

Debata na temat grzybów: jaki jest nasz aktualny stan wiedzy?

The fungal debate: where do we stand today?

F.A. EBBENS^{1/}, C. GEORGALAS^{1,2/}, A.B. RINIA^{1/}, C.M. VAN DRUNEN^{1/}, V.J. LUND^{2/}, W.J. FOKKENS^{1/}

^{1/} Department of Otorhinolaryngology, Academic Medical Center, Amsterdam, the Netherlands

^{2/} Department of Rhinology, Royal National Throat Nose and Ear Hospital, London, United Kingdom

Przewlekłe zapalenie zatok przynosowych (chronic rhinosinusitis, CRS) jest chorobą zapalną obejmującą jamy nosa i zatok przynosowych. Chociaż przez długi okres czasu wskazywano na bakterie jako patogeny wywołujące większość postaci CRS, odkryto że także grzyby są odpowiedzialne za niektóre formy tego schorzenia. Ostatnie doniesienia pokazują, że w optymalnych do rozwoju warunkach, grzyby mogą być izolowane z nosa i zatok przynosowych niemal każdego człowieka. Właściwa diagnoza wydaje się często kontrowersyjna ze względu na zbliżone objawy „alergicznego grzybiczego zapalenia nosa i zatok” oraz przewlekłego zapalenia zatok. Chociaż określenie „alergiczne grzybicze zapalenie nosa i zatok przynosowych” sugeruje reakcje na grzyby z udziałem immunoglobuliny E (IgE), rola nadwrażliwości typu I została zakwestionowana w ostatnich badaniach, które wskazują, że podniesiony poziom IgE w surowicy może dotyczyć jednego rodzaju grzyba, podczas gdy inny grzyb jest obecny w śluzie CRS u tej samej osoby. Niniejsza praca stanowi przegląd dotychczas sugerowanych mechanizmów wyjaśniających rolę grzybów w patogenezie CRS. Wymagają one jednak dalszych badań z zastosowaniem odpowiednich prób kontroli. Chociaż wstępne badania wskazują na korzystny wpływ miejscowego i doustnego stosowania środków przeciwgrzybiczych w leczeniu CRS, wiele prób z zastosowaniem podwójnie ślepej próby z placebo nie potwierdza tej skuteczności. Obecnie, przy braku przekonujących danych immunologicznych oraz braku dowodów klinicznych na poprawę stanu pacjentów z CRS podczas stosowania leków przeciwgrzybiczych, sprawa znaczenia grzybów pozostaje niewyjaśniona.

Słowa kluczowe: przewlekłe zapalenie nosa i zatok przynosowych, polipy nosa, grzyby, eozynofile, leczenie przeciwgrzybicze

Chronic rhinosinusitis (CRS) is a n inflammatory disorder affecting the nose and paranasal sinuses. Although bacteria have long been implicated as pathogens in most forms of CRS, it has been recognized that fungi may be responsible for some forms of CRS. Recent studies have shown that under optimal conditions, fungi can be identified within the nose and paranasal sinuses of nearly every individual. Considerable controversy exists concerning the proper diagnosis of and potential overlap between „allergic fungal rhinosinusitis” and „chronic rhinosinusitis”. Although the disease name „allergic fungal rhinosinusitis” is suggestive of an immunoglobulin E (IgE) mediated reaction to fungi, recent studies demonstrate the presence of elevated serum IgE levels to one fungus while another fungus is present in CRS mucin of the same individual, questioning the role of type I hypersensitivity. Several mechanisms explaining the role of fungi in the pathogenesis of CRS, all requiring additional investigations with adequate controls, have been suggested and will be reviewed. Although preliminary trials suggest a beneficial effect of topical and oral antifungal agents in the treatment of CRS patients, several double-blind placebo controlled trials do not. Presently, in the absence of convincing immunological data and evidence of clinical improvement of CRS upon therapy with antifungal agents, the case against the fungus remains unproven.

Key words: *chronic rhinosinusitis, nasal polyps, fungi, eosinophils, antifungal treatment*

Wstęp

Przewlekłe zapalenie nosa i zatok przynosowych (*chronic rhinosinusitis* – CRS) jest chorobą zapalną rozwijającą się w obrębie nosa i zatok przynosowych. CRS rozwija się przez co najmniej 12 tygodni, zanim dojdzie do pełnej manifestacji choroby i cechuje się charakterystycznymi objawami (np. nieżytem nosa, wydzieliną z nosa, bólem twarzy i/lub zaburzeniami powonienia) oraz typowym obrazem w endoskopii bądź tomografii komputerowej [1]. Polipy nosa (*nasal polyps* – NP) uznawane są za jedną z podgrup wszystkich opisanych form CRS. Jak dotąd, etiologia i patogenezą CRS pozostają w znacznej mierze nie wyjaśnione.

Chociaż przez długi okres czasu wskazywano na bakterie jako patogeny wywołujące większość postaci CRS, odkryto że również grzyby są odpowiedzialne za niektóre formy tej choroby. Wszelkoczesna natura zarodników grzybów sprawia, że nieustannie przedostają się one przez nos i osadzają na błonie śluzowej górnych dróg oddechowych. U zdrowych osób zarodniki grzybów rzadko stają się patogenami, jednakże niekiedy mogą wywoływać różne zespoły chorobowe. Obecnie wyróżnia się pięć form grzybiczych infekcji nosa i zatok przynosowych: 1) ostre inwazyjne grzybicze zapalenie nosa i zatok przynosowych (z uwzględnieniem mukormykozy nosowo-mózgowej), 2) przewlekłe inwazyjne grzybicze zapalenie nosa i zatok przynosowych, 3) ziarniniakowate inwazyjne grzybicze zapalenie nosa i zatok przynosowych, 4) zmiany o charakterze „fungal ball” oraz 5) nieinwazyjne (alergiczne) grzybicze zapalenie nosa i zatok przynosowych (zaadoptowane z DeShazo i wsp. [2]). Formy inwazyjne grzybiczego zapalenia nosa i zatok przynosowych uważane są za rzadkie i generalnie zdarzają się tylko u osób z obniżoną odpornością. Formy nieinwazyjne są nieco bardziej powszechne i składają się na nie zmiany o charakterze fungal ball, w którym zaatakowana jest z reguły jedna zatoka oraz odmiany alergicznej, obejmującej swym zasięgiem wiele zatok. Ostatnie dwie wymienione formy generalnie występują u osób z prawidłową funkcją układu odpornościowego.

Chociaż w poprzednich latach nieinwazyjne formy grzybiczych infekcji uznawane były za rzadkie, to jednak coraz częściej są one tematem debat [3]. W niniejszej pracy omówiona jest historia nieinwazyjnych grzybiczych zapaleń nosa i zatok przynosowych oraz przedstawiona, nigdy wcześniej nie proponowana, rola grzybów nieinwazyjnych w patogenezie CRS. Ponieważ zasadniczym warunkiem udowodnienia związku przyczynowego pomiędzy grzybami a CRS jest ich obecność, omó-

wione zostały występowanie i mikrobiologia grzybów identyfikowanych u pacjentów z CRS. Wiele uwagi poświęcono możliwej odpowiedzi immunologicznej, powstałej na skutek ekspozycji na działanie różnych grzybów. W końcu, omówiona została rola związków przeciugrzybiczych w leczeniu CRS.

Zarys historyczny

W 1983 roku Katzenstein i wsp. zidentyfikowali gatunki *Aspergillus* w śluzie uzyskanym z nosa i zatok przynosowych pacjentów cierpiących na CRS z NP. Ze względu na histopatologiczne podobieństwo do alergicznej, oskrzelowo-płucnej grzybicy kropidlakowej (*allergic bronchopulmonary aspergillosis* – ABPA) [4] wprowadzili oni określenie „alergicznego kropidlakowego zapalenia zatok przynosowych (*allergic Aspergillus sinusitis*). Alergiczne kropidlakowe zapalenie zatok było definiowane jako postać CRS charakteryzująca się obecnością tzw. „śluzu alergicznego” (tj. obfitego, nieustępującego i ciemnozabarwionego śluzu, zawierającego agregaty nekrotycznych eozynofilów, fragmenty jąder, wolne ziarna eozynofilów, złuszczone komórki nabłonka dróg oddechowych oraz kryształki Charcot-Leyden w obrębie zwykle bezkształtnego, bladego eozynofilowego lub bazofilowego śluzowego otoczenia oraz rozproszonych strzępeków grzybów rodzaju *Aspergillus* [4]. Później, kiedy odkryto, że inne grzyby powodują wystąpienie podobnych objawów chorobowych, stworzono określenie „alergicznego grzybiczego zapalenia zatok przynosowych (*allergic fungal sinusitis* – AFS)” [5].

W 1994 roku, opierając się na wynikach badań klinicznych u 15 pacjentów, Bent i Kuhn zaproponowali 5 kryteriów diagnozy AFS: 1) polipy nosa, 2) śluz alergiczny, 3) wyniki CT wskazujące na CRS, 4) dodatni wynik barwienia lub hodowli w kierunku grzybów i 5) nadwrażliwość typu I na grzyby zdiagnozowana na podstawie wywiadu i dodatniego wyniku testu skórniego lub serologicznego [6].

W 1995 roku, w przeglądzie literatury 98 przypadków AFS, DeShazo i Swain zaobserwowali, że zaledwie 3/4 zdiagnozowanych pacjentów było atopowych. Opierając się na tym spostrzeżeniu, co jest punktem debat do dziś, usunęli oni kryterium nadwrażliwości typu I z listy objawów niezbędnych do zdiagnozowania AFS [7].

Opierając się na spostrzeżeniu, że grzyby są obecne u prawie wszystkich pacjentów z CRS, Ponikau i wsp. zasugerowali, że AFS może być bardziej powszechnym schorzeniem niż wcześniej przypuszczano. Ponieważ wszyscy pacjenci z CRS

spełniali kryteria dla AFS opracowane przez DeShazo i Swain'a [7], Ponikau i wsp. zaproponowali, żeby termin AFS (wskazujący na odpowiedź immunologiczną z udziałem IgE) zastąpić terminem „eozynofilowe grzybicze zapalenie zatok przynosowych” (*eosinophilic fungal rhinosinusitis* – EFRS) oraz zasugerowali, żeby określenie „śluz alergiczny” zastąpić mianem „śluzu eozynofilowego” [3].

