

## Porównanie stężeń interleukiny-1 $\beta$ , interleukiny-6 i interleukiny-8 u chorych na astmę oskrzelową atopową i nieatopową w trakcie zaostrzenia

### The comparison of interleukin-1 $\beta$ , interleukin-6 and interleukin-8 concentrations in patients with atopic and non-atopic bronchial asthma during exacerbation

ANDRZEJ DZIEDZICZKO, MICHAŁ PRZYBYSZEWSKI, ANDRZEJ KUŹMIŃSKI, MAGDALENA ŻBIKOWSKA-GOTZ

Katedra i Klinika Alergologii i Chorób Wewnętrznych Akademii Medycznej, SP ZOZ Wojewódzki Szpital, Ul. Ujejskiego 75, 85-168 Bydgoszcz

**Wprowadzenie.** Cytokiny IL-6, IL-1 $\beta$  i IL-8 uczestniczą w zapaleniu oskrzeli, ale zależność ich stężeń w surowicy od ciężkości astmy w okresie zaostrzenia nie została zadowalająco poznana.

**Cel pracy.** Porównanie stężeń IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 w surowicy chorych na astmę atopową (AA) i nieatopową (AN) w okresie zaostrzenia, zależnie od stopnia ciężkości choroby.

**Material i metody.** U 36 chorych z AA: cIgE>100kU/l; (+) t. Phadiatop, śr. 41,3 lat, oraz 57 chorych z AN: cIgE≤100kU/l, (-) t. Phadiatop, śr. 49,3 lat, oznaczono stężenia: IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$  [pg/ml].

**Wyniki.** Stężenie IL-6 było istotnie wyższe w AA lekkiej (56,5±55) niż umiarkowanej (10,3±8,7, p=0,0143) i ciężkiej (12,4±11,2, p=0,0076), istotnie niższe w AN lekkiej (11,1±11,1) niż ciężkiej (21,0±23,1, p=0,0201) oraz istotnie wyższe w lekkiej AA niż lekkiej AN (p=0,015). Stężenie IL-8 było istotnie niższe w AN umiarkowanej (144,4±179,8) niż lekkiej (365±345,5; p=0,0203) i ciężkiej (238,6±174,2, p=0,0302). Stężenia IL-1 $\beta$  w AA i AN różniły się nieznacznie. W AA wykazano (+) korelacje między stężeniami IL-6 a IL-8 (p=0,014; r=0,41) i między IL-1 $\beta$  a IL-8 (p=0,041; r=0,34), a w grupie z AN między IL-1 $\beta$  a IL-8 (p=0,011; r=0,33).

**Wnioski.** Wyniki sugerują, że stężenia badanych interleukin wykazują tendencję wzrostową w AA i AN ciężkiej wobec AA i AN umiarkowanej.

*Alergia Astma Immunologia, 2004, 9(4), 196-203*

**Słowa kluczowe:** interleukina-8, interleukina-6, interleukina-1 $\beta$ , astma oskrzelowa

**Introduction.** Proinflammatory IL-6 and IL-1 $\beta$  and chemokine IL-8 take part in the bronchial inflammation, but the relationship between their serum concentrations and the severity of asthma in the exacerbation period is not sufficiently clear.

**Aim of the study.** Estimate IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 concentrations [pg/ml] in the serum of patients with atopic (AA) and non-atopic (NA) asthma in the period of exacerbation, depending on severity of the disease.

**Material and methods.** Serum concentrations of IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$  [pg/ml] were determined in 36 patients with AA: cIgE>100kU/l, (+) Phadiatop, mean age 41.3, and 57 patients with NA: cIgE≤100 kU/l, (-) Phadiatop test, mean age 49.3.

**Results.** The concentration of IL-6 was significantly higher in mild (56.5±55) than in moderate (10.3±8.7, p=0.0143) and heavy AA (12.4±11.2, p=0.0076); it was significantly lower in mild (11.1±11.1) than in heavy NA (21.0±23.1, p=0.0201), and significantly higher in mild AA than in mild NA (p=0.015). The mean concentrations of IL-8 were significantly lower in moderate NA (144.4±179.8) than in mild (365±345.5; p=0.0203) and heavy NA (238.6±174.2, p=0.0302). The differences in IL-1 $\beta$  concentrations between AA and AN were insignificant. A positive (+) correlation was detected between the concentrations of IL-6 and IL-8 (p=0.014; r=0.41), between IL-1 $\beta$  and IL-8 (p=0.041; r=0.34) in AA, and of IL-1 $\beta$  and IL-8 (p=0.011; r=0.33) in NA.

**Conclusions.** Our findings suggest that the concentrations of the interleukins tend to be higher in heavy than in moderate AA and NA. *Alergia Astma Immunologia, 2004, 9(4), 196-203*

**Key words:** interleukin-8, interleukin-6, interleukin-1 $\beta$ , bronchial asthma

Astmę oskrzelową jest złożonym przewlekłym procesem zapalnym dróg oddechowych. W procesie tym uczestniczą liczne komórki naciekające struktury płuc i wydzielające różnorodne substancje zewnątrzkomórkowe nazywane cytokinami, do których należą interleukiny, odgrywające znaczącą rolę w patogenezie astmy. Cytokiny biorą udział w aktywacji, proliferacji, chemo-

taksji, immunoregulacji, degranulacji, wzroście, różnicowaniu i apoptozie komórek. Odgrywają również kluczową rolę w zapoczątkowaniu i koordynowaniu przebiegu procesu zapalnego w astmie oskrzelowej. Do najważniejszych cytokin należą interleukiny (IL) takie jak: IL-1 $\beta$ , IL-8 i IL-6.

