

UTICAJ ALERGIJA NA NIVO CITOKINA U NOSNOM SEKRETU KOD BOLESNIKA SA NOSNIM POLIPIMA

Aleksandar Perić¹, Danilo Vojvodić² i Olivera Miljanović³

Koncentracije citokina u nosnom sekretu odražavaju stanje zapaljenja nosne sluzokože.

Cilj rada bio je uporediti koncentracije citokina u nosnom sekretu kod alergičnih i nealergičnih bolesnika sa nosnom polipozom (NP).

Tridesetoro obolelih od NP (13-oro atopičnih i 17-oro neatopičnih) uključeno je u ovu studiju. Uzorci sekreta uzeti su iz nosne duplje kod svih 30-oro bolesnika. Koncentracije TNF- α , TNF- β , IL-1 β , IL-2, IL-12, IFN- γ , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 i IL-8 merene su u nosnom sekretu korišćenjem komercijalnog flow-citometrijskog kita.

Pronađene su statistički značajno više koncentracije IL-4 ($p < 0,01$), IL-5 ($p < 0,05$), IL-6 ($p < 0,05$) i TNF- β ($p < 0,05$) kod alergičnih bolesnika sa NP u odnosu na nealergične.

Neatopični i atopični polipi imaju različit imunološki tok. *Acta Medica Medianae* 2010;49(3):40-44.

Cljučne reči: alergija, citokini, nosni polipi

Klinika za otorinolaringologiju, Vojnomedicinska akademija, Beograd, Srbija¹
Institut za medicinska istraživanja, Odeljenje kliničke imunologije, Vojnomedicinska akademija, Beograd, Srbija²
Centar za genetiku i imunologiju, Klinički centar Crne Gore, Podgorica, Crna Gora³

Kontakt: Aleksandar Perić
Klinika za otorinolaringologiju, Odeljenje rinologije
Vojnomedicinska akademija, Crnotravska 17,
11040, Beograd, Srbija
E-mail: alexneta@sezampro.rs

Uvod

Hronični rinosinuzitis (CRS) je zapaljensko oboljenje nosa i paranazalnih sinusa sa trajanjem od najmanje 12 nedelja bez kompletnog povlačenja simptoma. Nosna polipoza (NP), koja je shvaćena kao podgrupa CRS, definisana je kao hronično zapaljensko oboljenje sluzokože nosa i paranazalnih sinusa, praćeno formiranjem benignih polipa koji se pružaju od šupljina sinusa do nosne duplje. NP je karakterisana proliferacijom epitela, hiperplazijom žlezda, zadebljanjem bazalne membrane, edemom, fokalnom fibrozom i ćelijskom infiltracijom strome (1). Polipi najčešće polaze iz prednjeg dela etmoidalnog labirinta i odatle se spuštaju između srednje nosne školjke i lateralnog zida nosa u nosnu šupljinu izazivajući simptome kao što su nosna opstrukcija, anosmija, svrab u nosu, sluzava sekrecija i kihanje (2). NP je multifaktorijalno oboljenje. Perzistentno hronično zapaljenje je glavni faktor u razvoju polipa, a među pokretačima zapaljenja pominju se bakterijska, gljivična i virusna

infek-cija, alergija, kao i zagađenje životne sredine (2). Tkivo polipa sadrži različite zapaljenske ćelije, među kojima su eozinofili dominantni. Oni imaju primarnu ulogu u održavanju hroničnog zapaljenja (1,2).

Pretpostavlja se da je oslabljeni Th1-ćelijama posredovani imunski odgovor udružen sa pojačanim Th2-ćelijama posredovanim imunskim odgovorom, a u sadejstvu sa hroničnom infekcijom i pojačanim prisustvom eozinofila dolazi do formiranja polipa (3). Dalje se pretpostavlja da je oslabljeni Th1-ćelijama posredovani imunski odgovor kod tih bolesnika povezan sa supresijom specifičnih receptora izgleda rampe, uključenih u urođeni imunski odgovor (3).