W 2000 roku, w oparciu o dostępną literaturę oraz nowe przypadki, Ferguson opisała postać CRS histologicznie podobną do AFS (opisaną wcześniej przez DeShazo i wsp. [7]) za wyjątkiem braku obecności strzępków grzyba, którą określiła mianem eozynofilowego, śluzowego zapalenia nosa i zatok przynosowych (*eosinophilic mucin rhinosinusitis* – EMRS). W badaniu tym założono, że AFS jest odpowiedzią alergiczną na obecność grzybów u osób predysponowanych, podczas gdy EMRS jest wynikiem zaburzeń w układzie immunologicznym [8]. Tabela I podsumowuje różne kryteria oraz określenia stosowane w nazewnictwie choroby. Chociaż większość autorów, podczas omawiania przypadków pacjentów cierpiących na nieinwazyjne grzybicze zapalenie nosa i zatok przynosowych używa określenia AFS, powinniśmy mieć na uwadze fakt, że kryteria służące zaklasyfikowaniu pacjentów różnią się w różnych badaniach, co przysparza trudności w interpretacji i porównaniu wyników. W niniejszej pracy zarówno AFS, jak i EFRS będą określane mianem „nieinwazyjnych grzybiczych zapaleń nosa i zatok przynosowych”.

Występowanie oraz mikrobiologia grzybów w CRS

Jak wspomniano wcześniej, stwierdzenie obecności nieinwazyjnych grzybów w nosie i zatokach przynosowych jest warunkiem koniecznym do zdiagnozowania nieinwazyjnych grzybiczych zapaleń nosa i zatok przynosowych. Tym niemniej, udowodnienie rozpowszechnienia grzybów wydaje się przysparzać trudności. W ciągu wielu lat opublikowano szereg prac przedstawiających różny odsetek pacjentów z CRS, u których zidentyfikowano obecność grzyba w jamach nosa i zatok przynosowych. Wartości te wahają się od 0% do 100% i przedstawione są w tabeli II [3,4,9-25].

Czy technika pobierania materiału ma wpływ na ilość zidentyfikowanych w nim grzybów?

W 1999 roku w USA Ponikau i wsp. stosując nową technikę pobierania i hodowli materiału, wykazali obecność grzybów w nosie i zatokach przynosowych u niemal wszystkich pacjentów z zdiagnozowanym CRS (202 na 210 przypadków – 96%) i u wszystkich zdrowych osób z grupy kontrolnej (14 na 14 przypadków – 100%). W technice tej w skrócie, do każdego nozdrza podaje się dwie dawki 1% chlorowodoru fenylefryny w postaci aerozolu w celu obkurczenia naczyń krwionośnych i poszerzenia światła przewodów nosowych. Po 2 minutach, po wzięciu głębokiego wdechu przez pacjenta każde z nozdrzy poddawane jest irygacji 20ml sterylnego roztworu soli fizjologicznej. Otrzymane popłuczyny zbierane są do sterylnego naczynia i szybko transportowane do

Tabela I. Kryteria diagnozowania nieinwazyjnych grzybiczych zapaleń zatok przynosowych

Kryteria	Katzenstein [4]	Bent i Kuhn [6]	DeShazo i Swain [7]	Ponikau [3]	Ferguson [8]
Dodatni wynik badania histopatologicznego lub hodowli w kierunku grzybów	X	X	X	X	
Nadwrażliwość typu I w oparciu o określony wywiad i serologię lub dodatni wynik testów skórnych Śluz alergiczny lub eozynofilowy*	X	X	X	X	X
Obraz RTG lub CT wskazujący na CRS	X	X	X	X	X
Polipy nosa	X	X	X		X
Nazwa choroby	Alergiczne kropidlakowe zapalenie zatok przynosowych	Alergiczne grzybicze zapalenie zatok przynosowych	Alergiczne grzybicze zapalenie zatok przynosowych	Eozynofilowe grzybicze zapalenie zatok przynosowych	Eozynofilowe śluzowe zapalenie zatok przynosowych

* Określenie śluz alergiczny lub eozynofilowy jest błędnie definiowane w większości prac. Niektóre badania zakładają, że ocena wzrokowa jest wystarczająca (tj. śluz przypominający masło orzechowe), podczas gdy inne badania wskazują na konieczność przeprowadzenia badania histopatologicznego sprawdzającego obecność eozynofili i/lub strzępków grzyba i/lub kryształów Charcot-Leyden'a.

Tabela II. Występowanie grzybów

Badanie	Rok	Kraj	Technika pobrania materiału	Miejsce pobrania materiału	Technika detekcji	Obecność grzybów u pacjentów z CRS (%)	Obecność grzybów u osób zdrowych grupy kontrolnej (%)
Katzenstein i wsp. [4]	1983	USA	Chirurgicznie wycięta błona śluzowa	Zatoki przynosowe	Badanie histopatologiczne	6,2	
Ponikau i wsp. [3]	1999	USA	Płukanie nosa; Pobieranie prób podczas endoskopowej operacji zatok	Jama nosowa Zatoki przynosowe	Hodowla Badanie histopatologiczne	96 81	100
Catten i wsp. [9]	2001	USA	Cytologia zeskrobiny	Przegroda nosowa, wewnętrzne małżowiny nosowe	PCR	40	42
			Wymaz bawełnianym tamponem	Przegroda nosowa, wewnętrzne małżowiny nosowe	PCR	0	5,7
Taylor i wsp. [19]	2002	USA	Pobieranie prób podczas endoskopowej operacji zatok	Zatoki przynosowe	Barwienie metodą Grocotta (srebrem) Barwienie chitynazą wyznakowaną fluorescencyjnie	76 100	
Buzina i wsp. [23]	2003	Austria	Płukanie nosa; Pobieranie prób podczas endoskopowej operacji zatok	Jama nosowa Zatoki przynosowe	Hodowla Hodowla	91,3 84,0	91,3
					Barwienie metodą Grocotta (srebrem)	70,2	
Braun i wsp. [20]	2003	Austria	Płukanie nosa; Pobieranie prób podczas endoskopowej operacji zatok	Jama nosowa Zatoki przynosowe	Hodowla Badanie histopatologiczne	91,3 75,5	91,3
Scheuller i wsp. [15]	2004	USA	Pobieranie prób podczas endoskopowej operacji zatok	Przewód słuchowy środkowy	PCR	21,1	36,8
Kostamo i wsp. [12]	2004	Finlandia	Płukanie nosa; Pobieranie prób podczas endoskopowej operacji zatok	Jama nosowa Zatoki przynosowe	Hodowla Barwienie PAS i metodą Grocotta (srebrem)	16,7 16,7	0
Granville i wsp. [13]	2004	USA	Chirurgicznie wycięta błona śluzowa	Zatoki przynosowe	Barwienie metodą Grocotta (srebrem)	11,7	
Weschta i wsp. [18]	2004	Niemcy	Płukanie nosa	Jama nosowa	Hodowla, mikroskopia fluorescencyjna i PCR	63,3	
Jiang i wsp. [14]	2005	Taiwan, R.O.C.	Wymaz wacikiem	Przewód słuchowy środkowy	Hodowla	11,8	
			Płukanie nosa	Jama nosowa	Hodowla	49	

Tabela II. cd

Badanie	Rok	Kraj	Technika pobrania materiału	Miejsce pobrania materiału	Technika detekcji	Obecność grzybów u pacjentów z CRS (%)	Obecność grzybów u osób zdrowych z grupy kontrolnej (%)
Kim i wsp. [16]	2005	Korea Poł.	Płukanie nosa	Jama nosowa	PCR Hodowla	92,5 23,2	97,5 30,0
Polzelhl i wsp. [11]	2005	Niemcy	Płukanie nosa	Jama nosowa	Hodowla PCR	25 44	
Kennedy i wsp. [21]	2005	USA	Płukanie nosa, pobieranie nabłonka	Jama nosowa	Badanie histopatologiczne, hodowla	77,4	
Rao i wsp. [10]	2006	USA	Pobieranie prób podczas endoskopowej operacji zatok	Puszka sitowa lub zatoka sitowa	PCR Hodowla	6,5 0	0 0
Murr i wsp. [17]	2006	USA	Pobieranie próbek zeskrobin podczas endoskopowej operacji zatok	Przewód nosowy środkowy	PCR	45,9	45,9
Corradine i wsp. [22]	2006	Włochy	Płukanie nosa	Jama nosowa	Hodowla	77	

wyspecjalizowanego laboratorium mykologicznego, gdzie poddawane są dalszej analizie w jałowych warunkach. Materiał poddaje się działaniu środków rozrzedzających (przerywających mostki dwusiarczkowe w śluzie), a następnie wirowaniu w celu oddzielenia frakcji zawierającej grzyby. Kolejny etap analizy polega na ocenie wzrostu grzybów na różnych podłożach w 30°C przez co najmniej 30 dni. Zastosowanie tej techniki pozyskiwania materiału do badań umożliwiło wykazanie podobnego stopnia nosicielstwa grzybów wśród pacjentów z CRS w Europie [20,23].

Za wzrostem identyfikowanej liczby przypadków grzybiczego podłoża CRS przemawiać może nie tylko polepszenie technik pozyskiwania materiału do analizy, ale także udoskonalenie technik detekcji. W przypadku hodowli większą liczbę grzybów wykrywa się jeśli materiał został pobrany na drodze płukania jamy nosowej (49%) niż na drodze wymazu z środkowego przewodu nosowego (11,8%) [14]. W przypadku reakcji PCR lepsze wyniki otrzymuje się dla zeskrobin błony śluzowej nosa (40%) niż dla zwykłego wymazu z nosa (0%). Choć Buzina i wsp. zaobserwowali większy odsetek wyhodowanych grzybów z popłuczyn jamy nosowej (91,3%) niż z endoskopowo kontrolowanej operacji zatok (84%) [23], to jednak próbki w tym badaniu otrzymane zostały od dwóch różnych grup osób. We wcześniej opisanych dwóch badaniach próbki zostały pozyskane od tej samej grupy osób, tym samym zmniej-

szając ryzyko błędu podczas selekcji. Opierając się na wyżej opisanych wynikach badań można stwierdzić, że najlepszą techniką pozyskiwania materiału jest płukanie jamy nosa, mimo że otrzymany materiał pochodzi w tym przypadku nie tylko z jamy nosowej [26], ale też z części nosowej gardła i z przedsionka nosa.

Czy metoda detekcji może wpływać na ilość identyfikowanych grzybów?

