

Ocena korelacji między liczbą komórek kwasochłonnych w nacieku zapalnym błony śluzowej żołądka a stężeniem interleukiny 5 w surowicy krwi chorych z alergią pokarmową

ZBIGNIEW BARTUZI, BOGDAN ROMAŃSKI, MAGDALENA ŻBIKOWSKA-GÖTZ

Katedra i Klinika Alergologii i Chorób Wewnętrznych Akademii Medycznej, ul. Ujejskiego 75, 85-168 Bydgoszcz

Celem pracy było określenie poziomu IL 5 u chorych z alergią pokarmową i przewlekłymi zapaleniami żołądka oraz porównanie jej poziomu w zależności od rodzaju nacieku komórkowego błony śluzowej żołądka oraz braku lub obecności *Helicobacter pylori*.

Badaniami objęto grupę 34 chorych z alergią pokarmową zgłaszających dolegliwości dyspeptyczne. U wszystkich chorych wykonano badanie endoskopowe górnego odcinka przewodu pokarmowego, weryfikację histopatologiczną pobranych wycinków błony śluzowej żołądka i ocenę obecności *Helicobacter pylori*. Ilościową ocenę stężenia IL-5 w surowicy krwi przeprowadzono techniką immunoenzymatyczną ELISA.

U 32 pacjentów w badaniu endoskopowym i histopatologicznym stwierdzono przewlekły nieżyt błony śluzowej żołądka. Nacieki komórkowy złożony z komórek wielo- i jednojądrzastych świadczący o aktywnym procesie zapalnym stwierdzono w 9 przypadkach. W 18 z 32 próbek stwierdzono obecność *Helicobacter pylori*. W nacieku komórkowym stwierdzono we wszystkich biopsjach obecność komórek kwasochłonnych, w tym u 24 na 32 - w postaci nacieków. Całkowity poziom IL 5 był podwyższony u 24 pacjentów. W grupie chorych z naciekami z komórek kwasochłonnych poziom IL 5 był podwyższony u 23 chorych, natomiast u chorych bez nacieku eozynofilowego w 1 na 8 przypadków.

Przeprowadzone badania wskazują na znaczenie wydzielania IL 5 w rozwoju nacieku zapalnego u chorych z przewlekłymi zapaleniami żołądka i alergią pokarmową. W badanej grupie chorych wysoki poziom IL-5 dobrze korelował z obecnością komórek kwasochłonnych w nacieku zapalnym.

Od bardzo dawna wiadomo, że komórki kwasochłonne są silnie powiązane z procesami alergicznymi i stanowią wysoce charakterystyczny symbol tych procesów [1]. U chorych wykazujących cechy atopii, nadwrażliwych na alergeny zewnątrzpochodne, wzrostowi stężenia IgE w surowicy towarzyszy zazwyczaj wzrost liczby eozynofiliów w krwi krążącej a z reguły można u nich spostrzegać akumulację tych komórek w tkankowych ogniskach zapalenia alergicznego na terenie dróg oddechowych i skóry [2,3,4]. Wspomniana akumulacja jest powodowana całą serią wydarzeń, w których uczestniczą komórki T i cytokiny [5].

Migracja eozynofiliów do narządów docelowych, w których reakcja alergenów ze swoistym IgE zapoczątkowała proces alergicznego zapalenia przebiega w kolejnych fazach: 1) łączenia i przylegania komórek do śródbłonna naczyńowego, 2) śródbłonkowej migracji i diapedezy, 3) chemotaksji. Proces ten jest sterowany przez interleukinę 5 (IL5) [6]. IL-5 jest wytwarzana głównie przez komórki T należące do podtypu TH2 i w mniejszym stopniu przez mastocyty i eozynofile [6,7]. IL-5 powoduje dojrzewanie eozynofiliów w szpiku,

oddziałuje na ich napływ do miejsca reakcji, chemotaksje i czas przeżycia, a ogólnie wywiera silne działanie prozapalne. Przypuszcza się przeto, że ta właśnie interleukina odgrywa centralną rolę w przypisywanych eozynofilom zapalnych uszkodzeniach tkanek. Dzięki badaniom przeprowadzonym w ostatnich latach wykazano wzrost IL-5 w surowicy krwi u chorych na astmę oskrzelową [8,9,10), alergiczny nieżyt nosa [11], atopowe zapalenie skóry [12] i obrzęk angioneurotyczny z eozynofilią [13].

