

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΠΝΕΥΜΟΝΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΚΡΗΤΗΣ
Καθ. Ν.Μ.Σιαφάκας**

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΠΟΥ ΕΜΠΛΕΚΟΝΤΑΙ
ΣΤΟ ΗΠΙΟ ΕΠΙΜΟΝΟ ΑΣΘΜΑ ΕΝΗΛΙΚΩΝ ΚΑΙ
ΠΑΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΩΝ ΔΥΟ ΗΛΙΚΙΑΚΩΝ
ΟΜΑΔΩΝ**

**ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΗ ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ
Ιατρός- Ειδ. Παιδιατρικής**

**Νοέμβριος 2005
Ηράκλειο Κρήτης**

ΑΦΙΕΡΩΝΕΤΑΙ

ΣΤΟΥΣ ΓΟΝΕΙΣ ΜΟΥ

ΞΑΚΟΥΣΤΗ ΚΑΙ ΓΙΩΡΓΟ

&

ΤΗΝ ΑΔΕΛΦΗ ΜΟΥ

ΜΑΡΙΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περιεχόμενα.....	3
Βιογραφικό	6
Ευχαριστίες.....	14
Περίληψη.....	16
Summary.....	20

Γενικό μέρος

Κεφάλαιο 1

Βρογχικό άσθμα

1.1 Εισαγωγή ορισμός.....	24
1.2 Επιδημιολογία.....	27
1.3 Παθοφυσιολογία.....	30
1.4 Φλεγμονή και Βρογχική υπεραντιδραστικότητα.....	35
1.5 Οξεία φλεγμονή.....	36
1.6 Χρόνια φλεγμονή.....	41
1.7 Μεσολαβητές φλεγμονής.....	57
1.8 Αποτελέσματα φλεγμονής –επαναδιάταξη αεραγωγών (Remodeling).....	64

Κεφάλαιο 2

Πρόκληση πτυέλου

2.1 Πρόκληση πτυέλου.....	71
2.2 Μεθοδολογία.....	72
Βιβλιογραφία.....	74

Ειδικό Μέρος

Κεφάλαιο 1

Σκοπός

Σκοπός	120
--------------	-----

Κεφάλαιο 2

Ασθενείς και Μέθοδοι

2.1 Ασθενείς	123
2.2 Σχεδιασμός μελέτης.....	125
2.3 Σπυρομέτρηση-πρόκληση πτυέλου.....	126
2.4 Επεξεργασία πτυέλου.....	128
2.5 Κυτταρομετρία ροής.....	129
2.6 Μετρήσεις διαλυτών παραγόντων στο υπερκείμενο.....	130
2.7 Στατιστική ανάλυση.....	132

Κεφάλαιο 3

Αποτελέσματα

3.1 Κλινικά και δημογραφικά χαρακτηριστικά των ασθενών της μελέτης	134
3.2 Κύτταρα στο προκλητό πτύελο.....	136
3.3 Κυτταρομετρία ροής.....	137
3.4 Διαλυτές κυτταροκίνες στο υπερκείμενο	137
3.5 Συσχετίσεις	138
3.6 Figure 1.....	139
3.7 Figure 2.....	140
3.8 Figure 3.....	141

Κεφάλαιο 4

Συζήτηση- Συμπεράσματα

Συζήτηση-συμπεράσματα.....	143
Βιβλιογραφία.....	152

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Τόπος και Ημερομηνία Γέννησης : Ηράκλειο, 25 Νοεμβρίου 1972

1990: Εισαγωγή 2^η στο Τμήμα Βιολογίας Πανεπιστημίου Κρήτης

1990-92: Φοίτηση στο Τμήμα Βιολογίας Πανεπιστημίου Κρήτης

1992: Εισαγωγή 1^η στο Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Κρήτης

1992-98: Φοίτηση στο Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Κρήτης (8.58/10)

1998: Άδεια άσκησης ιατρικού επαγγέλματος

1998-99: Υπηρεσία Υπαίθρου- Επιστημονικός συνεργάτης στην

Παιδιατρική κλινική Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου

1999-8/2002: Έμμισθη Επιστημονική Συνεργάτης στην Πνευμονολογική

Κλινική Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου

8/2002 έως σήμερα: Ειδικευόμενη Παιδιατρικής Πανεπιστημιακού Γενικού

Νοσοκομείου Ηρακλείου

Κλινική Άσκηση σε Πανεπιστήμια του Εξωτερικού

- Presbyterian Medical Center, Columbia University, 3 μήνες Κλινικής άσκησης Παιδιατρικής: Νέα Υόρκη, Οκτώβριος 1997-Δεκέμβριος 1997

- Department of Pediatrics, University of North Carolina, Chapel Hill, 3 μήνες εκπαιδευτικής άδειας, ως ειδικευόμενη Παιδιατρικής: Βόρεια Καρολίνα, Μάιος 2004- Ιούλιος 2004

Ειδικές Εκπαιδευτικές Δραστηριότητες

Εκπαίδευση κυρίως ερευνητική στο Τμήμα Αλλεργίας και Ανοσολογίας του Πανεπιστημίου της Β.Καρολίνας, υπό την επίβλεψη του Dr.David Peden, όσον αφορά τη μεθοδολογία της πρόκλησης πτυέλου και της επεξεργασίας του, σε κλινικά και ερευνητικά πρωτόκολλα, από την 1^η Μαΐου 2004, έως και τις 30 Ιουλίου 2004.

Συμμετοχή σε ερευνητικές ομάδες

Ενεργή συμμετοχή στη διεξαγωγή Πολυεθνικής, Πολυκεντρικής Ευρωπαϊκής Κλινικής Δοκιμής –Μελέτης (**BIOAIR; www.bioair.org**) με τίτλο “Προοπτική εκτίμηση της κλινικής πορείας και των βιολογικών δειχτών στη βαριά Χρόνια Νόσο των αεραγωγών” (από 09/2001-09/2004).

Διακρίσεις- Βραβεία

- Εισαγωγή στο τμήμα Βιολογίας Πανεπιστημίου Κρήτης με τη 2^η σε σειρά καλύτερη βαθμολογία
- Εισαγωγή στην Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Κρήτης με την πρώτη σε σειρά καλύτερη βαθμολογία
- Υποτροφία από το ΙΚΥ για το σχολικό έτος 1993-4, 1^η στο ακαδημαϊκό έτος
- Υποτροφία από το ΙΚΥ για το σχολικό έτος 1994-5, 1^η στο ακαδημαϊκό έτος
- Υποτροφία από το ΙΚΥ για το σχολικό έτος 1996-7, 1^η στο ακαδημαϊκό έτος
- Αποφοίτηση 2^η κατά σειρά από την Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Κρήτης, 1998
- Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος: Γ Βραβείο καλύτερης εργασίας, με θέμα, ‘έκφραση περφορίνης και κυτταροτοξική δραστηριότητα των CD8+ λεμφοκυττάρων στο προκληθέν πτύελο καπνιστών με ΧΑΠ’, Γ.Χρυσοφάκης και συνεργάτες

**Ερευνητική Εμπειρία Ως Προπτυχιακή Φοιτήτρια, υπό τη επίβλεψη του
Καθ. Πνευμονολογίας, Ν.Μ.Σιαφάκα**

Συμμετοχή σε επιδημιολογικές μελέτες που αφορούσαν:

- 1) Τις καπνιστικές συνήθειες των Φοιτητών Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης
- 2) Γνώση και Αντίληψη του Πληθυσμού της Κρήτης γύρω από τη Φυματίωση
- 3) Καρκίνος του Πνεύμονα σε νέους ασθενείς

Οι παραπάνω μελέτες παρουσιάστηκαν ως posters ή προφορικές ανακοινώσεις σε Πανελλήνια Συνέδρια Πνευμονολογίας και στα Ευρωπαϊκά Συνέδρια Νοσημάτων Θώρακος την χρονική περίοδο 1994-1998.

Δημοσιευμένες περιλήψεις σε ξενόγλωσσα περιοδικά (abstracts)

1.The role of T-lymphocytes in asthma of different severity, E Papadopouli, M Tsoumakidou, N Tzanakis, G Chrysofakis, M Niniraki, N Siafakas. European Respiratory Journals, 12th ERS Annual Congress, Stockholm, Sweden, September 14-18,2002, p.423s

2. The role of T-lymphocytes in asthma of different severity, American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, vol 165, number 8, April 2002, p.A558
3. The role of neutrophilic inflammation in asthma of different severity, E Papadopouli, N Tzanakis, D Kyriakou, M Tsoumakidou, N Siafakas, European Respiratory Journals, 12th ERS Annual Congress, Stockholm, Sweden, September 14-18,2002, p.310s
4. Comparison of Sputum Eosinophilic and Neutrophilic Markers between Asthmatic Children and Adults, E Papadopouli, M Tsoumakidou, N Tzanakis, E Michailidou, E Mantzourani, N Siafakas, American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, Volume 167, Number 7, April 2003,p.A632
- 5.T- lymphocytes Subtypes in Induced Sputum Detected by FACS Analysis in Asthmatic Children and Adults, E Papadopouli, M Tsoumakidou, N Tzanakis, E Mantzourani, N Siafakas, American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, Volume 167, Number 7, April 2003, p.A632
6. Increased cytotoxicity and expression of perforin in sputum CD8+ cells of smokers with COPD, G Chrysofakis, N Tzanakis, D Kyriakou, E Papadopouli, D Bouros, N Siafakas, CHEST, November 4-8, Philadelphia, Pennsylvania, 2001, p.150s

7. Comparison of CD8+ subpopulations between severe asthmatics and COPD patients with the same level of airway obstruction, M Tsoumakidou, N Tzanakis, D Kyriakou, E Papadopouli, G Maltezas, N Siafakas, American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine Volume 165, Number 8, April 2002, p.A558
8. Neutrophilic inflammation in severe asthmatics and COPD patients with the same severity of airway obstruction, M Tsoumakidou, N Tzanakis, E Papadopouli, N Siafakas, European Respiratory Journal, 12th ERS Annual Congress Stockholm, Sweden, September 14-18, 2002, p.505s
9. Acceleration of neutrophilic inflammation during COPD exacerbation, M Tsoumakidou, N Tzanakis, E Papadopouli, N Siafakas, European Respiratory Journal, 12th ERS Annual Congress Stockholm, Sweden, September 14-18, 2002, p505s
10. Possible involvement of CD8+ cells and their subpopulations in COPD exacerbations, M Tsoumakidou, G Chrysofakis, N Tzanakis, E Papadopouli, D Kyriakou, N Siafakas, European Respiratory Journal, 12th ERS Annual Congress Stockholm, Sweden 14-18, 2002, p505s
11. Increased reactive nitrogen species production in COPD vs Asthmatic patients, M Tsoumakidou, E Papadopouli, N Tzanakis, E Tzortzaki, M

Zervou, N Siafakas, American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, Volume 167, Number 7, April 2003, p.A228

12. Increased sputum ECP levels in severe asthma and COPD vs mild-moderate asthma, M Tsoumakidou, E Papadopouli, V Pastourmatzi, N Tzanakis, N Siafakas, American Journal of Respiratory Critical Care Medicine, Vol 167, Numb 7, April 2003, p.A757

13. Genetic comparison between severe persistent asthma and COPD, M Zervou, E Tzortzaki, E Papadopouli, K Samara, M Plataki, M Tsoumakidou, N Siafakas, European Respiratory Journal, 13th ERS Annual Congress, Vienna, Austria, September 27- October 1, 2003, p.81s

14. Sputum neutrophilic markers in asthma of varying severity and COPD, M. Tsoumakidou, E Papadopouli, N Tzanakis, E Papadaku, M Profanti, N Siafakas European Respiratory Journal, 13th ERS Annual Congress, Vienna, Austria, September 27- October 1, 2003, p.550s

Δημοσίευση σε ξενόγλωσσο περιοδικό

Airway inflammation and cellular stress in non-eosinophil atopic asthma, M.Tsoumakidou, E.Papadopouli, N.Tzanakis, N.Siafakas, Chest, publication in progress, accepted in November 10th 2005

Συμμετοχή σε συγγραφή επιστημονικού βιβλίου

N. Tzanakis, E. Papadopouli, Acute exacerbation- other treatment, in: Acute exacerbation of COPD, N Siafakas, N Anthonisen, D Georgopoulos (Eds), Marcel Dekker, New York, in press.

Ξένες Γλώσσες

1. Αγγλικά (Lower, TOEFL)
2. Γερμανικά (Mittelstufe)
3. Γαλλικά (Certificat)

Άλλες δραστηριότητες: πτυχίο πιάνου

Ευχαριστίες

Ολοκληρώνοντας την Διδακτορική Διατριβή, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον δάσκαλό μου, Καθηγητή Νικόλαο Μ. Σιαφάκα, για την υποστήριξη και την καθοδήγησή του στην εκπόνηση αυτής της διατριβής. Υπήρξε, ακόμη από τα φοιτητικά χρόνια, ο καθηγητής που μου εμφύσησε την αγάπη για την έρευνα και την Πνευμονολογία, και με τη διδασκαλία του μου έδωσε τα ερεθίσματα να γνωρίσω και να αγαπήσω το αναπνευστικό σύστημα. Εύχομαι η διατριβή αυτή να αποτελέσει την αρχή της ερευνητικής μου δραστηριότητας. Θα είμαι πάντα ευγνώμων για την υποστήριξή του και τις πολύτιμες συμβουλές του.

