

Adam Barczyk, Władysław Pierzchała, Ewa Sozańska

Katedra i Klinika Pneumonologii Śląskiej Akademii Medycznej w Katowicach
Kierownik: Prof. dr hab. n. med. W. Pierzchała

STĘŻENIA CC-CHEMOKIN (MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β) W INDUKOWANEJ PLWOCINIE U CHORYCH NA PRZEWLEKŁĄ OBTURACYJNĄ CHOROBE PŁUC I U CHORYCH NA PRZEWLEKŁE ZAPALENIE OSKRZELI.

CC-CHEMOKINES (MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β) LEVEL IN INDUCED SPUTUM
OF PATIENTS WITH COPD AND CHRONIC BRONCHITIS

Summary: BACKGROUND: MCP-1, MIP-1 α and MIP-1 β are CC-chemokines, which act as chemoattractants for inflammatory cells like macrophages, lymphocytes and eosinophils. These cells are known to be important for development of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and chronic bronchitis (CB). METHODS: Sputum was obtained from 14 patients with COPD, 12 patients with CB and 14 healthy persons by means of the sputum induction method. The MCP-1, MIP-1 α and MIP-1 β levels were measured in induced sputum via ELISA method. RESULTS: MIP-1 α levels in sputum were significantly higher in CB patients compared to healthy persons ($p = 0,01$). Median and (range) were following: CB patients – 22,7 pg/ml (9,2-95,9 pg/ml), control subjects – 17,5 pg/ml (0-27,1 pg/ml). The MIP-1 β levels in sputum were significantly higher in COPD patients compared to healthy persons ($p = 0,003$). Median and (range) were following: COPD patients – 173,2 pg/ml (30,6-1880 pg/ml), control subjects – 19,0 pg/ml (0-570,5 pg/ml). No significant differences were detected among studied groups for MCP-1 levels in induced sputum. There was positive correlation in CB group between levels of MIP-1 β and number of eosinophils in gram of sputum ($r=0,81$ and $p=0,001$). CONCLUSIONS: MIP-1 α maybe important for development of chronic bronchitis and MIP-1 β for development of chronic obstructive pulmonary disease. MIP-1 β is probably a chemoattractant for eosinophils in patients with chronic bronchitis.

Key words: chronic obstructive pulmonary disease, chronic bronchitis, induced sputum, monocyte chemoattractant protein-1, macrophage inflammatory protein-1 α , macrophage inflammatory protein-1 β , CC-chemokines.

PNEUMONOL. ALERGOL. POL., 2001, 69, 1-2, 40-49

Wstęp Przewlekła obturacyjna choroba płuc (POChP) i przewlekłe zapalenie oskrzeli (PZO) to dwie odrębne, chociaż blisko ze sobą powiązane jednostki chorobowe. Chociaż definicje POChP ani PZO nie wspominają o toczącym się w drogach oddechowych w tych chorobach procesie zapalnym, to jednak jego istnienie i bardzo duże znaczenie w patogenezie tych schorzeń zostało potwierdzone w ostatnich latach m.in. dzięki zastosowaniu metod badawczych opartych na bronchofiberoskopii (9). Stan zapalny w tych chorobach charakteryzuje się występowaniem zwiększonej ilości: makrofagów, neutrofilów, limfocytów T oraz eozynofiliów w obrębie dróg oddechowych (5, 15, 24).

W patogenezie chorób zapalnych istotne znaczenie odgrywiają chemokiny, które można podzielić na cztery podgrupy: CXXXC, CXC, CC i C. Chemokiny grupy CC oddziałują głównie na limfocyty, monocyty, komórki tłuszczne i eozy-

nofile. Do tej podgrupy należą m.in.: MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1), MIP-1 α (macrophage inflammatory protein-1 α) oraz MIP-1 β (macrophage inflammatory protein-1 β).

Stan zapalny dróg oddechowych w POChP lub PZO można aktualnie badać za pomocą trzech różnych metod: biopsji oskrzela, popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych (BAL) lub indukowanej płwociny. Każda z tych metod badając inną część drzewa oskrzelowego dostarcza innych informacji na temat składu komórek i substancji biorących udział w zapaleniu (16). Indukowana płwocina została wynaleziona jako ostatnia z wymienionych metod na początku lat dziewięćdziesiątych (6, 20). Szereg prac wykonanych w następnych latach wykazało wysoką powtarzalność, a przez to i wiarygodność wyników składu komórkowego oraz zawartości substancji w supernatancie z indukowanej płwociny (19, 21, 26). Ważną zaletą tej metody w porównaniu do innych (BAL, biopsji oskrzela) jest jej bardzo mała inwazyjność, wysokie bezpieczeństwo i mały dyskomfort dla chorych, co powoduje że jej zastosowanie w badaniach naukowych stanu zapalnego dróg oddechowych jest wysoce etyczne.