Cytokina IL-1 jest ważnym aktywatorem limfocyta T i ko-stymulatorem ekspansji komórek Th2 po prezentacji antygeny. Makrofagi dróg oddechowych są ważnym źródłem cytokin pierwszej fali, do których należą IL-1, TNF- $\alpha$  i IL-6. Są one uwalniane pod wpływem ekspozycji na wziewane alergeny za pośrednictwem receptorów Fc $\epsilon$ -R2II wykazujących powinowactwo do IgE. Wymienione cytokiny działając na komórki nabłonkowe powodują uwolnienie drugiej fali cytokin, obejmujących GM-CSF, IL-8 i RANTES, które wzmacniają reakcję zapalną i napływ eozynofików, zdolnych do uwalniania różnych mediatorów [1].

Interleukina-1 występuje w formach  $\alpha$  i  $\beta$ , pochodzących z 2 różnych genów. Obie formy łączą się z tym samym receptorem. IL-1 $\beta$  (17,5 kDa), syntetyzowana jako większa cząsteczka prekursorowa (31 kDa), jest uwalniana do przestrzeni pozakomórkowej i krążenia. Najbardziej aktywną formą IL-1 $\beta$  jest jej rozszczepiona dojrziała forma powstająca pod wpływem działania swoistej proteazy cysteinowej (enzym konwertujący IL-1) [2].

Głównym źródłem IL-1 $\beta$  jest stymulowany monocyt/makrofag. Eozynofile mogą produkować IL-1 $\beta$ , a ludzkie komórki nabłonkowe mogą zwiększać jej ekspresję po ekspozycji, m. in. na zanieczyszczenia ditlenkiem azotu, samą IL-1, TNF- $\alpha$ , GM-CSF, endotoksynę i fagocytozę. PGE<sub>2</sub> i glikokortykosteroidy mogą zmniejszać zdolność tych bodźców do uwalniania IL-1 przez hamowanie transkrypcji i zmniejszanie stabilności mRNA w IL-1 [1].

Interleukina-6 jest cytokiną plejotropową uwalnianą głównie przez monocyty i makrofagi oraz komórki T i B. Reguluje wzrost wielu komórek i tkanek, uczestniczy w aktywacji, wzrastaniu i różnicowaniu limfocytów B, indukuje sekrecję immunoglobulin (IgG, IgM, IgA) i jest ważnym kofaktorem w zależnej od IL-4 syntezie IgE. IL-6 może również hamować ekspresję i uwalnianie IL-1 i TNF z makrofagów *in vitro*, a także wywierać wpływ przeciwapalny [1]. U pacjentów astmatycznych po prowokacji alergenem stwierdzono zwiększone uwalnianie IL-6 w porównaniu z osobami nieastmatycznymi [3]. Panuje przekonanie, że rola interleukiny-6 w patomechanizmie astmy jest nadal niejasna i kontrowersyjna.

Interleukina-8 należy do chemokin CXC. Jest głównym chemoatraktantem i aktywatorem neutrofila. Monocyty i makrofagi tkankowe są bogatym źródłem chemokin CXC, w tym także IL-8, uwalnianych w odpowiedzi na stymulację przez IL-1 $\beta$ , TNF, GM-CSF, IL-3, lipopolisacharydy i kompleksy immunologiczne. Komórki nabłonkowe i komórki mięśni gładkich dróg oddechowych stymulowane przez IL-1 $\beta$  lub TNF- $\alpha$  produkują IL-8 [4].

Ekspresja IL-8 w komórkach nabłonkowych zwiększa się w obecności zakażenia RSV (*Respiratory Syncytial Virus*) [5] i narażenia na elastazę neutrofilową [6]. IL-8 wywołuje uwalnianie histaminy i leukotrienów (LT) cisteinylowych [7].

Wykazano zwiększone uwalnianie IL-8 z makrofagów pęcherzykowych uzyskanych od pacjentów z łagodną astmą, w porównaniu z osobami zdrowymi. Natomiast nie stwierdzono zwiększonych poziomów IL-8 w indukowanej płwocinie u pacjentów z łagodną astmą w porównaniu do znacznie zwiększonych jej poziomów u pacjentów z POChP [8]. U pacjentów z zaostrzeniem astmy wykryto w surowicy i płwocinie wyższe stężenia IL-8 niż u osób zdrowych [9].

Prowadzone w ostatnich latach badania skupiają się na poszukiwaniu i wskazaniu prawdziwych markerów zapalenia w astmie atopowej (AA) i nieatopowej (AN). Celem pracy było zatem porównanie stężeń cytokin prozapalnych IL-1 $\beta$  i IL-6 oraz chemokiny IL-8 w surowicy krwi chorych na AA i AN, a także sprawdzenie czy stężenia tych cytokin zależą od stopnia zaawansowania obu postaci tej choroby.

## PACJENCI I METODY

### Pacjenci

Badania przeprowadzono u 93 chorych na astmę oskrzelową, hospitalizowanych w Klinice Alergologii i Chorób Wewnętrznych Akademii Medycznej w Bydgoszczy. Chorzy byli kierowani do Kliniki w okresie zaostrzenia choroby przez lekarzy alergologów z przyklinicznej Przychodni Alergologicznej lub przez lekarzy POZ. Chorzy znajdujący się pod opieką przyklinicznej Przychodni Alergologicznej trafiali do Kliniki z rozpoznaniem astmy ustalonym już wcześniej.

### Metody

Po przyjęciu do Kliniki wykonywano: 1) badanie podmiotowe i przedmiotowe, 2) badanie spirometryczne, 3) badanie reaktywności oskrzeli i/lub próbę rozkurczu (fenoterol 2 wziewy po 100  $\mu$ g, 3) oznaczenie stężenia całkowitego (c) IgE, oraz 4) test Phadiatop, obejmujący panel alergenów wziewnych, metodą EIA przy użyciu zestawów firmy Hycor BIOMEDICAL (tab. I).

Astmę atopową rozpoznano u 36 chorych w wieku od 18 do 67 lat (średnio 41,3  $\pm$  13,8 lat) na podstawie objawów klinicznych, stężenia cIgE >100 kU/l oraz dodatniego testu Phadiatop. Astmę nieatopową rozpoznano u 57 chorych w wieku od 21 do 78 lat (średnio 49,3  $\pm$  12,1 lat) w oparciu o objawy kliniczne, stężenie cIgE  $\leq$  100 kU/l oraz ujemny test Phadiatop.

