

Zakres wartości prawidłowych dla komórek występujących w indukowanej płwocinie w populacji śląskiej

Range of the normal values for induced sputum cells in Silesian population

Ewa Sozańska, Grzegorz Gąsior, Aleksandra Semik, Adam Barczyk, Władysław Pierzchała.

Z Katedry i Kliniki Pneumonologii Śląskiej Akademii Medycznej w Katowicach.
Kierownik: prof. dr hab. n. med. W. Pierzchała.

Summary: Background: The induced sputum is used in the diagnosis of chronic airways diseases. Up to now there has not been performed studies in Poland describing the distribution of cells in sputum. The aim of the study was to work out the range of normal values for cells in sputum, based on a group of healthy Polish people living in Silesia region.

Methods: One hundred healthy volunteers in age 17-79 without respiratory symptoms were examined. They had normal spirometry, no airways hyperresponsiveness to metacholine and no history of allergic diseases. The sputum was obtained from 85 people. Viability, total and differential cell counts was performed. Results: The range of the normal values for induced sputum cells was following [mean (\pm SD)]: macrophages 49.3% (11.5-77.1%), neutrophils 48.5% (9.6-87.2%), eosinophils 0.8% (<4.8), lymphocytes 1.4% (<4.2%). Smoking and age of subjects influenced the number and percentage of cells in sputum. Conclusions: Finding of high percentage of eosinophils (>4.8%) in sputum may be helpful in the diagnosis of asthma. Counting of neutrophils and other cells is of limited practical value.

E.S.;G.G.; A.S.; A.B.; W.P. Range of the normal value for induced sputum cells in people living in Silesian region

Pneumonol. Alergol. Pol. 2005, 73, 148:152

Key words: induced sputum, range of the normal values.

Wstęp

Badanie indukowanej płwociny jest ważną metodą w ocenie procesów zapalnych drzewa oskrzelowego u chorych na przewlekłe choroby układu oddechowego. Do jej zalet należą: mała inwazyjność [1,2] oraz powtarzalne i wiarygodne wyniki [3,4]. Dostarcza cennego materiału badawczego: supernatantu oraz komórek. Supernatant z indukowanej płwociny jest płynem, w którym rozpuszczone są białka między innymi o charakterze zapalnym. Wśród komórek dominują makrofagi, neutrofile, dużo rzadziej występują eozynofile, limfocyty i komórki nabłonkowe.

Ocena składu komórkowego płwociny jest pomocna w diagnostyce niektórych przewlekłych chorób układu oddechowego. Płwocina chorych na astmę oskrzelową cechuje się podwyższonym odsetkiem eozynofiliów, a chorych na przewlekłą obturacyjną chorobę płuc (POChP) wysokim odsetkiem neutrofilów zwłaszcza w czasie zaostrzenia [5,6]. Ponadto badanie indukowanej płwociny ma podstawowe znaczenie w rozpoznawaniu eozynofilowego zapalenia oskrzeli [7,8,9]. Chorzy na przewlekłe choroby oskrzeli, u których stwierdza się eozynofilię w płwocinie, dobrze reagują na terapię

lekami z grupy kortykosterydów w przeciwieństwie do pozostałych chorych [10,11].

Powyższe przykłady diagnostycznego wykorzystania oceny składu komórkowego płwociny indukowanej wskazują, że metoda może być użyteczna w praktyce klinicznej. W związku z tym, interpretacja wyników badania indukowanej płwociny, podobnie jak i każdego innego badania o charakterze ilościowym, powinna opierać się na normie, czyli zakresie wartości prawidłowych występujących u osób zdrowych. W 2000r. Belda i wsp. oraz Spornavello i wsp. [12,13], opracowali niezależnie od siebie wartości referencyjne dla całkowitej liczby oraz poszczególnych typów komórek zapalnych występujących w płwocinie indukowanej osób zdrowych. Ich badania jako pierwsze opierały się na dużych (około 100 osób) grupach badanych zdrowych ludzi.