MCP-1, MIP-1 α i MIP-1 β były jak dotąd jedynie badane u chorych na PZO przy użyciu popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych. Wciąż nie zbadano jeszcze ich poziomu w PZO metodą indukowanej płwociny. Brak także doniesień na temat poziomu MCP-1, MIP-1 α i MIP-1 β u chorych z POChP zarówno metodą indukowanej płwociny jak i przy użyciu BAL.

Cele pracy Określenie poziomu: MCP-1, MIP-1 α oraz MIP-1 β w supernatancie z indukowanej płwociny u chorych na PZO i POChP w porównaniu do osób zdrowych. Określenie czy poziomy CC-chemokin w supernatancie z indukowanej płwociny korelują z ilością makrofagów, limfocytów lub eozynofiliów w indukowanej płwocinie u chorych na PZO lub POChP.

Material Przed rozpoczęciem badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Śl.A.M. na jego prowadzenie. Grupę osób badanych stanowili ochotnicy, którzy przed rozpoczęciem jakichkolwiek procedur związanych z badaniem podpisali dobrowolnie pisemną zgodę na udział w badaniu. Ogółem w badaniu uczestniczyło 40 osób: 14 chorych na POChP, 12 na PZO i 14 zdrowych ochotników przy czym 3 osoby z grupy kontrolnej wykluczono z dalszej analizy. Pierwszą ze względu na niską wartość $FEV_1=74,6\%$ wartości należnej, a dwie pozostałe z powodu niskich wartości PC_{20} ($<2\text{mg/ml}$), pomimo faktu, że spirometria u tych osób była bez zmian (FEV_1 odpowiednio 122% i 138% wartości należnej).

Kryteriami włączenia dla chorych na POChP były: obecność przewlekłego, niezmiennego ograniczenia przepływu w drogach oddechowych z $FEV_1 <80\%$ należnej, $FEV_1\%VC <70\%$ i odwracalnością obturacji po 15 minutach od podania 200 μg wziewnego salbutamolu $<12\%$ należnej, brak atopii w wywiadzie, a także w ostatnim miesiącu przed włączeniem do badania: brak zaostrzenia POChP oraz nie stosowanie ogólnie działających glikokortykosteroidów.

W grupie chorych na PZO kryteriami wyłączającymi były: obecność atopii w wywiadzie, przebyte zaostrzenia infekcyjne PZO lub stosowanie ogólnie działających glikokortykosteroidów w ostatnim miesiącu przed włączeniem do badania.

Do grupy kontrolnej zakwalifikowano osoby bez objawów chorobowych ze strony układu oddechowego, prawidłowymi wartościami spirometrycznymi, brakiem nadreaktywności oskrzeli w teście z metacholiną ($PC_{20} > 8$ mg/ml), nieobecnością atopii w wywiadzie oraz brakiem infekcji dróg oddechowych w ostatnim miesiącu przed badaniem.

Metody

Badanie spirometryczne wykonywano u wszystkich chorych na aparacie MasterLab firmy Jaeger. U chorych na POChP wykonywano ponadto badania odwracalności obturacji po krótko działającym leku β_2 -mimetycznym (spirometria przed i po 15 minutach od podania 200 μ g salbutamolu przez inhalator ciśnieniowy);