Ciężkość zaawansowania astmy ustalano po przyjęciu do Kliniki na podstawie aktualnych wyników badań i w oparciu o kryteria GINA. W ocenie ciężkość choroby, poza obrazem klinicznym, brano pod uwagę aktualny stopień intensywności leczenia.

Przed przyjęciem do Kliniki pacjenci przyjmowali standardowe wziewne leki rozkurczające oskrzela ( $\beta$ <sub>2</sub>-mimetyki wziewne i/lub metyloksantyny p. os.) oraz wziewne

Tabela I. Wartości średnie cech charakteryzujących pacjentów z astmą atopową i astmą nieatopową (wiek, całkowite stężenia IgE (cIgE), FEV<sub>1</sub> liczba palących i liczba papierosów/d) z uwzględnieniem stopnia ciężkości choroby

Cechy	AA			AN		
	Lekka n=9	Umiarkowana n=10	Ciężka n=17	Lekka n=22	Umiarkowana n=13	Ciężka n=22
Wiek [lat]	40,1±19,2	41,7±10,2	41,6±13,2	48,1±12,1	48,5±11,6	51,0±12,7
cIgE [kU/l]	591±585	459±625	657±715	36±24	33±25	44±27
FEV <sub>1</sub> [%n]	101,0±16,6	70,3±4,5	45,3±8,7	100,0±11,9	71,6±3,9	47,6±7,1
Palący	6/9	0/10	5/17	4/22	1/13	2/22
Ilość papierosów/dzień	8,8	0	4,3	2,7	1,5	1,6

AA – astma atopowa

AN – astma nieatopowa

glikokortykosteroidy (stosownie do stopnia ciężkości choroby). Pacjentów kierowano do Kliniki z powodu zaostrzenia choroby.

U wszystkich chorych oznaczano stężenia IL-8, IL-1β oraz IL-6 w surowicy krwi metodą immunoenzymatyczną, przy użyciu testu diagnostycznego firmy Bender Med-

Tabela II. Porównanie wartości oznaczanych interleukin u chorych na astmę atopową i nieatopową z uwzględnieniem stopnia ciężkości choroby

Interleukina Grupa	Ogółem: AA (n=36) i AN (n=57)					
	IL-1β [pg/ml]		IL-6 [pg/ml]		IL-8 [pg/ml]	
	AA	AN	AA	AN	AA	AN
Średnia	1,89	2,86	22,86	15,63	235,23	265,9
SD	2,56	3,1	34,0	17,58	236,56	265,81
Mediana	0,79	1,41	10,1	10,9	173,05	189,35
Min	0,29	0,29	1,39	1,39	11,0	11,4
Max	10,6	13,6	152,32	98,59	1048,91	1476,33
p	=0,0447		NS		NS	
Astma lekka: AA (n=9); AN (n=22)						
Średnia	2,53	3,8	56,5	11,06	393,82	364,99
SD	3,34	3,77	54,99	11,06	354,05	345,5
Mediana	0,87	2,5	40,06	7,82	232,94	329,94
Min	0,29	0,3	5,77	1,8	25,62	14,9
Max	10,60	13,6	152,32	53,80	1048,91	1476,33
p	NS		=0,015		NS	
Astma umiarkowana: AA (n=10); AN (n=13)						
Średnia	0,9	1,27	10,33	14,24	155,39	144,39
SD	0,55	1,15	8,69	14,23	138,08	179,78
Mediana	0,84	0,9	8,0	7,38	121,46	88,02
Min	0,51	0,29	2,42	1,39	14,65	11,4
Max	2,4	4,5	30,68	43,2	403,42	603,05
p	NS		NS		NS	
Astma ciężka: AA (n=17); AN (n=22)						
Średnia	2,13	2,87	12,42	21,03	198,23	238,63
SD	2,78	2,87	11,15	23,07	171,55	174,24
Mediana	0,75	1,51	9,2	14,1	119,37	192,58
Min	0,29	0,29	1,39	1,39	11,0	12,66
Max	8,99	9,2	35,8	98,59	582,57	649,37
p	NS		NS		NS	

NS - nieistotne statystycznie

Tabela III. Wartości średnie stężeń interleukin w astmie atopowej i astmie nieatopowej w zależności od ciężkości choroby

IL [pg/ml]	AA			AN		
	Lekka	Umiarkowana	Ciężka	Lekka	Umiarkowana	Ciężka
IL-1 $\beta$	2,5 $\pm$ 3,3	0,9 $\pm$ 0,6	2,13 $\pm$ 2,8	3,8 $\pm$ 3,8	1,3 $\pm$ 1,2	2,9 $\pm$ 2,9
IL-6	56,5 $\pm$ 55*	10,3 $\pm$ 8,7*	12,4 $\pm$ 11,2*	11,1 $\pm$ 11,1 <sup>1*</sup>	14,2 $\pm$ 14,2	21 $\pm$ 23,1 <sup>1*</sup>
IL-8	394 $\pm$ 354	155 $\pm$ 138	198,2 $\pm$ 171	365 $\pm$ 346 <sup>2*</sup>	144 $\pm$ 180 <sup>2*</sup>	239 $\pm$ 174 <sup>2*</sup>

\*IL-6 Lekka>ciężka AA, p=0,0076; \*IL-6 Lekka>umiarkowana AA, p=0,0143;

<sup>1</sup>\*IL-6 Ciężka>lekka AN, p=0,0201; <sup>2</sup>\*IL-8 Lekka>umiarkowana AN, p=0,0203

<sup>2</sup>\*IL-8 Ciężka>umiarkowana AN, p=0,0302

Systems. Badania te wykonywano w Pracowni Immunologicznej Kliniki. Krew do badań pobierano bezpośrednio po przyjęciu do Kliniki lub następnego dnia, przed podaniem leków. Do badań pobierano 8 ml krwi z nakłucia żyły łokciowej do probówek separacyjnych nie zawierających antykoagulantu. Krew odwirowywano, a surowicę przechowywano w temperaturze -20° C do czasu zgromadzenia odpowiedniej liczby próbek poddanych później ocenie.