W piśmiennictwie brak danych o zachowaniu się IL-5 u chorych ze skazą atopową i nieżytem żołądka cechującym się obecnością w błonie śluzowej nacieków komórek zapalnych składającym się w przeważającej liczbie z eozynofiliów. Nacieki takie stwierdzamy bardzo często u chorych wykazujących cechy atopii uczulonych na pokarmy [14].

Celem naszych obecnych badań była próba prześledzenia ewentualnej korelacji między liczbą komórek kwasochłonnych w nacieku zapalnym błony śluzowej żołądka a stężeniem interleukiny 5 w surowicy pacjentów uczulonych na pokarmy.

MATERIAŁ

Badaniami objęto grupę 34 chorych (20 kobiet i 14 mężczyzn) w wieku od 18 do 56 lat (średni wiek 41 lat) z udokumentowaną alergią pokarmową, będących pod kontrolą Naszej Poradni Alergologicznej. Wywiad wskazujący na związek między uczulającym alergenem a występowaniem objawów klinicznych, silnie dodatnie reakcje skórne na alergeny pokarmowe (PRICK test), badania immunologiczne (IgE całkowite i swoiste) pozwalały u nich rozpoznać alergię pokarmową. Warunkiem zakwalifikowania do badań była obecność dolegliwości bólowych w nadbrzuszu i objawów dyspeptycznych. U wszystkich chorych od kilku do kilkudziesięciu minut od spożycia uczulającego alergenu pokarmowego występowały silne dolegliwości ze strony przewodu pokarmowego w postaci bólów kurczowych brzucha, wymiotów, biegunek, wzdęć a także występowały u nich objawy wielonarządowe - wysypki o charakterze pokrzywkowym, obrzęk Quincke'go, duszność o charakterze astmatycznym czy wodnisty wyciek z nosa. Z badań wykluczono chorych przyjmujących w ostatnich 2 miesiącach leki antykoagulacyjne, antybakteryjne, leki steroidowe czy antyhistaminowe, a także chorych stosujących immunoterapię. Przeciwwskazaniem do zakwalifikowania do badań była obecność chorób serca, płuc, wątroby, resekcji żołądka a także stwierdzone w badaniu endoskopowym kandydioza przełyku lub/i żołądka. Wszyscy chorzy zostali szczegółowo poinformowani o celu i sposobie przeprowadzenia badań, na którą wyrazili pisemną zgodę.

METODYKA

U wszystkich chorych wykonano badanie endoskopowe górnego odcinka przewodu pokarmowego przy użyciu aparatu fiberoskopowego GIF-E OLYMPUS. W trakcie badania poddano ocenie makroskopowej wygląd błony śluzowej, jej czynności ruchowej i sekrecyjnej a także pobrano biopaty śluzówki do weryfikacji histopatologicznej i na obecność *Helicobacter pylori*. Przeprowadzono archiwizację uzyskanych obrazów metodą video. Wycinki pobierano z normalnej lub zapalnie zmienionej błony śluzowej żołądka (ale nie z nadżerek lub wrzodów) - z okolicy antralnej (2-krotnie) i trzonu (2-krotnie) - jego przedniej i tylnej ściany. Ocena histopatologiczna została przeprowadzona w Katedrze i Zakładzie Patomorfologii Akademii Medycznej w Bydgoszczy. Przekazywane do oceny histopatologicznej biopaty nie zawierały informacji o dolegliwościach chorego, wynikach badania endoskopowego i stężeniach stwierdzanych cytokin (IL5). Pobrane wycinki poddano barwieniu eozyną i hematoxyliną z modyfikacją Giemsa. Ocena obecności przewlekłego stanu zapalnego błony śluzowej żołądka, aktywności i stopnia jego zaawansowania oparta była na kryteriach z Sydney [15]. W ocenie histopatologicznej zwrócono szczególną uwagę na określenie morfologiczne rodzaju nacieku komórkowego.