Badanie indukowanej płwociny. Indukcję oraz obróbkę płwociny wykonywano według zmodyfikowanej metody opisanej przez Pavord i wsp. (18). Po wykonaniu wstępnego pomiaru spirometrycznego (w celu określenia wartości FEV_1) podawano 200 μ g salbutamolu w inhalacji, a następnie po 15 minutach ponownie określano wartość FEV_1 . Indukcję płwociny rozpoczynano od podania 7 ml 5% roztworu NaCl za pomocą nebulizatora ultradźwiękowego Thomex MB firmy Medbryt. Następnie pacjent, po przepłukaniu jamy ustnej i gardła wodą, był proszony o wykonanie próby odkrztuszenia płwociny. W przypadku braku efektu powtarzano (maksymalnie dwukrotnie) opisaną powyżej procedurę, mierząc za każdym razem wartość FEV_1 . Odkrztuszoną płwocinę wylewano na płytkę Petriego i przy pomocy tępych kleszczyków oraz pod kontrolą mikroskopu oddzielano grudki płwociny od śliny, tak aby ilość komórek nabłonkowych w płwocinie była jak najmniejsza. Oddzieloną od śliny płwocinę ważono i dodawano 0,1% dithiothreitol (DTT) (Gibco BRL ultra pure) o objętości 4 razy większej niż zważona płwocina. Następnie delikatnie mieszano i homogenizowano przez około 20-krotne aspirowanie pipetą oraz dalej wytrząsano na wytrząsarce laboratoryjnej (KL-942 firmy JWelectronic) przez 20 minut w temperaturze pokojowej i dodawano sól Dulbecco w buforze fosforanowym (D-PBS) (Gibco-BRL) w ilości równej sumie objętości dithiothreitolu oraz płwociny, a następnie dalej wytrząsano przez 5 minut. Tak otrzymany homogenat wirowano 10 minut przy 790g. Supernatant zamrażano w temperaturze -70°C do dalszych badań a pozostałe komórki zawieszano w roztworze D-PBS. Następnie w komorze Neubauera liczono: odsetek komórek nabłonkowych, całkowitą ilość komórek nienabłonkowych w przeliczeniu na gram płwociny oraz określano ich żywotności za pomocą błękitu trypanu. W celu policzenia składu odsetkowego komórek wykonywano następnie 2 rozmazy cytospinowe używając wirówki HPW 342 z zestawem cytologicznym typu „Cytoset” (450 rpm przez 6 minut). Po wybarwieniu rozmazów metodą May-Grunwalda-Giemsy liczono pod mikroskopem 400 komórek określając odsetek makrofagów, neutrofilów, limfocytów i eozynofików;

Test nadreaktywności oskrzeli. Po co najmniej 24 godzinach od zakończenia badania indukowanej płwociny, u osób z grupy kontrolnej i u chorych na PZO wykonywano test nadreaktywności oskrzeli na metacholinę według standardów opracowanych przez Sterk'a i wsp. (27);

Oznaczenie CC-chemokin w supernatancie z indukowanej płwociny. Po zebraniu materiału od wszystkich osób badanych, rozmrożono supernatant z indukowanej płwociny. Poziomy MCP-1, MIP-1 α i MIP-1 β oznaczano metodą ELISA przy użyciu uniwersalnego czytnika mikroplamki Elx800 (Bio-Tec Instr. Inc) używając komercyjnie dostępnych zestawów do oznaczeń: MCP-1 i MIP-1 α firmy Endogen oraz MIP-1 β firmy R&Dsystems. Dolne granice wykrywalności (według danych producentów) były następujące: MCP-1: 10 pg/ml, MIP-1 α : 5 pg/ml, MIP-1 β : 4 pg/ml. Oznaczenia wykonano według instrukcji dostarczonych przez producentów.

Analiza statystyczna. Wyniki przedstawiono w postaci mediany oraz podano najmniejszą i największą wartość. Różnice pomiędzy badanymi grupami określano za pomocą testu U Manna-Whitneya. Korelacje pomiędzy stężeniami chemokin w supernatancie a składem komórkowym indukowanej płwociny oraz wynikami spirometrycznymi przeprowadzono za pomocą współczynnika korelacji rang Spearmana. Analizę wykonano przy użyciu komputera PC i programu Statistica. Różnice pomiędzy badanymi grupami przyjęto za znamienne statystycznie gdy $p \leq 0,05$.

Wyniki

Dane demograficzne, wyniki badań czynnościowych płuc i testu nadreaktywności oskrzeli przedstawiono w tabeli I.

Indukowana płwocina chorych na PZO w porównaniu do grupy kontrolnej charakteryzowała się: większą liczbą komórek nienabłonkowych ($p=0,004$), neutrofilów ($p=0,007$) i eozynofilów ($p=0,0007$) w gramie płwociny oraz wyższym odsetkiem eozynofilów ($p=0,02$). Natomiast w indukowanej płwocinie chorych na POChP stwierdzono: większą liczbę komórek nienabłonkowych ($p=0,007$), neutrofilów ($p=0,004$) i eozynofilów ($p=0,0003$) w gramie płwociny oraz mniejszy odsetek komórek nabłonkowych ($p=0,03$) i makrofagów ($p=0,001$) w porównaniu z płwociną ludzi zdrowych. Indukowana płwocina chorych na POChP zawierała ponadto wyższy odsetek neutrofilów ($p=0,03$) w porównaniu do indukowanej płwociny uzyskanej od chorych na PZO. (tab. II)