Tak jak zasugerowano wcześniej, różnice w metodach detekcji mogą wpływać na ilość identyfikowanych grzybów. W przypadku endoskopowo pobieranych próbek podczas operacji zatok większą skuteczność odnotowano dla PCR (6,5%) niż dla metody hodowli (0%) (10), hodowla okazała się być skuteczniejsza (84%) niż barwienie srebrem wg Grocotta (70,2%) [23]. Barwienie fluorescencyjnie wyznakowaną chitynazą dało lepsze wyniki (100%) niż barwienie srebrem wg Grocotta (76%) [19]. W przypadku próbek otrzymanych z popłuczyn nosa, Polzelhl i wsp. oraz Kim i wsp. wykazali przewagę techniki PCR (odpowiednio 44% i 92,5%) nad metodą hodowli (25% i 23,2%) [11,16]. Opierając się na wynikach tych badań można stwierdzić, że PCR jest lepszą techniką detekcji niż hodowla, bez względu na sposób pobierania materiału. Mimo to należy mieć na uwadze, że w przypadku niektórych badań technika hodowli umożliwia diagnozowanie obecności grzybów w niemal 100% przypadków [3]. Zarówno technika

PCR, jak i metoda hodowli wymagają do ich przeprowadzenia materiału w postaci fragmentów tkanki grzyba, jednakże obecność żywych komórek strzępków grzyba potwierdzić można wyłącznie poprzez założenie hodowli na odpowiednich podłożach. Rola żywotności komórek grzyba w patogenezie CRS pozostaje jednak jak dotąd nie wyjaśniona. Przy braku jakichkolwiek innych badań wykorzystujących fluorescencyjnie wyznakowaną chitynazę, wyniki prezentowane przez Taylor i wsp. wskazujące na obecność jednego lub wielu strzępków grzyba w 100% prób śluzu pobranego od pacjentów z CRS, są tym bardziej uderzające [19]. Wysoka czułość tego testu może wynikać z faktu, że chityna jest składnikiem ściany komórkowej wszystkich grzybów. W celu potwierdzenia tych wyników wymagane są dalsze badania.

Czy duża ilość izolowanych grzybów, podawana w niektórych badaniach może wynikać z zakażenia hodowli?

Proponowanym wyjaśnieniem wysokiego odsetka (w niektórych badaniach dochodzącego do 100%) izolowanych grzybów z materiału klinicznego jest zakażenie hodowli. Lackner i wsp. udowodnili, że grzyby mogą być wyhodowane z nabłonka nosa u 20% noworodków. W wieku 2 miesięcy spektrum indywidualne ulega unormowaniu, natomiast po 4 miesiącach osiąga stan podobny do obserwowanego u osób dorosłych (17 na 18 (94%) dzieci ma pozytywny wynik hodowli w kierunku grzybów) [27]. Chociaż wynik ten przemawia przeciw możliwości zakażenia materiału w laboratorium, to jednak nie należy wykluczać różnicowania geograficznego [28], czy, niezwykle istotnego podczas pobierania prób, zanieczyszczenia zarodnikami grzybów powietrza w środowisku szpitalnym [29].

Czy istnieje różnica w liczbie i rodzaju gatunków grzybów zaangażowanych w CRS?

Powszechne występowanie grzybów w środowisku zewnętrznym oraz w nosie i zatokach przynosowych osób zdrowych i pacjentów z CRS sugeruje, że nie sama obecność grzybów, ale raczej występowanie konkretnych ich gatunków może mieć znaczenie w rozwinięciu się choroby. Nowa technika hodowli grzybów opisana przez Ponikau i wsp. [3] pozwoliła na wykrycie 37-40 różnych ich rodzajów z 2,7-3,2 gatunkami przypadającymi na pacjentów z CRS i 2,3-3,1 przypadającymi na grupę kontrolną [3,20]. Do najczęściej spotykanych rodzajów zaliczyć można *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Candida*, *Aureobasidium* i *Alternaria* [16,17,20,23,30], jednakże nie wykazano istotnych różnic na poziomie gatunkowym.

Czy dawka zarodników (alergenu) ma znaczenie w rozwoju choroby?

Wpływ dawki zarodników grzyba na proces chorobowy został sprawdzony przez Schueller'a i wsp. w badaniu prospektywnym u 19 osób zdrowych i 19 pacjentów ze zdiagnozowanym CRS. Autorzy porównali ilość DNA grzybów między obiema grupami, jednakże nie udało im się zaobserwować żadnych istotnych różnic, co przemawia za hipotezą, że dawka alergenu nie jest krytycznym czynnikiem w rozwinięciu się CRS [15], pozostaje to jednak tematem debat do dziś. Na przykładzie rodzaju *Alternaria* dowiedziono, że ilość alergenu może ulec wahaniom pomiędzy szczepami tego samego grzyba oraz pomiędzy składowymi jednego izolatu (zarodniki versus strzępki). Dojrzewanie zarodników grzybów rodzaju *Alternaria* prowadzi do znaczącego wzrostu ilości uwalnianego alergenu, z uwzględnieniem głównego alergenu Alt a 1. W ostatnich badaniach zasugerowano, że proces ten może mieć miejsce w drogach oddechowych, a szczególnie w wyściełającym tę drogi śluzie i że towarzyszy mu zwiększone uwalnianie alergenu [31]. Ponieważ obecność śluzu poprzedza wzrost uwolnienia alergenu, rola grzybów jako patogenów wywołujących CRS jest mało prawdopodobna. Opierając się na wynikach dotychczasowych badań, bardziej sugerowana jest raczej ich rola w zaostrzeniu objawów CRS u wrażliwych pacjentów.

Podsumowanie

Grzyby mogą być izolowane z nosa i zatok przynosowych u wszystkich pacjentów z CRS, jak i u wszystkich zdrowych osób z grupy kontrolnej. Udoskonalenie technik pobierania materiału do badań, jak i metod detekcji grzybów przyczyniły się do zwiększenia diagnozowanej liczby ich przypadków. Ilości izolowanych grzybów oraz ich gatunki nie różnią się istotnie pomiędzy wspomnianymi grupami. Jednakże, zagadnienie czy różnice w składzie alergenów mogą mieć wpływ u niektórych osób na rozwinięcie się nieinwazyjnego grzybiczego zapalenia zatok przynosowych wciąż jest niewyjaśnione i powinno być badane.

Humoralna odpowiedź immunologiczna w zakażeniach grzybiczych

Czy nadwrażliwość typu I jest zaangażowana w patogenezę CRS?

Przez wiele lat uważano, że główną rolę w nieinwazyjnych grzybiczych zapaleniach nosa i zatok przynosowych pełnią układowe reakcje alergiczne, zachodzące z udziałem immunoglobuliny (Ig) E (za czym przemawiał podwyższony poziom

swoistych IgE oraz dodatni wynik testów skórnych na powszechne alergeny grzybów, przenoszone drogą powietrzną). Tymczasem wyniki ostatnich badań sugerują, że nieinwazyjne, grzybicze zapalenie nosa i zatok przynosowych jest znacznie bardziej powszechne niż się wcześniej spodziewano, a grzyby są izolowane z nosa i zatok przynosowych niemal każdego pacjenta z CRS. Jeśli wspomniane reakcje alergiczne rzeczywiście są niezbędne, jak twierdzą różni autorzy, właściwa diagnoza nieinwazyjnych grzybiczych zapaleń nosa i zatok przynosowych, powinna opierać się na rozróżnieniu chorych pacjentów od zdrowych osób z grupy kontrolnej, w oparciu o podwyższony poziom przeciwciał IgE swoistych dla grzybów lub dodatni wynik testu skórniego.

Wielu autorów sprawdzało częstość uczulenia na grzyby u pacjentów z CRS, a podawane przez nich wartości wahają się od 18% do 46% [3,19,32,33]. Część badań wskazuje na brak różnic pomiędzy chorymi a zdrowymi osobami [3], podczas gdy inne wskazują na wyższe poziomy swoistych dla grzybów IgE u pacjentów z CRS i śluzem eozynofilowym (zawierającym lub nie grzyby) w porównaniu ze zdrowymi osobami z grupy kontrolnej [34]. Należy jednak podkreślić, że nie wykazano znaczących różnic pomiędzy grupą pacjentów z CRS i śluzem eozynofilowym, a grupą z alergicznym nieżytem nosa bez zajęcia zatok, ale za to z udowodnioną alergią na grzyby [34]. Tak jak to jest prawdziwe dla ABPA, dodatni wynik testu skórniego nie upoważnia do rozpoznania ABPA, a jedynie odzwierciedla obecność swoistych IgE (inni atopowi pacjenci mogą być także uczuleni na *Aspergillus fumigatus*), a nie współwystępujące zmiany mięszkowe, wymagane dla właściwej diagnozy ABPA [35]. Tym samym, obecność swoistych przeciwciał skierowanych przeciw antygenom grzybów nie pozwala na rozróżnienie pacjentów z nieinwazyjnym grzybiczym zapaleniem nosa i zatok przynosowych od innych pacjentów z CRS.

Sugeruje się, że w procesie nieinwazyjnego grzybiczego zapalenia nosa i zatok przynosowych ważniejsza jest alergia na specyficzny gatunek grzyba, niż ogólna reakcja alergiczna na wszystkie rodzaje grzybów. Pomimo małej ilości badanych grzybów (*Alternaria alternata*, *Cladosporium herbarum* i *Penicilium notatum*) Shin zaobserwował podobne poziomy IgE przeciw różnym powszechnym grzybom, przenoszonym drogą powietrzną w surowicy 18 pacjentów z CRS i 15 zdrowych osób. Pomimo obecności białka *Alternaria* w wydzielinie z nosa wszystkich badanych (n=9) pacjentów z CRS, IgE były obecne w mniej niż 30% przypadków [36], co sugeruje że alergia na konkretny ro-

dzaj grzyba nie odpowiada za rozwinięcie się CRS. Związek alergii na grzyby z CRS poddawany jest w wątpliwość w obserwacjach dokonanych przez Pant'a i wsp. Wskazują oni, że niektórzy pacjenci z nieinwazyjnym grzybiczym zapaleniem nosa i zatok przynosowych nie mają alergii na grzyba izolowanego z ich eozynofilowego śluzu, ale mogą mieć podwyższony poziom IgE przeciw innym grzybom [34]. Tym samym, tak jak sugerowali DeShazo i wsp., nadwrażliwość typu I nie musi odgrywać głównej roli w rozwinięciu się nieinwazyjnych grzybiczych zapaleń nosa i zatok przynosowych [7]. W oparciu o opisane wyżej badania, hipoteza o jednoznacznej roli alergii grzybiczej w nieinwazyjnym grzybiczym zapaleniu nosa i zatok przynosowych powinna zostać poddana w wątpliwość. Bardziej prawdopodobnym jest, że jej obecność oznacza współistniejącą alergię u większości chorych z CRS.

Jaką rolę pełnią specyficzne dla grzybów IgG?