Celem pracy było opracowanie laboratoryjnej normy dla składu komórkowego płwociny indukowanej pochodzącej od zdrowych mieszkańców Polski, zamieszkałych na terenie województwa Śląskiego.

Material i metody

Badani

W badaniu wzięło udział 100 osób w wieku od 17 do 79 lat. Badanie uzyskało akceptację Komisji Bioetycznej Śląskiej Akademii Medycznej w Katowicach. Każdy uczestnik przed przystąpieniem do procedur badawczych zapoznał się z celem badania oraz dobrowolnie podpisał zgodę na uczestnictwo.

Kryteria włączenia i wyłączenia

Kryteria włączenia do badania obejmowały: wiek powyżej 16 lat, brak jakichkolwiek dolegliwości układu oddechowego aktualnie i w przeszłości, brak infekcji dróg oddechowych w trakcie badania oraz w okresie 4 tygodni poprzedzających badanie, prawidłowy wynik badania spirometrycznego, w tym przede wszystkim $FEV_1 > 80\%$ wartości należnej oraz $FEV_1\%FVC > 70\%$.

Do kryteriów wyłączenia z badania należała obecność nadreaktywności oskrzeli w teście z metacholiną ($PC_{20} < 8$ mg/ml) oraz dodatni wywiad dotyczący chorób alergicznych.

Przebieg badania

Badanie składało się z dwóch wizyt. W czasie pierwszej z nich przeprowadzano wywiad lekarski, badanie spirometryczne, wykonywano test nadreaktywności oskrzeli z metacholiną oraz punktowe testy skórne z alergenami wziewnymi. Osoby spełniające kryteria włączenia/wyłączenia do badania przychodziły na wizytę drugą, która odbywała się, co najmniej 7 dni po wizycie pierwszej. W trakcie drugiej wizyty wykonywano badanie indukowanej płwociny.

Metody

1. Wywiad według standardowego kwestionariusza badania.
2. Badanie spirometryczne wykonywano na aparacie MasterLab firmy Jaeger.
3. Test nadreaktywności oskrzeli z metacholiną przeprowadzono zgodnie z protokołem opisanym przez Sterk'a i wsp [14].
4. Punktowe alergiczne testy skórne wykonywano za pomocą referencyjnej metody Pepysa i Bernsteina [15] z dziewięcioma powszechnie stosowanymi alergenami wziewnymi. Wynik testu uznawano za ujemny, gdy żaden z badanych alergenów nie powodował wystąpienia bąbla większego od 3 mm. Atopię rozpoznawano, gdy odczyn był większy od 3 mm. Chorych z atopią włączano do badania, jeżeli nie występowały u nich objawy żadnych chorób alergicznych.
5. Badanie indukowanej płwociny wykonano według zmodyfikowanej metody opisanej przez Pavord'a i wsp.[16] i Popowa i wsp. [17]: Indukcja płwociny: Płwocinę indukowano za pomocą roztworów chlorku sodu o stężeniu 3, 4 i 5 % podawanych kolejno, w ilości po 7 ml, w postaci aerozolu wytwarzanego przez nebulizator ultradźwiękowy firmy deVilbis (prędkość przepływu 1ml/min). Po każdej dawce soli wdychanej przez ustnik, osoba badana proszona była o przepłukanie jamy ustnej wodą, oczyszczenie przewodów nosowych i odkrztuszenie płwociny do sterylnego naczynia. Wykonywano również spirometrię w celu kontroli wartości FEV_1 . Całkowity czas inhalacji wynosił około 20 minut. Obróbka płwociny: Oddzieloną od

