

Agnieszka Urbaniak^{1,2}, Marek Zięba¹, Anna Zwolińska³, Urszula Szkudlarek³, Maria Łuczyńska³, Krzysztof Noweta⁴, Sylwia Kwiatkowska²

¹Wojewódzki Zespół Zakładów Opieki Zdrowotnej Centrum Leczenia Chorób Płuc i Rehabilitacji w Łodzi
Dyrektor: inż. Janusz Kazimierczak

²Oddział Kliniczny Pneumonologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
Kierownik: dr hab. n. med. Sylwia Kwiatkowska prof. nadzw.

³Katedra Fizjologii Doświadczalnej i Klinicznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
Kierownik: prof. dr hab. n. med. Dariusz Nowak

⁴Klinika Pneumonologii i Alergologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
Kierownik: prof. dr hab. n. med. Paweł Górski

Porównanie wybranych parametrów lokalnego i systemowego stanu zapalnego u chorych na pozaszpitalne zapalenie płuc i zapalenie płuc współistniejące z rakiem płuca

Comparison of local and systemic inflammatory markers in patients with community-acquired pneumonia and pneumonia coexisting with lung cancer

Praca finansowana ze źródeł Uniwersytetu Medycznego w Łodzi w ramach pracy własnej nr 502-18-523

Abstract

Background: The aim of the study was to compare the local and systemic markers of inflammatory processes in patients with community-acquired pneumonia (CAP) and in those with pneumonia coexisting with lung cancer.

Material and methods: Seventeen patients with community-acquired pneumonia (group I), 14 patients with pneumonia and lung cancer (group II), and 24 patients with lung cancer (group III) were enrolled into the study. Sixteen healthy smokers served as a control group (group IV). Concentration of hydrogen peroxide (H₂O₂), vascular endothelial growth factor (VEGF) and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) were measured in exhaled breath condensate (EBC). The levels of VEGF and TNF- α were also measured in serum.

Results: The concentrations of VEGF (317.83 ± 77.78) and TNF- α (1.98 ± 0.13) in EBC were significantly higher in patients with pneumonia and lung cancer as compared to patients with community-acquired pneumonia (VEGF 30.20 ± 6.56 ; TNF- α 0.31 ± 0.05). Also the level of H₂O₂ (0.96 ± 0.16) in EBC in patients with pneumonia and lung cancer was elevated in comparison to patients with CAP (0.66 ± 0.09), however the difference was not statistically significant ($p > 0.05$). The serum concentrations of both studied cytokines were significantly higher in patients with pneumonia (VEGF 1112.62 ± 244.38 and TNF- α 2.6 ± 0.48) than in those with pneumonia and lung cancer (VEGF 392.9 ± 78.2 ; TNF- α 1.6 ± 0.2).

Conclusions: Patients with pneumonia and lung cancer exhibited higher levels of oxidative stress and local inflammatory reactions than those with pneumonia. However, inflammatory markers in serum were significantly lower in patients with pneumonia and lung cancer as compared to those with CAP.

Key words: pneumonia, lung cancer, hydrogen peroxide, vascular endothelial growth factor, tumor necrosis factor alpha
Pneumonol. Alergol. Pol. 2011; 79, 2: 90–98

Adres do korespondencji: lek. Agnieszka Urbaniak, Wojewódzki Zespół Zakładów Opieki Zdrowotnej Centrum Leczenia Chorób Płuc i Rehabilitacji w Łodzi, ul. Okólna 181, 91–520 Łódź, tel.: 42 617 73 74, faks: 42 659 04 16, e-mail: agnes.urbaniak@gazeta.pl

Praca wpłynęła do Redakcji: 16.06.2010 r.
Copyright © 2011 Via Medica
ISSN 0867–7077

Streszczenie

Wstęp: Celem pracy było porównanie markerów lokalnych i systemowych procesów zapalnych u chorych na pozaszpitalne zapalenie płuc (CAP) oraz zapalenie płuc współistniejące z rakiem płuca.

Materiał i metody: Badania przeprowadzono u 17 chorych na pozaszpitalne zapalenie płuc (I grupa), 14 chorych na zapalenie płuc współistniejące z rakiem płuca (II grupa), 24 chorych na raka płuca (III grupa) oraz u 16 osób zdrowych (IV grupa — kontrolna). Oceniano stężenie nadtlenu wodoru (H_2O_2), naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF) i czynnika martwicy nowotworów α (TNF- α) w kondensacie powietrza wydechowego (EBC) oraz stężenie VEGF i TNF- α w surowicy.

Wyniki: U chorych na zapalenie płuc współistniejące z rakiem płuca stwierdzono znamienne wyższe stężenie VEGF ($317,83 \pm 77,78$) i TNF- α ($1,98 \pm 0,13$) w kondensacie powietrza wydechowego w porównaniu z chorymi na pozaszpitalne zapalenie płuc (VEGF $30,20 \pm 6,56$; TNF- α $0,31 \pm 0,05$). Choć stężenie H_2O_2 ($0,96 \pm 0,16$) w EBC u chorych na zapalenie płuc współistniejące z rakiem płuca było wyższe niż stężenie występujące u chorych na CAP ($0,66 \pm 0,09$), to jednak różnica nie osiągnęła istotności statystycznej ($p < 0,05$). Natomiast u chorych na pozaszpitalne zapalenie płuc obserwowano istotnie wyższe stężenie obu badanych cytokin w surowicy krwi (VEGF $1112,62 \pm 244,38$ i TNF- α $2,6 \pm 0,48$) w porównaniu z chorymi na zapalenie płuc ze współistniejącym rakiem płuca (VEGF $392,9 \pm 78,2$; TNF- α $1,6 \pm 0,2$).

Wnioski: Chorych na zapalenie płuc współistniejące z rakiem płuca charakteryzuje wyraźna tendencja do nasilonego miejscowego stresu oksydacyjnego oraz znamienne wzmożona lokalna reakcja zapalna w porównaniu z chorymi na pozaszpitalne zapalenie płuc. Natomiast systemowa reakcja zapalna u chorych na zapalenie płuc wraz ze współistniejącym rakiem płuca jest wyraźnie zmniejszona w stosunku do chorych na CAP.