Οφείλω επίσης να ευχαριστήσω την συνεπιβλέπουσα αν.καθηγήτρια Ε. Μαντζουράνη για την εμπειρία της στην παιδοπνευμονολογία και τη βοήθειά της, χωρίς τις οποίες η πραγματοποίηση αυτής της μελέτης θα ήταν αδύνατη.

Ευχαριστώ τον Καθ. Δ. Μπούρο για την υποστήριξή του από τα φοιτητικά μου χρόνια και τη συνεισφορά του, τόσο στην εκπόνηση αυτής της διατριβής, όσο και στη μετάδοση της γνώσης και της αγάπης στην Πνευμονολογία.

Θέλω να ευχαριστήσω θερμά τον επ.καθηγητή Ν.Τζανάκη για την ανεκτίμητη βοήθειά του σε κάθε βήμα της προσπάθειάς μου και τον πολύτιμο χρόνο που μου αφιέρωσε. Ευχαριστώ πολύ την Ε.Μιχαηλίδου, Α' Επιμελήτρια Παιδιατρικής για τη βοήθειά της, κατά τη διάρκεια επιλόγης των ασθενών στην μελέτη και την Ε.Τζωρτζάκη, Λέκτορα Πνευμονολογίας, για τις χρήσιμες επισημάνσεις κατά τη συγγραφή.

Ευχαριστώ επίσης την καθηγήτρια Παιδιατρικής Μ.Καλμαντή και τον καθηγητή Δ.Γεωργόπουλο, για την εποικοδομητική κριτική τους κατά τη συγγραφή της εργασίας.

Θα ήταν παράλειψη να μην ευχαριστήσω την κ.Ε.Κουταλά, για τη τεχνική της υποστήριξη και τις συμβουλές. Επίσης ευχαριστώ τις κυρίες Ε.Ρογδάκη και Ρ.Μιχαλάκη, στη γραμματεία της Πνευμονολογικής Κλινικής, που αδιαμαρτύρητα, παρά το φόρτο εργασίας τους, έδειχναν την υποστήριξή τους.

Επίσης ευχαριστώ τις Μ.Πλατάκη, Μ.Τσουμακίδου και Κ.Σαμαρά, ειδικευόμενες Πνευμονολογίας, που πρόσφεραν βοήθεια, συμβουλές και ενθάρρυνση κατά τη διάρκεια της έρευνάς μου.

Τέλος ευχαριστώ την οικογένειά μου για την αγάπη, εμπιστοσύνη και υποστήριξη που μου έδειξαν. Ιδιαίτερα ευχαριστώ την αδελφή μου Μαρία, που με την εμπειρία της στην έρευνα, ως επ.καθηγήτρια, αποτέλεσε για μένα πρότυπο και καθοδηγητή σε κάθε βήμα της διατριβής.

Ηράκλειο, Νοέμβριος '05
Ευαγγελία Παπαδοπούλη

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το άσθμα αποτελεί μια από τις συχνότερες χρόνιες φλεγμονώδεις παθήσεις του αναπνευστικού συστήματος, με ιδιαίτερα πολύπλοκους παθογενετικούς μηχανισμούς και χαρακτηριστικές δομικές αλλοιώσεις στον πνεύμονα. Αποτελεί παγκόσμιο θέμα υγείας, προσβάλλοντας σχεδόν το 8% του ενήλικου πληθυσμού και πιθανόν πάνω από το 29% των παιδιών. Περισσότερα από 50% των παιδιών με άσθμα θα πάσχουν από άσθμα και στην ενήλικη ζωή τους.

Το άσθμα στα παιδιά όσο και στους ενήλικες άσθμα, παρουσιάζει παρόμοιους παθογενετικούς μηχανισμούς, όμως επιδημιολογικά και κλινικά χαρακτηριστικά, προτείνουν ότι η φλεγμονή των αεραγωγών ανάμεσα στις δυο ηλικιακές ομάδες είναι διαφορετική πιθανόν να είναι διαφορετική. Παρόλο που πολλές μελέτες έχουν γίνει στο ήπιο επίμονο παιδικό άσθμα η εξέλιξη της νόσου σε κάθε ασθενή δεν είναι προβλέψιμη. Το άσθμα που ξεκινάει στην ενήλικη ζωή, φαίνεται να διαφέρει από το παιδικό άσθμα που υποτροπιάζει στην ενήλικη ζωή, όσο αφορά το φύλο, τη σοβαρότητα των συμπτωμάτων, την πνευμονική λειτουργία, την επίπτωση και τα χαρακτηριστικά της ατοπίας.

Η ασθματική φλεγμονώδης απάντηση στους ενήλικες φαίνεται να ρυθμίζεται από τα CD4+ type 2 λεμφοκύτταρα (Th2). Τα μαστοκύτταρα και τα ηωσινόφιλα παίζουν επίσης σημαντικό ρόλο. Στα παιδιά έχουν καθοριστεί 3 φαινότυποι: διαλείπων βρεφικός βρογχόσπασμος (transient infant wheezing), μη ατοπική βρογχοσύσπασση νηπίου (non atopic wheezing of the toddler) και ατοπικό βρογχικό άσθμα. Τελευταία ένας τέταρτος τύπος έχει προστεθεί, και αναφέρεται στο άσθμα που ξεκινάει λίγο αργότερα, στην παιδική ηλικία. Η έρευνα και ο προσδιορισμός της φλεγμονής των αεραγωγών στο παιδικό άσθμα θα αναδείξει αν οι παθογενετικοί μηχανισμοί, ξεκινούν στην παιδική ηλικία και συνεχίζονται στην ενήλικη ζωή ή αν το παιδικό άσθμα και το άσθμα με έναρξη στην ενήλικη ζωή είναι δυο διαφορετικές οντότητες.

Σκοπός της παρούσης μελέτης ήταν να περιγράψει τις διαφορές στους φλεγμονώδεις παράγοντες στις εκκρίσεις αεραγωγών παιδιών και ενηλίκων με άσθμα, με ίδια διάρκεια νόσου. Επεμβατικές μέθοδοι, όπως το βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (BAL) και οι βρογχικές βιοψίες, που χρησιμοποιούνται σε ενήλικες δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν στα παιδιά μόνο για ερευνητικό σκοπό, για λόγους ηθικής. Στη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος πρόκλησης πτύελου, μη επεμβατική μέθοδος, για τη μέτρηση των κυτταρικών υποπληθυσμών στο πτύελο, τους

υποπληθυσμούς T λεμφοκυττάρων (CD4+, CD8+) και για τον ποσοτικό προσδιορισμό των διαλυτών στο πτύελο κυτταροκινών, IL 8, ECP και GM-CSF. Επιπρόσθετα η μελέτη αυτή εκτίμησε και επιβεβαίωσε την ασφάλεια της τεχνικής πρόκλησης πτυέλου σε ασθματικούς ασθενείς.

Συμμετείχαν συνολικά 47 ασθενείς από τα Τακτικά Ιατρεία του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου του Ηρακλείου. Η διάγνωση του άσθματος είχε τεθεί με βάση το προηγούμενο ιατρικό ιστορικό επαναλαμβανόμενων επεισοδίων βρογχολίτιδας, δύσπνοιας και κρίσεων άσθματος, σύμφωνα με τα κριτήρια του Διεθνούς Ινστιτούτου Καρδιάς, Πνεύμονα και Αίματος, 2000 (NHLB criteria 2000). Η βαρύτητα της νόσου ετέθη με δεδομένα που αφορούσαν το ιατρικό ατομικό αναμνηστικό του κάθε ασθενούς, την ημερήσια καταγραφή των συμπτωμάτων του άσθματος και την εκτίμηση της πνευμονικής λειτουργίας (σπιρομέτρηση). Από τον πληθυσμό της μελέτης, οι 32 ήταν ενήλικες με άσθμα με έναρξη στην ενήλικη ζωή (ομάδα 1, μέση ηλικία 42.8 χρόνια) και οι 15 ήταν παιδιά (ομάδα 2, μέση ηλικία 11.7 χρόνια). Οι δυο ομάδες δεν διέφεραν όσον αφορά το φύλο, τη δόση εισπνεόμενων κορτικοστεροειδών, το ιστορικό ατοπίας και τη διάρκεια της νόσου (μέση διάρκεια 7.75 χρόνια). Κατά τη διάρκεια της μελέτης, κάθε ασθενής υπεβλήθη σε σπιρομέτρηση και πρόκληση πτυέλου. Χρησιμοποιήθηκε κυτταρομετρία ροής για τον προσδιορισμό των

υποπληθυσμών των T λεμφοκυττάρων, έγινε εκατοστιαία μέτρηση κυττάρων σε κάθε δείγμα και με ELISA έγινε προσδιορισμός των επιπέδων ECP, IL8 και GM-CSF.

Αποτελέσματα: 3 από τα 15 (20%) των παιδιών και 6 από τους 32 (19%) των ενηλίκων ασθενών ήταν αδύνατο να παράγουν κατάλληλο δείγμα. Όλοι οι ασθενείς ανέχτηκαν την διαδικασία πολύ καλά. Η ζωτικότητα των κυτταρών στο προκλητό πτύελο δεν διέφερε μεταξύ των δυο ομάδων. Στα παιδιά ο συνολικός αριθμός κυττάρων στο προκλητό πτύελο, ήταν μεγαλύτερος, συγκριτικά με τους ενήλικες ($p=0.02$). Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στους υποπληθυσμούς των T λεμφοκυττάρων μεταξύ των δυο ομάδων, εκτός από τα CD25 ($p=0.04$). Αρνητική συσχέτιση βρέθηκε μεταξύ της FEV1 και των επιπέδων της ECP ($r=0.338$, $p=0.04$) στο σύνολο των ασθενών της μελέτης.

Συμπερασματικά, η παρούσα μελέτη έδειξε ότι η ανοσοπαθολογία του παιδιατρικού και ενήλικου άσθματος είναι παρόμοια και η μέθοδος πρόκλησης πτυέλου προσφέρει την ευκαιρία για σύγκριση της φλεγμονής του παιδικού και ενήλικου άσθματος, με ασφάλεια.

SUMMARY

Study objectives: Although many studies have focused on the persistence of childhood asthma and its outcome in transition from childhood to adulthood, the course of the disease in an individual is still unpredictable. The aim of this study was to investigate differences in airway inflammation between young patients with childhood- onset and patients with adult- onset asthma.

Patients and methods: A total of 47 asthmatic subjects were recruited from patients attending outpatient clinic of the University Hospital of Crete. A group of 32 adults, mean age 42.8 years (yrs) and a group of 15 children, mean age 11.7 yrs were included. The two groups did not differ in respect to gender, dose of inhaled corticosteroids, atopy status or duration of asthma (mean duration 7.75 yrs). Lung function tests, and sputum induction were performed. Flowcytometry was used to study cell population and interleukin-8, eosinophilic cationic protein (ECP) and granulocyte-macrophage colony stimulating factor were measured by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA).

Results: 3 out of 15 (20%) of the children and 6 out of 32 (19%) of the adult patients were unable to produce a sufficient sputum sample. However, all

individuals tolerated the procedure well. The viability of induced sputum cells did not differ among adult-onset asthmatics and children with asthma. Children had greater number of total cells in induced sputum compared with adult subjects ($p= 0.02$). No statistical difference in T-lymphocytes subsets was found between the two groups, except for CD25 ($p= 0.04$). A negative correlation was found between forced expiratory volume (FEV_1) values and ECP levels ($r= 0.338$, $p= 0.04$) in the whole population (children and adults).

Conclusions: Our study showed that the immunopathology of pediatric and adult asthma is similar and sputum induction provides opportunities for comparison of airway inflammation in childhood and adult asthma safely.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1
ΒΡΟΓΧΙΚΟ ΑΣΘΜΑ

1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ- ΟΡΙΣΜΟΣ

Το άσθμα αποτελεί μια από τις συχνότερες χρόνιες φλεγμονώδεις νόσους του αναπνευστικού, με ιδιαίτερα πολύπλοκους παθογενετικούς μηχανισμούς.

Η συνεχής έρευνα είχε ως αποτέλεσμα τα τελευταία χρόνια να έχουν προταθεί για τη νόσο διαφορετικοί ορισμοί που αναφέρονται στον κύριο παθογενετικό μηχανισμό της. Το 1959, ο ορισμός που προτάθηκε ανέφερε ότι πρόκειται για κατάσταση σε ασθενείς με διάσπαρτη στένωση των αεραγωγών των βρόγχων της οποίας η βαρύτητα αλλάζει σε μικρά χρονικά διαστήματα είτε αυτόματα είτε υπό θεραπεία.¹ Τρία χρόνια αργότερα, στο νέο ορισμό (ATS 1962) τονίζεται ο ρόλος της αντιδραστικότητας των αεραγωγών σε διάφορα ερεθίσματα² ενώ στον ορισμό το 1975 (WHO), προστίθεται σαν κύριο παθογενετικό στοιχείο της νόσου ο υποτροπιάζων βρογχόσπασμος ως απάντηση στα ερεθίσματα.³ Στην επόμενη προσπάθεια ορισμού για τη νόσο (ATS 1987)⁴, το άσθμα αναφέρεται ως κλινικό σύνδρομο που χαρακτηρίζεται από υπεραντιδραστικότητα του βρογχικού δένδρου σε διάφορα ερεθίσματα η οποία έχει ως πρωτοπαθή κλινική εκδήλωση τη διάφορου βαθμού απόφραξη των αεραγωγών. Στον ίδιο

ορισμό γίνεται αναφορά για πρώτη φορά στο οίδημα του βρογχικού βλεννογόνου και στη διήθησή του με φλεγμονώδη κύτταρα.