Stężenia MCP-1 były mierzalne w supernatancie z indukowanej płwociny u wszystkich chorych. Także poziomy MIP-1 α wykryto u wszystkich osób, przy czym u jednej osoby z grupy kontrolnej zmierzona wartość tej chemokiny wynosiła 3,29 pg/ml, czyli poniżej granicy wykrywalności, w związku z czym przyjęto, że wartość stężenia MIP-1 α w indukowanej płwocinie dla tej osoby wynosiła 0 pg/ml. Natomiast MIP-1 β nie wykryto u trzech osób. Stwierdzono, że chory na PZO w porównaniu do osób z grupy kontrolnej cechują się podwyższonymi poziomami MIP-1 α w supernatancie z indukowanej płwociny – w grupie PZO mediana wynosiła 22,7 pg/ml (zakres: 9,2-96 pg/ml) a w grupie kontrolnej odpowiednio: 17,5 pg/ml i (3,3-27,1 pg/ml). Różnice te były istotne statystycznie. Wartość p wynosiła 0,01. Natomiast u chorych na POChP stwierdzono wyższe poziomy MIP-1 β niż u osób z grupy kontrolnej. W grupie POChP mediana

Tabela I. Wiek, wyniki badań spirometrycznych i testu nadreaktywności w medianach (zakres).
Table I. Age, respiratory system function's results and hyperreactivity tests results in medians (ranges).

Badane parametry Analyzed parameters	Kontrola Control	PZO CB	POChP COPD	
Liczba osób	11	12	14	
Wiek / age	40,0 (16-73)	62,0* (38-79)	63,0** (49-70)	p=0,03* p=0,01**
Płeć (M/K) / Sex (M/F)	7/4	7/5	13/1	
Palenie papierosów Cigarette smoking (T/Ex/N)	4/1/6	4/6/2	4/9/1	
FEV ₁ (%N)	106,0** (92-141)	104,0*** (88-121)	50,8 (23-77)	p=0,00003 p=0,00002***
FEV ₁ %FVC	87,9** (82-95)	83,1*** (62-96,9)	50,8 (36-70)	p=0,00003 p=0,00004***
ΔFEV ₁ po salbutamolu (% N)			3,9 (0-11)	
PC ₂₀ metacholiny (mg/ml)				
PC ₂₀ metacholine (mg/ml)	>25* (18->25)	4,8 (0,4->25)		p=0,04*

* - PZO a kontrola; ** - POChP a kontrola; *** - POChP a PZO;

T – aktualni palacze papierosów; Ex – byli palacze papierosów; N – osoby nigdy nie palące papierosów; FEV₁ (%N) – natężona objętość wydechu pierwszosekundowa jako procent wartości należnej; FVC – natężona pojemność życiowa płuc; ΔFEV₁ po salbutamolu (%N) – odwracalność obturacji 15 minut po podaniu 200 µg salbutamolu wyrażona w procentach wartości należnej;

PC₂₀ metacholiny – stężenie metacholiny (mg/ml) powodujące spadek wartości FEV₁ o 20% w stosunku do wartości wyjściowych.

* - CB (chronic bronchitis) vs. Control; ** - COPD vs. Control; *** - COPD vs. CB; T – current cigarette smokers, Ex – exsmokers, N – nonsmokers; FEV₁ (% pred) – forced expiratory volume in one second (percentage of predicted value); FVC – forced vital capacity; ΔFEV₁ after salbutamol (% pred) – reversibility of airway obstruction 15 minutes after delivering 200 µg of salbutamol expressed as percentage of predicted value; PC₂₀ methacholine (mg/ml) – provocative concentration of methacholine causing a 20% fall in FEV₁.

wartości MIP-1β wynosiła 173,2 pg/ml (zakres: 30,6-1880 pg/ml) a w grupie kontrolnej odpowiednio: 19,0 pg/ml i (0-570,5 pg/ml). Nie stwierdzono różnic w zakresie MCP-1 pomiędzy grupami. (tab. III)

Przy rozpatrywaniu korelacji pomiędzy poziomami chemokin lub liczbą komórek w indukowanej płwocinie a danymi demograficznymi, spirometrycznymi oraz ilością komórek zapalnych w indukowanej płwocinie stwierdzono w obrębie badanych grup występowanie następujących zależności:

- u chorych na POChP: stwierdzono dodatnią korelację pomiędzy: stężeniem MIP-1α i stężeniem MIP-1β (r=0,56 i p=0,04), stężeniem MCP-1 i wartością FEV₁%FVC (r=0,54 i p=0,05), a także ujemne korelacje pomiędzy: wartością FEV₁%N i liczbą eozynofiliów w gramie płwociny (r=-0,62 i p=0,02), wartością FEV₁%N i odsetkiem eozynofiliów w płwocinie (r=-0,67 i p=0,008), wartością FEV₁%FVC i liczbą eozynofiliów

Stężenia CC-chemokin w indukowanej płwocinie

Tabela II. Charakterystyka indukowanej płwociny badanej populacji
Table II. Characteristics of induced sputum from the study population.