Słowa kluczowe: zapalenie płuc, rak płuca, nadtlenek wodoru, naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu, czynnik martwicy nowotworów α

Pneumonol. Alergol. Pol. 2011; 79, 2: 90–98

Wstęp

Jedną z najczęstszych chorób infekcyjnych, stanowiących poważny problem zdrowotny, jest pozaszpitalne zapalenie płuc (CAP, *community acquired pneumonia*). Jego występowanie rośnie wraz z wiekiem badanej populacji, osiągając powyżej 70. roku życia wartość około 30 na 1000 osób w skali roku [1]. Choć choroba ta często ma dość łagodny przebieg, to jednak około 20% pacjentów wymaga hospitalizacji, co sprawia, że CAP znalazło się na szóstym miejscu przyczyn zgonów w krajach rozwiniętych, mimo znacznych postępów antybiotykoterapii [2, 3]. Niewątpliwym wpływem na rozwój i przebieg toczącego się zapalenia ma stan układu immunologicznego, determinowany, przynajmniej częściowo, współistniejącymi chorobami.

Wyniki badań wielu autorów wskazują na wzrost stężenia prozapalnych cytokin, zarówno lokalnie — w układzie oddechowym, jak i systemowo — we krwi chorych na CAP. I tak, w płynie uzyskanym z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego (BALF, *bronchoalveolar lavage fluid*) u chorych na pozaszpitalne, bakteryjne zapalenie płuc, obok interleukiny IL-1 β (IL-1 β , *interleukin 1 β*) i IL-6, zaobserwowano zwiększone stężenie czynnika martwicy nowotworów α (TNF- α , *tumor necrosis factor alpha*) [4]. Natomiast pacjenci z ciężkim zapaleniem płuc oraz zespołem ostrej niewydolności oddechowej (ARDS, *acute respiratory distress syndrome*) charakteryzowali się systemowym wzrostem stężenia IL-6, IL-8 oraz TNF- α [5].

Rozwijające się w miejscu lokalnego zapalenia drobnoustroje są silnymi stymulatorami wybuchu oddechowego fagocytów, generującego olbrzymie ilości reaktywnych form tlenu (ROS, *reactive oxygen species*). Powstający w procesach wolnorodnikowych nadtlenek wodoru (H_2O_2), który nie został zneutralizowany przez układ antyoksydacyjny i nie uległ dalszej przemianie, zebrany w kondensacie powietrza wydechowego (EBC, *exhaled breath condensate*), jest dobrym miernikiem lokalnego stresu oksydacyjnego. Wykazano jego znaczący wzrost w powietrzu wydechowym zarówno u chorych na pozaszpitalne, bakteryjne zapalenie płuc [6], jak i u tych z chorobą nowotworową płuc. Prace wielu autorów wskazują na nasilenie lokalnego stresu oksydacyjnego mierzonego bezpośrednio wzrostem wydychanego H_2O_2 u chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca (NSCLC, *non-small cell lung cancer*), ale i pośrednio, przez nasiloną peroksydację lipidów w tkance zmienionej nowotworowo [7, 8].

U chorych na CAP obserwuje się przede wszystkim niszczące w stosunku do patogennych drobnoustrojów działanie ROS, jednak u chorych na raka płuca ich rola nie jest tak jednoznaczna. Stwierdzono bowiem, że ROS mają swój udział w procesie kancerogenezy, zarówno w fazie inicjacji, jak i promocji [9]. Ponadto znaczącą rolę w szerzeniu się nowotworu poprzez swój udział w angiogenezie odgrywa naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF, *vascular endothelial growth factor*) [10]. Wzmożoną ekspresję VEGF w tkance nowotworowej bądź też zwiększone stężenie tego

czynnika w surowicy stwierdzono u chorych na raka piersi, żołądka, jelita grubego oraz płuca [11–14]. Dlatego leki antyangiogenne hamujące aktywność VEGF i blokujące jego receptory zostały w ciągu ostatnich lat wprowadzone do terapii nowotworów [15]. Rola, jaką spełnia TNF- α u chorych na raka płuca, stanowi w dalszym ciągu przedmiot badań, bowiem z jednej strony wykazywano przeciwnowotworową aktywność tej cytokiny, a z drugiej promującą rozwój guza; TNF- α może hamować klonalną proliferację komórek nowotworowych, ale też poprzez wzrost produkcji reaktywnych form tlenu, które są czynnikami mutagennymi, potencjalnie toruje szlak kancerogenezy [16, 17].

Na podstawie zmian zachodzących w układzie pro- i antyoksydacyjnym, którym towarzyszą zmiany stężeń wybranych markerów, autorzy postanowili ocenić lokalny i systemowy proces zapalny w grupie chorych na pozaszpitalne zapalenie płuc w porównaniu z chorymi na zapalenie płuc współistniejące z rakiem płuca. W tym celu oceniano:

- lokalny stres oksydacyjny, mierząc stężenie H₂O₂ w kondensacie powietrza wydechowego;
- lokalną reakcję zapalną poprzez pomiar stężenia VEGF oraz TNF- α w kondensacie powietrza wydechowego;
- systemową reakcję zapalną, badając stężenie VEGF oraz TNF- α w surowicy;
- zależności między lokalną i systemową reakcją zapalną a wybranymi parametrami klinicznymi.