W opracowaniu wyników badań wykorzystano następujące metody statystyczne: estymację średniej arytmetycznej i odchylenia standardowego dla średniej, analizę korelacji Spearmana, test U Manna-Whitney'a.

## WYNIKI

W całej grupie chorych na AN IL-1 $\beta$  w surowicy było istotnie statystycznie wyższe niż u chorych z AA, podczas gdy stężenie IL-6 i IL-8 w obu grupach nie różniło się statystycznie znamienne. Wykazano istotną statystycznie różnicę między stężeniami IL-6 w surowicy chorych z postaciami lekkimi AA i AN (p=0,015). Nie wykazano istotnych statystycznie różnic pomiędzy średnimi stężeniami tej interleukiny w grupach chorych z postaciami umiarkowaną i ciężką AA i AN. Stężenia IL-1 $\beta$  i IL-8 w surowicy chorych z postaciami lekkimi, umiarkowanymi i ciężkimi AA i AN nie różniły się statystycznie istotnie (tab. II).

Wśród chorych z AA średnie stężenie IL-6 było istotnie statystycznie wyższe w grupie chorych z postacią lekką niż u chorych z postacią umiarkowaną (p=0,0143) i ciężką choroby (p=0,0076), ale nie różniło się istotnie statystycznie w grupie chorych z AA umiarkowaną i ciężką (tab. III).

U chorych na AN średnie stężenie IL-6 w surowicy było istotnie statystycznie niższe w grupie chorych z postacią lekką niż w grupie chorych z postacią ciężką (p=0,0201), ale nie różniło się istotnie statystycznie w grupie chorych z AN umiarkowaną i ciężką oraz umiarkowaną i lekką. Średnie stężenie IL-8 w surowicy było istotnie statystycznie niższe w grupie chorych z AN umiarkowaną niż w grupie chorych z AN lekką (p=0,0203) i ciężką (p=0,0302), ale różniło się statystycznie nieznamienne w grupie chorych z AN lekką i ciężką (tab. III).

W grupie w pacjentów z AA wykazano istotne statystycznie dodatnie korelacje między stężeniami IL-6 i IL-8 (r=0,41; p=0,014), między stężeniami IL-1 $\beta$  a IL-8 (r=0,34; p=0,041) oraz między stężeniami IL-1 $\beta$  a IL-8 w grupie pacjentów z AN (r=0,33; p=0,011). Nie było korelacji między IL-8 a IL-6 u chorych na AN i między IL-6 a IL-1 $\beta$  u chorych na AA i AN (tab. IV).

Tabela IV. Korelacje między badanymi interleukinami w astmie atopowej i astmie nieatopowej

Korelacja	AA	AN
IL-8/IL-1 $\beta$	r=0,341982 p=0,041202	r=0,334527 p=0,010978
IL-8/IL-6	r=0,405663 p=0,014102	r=0,056166 NS
IL-6/IL-1 $\beta$	r=0,214382 NS	r=0,012545 NS

## DYSKUSJA

Interleukiny, których stężenia oznaczano w surowicy krwi chorych z zaostrzeniem astmy, należą do grupy cytokin prozapalnych (IL-1, IL-6) i chemotaktycznych (IL-8). Z wcześniejszych badań wynika, że w okresie zaostrzenia astmy oskrzelowej spostrzegano podwyższone stężenia IL-8. Zhang i wsp. obserwowali istotny statystycznie wzrost stężenia IL-8 w surowicy krwi i w indukowanej płwocinie u pacjentów z zaostrzeniem astmy oskrzelowej w porównaniu z grupą pacjentów ze stabilną astmą i grupą kontrolną osób zdrowych [9]. Podobne wyniki uzyskali w surowicy krwi Tang i wsp. [10]. Jednakże, w prowadzonych przez nich badaniach, stężenia IL-8 u chorych w okresie zaostrzenia astmy, nie różniły się istotnie statystycznie od stężeń stwierdzonych w grupie pacjentów w okresie remisji choroby.

W badaniach własnych wśród chorych na AA średnie stężenia IL-8 były statystycznie znamienne wyższe w grupie chorych z postacią łagodną i ciężką niż u chorych z postacią umiarkowaną choroby, a spostrzegane

wyższe stężenia IL-8 w AA łagodnej niż ciężkiej okazały się statystycznie nieznamienne. Podobne różnice w zachowaniu się stężeń IL-8 w surowicy krwi uzyskane u chorych z łagodną, umiarkowaną i ciężką AN, były również nieistotne statystycznie.

Jahnz-Różyk i wsp. obserwowali u chorych z AA wzrost stężenia IL-8 w materiale z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego pod wpływem prowokacji oskrzeli swoistej (pyłki traw) i nieswoistej (histamina) [11], a Nocker i wsp. obserwowali zależny od dawki alergenu wzrost stężenia IL-8 i napływ neutrofilów do światła dróg oddechowych w grupie chorych na astmę łagodną i umiarkowaną oraz u nieastmatycznych alergików 4 godziny po prowokacji alergenem. Wzrost stężenia IL-8 i napływ neutrofilów były wielokrotnie większe u chorych na astmę niż u nieastmatycznych alergików. Autorzy ci sugerowali, że poza reakcją IgE-zależną stopień wzrostu IL-8 i influks neutrofilów determinują jeszcze czynniki lokalne [12].

Boznański i Rudzka wykazali wzrost stężenia IL-8 w surowicy krwi u dzieci chorych na astmę oskrzelową poddanych próbie wysiłkowej [13]. Z przedstawionych wyżej badań wynika, że do wzrostu stężenia IL-8 w materiale z dróg oddechowych lub krwi, dochodzi prawdopodobnie pod wpływem różnych czynników, w tym czynników swoistych – takich jak alergeny i nieswoistych – takich jak wysiłek i histamina.

