

Wartość diagnostyczna oznaczeń białka kationowego eozynofilów (ECP) oraz mieloperoksydazy neutrofilów (MPO) w przebiegu odczynów bronchospastycznych u dzieci

ALINA PUCHNAREWICZ, JOLANTA TOBOLCZYK, ANNA PŁOSZCZUK, JERZY HOFMAN

Zakład Alergologii Dziecięcej Akademii Medycznej, ul. J. Waszyngtona 17, 15-274 Białystok

Celem przedstawionej pracy była ocena przydatności oznaczania stężeń białka kationowego eozynofilów (ECP) oraz mieloperoksydazy neutrofilów (MPO) w surowicy krwi, w celu różnicowania podłoża odczynów bronchospastycznych u dzieci.

Badania wykonano w grupie 47 dzieci chorych, wśród których było 20 dzieci z atopową astmą oskrzelową umiarkowaną (AOI), 10 dzieci z astmą oskrzelową epizodyczną (AOII), 17 dzieci z nawracającymi zakażeniami dróg oddechowych (NZDO). Rozpoznanie ustalono na podstawie ogólnie przyjętych kryteriów WHO. Stężenie ECP i MPO oznaczono metodą radioimmunologiczną (Pharmacia LKB), wyniki wyrażano w $\mu\text{g/L}$.

Wyniki badań wykazały, że stężenie ECP było znamienne podwyższone w grupie AOI i NZDO w porównaniu z grupą kontrolną. Nie stwierdzono różnicy istotnej statystycznie pomiędzy AOI i AOII, a także AOI i NZDO. Znamienne wyższe stężenie MPO w surowicy stwierdzono w grupie AOI i NZDO w porównaniu z grupą kontrolną, a także w porównaniu AOI z NZDO. Różnica wartości stężeń MPO w AOI i AOII nie była istotna statystycznie. Badania nasze wskazują, że oznaczanie stężeń ECP i MPO wyłącznie w surowicy krwi nie stanowi obiektywnego kryterium diagnostycznego różnicującego odczyn bronchospastyczne.

WSTĘP

Choroby dróg oddechowych należą do najczęściej występujących w wieku rozwojowym. Stanowią one od 40-60% przyczyn zgłaszalności wszystkich dzieci do lekarza i są stale pierwszą przyczyną chorobowości szpitalnej (ok. 40% wszystkich hospitalizacji). Ta wysoka częstość zachorowań wynika z odrębności strukturalno-czynnościowych oraz immunologicznych związanych z rozwojem i dojrzewaniem poszczególnych struktur układu oddechowego u dzieci. Istotną rolę odgrywają również uwarunkowania genetyczne (np. rodzinne obciążenie alergią) oraz przebyte, zwłaszcza w okresie wczesnoniemowlęcym, zakażenia układu oddechowego.

Nawracające zakażenia układu oddechowego, na skutek naruszenia ciągłości błony śluzowej wyścielającej drogi oddechowe, predysponują do wyzwalania procesów alergizacji. Penetracja alergenów środowiskowych, narastanie odpowiedzi immunologicznej sprzyja nawrotowemu charakterowi oraz przewlekaniu się niepokojących objawów klinicznych u dzieci.

Mechanizmy patogenetyczne związane z zakażeniem układu oddechowego i procesem alergicznym obejmującym ten układ są różne. Niemniej cały szereg mechanizmów zachodzących w zmienionej zapalnie błonie śluzowej, wykazuje cechy wspólne w obu stanach chorobowych.