Ponieważ częstość uczuleń na grzyby jest podobna zasugerowano udział innej odpowiedzi immunologicznej skierowanej przeciwko grzybom i angażującej IgG (a nie IgE). Shin i wsp. zademonstrowali znaczny wzrost poziomów IgG swoistych dla *Alternaria alternata*, *Aspergillus fumigatus*, *Cladosporium herbarum* i *Penicilium notatum* u pacjentów z CRS w porównaniu z grupą kontrolną [36]. Podobne wyniki otrzymali Pant i wsp., wykazując wysokie poziomy swoistych dla *Alternaria alternata* i *Aspergillus fumigatus* izotypów IgG1 i IgG3 w grupie pacjentów z CRS i śluzem eozynofilowym (n=30) w odniesieniu do grupy kontrolnej [34]. W porównaniu z pacjentami z alergicznym nieżytem nosa (i ze zdiagnozowaną alergią na grzyby) oraz pacjentami z CRS, ale bez śluzu eozynofilowego, Pant i wsp. zaobserwowali, że swoiste dla grzybów IgG3 są charakterystyczne dla pacjentów ze śluzem eozynofilowym, bez względu na obecność grzybów, czy występującą na nie alergię [34]. Poziomy IgG2 i IgG4 są także podwyższone u pacjentów z CRS i śluzem eozynofilowym, jednakże nie są to poziomy istotnie wyższe od tych spotykanych u pacjentów z nieżytem nosa czy z CRS bez śluzu eozynofilowego. Wykazano niedawno, że ludzkie izotypy IgG2 i IgG4, które nie aktywują dopełniacza, ani nie wiążą dobrze receptorów Fc i chronią myszy BALB/c przed infekcją spowodowaną *Cryptococcus neoformans*. Co ciekawe, izotypy IgG1 i IgG3, które aktywują dopełniacz i wiążą wszystkie trzy klasy receptorów Fc, nie wykazywały działania ochronnego, a dodatkowo IgG1 obniżało zdolność przeżycia [37]. Izotyp IgG3 odgrywa rolę biologicznego markera

u pacjentów z CRS i śluzem eozynofilowym natomiast jego znaczenie w patogenezie pozostaje jak dotąd niewyjaśnione.

Podsumowanie

Jak dotąd nie zaobserwowano różnic w występowaniu alergii na grzyby pomiędzy pacjentami z CRS i osobami zdrowymi. Rola nadwrażliwości typu I w patogenezie nieinwazyjnych grzybiczych zapaleń nosa i zatok przynosowych jest kwestionowana, ponieważ u osób chorych podwyższone poziomy IgE dotyczyć mogą jednego grzyba, podczas gdy inne gatunki identyfikowane są w ich śluzie eozynofilowym. Niezbędne są dalsze badania w celu określenia roli swoistych dla grzybów IgG (szczególnie IgG1 i IgG3).

Komórkowa odpowiedź immunologiczna w zakażeniach grzybiczych w CRS

Prawidłowa odpowiedź immunologiczna zależy od gatunku grzyba, jego morfotypu oraz anatomicznej lokalizacji interakcji. W przeciwieństwie do drożdży i zarodników, grzybnie, ze względu na swój większy rozmiar, nie mogą być skutecznie fagocytowane i wymagają interakcji z różnymi komórkami specyficznymi dla procesu zapalnego [38]. Chociaż neutrofile, makrofagi i monocyty stanowią ważną linię obrony w zakażeniach grzybiczych, większość badań nad nieinwazyjnym grzybiczym zapaleniem nosa i zatok przynosowych dotyczy roli eozynofilów. Eozynofile uważane są za główne komórki efektorowe w reakcjach alergicznych. Syntetyzują, magazynują i uwalniają szeroką gamę różnorodnych mediatorów prozapalnych, włączając cztery typy białek kationowych (główne białko zasadowe (*major basic protein* – MBP), eozynofilowe białko kationowe (*eosinophil cationic protein* – ECP), neurotoksynę eozynofilo-zależną (*eosinophil derived neurotoxin* – EDN), peroksydazę eozynofilową (*eosinophil peroxidase* – EPO) oraz aż do 23 cytokin i czynników wzrostu. Oprócz zaangażowania w reakcje alergiczne o charakterze zapalnym, eozynofile odgrywają także ważną rolę w niealergicznym zapaleniu i odporności gospodarza na pasożyty jelitowe [39].

Czy obecność grzybów jest powiązana z tkankową eozynofilią?

Ponikau i wsp. zaobserwowali, że w niemal wszystkich próbkach tkanek pobranych od pacjentów z CRS można zaobserwować nie tylko grzyby, ale również eozynofile, jednakże obserwacja ta jest kwestionowana przez wielu autorów [3]. Wykazano, że w zależności od regionu analizowanej tkanki proces zapalny jest zróżnicowany i może mieć postać eozynofilii lub może przebiegać bez

jej udziału [40]. Staranne pobranie fragmentów tkanek wraz ze śluzem jest zatem konieczne dla określenia zakresu eozynofilii oraz miejsca i wzoru ich degranulacji [3,20,40,41]. Dokładna analiza wielu fragmentów tej samej próbki pozwoli też uniknąć otrzymania wyników fałszywie negatywnych, które wg różnych autorów wyjaśniają brak eozynofilii u pacjentów z CRS [20,40]. Pomimo obecności grzybów, zarówno u pacjentów z CRS, jak i pacjentów z grupy kontrolnej, eozynofilia tkankowa obserwowana jest wyłącznie w tej pierwszej grupie osób.

Czy odmienna odpowiedź immunologiczna z udziałem eozynofilów na powszechnie w środowisku grzyby przenoszone drogą powietrzną jest czynnikiem odróżniającym pacjentów z CRS od osób zdrowych z grupy kontrolnej?

Wei i wsp., przy użyciu komory Boydena i w obecności śluzu nosowego oraz tkanki pobranej z nosa chorych osób, zbadali zakres migracji eozynofilów pacjentów zdrowych i z CRS. Zaobserwowali zależną od stężenia, zwiększoną migrację eozynofilów w kierunku zarówno śluzu nosowego, jak i ekstraktów tkanki nosowej pobranej od pacjentów z CRS [42], przy czym procent migracji był wyższy dla eozynofilów otrzymanych od chorych pacjentów. Należy zaznaczyć, że 9 na 10 pacjentów z CRS miało zdiagnozowaną astmę, a 4 z 10 było atopowych. Chociaż Wei i wsp. zaobserwowali większą (choć ze względu na rozmiar grupy badanej nieistotną) migrację eozynofilów u pacjentów atopowych niż nieatopowych, wpływ astmy nie został wzięty pod uwagę. Niektóre badania wskazują, że eozynofile osób z astmą (alergiczną bądź nie) są fenotypowo komórkami aktywowanymi, co jest najprawdopodobniej konsekwencją interakcji eozynofilów z cytokinami krwi obwodowej; prowadzi to do zwiększonej migracji, adhezji i zdolności do degranulacji [43-45]. Opierając się na wynikach dotychczasowych badań trudno jest jednoznacznie stwierdzić, czy zwiększona migracja eozynofilów jest konsekwencją CRS, czy też jest związana z astmą i/lub atopią.

Jeśli powszechnie występujące i przenoszone drogą powietrzną grzyby indukują eozynofilię tkankową u osób wrażliwych, to czy w aktywacji eozynofilów zaangażowany jest mechanizm zależny od komórek T?

Jeśli grzyby są zdolne indukować komórki stanu zapalnego w celu wywołania złożonej reakcji z udziałem eozynofilów u osób wrażliwych, to można założyć że w proces ten zaangażowane są także komórki T, które reagują na antygeny grzy-

bów poprzez produkcję komórek T pomocniczych 2 (*T helper cells* – TH2) oraz indukcję produkcji cytokin, m.in. interleukiny-5 (IL-5) i IL-13. IL-5 jest najważniejszą cytokiną indukującą zapalenie z udziałem eozynofików, stymulującą ich produkcję, chemotaksję, przeżycie i aktywację [46]. IL-13 indukuje zaś ekspresję cząsteczek adhezji komórkowej naczyń 1 (*vascular cell adhesion molecule 1* – VCAM-1), zaangażowanych w selektywną migrację eozynofików z układu naczyniowego do tkanki [46].

Przy założeniu, że grzyby są zdolne do indukcji reakcji zapalnej z udziałem eozynofików u osób z CRS, ale nie u zdrowych osób z grupy kontrolnej, możliwym wytłumaczeniem tego zjawiska jest fakt, że obie grupy różnią się od siebie pod względem odpowiedzi na antygeny grzybów, zachodzących z udziałem komórek T. Chociaż Shin i wsp. nie zaobserwowali znaczących różnic w proliferacji jednojądrzastych komórek krwi obwodowej (*peripheral blood mononuclear cells* – PBMCs) w hodowli zawierającej ekstrakty czterech powszechnie występujących grzybów (*Alternaria alternata*, *Aspergillus fumigatus*, *Cladosporium herbarum* i *Penicillium notatum*) pomiędzy pacjentami z CRS i zdrowymi, to jednak uderzające różnice zaobserwowano w przypadku produkowanych przez PBMCs cytokin. 89% PBMCs otrzymanych od pacjentów z CRS i hodowanych z ekstraktem *Alternaria alternata*, produkowało istotnie więcej IL-5 i IFN- γ niż grupa kontrolna. Dodatkowo, u niektórych pacjentów zaobserwowano wzmożoną produkcję IL-5 w odpowiedzi na antygeny *Aspergillus fumigatus* (22%) i *Cladosporium herbarum* (33%). PBMCs izolowane od wszystkich pacjentów z CRS produkowały IL-13 w hodowli z ekstraktami *Alternaria alternata*, *Aspergillus fumigatus* i *Cladosporium herbarum* [36]. Chociaż 61% pacjentów wykazywała podwyższony poziom IgE skierowanych przeciw powszechnym aeroalergenom oraz u 78% pacjentów zdiagnozowano astmę oskrzelową, w badaniu tym nie zastosowano odpowiedniej grupy kontrolnej (tj. pacjentów z CRS bez alergii i astmy; pacjentów z CRS z alergią, ale bez astmy; pacjentów z CRS bez alergii, ale z astmą oraz pacjentów z alergicznym nieżytem nosa), utrudniając tym samym właściwą interpretację wyników badań. Chociaż autorzy wspominają, że odpowiedzi z udziałem cytokin w PBMCs są podobne u chorych pacjentów z atopią lub bez, rola astmy nie została wzięta pod uwagę. Haselden i wsp. wykazali, że PBMCs izolowane od pacjentów z astmą (alergiczną bądź niealergiczną) wytwarzają większe ilości IL-5 w odpowiedzi na alergen niż PBMCs izolowane od osób zdrowych i osób z alergicznym nieżytem nosa [47].

Czy inne mechanizmy, niezależne od komórek T, są zaangażowane w proces aktywacji eozynofików?