Nie można więc wykluczyć, że w naszych badaniach w grupie chorych na AA i AN, na stężenia IL-8 w surowicy krwi mogły wywierać wpływ czynniki lokalne [12], swoiste [11,12] i nieswoiste [13]. To jednak nie wydaje się zadowalająco tłumaczyć, dlaczego najwyższe stężenia IL-8 spostrzegano w lekkiej postaci AA i AN, choć w tej drugiej nieistotne statystycznie, jak wynika z naszych badań.

Z badań wykonanych przez Shute i wsp. [14] wynika, że w surowicy krwi i tkance płucnej stężenia IL-8 w postaci wolnej wykryto tylko u pacjentów z ciężką AA, a jednocześnie okazały się one prawie niewykrywalne u chorych z postacią łagodną choroby i u osób zdrowych, sugerując, że IL-8 jest markerem ciężkości astmy. Z ciężkością astmy kojarzyły się również zwiększone poziomy kompleksów IL-8 z IgA i IgG wykrywane we wszystkich próbkach krwi i tkanek oskrzeli. Wyniki tych badań mogłyby wskazywać, jak sądzą autorzy, na nadmierną regulację produkcji IL-8 i indukcję wiązania IL-8 z IgA w zapalnej śluzówce, podkreślając prozapalny charakter tych kompleksów w tkance płucnej [14].

W przeciwieństwie do wyżej cytowanych autorów, wyniki naszych badań wykazały, że IL-8 była wykrywalna zarówno w AA, jak i AN, i to niezależnie od stadium zaawansowania choroby. Jak się zatem wydaje, przydatność IL-8 jako markera ciężkości astmy staje się raczej wątpliwa, zwłaszcza w sytuacji, kiedy producent testu diagnostycznego do oznaczania stężenia IL-8 ustalił (firma Bender MedSystems), że poziomy IL-8 w 190 ludz-

kich surowicach pochodzących od kobiet i mężczyzn mieściły się w granicach od 0 do 30 100 pg/ml, przy średniej 859 pg/ml i odchyleniu standardowym 3 236 pg/ml. U wszystkich badanych chorych na astmę, niezależnie od postaci i ciężkości choroby, poziomy IL-8 mieściły wyraźnie poniżej wartości średniej, podanej przez producenta. Na tej podstawie trudno jest przypisywać IL-8 rolę markera ciężkości astmy i aktywności choroby przynajmniej, jeśli chodzi o oznaczanie jej stężenia w surowicy krwi.

Inoue i wsp. [15] wykazali, że przewlekłe wziewanie glikokortykosteroidów wpływa na profil komórkowy i poziom cytokin w indukowanej płwocinie pochodzącej od pacjentów astmatycznych. Wpływ propionianu flutikazonu na produkcję IL-8 przez monocyty pochodzące od pacjentów z umiarkowaną i ciężką astmą badali *in vitro* Gangemi i wsp. [16]. Autorzy ci wykazali częściowe hamowanie IL-8 uznając, że kliniczna poprawa astmy może zależeć, przynajmniej częściowo, od zdolności flutikazonu do modulowania produkcji cytokin przez monocyty. Kim i Lee wykazali, że deksametazon też może hamować produkcję IL-8 i w ten sposób może modulować reakcję zapalną oskrzelików, indukowaną przez RSV i zaostrzenie astmy [17].

John i wsp. wykazali, że komórki mięśni gładkich dróg oddechowych dysponują potencjałem syntetycznym i sekrecyjnym, który wyraża się najpierw uwalnianiem IL-8, a potem rekrutacją i aktywacją neutrofilów w drogach oddechowych. Uwalnianie IL-8 może być hamowane przez cytokiny wywodzące się z Th-2 i glikokortykosteroidy [4].

Pacjenci uczestniczący w naszych badaniach byli poddawani terapii przed przyjęciem do szpitala stosownie do stopnia ciężkości i zaostrzenia choroby i prawdopodobnie w większości, może z wyjątkiem postaci łagodnej choroby, korzystali również z wziewnych glikokortykosteroidów. Stężenia IL-8 uzyskane u pacjentów z umiarkowaną i ciężką AA różniły się istotnie statystycznie i były znamienne wyższe w AA ciężkiej niż umiarkowanej. Podobne wyniki uzyskano w AN, chociaż różnice były tu nieistotne statystycznie. Wyższe stężenia IL-8 w obu postaciach astmy łagodnej, w porównaniu z umiarkowaną i ciężką, mogły być konsekwencją zbyt ostrożnej kwalifikacji tych chorych do grupy łagodnej astmy z powodu względnie dobrej sprawności wentylacyjnej płuc w chwili badania. Jednak nie można wykluczyć, że przyczyną mniejszego stężenia IL-8 u pacjentów z astmą umiarkowaną i ciężką niż u pacjentów z astmą łagodną było zmniejszone uwalnianie IL-8, hamowane już przez leczenie kortykosteroidami, które u pacjentów z astmą lekką jeszcze nie było wdrażane. W tym kontekście wyniki naszych badań, ani nie potwierdzają, ani nie wykluczają możliwej roli IL-8 jako markera ciężkości astmy.

Warto tu wspomnieć, że Mazarella i wsp. [18] wykazali silną prozapalną aktywność makrofagów pęcherzy-

kowych również u pacjentów z astmą łagodną i pokazali zasadnicze składowe produkcji IL-8 przez te komórki. Ponadto stwierdzili, że IL-1 i TNF- $\alpha$  mogą regulować zdolność aktywowanych ludzkich makrofagów pęcherzykowych do produkcji IL-8 według poziomów tego białka i mRNA (informacyjny kwas rybonukleinowy). Ich badania pokazały, że podczas pierwszych 12 h stymulacji przez LPS (lipopolisacharyd) makrofagi uwalniały pewne ilości IL-8 razem z IL-1 i TNF- $\alpha$ . Okazało się jednocześnie, że te dwie ostatnie cytokiny wykazują potencjalną zdolność wpływania na modulację sprzężenia zwrotnego w sąsiednich lub tych samych makrofagach, kiedy wiążą się z odpowiednimi receptorami na tych komórkach (IL-1R i TNF- $\alpha$ R), prowadząc do zwiększenia sekrecji IL-8 aż do 20 h inkubacji [18].

