

Podwyższone stężenia RANTES w indukowanej plwocinie w przewlekłej astmie, ale nie w sezonowym alergicznym nieżycie nosa

Increased levels of RANTES in induced sputum of chronic asthma but not in seasonal grass pollen-induced rhinitis.

Adam Barczyk, Ewa Sozańska, Małgorzata Farnik, Iwona Stępnia-Ziółkiewicz, Joanna Nizio-Mąsior, Władysław Pierzchała.

Z Katedry i Kliniki Pneumonologii Śl. AM w Katowicach. Kierownik: prof. dr hab. n. med. W. Pierzchała.

Summary: BACKGROUND: Allergic rhinitis is one of risk factors for development of allergic asthma. METHODS: 9 patients with asthma, 16 patients with seasonal allergic rhinitis (SAR) due to grass or rye pollen sensitization and 17 healthy control subjects were recruited to the study. SAR patients were identified by history, skin-prick test, specific IgE and positive nasal allergen challenge. Every subject underwent the methacholine bronchial provocation test and sputum induction. Levels of RANTES were measured in supernatant of induced sputum. RESULTS: Increased percentage of eosinophils in induced sputum in asthma compared to control group ($p=0.01$) but not in SAR patients compared to healthy subjects ($p=0.13$) were found. Similarly, asthmatic patients ($p=0.01$) but not SAR patients had increased levels of RANTES in sputum compared to healthy subjects. CONCLUSION: Increased levels of RANTES in induced sputum of patients with chronic asthma but not in SAR patients indicate that RANTES is important in pathogenesis of chronic airway inflammation.

Pneumonol. Alergol. Pol. 2006, 74, 191:196

Key words: RANTES, asthma, seasonal allergic rhinitis, induced sputum

Wstęp

Astma oskrzelowa charakteryzują się obecnością nadreaktywności oskrzeli oraz eozynofilowego zapalenia dróg oddechowych. U dużej części chorych na astmę, szczególnie tych u których ma ona związek z atopią, alergiczny nieżyt nosa poprzedza rozwój astmy oskrzelowej. Wiele badań wykazało związek pomiędzy tymi dwoma chorobami. Alergiczny nieżyt nosa jest czynnikiem ryzyka astmy oskrzelowej (1). Ponadto u osób z alergicznym nieżytem nosa stwierdza się obecność stanu zapalnego dolnych dróg oddechowych także bez objawów astmy oskrzelowej (2,3). Co więcej donosowa prowokacja alergenowa u chorych na alergiczny nieżyt nosa prowadzi do powstawania po 24 godzinach nacieków eozynofilowych w błonie śluzowej dolnych dróg oddechowych (4). Jak dotąd wykazano, że cytokiny takie jak IL-1, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-13, TNF i GM-CSF należą do głównych składowych odpowiedzi zapalnej u chorych na alergiczny nieżyt nosa (5,6).

RANTES (ang. regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted) jest chemokina należącą do grupy CC chemokin. Została wyizolowana i oczyszczona jako produkt zaktywowanych limfocytów T, chociaż w mniejszych ale wykrywalnych stężeniach jest też wydzielana przez niestymulowane komórki mononuklearne krwi obwodowej. Także inne komórki takie jak makrofagi, eozynofile, ko-

mórki nabłonkowe i komórki mięśni gładkich mogą produkować tę chemokinę. RANTES jest bardzo silnym chemoatraktantem dla eozynofilów, ale też i dla innych komórek takich jak bazofile, monocyty i limfocyty T. Szereg badań wykazało jej istotne znaczenie w patogenezie astmy oskrzelowej (7).

Badania stanu zapalnego dolnych dróg oddechowych przeprowadzano najczęściej za pomocą metod brochoskopowych takich jak popłuczyny oskrzelowo-pęcherzykowe (BAL) i wycinki biopsyjne błony śluzowej oskrzeli. Ze względu jednak na stosunkowo dużą inwazyjność tych badań trwa poszukiwanie alternatywnych metod badawczych. Jedną z nich jest badanie indukowanej plwociny, które pozwala na nieinwazyjne, bezpośrednie, powtarzalne i wiarygodne badanie stanu zapalnego dolnych dróg oddechowych w takich chorobach jak astma oskrzelowa, alergiczny nieżyt nosa lub POChP (8). Stężenia RANTES były podwyższone w indukowanej plwocinie chorych na astmę oskrzelową (9,10), ale nie były jak dotąd badane w plwocinie chorych na sezonowy alergiczny nieżyt nosa (SAR).