Σταδιακά από τότε, παράλληλα με την ανάπτυξη της βρογχοσκόπησης, που παρέχει έκτοτε τη δυνατότητα ιστολογικής μελέτης των αεραγωγών, το ενδιαφέρον μετατοπίζεται, από την υπεραντιδραστικότητα και το βρογχόσπασμο, στις φλεγμονώδεις διεργασίες του άσθματος. Ως αποτέλεσμα των παραπάνω, ο ορισμός που έχει υιοθετηθεί πρόσφατα αναφέρει: «Το άσθμα είναι μία χρόνια φλεγμονώδης νόσος των αεραγωγών στην οποία πολλοί τύποι κυττάρων παίζουν ρόλο, κυρίως τα μαστοκύτταρα, τα ηωσινόφιλα και τα T-λεμφοκύτταρα. Σε ευπαθή άτομα, η φλεγμονή προκαλεί υποτροπιάζοντα επεισόδια συρρίτουσας αναπνοής, δύσπνοιας, συσφικτικού θωρακικού άλγους και βήχα, ιδιαιτέρως το βράδυ και/ ή νωρίς το πρωί. Αυτά τα συμπτώματα σχετίζονται συνήθως με διάσπαρτη και ποικίλη απόφραξη των αεραγωγών, η οποία είναι τουλάχιστον μερικώς αναστρέψιμη, είτε αυτόματα, είτε με θεραπεία. Η φλεγμονή επίσης προκαλεί αύξηση της αντιδραστικότητας σε μια ποικιλία ερεθισμάτων.»^{5,6}

Η έναρξη του άσθματος συχνά συμβαίνει κατά τη διάρκεια της σχολικής ηλικίας.⁷ Μια μελέτη της Mayo Clinic έδειξε σημαντική αύξηση στην επίπτωση της νόσου τις τελευταίες δυο δεκαετίες; και η αύξηση αυτή παρατηρήθηκε μόνο στα παιδιά και στους εφήβους ηλικίας 1 έως 14 ετών.⁷

Η διάγνωση του άσθματος στα παιδιά παραμένει προβληματική. Τα παιδιά που εμφανίζουν βρογχόσπασμο, δεν είναι σίγουρο ότι θα παρουσιάσουν άσθμα. Περισσότερα από τα μισά παιδιά που εμφανίζουν βρογχόσπασμο μετά από κάποια ιογενή λοίμωξη τον πρώτο χρόνο της ζωής τους, έχουν μια μεταβατική κατάσταση που θα αλλάξει στη σχολική ή προσχολική ηλικία.⁸

Οι αρχές ομοφωνίας για το Άσθμα (GINA) έχουν καθορίσει τον ορισμό και τις οδηγίες για την αντιμετώπιση του άσθματος στα παιδιά. Το άσθμα έχει διαιρεθεί σε 4 κατηγορίες, ανάλογα με τη βαρύτητα των συμπτωμάτων: διαλείπον, ήπιο επίμονο, μέτριο επίμονο και σοβαρό επίμονο. Οι μελέτες που αφορούν βρέφη με άσθμα είναι λίγες, και τα τελευταία χρόνια έχουν προσδιοριστεί για τα παιδιά διαφορετικοί φαινότυποι άσθματος, ανάλογα με την ηλικία. Παιδιά με διαλείπων βρογχόσπασμο (transient wheezers) έχουν σταματήσει τη συμπτωματολογία στην ηλικία των 3 ετών και δεν υπάρχει οικογενειακό θετικό ιστορικό ατοπίας ή άσθματος. Αντίθετα τα παιδιά με επίμονο βρογχόσπασμο (persistent wheezers) συνεχίζουν να παρουσιάζουν βρογχόσπασμο από τον πρώτο χρόνο ζωής έως και τη σχολική ηλικία και έχουν υψηλό κίνδυνο ατοπίας. Τα τελευταία, μπορεί να έχουν φυσιολογική αναπνευστική λειτουργία στη γέννηση, αλλά εμφανίζουν σημαντική μείωση της μέχρι την ηλικία των 6 ετών.⁹

Είναι φανερό λοιπόν από τους παραπάνω διαφορετικούς ορισμούς της νόσου ότι, ο εκάστοτε ορισμός που δίδεται στο άσθμα αντανακλά τις τρέχουσες γνώσεις των ειδικών για τους πολύπλοκους παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς της νόσου. Δεν είναι λοιπόν απίθανο, ο τωρινός ορισμός του άσθματος να αλλάξει ξανά στο μέλλον και να υπάρξουν προσθήκες που να αφορούν νέους μηχανισμούς και χαρακτηριστικά της νόσου με βάση την ηλικία και τους ανοσολογικούς μηχανισμούς που εμπλέκονται στη φλεγμονή του άσθματος.

1.2 Επιδημιολογία

Η δυσκολία ορισμού του άσθματος και η προσπάθεια εύρεσης σημείου ομοφωνίας στη διάγνωση και θεραπεία του, φυσικά αντανακλάται και στην επιδημιολογία της νόσου¹⁰. Τα επιδημιολογικά δεδομένα παρουσιάζουν ανομοιογένεια τόσο, στα διαφορετικά κέντρα της ίδιας χώρας, λόγω διαφορετικού ορισμού από τον θεράποντα ιατρό που θέτει τη διάγνωση, όσο και σε διαφορετικές χώρες λόγω της επίδρασης του περιβάλλοντος και του γενετικού υπόβαθρου του κάθε πληθυσμού.

Επίπτωση

Η επίπτωση (νοσούντες ανά 1000 άτομα/έτος) του άσθματος όπως πρόσφατα αναλύθηκε για τις βιομηχανικές χώρες (Ronmark et al)¹¹ είναι ανά ηλικία: 8.1-38.7 για άρρενες ηλικίας 0-4 ετών, 1.6-29 στις ηλικίες 5-15 έτη, 0.8-3.6 για 16-49 έτη και 0.7-3 για άνδρες άνω των 50 ετών. Για τις γυναίκες οι αντίστοιχοι αριθμοί ήταν: 4.3-22.8, 1-23, 0-9.4, και 0.5-11.

Επιπολασμός

Ο επιπολασμός του άσθματος, όπως έδειξαν και οι διεθνείς μελέτες ERCHS και ISAAC, παρουσιάζει εντυπωσιακή ποικιλομορφία. Έτσι, η διάγνωση του άσθματος κυμαίνεται από 2% στην Εσθονία, έως 11% στην Αυστραλία, ενώ η συρίττουσα αναπνοή τους τελευταίους 12 μήνες ανερχόταν μεταξύ 4% στην Ινδία και 32% στην Ιρλανδία (ERCHS)¹². Αντίστοιχα η μελέτη ISAAC¹³ έδειξε διακύμανση της συρίττουσας αναπνοής από 2% στην Ινδονησία σε 32% στη Μ. Βρετανία.

Σύμφωνα με στοιχεία του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (Π.Ο.Υ) που δημοσιεύθηκαν τον Ιανουάριο του 2000, φαίνεται ότι 100-150 εκατομμύρια άνθρωποι στον κόσμο πάσχουν από άσθμα και ο αριθμός αυτός συνεχώς αυξάνεται¹⁴. Αυτό παρατηρείται ιδιαίτερα στις βιομηχανικές χώρες¹⁵⁻¹⁸,

όπου για παράδειγμα στις Η.Π.Α. από τη δεκαετία του 80 έχει αυξηθεί κατά 60% ο αριθμός των ασθματικών, ενώ οι θάνατοι λόγω άσθματος έχουν διπλασιαστεί και ανέρχονται σε 5000 ετησίως. Όμοια όμως αύξηση των κρουσμάτων έχει καταγραφεί και στις αναπτυσσόμενες χώρες, όπως δείχνουν μελέτες κατά τα τελευταία 20 χρόνια σε κέντρα της Αφρικής.¹⁹ Οι λόγοι της αύξησης δεν είναι γνωστοί, αν και το ενδιαφέρον προσφάτων μελετών έχει επικεντρωθεί στην επίδραση των περιβαλλοντικών παραγόντων, της μόλυνσης, της διαίτας, του τρόπου ζωής και των λοιμώξεων ως παραγόντων που πιθανά συνεισφέρουν σε αυτή την αύξηση

.¹⁰

Θνητότητα

Αν και οι ασθματικοί ασθενείς σπάνια πεθαίνουν από τη νόσο τους, παρολαυτά η θνητότητα λόγω άσθματος υπάρχει και μάλιστα παρουσιάζεται αυξανόμενη παγκοσμίως σε διάφορες μελέτες^{16, 20}.

Σύμφωνα με στοιχεία του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (Π.Ο.Υ, Ιανουάριος 2000) οι θάνατοι λόγω άσθματος ανήλθαν σε 180.000 άτομα/έτος παγκοσμίως.⁸ Αυτή η αύξηση παρατηρήθηκε σε αρκετές χώρες σε διαφορετικά γεωγραφικά μήκη και πλάτη (Βραζιλία²¹, Ρωσία²², Νέα

Ζηλανδία ²³, Η.Π.Α ²⁴, Κούβα ²⁵), δείχνοντας έτσι μια ανησυχητική ανοδική τάση να παρατηρείται παγκοσμίως.

Επίσης, σε μελέτες στις Η.Π.Α ²⁴, Ν.Ζηλανδία ²³ και Ν.Αφρική ²⁶ παρατηρήθηκαν διαφορές, όπου οι έγχρωμοι αμερικάνοι, οι Μαορί και οι έγχρωμοι νοτιοαφρικανοί αντίστοιχα, παρουσίαζαν αυξημένη θνητότητα σε σχέση με τους άλλους κατοίκους των χωρών αυτών.

1.3 Παθοφυσιολογία του Άσθματος

Το άσθμα χαρακτηρίζεται από συγκεκριμένες φλεγμονώδεις διεργασίες οι οποίες στην πλειοψηφία τους είναι IgE εξαρτώμενες. ²⁷ Οι γενετικοί παράγοντες έχουν σημαντική επίδραση στην εξέλιξη της ατοπίας και διάφορα γονίδια με σημαντικό ρόλο έχουν ταυτοποιηθεί πρόσφατα. ²⁸ Φαίνεται μάλιστα ότι υπάρχει πιθανότατα κοινή γενετική βάση άσθματος και όλων των αλλεργικών παθήσεων. ²⁹ Παρόλα αυτά, η επίδραση των περιβαλλοντικών παραγόντων είναι ίσως αυτή που παίζει τον αποφασιστικό ρόλο στο εάν ένα ατοπικό άτομο θα παρουσιάσει άσθμα, παρότι οι γενετικοί παράγοντες είναι αυτοί που φαίνεται ότι επηρεάζουν το βαθμό βαρύτητας άσθματος και την ενίσχυση της φλεγμονώδους απάντησης.

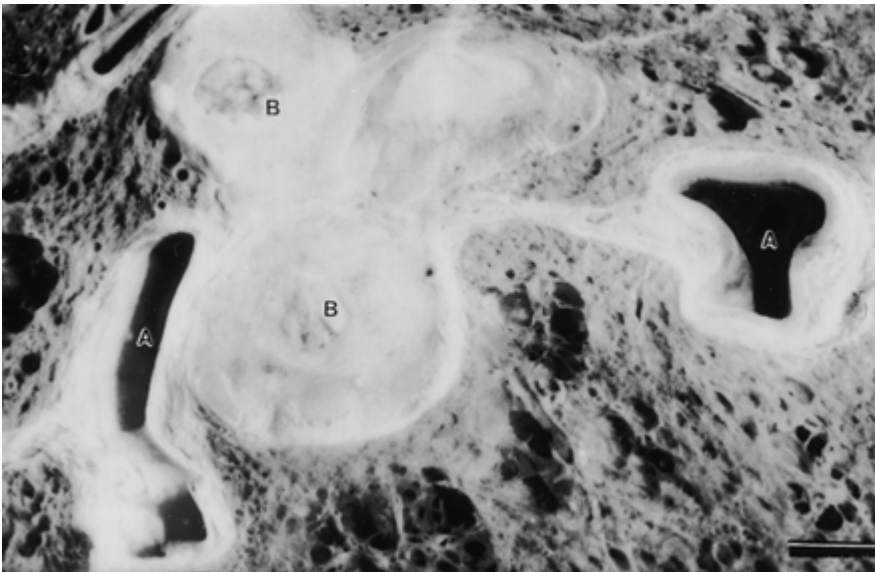
ΦΛΕΓΜΟΝΗ ΤΩΝ ΑΕΡΑΓΩΓΩΝ

Έχει αποδειχθεί αρκετά χρόνια πριν ότι οι ασθενείς που απεβίωσαν από οξεία κρίση άσματος, είχαν σοβαρού βαθμού φλεγμονή στους αεραγωγούς τους (εικόνα 1, 2). Χαρακτηριστικά, ο αυλός των αεραγωγών έχει περιορισμένη διάμετρο, λόγω της παρουσίας άφθονων βλεννωδών εκκρίσεων οι οποίες αποτελούνται από πρωτεΐνες πλάσματος που εκκρίνονται από τα αγγεία των αεραγωγών και γλυκοπρωτεΐνες που παράγονται από τα επιφανειακά επιθηλιακά κύτταρα. Το τοίχωμα του αεραγωγού είναι οίδηματώδες και διηθημένο με φλεγμονώδη κύτταρα κυρίως ηωσινόφιλα και λεμφοκύτταρα. Το βρογχικό επιθήλιο αποπίπτει κατά τόπους με ανομοιόμορφο τρόπο και συστάδες επιθηλιακών κυττάρων ανευρίσκονται στον αυλό. Παρόμοιες αλλαγές, μερικές φορές πιο ήπιες ανιχνεύθηκαν και μετά από βρογχοσκοπήσεις ασθματικών οι οποίοι πέθαναν από αίτια μη σχετιζόμενα με το αναπνευστικό.³⁰ Τα τελευταία χρόνια η δυνατότητα της μελέτης του αναπνευστικού με χρήση εύκαμπτου και άκαμπτου βρογχοσκοπίου, η δυνατότητα λήψης και μελέτης βιοψιών και βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος έδωσε καινούργιες λεπτομερέστερες πληροφορίες. Η παρατήρηση του βρογχικού δένδρου ασθματικών έδειξε ερυθρότητα και οίδημα, υποδεικνύοντας την ύπαρξη οξείας φλεγμονής. Με