śliny płwocinę ważono i dodawano do niej taką ilość mililitrów 0,1% roztworu dithiothreitolu w HBSS, która równała się 4-krotnej wadze płwociny wyrażonej w gramach. Uzyskaną zawiesinę homogenizowano przez aspirację pipetą a następnie mieszano na kołyszce laboratoryjnej przez 20minut. Dodawano HBSS w ilości równej objętości zawiesiny komórek i mieszało dalsze 5 minut. Uzyskany homogenat wirowano 10 minut przy 790g. Supernatant zamrażano do -70°C , a osad komórek płwociny zawieszano w niewielkiej ilości HBSS. Określano żywotność komórek za pomocą błękitu trypanu, obliczano całkowitą ilość komórek nabłonkowych i nie nabłonkowych w komorze hematologicznej Neubauera oraz wykonano dwa preparaty cytospinowe za pomocą wirówki MPW- 342 z zestawem „cytosef“, wirując 6 minut przy 600 obr/min. Po wybarwieniu preparatów metodą May-Grunwalda – Giemsy określano odsetek poszczególnych typów komórek przy użyciu mikroskopu świetlnego, licząc 400 kolejnych komórek nie nabłonkowych w każdym z dwóch preparatów. Do obróbki płwociny przystępowano jak najszybciej i nie później niż dwie godziny od jej uzyskania.

Analiza statystyczna

Wyniki przedstawiono w postaci średniej arytmetycznej, odchylenia standardowego (SD), mediany oraz rozstępu międzykwartyłowego (RQ). Zakres wartości prawidłowych zdefiniowano jako przedział zawarty pomiędzy średnią arytmetyczną minus dwa odchylenia standardowe oraz średnią arytmetyczną plus dwa odchylenia standardowe. Rozkłady poszczególnych typów komórek oceniano za pomocą testu Komogorow – Smirnow'a. Analizę korelacji określono przy pomocy współczynnika korelacji Pearsona i rang Spearmana w zależności od typu rozkładu porównywanych parametrów. Analizę porównawczą dla grup dokonano przy pomocy testu ANOVA rang Kruskal- Wallis'a. Różnice między badanymi grupami przyjęto za znamienne statystyczne, gdy $p < 0,05$.

Wyniki

Grupę analizowaną stanowiło 85 osób w wieku od 17 do 79 lat. Średnia wieku wynosiła $44 (\pm 15)$ lat. Rozkład wieku badanych osób był rozkładem normalnym. Średnia żywotność analizowanych komórek wynosiła 83,1%.

Średnia całkowita liczba komórek w indukowanej płwocinie w badanej populacji osób zdrowych wynosiła $2,9 (\pm 2,6) \times 10^6$ w przeliczeniu na gram płwociny. Średni odsetek komórek w płwocinie wynosił odpowiednio: makrofagi 49,3 ($\pm 18,9$) %, neutrofile 48,5 ($\pm 19,4$) %, eozynofile 0,8 ($\pm 1,2$) % i limfocyty 1,4 ($\pm 1,4$) %. Zakres wartości prawidłowych składu procentowego komórek zapalnych w indukowanej płwocinie był następujący: makrofagi (11,5-87,1%), neutrofile (9,6-87,2%), eozynofile ($\leq 4,8\%$) i limfocyty ($\leq 4,2\%$). Zakres wartości prawidłowych komórek zapalnych wyrażony w wartościach absolutnych w przeliczeniu na gram płwociny przedstawiał się następująco: całkowita liczba komórek ($\leq 8,1 \times 10^6$), makrofagi ($\leq 3,3 \times 10^6$), neutrofile ($\leq 5,67 \times 10^6$), eozynofile ($\leq 0,17 \times 10^6$), limfocyty ($\leq 0,09 \times 10^6$). (Tab. I).

Tabela 1. Zakres wartości prawidłowych komórek zapalnych w płwocinie indukowanej.
Table 1. Range of normal value inflammatory cells in induced sputum.