John i wsp. wykazali, że IL-1 $\beta$  silnie indukowała uwalnianie IL-8, a łącznie z TNF- $\alpha$  powodowała synergistyczny wzrost uwalniania IL-8 [4]. Wzrost uwalniania IL-8 przez monocyty/makrofagi tkankowe [18], komórki nabłonka i mięśni gładkich oskrzeli w głównej mierze zależy od aktywacji tych komórek przez IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$  [4]. Wyniki badań własnych potwierdzałyby to spostrzeżenie, ponieważ rzeczywiście wykazano istotną statystycznie dodatnią korelację pomiędzy IL-8 i IL-1 $\beta$ , zarówno u chorych z AA, jak i u chorych z AN. Uzyskane wyniki mogą zatem świadczyć o wzajemnym oddziaływaniu tych cytokin na patomechanizm AA i AN, ale tylko u chorych na AA w drodze aktywacji i gromadzenia się eozynofiliów w układzie oddechowym. Byłoby to zgodne z wynikami badań Shute i wsp. [14], którzy wykazali dodatnią korelację między poziomami IL-8 i eozynofilowego białka kationowego (ECP) i sugerowali, że IL-8 kojarzy się z aktywacją eozynofila. Z badań Konno i wsp. wynika, że w płwocinie chorych na astmę objawową obserwowano znamienne wyższe stężenia różnych cytokin zapalnych, w tym również IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 i ECP, niż u bezobjawowych chorych na astmę [19].

Zwiększone stężenie IL-1 $\beta$  spostrzegane w naszych badaniach w grupie chorych z astmą łagodną może być okolicznością tłumaczącą wysokie stężenie IL-8 w tej samej grupie, skoro warunkiem uwalniania IL-8 jest aktywacja monocytów/makrofagów tkankowych, komórek nabłonka i mięśni gładkich oskrzeli właśnie przez IL-1 $\beta$ . Natomiast niskie stężenie IL-1 $\beta$  w surowicy może zależeć od jej uwalniania z makrofagów nie do krwi, ale do tkanki płucnej, a także od przewlekłego stosowania glikokortykosteroidów. Za taką możliwością przemawia spostrzegana w naszych badaniach pewna regularność uzyskanych wyników, która wyraża się tymi samymi tendencjami zachowania się stężeń IL-1 $\beta$ , IL-6 i IL-8 wśród chorych na AA i AN.

Po ekspozycji na alergen eozynofile uwalniają głównie białko zasadowe (MBP) odpowiedzialne za niszczenie nabłonka dróg oddechowych i uwalnianie produktów degradacji kolagenu, aktywujących makrofagi produkują-

ce IL-1 $\beta$  [20]. Z badań wynika, że IL-1 $\beta$  zmniejsza reaktywność ludzkich komórek mięśni gładkich dróg oddechowych na  $\beta$ -agonistów *in vivo* i *in vitro* [21], a ten wpływ obserwowano jeszcze szereg godzin po ekspozycji.

Gomes i wsp. wykazali, że w astmie aktywacja fibroblasta i reakcja włóknienia podnabłonkowego (remodeling) zależą głównie od IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$  i bFGF, wywodzących się z eozynofila. Dochodzi tu do interakcji eozynofil-fibroblast, ponieważ wykazano, że wspólna hodowla eozynofiliów i fibroblastów indukowała ponad 60-krotny wzrost sekrecji IL-6 z fibroblasta. Natomiast neutralizacja IL-1 $\beta$  hamowała reakcje, w których uwalniała się IL-6 o 60% [22].

Rola IL-6 w patomechanizmie astmy oskrzelowej jest dość niejasna. Janz-Różyk i wsp. wykazali wyższe stężenie IL-6 w surowicy i materiale z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego (BAL) u pacjentów z AA i AN, w porównaniu z osobami zdrowymi [23]. Nie wykazano natomiast wpływu prowokacji wziewnej oskrzeli histaminą i alergenami traw na stężenie IL-6 w BAL u pacjentów z AA [24]. Wong i wsp. zaobserwowali wyraźnie wyższe stężenie IL-6 u pacjentów z AA (11,86 pg/ml) niż u osób zdrowych (0,61 pg/ml), a różnice między tymi wartościami pozostawały na granicy istotności statystycznej ( $p=0,053$ ) [25]. Wyniki naszych badań wykazały wyższe, ale również nieistotne statystycznie, stężenie IL-6 w grupie pacjentów z AA niż w grupie pacjentów z AN. Natomiast u pacjentów z lekką postacią AA stężenie IL-6 w surowicy było statystycznie znamienne wyższe niż u pacjentów z lekką postacią AN. Statystycznie istotne różnice stężeń IL-6 występowały również w grupie AA między postacią lekką a umiarkowaną i ciężką, ale nie między postacią umiarkowaną i ciężką tej choroby. W przeciwieństwie do AA, w AN stężenie IL-6 w surowicy było statystycznie istotnie wyższe w postaci ciężkiej niż w postaci lekkiej choroby. Uzyskane wyniki mogą sugerować, że w postaci lekkiej AA pacjenci jeszcze nie przyjmowali glikokortykosteroidów, tłumiących stężenia IL-6, podczas gdy pacjenci pozostałych grup AA i AN prawdopodobnie pozostawali już pod ich wpływem. Wyższe stężenie IL-6 w surowicy krwi chorych z AA lekką może również świadczyć o udziale IL-6 we wczesnym okresie rozwoju choroby.