Nosni sekret predstavlja prvu liniju odbrane, u kojoj leukociti verovatno deluju kao deo odbrambenog mehanizma, zajedno sa mukocilijarnim transportom i biohemijskim svojstvima mukusa (4). Da bi se objasnile zapaljenske promene sluzokože gornjih disajnih puteva, treba detektovati ćelijske sekretorne produkte (5). Nosni sekret sadrži male količine citokina, koji su snažni biološki faktori, uključeni u regulaciju zapaljenja i imunskog odgovora, kao i druge medijatore zapaljenja ispoljene u različitim epitelnim i neepitelnim ćelijama (6). Kako citokini imaju dominantnu ulogu u patofiziologiji bolesti disajnih puteva, određivanje profila citokina u nosnom sekretu može nam pomoći da razumemo mehanizme uključene u nastanak NP.

Prevalenca NP u Evropi je oko 2,7% (7). Sa druge strane, alergijski rinitis je bolest visoke prevalence u razvijenim zemljama, pogađajući između 10 i 20% populacije (7). Međutim, poveza-

nost između NP i alergijskog rinitisa je nedovoljno definisana. Povezanost NP i alergijskog rinitisa uglavnom je bila proučavana u okviru razmatranja da li su nosni polipi kod alergičnih bolesnika različiti od onih kod nealergičnih. Incidencija alergije kod bolesnika sa NP procenjena je u rasponu od 10% do 63,2% (8,9).

Cilj ove prospektivne studije bio je da se uporede koncentracije proinflammatoryh citokina, Th1-citokina i Th2-citokina, kao i jednog hemokina u nosnom sekretu kod alergičnih i nealergičnih bolesnika sa nosnim polipima.

Materijal i metode

Bolesnici

Tridesetoro (30) bolesnika sa NP (13-oro alergičnih i 17-oro nealergičnih) bilo je uključeno u ovu prospektivnu studiju. Informisani pristanak je potpisan od svih ispitanika. Ispitivanje je odobreno od strane Etičkog odbora Vojnomedicinske akademije. Dijagnoza NP je postavljena na osnovu podataka iz istorija bolesti, kao i na osnovu endoskopskog pregleda nosa i kompjuterizovane tomografije (CT) paranazalnih sinusa. Samo su bolesnici sa nosnim simptomima, čije je trajanje najviše dve godine, uključeni u ispitivanje. Kriterijumi za isključivanje bili su: astma, preosetljivost na aspirin, antrohoanalni i sfenochoanalni polipi, cistična fibroza i primarna cilijarna diskinezija. Nijedan ispitanik nije imao bilo kakvu akutnu infekciju respiratornog trakta. Nijedan od njih nije lečen oralnim ili topikalnim kortikosteroidima, antibioticima i antihistaminicima tokom najmanje tri nedelje pre uključivanja u studiju. Kožni prik-test je urađen svim ispitanicima u cilju ispitivanja preosetljivosti na česte inhalacione alergene: *Dermatophagoides farinae*, *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Artemisia*, *Alternaria alternata*, epitel psa i mačke, mešavinu polena trava, perje, polen breze, mešani polen cveća. Rezultat testa je smatran pozitivnim u slučaju kada je barem jedna od induracija bila veća od 3mm u dijametri u odnosu na negativnu kontrolu. Ispitanici su smatrani alergičnim ukoliko su imali koncentracije IgE u serumu veće od 160IU/mL.

Uzorkovanje nosnog sekreta i merenje koncentracije citokina

Uzorci nosnog sekreta su sakupljeni iz nosnih duplji svih 30-oro ispitanika (17-oro sa NP i 13-oro sa NP i alergijom), korišćenjem apsorpcione tehnike, uz upotrebu drvenih štapića sa vatom na vrhu, koji su držani i nosnoj duplji iza mesta spoja kože i sluzokože tokom 60 sekundi, kako je prethodno opisano (10,11). Svaki od uzoraka je stavljen u eppendorf epruvetu, zapremine 2mL, koja je imala 1mL transfer medijuma (fosfatno puferisani fiziološki rastvor sa 50µg/mL gentamicina, 340U/mL penicilina G i 500µg/mL

