofilowych, w tym ECP w płwocinie chorych na mukowiscydozę, a gorszą czynnością płuc [21]. W dostępnej literaturze nieznane są natomiast badania oceniające zależności pomiędzy stężeniami mediatorów eozynofilowych w płwocinie a stanem



Rycina 3. Korelacje pomiędzy stężeniem ECP w płwocinie a punkcją w skali Shwachmana-Kulczyckiego
Figure 3. Correlation between sputum ECP levels and Shwachman-Kulczycki score

odżywienia lub kliniczną oceną stanu chorych. Z uwagi na ogólnoustrojowy charakter choroby można jednak przypuszczać, że nasilenie procesu zapalenia w drogach oddechowych, w tym nasilenie zapalenia eozynofilowego, determinując stopień i tempo destrukcji tkanki płucnej, pośrednio wpływa na stan kliniczny chorych i stopień odżywienia. Pośrednim dowodem zależności pomiędzy nasileniem stanu zapalnego a stanem klinicznym chorych mogą być wyniki badań nad wpływem leków przeciwzapalnych. Zastosowanie u chorych na mukowiscydozę leków przeciwleukotrienowych – o udowodnionym działaniu modulującym zapalenie eozynofilowe – poprawia czynność płuc, zmniejsza nasilenie objawów klinicznych i wpływa na obniżenie stężenia ECP zarówno w surowicy, jak i płwocinie lub popłuczynach z nosa [22–24]. W prezentowanym badaniu nie wykazaliśmy natomiast zależności pomiędzy surowiczymi stężeniami ECP a ocenianymi parametrami klinicznymi i obserwacje te różnią się od wyników badań innych autorów. Koller i wsp. w kilku niezależnych badaniach wykazali istotną odwrotną korelację pomiędzy surowiczymi stężeniami mediatorów eozynofilowych a czynnością płuc i skalą kliniczną Shwachmana-Kulczyckiego [7–9]. Należy jednak zauważyć, że we wszystkich badaniach przeprowadzonych przez tych autorów w grupie badanej byli chorzy z rozpoznaną atopią lub/i alergiczną aspergillozą oskrzelowo-płucną. Pomimo że w cytowanych badaniach autorzy zaznaczają, iż surowicze stężenia ECP u chorych atopowych i bez atopii nie różniły się istotnie statystycznie, to nie można wykluczyć dodatkowego wpływu współistnienia atopii lub aspergillozy na pogorszenie czynności płuc lub ocenę stanu kli-

nicznego w skali Shwachmana-Kulczyckiego. W prezentowanym badaniu ta grupa chorych została wykluczona i fakt ten częściowo może tłumaczyć istniejące rozbieżności. Obserwowane przez nas zależności pomiędzy wysokimi poziomami ECP w płwocinie a badanymi parametrami klinicznymi, przy jednoczesnym braku tych korelacji w przypadku surowicznych stężeń ECP, wydają się potwierdzać hipotezę podwyższonej aktywności i zwiększonej zdolności do degranulacji eozynofilów w drogach oddechowych chorych na mukowiscydozę. Mechanizm aktywacji eozynofilów w mukowiscydozie nie został wyjaśniony; postulowana jest rola cytokin pobudzających degranulację tych komórek, a w szczególności TNF, IL-5 i IL-4, zwiększona ekspresja receptora CR-4 (*complement receptor*) dla dopełniacza [25] oraz pobudzenie degranulacji przez elastazę neutrofilową obecną w płwocinie chorych [26]. Czynnikiem zwiększającym aktywność eozynofilów może też być infekcja wirusowa [27,28]. Wyniki prezentowanego badania i obserwacje innych autorów potwierdzają potrzebę prowadzenia badań wyjaśniających patomechanizm procesu zapalenia w mukowiscydozie. Jego poznanie pozwoli na poszukiwanie nowych leków mogących modulować lub hamować ten proces i poprawić skuteczność leczenia choroby.

Wniosek

Obserwowany w badaniu istotny związek pomiędzy stężeniem ECP w płwocinie a stanem odżywienia chorych i czynnością płuc sugeruje, że nasilenie procesu zapalenia eozynofilowego w drogach oddechowych wpływa na stan kliniczny chorych na mukowiscydozę.