Material i metody

Charakterystyka pacjentów

Badaniem objęto 55 pacjentów hospitalizowanych na Oddziale Klinicznym Pneumonologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi w 2008 roku oraz 16 zdrowych ochotników, których podzielono na 4 grupy:

- I. 17 chorych na pozaszpitalne zapalenie płuc (8 kobiet i 9 mężczyzn), średnia wieku — 60 \pm 6 lat, 17 \pm 3 paczkołata, średnia liczba zajętych pól płucnych przez zmiany zapalne — 2,12 \pm 0,23;
- II. 14 chorych na zapalenie płuc współistniejące z rakiem płuca (6 kobiet i 8 mężczyzn), średnia wieku — 76 \pm 8 lat, 74 \pm 3 paczkołata. W tej grupie rozpoznano w 10 przypadkach raka niedrobnokomórkowego płuca (stopień IIIB — 3 chorych, stopień IV — 7 chorych), a w pozostałych 4 przypadkach — raka drobnokomórkowego (postać ograniczona [LD, *limited disease*] — 2 chorych, postać zaawansowana [ED, *extended disease*] — 2 chorych; stopień IIIB — 2 chorych, stopień IV — 2 chorych);

III. referencyjna — 24 chorych na raka płuca, bez współistniejącego zapalenia płuc (8 kobiet, 16 mężczyzn), średnia wieku — 61 \pm 2 lat, 42 \pm 5 paczkołata. Raka niedrobnokomórkowego rozpoznano u 17 pacjentów (stopień IIIB — 7 chorych, stopień IV — 10 chorych), natomiast raka drobnokomórkowego u 7 pacjentów (LD — 1 chory, ED — 6 chorych; stopień IIIB — 1 chory, stopień IV — 6 chorych);

IV. kontrolna — 16 zdrowych ochotników (5 kobiet, 11 mężczyzn), średnia wieku — 49 \pm 3, 19 \pm 3 paczkołata.

Wszystkie badane osoby były aktualnymi palaczami papierosów. We wszystkich badanych grupach występowały objawy przewlekłego zapalenia oskrzeli, jednak nie spełniano w nich kryteriów przewlekłej obturacyjnej choroby płuc (COPD, *chronic obstructive pulmonary disease*).

U chorych na zapalenie płuc rozpoznanie postawiono na podstawie objawów zakażenia dolnych dróg oddechowych, objawów klinicznych (temperatura ciała > 38°C, tachykardia > 100/min, *tachypnoe* > 24/min), ogniskowych zmian osłuchowych oraz pojawienia się zmian na zdjęciu rentgenowskim klatki piersiowej.

Raka płuca rozpoznano na podstawie badania cytologicznego lub histopatologicznego. Do oceny stopnia zaawansowania raka niedrobnokomórkowego stosowano nową klasyfikację TNM (*tumor, nodes, metastases*) z 2009 roku, a w przypadku raka drobnokomórkowego podział na ograniczoną (LD) i zaawansowaną postać choroby (ED), a także TNM.

U wszystkich badanych w ciągu pierwszych trzech dni hospitalizacji, dokonano pomiaru stężenia H₂O₂, VEGF i TNF- α w kondensacie powietrza wydechowego. Natomiast w surowicy krwi oznaczano stężenie VEGF i TNF- α .

Pacjenci wyrazili pisemną zgodę na udział w badaniu, które uzyskało aprobatę Komisji Etycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

Kondensat powietrza wydechowego

Kondensat powietrza wydechowego zbierano zgodnie z metodą opisywaną wcześniej w literaturze [18, 19]. Aparat służący do zbierania kondensatu składał się z ustnika połączanego ze szklaną rurką Liebiga, o długości 55 cm, średnicy wewnętrznej 10 mm oraz średnicy osłony 36 mm (Labmed, Łódź nr kat. 6010). Rurka Liebiga była chłodzona etanolem o temperaturze -9°C, który pompowano do zamkniętego zewnętrznego obiegu za pomocą MultiTemp III (Pharmacia Biotech, AB, Szwecja). Kondensat powietrza wydechowego zbierano do plastikowych probówek o pojem-

Tabela 1. Stężenie H₂O₂, VEGF i TNF-α w kondensacie powietrza wydechowego w badanych grupach**Table 1. Concentration of H₂O₂, VEGF and TNF-α in exhaled breath condensate in study groups**

Grupy badane/Study groups	VEGF [pg/ml]	TNF-α [pg/ml]	H ₂ O ₂ [μM]
I. Chorzy na pozaszpitalne zapalenie płuc/ <i>Patients with community-acquired pneumonia</i>	30,20 ± 6,56	0,31 ± 0,05	0,66 ± 0,09
II. Chorzy na zapalenie płuc współistniejące z rakiem płuca/ <i>Patients with pneumonia and lung cancer</i>	317,83 ± 77,78	1,98 ± 0,13	0,96 ± 0,16
III. Chorzy na raka płuca (grupa referencyjna)/ <i>Patients with lung cancer (reference group)</i>	53,96 ± 5,13	0,45 ± 0,05	0,6075 ± 0,088
IV. Zdrowi ochotnicy (grupa kontrolna)/ <i>Healthy volunteers (control group)</i>	16,47 ± 0,96	0	0,085 ± 0,028

ności 10 ml (Sarstedt), które były umieszczone w zbiorniku z lodem.

Badanie, które trwało 20 min, wykonywano między godziną 08.00 a 10.00 rano. Osoba badana wykonywała swobodny wydech przez ustnik, natomiast wdech poza ustnikiem. Uzyskiwano średnio 5 ml kondensatu powietrza wydechowego, który do czasu badania przechowywano w temperaturze -80°C, nie dłużej niż 2 tygodnie.

Pomiar H₂O₂ w kondensacie powietrza wydechowego

Stężenie H₂O₂ mierzono zgodnie z metodą podaną przez Ruch i wsp. [20] — 10 μl kondensatu mieszano z 90 μl PBS (*phosphate-buffered saline*; pH 7,4) i 100 μl roztworu peroksydazy chrzanowej — HRP (1 Uml⁻¹), który zawierał 400 μM kwasu homowanilinowego (HVA, *homovanilic acid*). Otrzymaną mieszaninę inkubowano w temperaturze 37°C przez 60 min, a następnie dodawano 300 μl 0,1 M buforu glicyna — NaOH o pH 12,0 oraz 25 mM kwasu etylenodiaminotetraoctowego (EDA, *ethylene diamine tetraacetic acid*). Za pomocą spektrofotometru luminescencyjnego (Perkin Elmer Luminescence Spectrometer, Beaconsfield, Wielka Brytania) mierzono natężenie emisji o długości fali 420 nm po wzbudzeniu falą o długości 312 nm. Stężenie H₂O₂ obliczano według równania regresji:

$$Y = 0,012 \times (X - X_0) - 0,007,$$

gdzie: Y — stężenie H₂O₂ w μM, X — emisja 420 nm w jednostkach U. Dolna granica detekcji H₂O₂ wynosiła 0,083 μM.