fungizona) tokom 30 minuta, zbog difundovanja citokina u transfer medijum, a zatim držan na temperaturi od 4°C tokom maksimalno 2 h. Nosni sekret je centrifugiran na 1000g tokom 10 minuta u cilju odvajanja ćelijskih komponenti. Nakon centrifugiranja, supernatant je smešten i zamrznut na -70°C do detekcije citokina. Koncentracije jedanaest citokina (proinflammatoryh citokina TNF-α, TNF-β, IL-1β, Th1-citokina IL-2, IL-12 i IFN-γ, Th2-citokina IL-4, IL-5, IL-6 i IL-10, kao i hemokina IL-8) merene su u svakom od 30 uzoraka nosnog sekreta korišćenjem komercijalnog flow citometrijskog kita (Flow cytometry, Bender MedSystems GmbH, Vienna, Austria) na aparatu protočnom citofluorimetru, prema uputstvima proizvođača. Prag detekcije bio je: 22pg/mL za TNF-α, 32pg/mL za TNF-β, 17pg/mL za IL-1β, 28pg/mL za IL-2, 20pg/mL za IL-4, 30pg/mL za IL-5, 21pg/mL za IL-6, 13pg/mL za IL-8, 20pg/mL za IL-10, 15pg/mL za IL-12, 8pg/mL za IFN-γ.

Statistička analiza

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti ± standardna devijacija (± SD). Poređenje među grupama je rađeno korišćenjem neparametarskog Mann-Whitney U testa. Razlike su smatrane statistički značajnim pri p nivou manjem od 0,05 (p<0,05).

Rezultati

U grupi bolesnika sa NP i alergijom bilo je 8 muškaraca i 5 žena (srednje starosti 43,85 ± 14,37 godina), a u grupi sa NP bez alergije bilo je 13 muškaraca i 4 žene (srednje starosti 45,24 ± 14,78 godina).

Poredeći dve glavne grupe bolesnika (sa i bez alergije), nismo našli statistički značajne razlike u koncentracijama TNF-α, IL-1β, IL-2, IL-8, IL-10, IL-12 i IFN-γ u nosnom sekretu (Tabela 1). Koncentracije IL-4, IL-5, IL-6 i TNF-β u nosnom sekretu bile su značajno više kod alergičnih bolesnika sa NP u poređenju sa nealergičnim sa NP (1757±1150,97pg/mL nasuprot 651,47±1005,94 pg/mL, p<0,01; 761,38±885,32 pg/mL nasuprot 202,35±287,26pg/mL, p<0,05; 311,07±245,28 pg/mL nasuprot 97,47±114,41pg/mL, p<0,05; 287,61±325,94pg/mL nasuprot 108,70±208,81 pg/mL, p<0,05) (Tabela 2).

Diskusija

Sadržaj nosnog sekreta nam daje podatke o stanju zapaljenja, kao i o napredovanju bolesti nosne sluzokože. Međutim, mehanizmi oslobađanja citokina u nosni sekret nisu dobro istraženi. Rezultati koje su objavili Ohkubo i sar. (12) pokazali su da se IL-6 oslobađa u nosni sekret u alergijskom rinitisu uglavnom iz migrirajućih ćelija i epitelnih ćelija i to posredovano direktnim dejstvom histamina, refleksnim dejstvom metaholina, kao i nakon stimulacije antigenom.

