

## Znaczenie eozynofilowego białka kationowego w patogenezie chorób alergicznych

### The importance of eosinophil cationic protein in pathogenesis of allergic diseases.

Grzegorz Gogolewski, Anna Wolańczyk-Mędrala, Wojciech Mędrala

Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych i Alergologii  
Akademia Medyczna we Wrocławiu

*Pneumonol. Alergol. Pol.* 2006, 74, 236:239

**Key words:** Eosinophil, ECP, asthma

Wyniki badań ostatnich kilkunastu lat dostarczają wielu danych na temat istotnej roli eozynofila w patogenezie licznych chorób o podłożu zapalnym. Ważnym impulsem a jednocześnie nowoczesnym narzędziem badawczym było opracowanie przeciwciał monoklonalnych EG1, które pozwalają na identyfikację eozynofila, oraz EG2, które identyfikują eozynofila aktywowanego. Przeciwciała te znalazły również swoją aplikację w testach służących do określania stężeń eozynofilowego białka kationowego, co umożliwiło precyzyjne śledzenie stopnia aktywacji tej komórki zachodzącej w organizmie.

Eozynofil jest także istotną częścią układu regulatorowego odpowiedzialnego za proces zapalny. Dojrzałe eozynofile wywodzące się z komórki macierzystej układu krwiotwórczego znajdują się głównie w tkankach. Szacuje się, że tylko jeden procent tych komórek krąży we krwi [5].

Obecnie wydaje się, że wydzielanie cytotoksycznych białek z ziarnistości jest najważniejszym mechanizmem patogenetycznym, w jaki ta komórka jest wyposażona. Białka te powodują uszkodzenie błony zewnętrznej niektórych pasożytów i ich śmierć, niszczą niektóre komórki ssaków, odgrywając ważną rolę w obronie organizmu przed inwazją pasożytów, bakterii i rozwojem chorób nowotworowych [5,14].

Degranulacja eozynofila przebiega stopniowo i w różnych mechanizmach. Składniki ziarnistości są umieszczane w mniejszych pęcherzykach i transportowane na powierzchnię komórki. Mechanizm ten pozwala na wyjaśnienie selektywnego wyzwolania białek z ziarnistości. Zachodzi on przy udziale interleukiny 5 (IL-5) [4,14]. Wyróżnia się dwa typy wydzielania białek z ziarnistości: egzocytozę i cytolizę. W przypadku egzocytozy ziarnistości zbliżają się do błony komórkowej, łączą się z nią i wyrzucają swoją zawartość na zewnątrz. W cytolizie błona

komórkowa ulega zniszczeniu, w wyniku czego całe ziarnistości przemieszczają się do przestrzeni pozakomórkowej [4,14].

Ziarnistości eozynofila zbudowane są z około 200 mniejszych podjednostek [2]. Degranulacja eozynofila powoduje wydzielenie do otaczających tkanek czterech głównych białek bogatych w argininę: eozynofilowego białka kationowego (eosinophil cationic protein – ECP), eozynofilowej neurotoksyny (eosinophil-derived neurotoxin – EDN) zwanej także eozynofilowym białkiem X (eosinophil protein X – EPX), eozynofilowej peroksydazy (eosinophil peroxidase – EPO) oraz głównego białka zasadowego (major basic protein – MBP). Trzy pierwsze białka zlokalizowane są w ziarnistościach matrix, podczas gdy MBP występuje w ziarnistościach jądra komórkowego [2,5,17]. EDN i ECP są małymi białkami kationowymi obecnymi w większości specyficznych ziarnistości ludzkiego eozynofila [12]. EDN jako jedyne białko jest wykrywalne nie tylko w surowicy krwi, ale także w moczu osób zdrowych [17]. Wydzielanie białek eozynofili jest mediowane przez niektóre klasy immunoglobulin, takie jak IgG, IgE, czynnik aktywujący płytki (Platelet Activating Factor – PAF) lub jonofor wapniowy [9]. Zaktywowany eozynofil w stanie zapalnym, oprócz substancji białkowych wydzielanych z ziarnistości, może także syntezować i wydzielać cytokiny: transformujący czynnik wzrost  $\alpha$  i  $\beta$  (Transforming Growth Factor  $\alpha$  and  $\beta$  – TGF  $\alpha$  i  $\beta$ ), białko zapalne makrofagów 1 $\alpha$  (Macrophage Inflammatory Protein-1 $\alpha$  – MIP-1 $\alpha$ ), IL-1, IL-5, IL-6, IL-8, granulocytarno-makrofagowy czynnik wzrostu kolonii (Granulocyte Macrophage – Colony Stimulating Factor – GM-CSF), czynnik martwicy nowotworów  $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor alpha – TNF $\alpha$ ), leukotrien C4 (Leukotriene C4 – LTC4) [2,5,11].