Celem badania było określenie czy RANTES może mieć znaczenie w powstawaniu astmy oskrzelowej u chorych na SAR. W tym celu wykonano badanie indukowanej plwociny u chorych na SAR w trakcie sezonu pylenia oraz u chorych na astmę oskrzelową i zdrowych ochotników.

Metody i materiał

Badanie zostało zaakceptowane przez Komisję Biotyczną Śląskiej Akademii Medycznej w Katowicach. Wszystkie osoby wyraziły zgodę na udział w badaniu.

Do badania zakwalifikowano 9 chorych na przewlekłą astmę oskrzelową, którzy spełniali następujące kryteria włączenia do badania: rozpoznanie przez lekarza prowadzącego astmy oskrzelowej, odwracalność obturacji 15 minut po inhalacji 200 µg salbutamolu większa niż 12 procent wartości wyjściowych lub nadreaktywność oskrzeli w teście z metacholiną (PC20 <8 mg/ml), palenie papierosów w wywiadzie mniejsze niż 10 paczkolet oraz brak zaostrzenia astmy oskrzelowej lub stosowania ogólnie działających kortykosteroidów w okresie 4 tygodni przed włączeniem do badania.

16 chorych na SAR uczulonych na pyłki traw lub żyta uczestniczyło w badaniu. Kryteria włączenia do badania były następujące: dodatni wywiad dotyczący alergicznego nieżyty nosa w sezonie pylenia traw i żyta (maj i czerwiec) w okresie co najmniej 2 ostatnich lat; dodatni wynik punktowych testów skórnych z mieszkanką traw lub żyta (wielkość bąbla ≥ 3 mm); obecność w surowicy swoistych przeciwciał IgE przeciwko pyłkom traw lub żyta (test RAST klasy II-IV); dodatni wynik prowokacji donosowej mieszkanką traw i zbóż (Allergopharma, Reinbeck, Niemcy) ocenianej za pomocą wskaźnika objawów klinicznych oraz pomiaru rynomanometrii aktywnej przedniej (RhinoTest MP 500, MES, Kraków). Wymienione powyżej badania kwalifikacyjne wykonywano poza okresem pylenia traw i zbóż, natomiast badanie indukowanej płwociny przeprowadzono w tej grupie chorych w trakcie pylenia traw i zbóż.

Grupę kontrolną stanowiło 17 zdrowych ochotników, u których wykluczono obecność astmy oskrzelowej lub alergicznego nieżyty nosa (ujemny wywiad, prawidłowa spirometria, brak nadreaktywności oskrzeli lub atopii w punktowych testach skórnych).

Badanie indukowanej płwociny przeprowadzono według standardowego protokołu stosowanego w Klinice Pneumonologii ŚAM, jak opisywano uprzednio (11,12). W skrócie, płwocinę indukowano za pomocą wzrastających stężeń roztworów chlorku sodu podawanych przez nebulizator ultradźwiękowy. Do uzyskanej płwociny dodawano 0,1% roztwór dithiothreitolu (DTT), homogenizowano i wirowano w celu uzyskania supernatantu, który zamrażano w temperaturze -70°C do późniejszych oznaczeń. Odsetek poszczególnych typów komórek w płwocinie oceniano przy użyciu mikroskopu świetlnego.

Stężenia RANTES w supernatancie z indukowanej płwociny oznaczano za pomocą metody ELISA używając komercyjnie dostępnych zestawów do oznaczeń firmy RDSystems. Dolna granica wykrywalności, według informacji podanej przez producenta, wynosiła 15,6 pg/ml.

Wyniki przedstawiono w postaci mediany oraz dolnego i górnego kwartyla. Różnice pomiędzy badanymi grupami badano za pomocą testu ANOVA rang Kruskala-Wallis. Analizę korelacji wykonano za pomocą współczynnika rang Spearmana. Różnice między badanymi grupami przyjęto za znamienne statystyczne, gdy $p < 0,05$.