Tabela 1. Koncentracije citokina u nosnom sekretu kod atopičnih i neatopičnih bolesnika

Bolesnici sa NP i alergijom

	IL-12	IFN- γ	IL-2	IL-10	IL-8	IL-6	IL-4	IL-5	IL-1 β	TNF- α	TNF- β
x	17,62	41,77	343,62	65,46	192,07	311,07	1757	761,38	52,77	37,77	281,61
SD	37,54	45,76	252,24	65,34	290,58	245,28	1150,9	885,32	76,03	28,62	325,94

Bolesnici sa NP bez alergije

	IL-12	IFN- γ	IL-2	IL-10	IL-8	IL-6	IL-4	IL-5	IL-1 β	TNF- α	TNF- β
x	15,53	79,35	251,64	45,65	120,88	91,47	651,47	202,35	22,11	34,47	108,71
SD	34,03	64,38	230,21	62,9	107,31	114,41	1005,9	287,26	31,88	41,59	208,81

Table 2. Poređenje koncentracija citokina u nosnom sekretu kod alergičnih i nealergičnih bolesnika sa nosnom polipozom

Cytokini	Sa alergijom	Bez alergije	<i>p</i> nivo
IL-4	1757 \pm 1150,9	651,47 \pm 1005,9	<i>p</i> < 0,01
IL-5	761,38 \pm 885,32	202,35 \pm 287,26	<i>P</i> < 0,05
IL-6	311,07 \pm 245,28	91,47 \pm 114,41	<i>P</i> < 0,05
TNF- β	281,61 \pm 325,94	108,71 \pm 208,81	<i>P</i> < 0,05

Inicirajući faktor koji pokreće hronično zapaljenje i kolonizaciju mikrobima u NP nije dobro poznat. Mada je zapaljenje posredovano Th2 ćelijama osnovna karakteristika bolesti, nije poznato šta pokreće lokalnu produkciju Th2-citokina i infiltraciju eozinofilima i limfocitima. Pokazano je da Th2-citokini smanjuju ispoljavanje receptora oblika rampe i inhibiraju signalnu funkciju istih receptora u ćelijskoj membrani limfocita. Tako Th2-citokini inhibiraju produkciju Th1-citokina, smanjujući otpornost sluzokože nosa na infekcije (3). Rezultati našeg istraživanja takođe su pokazali značajno više koncentracije Th2-citokina (IL-4, IL-5 i IL-6) u nosnom sekretu bolesnika sa nosnim polipima i alergijom nego kod nealergičnih bolesnika. Prethodni rezultati su pokazali da je IL-5 jedan od ključnih proteina u patomehanizmu tkivne eozinofilije, povećavajući diferencijaciju, aktivaciju, širenje, mobilizaciju, kao i preživljavanje eozinofila (13). Široko je prihvaćeno da IL-5 ima značajnu ulogu u patogenezi alergijskog rinitisa, gde pokreće mobilizaciju eozinofila, rast i diferencijaciju B-limfocita (13). Glavni izvori IL-5 su eozinofili, Th2-limfociti i mastociti (13). Infiltracija i aktivacija eozinofila je osnovno obeležje tkiva nosnih polipa (1, 13). Preliminarni rezultati koje su prikazali Fan i sar. (1) sugerišu nam da IL-5 proizveden u T-limfocitima, kao i autosekrecija IL-5 u aktiviranim eozinofilima mogu biti razlozi za širenje i održavanje zapaljenja u NP. Aktivirani eozinofili oslobađaju velike količine citotoksičnih proteina, kao i faktora rasta, izazivajući oštećenja epitela, zadebljanja epitelne bazalne membrane, fibrozu i angiogenezu u stromi, kao i hiperplaziju žlezda (1,14). IL-6 je važan Th2-citokin, koji stimuliše produkciju IgE, kao i proliferaciju i sazrevanje mastocita (15). Kao i drugi Th2-citokini (IL-4, IL-5 i IL-13), IL-6 je naročito prisutan u nosnoj sluzokoži bolesnika sa alergijskim rinitisom (15). Imunohistohemijska bojenja i in situ hibridizacija