Eozynofil podlega wielu mechanizmom regulacyjnym. Na przykład IL-3, i GM-CSF pobudzają eozynofila do rozwoju, a także mogą go aktywować. W badaniach *in vitro* wykazano wpływ IL-5 wydzielanej przez limfocyty CD4<sup>+</sup> na różnicowanie, przeżycie i adhezję eozynofila do komórek śródbłonna naczyń krwionośnych [1,5]. Czynniki chemotaktyczne takie jak: eotaksyna, leukotrien C4 i histamina indukują napływ eozynofików do miejsc toczącego się stanu zapalnego [5]. Aktywacja eozynofila towarzyszy szeregowi chorób i stanów zapalnych włączając w nie: astmę oskrzelową, atopowe zapalenie skóry, alergiczny nieżyt nosa, alergiczne zapalenie spojówek, alergiczne zapalenie ucha środkowego, infekcje bakteryjne i pasożytnicze, choroby autoimmunologiczne, reumatoidalne zapalenie stawów, łuszczycę, celiakię dorosłych, choroby tkanki łącznej, zespół hipereozynofilowy (hypereosinophilic syndrome – HES), obrzęk naczyń ruchomych, robaczyce [1,5,12].

Reakcje alergiczne składają się z dwóch faz. W pierwszej – wczesnej, pojawiającej się po kilku minutach od kontaktu z alergenem biorą udział przede wszystkim komórki tuczne i wydzielane przez nie substancje: histamina, tryptaza i sulfidoleukotrieny. W drugiej fazie, w kilka godzin po kontakcie z alergenem gromadzą się w drogach oddechowych między innymi eozynofile i uwalniają substancje zawarte w ziarnistościach [5].

Najlepiej udokumentowana jest rola eozynofila i białek przez nie wydzielanych w patogenezie astmy oskrzelowej. Ważną funkcję pełnią także komórki prozapalne: mastocyty, makrofagi, płytki krwi, neutrofile oraz nabłonek dróg oddechowych, endotelium i fibroblasty [2].

Pobudzony eozynofil wydziela całe spektrum mediatorów, a wśród nich eozynofilowe białko kationowe – ECP (eosinophil cationic protein) [6].

Jest to białko zasadowe kodowane przez gen znajdujący się na chromosomie 14, o masie cząsteczkowej wahającej się od 16 do 21,4 kDa. Białko to posiada w swoim składzie cynk i występuje zarówno w peroksydazo-dodatnich jak i ujemnych ziarnistościach granulocytów kwasochłonnych. ECP występuje w trzech odmianach w zależności od masy cząsteczkowej. Wynika to z różnicy w jego glikozylacji. Białko to wiąże się z heparyną i wchodzi w interakcje z czynnikami krzepnięcia krwi. Pojawia się w surowicy zarówno jako wolna cząsteczka jak i w kompleksie niekonwalencyjnym z  $\beta$ 2-makroglobuliną [1,8,10].