Wyniki

Chorzy na astmę oskrzelową byli znamienne starsi od chorych na SAR ($p=0,04$), nie stwierdzono jednak różnic dotyczących wieku badanych osób pomiędzy chorymi na astmę lub na SAR a grupą kontrolną. Chorzy na astmę charakteryzowali się niższymi wartościami wskaźnika FEV1%VC zarówno w stosunku do grupy kontrolnej ($p=0,03$) jak i grupy SAR ($p=0,0003$). Podobnie w grupie chorych na astmę oskrzelową stwierdzono znamienne wyższą nadreaktywność oskrzeli na metacholinę zarówno w porównaniu do osób zdrowych ($p=0,000008$) jak i chorych na SAR ($p=0,002$). (Tab.I).

Analiza składu komórkowego indukowanej płwociny badanych osób wskazuje, że główne różnice dotyczyły odsetka komórek kwasochłonnych. Stwierdzono znamienne podwyższony odsetek eozynofiliów w płwocinie chorych na astmę w porównaniu do grupy kontrolnej ($p=0,01$) [mediana oraz (dolny i górny kwartyl)] były odpowiednio następujące [6,0% (2,9-8,8%) oraz 0,5% (0,2-1,5%)] (ryc. 1). Nie wykazano jednak znamienych różnic, a jedynie tendencję do wyższych wartości odsetka eozynofiliów w płwocinie w grupie chorych na SAR [1,8% (0,2-4,2%)] w porównaniu do grupy kontrolnej ($p=0,13$) (ryc. 1). Wartości odsetkowe pozostałych komórek w indukowanej płwocinie, takich jak neutrofile, makrofagi i limfocyty, nie różniły się znamienne pomiędzy badanymi grupami. Stwierdzono natomiast, że płwocina chorych na SAR w porównaniu do grupy kontrolnej charakteryzowała się znamienne niższą całkowitą liczbą komórek w płwocinie ($p=0,04$). (Tab. II).

Stężenia RANTES w supernatancie z indukowanej płwociny były znamienne wyższe u chorych na astmę oskrzelową w porównaniu do grupy kontrolnej, odpowiednio [20,5 pg/ml (18,0-24,0 pg/ml) vs 0 pg/ml (0-16,6 pg/ml), $p=0,01$] oraz w porównaniu do grupy SAR, odpowiednio [20,5 pg/ml (18,0-24,0 pg/ml) vs 0 pg/ml (0-0 pg/ml), $p=0,002$] (ryc. 2).

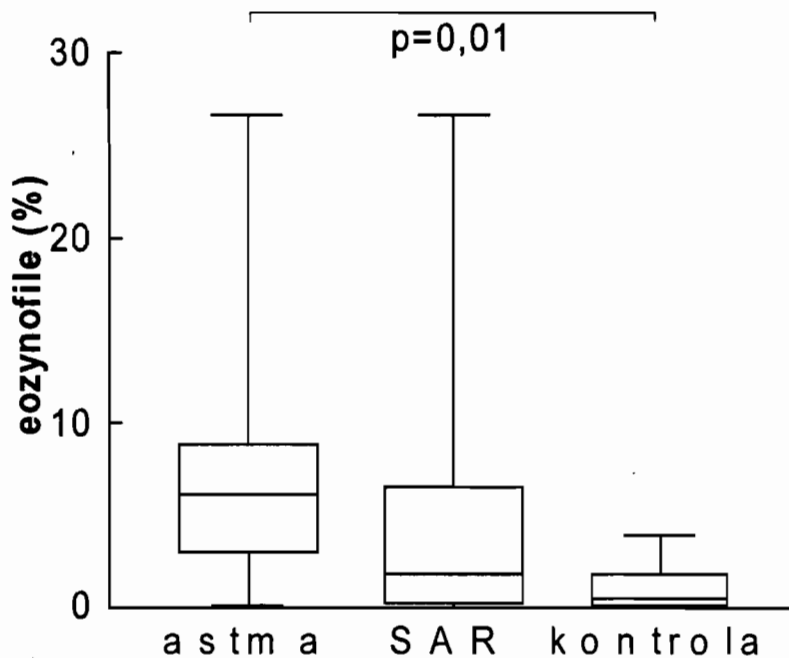
Analiza korelacji wykazała, że stężenia RANTES w płwocinie zwiększają się w miarę nasilania się obturacji dróg oddechowych wyrażanej za pomocą wskaźnika FEV1%VC ($r=-0,43$; $p=0,007$) (ryc. 3) oraz wraz ze wzrostem reaktywności oskrzeli na metachocholinę mierzonej za pomocą wskaźnika PC20 ($r=-0,42$; $p=0,006$). Podobnie odsetek eozynofiliów w płwocinie wykazywał odwrotną korelację z odsetkową wartością należną FEV1 ($r=-0,35$; $p=0,03$) oraz stopniem nadreaktywności oskrzeli mierzonej za pomocą wskaźnika PC20 ($r=-0,56$; $p=0,0002$).