Pomiar stężenia VEGF oraz TNF-α w EBC i w surowicy

Naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu oraz TNF-α zarówno w EBC, jak i w surowicy krwi mierzono metodą immunoenzymatyczną (ELISA, *enzyme-linked immunosorbent assay*) przy użyciu komercyjnie dostępnego zestawu (Quantikine, R&D Systems, Stany Zjednoczone), według instrukcji podanej przez producenta. Pobraną do próbki niezawierającej antykoagulantów krew obwodową,

pozostawiano 30 min w celu wytworzenia skrzepu, a następnie wirowano przez 10 min, z prędkością 1000 obrotów/min. Tak uzyskaną surowicę przechowywano w temperaturze -20°C do czasu wykonania oznaczeń. Dolna granica detekcji dla VEGF wynosiła 9 pg/ml, a dla TNF-α — 0,06 pg/ml.

Analiza statystyczna

Wyniki przedstawiano jako średnią ± błąd standardowy średniej (SEM, *standard error for the mean*). Rozkład zmiennych w poszczególnych grupach oceniano za pomocą testu Shapiro-Wilka. Korelacje badano za pomocą testu Pearsona (r) i Spearmana (R). Do oceny istotności różnic między badanymi parametrami stosowano test t oraz test Kolmogorowa-Smirnowa. We wszystkich przypadkach poziom p < 0,05 uznano za statystycznie istotny.

Wyniki

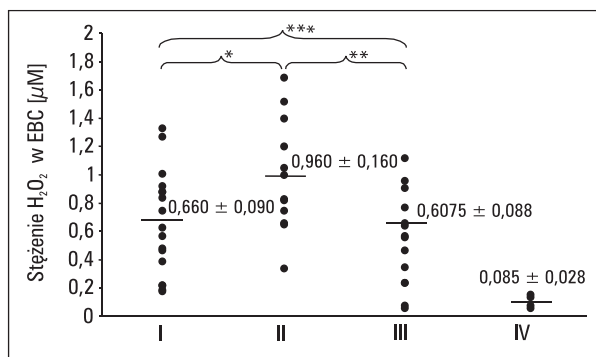
Kondensat powietrza wydechowego

Stężenie H₂O₂ w kondensacie powietrza wydechowego

We wszystkich grupach badanych (tab. 1) wykazano istotnie wyższe średnie stężenie H₂O₂ w EBC w porównaniu z grupą osób zdrowych (p < 0,05). Mimo że najwyższe stężenie H₂O₂ stwierdzono u chorych na zapalenie płuc współistniejące z rakiem płuca, to jednak nie różniło się ono znamienne od stężenia uzyskanego u pacjentów z CAP (p > 0,05). Pozostawało natomiast istotnie wyższe niż u chorych na raka płuca (p < 0,05). Nie stwierdzono istotnej różnicy między stężeniem H₂O₂ u chorych na CAP a u chorych na raka płuca (p > 0,05) (ryc. 1).

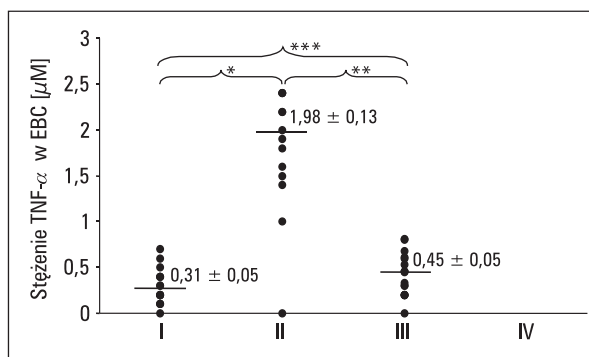
Stężenie VEGF w kondensacie powietrza wydechowego

Średnie stężenie VEGF w EBC we wszystkich badanych grupach wykazywało wyraźną tendencję wzrostową w stosunku do zdrowych ochotników. Jednak tylko u chorych na zapalenie płuc współistniejące z rakiem płuca i u chorych na raka



I — chorzy na pozaszpitalne zapalenie płuc/*patients with community-acquired pneumonia*
 II — chorzy na zapalenie płuc współistniejące z rakiem płuca/*patients with pneumonia and lung cancer*
 III — chorzy na raka płuca/*patients with lung cancer*
 IV — zdrowi ochotnicy/*healthy volunteers*
 * $p > 0,05$ I v. II
 ** $p < 0,05$ II v. III
 *** $p > 0,05$ III v. I

Rycina 1. Stężenie H_2O_2 w kondensacie powietrza wydechowego
Figure 1. Concentration of H_2O_2 in exhaled breath condensate



I — chorzy na pozaszpitalne zapalenie płuc/*patients with community-acquired pneumonia*
 II — chorzy na zapalenie płuc współistniejące z rakiem płuca/*patients with pneumonia and lung cancer*
 III — chorzy na raka płuca/*patients with lung cancer*
 IV — zdrowi ochotnicy/*healthy volunteers*
 * $p < 0,05$ I v. II
 ** $p < 0,05$ II v. III
 *** $p > 0,05$ III v. I

Rycina 2. Stężenie $TNF-\alpha$ w kondensacie powietrza wydechowego
Figure 2. Concentration of $TNF-\alpha$ in exhaled breath condensate

Tabela 2. Stężenie VEGF i $TNF-\alpha$ w surowicy krwi w badanych grupach

Table 2. Serum concentration of VEGF and $TNF-\alpha$ in study groups

Grupy badane/Study groups	VEGF [pg/ml]	$TNF-\alpha$ [pg/ml]
I. Chorzy na pozaszpitalne zapalenie płuc/ <i>Patients with community-acquired pneumonia</i>	1112,62 ± 244,38	2,6 ± 0,48
II. Chorzy na zapalenie płuc współistniejące z rakiem płuca/ <i>Patients with pneumonia and lung cancer</i>	392,9 ± 78,2	1,6 ± 0,2
III. Chorzy na raka płuca (grupa referencyjna)/ <i>Patients with lung cancer (reference group)</i>	704,70 ± 157,77	2,22 ± 0,46
IV. Zdrowi ochotnicy (grupa kontrolna)/ <i>Healthy volunteers (control group)</i>	183,27 ± 18,57	0,62 ± 0,09

płuca wynik osiągnął istotność statystyczną ($p < 0,05$). Najwyższe stężenie VEGF zanotowano u chorych na zapalenie płuc współistniejące z rakiem płuca i było ono znacząco wyższe niż u chorych na CAP ($p < 0,05$) i chorych na raka płuca ($p < 0,05$) (tab. 1). Średnie stężenie VEGF w EBC u pacjentów z CAP nie różniło się od wartości charakteryzującej chorych na raka płuca ($p > 0,05$).