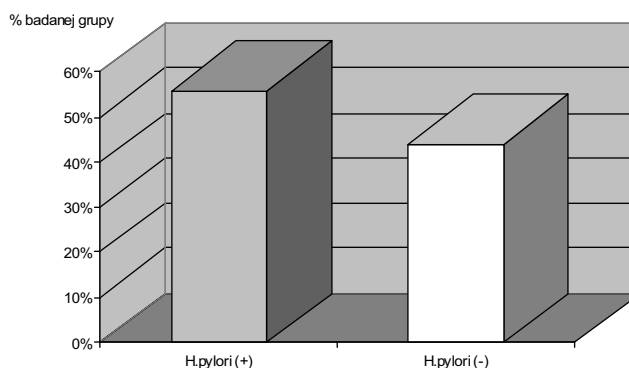
Obecność w nacieku komórkowym błony śluzowej żołądka 5-10 komórek kwasochłonnych (powiększenie 250 x) w polu widzenia kwalifikowano jako +, 10-20 eozynofiliów - ++, 21-30 +++ i powyżej 30 ++++ traktując w tym przypadku zmiany jako nacieki eozynofilowe. Obecność *Helicobacter pylori* stwierdzano przy użyciu metody histopatologicznej, tj. wybarwienia pobranych wycinków błony śluzowej żołądka eozyną i hematoxyliną z modyfikacją Giemsa.

U wszystkich chorych pobrano krew celem określenia stężenia interleukiny 5. Badanie przeprowadzono techniką immunoenzymatyczną na zestawach firmy ENDOGEN stosując czytnik Matertech 960 (czułość metody 1,0 pg/ml).

Uzyskane wyniki poddano ocenie statystycznej przy użyciu dokładnego testu Fischera dla tablicy czteropolowej.

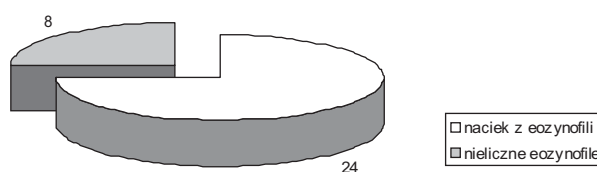
WYNIKI

U 34 chorych poddanych badaniu endoskopowemu w 32 przypadkach stwierdzono metodą histopatologiczną cechy przewlekłego stanu zapalnego błony śluzowej żołądka. U 18 stwierdzono kolonizację *Helicobacter pylori* (ryc.1)



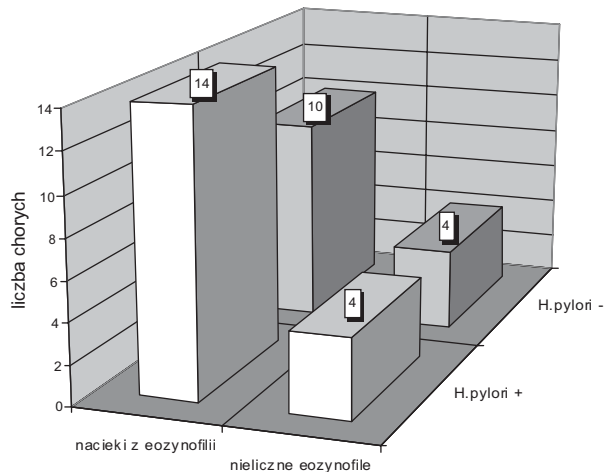
Ryc. 1. Ocena kolonizacji *Helicobacter pylori* w grupie chorych z alergią pokarmową i przewlekłymi nieżytami żołądka

Naciek komórkowy złożony z komórek wielojądrowych świadczący o aktywnym procesie zapalnym był stwierdzany w 9 przypadkach. Szczegółowa ocena morfologiczna składu nacieku komórkowego pozwoliła wykazać obecność we wszystkich zmienionych zapalnie biopatach komórki kwasochłonne - w tym u 24 w postaci nacieków (zgodnie z przyjętymi kryteriami ++++) - ryc.2.



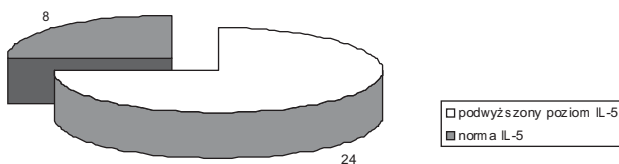
Ryc. 2. Obecność komórek kwasochłonnych w nacieku zapalnym błony śluzowej żołądka w grupie 32 chorych z alergią pokarmową

W grupie 18 chorych z obecnością kolonizacji bakteryjnej *Helicobacter pylori* naciek zapalny z dominacją komórek kwasochłonnych stwierdzano w 14 przypadkach zaś bez kolonizacji bakteryjnej u 10 chorych (ryc.3). Analiza statystyczna uzyskanych wyników (test Fischera, przy przyjęciu jako istotny poziom istotności $p < 0,05$) pozwoliła stwierdzić, że nie ma statystycznie istotnych różnic w częstości występowania nacieków eozynofilowych w grupie chorych z alergią pokarmową z kolonizacją i bez kolonizacji bakteryjnej *Helicobacter pylori*.