Badane parametry Analyzed parameters	Kontrola Control	PZO CB	POChP COPD	
nienablonkowe/ non epithelial cells	1,2 (0,2-5,2)	4,2* (1,2-20,5)	2,8** (0,3-11,1)	*p=0,004, **p=0,007
makrofagi / macrophages	0,48 (0,15-1,73)	0,87 (0,19-6,52)	0,43 (0,1-1,89)	
neutrofile/ neutrophils	0,56 (0,08-3,68)	1,77 (0,22-8,21)		*p=0,007, **p=0,004
eozynofile/eosinophils	0,0036 (0-0,026)	0,097* (0,002-1,73)	0,139** (0,002-1,2)	*p=0,0007, **p=0,0003
limfocyty/ lymphocytes	0,059 (0,002-0,12)	0,085 (0,01-1,415)	0,062 (0-0,988)	
% poszczególnych rodzajów komórek w płwocinie/ % of appropriate cells in the sputum.				
komórki nablonkowe/ epithelial cells	7,3** (2,3-39)	6,4 (0,8-10,7)	2,8 (0-11,1)	**p=0,03
makrofagi	33,4** (23,0-73,8)	28,7 (2,8-72,4)	15,2 (5,5-74)	**p=0,001
neutrofile	52,0 (19,5-72)	63,2 (18,3-94,6)	79,9**,* (32,3-88,3)	**p=0,007, ***p=0,03
eozynofile	0,5 (0-1,7)	1,4* (0,2-48)	4,1** (0,3-33,7)	*p=0,02, **p=0,002
limfocyty	3,9 (1,0-12)	3,6 (0,6-8,9)	3,2 (0-8,9)	

Dane przedstawiono w postaci median oraz w nawiasach podano zakresy;

*PZO kontrola; **POChP a kontrola; ***POChP a PZO

Data are expressed as medians and ranges (in brackets);

*CB vs. Control; **COPD vs. Control; ***COPD vs. CB

Tabela III. Poziomy CC-chemokin w indukowanej płwocinie w pg/ml.

Table III. Levels of CC-chemokines in induced sputum (pg/ml).

Chemokiny	Kontrola/Control	PZO/CB	POChP/COPD	p
MIP-1 α	17,5 (0-27,1)	22,7* (9,2-96)	21,7 (8,7-51)	*p=0,01
MIP-1 β	19,0 (0,570)	172,6 (0-3480)	173,2** (31-1880)	**p=0,003
MCP-1	277 (200-1034)	254 (77-1201)	323 (156-620)	

Dane przedstawiono w postaci median oraz w nawiasach podano zakresy;

*PZO a kontrola; ** POChP a kontrola; ***POChP a PZO

Data are expressed as medians and ranges (in brackets);

*CB vs. Control; ** COPD vs. Control; ***COPD vs. CB.

- w gramie płwociny ($r=-0,57$ i $p=0,03$), wartością $FEV_1\%FVC$ i odsetkiem eozynofiliów w płwocinie ($r=-0,68$ i $p=0,007$),
- u chorych na PZO występowały dodatnie korelacje pomiędzy: stężeniami MIP-1 α i MIP-1 β ($r=0,68$ i $p=0,02$), stężeniem MIP-1 β i wiekiem chorych ($r=0,71$ i $p=0,01$), stężeniem MIP-1 β i liczbą komórek nienabłonkowych w gramie płwociny ($r=0,69$ i $p=0,01$) oraz stężeniem MIP-1 β i liczbą eozynofiliów w gramie płwociny ($r=0,81$ i $p=0,001$). Ponadto stwierdzono ujemne korelacje pomiędzy: stężeniem MIP-1 β i odsetkiem komórek nabłonkowych w płwocinie ($r=-0,77$ i $p=0,003$) oraz stężeniem MCP-1 i ilością neutrofilów w gramie płwociny ($r=-0,58$ i $p=0,05$),
 - w grupie kontrolnej zanotowano jedynie dodatnią korelację pomiędzy stężeniami MIP-1 α i MIP-1 β ($r=0,76$ i $p=0,006$).

Dyskusja

Prezentowana praca jest pierwszą, w której badano poziomy MCP-1, MIP-1 α i MIP-1 β w indukowanej płwocinie u chorych na POChP i PZO.

Jest też pierwszym doniesieniem sugerującym, że MIP-1 α może mieć znaczenie w patogenezie PZO. MIP-1 α jest silnym chemoatraktantem dla eozynofiliów, monocytów i limfocytów (1, 25, 30). W prezentowanym badaniu u chorych na PZO stwierdzono zwiększone liczby eozynofiliów i neutrofilów w indukowanej płwocinie. Poziomy MIP-1 α nie korelowały jednak z liczbami poszczególnych komórek w indukowanej płwocinie, co może wynikać z faktu, że chemokina ta jest tylko jednym z wielu czynników chemotaktycznych dla leukocytów. Znaczenie MIP-1 α w patogenezie PZO wymaga więc dalszych badań.