Zdolność IL-6 do stymulacji komórek T i B oraz udział komórki pomocniczej Th2 w rozwoju zapalenia sugerowałyby, że IL-6 gra rolę w powstawaniu i/lub utrwalaniu zapalenia astmatycznego. IL-6 jest silnym mitogenem mięśni gładkich dróg oddechowych, stąd możliwy jest jej udział w remodelingu. Okazało się jednak, że IL-6 wykazuje również działanie przeciwzapalne i cytoprotekcyjne. To rodzi przypuszczenie, że IL-6 może być uznawana za główny sygnał alarmowy, porządkujący reakcje ochronne, służące zmniejszeniu zapalenia i uszkodzenia tkanki [26]. Dlatego być może, wśród naszych pacjentów z łagodną postacią choroby występowały zwiększone stęże-

nia IL-6, jako wyraz działań przeciwzapalnych i cytoprotekcyjnych tej cytokiny.

Ammit i wsp. wykazali, że sekrecję IL-6 i RANTES (*regulated on activation, normal T cells expressed and secreted*) z komórek mięśni gładkich dróg oddechowych stymuluje TNF- $\alpha$ . TNF- $\alpha$  zwiększał indukcję sekrecji IL-6 z mięśni gładkich dróg oddechowych występującą pod wpływem  $\beta$ -agonistów. Te dane wyjaśniają transkrypcyjny mechanizm sekrecji IL-6 z komórek mięśni gładkich dróg oddechowych. [27]. Wspomniani wyżej autorzy stwierdzili, że sekrecja IL-6 była tylko częściowo hamowana przez deksametazon [27], natomiast McKay i wsp. ustalili, że uwalnianie IL-6 ujawnione przez TNF- $\alpha$  było znamienne hamowane przez deksametazon [28].

Kuschner i wsp. demonstrowali statystycznie znamienne większe stężenia neutrofilów, makrofagów, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 w BAL u palaczy w porównaniu z niepalaczami [29]. Rusznak i wsp. wykazali, że inkubacja hodowli ludzkich komórek nabłonka oskrzelowego z alergenem roztoczy kurzu domowego Der p znamienne zwiększa uwalnianie IL-8, IL-1 $\beta$  i sICAM. Ponadto okazało się, że krótkotrwała ekspozycja na dym papierosowy zwiększa uwalnianie mediatorów zapalenia indukowanych przez alergeny roztoczy kurzu domowego z hodowli ludzkich komórek nabłonka oskrzelowego. Zmniejszenie ilości mediatorów zapalenia obserwowane przy dłuższej ekspozycji wiązano z oksydacyjnym wpływem dymu papierosowego na zmiany struktur cząstek cytokin. W roztworach eksponowanych na dym papierosowy autorzy obserwowali dramatyczne zmniejszenie wykrywalnych ilości IL-8, IL-1 $\beta$  i sICAM zależne od czasu ekspozycji. Obserwacje te sugerują, że pierwotny wpływ długoterminowej ekspozycji na dym papierosowy polega na uszkodzeniu komórki, a nie na apoptozie. To uszkodzenie komórki może być częściowo odpowiedzialne za zmniejszone uwalnianie IL-8, IL-1 $\beta$  i sICAM-1 [30].

Nie można wykluczyć, że wyższe niż w innych grupach stężenia IL-8, IL-1 $\beta$  i IL-6 w grupie AA łagodnej

należy wiązać, podobnie jak w badaniach Kuschner i wsp. [29] z paleniem tytoniu, ponieważ 6/9 pacjentów tej grupy, a więc najwięcej spośród wszystkich badanych, było palaczami tytoniu (tab. I). Na wartości IL-8, IL-1 $\beta$  w grupach umiarkowanej i ciężkiej AA i AN mogło wpływać uszkodzenie komórek, pod wpływem różnych czynników oksydacyjnych odpowiedzialnych za zmniejszone uwalnianie badanych interleukin, podobnie jak to spostrzegali Rusznak i wsp. [30].

Wyniki naszych badań sugerują, że stężenia badanych interleukin wykazują tendencję wzrostową w obu postaciach astmy ciężkiej w stosunku do astmy umiarkowanej. Stężenia IL-1 $\beta$  w poszczególnych grupach AA i AN różniły się nieznacznie statystycznie, co może sugerować, że nie zależą one od ciężkości choroby. Stężenie IL-6 w AN wykazywało wyraźną tendencję wzrostową zależną od ciężkości choroby, choć ta zależność była istotna statystycznie tylko między AN lekką i ciężką. Nie jest do końca jasne, dlaczego stężenie IL-6 okazało się statystycznie wyższe w AA lekkiej niż w umiarkowanej i ciężkiej, jakkolwiek nie wyklucza się, że na te różnice mogły mieć wpływ takie czynniki jak: palenie papierosów, niestosowanie dotychczas glikokortykosteroidów, mechanizm przeciwzapalny przypisywany IL-6 i jeszcze nieuszkodzone komórki produkujące tę interleukinę. Zwiększone stężenie IL-8 w AA lekkiej, choć różniło się statystycznie nieznacznie w porównaniu do umiarkowanej i ciężkiej postaci AA, wydaje się pozostawać w związku z IL-6, ponieważ wykazano istotną statystycznie dodatnią korelację między tymi interleukinami, podobnie jak między IL-1 $\beta$ , cytokiną prozapalną pierwszej fali a IL-8, cytokiną chemotaktyczną drugiej fali w procesie zapalenia [1].