Piśmiennictwo

1. Kristjansson S, Shimizu T, Strannegard IL, Wennergren G. Eosinophil cationic protein, myeloperoxidase and tryptase in children with asthma and atopic dermatitis. *Pediatr Allergy Immunol* 1994;5:223–229.
2. Niimi A, Amitani R, Suzuki K i wsp. Serum eosinophil cationic protein as a marker of eosinophilic inflammation in asthma. *Clin Exp Allergy* 1998;28:233–240.
3. Remes S, Korppi M, Remes K i wsp. Serum eosinophil cationic protein (ECP) and eosinophil protein X (EPX) in childhood asthma: the influence of atopy. *Pediatr Pulmonol* 1998;25:167–174.
4. Wever AMJ, Wever-Hess J, Hermans J. The use of serum eosinophil cationic protein in the management of steroid therapy in chronic asthma. *Clin Exp Allergy* 1997;27:519–529.
5. Koller DY, Nething I, Otto J, Urbanek R, Eichler I. Cytokine concentrations in sputum from patients with cystic fibrosis and their relation to eosinophil activity. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155:1050–1054.
6. Koller DY, Gotz M, Eichler I, Urbanek R. Eosinophilic activation in cystic fibrosis. *Thorax* 1994;49:496–499.
7. Koller DY, Gotz M, Wojnarowski C, Eichler I. Relationship between disease severity and inflammatory markers in cystic fibrosis. *Arch Dis Child* 1996;75:498–501.
8. Koller DY, Halmerbauer G, Muller J, Frischer T i wsp. Major basic protein, but not eosinophil cationic protein or eosinophil protein X, is related to atopy in cystic fibrosis. *Allergy* 1999;54:1094–1099.
9. Koller DY, Nilsson M, Enander I, Venge P i wsp. Serum eosinophil cationic protein, eosinophil protein X and eosinophil peroxidase in relation to pulmonary function in cystic fibrosis. *Clin Exp Allergy* 1998;28:241–248.
10. Koller DY, Urbanek R, Gotz M. Increased degranulation of eosinophil and neutrophil granulocytes in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152:629–633.
11. Bonfield T, Panuska J, Konstan M. Inflammatory cytokines in cystic fibrosis lung. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152:2111–2118.
12. Greally P, Hussein MJ, Cook AJ i wsp. Sputum tumor necrosis factor- α and leukotriene concentrations in cystic fibrosis. *Arch Dis Child* 1993;68:389–392.
13. Chmiel J, Berger M, Konstan M. The role of inflammation in the pathophysiology of CF lung disease. *Clin Rev Allergy Immunol* 2002;23:5–27.
14. Moss RB, Hsu YP, Olds L. Cytokine dysregulation in activated CF peripheral lymphocytes. *Clin Exp Immunol* 2000;120:518–525.
15. Tirouvanziam R, de Bentzmann S, Hubeau C i wsp. Inflammation and infection in naive human cystic fibrosis airway grafts. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000;23:121–127.
16. Khan TZ, Wagener JS, Bost T i wsp. Early pulmonary inflammation in infants with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151:1075–1082.
17. Balough M, McCubbin M, Weinberger M i wsp. The relationship between infection and inflammation in the early stages of lung disease from cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 1995;20:63–70.
18. Venkatakrishnan A, Stecenko AA, King G i wsp. Exaggerated activation of nuclear factor-kappaB and altered IkappaB-beta processing in cystic fibrosis bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000;23:396–403.
19. Tabary O, Muselet C, Escotte S i wsp. Interleukin-10 inhibits elevated chemokine interleukin-8 and regulated on activation normal T cell expressed and secreted production in cystic fibrosis bronchial epithelial cells by targeting the I(k)B kinase alpha/beta complex. *Am J Pathol* 2003;162:293–302.
20. Li J, Johnson XD, Iazovskaia S i wsp. Signaling intermediates required for NF-kappa B activation and IL-8 expression in CF bronchial epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003;284:307–315.
21. Halmerbauer G, Arri S, Schieri M i wsp. The relationship of eosinophil granule proteins to ions in the sputum of patients with cystic fibrosis. *Clin Exp Allergy* 2000;30:1771–1776.
22. Morice AH, Kastelik JA, Aziz I. Montelukast sodium in cystic fibrosis. *Thorax* 2001;56:244–245.
23. Schmitt-Grohe S, Eickmeier O, Schubert R, Bez C i wsp. Anti-inflammatory effects of montelukast in mild cystic fibrosis. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2002;89:599–605.
24. Stelmach I, Korzeniewska A, Stelmach W i wsp. Effects of montelukast treatment on clinical and inflammatory variables in patients with cystic fibrosis. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2005;95:372–380.
25. Greally P, Hussein MJ, Cook AJ i wsp. Sputum tumor necrosis factor- α and leukotriene concentrations in cystic fibrosis. *Arch Dis Child* 1993;68:389–392.
26. Liu H, Lazarus SC, Caughey GH, Fahy JV. Neutrophil elastase and elastase-rich cystic fibrosis sputum degranulate human eosinophils in vitro. *Am J Physiol* 1999;276:28–34.
27. Garofalo R, Kimpen JLL, Welliver RC, Ogra PL. Eosinophil degranulation in the respiratory tract during naturally acquired respiratory syncytial virus infection. *J Pediatr* 1992;120:28–32.
28. Wang EEL. Association of respiratory viral infections with pulmonary deterioration in patients with cystic fibrosis. *N Engl J Med* 1984;311:1653–1658.

Wpłynęła: 23.06.2006 r.

Adres: Oddział Kliniczny Interny Dziecięcej i Alergologii III Katedry Pediatrii UM w Łodzi
Wojewódzki Szpital Specjalistyczny im. M. Kopernika
ul. Pabianicka 62, 93–513 Łódź
e-mail: alergol@kopernik.lodz.pl