Stężenie $TNF-\alpha$ w kondensacie powietrza wydechowego

W trzech badanych grupach wykazano obecność $TNF-\alpha$ w EBC (tab. 1). Najwyższe stężenie tej cytokiny występowało w grupie chorych na zapalenie płuc współistniejące z rakiem płuca i było ono istotnie wyższe niż w dwóch pozostałych grupach chorych (I i III) ($p < 0,05$). Nie zaobserwowano istotnej różnicy w stężeniu czynnika $TNF-\alpha$ w EBC między chorymi na CAP a chorymi na raka płuca ($p > 0,05$). U zdrowych osób stężenie $TNF-\alpha$ było poniżej dolnej granicy detekcji (ryc. 2).

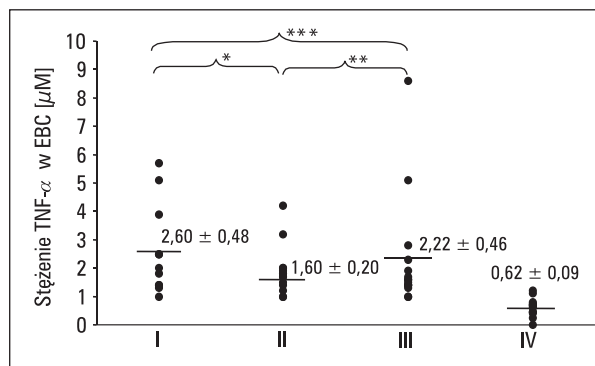
Stężenie prozapalnych cytokin w surowicy

Stężenie VEGF w surowicy

W porównaniu z grupą zdrowych osób znacząco wyższe stężenie VEGF występowało u chorych na CAP ($p < 0,05$) i na raka płuca ($p < 0,05$), przy czym najwyższą wartość osiągnęło u pacjentów z CAP. Natomiast najniższe stężenie VEGF zanotowano u chorych na zapalenie płuc współistniejące z rakiem płuca i było ono istotnie niższe niż u chorych na CAP (tab. 2). Nie stwierdzono znaczącej różnicy w stężeniach VEGF między chorymi na zapalenie płuc współistniejące z rakiem płuca a chorymi na raka płuca ($p > 0,05$), jak również między chorymi na CAP a chorymi na raka płuca ($p > 0,05$).

Stężenie $TNF-\alpha$ w surowicy

Stężenie $TNF-\alpha$ w surowicy było istotnie wyższe u chorych na CAP i chorych na raka płuca w porównaniu ze zdrowymi osobami ($p < 0,05$). Naj-



I — chorzy na pozaszpitalne zapalenie płuc/patients with community-acquired pneumonia
 II — chorzy na zapalenie płuc współistniejące z rakiem płuca/patients with pneumonia and lung cancer
 III — chorzy na raka płuca/patients with lung cancer
 IV — zdrowi ochotnicy/healthy volunteers

* $p < 0,05$ I v. II

** $p > 0,05$ II v. III

*** $p > 0,05$ III v. I

Rycina 3. Stężenie TNF- α w surowicy krwi

Figure 3. Serum concentration of TNF- α

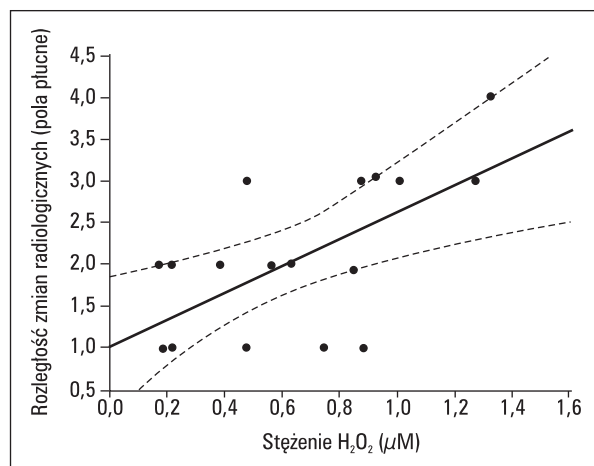
niższe stężenie TNF- α , które odnotowano u chorych na zapalenie płuc ze współistniejącym rakiem płuca, było istotnie niższe niż u chorych na CAP ($p < 0,05$) oraz porównywalne ze stężeniem występującym u chorych na raka płuca ($p > 0,05$). Nie zaobserwowano również znaczącej różnicy w stężeniach TNF- α między chorymi na zapalenie płuc a chorymi na raka płuca ($p > 0,05$) (tab. 2, ryc. 3).

Korelacje między badanymi zmiennymi

U chorych na zapalenie płuc wykazano dodatnią korelację między stężeniem H₂O₂ w EBC a rozległością zmian zapalnych stwierdzonych na zdjęciu rentgenowskim klatki piersiowej, mierzonych liczbą zajętych pól płucnych ($r = 0,62$, $p < 0,05$) (ryc. 4). Nie stwierdzono związku między badanymi parametrami charakteryzującymi zmiany lokalne a markerami odpowiedzi systemowej. Nie wykazano istotnych statystycznie różnic dotyczących wieku badanych, z wyjątkiem chorych z II grupy, którzy byli istotnie starsi niż osoby z grupy kontrolnej. Natomiast badane grupy różniły się istotnie ($p < 0,05$) pod względem liczby paczkołat. Jednak analiza korelacji między wiekiem badanych osób i liczbą paczkołat a badanymi parametrami (VEGF, TNF- α , H₂O₂) w EBC i surowicy oceniana testem Pearsona oraz Spearmana nie wykazała istotności statystycznej ($p > 0,05$).