Znane są liczne substancje mające zdolność pobudzania eozynofila do wydzielania ECP. Należą do nich GM-CSF, PAF i aktywny składnik 5 dopel-

niacza – C5a. Aby mogła zajść reakcja pobudzenia muszą być spełnione odpowiednie warunki. Nie wystarczy zadziałanie na eozynofila pojedynczym agonistą. Do pełnego pobudzenia konieczna jest wstępna aktywacja przez GM-CSF, a następnie zadziałanie innego agonisty: PAF lub C5a. Eozynofile nie są w zdolne do ciągłej produkcji ECP przy stałym pobudzeniu. W pewnym przedziale czasowym są one niewrażliwe na bodźce. Okres ten zwany jest desensytyzacją komórki. W zależności od działającego agonisty różny jest czas desensytyzacji. Dla PAF czas ten wynosi około 5 minut. Aby uzyskać stężenie ECP równie wysokie jak przy pierwszym pobudzeniu, niezbędny jest przedział czasowy między pobudzeniami równy 20 minut. C5a nie jest w stanie wywołać tak wysokiego stężenia ECP jak przy pierwszej stymulacji. Maksimum jakie może osiągnąć pojawia się po 45 minutach od pierwszej aktywacji [15, 16]. ECP wydzielane przez eozynofile wykazuje toksyczność dla neuronów, komórek nabłonkowych, izolowanych komórek miokardium oraz wirusów [5,13]. Eozynofilowe białko kationowe należy do rodziny rybonukleazy A i ma zbliżoną sekwencję aminokwasową do innego białka z tej samej rodziny – EDN [8]. ECP bierze udział w chorobach neurologicznych, a aktywność rybonukleazy jest niezbędna dla wykazania neurotoksyczności tego białka [13]. Powoduje także niszczenie nabłonka rzęskowego dróg oddechowych. Ponadto pobudza wydzielanie chemicznych mediatorów z mastocytów i bazofików, takich jak: histamina i leukotrieny [7].

W związku z pełnionymi funkcjami oznaczenie stężenia ECP znalazło wiele zastosowań w praktyce klinicznej [13]. Może być ono przydatne we wczesnej diagnostyce stanu zapalnego, ocenie skuteczności leczenia, dostosowywaniu dawki leków, może być wskaźnikiem niepowodzenia terapii, jak również czynnikiem prognostycznym zaostrzenia astmy, jeszcze przed wystąpieniem wczesnych objawów i spadku natężonej jednosekundowej objętości wydechowej – FEV1 (forced expiratory volume in one second) [2]. Zaobserwowano częstszy i niezwiązany z typem reakcji: IgE-zależnej lub IgE niezależnej, wzrost stężenia ECP w surowicy osób z atopią, w porównaniu z grupą osób zdrowych, nawet w przypadku prawidłowej ilości eozynofili krążących we krwi. Chorzy z wysypką grudkowo-rumieniową i świerzbiczką guzkową mają podwyższone stężenie ECP w surowicy, które powraca do normy po wyleczeniu. Istnieje system klinicznej punktacji dla atopowego zapalenia skóry oceniający stopień lichenifikacji, zaburzenia snu, rumień, grudki, guzki i otarcie skóry. Każdy z wyżej wymienionych objawów koreluje ze

stężeniem ECP w surowicy [5]. Niedawno wykazano, że białko to jest także jednym z najwcześniejszych wskaźników zapalenia oskrzeli wywołanego przez alergen, jeszcze przed wystąpieniem objawów klinicznych i nadreaktywności oskrzeli [6]. Stężenie ECP w surowicy jest w ścisłej zależności z jego stężeniem w laważu z dróg oddechowych. Pomiar jego stężenia pozwala w sposób stosunkowo mało inwazyjny na określenie nasilenia procesu zapalnego „in situ” u osób z astmą [2]. Stężenie białka ECP krążącego we krwi jest bardziej specyficznym wskaźnikiem toczącego się procesu zapalnego niż sama liczba eozynofili [5]. Niektóre badania ostatnich lat wykazały wysokie stężenia ECP w chorobach przy nieobecności eozynofili. Dotyczyło to takich chorób dróg oddechowych jak rozstrzenie oskrzeli i przewłękła obturacyjna choroba płuc. Wzrost stężenia ECP sugeruje, że niektóre inne komórki – neutrofile mogą zawierać to białko [3].