W patogenezie astmy oskrzelowej podkreśla się rolę procesu zapalnego z udziałem limfocytów i eozynofilów [1,2,3]. Zwrócenie uwagi na prozapalne właściwości komórek kwasochłonnych przyczyniło się do wykrycia w ziarnistościach tych krwinek licznych substancji czynnych, m.in. białka kationowego eozynofilów (ECP) [4,5]. Z obserwacji klinicznych wiadomo, że zakażenia dróg oddechowych mogą poprzedzać rozwój lub zaostrzać przebieg astmy oskrzelowej [6,7], a więc zapaleniu alergicznemu może towarzyszyć zakażenie bakteryjne z naciekiem tkanek przez granulocyty obojętnochłonne. Od dawna poszukuje się swoistych markerów, które mogłyby być przydatne nie tylko w rozpoznawaniu i monitorowaniu procesu zapalnego ale też umożliwiłyby ocenę stopnia udziału nieswoistego procesu zapalnego oraz procesu alergicznego w obserwowanych objawach klinicznych. Szczególnie u dzieci, u których niektóre badania specjalistyczne, np. pobranie materiału z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego (BAL), są bardzo trudne do wykonania, oznaczenie takich markerów w surowicy krwi byłoby pomocne w monitorowaniu stanu zapalnego oraz wdrożeniu prawidłowego leczenia.

CEL PRACY

Celem pracy była ocena przydatności oznaczania stężeń białka kationowego eozynofilów (ECP) i mieloperoksydazy neutrofilów (MPO) w surowicy krwi w celu różnicowania podłoża odczynów spastycznych u dzieci z astmą oskrzelową atopową o przebiegu umiarkowanym i epizodycznym, oraz u dzieci z nawracającymi zakażeniami dróg oddechowych, którym towarzyszyła obturacja drzewa oskrzelowego (u których nie wykazano istnienia reakcji alergicznych typu I wg Gella-Coombsa).

PACJENCI I METODY

Badania przeprowadzono u 47 dzieci, w wieku od 4 do 16 lat (średnia $8,3 \pm 3,6$ lat), które podzielono na grupy:

Grupę I - stanowiło 20 dzieci z atopową astmą oskrzelową o przebiegu umiarkowanym (AO I) w wieku od 4 do 16 lat (średnia $8,6 \pm 3,9$ lat), średni czas trwania choroby - 3,9 lat.

Do grupy II zakwalifikowano 10 dzieci z atopową astmą oskrzelową epizodyczną (AO II) w wieku od 5 do 16 lat (średnia wieku $9,1 \pm 3,4$), średni czas trwania choroby wynosił 4,8 lat.

Grupę III - stanowiło 17 dzieci w wieku od 4 do 14 lat (średnia $7,4 \pm 3,6$) z nawracającymi zakażeniami dróg oddechowych (NZDO) (powyżej 6 epizodów w ciągu roku) z odczynem spastycznym, w okresie zaostrzenia choroby. U dzieci z tej grupy testy skórne wypadły ujemnie a wartości stężenia całkowitej IgE nie odbiegały od przyjętych norm wiekowych.

U wszystkich badanych dzieci wykluczono infestację pasożytami oraz odplyw żołądkowo-przełykowy.

Grupę kontrolną (K) stanowiło 10 dzieci zdrowych w wieku od 4 do 13 lat (średnia $6,7 \pm 3,09$ lat) nie obciążonych chorobami alergicznymi, ani przebytymi chorobami zakaźnymi.

Rozpoznanie atopowej astmy oskrzelowej ustalono w oparciu o obowiązujące kryteria takie jak: dodatnie testy skórne z alergenami wziewnymi (firma Smith Kline Beecham Bencard - Wielka Brytania), podwyższone wartości stężeń całkowitej IgE i alergenowo-swoistych przeciwciał IgE w surowicy krwi (metoda fluorometryczna, odczynniki firmy BioWhittaker - USA). U wszystkich dzieci obliczono eozynofilię bezwzględną, wykonano badania spirometryczne oraz dokonano szczegółowej analizy danych uzyskanych z wywiadu chorobowego i badania przedmiotowego. Stopień ciężkości astmy ustalono w oparciu o Raport NHLBI/WHO [8].

W okresie 3 miesięcy przed hospitalizacją pacjenci nie przyjmowali leków sterydowych ani antybiotyków, a krew do badań diagnostycznych

pobrano przed włączeniem leczenia. Pacjenci z astmą oskrzelową epizodyczną, poza sporadycznymi inhalacjami β_2 -sympatykomimetyków, nie otrzymywali żadnych leków w okresie 6 miesięcy poprzedzających hospitalizację.