Dyskusja

Wyniki przeprowadzonych badań wykazały, że zarówno chorzy na zapalenie płuc, jak i zapalenie płuc współistniejące z rakiem płuca, charakte-



Rycina 4. Dodatnia korelacja między stężeniem H₂O₂ w kondensacie powietrza wydechowego, u chorych na pozaszpitalne zapalenie płuc, a rozległością zmian zapalnych obserwowanych na radiogramach klatki piersiowej

Figure 4. Positive correlation between the concentration of H₂O₂ in exhaled breath condensate in patients with community-acquired pneumonia and the extent of radiological inflammatory changes

ryzowali się nasiloną lokalną reakcją zapalną w porównaniu z grupą kontrolną. Stres oksydacyjny mierzony stężeniem nadtlenu wodoru w wydychanym powietrzu w badanych grupach był znacznie wyższy niż u zdrowych palaczy tytoniu. Podwyższonemu stężeniu H₂O₂ towarzyszył lokalny wzrost VEGF i TNF- α (tab. 1). Jednocześnie stwierdzono, że najwyższe stężenie badanych markerów występowało u chorych na zapalenie płuc współistniejące z rakiem płuca, podczas gdy reakcja systemowa w tej grupie była zbliżona do wartości charakteryzujących grupę zdrowych osób. Natomiast u chorych na izolowane zapalenie płuc lokalne stężenie VEGF i TNF- α było znacznie niższe niż u chorych na zapalenie płuc współistniejące z rakiem płuca, zaś reakcja systemowa była najsilniej wyrażona (tab. 1, 2).

Również inni autorzy wskazują na nasilenie stresu oksydacyjnego w układzie oddechowym u chorych na zapalenie płuc. Majewska i wsp. wykazali wzrost H₂O₂, a także pochodnych kwasu tiobarbiturowego (TBARs, *tiobarbituric acid reactive substances*) w kondensacie powietrza wydechowego u pacjentów z bakteryjnym CAP w porównaniu z grupą asymptomatycznych palaczy [6]. W badaniu tym stężenie H₂O₂ korelowało z liczbą białych krwinek i stężeniem białka C-reaktywnego (CRP, *C-reactive protein*) w surowicy pacjentów. Podobnie Kietzmann i wsp. obserwowali wysokie stężenie wydychanego nadtlenu wodoru u chorych z ARDS spowodowanym między innymi ciężkim zapaleniem płuc [21]. Wyniki przeprowadzonych

przez autorów niniejszej pracy badań pozostają w związku z powyższymi doniesieniami i potwierdzają przewagę lokalnych procesów oksydacyjnych nad antyoksydacyjnymi u chorych na zapalenie płuc oraz wskazują na dodatnią korelację pomiędzy stężeniem H_2O_2 w kondensacie powietrza wydechowego a rozległością zmian radiologicznych. Szczególnie interesująca i warta podkreślenia jest wyraźna tendencja wzrostowa dotycząca stężenia H_2O_2 w EBC u chorych na zapalenie płuc współistniejące z rakiem płuca. Będący skutkiem palenia papierosów przewlekły proces zapalny obejmujący drogi oddechowe, wiążący się z lokalnym nagromadzeniem makrofagów i neutrofilów stanowiących główne źródło prozapalnych cytokin i ROS, może prowadzić do rozwoju nowotworu [22, 23]. Wykazano bowiem, że wolne rodniki indukują mutacje punktowe DNA i aberracje chromosomalne w komórkach nabłonka dróg oddechowych, prowadząc do transformacji nowotworowej. Potwierdzeniem tego jest zwiększone stężenie nadtlenu wodoru w EBC stwierdzone zarówno u zdrowych palaczy tytoniu [24], jak i u chorych z chorobą nowotworową płuc [7]. Wykazany zatem wzrost stężenia H_2O_2 w kondensacie powietrza wydechowego u chorych na zapalenie płuc współistniejące z rakiem płuca należy wiązać z nakładaniem się ostrej reakcji zapalnej na przewlekły proces zapalny indukowany paleniem tytoniu, jak również obecnością samego nowotworu. W tym przypadku źródłem reaktywnych form tlenu są nie tylko leukocyty, gromadzące się w miejscu ostrej odpowiedzi zapalnej, ale również komórki układu immunologicznego znajdujące się w otoczeniu guza.

Podobnie jak nasilenie stresu oksydacyjnego, najwyższe stężenia VEGF i TNF- α w powietrzu wydechowym obserwowano u chorych na zapalenie płuc współistniejące z rakiem płuca. Choć rola plejotropowej cytokiny, jaką jest TNF- α , jak również VEGF, była już przedmiotem wielu badań, to zgodnie z wiedzą autorów, dotychczas nie oceniano przebiegu procesów zapalnych mierzonych stężeniem obu tych markerów w wybranych grupach chorych. Czynniki martwicy nowotworów α poprzez stymulację limfocytów do produkcji przeciwciał, a także aktywację neutrofilów i makrofagów, bierze udział w odpowiedzi immunologicznej skierowanej przeciwko wielu mikroorganizmom, które często są przyczyną zapalenia płuc, takim jak: *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* czy *Pseudomonas aeruginosa*. Również na modelu mysim wykazano protekcyjną rolę tego czynnika w samym procesie zapalnym [25]. Podanie bowiem przeciwciał anty-TNF- α wiązało się z nasileniem procesów zapalnych prowadzących do