	Średnia ± SD Mean ± SD	Zakres wartości prawidłowych Range of the normal value		Mediana (RK) Mediana (QR)	Percentyl Percentile	
		Średnia – 2 SD Mean – 2 SD	Średnia + 2 SD Mean + 2 SD		10	90
Całkowita l. komórek x 10 ⁶ /g Total cell count x 10 ⁶ /g	2,9±2,6	-2,30	8,1	2,0 (2,6)	0,57	6,66
Makrofagi %	49,3±18,9	11,5	87,1	52,0 (31,5)	24,2	73,7
Neutrofile%	48,5±19,4	9,60	87,2	45,7 (34,1)	22,5	74,6
Eozynofile %	0,8±1,2	-2,75	4,8	0,4 (1,0)	0,0	2,4
Limfocyty %	1,4±1,4	-1,34	4,2	1,4 (1,1)	0,0	3,3
Makrofagi x10 ⁶ /g	1,21±0,98	-0,70	3,30	0,92 (0,89)	0,337	2,354
Neutrofile x10 ⁶ /g	1,68±2,04	-2,33	5,67	0,91 (0,89)	0,155	4,031
Eozynofile x10 ⁶ /g	0,2±0,5	-0,11	0,17	0,01 (0,02)	0,0	0,067
Limfocyty x10 ⁶ /g	0,03/g0,03	-0,03	0,09	0,02 (0,02)	0,0	0,077

Wartości przedstawione w postaci średnich ±2 odchylenia standardowe (SD), median, rozstęp kwartylnych (RK) oraz jako 10 i 90 percentyl.

Value are represented as mean ±2 SD, medians, quartyl range (QR) and as 10 and 90 percentiles.

Analiza wpływu palenia papierosów na zawartość komórek zapalnych w indukowanej płwocinie wykazała istotne znaczenie tego czynnika, niezależnie od faktu czy osoby badane paliły aktualnie lub w przeszłości. Stwierdzono, że indukowana płwocina osób palących papierosy (aktualnie lub w przeszłości) w porównaniu do osób niepalących charakteryzowała się znamienne podwyższoną: całkowitą liczbą wszystkich komórek (p=0,006), w tym także makrofagów (p=0,04), neutrofilów (p=0,01) i eozynofiliów (p=0,02) oraz zmniejszonym odsetkiem limfocytów (p=0,0003) (Tab. II).

Czynnikiem istotnie modyfikującym skład komórek w indukowanej płwocinie okazał się wiek badanych. Stwierdzono dodatnią korelację pomiędzy wiekiem a: odsetkiem neutrofilów (r=0,35; p=0,001), liczbą neutrofilów (r=0,40, p=0,0002) i liczbą eozynofiliów (r=0,36, p=0,0009). Ponadto występowała ujemna korelacja pomiędzy wiekiem a odsetkiem makrofagów (r=-0,36, p=0,001). (Ryc. 1a,b).

Tabela II. Rozkład komrek w płwocinie indukowanej u osób palących i nigdy niepalących.
Table II. Differential cells in induced sputum in smokers and never smokers.

	Palacze + byli palacze Smokers + ex smokers	Niepalący No smokers	Wartość p p value
n	38	47	
Całkowita l. komórek x 10 ⁶ /g Total cell count x 10 ⁶ /g	3,5 (0,22-11,5)	2,3 (0,43-10,9)	0,001
Makrofagi %	45,4 (11,3-80,7)	51,9 (13,5-87,9)	0,12
Neutrofile%	52,9 (17,3-87,5)	45,6 (9,8-86,5)	0,086
Eozynofile %	0,9 (0,0-3,3)	0,7 (0,0-6,7)	0,11
Limfocyty %	1,09 (0,0-4,5)	1,8 (0,0-7,0)	0,0003
Makrofagi x10 ⁶ /g	1,39 (0,15-4,31)	0,99 (0,19-4,29)	0,044
Neutrofile x10 ⁶ /g	2,03 (0,06-9,39)	1,42 (0,09-8,61)	0,011
Eozynofile x10 ⁶ /g	0,04 (0,00-0,30)	0,02 (0,00-0,13)	0,022
Limfocyty x10 ⁶ /g	0,03 (0,00-0,18)	0,03 (0,00-0,14)	0,085

Wartości wyrażono w postaci średnich, w nawiasach podano zakresy.
Value are expressed as mean with ranges.

18 osób miała więcej niż 87,2% neutrofilów. Wyniki naszej pracy wskazują, więc że określenie odsetka neutrofilów w płwocinie u chorych na POChP ma marginalne znaczenie w diagnostyce klinicznej tego schorzenia.