Tabela I. Charakterystyka badanej populacji
Table I. The characteristic of study population

Grupa	kontrola	SAR	astma
Liczba badanych / Number of subjects	17	16	9
Wiek (lata)* / Age (years)	43 (24-54)	28 (24-38)**)	44 (36-47)
Płeć (M/K) / Sex (M/F)	13/4	9/7	2/7
Palenie papierosów (T/Ex/N) / Smoking (Y/Ex/N)	6/0/11	3/4/9	0/2/7
sIgE trawy/ grasses (kU/L)	-	8,0 (3,2-19,8)	-
sIgE żyto/rye(kU/L)	-	4,2 (1,8-14,9)	-
IgE całkowite/total (IU/ml)	-	146 (94-270)	-
FEV ₁ (% wartości należnej)* / FEV ₁ (% predicted)	107,0 (104,3-113,5)	106,7 (104,2-113,4)	101,9 (89,0-104,3)
FEV ₁ %VC*	86,7 (85,0-88,4)	92,6 (87,0-94,3)	79,3*** **) (71,3-81,9)
Odwracalność obturacji po salbutamolu (% wart. wyjściowej) Reversibility of airway obstruction after salbutamol (% of baseline value)	-	-	19,9 (13,6-25,1)
PC ₂₀ dla metacholiny (mg/ml)* Methacholine challenge – PC ₂₀ (mg/ml)	>25 (>25- >25)	>25 (14,7- >25)	0,70*** **) (0,11-1,26)

Dane przedstawiono w postaci mediany oraz w nawiasach dolny i górny kwartył; M – mężczyźni, K – kobiety, T – aktualni palacze papierosów, Ex – byli palacze, N – osoby nigdy niepalące; *P <0.05 różnice znamienne statystycznie pomiędzy wszystkimi grupami, Kruskal-Wallis; P <0.05 różnice znamienne pomiędzy SAR a kontrolą^{#)}, ***) astmą a kontrolą, **) astmą a SAR; SAR – sezonowy alergiczny nieżyt nosa.

Data are expressed as a median (lower and upper quartile); M – males, F – females, Y – current smokers, Ex – ex-smokers, N – never smokers. *) P <0.05 significant differences among all studied groups, Kruskal-Wallis; P <0.05 significant differences between SAR and controls ^{#)}, ***) asthma and controls, **) asthma and SAR; SAR – seasonal allergic rhinitis.



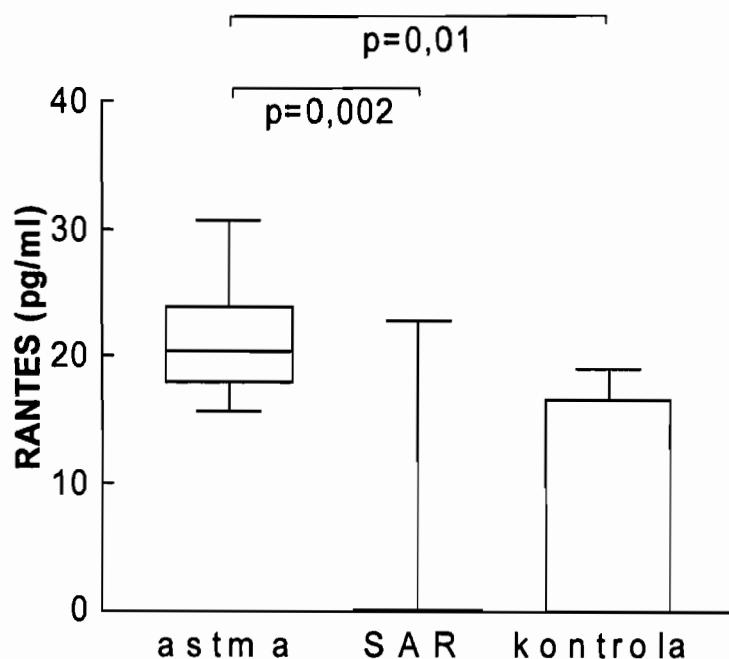
Rycina 1. Odsetek eozynofili w indukowanej płwocinie. Dane wyrażono w postaci mediany (pozioma linia); górnego i dolnego kwartyła (kwadrat); górnego i dolnego zakresu (wąsy).