śmierci zwierzęcia. Podobnie w badaniach własnych, u chorych na CAP stwierdzono w powietrzu wydechowym wyraźną obecność TNF- α przy jego nieoznaczalnym stężeniu w grupie zdrowych palaczy. Najwyższe stężenie tej cytokiny odnotowano u chorych na zapalenie płuc współistniejące z rakiem, co może wynikać z miejscowej mobilizacji komórek układu immunologicznego, prowadzącej do wzmożonej produkcji prozapalnych cytokin będących przyczyną przewlekłego stanu zapalnego związanego z obecnością samego nowotworu. Wyniki badań innych autorów wykazały, że u chorych na raka płuca lokalnym źródłem wielu markerów prozapalnych, takich jak: TNF- α , IL-1 oraz IL-6 są makrofagi pęcherzykowe zlokalizowane wokół guza (TAMs, *tumor associated macrophages*) [26, 27]. Carpagano i wsp. wykazali nie tylko miejscowo wyższe stężenie TNF- α obok IL-2 i leptyny u chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca w porównaniu z grupą zdrowych, byłych palaczy tytoniu, ale również korelację badanych markerów ze stopniem zaawansowania nowotworu [28]. Z kolei zważywszy na rolę, jaką w procesie wzrostu i szerzenia się guza odgrywa VEGF nie dziwi fakt, że jego najwyższe stężenie zanotowano w grupie chorych na zapalenie płuc współistniejące z rakiem płuca. Było ono ponad 10-krotnie wyższe niż wartość stężenia charakterystyczna dla chorych z izolowanym zapaleniem płuc. W badanych grupach jedynie u chorych z chorobą nowotworową (grupa II i III) występowało w EBC znacząco wyższe stężenie tego czynnika w porównaniu z grupą zdrowych osób. Ostatnio Gessner i wsp. [29], analizując markery angiogenezy, w tym VEGF, w EBC w różnych grupach chorych uznali nawet, że mogą one być pomocne we wczesnej diagnostyce raka płuca. Wykazany przez autorów znaczący wzrost TNF- α i VEGF w kondensacie powietrza wydechowego u chorych na zapalenie płuc ze współistniejącym rakiem płuca, w porównaniu z chorymi na CAP, świadczy o wybitnie zaawansowanych lokalnych procesach zapalnych, związanych zarówno z ostrą reakcją skierowaną przeciwko patogenom, jak i tą związaną z obecnością guza, ale nie można też wykluczyć związku z miejscową progresją choroby nowotworowej.

Odmienne od reakcji lokalnej przebiegała systemowa odpowiedź zapalna (tab. 2). Najwyższe stężenia badanych markerów obserwowano u chorych na CAP, podczas gdy chorzy na zapalenie płuc ze współistniejącym rakiem płuca wykazywali się jedynie nieznacznie wyższym ($p > 0,05$) stężeniem zarówno TNF- α , jak i VEGF w porównaniu z grupą kontrolną zdrowych palaczy. Natomiast wśród chorych na izolowane zapalenie płuc, obok wzro-

stu stężenia TNF- α , obserwowano wyjątkowo wysokie stężenie VEGF. Również Choi i wsp. w populacji dziecięcej z CAP wykazali istotnie wyższe stężenie VEGF w surowicy, w porównaniu z grupą kontrolną [30]. Wartość ta wzrastała znacząco w przypadku powikłania wysiękiem opłucnowym i wykazywała dodatnią korelację z sedymentacją erytrocytów. Wykazane zaś, zbliżone do wartości charakteryzującej grupę kontrolną, stężenia TNF- α i VEGF w surowicy chorych na zapalenie płuc współistniejące z rakiem płuca, wskazują na obniżoną ogólnoustrojową odpowiedź zapalną u tych chorych. Co ciekawe, stężenia badanych cytokin u chorych w II grupie wykazywały także tendencję niższą ($p > 0,05$) w porównaniu z wartościami występującymi u chorych na raka płuca, wskazując, że dołączający się ostry proces zapalny nie stymulował już dalszego wzrostu badanych markerów w surowicy. Wiąże się to ze zmniejszoną systemową liczbą i aktywnością komórek układu immunologicznego, które zostały zaangażowane w intensywny lokalny proces zapalny. Już w latach 70. XX wieku stwierdzono upośledzoną odpowiedź immunologiczną u chorych na raka płuca, przejawiającą się zmniejszoną liczbą krążących limfocytów T oraz słabą opóźnioną reakcją nadwrażliwości typu komórkowego [31]. Wykazano, że pacjenci z tak zaburzoną aktywnością układu immunologicznego charakteryzowali się bardziej zaawansowaną postacią choroby nowotworowej i niekorzystną odpowiedzią na chemioterapię. Dlatego też wystąpienie zapalenia płuc u chorych na raka płuca, pogłębia istniejące już zaburzenia ogólnoustrojowej odpowiedzi immunologicznej i przejawia się wyraźnym systemowym zmniejszeniem produkcji obu badanych markerów. Potwierdzają to obserwacje kliniczne u chorych na raka płuca wskazujące, że zakażenia układu oddechowego są jedną z głównych przyczyn zgonu wśród tych pacjentów [32, 33].

Wnioski

1. U chorych na zapalenie płuc współistniejące z rakiem płuca występuje zarówno wyraźna tendencja do nasilonego miejscowego stresu oksydacyjnego, jak i znamienne wzmożona lokalna reakcja zapalna, w porównaniu z chorymi na CAP.
2. Systemowa reakcja zapalna u chorych na zapalenie płuc współistniejące z rakiem płuca jest wyraźnie mniejsza w stosunku do chorych na izolowane CAP.
3. Stężenie H₂O₂ w powietrzu wydechowym u chorych na CAP wykazuje dodatnią korelację z rozległością zmian zapalnych.