#### Piśmiennictwo

1. Björk A., Venge P.: Peterson CGB: Measurements of ECP in serum and the impact of plasma coagulation. *Allergy* 2000,55,442-448.
2. Čičak B. i wsp.: Asthma and eosinophilic cationic protein as an indicator of disease control. *Acta Clin Croat* 2005,44,251-257.
3. Gibson P.G., Simpson J.L., Salto N.: Heterogeneity of airway inflammation in persistent asthma : evidence of neutrophilic inflammation and increased sputum interleukin-8. *Chest* 2001,119,1329-1336.
4. Karawajczyk M. i wsp.: Piecemeal degranulation of peripheral blood eosinophils a study of allergic subjects during and out of the pollen season. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000,23,521-529.
5. Kelly J.: Role of ECP in monitoring inflammatory conditions. DPC Technical Report ZB,181-B,Los Angeles, 1999.
6. Kovacevic S. i wsp.: The influence of atopic constitution, the severity and exacerbation of the disease on the serum eosinophil cationic protein (ECP) concentration in patients with bronchial asthma. *Allergy* 2003,58,1079-1081.
7. Kuwahara Y. i wsp.: Involvement of urban living environments in atopy and enhanced eosinophil activity potential risk factors of airway allergic symptoms. *Allergy* 2001,56,224-30.
8. Maeda T. i wsp.: Growth inhibition of mammalian cells by eosinophil cationic protein. *Eur J Biochem* 2002,269,307-316.
9. Matsunaga Y. i wsp.: Regulation of lymphocyte proliferation by eosinophils via chymotrypsin-like protease

activity and adhesion molecule interaction. *Br J Pharmacol* 2000,130,1539-1546.

10. Noguchi E. i wsp.: The promoter polymorphism in the eosinophil cationic protein gene and its influence on the serum eosinophil cationic protein level. *Am J Respir Crit Care Med* 2003,167(2),180-184.

11. Plötz S.G. i wsp.: The interaction of human peripheral blood eosinophils with bacterial lipopolysaccharide is CD14 dependent. *Blood* 2001,97(1),235-241.

12. Rosenberg H.F., Dyer K.D.: Eosinophil cationic protein and eosinophil-derived neurotoxin. Evolution of novel function in a primate ribonuclease gene family. *J Biol Chem* 1995,270(37),21539-21544.

13. Sanjeev B.S., Vishveshwara S.: Essential dynamics and sidechain hydrogen bond cluster studies on eosinophil cationic protein. *Eur Phys J D* 2002,20,601-608.

14. Seton K. i wsp.: The stimulus-dependent release of eosinophil cationic protein and eosinophil protein X increases in apoptotic eosinophils. *Scand J Immunol* 2003,58,312-320.

15. Simon H.U. i wsp.: Eosinophils maintain their capacity to signal and release eosinophil cationic protein upon repetitive stimulation with the same agonist. *J Immunol* 2000,165,4069-4075.

16. Takafuji S. i wsp.: Effects of human lung fibroblasts on eosinophil degranulation. *Allergy* 2000,55(12),1170-1178.

17. Tischendorf F.W. i wsp.: Eosinophil granule proteins in serum and urine of patients with helminth infections and atopic dermatitis. *Trop Med Int Health* 2000,5,898-905.

Wpłynęła: 23.01.2006r.

Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych i Alergologii AM we Wrocławiu,  
ul. Traugutta 57, 50-417 Wrocław, tel./fax: 0-71 3 44 21 64  
e-mail: ggogolewski@plusnet.pl