W praktyce klinicznej badanie indukowanej płwociny wykonuje się najczęściej w diagnostyce astmy oskrzelowej w celu określenia odsetka eozynofilów. Z naszych własnych badań wynika, że odsetek eozynofilów w płwocinie u chorych na astmę oskrzelową może być bardzo wysoki – mediana 27,3%, zakres od 3-80% [19]. Natomiast u osób zdrowych maksymalny odsetek tych komórek wynosił w naszej pracy tylko 6% przy średniej wartości 0,8%. W próbkach trzydziestu procent badanych, eozynofile w ogóle nie występowały. Górny zakres normy dla odsetka eozynofilów w płwocinie osób zdrowych w populacji polskiej wyniósł 4,8%. Oznacza to, że w przypadku podejrzenia astmy oskrzelowej stwierdzenie wyższych wartości eozynofilów w płwocinie z dużym prawdopodobieństwem potwierdza to rozpoznanie.

Wartość określenia odsetka innych komórek w indukowanej płwocinie – makrofagów lub limfocytów jest mała. W przypadku makrofagów wynika to z faktu, że odsetek tych komórek w płwocinie odzwierciedla zmiany dotyczące neutrofilów. Dla przykładu u chorych na POChP stwierdza się najczęściej wzrost odsetka neutrofilów, co wiąże się z kolei ze zmniejszeniem odsetka makrofagów. Natomiast niska wartość diagnostyczna oznaczania liczby lub odsetka limfocytów w płwocinie wynika z małej powtarzalności tego pomiaru [17].

Do badania kwalifikowaliśmy osoby zdrowe. W przeciwieństwie do naszego badania Belda i wsp. oraz Spanavello i wsp. [12,13] wykluczali z badania osoby palące. W naszym badaniu nie było takich ograniczeń, gdyż uważamy, że osoby palące mogą być jednocześnie zdrowe. Inną różnicę stanowił wiek chorych. Średni wiek osób przez nas badanych (44 ± 15 lat) był wyższy od średniej wieku populacji zbadanej przez Spavanello i wsp. (38 ± 13 lat) oraz Belda i wsp. (36 lat). Te odmienności mogą leżeć u podłoża nieco wyższej liczebności neutrofilów w płwocinie w naszym badaniu.

Osoby palące mają, zatem w płwocinie więcej neutrofilów i makrofagów, ale ponieważ wzrost ten jest niemal równomierny, dlatego nie obserwowano wpływu palenia na skład odsetkowy tych komórek. Jedynym wyjątkiem był spadek odsetka limfocytów u osób palących papierosy, co przy braku różnic dotyczących ich całkowitej liczby w płwocinie, wskazuje na wtórny charakter tego zjawiska wynikający ze wzrostu liczebności pozostałych komórek.

Rycina 1. Zależność liczby neutrofilów (a) i eozynofilów (b) w 1g płwociny od wieku.

Figure 1. Relationship the counts of neutrophils(a) and eosinophils (b) in 1g sputum and age.

Dyskusja

Nasze badanie po raz pierwszy w Polsce przedstawia wyniki składu komórkowego indukowanej płwociny w dużej grupie osób zdrowych. Dane te dotyczą mieszkańców Górnej Śląska.

Neutrofile obok makrofagów należą do komórek najliczniej występujących w indukowanej płwocinie, nie tylko chorych na POChP lub PZO, ale też osób zdrowych, co potwierdza nasza praca (średnia dla neutrofilów wynosiła 48,5%). Odsetek neutrofilów w indukowanej płwocinie u chorych na POChP jest z reguły wyższy. W jednej z naszych prac mediana dla odsetka neutrofilów w płwocinie chorych na POChP wynosiła 77,4% [18]. Jednak u 2 spośród 18 chorych włączonych do cytowanego badania, odsetek neutrofilów był niższy niż średni odsetek dla osób zdrowych. Bardziej istotne dla określenia przydatności w diagnostyce klinicznej pomiaru odsetka neutrofilów w płwocinie było określenie zakresu norm dla tego parametru, który okazał się bardzo szeroki 9,6-87,2%. We wspomnianej uprzednio pracy większość chorych na POChP miała 70-85% neutrofilów w płwocinie, a tylko jedna spośród