Figure 1. The percentage of eosinophils in induced sputum. Data are presented as a median (horizontal line); upper and lower quartiles (box); upper and lower range (whiskers).

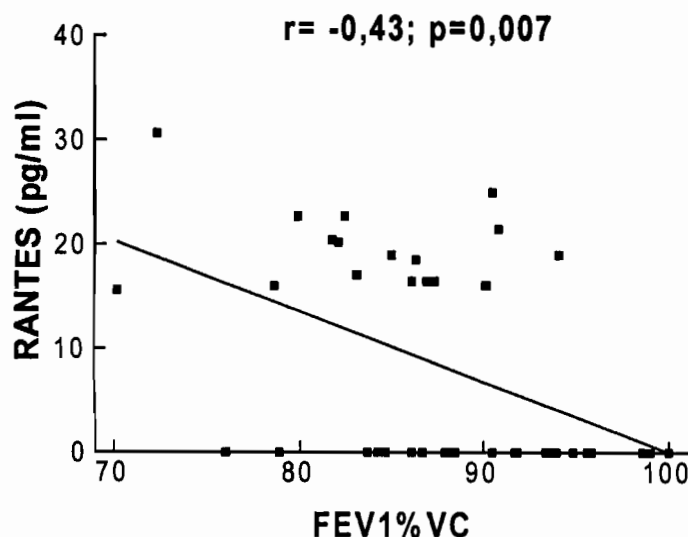
Tabela II. Charakterystyka indukowanej płwociny
Tabel II. The characteristic of induced sputum

Grupa	kontrola	SAR	astma
Całkowita liczba komórek (x 10 ⁶ /gram płwociny) ^{a)} Total cells number (x 10 ⁶ /gram of sputum)	1,8 (0,7-2,6)	0,6 ^{b)} (0,3-1,4)	1,7 (1,0-2,5)
Makrofagi (%)	48,4 (31,5-65,0)	41,6 (29,4-58,7)	48,4 (35,5-52,6)
Neutrofile (%)	50,0 (33,0-67,4)	46,3 (34,0-61,7)	29,3 (14,5-44,4)
Eozynofile (%) ^{c)}	0,5 (0,2-1,5)	1,8 (0,2-4,2)	6,0 ^{d)} (2,9-8,8)
Limfocyty (%)	1,5 (1,0-3,2)	1,9 (0,7-3,8)	2,7 (1,8-4,6)
Komórki nabłonkowe (%) Epithelial cells (%)	11,8 (8,7-15,5)	11,9 (6,8-28,0)	7,3 (3,1-12,1)

Dane przedstawiono w postaci mediany oraz w nawiasach dolny i górny kwartyl; * P < 0,05 różnice znamienne statystycznie pomiędzy wszystkimi grupami, Kruskal-Wallis; P < 0,05 różnice znamienne pomiędzy SAR a kontrolą #, astmą a kontrolą ^{c)}, astmą a SAR?; SAR – sezonowy alergiczny nieżyt nosa.
Data are expressed as a median (lower and upper quartile); *P < 0,05 significant differences among all studied groups, Kruskal-Wallis; P < 0,05 significant differences between SAR and controls #, asthma and controls ^{c)}, asthma and SAR?; SAR – seasonal allergic rhinitis.



Rycina 2. Stężenia RANTES w indukowanej płwocinie. Dane wyrażono w postaci mediany (pozioma linia); górnego i dolnego kwartyla (kwadrat); górnego i dolnego zakresu (wąsy).
Figure 2. The levels of RANTES in induced sputum. Data are presented as a median (horizontal line); upper and lower quartiles (box); upper and lower range (whiskers).