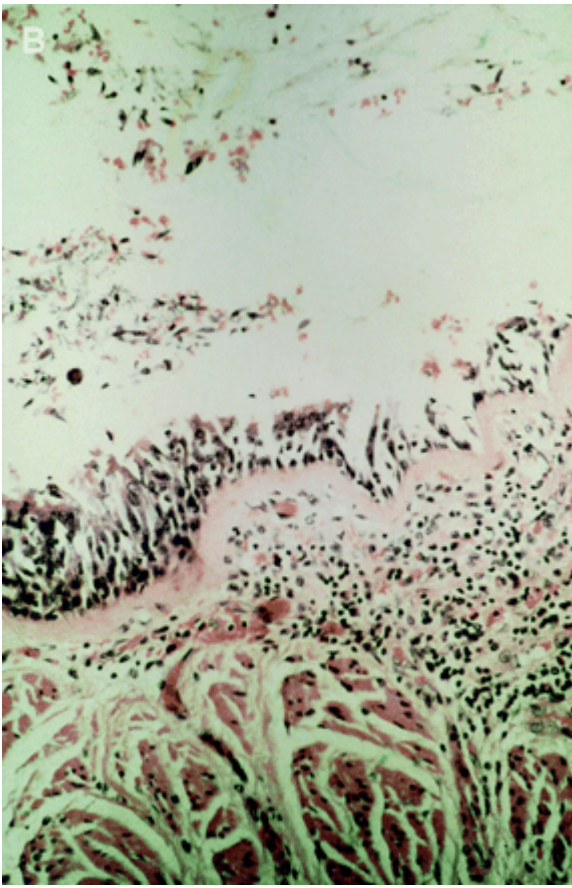
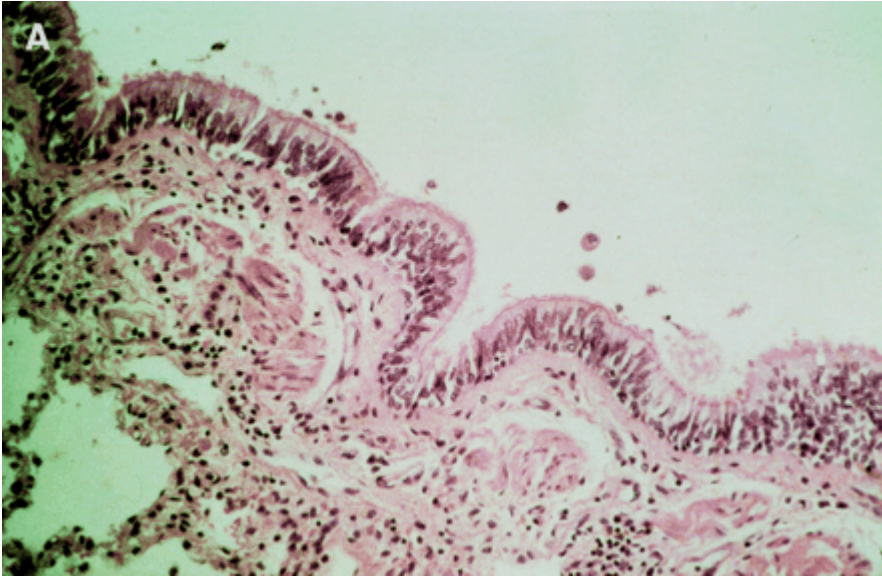
τη βοήθεια βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος παρατηρήθηκε αυξημένος αριθμός λεμφοκυττάρων, μαστοκυττάρων και ηωσινοφίλων σε σχέση με δείγματα φυσιολογικών ατόμων. Η μελέτη βιοψιών από τους αεραγωγούς αποκάλυψε αυξημένα σε αριθμό και ενεργοποιημένα μαστοκύτταρα, μακροφάγα, ηωσινόφιλα και T-λεμφοκύτταρα.^{31,32} Οι παραπάνω αλλοιώσεις ανευρίσκονται ακόμα και σε ασθενείς με ήπιο άσθμα οι οποίοι έχουν ελάχιστα συμπτώματα, γεγονός που συνηγορεί στη διαπίστωση ότι το άσθμα είναι μία φλεγμονώδης νόσος των αεραγωγών.

Ο τύπος της φλεγμονώδους αντίδρασης στο αλλεργικό άσθμα σαφώς διαφοροποιείται από την κλασική οδό που ακολουθείται μετά την έκθεση του οργανισμού σε μικροοργανισμούς ή σε τοξίνες αυτών. Η φλεγμονή στο αλλεργικό άσθμα συνήθως είναι επακόλουθο της έκθεσης σε αλλεργιογόνο, οι μηχανισμοί της είναι IgE-εξαρτώμενοι και έχουν ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη ενός τύπου φλεγμονής με χαρακτηριστική ηωσινοφιλική διήθηση, που φαίνεται να έχει κοινά στοιχεία με τη φλεγμονή που εμφανίζεται μετά τις παρασιτικές μολύνσεις του οργανισμού, διατηρεί όμως τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά της.²⁷ Κατ' αυτόν τον τρόπο, στο άσθμα έχουμε παράδοξη ενεργοποίηση της φλεγμονώδους αντίδρασης, με αποτέλεσμα η φλεγμονή να μην δρα προστατευτικά, να μην προάγει την επούλωση και την αποκατάσταση των αεραγωγών, αλλά αντιθέτως να είναι επιβλαβής για τους

αεραγωγούς. Είναι γνωστό, ότι μερικά αλλεργιογόνα όπως η οικιακή σκόνη ή η γύρη, προάγουν την ηωσινοφιλική φλεγμονή. Η απάντηση αυτού του τύπου σε περίπτωση παρασιτικής μόλυνσης θα είχε ως αποτέλεσμα τη θανάτωση του παρασίτου και τον τερματισμό της φλεγμονώδους αντίδρασης. Αντιθέτως, στα αλλεργικά νοσήματα το ερέθισμα του αλλεργιογόνου επιμένει και η οξεία φλεγμονή μετατρέπεται σε χρόνια η οποία μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα δομικές αλλαγές στους αεραγωγούς ή στο δέρμα.²⁷



Εικόνα 1. Τομή από αποφραχθέντα βρόγχο (B) με παρακείμενες αρτηρίες (A) σε ασθενή που απεβίωσε λόγω κρίσης άσθματος. Ο συνδυασμός φλεγμονώδους εξιδρώματος, βλέννης, βρογχόσπασμου και πάχυνσης του τοιχώματος του αεραγωγού είχε ως αποτέλεσμα την απόφραξη του αεραγωγού και την ασφυξία του ασθενούς.



Εικόνα 2 . Ιστολογικό παρασκεύασμα βρόγχου όπου φαίνονται οι αλλαγές και η φλεγμονή του τοιχώματος του αεραγωγού(αιματοξυλίνη-ηωσίνη, μεγέθυνση ×180). (Α) Φυσιολογικό άτομο χωρίς ιστορικό άσθματος το οποίο πέθανε σε ατύχημα, με άθικτη την επιθηλιακή στοιβάδα . Η υποκείμενη δικτυωτή βασική μεμβράνη είναι λεπτή, υπάρχουν ελάχιστα φλεγμονώδη κύτταρα και ελάχιστα ανεπτυγμένος λείος μυϊκός ιστός. (Β) Αντίθετα στο θανατηφόρο άσθμα υπάρχει απόπτωση του επιθηλίου, ιδιαίτερα πεπαχυμένη δικτυωτή βασική μεμβράνη, έντονη διήθηση του βλεννογόνου με φλεγμονώδη κύτταρα και αύξηση των λείων μυϊκών ινών των βρόγχων

1.4 Φλεγμονή και Βρογχική Υπεραντιδραστικότητα

Βρογχική υπεραντιδραστικότητα είναι η μεγάλου βαθμού στένωση των αεραγωγών, η οποία συνήθως ακολουθεί της έκθεσης σε κάποιο αλλεργιογόνο ή σε άλλο ερέθισμα και αποτελεί κύριο χαρακτηριστικό του άσθματος. Έχει αποδειχθεί ότι ο βαθμός της φλεγμονώδους αντίδρασης σχετίζεται με τη βρογχική υπεραντιδραστικότητα, όπως αυτή καθορίζεται από την πρόκληση με μεταχολίνη ή ισταμίνη. Επίσης ο βαθμός της βρογχικής υπεραντιδραστικότητας φαίνεται ότι σχετίζεται με τα συμπτώματα του άσθματος και την ανάγκη θεραπευτικής αγωγής.²⁷

Μελέτες σε ενήλικες και σε μεγάλα παιδιά δείχνουν ότι η σοβαρότητα του

άσθματος, με βάση τα κλινικά κριτήρια, σχετίζεται πολύ λίγο με το βαθμό υπεραντιδραστικότητας των αεραγωγών.³³

Η φλεγμονή των αεραγωγών μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση της βρογχικής υπεραντιδραστικότητας, η οποία έχει ως αποτέλεσμα εκλυτικοί παράγοντες που κανονικά δεν θα προκαλούσαν βρογχόσπασμο τώρα να τον προκαλούν.

Επιπρόσθετα η φλεγμονή προκαλεί με άμεσο τρόπο αύξηση των συμπτωμάτων του άσθματος, όπως ο βήχας και η δύσπνοια, μέσω της δράσης της στις αισθητικές νευρικές απολήξεις των αεραγωγών²⁷.

1.5 Οξεία Φλεγμονή

Η έκθεση του ασθματικού ατόμου σε διάφορα ερεθίσματα όπως τα αλλεργιογόνα, οι ιοί³⁴, οι ενδοοικιακοί ή περιβαλλοντικοί ρύποι³⁵, μπορεί να οδηγήσει σε οξεία φλεγμονώδη αντίδραση. Για την κατανόηση της αντίδρασης αυτής, μπορεί ως μοντέλο να χρησιμοποιηθεί η απάντηση σε εισπνεόμενα αλλεργιογόνα.

Πρώιμη φάση της ασθματικής αντίδρασης

Η εισπνοή αλλεργιογόνου σε ατοπικό ασθενή έχει ως αποτέλεσμα την έναρξη της πρώιμης φλεγμονώδους αλλεργικής αντίδρασης η οποία μερικές

φορές μπορεί να ακολουθείται από την όψιμη φάση της ίδιας αντίδρασης. Η πρώιμη φάση ξεκινάει με την ενεργοποίηση κυττάρων που φέρουν ειδική για το αλλεργιογόνο ανοσοσφαιρίνη E (IgE). Χαρακτηρίζεται από την ενεργοποίηση των μαστοκυττάρων των αεραγωγών ^{36, 37} και των μακροφάγων.^{38, 39} Επίσης και άλλα κύτταρα που φέρουν τον υψηλής συγγένειας υποδοχέα της IgE (FcεRI) ⁴⁰ συμμετέχουν, αλλά δεν είναι ακόμη γνωστό εάν ενεργοποιούνται απευθείας από τα αλλεργιογόνα. Τα ενεργοποιημένα κύτταρα παράγουν προφλεγμονώδεις μεσολαβητές όπως η ισταμίνη ⁴¹, τα εικοσανοειδή καθώς και ρίζες οξυγόνου, οι οποίοι προάγουν τη σύσπαση των λείων μυϊκών ινών των αεραγωγών, την έκκριση βλέννης και την τοπική αγγειοδιαστολή. Η βρογχική μικροκυκλοφορία έχει βασικό ρόλο στην αντίδραση αυτή. ⁴³ Οι μεσολαβητές της φλεγμονής προάγουν την αγγειακή διαφυγή λόγω αυξημένης διαπερατότητας και την εξίδρωση πλάσματος στο τοίχωμα των αεραγωγών. Η οξεία εξίδρωση πλάσματος ^{44, 45} οδηγεί στη διόγκωση και υπεραιμία του βρογχικού τοιχώματος με αποτέλεσμα τη στένωση του αυλού του βρόγχου. Επιπρόσθετα, το πλάσμα μπορεί να περάσει διαμέσου του επιθηλίου και να φτάσει μέχρι τον αυλό του αεραγωγού. Η παρουσία του εκεί συνήθως έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της ικανότητας κάθαρσης της βρογχικής βλέννης του αεραγωγού. ⁴⁶ Επίσης οι πρωτεΐνες του πλάσματος πιθανότατα ευνοούν τη δημιουργία

παχύρρευστων βυσμάτων που αποτελούνται από βλέννη φλεγμονώδη και επιθηλιακά κύτταρα. Όλες οι παραπάνω διεργασίες τελικά συμβάλλουν στην απόφραξη του αεραγωγού.