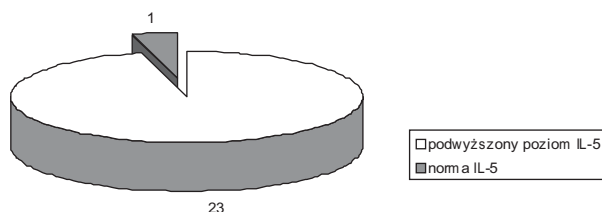
Ryc. 3. Obecność komórek kwasochłonnych w nacieku zapalnym błony śluzowej żołądka w zależności od braku lub obecności *Helicobacter pylori*

Stężenie interleukiny 5 było podwyższone powyżej 2,4pg/ml (wartości wykazane w grupie osób zdrowych 0,0-2,4 pg/ml) u 24, tj. 75% badanych chorych z przewlekłymi zapaleniami żołądka (ryc.4).



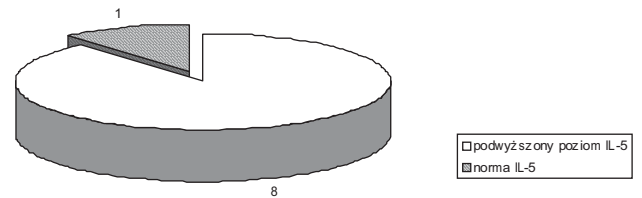
Ryc. 4. Ocena stężenia interleukiny 5 w surowicy krwi w grupie 32 chorych z przewlekłymi nieżytami żołądka i alergią pokarmową

W grupie chorych z dominacją w nacieku zapalnym komórek kwasochłonnych (24 przypadki) stężenie IL 5 było podwyższone znamienne u 23 osób (wartości wykazane w grupie osób zdrowych 0-2,4 pg/ml). Średnia uzyskana wartość wynosiła 11,9 pg/ml (ryc. 5a).



Ryc. 5a. Stężenie interleukiny 5 w grupie 24 chorych z dominacją w nacieku zapalnym komórek kwasochłonnych

U chorych, u których w badaniu histo-patologicznym nie stwierdzano dominacji w nacieku zapalnym błony śluzowej żołądka komórek kwasochłonnych w 1 na 8 przypadków stwierdzono podwyższone stężenie IL 5, tj. 4,6 pg/ml (ryc 5b).



Ryc. 5b. Stężenie interleukiny 5 w grupie 8 chorych bez dominacji w nacieku zapalnym komórek kwasochłonnych

Przy ocenie statystycznej uzyskanych wyników z zastosowaniem testu Fischera ($p > 0,01$), stwierdzono występowanie zależności między obecnością komórek kwasochłonnych w nacieku zapalnym a podwyższonym stężeniem IL-5.

DYSKUSJA

Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że dolegliwości dyspeptyczne i bólowe spostrzegane u naszych pacjentów były powodowane przez ujawnione w badaniu endoskopowym i potwierdzone w badaniu histopatologicznym przewlekłe zmiany zapalne błony śluzowej żołądka. Powstaje pytanie o patomechanizm tych zmian i czynnik względnie czynniki inicjujące powstanie procesu zapalnego.

Dane z wywiadu informujące o związku dolegliwości ze spożyciem określonych pokarmów w połączeniu z dodatnimi odczynami skóry na ich wyciągi pozwalały wstępnie podejrzewać przyczynową rolę alergenów pokarmowych. Obecność nacieków eozynofilowych w 24 biopatach i podwyższenie stężenia IL-5 w surowicy z kolei silnie sugerowały alergiczne podłoże zapalenia żołądka i bezpośrednią odpowiedzialność eozynofików za uszkodzenie tkanek i podtrzymanie procesu zapalnego w sposób w jaki te komórki oddziałują na tkanki dróg oddechowych i skórę u atopików z alergicznym nieżytem nosa, astmą i wypryskiem. Eozynofile migrują z krwi obwodowej - jak to wykazaliśmy we wcześniejszych badaniach - do tkanek już po 60 minutach od chwili prowokacji błony śluzowej żołądka alergenami pokarmowymi [16,17].

Tak więc alergiczna etiopatogeneza nieżytów u 14 pacjentów, u których nie stwierdzono obecności *Helicobacter pylori* w kryptach błony śluzowej żołądka ze wskazaniem pokarmów jako pierwotnych czynników przyczynowych procesu chorobowego wydaje się prawdopodobna.