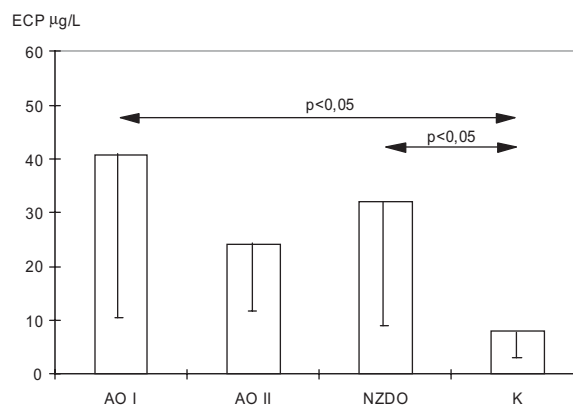
Białko kationowe eozynofilów (ECP) oraz mieloperoksydazę granulocytów obojętnochłonnych (MPO) w surowicy oznaczano metodą radioimmunologiczną zgodnie z zaleceniami producenta (Pharmacia LKB), wyniki wyrażano w mikrogramach na liter ($\mu\text{g/L}$).

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej. Obliczono średnie i odchylenia standardowe. Porównanie średnich wykonano testem T dla prób niezależnych. Współczynnik korelacji pomiędzy poszczególnymi grupami wg Spearman'a. Przyjęto poziom istotności statystycznej $p < 0,05$.

WYNIKI

U wszystkich pacjentów wykazano słabą, ale istotną znamienne korelację między stężeniem ECP a stężeniem IgE całkowitej w surowicy krwi ($p < 0,05$; $R=0,293$) oraz eozynofilią bezwzględną ($p < 0,05$; $R=0,382$).

Średnie stężenie ECP w surowicy w poszczególnych grupach badanych dzieci przedstawia rycina 1.

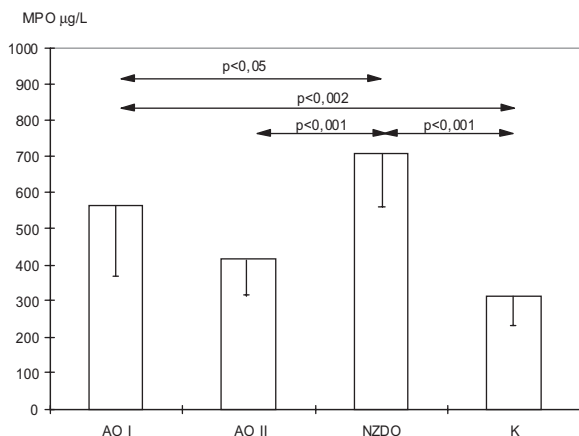


Ryc. 1 Stężenia ECP w surowicy krwi w badanych grupach
 AO I - grupa z astmą oskrzelową o przebiegu umiarkowanym,
 AO II - grupa z astmą oskrzelową epizodyczną,
 NZDO - grupa z nawracającymi zakażeniami dróg oddechowych,
 K - grupa kontrolna.

Średnie stężenie ECP w grupie chorych na astmę oskrzelową umiarkowaną (AOI) wynosiło $40,71 \pm 29,11 \mu\text{g/L}$, na astmę oskrzelową epizodyczną (AOII) - $24,11 \pm 15,5 \mu\text{g/L}$. Różnice wartości stężeń ECP w tych grupach chorych nie były istotne statystycznie.

Stężenie ECP w grupie AOI, jak również w grupie dzieci z NZDO ($32,1 \pm 26,4 \mu\text{g/L}$) było znamienne wyższe w porównaniu z grupą kontrolną (K) ($7,99 \pm 3,7 \mu\text{g/L}$) ($p < 0,05$). Nie było natomiast znamiennej różnicy między stężeniem ECP w grupie AOI i NZDO.

Rycina 2 przedstawia średnie stężenie MPO w surowicy w badanych grupach dzieci.