W badanej przez nas grupie zaobserwowano tendencję do podwyższonych stężeń MIP-1 β w supernatancie z indukowanej płwociny u chorych na PZO w porównaniu do kontroli, to różnice te nie były znamienne statystycznie ($p=0,06$). Natomiast w grupie chorych na POChP stężenia tej chemokiny w supernatancie z indukowanej płwociny były znamienne podwyższone w porównaniu do kontroli. Jak dotąd brak jest jednak w piśmiennictwie badań dotyczących MIP-1 β u chorych na POChP (zarówno w indukowanej płwocinie, jak i w BAL lub biopsji oskrzeli). Capelli i wsp. stwierdzili podwyższone poziomy MIP-1 β w BALu u chorych na PZO (3), przy czym chorzy ci różnili się od naszych chorych na PZO (3). Chociaż wszyscy spełniali kryteria PZO, to jednak wyniki spirometryczne wskazują, że przynajmniej część z nich spełniała kryteria POChP. W prezentowanym badaniu zdecydowana większość chorych na PZO nie miała nawet niewielkiej obturacji dróg oddechowych. Wydaje się, więc że prezentowana praca, pomimo różnic w metodologii (indukowana płwocina zamiast BAL) wspiera wyniki przedstawione przez Capelliego i wsp. o znaczeniu MIP-1 β w patogenezie PZO, szczególnie u tych chorych, u których stwierdza się dodatkowo obturację dróg oddechowych. Zwłaszcza, że Capelli i wsp. stwierdzili u chorych na PZO występowanie ujemnej korelacji pomiędzy poziomami MIP-1 β w BAL a wartością $FEV_1\%N$ ($r=-0,64$, $p=0,035$) (3). W prezentowanym badaniu stwierdzono jedynie obecność nieznamiennie statystycznie ujemnej korelacji pomiędzy poziomami MIP-1 β w supernatancie z indukowanej płwociny a wartością $FEV_1\%N$ ($r=-0,48$, $p=0,08$) u chorych na POChP.

W badaniach *in vitro* nie stwierdzono, aby MIP-1 β działała chemotaktycznie na eozynofile (2, 22). Nasza analiza wykazała jednak bardzo silną korelację pomiędzy stężeniami MIP-1 β a liczbą eozynofiliów w płwocinie ($r=0,81$, $p=0,001$), co przemawia za tym, że *in vivo* u chorych na PZO, MIP-1 β może być chemoatraktantem dla eozynofiliów.

W prezentowanym badaniu nie występowały różnice w poziomach MCP-1 w indukowanej płwocinie pomiędzy badanymi grupami. W pracach innych autorów stwierdzono podwyższone w BAL stężenia tej chemokiny u palących papierosy chorych na PZO w porównaniu do niepalących papierosów osób z grupy kontrolnej (3, 7). Prawdopodobnie palenie papierosów wywiera istotny wpływ na poziomy tej chemokiny w drogach oddechowych co potwierdzają badania przeprowadzone na zdrowych ochotnikach, w których stwierdzono, że istnieje związek pomiędzy liczbą wypalanych aktualnie papierosów a poziomami MCP-1 w BAL (12). We wszystkich naszych badanych grupach tyle samo osób (cztery) było aktualnymi palaczami papierosów, co może po części tłumaczyć brak różnic w stężeniach MCP-1 w indukowanej płwocinie pomiędzy tymi grupami.

Spośród komórek, którym przypisuje się znaczenie w patogenezie POChP i PZO (makrofagi, limfocyty T, neutrofile i eozynofile), jedynie liczby dwóch ostatnich były podwyższone w indukowanej płwocinie w prezentowanym badaniu. Wg większości autorów neutrofile stwierdza się w zwiększonej liczbie i odsetku w indukowanej płwocinie u chorych na POChP (10, 11, 19, 23, 29), natomiast u chorych na PZO odsetek tych komórek bywa nieznacznie podwyższony w porównaniu do osób zdrowych ($p=0,05$) (21). W naszym badaniu odsetek neutrofilów był wyższy w indukowanej płwocinie u chorych na POChP w porównaniu do chorych na PZO. Ta różnica sugeruje znaczenie neutrofilów dla powstawania obturacji dróg oddechowych, co znajduje potwierdzenie w danych z piśmiennictwa (4).