Rycina 3. Korelacja pomiędzy stężeniami RANTES w indukowanej płwocinie a wskaźnikiem FEV₁%VC.
Figure 3. Correlation between the levels of RANTES in induced sputum and the value of FEV₁/VC (%).

Dyskusja

W prezentowanym badaniu wykazaliśmy, że stężenia RANTES w indukowanej płwocinie są podwyższone u chorych z przewlekłą astmą oskrzelową. Natomiast u chorych na SAR, u których badanie indukowanej płwociny wykonywano było w okresie pylenia traw i zbóż stężenia RANTES w indukowanej płwocinie nie różniły się w porównaniu do grupy kontrolnej. Otrzymane wyniki sugerują, że RANTES odgrywa istotną rolę w podtrzymywaniu stanu zapalnego dolnych dróg oddechowych u chorych na astmę. Dodatkowo analiza korelacji wskazuje, że RANTES może mieć znaczenie w powstawaniu nadreaktywności oskrzeli i obturacji dróg oddechowych lub alternatywnie, że nasilona nadreaktywność oskrzeli oraz obturacja oskrzeli (wskazniki ciężkiej lub źle kontrolowanej astmy) wiążą się z nasileniem stanu zapalnego dróg oddechowych, w którym istotną rolę zdaje się odgrywać RANTES. W prezentowanym badaniu nie stwierdzono obecności znaczącej statystycznie korelacji pomiędzy stężeniami RANTES a odsetkiem eozynofiliów w płwocinie indukowanej. Pomimo tego zauważalne jest pośrednie powiązanie pomiędzy tymi dwoma czynnikami. Zarówno RANTES jak i eozynofile były znamienne podwyższone u chorych na astmę. Ponadto oba te czynniki wykazywały korelację z tymi samymi innymi parametrami takimi jak: nadreaktywność oskrzeli oraz ze wskaźnik FEV1%VC. Związek pomiędzy eozynofilami i RANTES znajduje potwierdzenie w innych badaniach. Wykazano, że RANTES należy obok IL-5 i eotaxin do głównych czynników chemotaktycznych i aktywujących eozynofile (13). W innym badaniu stwierdzono zwiększoną ekspresję RANTES oraz jej korelację z liczbą eozynofiliów w błonie

śluzowej nosa po prowokacji alergicznej u chorych z sezonowym nieżytem nosa (SAR) (14). Także u chorych na astmę oskrzelową ekspresja RANTES była zwiększona w błonie śluzowej oskrzeli oraz w popłuczynach oskrzelowo-pęcherzykowych (BAL), a u chorych z zaostrzeniem astmy także w osoczu krwi obwodowej (15-17). Ponadto wykazano silną zależność pomiędzy rekrutacją eozynofiliów do dróg oddechowych a działaniem RANTES (18).

Istotne różnice pomiędzy RANTES i eozynofilami dotyczyły natomiast grupy SAR. O ile odsetek eozynofiliów w płwocinie w tej grupie był pośredni pomiędzy grupami kontrolną i astmy oskrzelowej, to już stężenia RANTES w płwocinie w grupie SAR były niemal identyczne jak w grupie kontrolnej i wyraźnie niższe niż u chorych na astmę oskrzelową. Wyniki te potwierdzają dane z piśmiennictwa o obecności eozynofilowego zapalenia dróg oddechowych u chorych na SAR oraz o istnieniu wyraźnego powiązania pomiędzy zapaleniem górnych i dolnych dróg oddechowych (19). Wskazują jednak, że RANTES prawdopodobnie nie odgrywa znaczącej roli w inicjalizacji stanu zapalnego dolnych dróg oddechowych (niskie stężenia w grupie SAR), natomiast może mieć znaczenia w podtrzymywaniu przewlekłego stanu zapalnego (astma). Sugeruje to, że być może inne chemokin i cytokiny jak eotaxin lub IL-5 mają większe znaczenie w powstawaniu eozynofilowego zapalenia dróg oddechowych u chorych na SAR. Konieczne są jednak dalsze badania, a w szczególności określenie stężeń RANTES w płwocinie indukowanej po donosowej lub dooskrzelowej prowokacji alergenowej u chorych na SAR w celu określenia znaczenia tej chemokin dla powstawania stanu zapalnego dróg oddechowych u chorych z SAR.