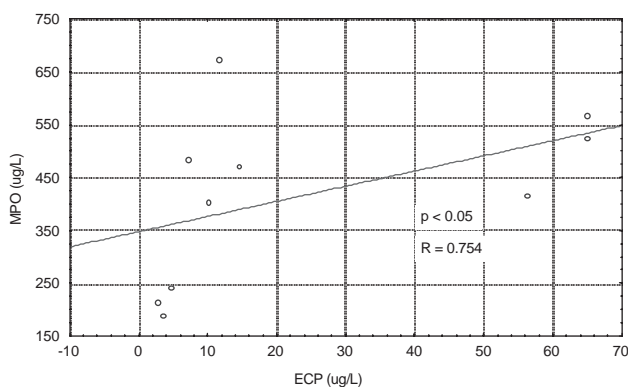


Ryc. 2 Stężenia MPO w surowicy krwi w badanych grupach dzieci. Oznakowanie grup jak na ryc. 1.

We wszystkich grupach dzieci chorych wykazano znamienne wyższe stężenie MPO, szczególnie w porównaniu AOI ($565 \pm 216,67 \mu\text{g/L}$) i NZDO ($707,47 \pm 157,65 \mu\text{g/L}$) z grupą kontrolną ($311,7 \pm 117,2 \mu\text{g/L}$) ($p < 0,001$). Istnieje też znamienna różnica między stężeniem MPO w AOI i NZDO ($p < 0,05$).

Średnie stężenia MPO w surowicy chorych na astmę oskrzelową epizodyczną (AOII) były niższe ($416 \pm 160 \mu\text{g/L}$) w porównaniu ze średnim stężeniem tego białka w surowicy chorych na astmę oskrzelową umiarkowaną (AOI). Różnica wartości stężeń MPO w obu grupach dzieci chorych na astmę oskrzelową (AOI i AOII) nie była istotna statystycznie.

Na kolejnych rycinach przedstawiono korelację pomiędzy stężeniami MPO i ECP w badanych grupach dzieci chorych.

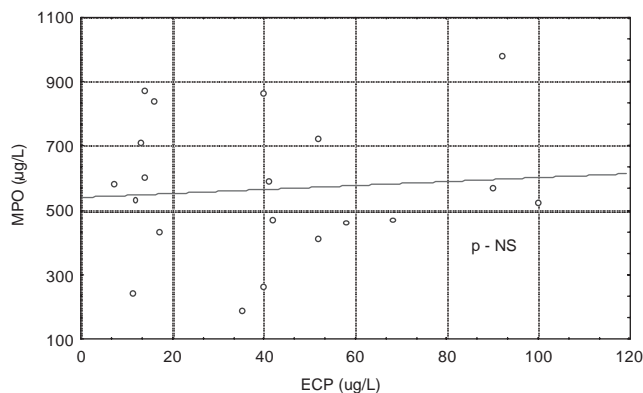


Ryc. 3 Korelacja stężeń ECP i MPO w surowicy krwi dzieci z astmą epizodyczną

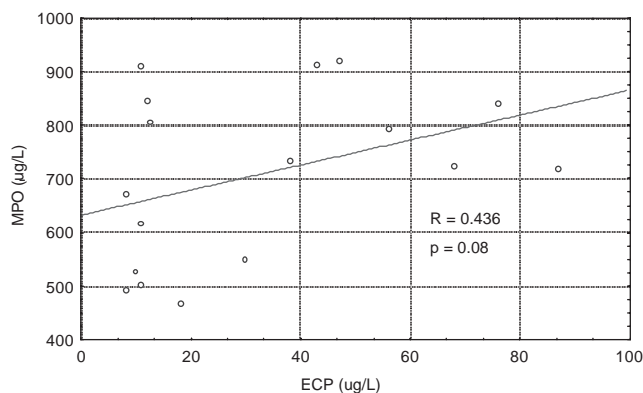
Jak wynika z ryciny 3 w grupie pacjentów z astmą oskrzelową epizodyczną istnieje znamienna korelacja surowicznych stężeń ECP i MPO ($p < 0,05$; $R = 0,754$).