pokazale su da su Th2-limfociti, makrofagi, eozinofili i epitelne ćelije glavni izvori IL-6 (15). Patogeneza NP uključuje i fibroblaste kroz produkciju IL-6 koji modifikuje imunski odgovor (formiranje plazmocita), kao i kroz nastanak strome (15). Van Zele i sar. (16) su pokazali povećanu kolonizaciju NP kulturom *Staphylococcus aureus*, kao i prisustvo specifičnih IgE direktno protiv egzotoksina *Staphylococcus aureus* u tkivu nosnih polipa. Nivoi kolonizacije ovom bakterijom, kao i prisustvo IgE su viši kod bolesnika sa NP i pridruženom alergijskom astmom (16). Hellings i sar. (17) su pokazali da nosna aplikacija *Staphylococcus aureus* egzotoksina B kod miša u eksperimentalnim uslovima izaziva nastanak alergijskog rinitisa i astme, uporedo sa povećanjem nivoa Th2-citokina u bronhijalnom sekretu i sistemske cirkulaciji. Xu i sar. (18) su takođe našli značajno više koncentracije IL-6, kao i IL-4 i IFN- γ u *Staphylococcus aureus* egzotoksin B-stimulisanim nosnim polipima.

Među drugim Th2-citokinima, pokazano je da IL-4 potpomaže ili izaziva selektivni influks eozinofila u tkivo (13,19). Pretpostavlja se da IL-4 može biti uključen u stimulisanje ispoljavanja molekula adhezije za vaskularne ćelije-1 (VCAM-1) na endotelu malih krvnih sudova u nosnim polipima (13). Voegels i sar. (19) su našli da alergični bolesnici sa NP imaju značajno više koncentracije IL-4 u tkivu polipa nego nealergični. Cheng i sar. (20) su našli značajno viši procenat IL-4-produkujućih Th2-limfocita u polipima atopičnih ispitanika u odnosu na neatopične.

Naši rezultati su pokazali značajno više koncentracije snažnog proinflamatornog citokina TNF- β u nosnom sekretu atopičnih bolesnika sa NP u odnosu na neatopične. Uloga tog citokina je stimulacija rasta i diferencijacije brojnih ćelija, naročito T- i B-limfocita. Naš nalaz bi mogao biti objašnjen višim nivoom zapaljenjske reakcije kod alergičnih ispitanika u odnosu na nealergične.

Zaključak

Naši rezultati su pokazali da je prisustvo Th2-citokina (IL-4, IL-5 i IL-6) karakteristika koja je izraženija kod atopičnih nego kod

neatopičnih bolesnika sa nosnom polipozom, što je povezano sa pojačanim zapaljenjem koje je posredovano eozinofilima. Zaključili smo da polipi alergičnih i nealergičnih bolesnika imaju različit imunološki tok.