## Piśmiennictwo

1. Chung KF, Barnes PJ. Cytokines in asthma. *Thorax* 1999; 54: 825-857.
2. Cerretti DP, Kozlosky CJ, Mosley B i wsp. Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Science* 1992; 256: 97-100.
3. Broide DH, Lotz M, Cuomo AJ i wsp. Cytokines in symptomatic asthmatic airways. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 89: 958-967.
4. John M, Au BT, Jose PJ i wsp. Expression and release of interleukin-8 by human airway smooth muscle cells: inhibition by Th-2 cytokines and corticosteroids. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998; 18: 84-90.
5. Choi AMK, Jacoby DB. Influenza virus A infection induces interleukin-8 gene expression in human airway epithelial cells. *FEBS Lett* 1992; 309: 327-329.
6. Nakamura H, Yoshimura K, McElvaney NG i wsp. Neutrophil elastase in respiratory epithelial lining fluid of individuals with cystic fibrosis induces interleukin-8 gene expression in a human bronchial epithelial cell line. *J Clin Invest* 1992; 89: 1478-1484.
7. Dahinden CA, Kurimoto Y, De Weck AL i wsp. The neutrophil-activating peptide NAF/NAP-1 induces histamine and leukotriene release by interleukin 3-primed basophils. *J Exp Med* 1989; 170: 1787-1792.
8. Keatings VM, Collins PD, Scott DM i wsp. DiVerences in interleukin-8 and tumor necrosis factor- $\alpha$  in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153: 530-534.
9. Zhang HB, Lin YG, Zhao XM. Clinical value of induced sputum test in monitoring airway inflammation in asthma. *Chung Kuo i Hsueh Ko Hsueh Yuan Hsueh Pao* 2001; 23: 432-434.

10. Tang RB, Chen SJ. Evaluation of serum interleukin-8 as a marker of disease activity in acute asthma in children. *J Asthma* 2000; 37: 409-413.
11. Jahnz-Różyk K, Pirożyńska E, Pojda Z. Wpływ wziewnej próby prowokacji oskrzeli na stężenie interleukiny-8 w materiale z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego u chorych na atopową astmę oskrzelową. *Pol Merk Lek* 1997; 2: 32-35.
12. Nocker RE, Out TA, Weller FR, Mul EP i wsp. Influx of neutrophils into the airway lumen at 4 h after segmental allergen challenge in asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 1999; 119: 45-53.
13. Boznański A, Rudzka D. Poziom RANTES i IL-8 w surowicy dzieci chorych na astmę oskrzelową poddanych testowi wysiłkowemu. *Pneumonol Alergol Pol* 1998; 66: 148-153.
14. Shute JK, Vrugt B, Lindley IJ i wsp. Free and complexed interleukin-8 in blood and bronchial mucosa in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155: 1877-1883.
15. Inoue H, Aizawa H, Fukuyama S i wsp. Effect of inhaled glucocorticoid on the cellular profile and cytokine levels in induced sputum from asthmatic patients. *Lung* 1999; 177: 53-62.
16. Gangemi S, Ruello A, Arena A i wsp. In vitro effect of fluticasone propionate on interleukin 8 production by monocytes obtained from patients affected by moderate-severe allergic asthma. *Pharmacology* 2002; 66: 57-60.
17. Kim H, Lee J. The Effect of Corticosteroid on RANTES and IL-8 mRNA Expression in Human Bronchial Epithelial Cell Line Infected with Respiratory Syncytial Virus. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111: 788.
18. Mazarella G, Grella E, D'Auria D i wsp. Phenotypic features of alveolar monocytes/macrophages and IL-8 gene activation by IL-1 and TNF- $\alpha$  in asthmatic patients. *Allergy* 2000; 55 (Suppl. 61): 36-41.
19. Konno S, Gonokami Y, Kurokawa M i wsp. Cytokine concentrations in sputum of asthmatic patients. *Int Arch Allergy Immunol* 1996; 109: 73-78.
20. Haley KJ, Drazen JM. Inflammation and Airway Function in Asthma What You See Is Not Necessarily What You Get. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 1-3.
21. Hood KC. IL-1 $\beta$  Attenuates the Preventive Effect of Beta-Agonists In Vivo and In Vitro. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111: 292.
22. Gomes I, Espendshade BM, Mathur SK i wsp. Eosinophil-Derived IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$  and bFGF Induce Lung Fibroblast Secretion of the Pro-Fibrogenic Cytokine IL-6: A Potential Mechanism for Subepithelial Fibrosis in Asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111: 479.
23. Jahnz-Różyk K, Płusa T, Chciałowski A i wsp. IL-6 w materiale z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego i surowicy u chorych na astmę oskrzelową i przewlekłe zapalenie oskrzeli. *Lekarz Wojskowy* 1995; 11-12: 641-646.
24. Jahnz-Różyk K, Staniszewski R. Wpływ próby prowokacyjnych oskrzeli na zachowanie się stężeń interleukiny 6 w materiale z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego u chorych na atopową astmę oskrzelową. *Lekarz Wojskowy* 1999; 1-2: 12-18.
25. Wong CK, Ho CY, Ko FW i wsp. Proinflammatory cytokines (IL-17, IL-6, IL-18 and IL-12) and Th cytokines (IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10 and IL-13) in patients with allergic asthma. *Clin Exp Immunol* 2001; 125: 177-183.
26. Aaron SD, Angel JB, Lunau M i wsp. Granulocyte Inflammatory Markers and Airway Infection during Acute Exacerbation of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163: 349-355.
27. Ammit AJ, Lazaar AL, Iran Carla I i wsp. Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ -Induced Secretion of RANTES and Interleukin-6 from Human Airway Smooth Muscle Cells Modulation by Glucocorticoids and  $\beta$ -Agonists. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002; 26: 465-474.
28. McKay S, Hirst SJ, Haas MB i wsp. Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Enhances mRNA Expression and Secretion of Interleukin-6 in Cultured Human Airway Smooth Muscle Cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000; 23: 103-111.
29. Kuschner WG, D'Alessandron A, Wong H i wsp. Dose-dependent cigarette smoking-related inflammatory responses in healthy adults. *Eur Respir J* 1996; 9: 1989-1994.
30. Rusznak C, Sapsford RJ, Devalia JL i wsp. Interaction of cigarette smoke and house dust mite allergens on inflammatory mediator release from primary cultures of human bronchial epithelial cells. *Clin Exp Allergy* 2001; 31: 226-238.