W pozostałych dwóch grupach dzieci chorych nie stwierdzono takiej zależności, co obrazuje rycina 4 (dla dzieci chorych na astmę oskrzelową umiarkowaną)

oraz rycina 5 (dla dzieci chorych na nawracające zakażenia dróg oddechowych).



Ryc. 4 Korelacja stężeń ECP i MPO w surowicy krwi dzieci z astmą umiarkowaną



Ryc. 5 Korelacja stężeń ECP i MPO w surowicy krwi dzieci z nawracającymi zakażeniami dróg oddechowych

Omówienie

Reakcje IgE-zależne mogą prowadzić do powstania zapalenia przewlekłego, w którym granulocyty kwasochłonne, obdarzone właściwościami uwalniania licznych substancji o charakterze prozapalnym i cytotoksycznym, odgrywają zasadniczą rolę [4].

Stąd też fakt stwierdzenia w naszych badaniach korelacji pomiędzy stężeniem ECP, eozynofilią i stężeniem IgE całkowitej w surowicy krwi dzieci chorych na atopową astmę oskrzelową wydaje się być zrozumiałą. Istnieje jednak wiele kontrowersji co do przydatności oznaczania stężeń ECP w surowicy krwi, jako markera aktywności zapalenia alergicznego m.in. w przebiegu astmy oskrzelowej [2,9,10,11,12].

Według niektórych autorów liczba eozynofilów i stężenie ECP koreluje ze stanem klinicznym pacjentów cierpiących z powodu astmy [9,10]. Podwyższone stężenie ECP stwierdzano nie tylko w surowicy krwi, ale też w wydzielinie uzyskanej z oskrzeli i nosa chorych w czasie napadu astmy [2]. Virchow i wsp. stwierdzają istotną korelację pomiędzy stężeniami ECP w surowicy krwi i stopniem ciężkości astmy, pomimo słabej korelacji pomiędzy stężeniami ECP w płwocinie i surowicy [11].

Badania Hedlina sugerują, że ECP jest odzwierciedleniem przewlekłej fazy alergicznego zapalenia [12].

Wyniki naszych badań wykazały znacznie wyższe stężenie ECP w surowicy krwi dzieci chorych na astmę oskrzelową w porównaniu z grupą kontrolną, ale średnie wartości stężeń ECP w surowicy nie różniły się istotnie statystycznie w grupach dzieci chorych na astmę oskrzelową umiarkowaną i epizodyczną.

Jak wykazały badania Adelroth i wsp. stężenie ECP w surowicy krwi koreluje ze stężeniem w wydzielinie z oskrzeli (BAL) u tego samego chorego [1]. Stwierdza się również wyraźną korelację pomiędzy liczbą eozynofiliów i stężeniem ECP w BAL z jednej strony i ciężkością astmy z drugiej [2].

Istnieją jednak zasadnicze różnice pomiędzy pomiarem ECP w płynie BAL i surowicy. W BAL przeważająca część ECP pochodzi z ziarnistości aktywowanych eozynofiliów i jest wydzielona przed pobraniem płynu do badania [5]. W surowicy spora ilość ECP jest wydzielona w czasie procesu wykrzepiania [5]. Tak więc stężenie ECP w surowicy zależy od wielu czynników, do których zalicza się m.in.: czas pobrania krwi do badania, temperaturę otoczenia, liczbę eozynofiliów, stopień aktywacji komórek krwi (np. monocytów, limfocytów) i prawdopodobnie innych czynników zawartych w plazmie [5]. Stąd też, według niektórych autorów, stężenie ECP w surowicy krwi nie jest dobrym testem do oceny fazy zapalenia (ostra czy przewlekła) i nie powinno być podstawą do modyfikacji sposobu leczenia [13,14].

Niezwykle ciekawe jest stwierdzenie przez nas znamiennego podwyższenia stężenia ECP także w grupie chorych na nawracające zakażenia dróg oddechowych w porównaniu z grupą kontrolną. W tej grupie pacjentów, pomimo objawów bronchospastycznych, nie potwierdziliśmy istnienia reakcji IgE-zależnych. Nie można jednak wykluczyć astmy o innym podłożu patogenetycznym.