Literatura

1. Fan GK, Wang H, Takenaka H. Eosinophil infiltration and activation in nasal polyposis. *Acta Otolaryngol* 2007;127:521-6.
2. Fokkens W, Lund V, Mullol J; European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps group. European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps 2007. *Rhinol Suppl* 2007; 45(Suppl 20):1-136.
3. Ramanathan M, Lee WK, Spannhake EW, Lane AP. Th2 cytokines associated with chronic rhinosinusitis with polyps down-regulate the antimicrobial immune function of human sinonasal epithelial cells. *Am J Rhinol* 2008;22:115-21.
4. Jankowski R, Persoons M, Foliguet B, Coffinet L, Thomas C, Verient-Montaut B. Eosinophil count in nasal secretions of subjects with and without nasal symptoms. *Rhinology* 2000;38:23-32.
5. Riechelmann H, Deutschle T, Rozsasi A, Keck T, Polzehl D, Bürner H. Nasal biomarker profiles in acute and chronic rhinosinusitis. *Clin Exp Allergy* 2005;35:1186-91.
6. Riechelmann H, Deutschle T, Friemel E, Gross HJ, Bachem M. Biological markers in nasal secretions. *Eur Respir J* 2003;21:600-5.
7. Bonfils P, Avan P, Malinvaud D. Influence of allergy on the symptoms and treatment of nasal polyposis. *Acta Otolaryngol* 2006;126:839-44.
8. Gelardi M, Russo C, Fiorella ML, Fiorella R, Canonica GW, Passalacqua G. When allergic rhinitis is not only allergic. *Am J Rhinol Allergy* 2009;23(3):312-5.
9. Muñoz del Castillo F, Jurado-Ramos A, Fernández-Conde BL, Soler L, Barasona MJ, Cantillo E, et al. Allergic profile of nasal polyposis. *J Invest Allergol Clin Immunol* 2009;19:110-6.
10. Perić A, Vojvodić D, Radulović V. Cytokine profiles in nasal fluid in patients with nasal polyps: a flow cytometric study. *J Med Biochem* 2010;29:28-33.
11. Bachert C, Van Kempen M, Van Cauwenberge P. Regulation of proinflammatory cytokines in seasonal allergic rhinitis. *Int Arch Allergy Immunol* 1999;118:375-9.
12. Ohkubo K, Masakazu I, Pawankar R, Gotoh M, Yagi T, Okuda M. Mechanisms of IL-6, IL-8 and GM-CSF release in nasal secretions of allergic patients after nasal challenge. *Rhinology* 1998;36:156-61.
13. Bachert C, Wagenmann M, Rudack C, Höpken K, Hillebrandt M, Wang D, et al. The role of cytokines in infectious sinusitis and nasal polyposis. *Allergy* 1998;53:2-13.
14. Saitoh T, Kusunoki T, Yao T, Kawano K, Kojima Y, Miyahara K, et al. Relationship between epithelial damage or basement membrane thickness and eosinophilic infiltration in nasal polyps with chronic rhinosinusitis. *Rhinology* 2009;47:275-9.
15. Liu CM, Hong CY, Shun CT, Hsiao TY, Wang CC, Wang JS, et al. Inducible cyclooxygenase and interleukin-6 gene expression in nasal polyp fibroblasts. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2002; 128:945-51.
16. Van Zele T, Gevaert P, Watelet JB, Claeys G, Holtappels G, Claeys C, et al. Staphylococcus aureus colonization and IgE antibody formation to enterotoxins is increased in nasal polyposis. *J Allergy Clin Immunol* 2004;114:981-3.
17. Hellings PW, Hens G, Meyts I, Bullens D, Vanoirbeek J, Gevaert P, et al. Aggravation of bronchial eosinophilia in mice by nasal and bronchial exposure to Staphylococcus aureus enterotoxin B. *Clin Exp Allergy* 2006;36:1063-71.
18. Xu G, Xia JH, Zhou H, Yu CZ, Zhang Y, Zuo KJ, et al. Interleukin-6 is essential for Staphylococcal exotoxin B-induced T regulatory cell insufficiency in nasal polyps. *Clin Exp Allergy* 2009;39:829-37.
19. Voegels RL, Santoro P, Butugan O, Formigoni LG. Nasal polyposis and allergy: is there a correlation. *Am J Rhinol* 2001;15:9-14.
20. Cheng W, Zheng C, Tian J, Shi G. T helper cell population and eosinophilia in nasal polyps. *J Invest Allergol Clin Immunol* 2007;17:297-301.

INFLUENCE OF ALLERGY ON CYTOKINE LEVEL IN NASAL DISCHARGE OF PATIENTS WITH NASAL POLYPS

Aleksandar Perić, Danilo Vojvodić and Olivera Miljanović

Cytokine levels in nasal discharge reflect the inflammatory status of the nasal mucosa. The aim of the paper was to compare the concentrations of cytokines in nasal discharge in allergic and non-allergic patients with nasal polyps (NP). Thirty patients with NP (13 atopic and 17 non-atopic) were included in this study. Samples of nasal discharge were collected from nasal cavities of all 30 subjects. The levels of TNF- α , TNF- β , IL-1 β , IL-2, IL-12, IFN- γ , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, and IL-8 in nasal discharge were measured using commercial flow cytometric kit. We found significantly higher concentrations of IL-4 ($p < 0.01$), IL-5 ($p < 0.05$), IL-6 ($p < 0.05$) and TNF- β ($p < 0.05$) in allergic patients with NP than in non-allergic. Polyps in non-atopic and atopic patients have different immunological patterns. *Acta Medica Medianae 2010;49(3):40-44.*

Key words: *allergy, cytokines, nasal polyps*