Piśmiennictwo

1. Garcia-Vidal C., Calbo E., Pascual V., Ferrer C., Quintana S., Garau J. Effects of systemic steroids in patients with severe community-acquired pneumonia. *Eur. Respir. J.* 2007; 30: 951–956.
2. Alvares-Lerma F., Torres A. Severe community-acquired pneumonia. *Curr. Opin. Crit. Care* 2004; 10: 369–374.
3. Garibaldi R.A. Epidemiology of community-acquired respiratory tract infections in adults. Incidence, etiology, and impact. *Am. J. Med.* 1985; 78: 32–37.
4. Dehoux M.S., Boutten A., Ostinelli J. i wsp. Compartmentalized cytokine production within the human lung in unilateral pneumonia. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1994; 150: 710–716.
5. Schütte H., Lohmeyer J., Rosseau S. i wsp. Bronchoalveolar and systemic cytokine profiles in patients with ARDS, severe pneumonia, and cardiogenic pulmonary oedema. *Eur. Respir. J.* 1996; 9: 1858–1867.
6. Majewska E., Kasielski M., Łuczyński R., Bartosz G., Białasiewicz P., Nowak D. Elevated exhalation of hydrogen peroxide and thiobarbituric acid reactive substances in patients with community acquired pneumonia. *Respir. Med.* 2004; 98: 669–676.
7. Chan H.P., Tran V., Lewis C., Thomas P.S. Elevated levels of oxidative stress markers in exhaled breath condensate. *J. Thorac. Oncol.* 2009; 4: 172–178.
8. Zięba M., Nowak D., Suwalski M. i wsp. Enhanced lipid peroxidation in cancer tissue homogenates in non-small cell lung cancer. *Monaldi. Arch. Chest Dis.* 2001; 56: 110–114.
9. Weinberg F., Chandel N.S. Reactive oxygen species-dependent signaling regulates cancer. *Cell. Mol. Life Sci.* 2009; 66: 3663–3673.
10. Swidzińska E., Naumnik W., Chyczewska E. Angiogeneza i neoangiogeneza — znacznie w raku płuca i innych nowotworach. *Pneumonol. Alergol. Pol.* 2006; 74: 414–420.
11. Carpini J.D., Karam A.K., Montgomery L. Vascular endothelial growth factor and its relationship to the prognosis and treatment of breast, ovarian, and cervical cancer. *Angiogenesis* 2010; 13: 43–58.
12. Vidal O., Metges J.P., Elizalde I. i wsp. High preoperative serum vascular endothelial growth factor levels predict poor clinical outcome after curative resection of gastric cancer. *Br. J. Surg.* 2009; 96: 1443–1451.
13. Bendardaf R., Buhmeida A., Hilska M. i wsp. VEGF-1 expression in colorectal cancer is associated with disease localization, stage, and long-term disease-specific survival. *Anticancer Res.* 2008; 28: 3865–3870.
14. Kaya A., Ciledag A., Gulbay B.E. i wsp. The prognostic significance of vascular endothelial growth factor levels in sera of non-small cell lung cancer patients. *Respir. Med.* 2004; 98: 632–636.
15. Reck M., von Pawel J., Zatlouk P. i wsp. Phase III trial of cisplatin plus gemcitabine with either placebo or bevacizumab as first-line therapy for nonsquamous non-small-cell lung cancer: AVAIL. *J. Clin. Oncol.* 2009; 27: 1227–1234.
16. Munker M., Munker R., Saxton R.S., Hoeffler H.P. Effect of recombinant monokines, lymphokines, and other agents on clonal proliferation of human lung cancer cell lines. *Cancer Res.* 1987; 47: 4081–4085.
17. Babbar N., Casero R.A. Tumor necrosis factor- α increases reactive oxygen species by inducing spermine oxidase in human lung epithelial cells: a potential mechanism for inflammation-induced carcinogenesis. *Cancer Res.* 2006; 66: 11125–11130.
18. Dziedzic B., Mazanowska-Gajdowicz J., Walczewska A., Sarniak A., Nowak D. Comparison of cadmium and enzyme-catalyzed nitrate reduction for determination of NO₂/NO₃ in breath condensate. *Clin. Chim. Acta* 2003; 335: 65–74.
19. Łuczyńska M., Szkudlarek U., Dzikowska-Bartkowiak B. i wsp. Elevated exhalation of hydrogen peroxide in patients with systemic sclerosis. *Eur. J. Clin. Invest.* 2003; 33: 274–279.
20. Ruch W., Cooper P.H., Baggiolini M. Assay of H₂O₂ production by macrophages and neutrophils with homovanilic acid and horse-radish peroxidase. *J. Immunol. Methods* 1983; 63: 347–357.
21. Kietzmann D., Kahl R., Müller M., Burchardi H., Kettler D. Hydrogen peroxide in expired breath condensate of patients with acute respiratory failure and with ARDS. *Intensive Care Med.* 1993; 19: 78–81.
22. Faux S.P., Tai T., Thorne D., Xu Y., Breheny D., Gaca M. The role of oxidative stress in the biological responses of lung epithelial cells to cigarette smoke. *Biomarkers* 2009; 14: 90–96.

23. Yao H., Rahman I. Current concepts on the role of inflammation in COPD and lung cancer. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2009; 9: 375–383.
24. Nowak D., Kałucka S., Białasiewicz P., Król M. Exhalation of H₂O₂ and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) by healthy subjects. *Free Radic. Biol. Med.* 2001; 30: 178–186.
25. Rijneveld A.W., Florquin S., Branger J., Speelman P., Van Deventer S.J.H., van der Poll T. TNF- α compensates for the impaired host defense of Il-1 Type I receptor-deficient mice during pneumococcal pneumonia. *J. Immunol.* 2001; 167: 5240–5246.
26. Matanić D., Beg-Zec Z., Stojanović D., Matakorić N., Flego V., Milevoj-Ribić F. Cytokines in patients with lung cancer. *Scand. J. Immunol.* 2003; 57: 173–178.
27. Siziopikou K.P., Harris J.E., Casey L., Nawas Y., Braun D.P. Impaired tumoricidal function of alveolar macrophages from patients with non-small cell lung cancer. *Cancer* 1991; 68: 1035–1044.
28. Carpagnano G.E., Spanevello A., Curci C. i wsp. IL-2, TNF-alpha, and leptin: local versus systemic concentrations in NSCLC patients. *Oncol. Res.* 2007; 16: 375–381.
29. Gessner C., Rechner B., Hammerschmidt S. i wsp. Angiogenic markers in breath condensate identify non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2010; 68: 177–184.
30. Choi S.H., Park E.Y., Jung H.L. i wsp. Serum vascular endothelial growth factor in pediatric patients with community-acquired pneumonia and pleural effusion. *J. Korean Med. Sci.* 2006; 21: 608–613.
31. Brugarolas A., Takita H. Immunologic status in lung cancer. *Chest* 1973; 64: 427–430.
32. Nagata N., Nikaido Y., Kido M., Ishibashi T., Sueishi K. Terminal pulmonary infections in patients with lung cancer. *Chest* 1993; 103: 1739–1742.
33. Zięba M., Baranowska A., Krawczyk M., Noweta K., Grzelewska-Rzymowska I., Kwiatkowska S. Pneumonia as a cause of death in patients with lung cancer. *Radiol. Oncol.* 2003; 37: 167–174.