U pozostałych 18 pacjentów wykryliśmy w żołądku obecność *Helicobacter pylori*, uważanego od lat osiemdziesiątych bieżącego stulecia za jeden

z głównych czynników przyczynowych przewlekłych stanów zapalnych żołądka i dwunastnicy oraz choroby wrzodowej [18,19]. Nie można przeto pominąć roli tego bardzo rozpowszechnionego drobnoustroju i zapytać czy nie był on w tych przypadkach dodatkowo lub wyłącznie odpowiedzialny za utrzymywanie się procesu zapalnego. Jedną z tych możliwości wydaje się bardzo prawdopodobna. Zwraca jednak uwagę okoliczność, że w grupie naszych pacjentów nie stwierdziliśmy statystycznie istotnych różnic w częstości występowania nacieków eozynofilowych w grupie z kolonizacją i bez kolonizacji bakteryjnej. Wszystko wydaje się wskazywać, że obecność *Helicobacter pylori* w błonie śluzowej żołądka, podobnie jak alergeny pokarmowe wnikające do żołądka z zewnątrz może stanowić bodziec wywołujący migrację eozynofilów do tkanek. Uwzględniając szczególną predyspozycję naszych chorych do reagowania alergicznego na spożyty pokarm, podejrzewamy, że u atopików *Helicobacter pylori*, może podobnie jak inne alergeny, inicjować reakcję IgE - zależną w błonie śluzowej żołądka. Taka możliwość wydaje się nam wysoce prawdopodobna albowiem w badaniach bieżąco wykonywanych znajdujemy u atopików z alergią na pokarmy i nieżytkach żołądka, z obecnością i bez *Helicobacter pylori* liczne komórki wiążące IgE. Nasze obserwacje potwierdzają pojawiające się ostatnio w piśmiennictwie doniesienia o obecności w nieżytkach żołądka komórek zawierających na swej powierzchni

IgE. Lutton i Bamford wykazali aż u 84% chorych z przewlekłymi nieżytkami żołądka i kolonizacją *Helicobacter pylori* obecność na powierzchni bazofilów swoistych IgE [20,21].

Wyniki naszych badań sugerują, że żołądek może być jednym z narządów docelowych procesów alergicznych IgE-zależnych inicjowanych u atopików przez alergeny zewnątrzpoходne i być może także przez infekcję bakteryjną. W patomechanizmie przewlekłego zapalenia tego narządu - podobnie jak to ma miejsce w drogach oddechowych i skórze - odgrywają szczególną rolę interleukina 5 i aktywowane komórki kwasochłonne. Powyższe stwierdzenie ma bez wątpienia nie tylko ważne znaczenie poznawcze lecz także praktyczne albowiem nie tylko eradykacja *Helicobacter pylori* lecz także eliminacja uczulających pokarmów z diety pacjentów może wielokrotnie pozwolić na uzyskanie ustąpienia ich dolegliwości.

Znajomość ważnego znaczenia interleukiny 5 w patomechanizmie procesów alergicznych IgE-zależnych otwiera nowe, potencjalne możliwości terapeutyczne. W chwili obecnej przeprowadza się liczne badania nad mechanizmami wytwarzania IL-5 i możliwością zablokowania tej cytokiny przy pomocy przeciwciał monoklonalnych. Zdaniem niektórych badaczy istnieje nadzieja, że leczenie anty-IL5 stanie się w przyszłości nową, skuteczną i bezpieczną metodą leczenia astmy i innych zaburzeń alergicznych z eozynofilią [22,23].