Grzyby przenoszone drogą powietrzną przyczyniają się do nasilenia objawów choroby alergicznej poprzez indukowanie reakcji immunologicznych zależnych od komórek TH2, których końcowym wynikiem jest eozynofilia tkankowa, jakkolwiek ostatnie badania wskazują, że grzyby mogą aktywować eozynofile także na drodze bezpośredniej. Niedawno, Inoue i wsp. w badaniu na eozynofikach izolowanych od zdrowych ochotników oraz pacjentów z alergicznym nieżytem nosa lub astmą dowiedli, że to *Alternaria alternata*, a nie IL-5, jest zdolna indukować produkcję IL-8 przez eozynofile, a także ekspresję powierzchniowej CD11b (β 2-integriny, będącej markerem aktywacji eozynofików [48]) oraz CD63 (białka błonowego związanego z lizosomami-3 będącego składnikiem ziarnistym błon eozynofików [49]). Dodatkowo, pomimo że molekularne mechanizmy egocytozy ziarnistości kationowych eozynofików są nie do końca poznane, to wiadomym jest, że międzykomórkowe i zewnątrzkomórkowe stężenie Ca^{2+} jest kluczowym czynnikiem w procesach degranulacji eozynofików indukowanych przez *Alternaria alternata* i *Penicillium notatum* [50]. W przypadku *Alternaria alternata* wykazano, że za wzrost stężenia wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} odpowiedzialne są, wrażliwe na toksynę krztuscową, receptory dla białka G [50]. Dowiedziono także, że stymulacja antygenami *Alternaria alternata* prowadzi do wzrostu tendencji do degranulacji eozynofików, izolowanych od wszystkich badanych osób. Należy jednak podkreślić, że eozynofile otrzymane od pacjentów z astmą bądź alergicznym nieżytem nosa uwalniały 70% więcej neurotoksyny eozynofilozależnej EDN po stymulacji *Alternaria alternata* niż osoby zdrowe [50]. Ciągłe niewyjaśniona jest przyczyna nasilenia wspomnianych procesów – czy są one bezpośrednim efektem działania antygenów *Alternaria alternata*, czy też może stanowią konsekwencję głównego fenotypu eozynofików, lub są wynikiem kombinacji obu z nich. Niestety, w powyższym badaniu nie uwzględniono eozynofików pacjentów z CRS, w związku z czym nie wiadomo czy podobne mechanizmy mogą mieć znaczenie w tym przypadku.

Podsumowanie

Eozynofile są wykrywane w niemal wszystkich próbkach pobranych z tkanek pacjentów z CRS. Ponieważ w każdej z analizowanych prób eozynofilia tkankowa ma charakter różnorodny, skrupulatna analiza wielu fragmentów jednej próbki jest niezbędna w celu uniknięcia wyników tzw.

falszywie pozytywnych. W celu potwierdzenia związku pomiędzy obecnością grzybów a wystąpieniem eozynofilii tkankowej u osób wrażliwych niezbędne jest przeprowadzenie dodatkowych badań, uwzględniających odpowiednie grupy kontrolne. Jeśli tak się rzeczywiście dzieje, udział procesów zależnych, jak i niezależnych od komórek T jest bardzo prawdopodobny.

Rola śluzu nosowego

Nabłonek nosa jest pierwszą barierą napotykaną przez wszelkie organizmy (w tym grzyby) przenoszone drogą powietrzną i tym samym stanowi obszar wzajemnego oddziaływania pomiędzy środowiskiem zewnętrznym a wnętrzem nosa. W prawidłowych warunkach nabłonek jest strukturą ściśle uporządkowaną i dzięki formacji ścisłych połączeń (tzw. *tight junctions*) pomiędzy komórkami oraz komórkami a matriks zewnątrzkomórkową, stanowi niemalże nieprzepuszczalną barierę. W ostatnim czasie dowiedziono, że to właśnie nabłonek nadzoruje przebieg procesów zapalnych oraz odpowiedzi związanych z przebudową (remodeling) błony śluzowej dróg oddechowych (praca pogładowa autorstwa Hackett i Knight [51]). Remodeling dróg oddechowych jest procesem patologicznym charakterystycznym dla astmy i CRS, na który składają się następujące procesy: metaplasja oraz zniszczenie struktury nabłonka nosa, zgrubienie podnabłonkowej blaszki podstawnej, wzrost ilości miofibroblastów, hipertrofia i rozrost mięśni gładkich dróg oddechowych, rozrost gruczołów wydzielniczych, angiogeneza oraz zmienione odkładanie i skład białek matriks zewnątrzkomórkowej (praca pogładowa autorstwa Busse i wsp. oraz Pawankar i wsp. [52,53]).

Jeżeli grzyby wywołują CRS, czy uszkodzenie nabłonka obserwowane w próbkach pobranych od chorych pacjentów jest wynikiem procesów zachodzących z udziałem komórek T, czy w patogenезę zaangażowane są może inne mechanizmy?

Uszkodzenie nabłonka obserwowane w próbkach pobranych od pacjentów z CRS może być wynikiem odpowiedzi immunologicznej wywołanej antygenem i zależnej od komórek TH2, która niekiedy prowadzi do uwolnienia toksycznych ziarnistości eozynofilowych. Eozynofilowe białka kationowe są toksyczne dla komórek nabłonka dróg oddechowych i ich uwolnienie prowadzi w warunkach *in vitro* do zastoju rzęskowego, złuszczenia i zniszczenia tych komórek [54]. Wyniki ostatnich badań sugerują, że powszechnie występujące i przenoszone drogą powietrzną grzyby, zwłaszcza *Alternaria alternata* i *Aspergillus fumigatus*, wy-

twarzają proteazy, które przyłączają się do receptorów PARs (*protease-activated receptors*) na powierzchni komórek nabłonkowych, komórek dróg oddechowych, leukocytów i naczyń krwionośnych, tym samym aktywując międzykomórkowe drogi przesyłania sygnałów co prowadzi do wielu odpowiedzi, w tym produkcji chemokin, cytokin, eikozanoidów oraz metaloproteinaz, które mogą prowadzić do zniszczenia połączeń ścisłych między komórkami nabłonkowymi oraz między komórkami nabłonkowymi i błoną podstawną [55,56]. W odróżnieniu od proteaz *Aspergillus fumigatus* i *Cladosporium herbarum*, proteazy *Alternaria alternata* najsilniej indukują produkcję cytokin zapalnych (IL-6, IL-8) w komórkach nabłonkowych nosa [55]. Obserwacje te sugerują, że mechanizmy obronne w zakażeniach *Alternaria alternata* są odmienne niż w zakażeniach wywołanych innymi grzybami, nie tłumaczą one jednak różnych odpowiedzi immunologicznych u pacjentów z CRS i osób zdrowych. Niewyjaśniona jest także kwestia ewentualnego wpływu czynników genetycznych w ekspresji PARs lub innych, które wzmagają aktywność tych receptorów w odpowiedzi na stymulację proteazami grzybów.

Chociaż receptory PARs aktywowane antygenami grzybów mogą odgrywać rolę w remodelingu dróg oddechowych, to jednak sugeruje się też, że może być to proces niezależny w CRS. Ostatnio zaprezentowane wyniki biopsji u dzieci z astmą wykazały złogi kolagenu oraz proliferację fibrocytów poprzedzające naciek eozynofilowy w płucach, sugerując tym samym, że nabłonek astmatyków nie funkcjonuje poprawnie, nawet przy braku toczących się reakcji zapalnych [57]. Uszkodzenia nabłonka są obserwowane także u niemal wszystkich pacjentów z CRS, za wyjątkiem pacjentów z alergicznym nieżytem nosa, u których występują objawy charakterystyczne dla tych dwóch chorób (np. zwiększona produkcja śluzu, eozynofilia tkankowa, obecność grzybów). Podobne wewnętrzne nieprawidłowości w strukturze nabłonka mogą więc wyjaśniać rozwinięcie się choroby u osób wrażliwych. Przy takim założeniu, rolę grzybów można porównać do „unieruchomionych pasażerów” bądź katalizatorów reakcji.

Podsumowanie

Przebudowa (remodeling) dróg oddechowych jest procesem patologicznym, charakterystycznym zarówno dla astmy, jak i dla CRS. Wykazano, że w przypadku astmy proces ten może przebiegać niezależnie od stanu zapalnego. Zaangażowanie grzybów w remodeling (na drodze degranulacji eozynofili lub aktywacji receptorów PARs) pozostaje jednak jak dotąd niewyjaśnione.

Leczenie antygrzybicze

Jeżeli procesy zapalne zachodzące u pacjentów z CRS są rzeczywiście wynikiem reakcji immunologicznej na grzyby, to ich zahamowanie powinno łagodzić objawy choroby [3]. Dobrze dobrana terapia powinna doprowadzić do wyeliminowania grzyba, jednocześnie nie przynosząc szkody organizmowi gospodarza. W 1996 r. Bent i Kuhn *in vitro* ocenili wpływ 5 powszechnie stosowanych leków przeciwgrzybiczych (ketokonazolu, amfoterycyny B, itraconazolu, nystatyny i flukonazolu) na 22 kulturach grzybów wyizolowanych od 15 pacjentów z AFS. Najskuteczniej działającymi, niezależnie od rodzaju grzyba, okazały się ketokonazol i amfoterycyna B [58]. Amfoterycyna B wykazuje działanie specyficzne w stosunku do grzybów powszechnie izolowanych z nosa i zatok przynosowych [59]. Pomimo obserwowanej skuteczności klinicznej możliwości układowego stosowania tego antybiotyku są ograniczone ze względu na występowanie szeregu reakcji ubocznych (gorączki, dreszczy, mdłości, biegunki, neu-

tropenii, a także uszkodzenia nerek i wątroby). Z tego też względu lepszym wydaje się być miejscowe stosowanie leku, gdyż lokalnie osiągnane wysokie jego stężenia nie prowadzą do ww. skutków ubocznych.

Oznaczenia wprowadzone przez Amerykańską Agencję do Spraw Żywności i Leków (US Food and Drug Administration) zakładają jedynie dożylne podawanie amfoterycyny B, znane są jednak inne alternatywne drogi aplikacji tego leku (np. do jamy opłucnowej [60], pęcherza [61-63], stawów maziówkowych [64] i jamy otrzewnowej [65]).

Czy lokalnie stosowana amfoterycyna B jest skuteczna w leczeniu CRS?