Όψιμη φάση της ασθματικής αντίδρασης

Η φάση αυτή συνήθως εμφανίζεται έξι έως εννέα ώρες μετά την πρόκληση με αλλεργιογόνο. Κύρια γεγονότα της φάσης αυτής είναι η μετανάστευση και ενεργοποίηση των ηωσινοφίλων ⁴⁷, των CD4 T-λεμφοκυττάρων ⁴⁸, των βασεοφίλων ⁴⁹, των ουδετεροφίλων ^{50, 51} και των μακροφάγων ⁵². Η ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων μετά την έκθεση στο αλλεργιογόνο, οδηγεί στην απελευθέρωση των τύπου 2 βοηθητικών λεμφοκυτταρικών (Th2) κυτταροκινών, η οποία ίσως αποτελεί το κλειδί της όψιμης φάσης της αλλεργικής αντίδρασης ⁵³. Παρόλα αυτά μάλλον είναι αδύνατον να είναι αρκετός ο χρόνος που μεσολαβεί μεταξύ της έκθεσης στο αλλεργιογόνο και της πρώτης φάση της όψιμης αντίδρασης (δηλαδή 2–4 ώρες μετά την έκθεση) για το αλλεργιογόνο να προκαλέσει μεταγραφή, μετάφραση και πρωτεϊνοσύνθεση στα ευαισθητοποιημένα T-λεμφοκύτταρα. Η έκκριση των προσχηματισμένων κυτταροκινών από τα μαστοκύτταρα πιθανά είναι το εναρκτήριο ερέθισμα για την πρώιμη μετανάστευση φλεγμονωδών

κυττάρων ⁵⁴. Οι κυτταροκίνες αυτές μάλιστα, ευοδώνουν τη μετανάστευση και περαιτέρω συμμετοχή των T-λεμφοκυττάρων στη διαδικασία της αντίδρασης. Εικοσιτέσσερις ώρες μετά την πρόκληση παρατηρείται αύξηση της έκφρασης του αγγελιοφόρου RNA (messenger RNA) των ενεργοποιημένων ιντερλευκίνη 2 θετικών T-λεμφοκυττάρων και των ιντερλευκίνη 5 θετικών ενεργοποιημένων T-λεμφοκυττάρων σε βιοψίες ασθματικών γεγονός που υποδηλώνει τη συμμετοχή των T-λεμφοκυττάρων στη χρόνια φάση της αντίδρασης.

Η αύξηση της μη ειδικής βρογχικής υπεραντιδραστικότητας μπορεί να εκδηλωθεί μόνο μετά την όψιμη αλλεργική αντίδραση που ακολουθεί την έκθεση και όχι αμέσως μετά την οξεία φάση της αντίδρασης ^{56, 57}. Η όψιμη φάση της ασθματικής αντίδρασης θεωρείται ως το μοντέλο για τη μελέτη των μηχανισμών της χρόνιας φλεγμονής στο άσθμα ^{58, 59}. Τα φλεγμονώδη κύτταρα ωριμάζουν και απελευθερώνονται από το μυελό των οστών και διοχετεύονται στην κυκλοφορία πριν γίνει η μετανάστευσή τους στους αεραγωγούς. Παρόλα αυτά στους αεραγωγούς ήδη υπάρχει κάποιος αριθμός αιμοποιητικών κυττάρων ⁶⁰. Έρευνες έχουν δείξει ότι στο μυελό των οστών των ασθματικών ανευρίσκεται μεγάλος αριθμός προβαθμίδων αιμοποιητικών κυττάρων. Η μετανάστευση και ωρίμανση των προδρομικών κυττάρων και όχι η ωρίμανση των ευρισκομένων στην περιοχή κυτταρικών

αιμοποιητικών προβαθμίδων είναι το κύριο γεγονός της αντίδρασης ⁶⁴. Η προσέλκυση κυττάρων από το περιφερικό αίμα, όπως τα ηωσινόφιλα, τα λεμφοκύτταρα και τα μονοκύτταρα, είναι αποτέλεσμα αλληλοεπίδρασης μεταξύ κυκλοφορούντων φλεγμονωδών και ενδοθηλιακών κυττάρων μέσω προφλεγμονωδών μεσολαβητών, κυτταροκινών, χυμοκινών και παραγόντων προσκόλλησης κυτταρικής επιφανείας. Κατ' αυτόν τον τρόπο η ενεργοποίηση συγκεκριμένων προσκολλητικών μορίων (ICAM – 1, Intercellular Adhesion Molecule -1) ή αγγειακών προσκολλητικών μορίων (VCAM – 1, Vascular Adhesion Molecule -1) στα ενδοθηλιακά κύτταρα αποτελεί θεμελιώδες βήμα για την εισαγωγή στη φλεγμονώδη αντίδραση. ^{64, 65, 66} Η μετανάστευση των κυττάρων στο τοίχωμα των αεραγωγών εξαρτάται από την ενεργοποίησή τους ⁶⁷ και επίσης από κυτταροκίνες όπως η ιντερλευκίνη 5 ⁶⁸ και ο GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor) ⁶⁹, οι οποίες συντελούν στη συσσώρευση και την ωρίμανση των ηωσινοφίλων καθώς και στην έκφραση των μορίων προσκόλλησης ^{70,71}. Χυμοκίνες όπως οι RANTES (Regulated upon Activation, Normal T-cells Expressed and Secreted)^{72, 73} και η εοταξίνη επίσης δρουν στα ηωσινόφιλα και T-λεμφοκύτταρα αυξάνοντας ιδιαίτερα τη μετανάστευση και πιθανά την ενεργοποίησή τους. Οι RANTES ⁷⁷, η ιντερλευκίνη 16 (που αποτελεί παράγοντα προσέλκυσης των

λεμφοκυττάρων) και η φλεγμονώδης πρωτεΐνη των μακροφάγων (MIP-1 α) ανευρίσκονται στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (BALF) ασθματικών μετά από πρόκληση με αλλεργιογόνο. Αυτή η απάντηση της οξείας φάσης που χαρακτηρίζεται από στένωση των βρόγχων, κλινικά μεταφράζεται στα συμπτώματα της συρίττουσας αναπνοής και δύσπνοιας τα οποία συνήθως δεν επιμένουν περισσότερο από δύο ημέρες.

1.6 Χρόνια Φλεγμονή

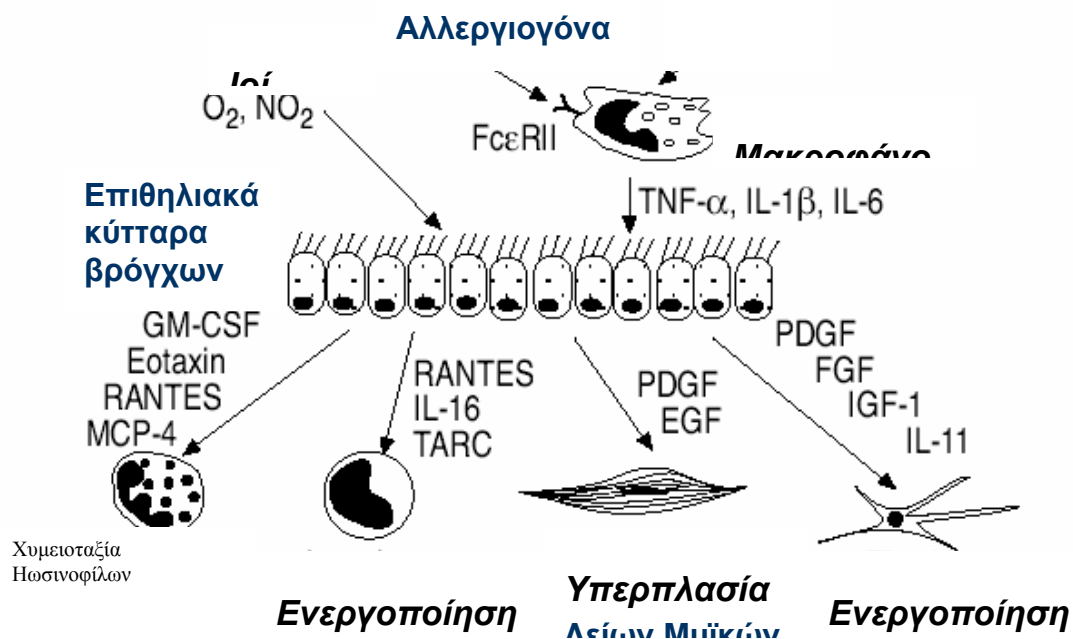
Παρότι τις περισσότερες φορές η οξεία φλεγμονή είναι αυτή που συγκεντρώνει το ενδιαφέρον μας, το γεγονός που προεξάρχει στο άσθμα είναι η χρόνια φλεγμονή. Οι μηχανισμοί που οδηγούν στην επιμονή της φλεγμονής δεν είναι ακόμα πλήρως κατανοητοί. Η χρόνια φλεγμονή στο αλλεργικό άσθμα φαίνεται να είναι αρκετά πιο πολύπλοκη από την συνήθη ηωσινοφιλική φλεγμονή. Σχεδόν όλα τα κύτταρα των αεραγωγών, συμπεριλαμβανομένων των T-λεμφοκυττάρων, ηωσινοφίλων, μαστοκυττάρων, επιθηλιακών κυττάρων, ινοβλαστών καθώς και των κυττάρων των λείων μυϊκών ινών συμμετέχουν στη φλεγμονώδη αντίδραση. Παρολαυτά, ο ρόλος των ηωσινοφίλων παραμένει ρυθμιστικός, αφού είναι υπεύθυνα για την έκκριση των προφλεγμονωδών και κυτταροτοξικών

μεσολαβητών καθώς και κυτταροκινών που οδηγεί στην αυξημένη διαπερατότητα των αγγείων, στη σύσπαση των λείων μυϊκών ινών, στην απόπτωση του βρογχικού επιθηλίου καθώς και στη βρογχική υπεραντιδραστικότητα. Ο ρόλος των ηωσινοφίλων επεκτείνεται στον έλεγχο της φλεγμονώδους αντίδρασης και στην ενεργοποίηση της διαδικασίας της επαναδιάταξης (remodeling) των αεραγωγών με την έκκριση κυτταροκινών και αυξητικών παραγόντων. Ο ρόλος μερικών φλεγμονωδών κύτταρων που συμμετέχουν στην ασθματική φλεγμονώδη αντίδραση αναφέρεται παρακάτω.

Επιθηλιακά Κύτταρα

Για αρκετά χρόνια ο ρόλος των επιθηλιακών κυττάρων των βρόγχων θεωρούνταν ότι περιοριζόταν στο να αποτελούν το φραγμό που συμμετέχει στην βλεννοτριχοειδική κάθαρση και την απομάκρυνση των επιβλαβών παραγόντων. Πρόσφατα αποδείχθηκε ότι συμμετέχουν ενεργά στη φλεγμονώδη αντίδραση εκκρίνοντας εικοσανοειδή, πεπτιδάσες, πρωτεΐνες εξωκυττάριας ουσίας, κυτταροκίνες και μονοξείδιο του αζώτου (NO), καθώς και στη ρύθμιση της ανοσολογικής απάντησης με την ικανότητα

τους να εκφράζουν HLA-DR (human leukocyte-associated antigen) αντιγόνα και να παρουσιάζουν αντιγόνα.³² Τα επιθηλιακά κύτταρα φαίνεται να κατέχουν καθοριστικό ρόλο στη «μετάφραση» των εισπνεομένων περιβαλλοντικών ερεθισμάτων σε φλεγμονώδη απάντηση των αεραγωγών και αποτελούν πιθανότατα τα κύτταρα στόχους των κορτικοστεροειδών.²⁷ Τα επιθηλιακά κύτταρα μπορεί να ενεργοποιηθούν είτε με IgE-μηχανισμούς ή ιούς, είτε ατμοσφαιρικούς ρύπους ή προφλεγμονώδεις μεσολαβητές, όπως η ισταμίνη. Όταν αυτό συμβεί, εκκρίνουν αρκετούς μεσολαβητές όπως 15 υδροξυεικοσιτετρανοϊκό οξύ (15-HETE)⁹⁰, κυτταροκίνες⁹¹, εοταξίνη⁹², αυξητικούς παράγοντες^{93, 94}, πρωτεΐνες της εξωκυττάριας (ECM)^{90, 95} και μεταλλοπρωτεϊνάσες⁹⁶ οι οποίοι συντελούν στην απόφραξη των αεραγωγών, στη φλεγμονή και την επαναδιάταξη των αεραγωγών (remodeling)⁹⁷ (σχήμα 1).



Σχήμα 1. Τα επιθηλιακά κύτταρα έχουν ενεργό ρόλο στη φλεγμονώδη ασθματική αντίδραση μέσω της έκκρισης αρκετών μεσολαβητών, κυτταροκινών, χυμοκινών και αυξητικών παραγόντων.