Piśmiennictwo

1. Guerra S i wsp. Rhinitis as an independent risk factor for adult-onset asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2002; 109: 419-25.
2. Foresi A i wsp. Eosinophils, mast cells, and basophils in induced sputum from patients with seasonal allergic rhinitis and perennial asthma: relationship to methacholine responsiveness. *J Allergy Clin Immunol.* 1997; 100:58-64.
3. Alvarez MJ i wsp. Airway inflammation in asthma and perennial allergic rhinitis. Relationship with nonspecific bronchial responsiveness and maximal airway narrowing. *Allergy.* 2000; 55:355-62.
4. Braunstahl GJ i wsp. Nasal allergen provocation induces adhesion molecule expression and tissue eosinophilia in upper and lower airways. *J Allergy Clin Immunol.* 2001; 107:469-76.
5. Borish L. Allergic rhinitis: systemic inflammation and implications for management. *J Allergy Clin Immunol.* 2003; 112:1021-31.
6. Beeh KM i wsp. A single nasal allergen challenge increases induced sputum inflammatory markers in non-asthmatic subjects with seasonal allergic rhinitis: correlation with plasma interleukin-5. *Clin Exp Allergy.* 2003; 33:475-82.
7. Chung KF, Barnes PJ. Cytokines in asthma. *Thorax.* 1999; 54:825-57.
8. Pizzichini E i wsp. Indices of airway inflammation in induced sputum: reproducibility and validity of cell and fluid-phase measurements. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996; 154: 308-17.
9. Konno S i wsp. Cytokine concentrations in sputum of asthmatic patients. *Int Arch Allergy Immunol.* 1996; 109:73-8.
10. Romagnoli M i wsp. Eosinophilic inflammation in sputum of poorly controlled asthmatics. *Eur Respir J.* 2002; 20:1370-7.
11. Barczyk A, Pierzchała W, Sozańska E. Stężenia CC-chemokin (MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β) w indukowanej płwocinie u chorych na przewlekłą obturacyjną chorobę płuc i u chorych na przewlekłe zapalenie oskrzeli. *Pneumonol Alergol Pol* 2001; 69:40-49.
12. Sozańska E i wsp. Zakres wartości prawidłowych dla komórek występujących w indukowanej płwocinie w populacji śląskiej. *Pneumonol Alergol Pol* 2005; 73:148-152.
13. Gauvreau GM, Watson RM, O'Byrne PM. Kinetics of allergen-induced airway eosinophilic cytokine production and airway inflammation. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999; 160: 640-7.
14. KleinJan A i wsp. Increase in IL-8, IL-10, IL-13, and RANTES mRNA levels (in situ hybridization) in the nasal mucosa after nasal allergen provocation. *J Allergy Clin Immunol.* 1999; 103:441-50.
15. Chihara J i wsp. Elevation of the plasma level of RANTES during asthma attacks. *J Allergy Clin Immunol.* 1997; 100: S52-5.
16. Ying S i wsp. Eosinophil chemotactic chemokines (eotaxin, eotaxin-2, RANTES, monocyte chemoattractant protein-3 (MCP-3), and MCP-4), and C-C chemokine receptor 3 expression in bronchial biopsies from atopic and nonatopic (Intrinsic) asthmatics. *J Immunol.* 1999; 163:6321-9.
17. Alam R i wsp. Increased MCP-1, RANTES, and MIP-1 α in bronchoalveolar lavage fluid of allergic asthmatic patients. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996; 153:1398-404.
18. Teran LM i wsp. Eosinophil recruitment following allergen challenge is associated with the release of the chemokine RANTES into asthmatic airways. *J Immunol.* 1996; 157: 1806-12.
19. Polosa R i wsp. Bronchial hyperresponsiveness and airway inflammation markers in nonasthmatics with allergic rhinitis. *Eur Respir J.* 2000; 15:30-5.

Wpłynęła: 9.05.2006

Adres: Katedra i Klinika Pneumonologii Śląskiej AM, Katowice, ul. Medyków 14; faks: 0322523831,
e-mail: abarczyk@slam.katowice.pl