W ostatnich latach przeprowadzono szereg badań oceniających efektywność miejscowego stosowania leków przeciwgrzybiczych w terapii CRS (tab. III). W 2002 r., w otwartej próbie klinicznej przeprowadzonej w Klinice Mayo u 51 pacjentów z CRS, oceniono wpływ amfoterycyny B podawanej donosowo [32]. Po 3 miesiącach terapii u 38

Tabela III. Badania dotyczące miejscowego i doustnego podawania leków przeciwgrzybiczych u pacjentów z CRS

Autor	Rok	Kraj	Postać aktywna leku (n)	Placebo (n)	Nazwa leku	Rozpuszczalnik	Dawka	Czas trwania terapii	Technika	Projekt badania	Poziom istotności	Wynik badania
Ponikau i wsp. [32]	2002	US	51	0	Amfoterycyna B	Sterylna woda	100µg/ml 20ml 2x dziennie do każdego z nozdrzy	3-17 miesiące	Płukanie nosa	1 ośrodek, brak kontroli z placebo	Poziom III	Pozytywny
Ricchetti i wsp. [67]	2002	Szwajcaria	74	0	Amphomoronal (Bristol-Myers Squibb)	Sterylna woda	1:1000 20ml 2x dziennie do każdego z nozdrzy	4 tygodnie	Płukanie nosa	1 ośrodek, brak kontroli z placebo	Poziom III	Pozytywny
Weschta i wsp. [18]	2004	Niemcy	28	32	Amfoterycyna B (Bristol-Myers Squibb)	5% glukoza (w fosforanie sodu)	3mg/ml 200µl 4x dziennie do każdego z nozdrzy	8 tygodni	Aerozol do nosa	1 ośrodek, podwójnie ślepa kontrolowana placebo	Poziom Ib	Negatywny
Ponikau i wsp. [25]	2005	US	10	14	Amfoterycyna B	Sterylna woda	250µg/ml 20ml 2x dziennie do każdego z nozdrzy	6 miesiące	Płukanie nosa	1 ośrodek, podwójnie ślepa kontrolowana placebo	Poziom Ib	Pozytywny (CT) i negatywny (objawy)
Kennedy i wsp. [21]	2005	US	25	28	Terbinafina (Novartis Pharma AG)		625mg/ dzień	6 tygodni	Doustne	1 ośrodek, podwójnie ślepa kontrolowana placebo	Poziom Ib	Negatywny
Ebbens i wsp. [33]	2006	Holandia, Wielka Brytania, Hiszpania, Belgia	59	57	Amfoterycyna B (Bristol-Myers Squibb)	2,5% glukoza	100µg/ml 20ml 2x dziennie do każdego z nozdrzy	13 tygodni	Płukanie nosa	Wiele ośrodków, podwójnie ślepa kontrolowana placebo	Poziom Ib	Negatywny

(75%) pacjentów zaobserwowano wyraźną poprawę w zakresie objawów zapalenia zatok oraz lepsze wyniki endoskopowego badania nosa. Choć u 12 z 13 badanych osób wykazano poprawę w obrazie CT zatoki szczękowej to należy zaznaczyć, że zmniejszenie grubości błony śluzowej w CT zatok szczękowych słabo korelowało z poprawą objawów choroby [66]. Ponieważ do drugiego badania CT wyselekcjonowano jedynie 13 z 51 pacjentów należy pamiętać, że wyniki badania są dodatkowo obciążone błędem wynikającym z selekcji osób. Ponieważ w badaniu tym nie zastosowano grupy kontrolnej z placebo, nie wiadomo zatem, czy obserwowana efektywność terapii była wynikiem zastosowania amfoterycyny B, czy może raczej płukania nosa.

W tym samym roku przeprowadzono podobne badanie u 74 osób, w którym oceniono wpływ amfoterycyny B podawanej donosowo przez okres 4 tygodni w leczeniu polipów nosa [67]. U 29 (39%) pacjentów zaobserwowano całkowite cofnięcie się objawów choroby, z których 62% miało zdiagnozowane polipy tylko w przewodzie nosowym środkowym, a 42% dodatkowo poza przewodem nosowym środkowym. Poprawy nie zaobserwowano u żadnego z pacjentów z polipami obejmującymi całą jamę nosa co sugeruje, że rozległość choroby ma wpływ na ostateczny wynik leczenia. Oprócz stopnia rozwoju polipów zauważono także lepszy wynik leczenia u chorych z przebytą wcześniej operacją nosa (ESS). Może być to spowodowane lepszą penetracją leku w jamach pooperacyjnych. W badaniu tym także nie zastosowano jednak grupy kontrolnej z placebo.

W innym badaniu, stosującym dla odmiany grupę kontrolną z placebo, nie zaobserwowano korzyści z długoterminowego (8 tygodniowego) stosowania amfoterycyny B w postaci donosowej u 78 pacjentów z CRS [18]. W sumie, zgodnie z protokołem, badanie ukończyło 60 osób. Choć stopień penetracji amfoterycyny B okazał się być gorszy w przypadku płukania nosa, zwłaszcza w pozycji klęczącej [68] w porównaniu z podawaniem w aerozolu donosowym, to jednak objawy były gorsze po terapii aerozolowej. W przypadku pozostałych parametrów, tj. obrazu CT oceniającej stopień zacienienia zatok, poziomu jakości życia, wyniku badania endoskopowego oraz obecności grzybów w popłuczynach z nosa badane grupy osób nie różniły się od siebie. Co ważne, żaden z ocenianych parametrów nie poprawił się w podgrupie pacjentów, u których wykryto obecność grzybów przed rozpoczęciem terapii, ale nie po jej zakończeniu, tym samym kwestionując hipotezę, że wyeliminowanie czynnika wywołującego cho-

robę poprawia jej przebieg.

W innym badaniu z zastosowaniem randomizowanej podwójnie ślepej próby z placebo oceniono skuteczność amfoterycyny B w leczeniu 30 pacjentów z CRS [25]. Tylko 24 osoby z 30 zakończyły 6-miesięczny okres terapii. Choć obraz CT wykazał istotne o 8,8% zmniejszenie pogrubienia błony śluzowej (główny wynik pomiaru), to w świetle wyników wcześniejszego badania wskazującego na słabą korelację pogrubionej zapalnej błony śluzowej z objawami choroby [66] znaczenie kliniczne tej obserwacji pozostaje niejasne. Ocena laboratoryjna wykazała, że po terapii amfoterycyną B następuje spadek poziomów neurotoksyny eozynofilozależnej EDN (za wyjątkiem IL-5, białka *Alternaria* i eozynofili). Choć wyniki endoskopii nosa wskazują na znaczną poprawę, objawy choroby (SNOT-20) nie zmieniły się.

W niedawno przeprowadzonym w Europie wieloośrodkowym dużym badaniu z zastosowaniem podwójnie ślepej próby kontrolowanej placebo, oceniono wpływ płukania nosa amfoterycyną B u 116 pacjentów z CRS. Otrzymane wyniki są sprzeczne z wyżej opisanymi badaniami, jednakże są zgodne z doniesieniem Weschta i wsp. [18]. Po 3 miesiącach terapii antybiotykiem nie wykazano poprawy w zakresie objawów choroby (ocena w skali wizualno-analogowej, *visual analogue scale* – VAS), stopniu niedrożności nosa (ocena przepływu nosowego powietrza, *peak nasal inspiratory flow* – PNIF), wynikach endoskopii nosa, rozległości polipów, jakości życia (*rhinosinusitis outcome measure 31* – RSOM-31), short form 36 (SF-36)), sugerując tym samym, że miejscowe stosowanie amfoterycyny B nie przynosi istotnej poprawy klinicznej [33].

Czy podawane doustnie leki przeciwgrzybicze są skuteczne w terapii CRS?

Kilka badań donosi o efektywności terapii CRS z zastosowaniem doustnych leków przeciwgrzybiczych. Rains i Mineck, w badaniu retrospektywnym obejmującym 12 lat, ocenili 139 pacjentów na podstawie kryteriów AFS atopii grzybiczej, charakterystycznych wyników radiografii, obecności śluzu eozynofilowego, polipowatości nosa i pozytywnego wyniku barwienia w kierunku hodowli grzybów i wykazali, że doustnie podawany itraconazol, w połączeniu z miejscowo i doustnie aplikowanymi kortykosteroidami, może prowadzić do ograniczenia ryzyka powtórnej operacji [69]. Nasuwa się jednak pytanie, czy obserwowane wyniki są efektem wzmożonego działania kortykosteroidów, czy raczej przeciwgrzybiczych właściwości itraconazolu.

Kennedy i wsp. [21] w badaniu klinicznym z zastosowaniem podwójnie ślepej próby kontrolowanej placebo, testowali skuteczność wysokich dawek terbinafiny (625mg/dzień) u 53 pacjentów z CRS podawanych przez okres 6 tygodni, jednakże nie potwierdzili doniesień Rains i wsp. [69]. Obserwowany brak znaczącej poprawy w zakresie całkowitego wskaźnika zacięnienia zatok (CT zatok), całkowitego wskaźnika zatkania nosa (CT zatok), całkowity wskaźnik niepełnosprawności związanej z zapaleniem nosa i zatok przynosowych (*total rhinosinusitis disability index* – RSDI) oraz związanej z nią sfery czynnościowej, fizycznej i emocjonalnej, jest jednak zgodny z wcześniejszymi wynikami badań nad miejscowo stosowanymi lekami przeciwgrzybiczymi [18,33]. Po zakończeniu terapii dokonano pomiaru poziomu leku w bioptatach z zatok niektórych pacjentów. Poziom terbinafiny utrzymywał się w zakresie minimalnego stężenia hamującego (*minimum inhibitory concentration* – MIC), tym samym pełniąc aktywną rolę w leczeniu CRS [21]. Nasuwa się też pytanie, czy biodostępność tkankowa terbinafiny jest taka sama przy jej podawaniu doustnym i na błonę śluzową nosa. Ponikau i wsp. zasugerowali, że grzyby rezydują poza błonę śluzową, poza zasięgiem krążącego leku [3]. Żeby osiągnąć pozytywny wynik terapii, podany ogólnie lek przeciwgrzybiczy powinien być wydzielany przez błonę śluzową zatok, jednakże takie zjawisko jak dotąd nie zostało udokumentowane i może nie mieć w ogóle miejsca.

Czy miejscowo stosowana amfoterycyna B jest bezpieczna dla pacjenta?

Pomimo wielu udokumentowanych korzyści z miejscowego stosowania leków wiadomym jest, że często mogą one wywoływać efekt cytotoksyczny. W celu zbadania tej hipotezy, Hofer i wsp. sprawdzili wpływ miejscowo aplikowanej amfoterycyny B na częstość ruchu rzęsek (*ciliary beat frequency* – CBF). W przypadku zawieszenia leku w dawce 0,1mg/ml roztworu soli fizjologicznej nie zaobserwowano żadnego wpływu antybiotyku na CBF. Natomiast w przypadku zawieszenia amfoterycyny B w roztworze wody destylowanej, poziom CBF był obniżony o 50%, sugerując tym samym, że należy stosować fizjologiczne rozpuszczalniki [70]. Gosepath i wsp. potwierdzili te doniesienia wykazując minimalny poziom toksyczności w stosunku do rzęsek przy małych stężeniach (2,5%; 5%) amfoterycyny B oraz spadek CBF przy wysokich dawkach leku (10%) [71]. Chociaż dotychczasowe badania sugerują, że cytotoksyczność opisanych dawek jest mało prawdopodobna, to jednak efekt powtarzanych dawek leków na przetrzeleni czasu na CBF jest nieznan.

Jeśli amfoterycyna B jest skuteczna, jaki jest jej mechanizm działania przy podawaniu miejscowym?