Μαστοκύτταρα

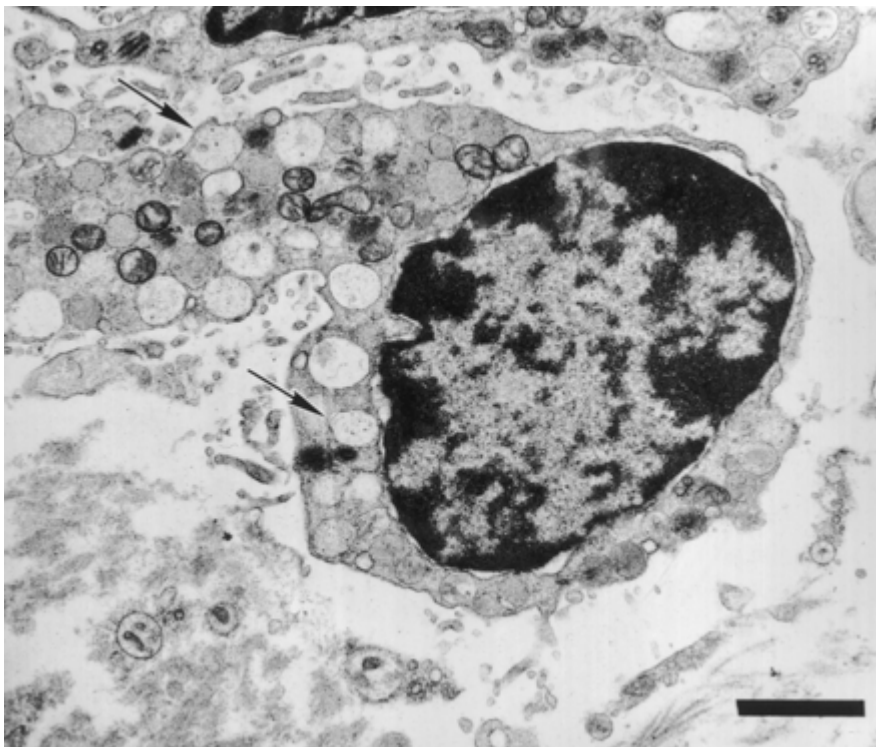
Τα μαστοκύτταρα κατέχουν σημαντικό ρόλο στη διαδικασία του οξέος βρογχόσπασμου, ως απάντηση στην έκθεση σε αλλεργιογόνα ή άλλο έμμεσο ερέθισμα όπως η άσκηση, ο υπεραερισμός ή η υγρασία. Είναι χαρακτηριστικό ότι ο αριθμός των μαστοκυττάρων είναι αυξημένος στις λείες μυϊκές ίνες των αεραγωγών των ασθματικών.⁹⁸ Η θεραπεία με πρεδνιζολόνη σε ασθματικούς ασθενείς είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση των θετικών σε τρυπτάση μαστοκυττάρων.⁹⁹ Επιπρόσθετα τα μαστοκύτταρα

φαίνεται να διαδραματίζουν και κάποιο ρόλο στη διαδικασία επαναδιάταξης (remodeling) των αεραγωγών, αφού διεγείρουν την αύξηση των ινοβλαστών του πνεύμονα.¹⁰⁰ Τα μαστοκύτταρα εκκρίνουν ορισμένες κυτταροκίνες όπως η ιντερλευκίνη 4 (IL4), η οποία πιθανά συμμετέχει στη διατήρηση της φλεγμονώδους απάντησης, καθώς και ο παράγοντας νέκρωσης του όγκου (TNF-α).¹⁰¹

Τα μαστοκύτταρα ενεργοποιούνται μέσω IgE μηχανισμών οι οποίοι αποδεδειγμένα έχουν κυρίαρχο ρόλο στη παθογένεια του άσθματος. Σε πρόσφατες κλινικές εργασίες, μετά χορήγηση αντί-IgE αντισωμάτων παρατηρήθηκε μείωση της κυκλοφορούσας IgE σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα^{102,103}, η οποία όμως δεν οδήγησε σε ανάλογη κλινική βελτίωση ασθενών με στεροειδοεξαρτώμενο άσθμα.¹⁰⁴ Ενδιαφέρον επίσης είναι το εύρημα ότι θεραπεία με IgE μονοκλωνικά αντισώματα οδήγησε σε μείωση της απαιτούμενης δόσης κορτικοστεροειδών για τον έλεγχο του άσθματος. Από τα παραπάνω φαίνεται ότι ο μηχανισμός με τον οποίο η IgE οδηγεί στη βρογχική απόφραξη είναι στεροειδοεξαρτώμενος παρότι τα στεροειδή δεν μειώνουν αλλά αντιθέτως μπορεί ακόμα και να αυξάνουν τα επίπεδα της κυκλοφορούσας IgE.^{105, 106}

Ο ρόλος των μαστοκυττάρων στη χρόνια φλεγμονή δεν έχει ακόμα αποσαφηνιστεί και φαίνεται ότι άλλα κύτταρα όπως τα μακροφάγα, τα

ηωσινόφιλα και τα Τ-λεμφοκύτταρα έχουν κυρίαρχη θέση στη παθογένεια του άσθματος. Τα νέα ευρήματα μελετών που αποδεικνύουν την ικανότητα των μαστοκυττάρων να εκκρίνουν προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, νευροτροφίνες και χυμοκίνες ίσως μας οδηγήσουν στην αναθεώρηση του ρόλου τους και κατά τη φλεγμονώδη διαδικασία του ασθματικού παροξυσμού¹⁰⁷ (εικόνα 3).



Εικόνα 3. Εικόνα από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (TEM, Transmission electron microscopy) βρογχικής βιοψίας όπου απεικονίζεται η αποκοκκίωση μαστοκυττάρου. Κλίμακα =2.0 μ m.

Μακροφάγα

Τα μακροφάγα, κύτταρα με δυνατότητα παραγωγής μεγάλου αριθμού μεσολαβητών, ανάλογα με το ερέθισμα μπορεί είτε να ενισχύσουν είτε να μειώσουν τη φλεγμονώδη αντίδραση.¹⁰⁸ Προέρχονται από τα μονοκύτταρα του αίματος και κυκλοφορούν στους αεραγωγούς των ασθματικών ασθενών, ενώ ενεργοποιούνται μέσω των χαμηλής συγγένειας υποδοχέων της IgE (FcεRII).^{109, 110} Τα ενεργοποιημένα μακροφάγα συμμετέχουν στην απόφραξη των αεραγωγών και στη φλεγμονώδη αντίδραση με την έκκριση ουσιών με βλαπτική δράση στους βρόγχους όπως ένζυμα¹¹¹, εικοσανοειδή¹¹², παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF)¹¹³, ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, κυτταροκίνες^{114, 115} και ουσίες προαγωγής της έκκρισης της βλέννης.¹¹⁶ Επίσης, δυνητικά συμμετέχουν στη ρύθμιση της διαδικασίας της επαναδιάταξης (remodeling) των αεραγωγών, μέσω της έκκρισης αυξητικών παραγόντων όπως ο PDGF (Platelet Derived Growth Factor), βFGF (basic Fibroblast Growth Factor), και TGF (Transforming Growth Factor), που ενέχονται στην ίνωση των αεραγωγών.¹¹⁷ Τα κυψελιδικά μακροφάγα που βρίσκονται στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα ασθματικών ασθενών, όπως πολλές εργασίες έχουν δείξει, παρουσιάζουν βαθμό

ενεργοποίησης,^{114, 115, 118, 119} ο οποίος είναι ανάλογος της βαρύτητας της νόσου του ασθενούς^{120, 121}. Η πρόκληση με αλλεργιογόνο αυξάνει την ενεργοποίηση των κυψελιδικών μακροφάγων,^{38, 39, 52, 122} ενώ ενεργοποίηση τους παρατηρείται και κατά την όψιμη φάση της ασθματικής αντίδρασης μετά από πρόκληση με αλλεργιογόνο.¹²³ Κυτταροκίνες όπως η ιντερλευκίνη 4 (IL4), οι οποίες συνήθως καταστέλλουν τα κυψελιδικά μακροφάγα, έχει δειχθεί ότι έχουν μειωμένη δραστηριότητα σε ασθματικούς ασθενείς.^{115, 119} Όσον αναφορά στην αντιφλεγμονώδη δράση των μακροφάγων, αξίζει να σημειωθεί ότι καταστέλλουν τη λειτουργία των T-λεμφοκυττάρων, δράση όμως που επηρεάζεται στο άσθμα.¹⁰⁸ Επίσης η έκκριση της αντιφλεγμονώδους ιντερλευκίνης 10 (IL10), φαίνεται να είναι μειωμένη στα κυψελιδικά μακροφάγα των ασθματικών.¹²⁴ Επιπρόσθετα η παραγωγή της ιντερλευκίνης 12 (IL12), η οποία σε φυσιολογικά άτομα αναστέλλει την έκκριση της ιντερλευκίνης 5 (IL5), είναι ελαττωματική σε ασθενείς με ατοπικό άσθμα.¹²⁵ Φαίνεται λοιπόν ότι τα μακροφάγα μπορεί επίσης να διαδραματίσουν αντιφλεγμονώδη ρόλο προστατεύοντας τον οργανισμό από την ανάπτυξη της φλεγμονώδους αντίδρασης.³² Τέλος τα μακροφάγα πιθανά δρουν και ως αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα των αλλεργιογόνων στα T-λεμφοκύτταρα.¹²⁶

Δενδριτικά κύτταρα

Τα δενδριτικά κύτταρα συμμετέχουν σε ένα εκτεταμένο δίκτυο κυττάρων στο βρογχικό επιθήλιο, με κύριο ρόλο τη ρύθμιση, μέσω των T-λεμφοκυττάρων, της ανοσολογικής απάντησης.¹²⁷ Τα κύτταρα αυτά, παρότι οι μέχρι τώρα πληροφορίες μας για τη δράση τους είναι ελάχιστες, φαίνεται ότι είναι σημαντικά στη παθογένεια του άσθματος, αφού δρουν ως αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα και εκφράζουν τμήμα (FcεRII) του υποδοχέα της IgE σε φυσιολογικά και ασθματικά άτομα.¹²⁸ Τα δενδριτικά κύτταρα παραλαμβάνουν αρχικά, στη διαδικασία της αλλεργικής αντίδρασης, τα αντιγόνα τα οποία τροποποιούν σε πεπτίδια, μεταναστεύουν σε γειτονικούς λεμφαδένες, όπου παρουσιάζουν τα προερχόμενα από το αλλεργιογόνο (αντιγόνο) πεπτίδια σε μη συνδεδεμένα T-λεμφοκύτταρα. Η διαδικασία αυτή με τη βοήθεια και άλλων επικουρικών ερεθισματογωγών κυττάρων όπως τα B7.1, B7.2 και CD40 έχει ως αποτέλεσμα τον προγραμματισμό της παραγωγής των ειδικών για το αλλεργιογόνο T-λεμφοκυττάρων. Ο παράγοντας GMCSF (Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor) του οποίου η έκφραση στα επιθηλιακά και μακροφάγα των ασθματικών είναι αυξημένη, οδηγεί στη διαφοροποίηση και ενεργοποίηση των δενδριτικών κυττάρων. Αυτό με τη σειρά του οδηγεί στην παραγωγή μυελοειδών δενδριτικών κυττάρων τα οποία προάγουν τη

διαφοροποίηση των T-βοηθητικών τύπου 2 λεμφοκυττάρων (Th2).¹²⁹ Μελέτες που έχουν γίνει σε πειραματόζωα έχουν δείξει ότι τα μυελοειδή δενδριτικά κύτταρα είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη των T-βοηθητικών λεμφοκυττάρων και των ηωσινοφίλων.¹³⁰ Τα ανώριμα δενδριτικά κύτταρα των αεραγωγών προάγουν την Th2 διαφοροποίηση των λεμφοκυττάρων, ενώ απαιτείται η παρουσία κυτταροκινών, όπως η ιντερλευκίνη 12 (IL12) και ο παράγοντας νέκρωσης του όγκου (TNF-α) για να προαχθεί η Th1 απάντηση.¹³¹ Με δεδομένη λοιπόν τη σημαντική συμμετοχή των κυττάρων αυτών στην αλλεργική αντίδραση, θεωρείται πιθανό στο μέλλον να δούμε ανάπτυξη ανοσοθεραπείας, βασιζόμενης στα δενδριτικά κύτταρα, με στόχο την προφύλαξη και τον έλεγχο των αλλεργικών νοσημάτων.