We wszystkich grupach badanych dzieci wykazaliśmy również znamienne podwyższenie stężenia MPO w surowicy krwi, szczególnie, gdy porównano dzieci chore na astmę oskrzelową umiarkowaną (AOI) i epizodyczną (AOII) z dziećmi cierpiącymi z powodu

nawracających zakażeń dróg oddechowych (NZDO). Potwierdza to znany fakt udziału czynników infekcyjnych w zaostrzeniach astmy oskrzelowej [6,7,15,16].

Kristjansson i wsp. stwierdzili wzrost zarówno stężenia ECP jak i MPO u dzieci chorych na astmę oskrzelową, przy czym stężenia tych białek w surowicy były znacznie wyższe u chorych leczonych jedynie β_2 -agonistami [17]. Jak wynika z obserwacji Juntunen-Backman, prawidłowe wartości ECP obserwuje się u chorych leczonych sterydami wziewnymi [18]. Wykazano również że stężenie MPO w surowicy krwi, pozostaje w granicach normy u chorych na astmę oskrzelową leczonych sterydami dłużej niż 2 miesiące [17]. Zwraca uwagę fakt, że badania wykonane w trakcie podawania Intalu, nie wykazują normalizacji stężenia ECP w surowicy po 6-ciu tygodniach kuracji [18].

Na podstawie uzyskanych wyników badań wydaje się, że podwyższone stężenie ECP i MPO w surowicy świadczy jedynie o udziale eozynofiliów i neutrofilów w patogenezie odczynu zapalnego. Białka te, oznaczone wyłącznie w surowicy, nie stanowią obiektywnego kryterium diagnostycznego różnicującego odczynu bronchospastyczne. Konieczne jest wyeliminowanie udziału czynników nieswoiście podwyższających stężenie tych białek w surowicy, a także oznaczenie jednocześnie stężenia ECP i MPO w innych płynach ustrojowych. Niezbędne są bardzo skrupulatne badania bakteriologiczne i wirusologiczne, umożliwiające potwierdzenie bądź wykluczenie udziału czynnika infekcyjnego w patogenezie zaostrzeń procesu chorobowego u pacjentów z astmą oskrzelową atopową i nieatopową.

Reasumując, stwierdzono podwyższone stężenie ECP i MPO w surowicy, zarówno w grupie dzieci chorych na astmę oskrzelową, jak i na nawracające zakażenia dróg oddechowych z odczynem spastycznym. Przemawia to za złożonym mechanizmem zapalnym, pomimo różnych czynników inicjujących te procesy chorobowe. Stężenie ECP i MPO w surowicy nie stanowi zatem obiektywnego kryterium diagnostycznego różnicującego odczynu bronchospastyczne.

Piśmiennictwo

1. Adelroth E., Rosenhall L., Johansson S.A., Linden M., Venge P.: Inflammatory cells and eosinophils activity in asthmatic investigated by bronchoalveolar lavage. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1990;142: 91-99.
2. Bousquet J., Chanaz P., Lacoste J.Y. i wsp.: Eosinophilic inflammation in asthma. *N.Engl.J.Med.* 1990; 323: 1033-9.
3. Kay A.B., Durham S.R.: T-lymphocytes, allergy and asthma. *Clin.Exp. Allergy* 1991; 21(supl. 1): 17-23.
4. Romański B.: Eozynofil - tajemniczy symbol procesów alergicznych. *Pneumonol.Alergol.Pol.* 1994; 62, 7-8: 335-343.
5. Venge P.: Serum measurements of eosinophil cationic protein (ECP) in bronchial asthma. *Clin. Exp. Allergy*, 1993; 23, (supl.2): 3-7.
6. Norn S.: Bacteria and their products release histamine and potentiate mediator release: new aspects in airway diseases. *Eur.J.Respir.Dis.* 1986; 69: 230-236.