W porównaniu do neutrofilów znaczenie eozynofiliów w patogenezie PZO i POChP jest znacznie bardziej kontrowersyjne. W części prac stwierdzono podwyższone liczby eozynofiliów w indukowanej płwocinie u chorych na POChP (10, 23), w innych natomiast nie wykazano statystycznie istotnego zwiększenia ich liczby (11, 19, 29). Podobne rozbieżności dotyczyły BAL. Stwierdzano: zwiększone liczby eozynofiliów w PZO (7, 14, 28) lub brak różnic (u chorych na POChP lub PZO w porównaniu do kontroli) (13, 23). Także wyniki prac, w których analizowano wycinki pobrane z dróg oddechowych są niejednoznaczne. W części badań stwierdzano zwiększone liczby eozynofiliów w ścianie dróg oddechowych chorych na PZO (13) i POChP (13, 23), w innych natomiast brak różnic (4, 17).

Stwierdzenie podwyższonego odsetka i liczby eozynofiliów u chorych na PZO i POChP w prezentowanej pracy wspiera doniesienia z piśmiennictwa sugerujące, że komórki te mogą mieć znaczenie w patogenezie tych chorób. Dodatkowo za ich znaczeniem w powstawaniu POChP przemawia wykazana w naszej pracy obecność wyraźnej korelacji pomiędzy nasileniem obturacji (mierzonej za pomocą FEV_1 i $FEV_1\%FVC$) a liczbą i odsetkiem eozynofiliów w tej grupie chorych. Warto jednak zwrócić uwagę na to, że liczba eozynofiliów w drogach oddechowych u chorych na PZO lub POChP jest w porównaniu do chorych na astmę oskrzelową stosunkowo niska (8). Ponadto stwierdzono, że w przeciwień-

stwie do astmy, większość eozynofiliów w ścianie oskrzeli u chorych na POChP nie była zdegranulowana, co stanowiło podstawę przypuszczenia, że komórki te mogą nie być aktywne u chorych na POChP (13).

Chorzy na POChP lub PZO byli w prezentowanej pracy starsi od osób z grupy kontrolnej. Wynika to z faktu, że wiek jest jednym z czynników ryzyka tych chorób a losowo wybrane osoby z populacji ogólnej są młodsze od losowo wybranych chorych na POChP lub PZO.

Wnioski

MIP-1 α może mieć znaczenie w patogenezie przewlekłego zapalenia oskrzeli, natomiast MIP-1 β w patogenezie przewlekłej obturacyjnej choroby płuc. MIP-1 β jest prawdopodobnie chemoatraktantem dla eozynofiliów u chorych na PZO. Zastosowana metoda indukowania płwociny potwierdza rolę neutrofilów i eozynofiliów w patogenezie PZO i POChP, a także pozwala na wiarygodne badanie stanu zapalnego w drogach oddechowych.

Piśmiennictwo

1. Adams D. H., Shaw S.: Leucocyte-endothelial interactions and regulation of leucocyte migration. *Lancet*. 1994, 343, 831-836.
2. Baggiolini M., Dewald B., Moser B.: Interleukin-8 and related chemotactic Cytokines.: CXC and CC chemokines. *Adv. Immunol.* 1994, 55, 97-179.
3. Capelli A., Di Stefano A., Gnemmi I., i wsp.: Increased MCP-1 and MIP-1 β in bronchoalveolar lavage fluid of chronic bronchitics. *Eur. Respir. J.* 1999, 14, 160-165.
4. Di Stefano A., Capelli A., Lusuardi M., i wsp.: Severity of airflow limitation is associated with severity of airway inflammation in smokers. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1998, 158, 1277-1285.
5. Di Stefano A., Turato G., Maestrelli P., i wsp.: Airflow limitation in chronic bronchitis is associated with T-lymphocyte and macrophage infiltration of the bronchial mucosa. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1996, 153, 629-632.
6. Fahy J. V., Liu J., Wong H., i wsp.: Cellular and biochemical analysis of induced sputum from asthmatic and from healthy subjects. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1993, 147, 1126-1131.
7. Jahnz-Różyk K. M., Kuna P., Pirożyńska E.: Monocyte chemotactic and activating factor/monocyte chemoattractant protein (MCAF/MCP-1) in bronchoalveolar lavage fluid from patients with atopic asthma and chronic bronchitis. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 1997, 7, 254-259.
8. Jeffery P. K.: Structural and inflammatory changes in COPD: a comparison with asthma. *Thorax* 1998, 53, 129-136.
9. Jeffery P.K.: Chairman's summary. Inflammation in chronic obstructive lung disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1999, 160, S3-S4.
10. Keatings V. M., Barnes P. J.: Granulocyte activation markers in induced sputum: comparison between chronic obstructive pulmonary disease, asthma, and normal subjects. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1997, 155, 449-453.
11. Keatings V. M., Collins P. D., Scott D. M., i wsp.: Differences in interleukin-8 and tumor necrosis factor- α in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1996, 153, 530-534.
12. Kuschner W. G., D'Alessandro A., Wong H., i wsp.: Dose-dependent cigarette smoking-related inflammatory responses in healthy adults. *Eur. Respir. J.* 1996, 9, 1989-1994.
13. Lacoste J. Y., Bousquet J., Chanez P., i wsp.: Eosinophilic and neutrophilic inflammation in asthma, chronic bronchitis, and chronic obstructive pulmonary disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1993, 92, 537-548.
14. Linden M., Rasmussen J. B., Piitulainen E., i wsp.: Airway inflammation in smokers with nonobstructive and obstructive chronic bronchitis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1993, 148, 1226-1232.
15. Lusuardi M., Capelli A., Cerutti C. G., i wsp.: Airways inflammation in subjects with chronic bronchitis who have never smoked. *Thorax*. 1994, 49, 1211-1216.
16. Maestrelli P., Saetta M., Di Stefano A., i wsp.: Comparison of leukocyte counts in sputum,