Ηωσινόφιλα

Η διήθηση του τοιχώματος των αεραγωγών των ασθματικών με ηωσινόφιλα είναι χαρακτηριστικό της αλλεργικής φλεγμονής. Άλλωστε ο όρος που είχε δοθεί στο άσθμα από το 1916 ήταν «χρόνια ηωσινοφιλική φλεγμονή».²⁷ Η εισπνοή αλλεργιογόνου έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση των ηωσινοφίλων στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (BALF) κατά την όψιμη

φάση της αλλεργικής αντίδρασης, ενώ υπάρχει αποδεδειγμένος συσχετισμός μεταξύ του αριθμού των ηωσινοφίλων στο BALF ή στο αίμα και της βρογχικής υπεραντιδραστικότητας. Τα ηωσινόφιλα είναι συνδεδεμένα με την ανάπτυξη της βρογχικής υπεραντιδραστικότητας μέσω της απελευθέρωσης βασικών πρωτεϊνών και ελευθέρων ριζών οξυγόνου.^{131, 132}

Ηωσινόφιλα, τα οποία πειραματικά έχουν ενεργοποιηθεί, έχει δειχθεί ότι προάγουν τη βλάβη των επιθηλιακών κυττάρων που είναι χαρακτηριστική στους ασθματικούς ασθενείς.¹³¹

Στη μετανάστευση των ηωσινοφίλων στους αεραγωγούς συμμετέχουν αρκετοί πολύπλοκοι μηχανισμοί.¹³⁴ Τα ηωσινόφιλα κυρίως προέρχονται από προγονικές μορφές κυττάρων από το μυελό των οστών. Κατά την όψιμη φάση της ασθματικής αντίδρασης παρατηρείται αύξηση των ηωσινοφίλων στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (BALF), που συνοδεύεται από μείωση του αριθμού των ηωσινοφίλων στο περιφερικό αίμα και εμφάνιση προδρομικών αιμοποιητικών κυττάρων στην κυκλοφορία.¹³⁵

Υπάρχει σημαντική συσχέτιση της ενεργοποίησης των ηωσινοφίλων, της βαρύτητας του άσθματος¹³⁶ και της βρογχικής υπεραντιδραστικότητας.¹³⁷

Επίσης η ηωσινοφιλία ασθματικών με θανατηφόρο άσθμα αποδεδειγμένα είναι πολύ μεγαλύτερη από αυτήν ασθενών με ήπια νόσο. Το εναρκτήριο ερέθισμα για τη μετανάστευση είναι η φλεγμονή του αεραγωγού. Η

διαδικασία της μετανάστευσης αρχίζει με την προσκόλληση των ηωσινοφίλων στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων της πνευμονικής κυκλοφορίας, την εγκατάσταση στην υποβλενογόνια περιοχή και την ενεργοποίησή τους εκεί. Μεγάλος αριθμός προσκολλητικών μορίων, κυτταροκινών και άλλων μεσολαβητών ρυθμίζουν τη διαδικασία με μηχανισμούς μερικώς ακόμα κατανοητούς από τους ερευνητές. Η προσκόλληση των ηωσινοφίλων προϋποθέτει την έκφραση στην επιφάνεια τους ειδικών γλυκοπρωτεϊνικών μορίων και την έκφραση στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων των αγγείων, κυττάρων όπως το ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule). Η χορήγηση αντισώματος κατά του μορίου προσκόλλησης ICAM-1 αναστέλλει σε ασθενείς τον πολλαπλασιασμό των ηωσινοφίλων στους αεραγωγούς και επίσης εμποδίζει τη συνοδό βρογχική υπεραντιδραστικότητα.¹⁴¹ Παρόλα αυτά φαίνεται ότι ο παράγοντας ICAM-1 δεν είναι τόσο εκλεκτικός όσο τα άλλα μόρια προσκόλλησης, δηλαδή το VLA (Very Late Antigen) που εκφράζεται στην επιφάνεια του ηωσινοφίλου και αλληλεπιδρά με το αγγειακό κυτταρικό μόριο προσκόλλησης VCAM-1¹⁴² (Vascular Cell Adhesion Molecule). Η ιντερλευκίνη 4 (IL-4) αυξάνει την έκφραση του VCAM-1 στα ενδοθηλιακά κύτταρα¹⁴³, ενώ η ιντερλευκίνη 5 (IL5) και ο GM-CSF (granulocyte macrophage colony stimulating factor) φαίνεται να επέχουν σημαντικό ρόλο

στην επιβίωση των ηωσινοφίλων και στη σήμανσή τους, γεγονός απαραίτητο για την εκδήλωση της αυξημένης υπεραντιδραστικότητας. Επίσης άλλοι μεσολαβητές όπως οι χυμοκίνες RANTES (regulated on activation t-cell expressed and secreted), εοταξίνες 1 – 3 και η πρωτεΐνη χημειοταξίας μακροφάγων (MCP-4, macrophage chemotactic proteins), που εκφράζονται στα επιθηλιακά κύτταρα φαίνεται να προάγουν ιδιαίτερος τη μετανάστευση των ηωσινοφίλων από την κυκλοφορία στους αεραγωγούς. Αφού τα ηωσινόφιλα μεταναστεύσουν, η παρουσία της ιντερλευκίνης 5 και αυξητικών παραγόντων, όπως ο GM-CSF, ¹⁴⁴ είναι απαραίτητη ειδικά για τα ηωσινόφιλα εισέρχονται στη διαδικασία του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (απόπτωσης). ^{146, 147} Η χορήγηση αντισωμάτων έναντι ιντερλευκίνης 5 σε ασθματικούς, παρότι έδειξε ιδιαίτερη μείωση της ηωσινοφιλικής διήθησης των βρόγχων και των κυκλοφορούντων ηωσινοφίλων, ¹⁴⁰ δεν είχε κανένα αποτέλεσμα στην μετά αλλεργιογόνο ασθματική αντίδραση, στη βρογχική υπεραντιδραστικότητα ή στα κλινικά συμπτώματα των ασθενών. ¹⁴⁹ Τα παραπάνω θέτουν ερωτηματικά για τον κυρίαρχο ρόλο των ηωσινοφίλων στη βρογχική υπεραντιδραστικότητα και το άσθμα, παρ'όλα αυτά, τα κύτταρα αυτά μέσω των αυξητικών παραγόντων που εκκρίνουν, όπως ο TGFβ (Transforming Growth Factor) φαίνεται να

έχουν σημαντική ρυθμιστική δράση στις δομικές αλλαγές που επισυμβαίνουν στο άσθμα.¹⁵⁰

Ουδετερόφιλα

Παρόλο που το ενδιαφέρον των ερευνητών για αρκετά χρόνια ήταν συγκεντρωμένο στα ηωσινόφιλα, ευρήματα προσφάτων εργασιών έχουν δείξει αυξημένο αριθμό ουδετεροφίλων στα προκλητά πτύελα (sputum induction) ασθενών με σοβαρό άσθμα.¹⁵⁰⁻¹⁵³ Το εύρημα βέβαια αυτό μπορεί να είναι αποτέλεσμα των αυξημένων δόσεων κορτικοστεροειδών που λαμβάνουν οι ασθενείς αυτοί και τα οποία αυξάνουν την επιβίωση των ουδετεροφίλων και αναστέλλουν την απόπτωση τους.^{152, 151, 155} Υπάρχει όμως και η πιθανότητα της μετανάστευσης τους μέσω της δράσης της ιντερλευκίνης 8 (IL-8), που έχει δειχθεί ότι είναι αυξημένη στα πτύελα ασθενών με βαρύ άσθμα. Επίσης τα αυξημένα ουδετερόφιλα μπορεί να σχετίζονται με τη μειωμένη ανταπόκριση των ασθενών με σοβαρό άσθμα στα κορτικοστεροειδή, ενώ εκκρεμεί η διαλεύκανση του ρόλου των κυττάρων αυτών στον ασθματικό παροξυσμό.²⁷

T-λεμφοκύτταρα

Σε αντίθεση με τα ουδετερόφιλα οι γνώσεις μας για τον ρόλο των Τ-λεμφοκυττάρων στην παθογένεια του άσθματος είναι περισσότερες. Τα Τ-λεμφοκύτταρα ενορχηστρώνουν τη φλεγμονώδη αντίδραση, μέσω της απελευθέρωσης κυτταροκινών, με αποτέλεσμα τη μετανάστευση και μακρότερη επιβίωση των ηωσινοφίλων, καθώς και τη διατήρηση ικανού αριθμού μαστοκυττάρων στους αεραγωγούς.¹⁵⁶ Τα Τ-λεμφοκύτταρα αφού ενεργοποιηθούν από αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, όπως τα δενδριτικά κύτταρα, εκφράζουν ένα φάσμα κυτταροκινών που συμπεριλαμβάνει τις ιντερλευκίνες 4, 5, 9 και 13. Πρόσφατες έρευνες έδειξαν, ότι το ανοσοποιητικό σύστημα τείνει να εκτρέπεται προς τον Th2 φαινότυπο και αυτή η προτίμηση του ανοσοποιητικού συστήματος προς τον Th2 τύπο επιμένει περισσότερο στα ατοπικά παιδιά από ότι στα φυσιολογικά.¹⁵⁷ Υπάρχουν ενδείξεις ότι λοιμώξεις ή έκθεση σε ενδοτοξίνες νωρίς στη ζωή θα μπορούσαν να εκτρέψουν το ανοσοποιητικό σύστημα προς τον Th1 φαινότυπο, ενώ η έλλειψη λοιμώξεων και το «στείρο» περιβάλλον των πρώτων χρόνων της ζωής του παιδιού ευνοεί την Th2 έκφραση και την αυξημένη επίπτωση των ατοπικών αντιδράσεων.¹⁵⁸⁻¹⁶⁰

Φαίνεται ότι η ισορροπία ανάμεσα στο Th1 και Th2 μονοπάτι εξαρτάται από κυτταροκίνες όπως την ιντερλευκίνη 12 που ευνοεί την Th1 έκφραση ή την ιντερλευκίνη 4 και 13 που ευνοούν την Th2. Επίσης υπάρχουν ενδείξεις

ότι η θεραπεία με στεροειδή μπορεί να έχει διαφοροποιό δράση στην ισορροπία μεταξύ της έκκρισης της ιντερλευκίνης 12 και της ιντερλευκίνης 13.¹⁶¹

Μία κατηγορία T-λεμφοκυττάρων με άγνωστο ακόμα ρόλο είναι τα ρυθμιστικά T-λεμφοκύτταρα (Tr, regulatory) τα οποία μάλλον μειώνουν την απάντηση του ανοσοποιητικού εκκρίνοντας ανασταλτικές κυτταροκίνες όπως η ιντερλευκίνη 10 και ο TGFβ (transforming growth factor) και παίζουν ρόλο στη ρύθμιση της ανοσοαπάντησης με την καταστολή της Th1 απάντησης.^{162, 163}

B-λεμφοκύτταρα

Η κύρια λειτουργία των κυττάρων αυτών στην παθογένεια του άσθματος είναι η παραγωγή της IgE.¹⁶⁴ Παράγοντες ρύθμισης αυτής της λειτουργίας είναι η ιντερλευκίνη 4 η οποία προάγει την παραγωγή IgE και η παρουσία CD40–T-λεμφοκυττάρων τα οποία αλληλεπιδρούν με τον CD40 σύνδεσμο (CD40 ligant) που φέρουν τα B-λεμφοκύτταρα.

Βασεόφιλα

Τα κύτταρα αυτά έχουν άγνωστο λειτουργικό ρόλο, παρόλα αυτά πρόσφατα με τη βοήθεια νέων μεθόδων ανοσοϊστοχημείας ανιχνεύθηκαν σε σχετικά αυξημένους αριθμούς μετά από πρόκληση με αλλεργιογόνο σε αεραγωγούς ή πτύελα ασθματικών.¹⁶⁵⁻¹⁶⁹

Αιμοπετάλια

Έχει αποδειχθεί ότι τα κυκλοφορούντα αιμοπετάλια μειώνονται μετά από πρόκληση με αλλεργιογόνο σε ασθματικούς ασθενείς ενώ αντίθετα αυξάνονται στις βρογχικές βιοψίες των ίδιων ασθενών.^{169,170} Επίσης ενεργοποιημένα αιμοπετάλια ασθματικών φαίνεται ότι εκκρίνουν RANTES¹⁷¹, ενώ μια σειρά κυτταροκινών σχετιζομένων με το Th2 μονοπάτι αποδείχθηκε ότι μπορεί να προκαλέσει τη μετανάστευση και ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων.¹⁷²

1.7 Μεσολαβητές Φλεγμονής

Ένας μεγάλος αριθμός μεσολαβητών συμμετέχει στην παθογένεια του άσθματος με πολλαπλές δράσεις, άφθονες αλληλεπιδράσεις και όχι ακόμα σαφείς ρόλους. Λόγω αυτής της πολυπλοκότητας, τα γνωστά αποτελέσματα

της σύσπασης των λείων μυϊκών ινών, της αυξημένης αγγειακής διαπερατότητας, της υπερέκκρισης βλέννης και της χυμιοταξίας φλεγμονωδών κυττάρων μάλλον που δύσκολα θα μπορούσαν να ανασταλούν από την παρέμβασή μας στην παραγωγή ή δράση ενός μόνο από αυτούς τους μεσολαβητές.

Μεσολαβητές λιπιδίων(lipid mediators)

Οι κυστεΐνυλο-λευκοτριένες (LTC₄, LTD₄, LTE₄) είναι ισχυροί βρογχοσυσπαστικοί παράγοντες, ενώ αναφέρεται ότι αυξάνουν και τη βρογχική υπεραντιδραστικότητα.¹⁷³ Πρόσφατα με την εισαγωγή των αντιλευκοτριενίων στη φαρμακευτική αγωγή των ασθματικών είχαμε τη δυνατότητα να παρατηρήσουμε την προστασία που παρέχουν τα φάρμακα αυτά (περίπου 50%) έναντι του προκαλούμενου, από άσκηση ή αλλεργιογόνο, βρογχόσπασμο. Επίσης η συγκεκριμένη ομάδα λευκοτριενών φαίνεται να έχει και ήπιες φλεγμονώδεις δράσεις αφού φαίνεται ότι προκαλεί αύξηση των ηωσινοφίλων στα πτύελα των ασθματικών.¹⁷⁴

Ο παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων PAF (platelet activating factor) προάγει την ενεργοποίηση και τη συσσώρευση των ηωσινοφίλων στους

αεραγωγούς οδηγώντας στην αύξηση της βρογχικής υπεραντιδραστικότητας.