Przy interpretacji wyników badania indukowanej płwociny oprócz wywiadu dotyczącego palenia papierosów, istotne znaczenie ma wiek chorych. Analiza korelacji wskazuje, że u osób w starszym wieku wzrasta liczebność neutrofilów oraz eozynofilów oraz wtórnie (jako odzwierciedlenie wzrostu neutrofilów) zmniejsza się odsetek makrofagów.

Piśmiennictwo

1. Brightling C. E. i wsp. Induced sputum and other outcome measures in chronic obstructive pulmonary disease: safety and repeatability. *Respir. Med.* 2001, 95, 999-1002. 3
2. Tarodo de la Fuente P. i wsp. Safety of inducing sputum in patients with asthma of varying severity. *Am J Respir Crit Care Med* 1998, 157, 1127-1130.
3. Beeh K. M. i wsp. Long – term repeatability of induced sputum cells and inflammatory markers in stable, moderately severe COPD. *Chest* 2003, 123, 778-783.
4. Spanavello A. i wsp. Induced sputum to assess airway inflammation: a study of reproducibility. *Clin Exp Allergy* 1997, 27, 1138-1144.
5. Erin E. M., Barnest P. J., Hansel T. T. Optimizing sputum methodology. *Clin Exp Allergy* 2002, 32, 653-657.
6. Lemiere C. i wsp. Diagnosing of occupational asthma: use of induced sputum. *Eur Respir J* 1999, 13, 482-488.
7. Djukanovic R. Induced sputum-a tool with great potential but not with problems. *J Allergy Clin Immunol.* 2000, 105, 1071-1073.
8. Pizzichini E. i wsp. Sputum eosinophilia predicts benefit from prednisone in smokers with chronic obstructive bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998, 158, 1511-1517.
9. Brightling C. E., Pavord I. D. Eosinophilic bronhitis – what is it and why is it important. *Clin Exp Allergy* 2000, 30, 4-6.
10. Barczyk A. i wsp. Decreased levels of myeloperoxidase in induced sputum of COPD patients after oral glucocorticoids treatment. *Chest* 2004, 126, 389-393.
11. Erin E. M., Barnest P. J., Hansel T. T. Optimizing sputum methodology. *Clin Exp Allergy* 2002, 32, 653-657.
12. Belda J. i wsp. Induced sputum cell counts in healthy adults. *Am J Respir Crit Care Med* 2000, 161, 475-478.
13. Spanavello A. i wsp. Induced sputum cellularity. Reference values and distribution in normal volunteers. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000, 162, 1172-1174.
14. Sterk P. J. 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 Statment of the European Respiratory Society. *Eur Respir J* 1993, 16, 53-83.
15. Pepys J., Bernstein I.L. The modified skin prick test. XII International Congress of Immunology. Washington, D. C. 1985.
16. Pavord I. D. i wsp. The use of induced sputum to investigate airway inflammation. *Thorax* 1997, 52, 498-501.
17. Popov T. A. i wsp. The evaluation of a cell dispersion method of sputum examination. *Clin Exp Allergy* 1994, 24, 778-783.
18. Barczyk A., Pierzchała W., Sozańska E. Stężenie CC-chemokina (MCP-1, MIP-1A, MIP-1B) w indukowanej płwocinie u chorych na przewlekłą obturacyjną chorobę płuc i u chorych na przewlekłe zapalenie oskrzeli. *Pneumonol Alergol Pol.* 2001, 69, 40-49.
19. Barczyk A., Pierzchała W., Sozańska E. Interleukin-17 in sputum correlates with airway hyperresponsiveness to methacholine. *Respiratory Medicine* 2003, 97, 726-733.

Wpłynęła: 24.05.2005 r.

Adres: Klinika Pneumonologii Śląskiej AM, ul., Medyków 14, 40-752 Katowice