Piśmiennictwo

- Romański B.: Eozynofil - tajemniczy symbol procesów alergicznych. *Pneumonologia i Alergologia Polska*. 1994; 62(7-8): 335-343
- Basquat J., Chang P., Lacosk J.W.: Eosinophilic inflammation in asthma. *N. Eng. J. Med.* 1993; 48: 1.
- Kay A.B.: Asthma and inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1991; 87: 893-910.
- Kapp A.: The role of eosinophils in the pathogenesis of atopic dermatitis - eosinophil granule proteins as markers of disease activity. *Allergy* 1993; 48: 1.
- Kay A.B.: Eosinophils and cytokines. W A. Basomba J.Sastre (red.). *Proceedings I of EAACI 95*, 103-110. Horduzi. Bologna 1995.
- Bruijnzel P.L.B.: Eosinophil adhesion and migration in allergic inflammation. w: A. Basomba J.Sastre (red.). *Proceedings I of EAACI 95*, 37-102, Horduzi. Bologna 1995.
- Bradding P., Roberts J.A., Britten K.H.: Interleukin-4 -5 and -6 and tumor necrosis factor in normal and asthmatic airways: evidence for the human mast cell as a source of these cytokines. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1994; 10: 471-480.
- Dubucquoi S., Desreumaux P., Janin A.: Interleukin-5 synthesis by eosinophils: association with granules and immunoglobulin dependent secretion. *J. Exp. Med.* 1994; 179: 703-8.
- Motojima S., Akutson J., Tukuda T.: Clinical significance of measuring levels of spectrum and serum ECP and serum IL-5 in bronchial asthma. *Allergy* 1993; 48 Suppl 17: 98-106.
- Hamid Q., Azzawi M., Ying S.: Interleukin-5 mRNA mucosal bronchial biopsies from asthmatic subjects. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 1991; 94.
- Ohnishi T., Kita H., Weiler D.: IL-5 is the predominant eosinophil-active cytokine in the antigen - induced pulmonary late-phase reaction. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1993; 147: 901-907.
- Rusp G., Thomas P.: Interleukin-5 release in late antigen-induced nasal secretion is associated with eosinophil activation. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1995; 95: 258.
- Taha R., Leung D., Boguniewicz M.: IL-4 and IL-5 receptor mRNA expression in acute and chronic atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1995; 95: 258.
- Buterfield J.H., Leiferman K.M., Abrams J.: Elevated serum levels of interleukin-5 in patients with the syndrome of episodic angioedema and eosinophilia. *Blood* 1992; 79: 688-692.
- Price AB.: The Sydney System: Histological division. *J. Gastroenterol Hepatol.* 1991; 6: 209-222.
- Romański B.: Alergia na pokarmy. *Terapia* 1995; 10(27): 3-16.
- Bartuzi Z., Romański B.: The migration of circulating blood eosinophils in food sensitive patients challenged with food allergens. *International Review of Allergology and Clinical Immunology* 1996; II(4): 145-149.
- Marshall B.: Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* 1983; 1: 1273.
- Blaser M.J.: Hypothesis of the pathogenesis nad natural history induced inflammation. *Gastroenterology* 1992; 102: 720.

20. Lutton D., Bamford K., O'Loughlin B.: Modulatory action of *Helicobacter pylori* on histamine release from mast cells and basophils in vitro. *J. Med. Microbiol.* 1995; 42: 386-393.
21. Aceti A., Celestino D., Caferro M.: Basophil- bound and serum immunoglobulin E directed against *Helicobacter pylori* in patients with chronic gastritis. *Gastroenterology* 1991; 101: 131-137.
22. Egan R.W., Umland S.P., Cuss F.M.: Biology of Interleukin-5 and its relevance to allergic disease. *Allergy* 1996; 51: 71-81.
23. Dauzing M., Loss F.: Inhibition of interleukin-5 with a monoclonal antibody attenuates allergic inflammation. *Allergy* 1997; 52: 787-794.

An evaluation of the correlation between the number of eosinophil cells in gastric mucosa and levels of interleukin 5 in plasma in patients with food allergy and *Helicobacter pylori* positive and negative gastritis

ZBIGNIEW BARTUZI, BOGDAN ROMAŃSKI, MAGDALENA ŻBIKOWSKA-GÖTZ

Summary

The aim of the present work was to determine the level of secretion of IL 5 in patients with food allergy and chronic gastritis (both *Helicobacter pylori* positive and negative), together with an assessment of the degree of the eosinophil mucosal infiltration.

The group of 34 patients with diagnosed food allergy was studied. All patients underwent gastroscopy, and had taken of the gastric mucosa (from the antral and duodenal regions taken). The presence of *Helicobacter pylori* was taken as either positive or negative. The levels of IL 5 in plasma were determined using ELISA.

Gastritis was confirmed in 32 of 34 studied samples. *Helicobacter pylori* was present in 18 of 32 studied samples. Eosinophil infiltration of the gastric mucosa was found in 24 of the 32 studied subjects. Raised levels of IL 5 were found in 23 of the 24 cases with eosinophil infiltrations and only 1 of the 8 with no infiltration.

It appears therefore that IL 5 influences the development of eosinophil infiltration caused by hypersensitive reaction of the mucosa to food and / or bacterial allergens in patients with *Helicobacter pylori* positive and negative gastritis.