Sugeruje się, że miejscowo stosowana amfoterycyna B prowadzi do redukcji liczby grzybów, tym samym zmniejszając odpowiedź immunologiczną w obrębie nosa i zatok przynosowych i w konsekwencji prowadząc do wyleczenia CRS. W ostatnich badaniach wykazano, że oprócz wyżej opisanego efektu lek ten ma także działanie cytotoksyczne na komórki nabłonkowe polipów występujących w obrębie nosa. Amfoterycyna B jest czynnikiem wiążącym sterole, wykazującym duże powinowactwo do ergosterolu (głównego sterolu u grzybów) i niskie powinowactwo do cholesterolu (sterol u ssaków). Antybiotyk ten modyfikuje strukturę błon komórkowych, tak że zwiększa się ich przepuszczalność na małe jony (napływ Na^+ , wypływ K^+) i w konsekwencji prowadzi do aktywacji pompy $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP-azy}$ oraz modyfikacji transnabłonkowej oporności. Jornot i wsp. ocenili wpływ amfoterycyny B (w dawce 50M, 4 godz/dzień przez 5 dni) na ludzkie komórki nabłonkowe polipów nosa i zaobserwowali wzrost przepuszczalności komórek oraz w konsekwencji zniszczenie integralności jednej warstwy komórek (co zademonstrowano na podstawie 60% spadku oporności transnabłonkowej). Dodatkowo, przy zastosowaniu mikroskopii immunofluorescencyjnej, autorzy zaobserwowali utratę istotnej ilości komórek oraz spadek ekspresji białka połączeń ścisłych – okludyzy. W obrębie komórek nabłonkowych małżowin nosowych spójność struktury została zachowana (tzn. nie zaobserwowano zmian w transnabłonkowej oporności), co sugeruje różny wpływ amfoterycyny B na te dwa rodzaje komórek [72]. W przypadku komórek nabłonkowych małżowin nosowych Jornot i wsp. zaobserwowali, że terapia amfoterycyną B wpływa na spadek potencjałów transnabłonkowych oraz absorpcję Na^+ . Zahamowanie transportu Na^+ początkowo wiązano ze spadkiem aktywności kanału dla tych jonów (EnaC), prowadzącym do spadku aktywności pompy $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATP-azy}$ i obniżenia przewodnictwa K^+ , co prawdopodobnie odzwierciedla mechanizmy ujemnego sprzężenia zwrotnego, mające na celu ograniczenie nadmiaru komórkowego Na^+ oraz wyczerpanie K^+ zaraz po utworzeniu przez amfoterycynę B porów w błonie komórkowej [73]. Kwestia wpływu wspomnianych mechanizmów na naruszenie integralności warstwy komórek oraz śmierć komórek nabłonka polipów pozostaje jak dotąd niewyjaśniona.

Sugeruje się, że oprócz efektów cytotoksycznych na komórki nabłonka u pacjentów z CRS i polipami nosa, amfoterycyna B może wykazywać także

właściwości przeciwzapalne. Jednakże, w badaniu ze stosowaną miejscowo przez 4 tygodnie amfoterycyną B (w dawce 50 lub 100mg/l, 10ml 2x dziennie) nie wykazano istotnego spadku IL-5, IL-8, IFN- γ oraz poziomów RANTES (*regulated upon activation of normal T cell expressed and secreted*) [74]. Dodatkowo, 8-tygodniowa terapia miejscowa amfoterycyną B podawaną w postaci aerozolu (w dawce 3mg/ml, 200ml/nozdrze, 4x dziennie) nie wykazała istotnej redukcji poziomów ECP i tryptazy w popłuczynach nosa pacjentów z CRS. Ani miejscowo stosowana amfoterycyna B, ani stan zakażenia grzybami przed i po terapii nie miały istotnego wpływu na poziomy ECP oraz tryptazy, jednakże niewielka poprawa w poziomie ECP została zaobserwowana w przypadku pacjentów, u których skutecznie wyeliminowano grzyby, w porównaniu z osobami z przewlekłym zakażeniem grzybiczym [75].

Podsumowanie

Pomimo wcześniejszych wyników badań bez grup kontrolnych wskazujących na bezpieczeństwo i korzyści ze stosowania amfoterycyny B w terapii CRS [32,67], kolejne badania uwzględniające podwójnie ślepą próbę kontrolowaną placebo albo nie potwierdzały tej hipotezy [18,33], albo co najwyżej wykazywały umiarkowaną korzyść z klinicznego zastosowania tego antybiotyku u pacjentów z CRS [25]. Chociaż zakłada się, że właściwości terapeutyczne amfoterycyny B są wynikiem jej działania przeciwgrzybiczego, to jednak możliwe jest, że wynikają one także z wybiórczego cytoto-

ycznego działania tego antybiotyku na nabłonek w CRS. Mało prawdopodobnym wydaje się być przeciwzapalne działanie amfoterycyny B stosowanej miejscowo. Podobnie jak w przypadku miejscowo podawanych leków przeciwgrzybiczych, nie ma przesłanek do rutynowego stosowania doustnych środków przeciwgrzybiczych w leczeniu pacjentów z CRS [21].

Wnioski i wskazówki na przyszłość

Rola grzybów w CRS ciągle pozostaje nie do końca zdefiniowana. Chociaż wiele badań wskazuje na obecność grzybów i eozynofiliów u niemal wszystkich chorych pacjentów, to jednak należy pamiętać, że grzyby są czasami izolowane także od osób zdrowych. Obecnie więcej jest pytań niż odpowiedzi na temat przyczyn CRS i roli jaką odgrywają w nim grzyby. Ostatnie badania sugerują zaangażowanie wielu różnych mechanizmów, które umożliwiają grzybom wywołanie choroby. Przyszłe badania powinny mieć na celu wyjaśnienie roli grzybów w patogenezie CRS, określenie jaki organizm lub jaki składnik organizmów grzybów jest patogenny, jakie osoby są podatne na rozwój choroby oraz jakie są charakterystyczne cechy odpowiedzi immunologicznej na grzyby prowadzące do rozwinięcia się CRS. Obecnie, przy braku przekonujących danych immunologicznych (uwzględniając badania z odpowiednimi grupami kontrolnymi) kwestia klinicznych korzyści z miejscowego bądź ogólnego stosowania leków przeciwgrzybiczych ciągle pozostaje niewyjaśniona.

Piśmiennictwo

1. Fokkens WJ, Lund VJ, Mullol J i wsp. European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps 2007. *Rhinol* 2007; 45(Suppl 20): 1-139.
2. deShazo RD, Chapin K, Swain RE. Fungal sinusitis. *N Engl J Med* 1997; 337: 254-259.
3. Ponikau JU, Sherris DA, Kern EB, Homburger HA, Frigas E, Gaffey TA i wsp. The diagnosis and incidence of allergic fungal sinusitis. *Mayo Clin Proc* 1999; 74: 877-884.
4. Katzenstein AL, Sale SR, Greenberger PA. Allergic Aspergillus sinusitis: a newly recognized form of sinusitis. *J Allergy Clin Immunol* 1983; 72: 89-93.
5. Robson JM, Hogan PG, Benn RA, Gatenby PA. Allergic fungal sinusitis presenting as a paranasal sinus tumour. *Aust N Z J Med* 1989; 19: 351-353.
6. Bent JP, III, Kuhn FA. Diagnosis of allergic fungal sinusitis. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1994; 111: 580-588.
7. deShazo RD, Swain RE. Diagnostic criteria for allergic fungal sinusitis. *J Allergy Clin Immunol* 1995; 96: 24-35.
8. Ferguson BJ. Eosinophilic mucin rhinosinusitis: a distinct clinicopathological entity. *Laryngoscope* 2000; 110: 799-813.
9. Catten MD, Murr AH, Goldstein IA, Mhatre AN, Lalwani AK. Detection of fungi in the nasal mucosa using polymerase chain reaction. *Laryngoscope* 2001; 111: 399-403.
10. Rao AK, Mathers PH, Ramadan HH. Detection of fungi in the sinus mucosa using polymerase chain reaction. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2006; 134: 581-585.
11. Polzehl D, Weschta M, Podbielski A, Riechelmann H, Rimek D. Fungus culture and PCR in nasal lavage samples of patients with chronic rhinosinusitis. *J Med Microbiol* 2005; 54: 31-37.
12. Kostamo K, Richardson M, Virolainen-Julkunen A, Leivo I, Malmberg H, Ylikoski J i wsp. Microbiology of chronic hyperplastic sinusitis. *Rhinology* 2004; 42: 213-218.
13. Granville L, Chirala M, Cernoch P, Ostrowski M, Truong LD. Fungal sinusitis: histologic spectrum and correlation with culture. *Hum Pathol* 2004; 35: 474-481.
14. Jiang RS, Su MC, Lin IF. Nasal mycology of chronic rhinosinusitis. *Am J Rhinol* 2005; 19: 131-133.
15. Scheuller MC, Murr AH, Goldberg AN, Mhatre AN, Lalwani AK. Quantitative analysis of fungal DNA in chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope* 2004; 114: 467-471.