Stężenia CC-chemokin w indukowanej płwocinie

- bronchial biopsies, and bronchoalveolar lavage. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1995, 152, 1926-1931.
17. O'Shaughnessy T. C., Ansari T. W., Barnes N. C., i wsp.: Inflammation in bronchial biopsies of subjects with chronic bronchitis: inverse relationship of CD8+ T lymphocytes with FEV₁. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1997, 155, 852-857.
 18. Pavord I. D., Pizzichini M. M., Pizzichini E., i wsp.: The use of induced sputum to investigate airway inflammation. *Thorax.* 1997, 52, 498-501.
 19. Peleman R. A., Ryttilä P. H., Kips J. C., i wsp.: The cellular composition of induced sputum in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur. Respir. J.* 1999, 13, 839-843.
 20. Pin I., Gibson P. G., Kolendowicz R., i wsp.: Use of induced sputum cell counts to investigate airway inflammation in asthma. *Thorax.* 1992, 47, 25-29.
 21. Pizzichini E., Pizzichini M. M., Efthimiadis A., 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, 308-317.
 22. Rot A., Krieger M., Brunner T., i wsp.: RANTES and macrophage inflammatory protein 1 α induce the migration and activation of normal human eosinophil granulocytes. *J. Exp. Med.* 1992, 176, 1489-1495.
 23. Rutgers S. R., Postma D. S., ten Hacken N. H., i wsp.: Ongoing airway inflammation in patients with COPD who do not currently smoke. *Thorax.* 2000, 55, 12-18.
 24. Saetta M., Di Stefano A., Maestrelli P., i wsp.: Airway eosinophilia in chronic bronchitis during exacerbations. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1994, 150, 1646-1652.
 25. Schrum S., Probst P., Fleischer B., i wsp.: Synthesis of the CC-chemokines MIP-1 α , MIP-1 β , and RANTES is associated with a type 1 immune response. *J. Immunol.* 1996, 157, 3598-3604.
 26. Spanavello A., Migliori G. B., Sharara A., i wsp.: Induced sputum to assess airway inflammation: a study of reproducibility. *Clin. Exp. Allergy.* 1997, 27, 1138-1144.
 27. Sterk P. J., Fabbri L. M., Quanjer P. H., i wsp.: Airway responsiveness. Standardized challenge testing with pharmacological, physical and sensitizing stimuli in adults. Report Working Party Standardization of Lung Function Tests, European Community for Steel and Coal. Official Statement of the European Respiratory Society. *Eur. Respir. J.* 1993, 16, 53-83.
 28. Sun G., Stacey M. A., Vittori E., i wsp.: Cellular and molecular characteristics of inflammation in chronic bronchitis. *Eur. J. Clin. Invest.* 1998, 28, 364-372.
 29. Takanashi S., Hasegawa Y., Kanehira Y., i wsp.: Interleukin-10 level in sputum is reduced in bronchial asthma, COPD and in smokers. *Eur. Respir. J.* 1999, 14, 309-314.
 30. Taub D. D., Conlon K., Lloyd A. R., i wsp.: Preferential migration of activated CD4+ and CD8+ T cells in response to MIP-1 α and MIP-1 β . *Science.* 1993, 260, 355-358.

Wpłynęła: 25.08.2000

Adres: Katedra i Klinika Pneumonologii Śląskiej Akademii Medycznej, ul. Medyków 14, 40-752 Katowice