7. Pauwels R., Verschragen G., Van der Straeten M.: IgE antibodies to bacteria in patients with bronchial asthma. *Allergy* 1980; 35: 665-669.
8. Ogólnoświatowa strategia leczenia astmy oskrzelowej i jej prewencji. Raport NHLBI/WHO. National Institutes of Health. National Heart, Lung, and Blood Institute. Publication Number 95-3659, January 1995.
9. Griffin E., Hakansson L., Formgren H. i wsp.: Blood eosinophil number and activity in relation to lung function in patient with asthma and eosinophilia. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1991; 87: 548-57.
10. Hakansson L., Carlsson M., Stalenheim G. i wsp.: Migratory responses of eosinophil and neutrophil granulocytes from asthmatic patients. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1990; 85: 743-50.
11. Virchow I.C., Holscher U., Virchow C.: Sputum ECP levels correlate with parameters of airflow obstruction. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1992; 146: 604-606.
12. Hedlin G., Ahlstedt S., Enander I. i wsp.: Eosinophil cationic protein (ECP), eosinophil chemotactic activity (ECA), neutrophil chemotactic activity (NCA) and tryptase in serum before and during bronchial challenge in cat-allergic children with asthma. *Pediatr. Allergy Immunol.* 1992; 3: 144-149.
13. Ferguson A.C., Withelaw M., Brown H. i wsp.: Correlation of bronchial eosinophil and mast cell activation with bronchial hyperresponsiveness in children with asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1992; 90: 609-13.
14. Ferguson A.C., Vaughan R., Brown H. i wsp.: Evaluation of serum eosinophilic cationic protein as a marker of disease activity in chronic asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1995; 1: 23-28.
15. Kroczyńska-Bednarek J., Kuna P., Roźniecki P.: Rola wirusowych zakażeń dróg oddechowych w patogenezie astmy oskrzelowej. I. Badania kliniczne i doświadczalne. *Pneumonol. Alergol. Pol.* 1995; 63, 9-10: 566-569.
16. Kroczyńska-Bednarek J., Kuna P., Roźniecki J.: Rola wirusowych zakażeń dróg oddechowych w patogenezie astmy oskrzelowej. II. Wpływ na układ immunologiczny. *Pneumonol. Alergol. Pol.* 1995; 63, 9-10: 570-576.
17. Kristjánsson S., Shimizu T., Strannegard IL. i wsp.: Eosinophil cationic protein, myeloperoxidase and tryptase in children with asthma and atopic dermatitis. *Pediatr. Allergy Immunol.* 1994; 5: 223-229.
18. Juntunen-Backman K., Järvinen P., Sorva R.: Serum eosinophil cationic protein during treatment of asthma in children. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1993; 92: 34-38.

Diagnostic value of serum measurements of eosinophil cationic protein and myeloperoxidase in children with bronchial hyperresponsiveness

ALINA PUCHNAREWICZ, JOLANTA TOBOLCZYK, ANNA PŁOSZCZUK, JERZY HOFMAN

Summary

Atopic bronchial asthma is a chronic inflammatory disease in which lymphocytes and eosinophils are involved. On the other hand recurrent bacterial infections bronchitis is associated with a bronchospastic component.

In this situation the "specific markers" for "allergic" and "non-allergic" inflammation was investigated. The aim of the study were to evaluate the relation between eosinophil cationic protein (ECP) the "marker of allergic response" and myeloperoxidase (MPO) the "marker of non-allergic response".

The study included 47 children: 20 with chronic mild bronchial asthma (BA I), 10 with episodic atopic bronchial asthma (BA II) and 17 with recurrent infections of respiratory tract (RIRT). Serum levels of ECP and MPO were determined by radioimmunoassay (RIA, Pharmacia).

ECP level was significantly elevated in BA I and RIRT groups in comparison with control group, but without significant changes between BA I, BA II, and RIRT groups.

The MPO concentrations was significantly elevated in BA I and RIRT in comparison with control group, and the levels in RIRT group was significantly higher as compared to BA I and BA II groups.

Our investigations showed that measuring ECP and MPO in serum only, are unsatisfactory criterions in diagnosis bronchospastic syndrome in children, and specificity of ECP as "allergic inflammation" and MPO as "non-specific marker" should be further investigated.