16. Kim SI, Choi JH, Jeon HG, Cha HE, Hwang YJ, Chung YS. Comparison between polymerase chain reaction and fungal culture for the detection of fungi in patients with chronic sinusitis and normal controls. *Acta Otolaryngol* 2005; 125: 72-75.
17. Murr AH, Goldberg AN, Vesper S. Fungal speciation using quantitative polymerase chain reaction (QPCR) in patients with and without chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope* 2006; 116:1342-1348.
18. Weschta M, Rimek D, Formanek M, Polzehl D, Podbielski A, Riechelmann H. Topical antifungal treatment of chronic rhinosinusitis with nasal polyps: a randomized, double-blind clinical trial. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113: 1122-1128.
19. Taylor MJ, Ponikau JU, Sherris DA, Kern EB, Gaffey TA, Kephart G i wsp. Detection of fungal organisms in eosinophilic mucin using a fluorescein-labeled chitin-specific binding protein. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2002; 127: 377-383.
20. Braun H, Buzina W, Freudenschuss K, Beham A, Stammberger H. 'Eosinophilic fungal rhinosinusitis': a common disorder in Europe? *Laryngoscope* 2003; 113: 264-269.
21. Kennedy DW, Kuhn FA, Hamilos DL, Zinreich SJ, Butler D, Warsi G i wsp. Treatment of chronic rhinosinusitis with high-dose oral terbinafine: a double blind, placebo-controlled study. *Laryngoscope* 2005; 115: 1793-1799.
22. Corradini C, Del NM, Buonomo A, Nucera E, Paludetti G, Alonzi C i wsp. Amphotericin B and lysine acetylsalicylate in the combined treatment of nasal polyposis associated with mycotic infection. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2006; 16: 188-193.
23. Buzina W, Braun H, Freudenschuss K, Lackner A, Habermann W, Stammberger H. Fungal biodiversity - as found in nasal mucus. *Med Mycol* 2003; 41: 149-161.
24. Gosepath J, Brieger J, Vlachtsis K, Mann WI. Fungal DNA is present in tissue specimens of patients with chronic rhinosinusitis. *Am J Rhinol* 2004; 18: 9-13.
25. Ponikau JU, Sherris DA, Weaver A, Kita H. Treatment of chronic rhinosinusitis with intranasal amphotericin B: a randomized, placebo-controlled, double-blind pilot trial. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115: 125-131.
26. Ragab A, Clement P, Vincken W, Nolard N, Simones F. Fungal cultures of different parts of the upper and lower airways in chronic rhinosinusitis. *Rhinology* 2006; 44: 19-25.
27. Lackner A, Stammberger H, Buzina W, Freudenschuss K, Panzitt T, Schosteritsch S i wsp. Fungi: a normal content of human nasal mucus. *Am J Rhinol* 2005; 19: 125-129.
28. Ferguson BJ, Barnes L, Bernstein JM, Brown D, Clark CE, III, Cook PR i wsp. Geographic variation in allergic fungal rhinosinusitis. *Otolaryngol Chin North Am* 2000; 33: 441-449.
29. Faure O, Fricker-Hidalgo H, Lebeau B, Mallaret MR, mbroise-Thomas F, Grillot R. Eight-year surveillance of environmental fungal contamination in hospital operating rooms and haematological units. *J Hosp Infect* 2002; 50: 155-160.
30. Lebowitz RA, Waltzman MN, Jacobs JB, Pearlman A, Tiemo PM. Isolation of fungi by standard laboratory methods in patients with chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope* 2002; 112: 2189-2191.
31. Mitakakis TZ, Barnes C, Tovey ER. Spore germination increases allergen release from *Alternaria*. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107: 388-390.
32. Ponikau JU, Sherris DA, Kita H, Kern EB. Intranasal antifungal treatment in 51 patients with chronic rhinosinusitis. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110: 862-866.
33. Ebbens FA, Scadding GK, Badia L, Hellings PW, Jorissen M, Mullol J i wsp. Amphotericin B nasal lavages: not a solution for patients with chronic rhinosinusitis. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118: 1149-1156.
34. Pant H, Kette FE, Smith WB, Wormald PJ, Macardle PJ. Fungal-specific humoral response in eosinophilic mucus chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope* 2005; 115: 601-606.
35. Terho E, Frew AJ. Type III allergy skin testing. Position statement for EAACI Subcommittee on Skin Tests and Allergen Standardization. *Allergy* 1995; 50: 392-396.
36. Shin SH, Ponikau JU, Sherris DA, Congdon D, Frigas F, Homburger HA i wsp. Chronic rhinosinusitis: an enhanced immune response to ubiquitous airborne fungi. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114: 1369-1375.
37. Beenhouwer DO, You EM, Lai CW, Rocha MA, Morrison SL. Human immunoglobulin G2 (IgG2) and IgG4, but not IgG1 or IgG3, protect mice against *Cryptococcus neoformans* infection. *Infect Immun* 2007; 75: 1424-1435.
38. Shoham S, Levitz SM. The immune response to fungal infections. *Br J Haematol* 2005; 129: 569-582.
39. Prussin C, Metcalfe DD. 5. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *IJ Allergy Clin Immunol* 2006; 117(2 Suppl Mini-Primer): 8450-8456.
40. Ponikau JU, Sherris DA, Kephart GM, Kern EB, Galley TA, Tarara JE i wsp. Features of airway remodeling and eosinophilic inflammation in chronic rhinosinusitis: is the histopathology similar to asthma? *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112: 877-882.
41. Ponikau JU, Sherris DA, Kephart GM, Kern EB, Congdon DJ, Adolphson CR i wsp. Striking deposition of toxic eosinophil major basic protein in mucus: implications for chronic rhinosinusitis. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116: 362-369.
42. Wei JL, Kita H, Sherris DA, Kern EB, Weaver A, Ponikau JU. The chemotactic behavior of eosinophils in patients with chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope* 2003; 113: 303-306.
43. Hakansson L, Carlson M, Stalenheim G, Venge P. Migratory responses of eosinophil and neutrophil granulocytes from patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1990; 85: 743-750.
44. Griffin E, Hakansson L, Formgren H, Jorgensen K, Venge P. Increased chemokinetic and chemotactic responses of eosinophils in asthmatic patients. *Allergy* 1991; 46: 255-265.
45. Koenderman L, van der BT, Schweizer RC, Warringa RA, Coffey P, Caldenhoven E i wsp. Eosinophil priming by cytokines: from cellular signal to in vivo modulation. *Eur Respir J Suppl* 1996; 22: 119s-25s.
46. Borish LC, Steinke JW. 2. Cytokines and chemokines. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111(2 Suppl): 8460-8475.
47. Haselden BM, Syrigou E, Jones M, Huston D, Ichikawa K, Chapman MD i wsp. Proliferation and release of IL-5 and IFN-gamma by peripheral blood mononuclear cells from cat-allergic asthmatics and rhinitics, non-cat-allergic asthmatics, and normal controls to peptides derived from Fel d 1 chain 1. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108: 349-356.

48. Kroegel C, Liu MC, Hubbard WC, Lichtenstein LM, Bochner BS. Blood and bronchoalveolar eosinophils in allergic subjects after segmental antigen challenge: surface phenotype, density heterogeneity, and prostanoid production. *J Allergy Clin Immunol* 1994; 93: 725-734.
49. Mahmudi-Azer S, Downey GP, Moqbel R. Translocation of the tetraspanin CD63 in association with human eosinophil mediator release. *Blood* 2002; 99: 4039-4047.
50. Inoue Y, Matsuwaki Y, Shin SH, Ponikau JU, Kita H. Nonpathogenic, environmental fungi induce activation and degranulation of human eosinophils. *J Immunol* 2005; 175: 5439-5447.
51. Hackett TL, Knight DA. The role of epithelial injury and repair in the origins of asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2007; 7: 63-68.
52. Busse W, Elias I, Sheppard D, Banks-Schlegel S. Airway remodeling and repair. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: 1035-1042.
53. Pawankar R, Nonaka M. Inflammatory mechanisms and remodeling in chronic rhinosinusitis and nasal polyps. *Curr Allergy Asthma Rep* 2007; 7: 202-208.
54. Frigas E, Motojima S, Gleich GJ. The eosinophilic injury to the mucosa of the airways in the pathogenesis of bronchial asthma. *Eur Respir J Suppl* 1991; 13: 123s-35s.
55. Kauffman HF, Tomee JF, van de Riet MA, Timmerman AJ, Borger P. Protease-dependent activation of epithelial cells by fungal allergens leads to morphologic changes and cytokine production. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105: 1185-1193.
56. Reed CE, Kita H. The role of protease activation of inflammation in allergic respiratory diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114: 997-1008.
57. Fedorov IA, Wilson SJ, Davies DE, Holgate ST. Epithelial stress and structural remodelling in childhood asthma. *Thorax* 2005; 60: 389-394.
58. Bent JP, III, Kuhn FA. Antifungal activity against allergic fungal sinusitis organisms. *Laryngoscope* 1996; 106: 1331-1334.
59. Wildfeuer A, Seidl HP, Paule I, Haberreiter A. In vitro evaluation of voriconazole against clinical isolates of yeasts, moulds and dermatophytes in comparison with itraconazole, ketoconazole, amphotericin B and griseofulvin. *Mycoses* 1998; 41: 309-319.
60. Kfoury AG, Smith JC, Farhoud HH, Terreros DA, Stringham JC, Taylor DO i wsp. Adjuvant intrapleural amphotericin B therapy for pulmonary mucormycosis in a cardiac allograft recipient. *Clin Transplant* 1997; 11: 608-612.
61. Fan-Havard P, O'Donovan C, Smith SM, Oh J, Bamberger M, Eng RH. Oral fluconazole versus amphotericin B bladder irrigation for treatment of candidal funguria. *Clin Infect Dis* 1995; 21: 960-965.
62. Jacobs LG, Skidmore EA, Freeman K, Lipschultz D, Fox N. Oral fluconazole compared with bladder irrigation with amphotericin B for treatment of fungal urinary tract infections in elderly patients. *Clin Infect Dis* 1996; 22: 30-35.
63. Leu HS, Huang CT. Clearance of funguria with short-course antifungal regimens: a prospective, randomized, controlled study. *Clin Infect Dis* 1995; 20: 1152-1157.
64. Bossler AD, Richter SS, Chavez AJ, Vogelgesang SA, Sutton DA, Grooters AM i wsp. Exophiala oligosperma causing olecranon bursitis. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 4779-4782.
65. Struijk DG, Krediet RT, Boeschoten EW, Rietra PJ, Arisz L. Antifungal treatment of Candida peritonitis in continuous ambulatory peritoneal dialysis patients. *Am J Kidney Dis* 1987; 9: 66-70.
66. Bhattacharyya T, Piccirillo J, Wippold FJ. Relationship between patient-based descriptions of sinusitis and paranasal sinus computed tomographic findings. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1997; 123: 1189-1192.
67. Ricchetti A, Landis BN, Maffioli A, Giger R, Zeng C, Lacroix JS. Effect of anti-fungal nasal lavage with amphotericin B on nasal polyposis. *J Laryngol Otol* 2002; 116: 261-263.
68. Wormald PJ, Cain T, Oates L, Hawke L, Wong I. A comparative study of three methods of nasal irrigation. *Laryngoscope* 2004; 114: 2224-2227.
69. Rains BM, III, Mineck CW. Treatment of allergic fungal sinusitis with high-dose itraconazole. *Am J Rhinol* 2003; 17: 1-8.
70. Hofer E, Neher A, Schrott-Fischer A, Nagl M. Influence of amphotericin B on the ciliary beat frequency of nasal mucosa. *Laryngoscope* 2004; 114: 1964-1966.
71. Gosepath J, Grebneva N, Mossikhin S, Mann WJ. Topical antibiotic, antifungal, and antiseptic solutions decrease ciliary activity in nasal respiratory cells. *Am J Rhinol* 2002; 16: 25-31.
72. Jornot L, Rochat T, Lacroix JS. Nasal polyps and middle turbinates epithelial cells sensitivity to amphotericin B. *Rhinology* 2003; 41: 201-205.
73. Jornot L, Rochat T, Caruso A, Lacroix JS. Effects of amphotericin B on ion transport proteins in airway epithelial cells. *J Cell Physiol* 2005; 204: 859-870.
74. Shin SH, Ye MK. Effects of topical amphotericin B on expression of cytokines in nasal polyps. *Acta Otolaryngol* 2004; 124: 1174-1177.
75. Weschta M, Rimek D, Formanek M, Podbielski A, Riechelmann H. Effect of nasal antifungal therapy on nasal cell activation markers in chronic rhinosinusitis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2006; 132: 743-747.