¹⁷⁵ Εντούτοις ακόμα και ισχυροί ανταγωνιστές του PAF δεν είναι σε θέση να ελέγξουν τα συμπτώματα του άσθματος.¹⁷⁶⁻¹⁷⁸ Από την άλλη μεριά έρευνες στην Ιαπωνία έδειξαν ότι η ελλειμματική λειτουργία του ενζύμου μεταβολισμού του PAF, της ακετυλουδρολάσης, σχετίζεται με την παρουσία σοβαρού άσθματος.¹⁷⁹

Οι προσταγλανδίνες παρουσιάζουν άμεση και ισχυρή δράση στους αεραγωγούς ασθματικών όπου έχουμε αυξημένη έκφραση της επαγωγίμης μορφής της κυκλοοξυγενάσης (COX-2). Η χορήγηση όμως αναστολέων της κυκλοοξυγενάσης όπως η ιβοπροφένη και η ασπιρίνη δεν έχει αποτελέσματα στον έλεγχο του άσθματος. Επιπρόσθετα οι ασθενείς με άσθμα προκαλούμενο από ασπιρίνη παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση της LTC₄ συνθετάσης με αποτέλεσμα την υπερέκκριση κυστεϊνυλο-λευκοτριενών.¹⁸¹ Η προσταγλανδίνη D₂ (PGD₂) αποτελεί βρογχοσυσπαστικό παράγοντα που παράγεται κυρίως από τα μαστοκύτταρα. Η αφαίρεση των υποδοχέων της PGD₂ από ποντίκια είχε ως αποτέλεσμα την αναστολή της αλλεργικής αντίδρασης και της υπεραντιδραστικότητας.

¹⁸² Επίσης βρέθηκε ότι η προσταγλανδίνη D₂ ενεργοποιεί έναν υποδοχέα των Th₂ κυττάρων (T helper 2) που εκφράζεται στα ηωσινόφιλα, στα Th₂

λεμφοκύτταρα και στα βασεόφιλα, έχοντας ρόλο στη χυμιοταξία των κυττάρων. Η προσταγλανδίνη αυτή ίσως αποτελεί σύνδεσμο μεταξύ της ενεργοποίησης των μαστοκυττάρων και της φλεγμονώδους αντίδρασης¹⁸³. Πιθανά λοιπόν στο μέλλον να αποδειχθεί ότι ο ρόλος αυτής της προσταγλανδίνης στην παθογένεια του άσθματος είναι σημαντικός.

Κυτταροκίνες

Οι ουσίες αυτές φαίνεται να έχουν κυρίαρχο ρόλο στην ενορχήστρωση της φλεγμονώδους απάντησης στο άσθμα.¹⁸⁴ Διαδραματίζουν κύριο ρόλο στη διαδικασία της χρόνιας φλεγμονής σε αντίθεση με τις λευκοτριένες που δρουν κατά την οξεία φάση. Σχεδόν όλα τα κύτταρα που περιγράφηκαν είναι σε θέση να παράγουν κυτταροκίνες (μακροφάγα, μαστοκύτταρα, ηωσινόφιλα, λεμφοκύτταρα, λεία μυϊκά κύτταρα των βρόγχων, επιθηλιακά κύτταρα).¹⁸⁵ Ιδιαίτερο ρόλο έχουν οι παραγόμενες από τα T-λεμφοκύτταρα κυτταροκίνες:

Ιντερλευκίνη 3 (IL3): σημαντικός ο ρόλος της στην επιβίωση των μαστοκυττάρων στους αεραγωγούς.²⁴

Ιντερλευκίνη 4 (IL4): η παρουσία της είναι απαραίτητη για την παραγωγή IgE από τα β-λεμφοκύτταρα καθώς και για την έκφραση των μορίων

προσκόλλησης VCAM-1 στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Επίσης η ιντερλευκίνη 4 συμμετέχει στη διαφοροποίηση των T-λεμφοκυττάρων προς βοηθητικά τύπου 2 (Th2) οπότε πιθανά και έχει κυρίαρχο ρόλο στην ανάπτυξη της ατοπίας.^{186, 187}

Ιντερλευκίνη 5 (IL5): η ιντερλευκίνη αυτή προάγει την διαφοροποίηση, επιβίωση και κωδικοποίηση των ηωσινοφίλων. Εκφράζεται σε αυξημένο αριθμό στα λεμφοκύτταρα, σε βιοψίες βρόγχων ασθματικών ασθενών, ενώ η συμμετοχή της στη διαδικασία μετανάστευσης των ηωσινοφίλων στους αεραγωγούς, έχει επαληθευτεί από πρόσφατες κλινικές μελέτες. Στη διάρκεια αυτών χορηγήθηκε αντι-ιντερλευκίνη 5 αντίσωμα (mepolizumab) με αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση των ηωσινοφίλων σε περιφερικό αίμα και προκλητά πτύελα.^{153, 188}

Ιντερλευκίνη 9 (IL9): πρόκειται για άλλη μία σημαντική Th2 κυτταροκίνη απαραίτητη για την απευαισθητοποίηση των κυττάρων στη δράση της ιντερλευκίνη 4 και ιντερλευκίνης 5.^{189, 190}

Ιντερλευκίνη 13 (IL13): σημαντική η δράση και αυτής της ιντερλευκίνης στη διαδικασία παραγωγής IgE από τα B-λεμφοκύτταρα μαζί με την ιντερλευκίνη 4. Η κυτταροκίνη αυτή εκφράζεται σε αφθονία σε χρόνια ασθματική νόσο, άρα πιθανά να είναι σημαντική στη διατήρηση της φλεγμονής.^{186,187}

Άλλες κυτταροκίνες, που επίσης ενισχύουν τη φλεγμονώδη αντίδραση και παράγονται από τα μακροφάγα ή τα επιθηλιακά κύτταρα, είναι η ιντερλευκίνη 1β (η οποία μαζί με τον TNFα ενεργοποιούν παράγοντες μεταγραφής όπως ο NF-κΒ και η πρωτεΐνη ενεργοποίησης AP1) , η ιντερλευκίνη 6, ο GM-CSF και ο TNFα. Ο παράγοντας νέκρωσης όγκου (TNFα) παράγεται σε αυξημένα ποσά στους αεραγωγούς των ασθματικών. Εισπνοή δε TNFα μπορεί να προκαλέσει αυξημένη βρογχική υπεραντιδραστικότητα και σε φυσιολογικά άτομα.^{181, 182} Άλλες κυτταροκίνες επίσης μπορεί να παίζουν ρυθμιστικό ρόλο και αν έχουν αντιφλεγμονώδη δράση, όπως η ιντερφερόνη γ (INFγ) και οι ιντερλευκίνες 10, 12 και 18.

Χυμοκίνες

Πάνω από πενήντα χυμοκίνες έχουν αναγνωρισθεί μέχρι τώρα οι οποίες ενεργοποιούν περισσότερους από είκοσι υποδοχείς επιφανείας¹⁹³ με αποτέλεσμα κυρίως την μετανάστευση φλεγμονωδών κυττάρων στους αεραγωγούς.¹⁴⁴

Η εοταξίνη 2 και 3 , η χυμοκίνη RANTES (regulated on activation t-cell expressed and secreted) και η MCP4 ενεργοποιούν ένα υποδοχέα στην επιφάνεια των ηωσινοφίλων, τον CCR3/190. Υπάρχει αυξημένη έκφραση των παραπάνω χυμοκινών και του συγκεκριμένου υποδοχέα στους αεραγωγούς των ασθματικών, η οποία έχει συσχετισθεί με αυξημένη βρογχική υπεραντιδραστικότητα.^{195, 196} Διάφοροι αναστολείς του υποδοχέα CCR3 όπως οι USB35625, SB297006 και SB328437 φαίνεται να είναι αποτελεσματικοί στην αναστολή της μετανάστευσης των ηωσινοφίλων, γεγονός που έχει οδηγήσει την έρευνα για νέα φάρμακα αυτής της κατηγορίας.^{197, 198}

Επίσης η χυμοκίνη MCP1 φαίνεται ότι ενεργοποιεί τον υποδοχέα CC2 στα μονοκύτταρα και T-λεμφοκύτταρα. Αναστολή της MCP1 σε μοντέλο ποντικών με ειδικά αντισώματα έδειξε μείωση της συσσώρευσης ηωσινοφίλων και T-λεμφοκυττάρων στους αεραγωγούς.¹⁹⁵ Η ίδια χυμοκίνη συσσωρεύει και ενεργοποιεί τα μαστοκύτταρα μέσω της δράσης της στον υποδοχέα CC2/196. Γνωρίζουμε ότι η MCP1 είναι αυξημένη στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα ασθματικών, ενώ η χορήγηση ειδικού για MCP1 αντισώματος προκαλεί αναστολή της βρογχικής υπεραντιδραστικότητας ως απάντησης σε πρόκληση με αλλεργιογόνο.^{200, 201}

1.8 Αποτελέσματα φλεγμονής- επαναδιάταξη αεραγωγών (Remodeling)

Η οξεία φλεγμονή είναι γενικά μια μη ειδική αντίδραση των ιστών στον τραυματισμό και γενικά οδηγεί στην επιδιόρθωση και αποκατάσταση της ομαλής δομής και λειτουργίας των ιστών. Αντίθετα στο άσθμα η διαδικασία της φλεγμονής είναι χρόνια, ακολουθείται από διαδικασίες επούλωσης, των οποίων το τελικό αποτέλεσμα μπορεί να είναι μια τροποποιημένη δομή των αεραγωγών, που αναφέρεται ως επαναδιάταξη (remodeling) των αεραγωγών.^{27, 202} Η διαδικασία της επούλωσης συνήθως περιλαμβάνει την αναγέννηση του τραυματισμένου ιστού με παρεγχυματικά κύτταρα ίδιου τύπου, καθώς και την αντικατάσταση του με συνδετικό ιστό και μερικές φορές την ωρίμανση του σε ουλώδη ιστό. Στο άσθμα οι διαδικασίες διαφοροποίησης, μετανάστευσης και ωρίμανσης των κυττάρων, καθώς και εναπόθεσης του συνδετικού ιστού μπορεί να ακολουθείται είτε από πλήρως ή από τροποποιούμενη δομή και λειτουργία των αεραγωγών. Η τελευταία συνήθως εμφανίζεται ως ίνωση και αύξηση των λείων μυϊκών κυττάρων και της μάζας των βλεννοεκκριτικών αδένων.²⁰³

Υπερτροφία και Υπερπλασία Λείων Μυϊκών Ινών των Αεραγωγών

Τα λεία μυϊκά κύτταρα είναι κύτταρα με πολλές λειτουργίες και φαινοτυπική ποικιλομορφία.²⁰⁴ Η αύξηση της μάζας των λείων μυϊκών ινών μπορεί να οφείλεται σε αρκετούς παράγοντες, όπως ο πυροδοτούμενος από φλεγμονώδεις μεσολαβητές²⁰⁵, κυτταροκίνες²⁰⁶ και αυξητικούς παράγοντες για τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών ινών. Επίσης άλλος πιθανός μηχανισμός είναι η υπερτροφία των μυϊκών ινών λόγω αυξημένου έργου είτε λόγω επαναλαμβανόμενων επεισοδίων βρογχόσπασμου, είτε λόγω μειωμένης λειτουργίας του ανασταλτικού ελέγχου.

Επίσης η συσσώρευση πλάσματος στην περιοχή των λείων μυϊκών ινών μπορεί επίσης να αποτελεί ερέθισμα για τη μίτωση και υπερπλασία των μυϊκών κυττάρων.²⁰⁹ Έχει υποτεθεί από διάφορους ερευνητές ότι οι συγκεκριμένες ενδογενείς ανωμαλίες των λείων μυϊκών ινών μπορεί να εκφράζονται ως διαφορές της βαρύτητας του άσθματος. Επιπρόσθετα οι λείοι μύες του αναπνευστικού έχουν ρυθμιστικές ικανότητες τόσο μέσω της παραγωγής μεσολαβητών (π.χ RANTES)²¹⁰ που είναι σε θέση να ενεργοποιήσουν τα T-λεμφοκύτταρα, τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα, καθώς και μέσω της επίδρασης των στη σύνθεση της ECM που τελικά επηρεάζουν τη διαδικασία της χρόνιας αναδιάταξης των αεραγωγών.²¹¹

Αύξηση των Βλεννοεκκριτικών Αδένων

Η υπερτροφία των υποβλεννογονίων βλεννοεκκριτικών αδένων είναι πιθανότατα ο κύριος μηχανισμός πρόκλησης αυξημένης ποσότητας βλέννης σε ασθενείς με θανατηφόρο άσθμα. Επίσης χαρακτηριστικό είναι το γεγονός ότι στους ασθματικούς ασθενείς βλεννοεκκριτικοί αδένες βρίσκονται και στα περιφερειακά βρογχιόλια, ενώ σε φυσιολογικά άτομα εντοπίζονται μόνο στα χόνδρινα τμήματα των αεραγωγών.²¹²⁻²¹⁴ Επιπρόσθετα, οι εκκριτικοί πόροι των αδένων είναι διατεταμένοι στους ασθματικούς ασθενείς λόγω του διάμεσου εμφυσήματος. Το αποτέλεσμα των παραπάνω γεγονότων είναι η απόφραξη των μεγάλων και μικρών αεραγωγών με βύσματα βλέννης που εμποδίζουν τη δράση των χορηγουμένων β2-αγωνιστών, κάνοντας έτσι τους ασθενείς να χρειάζονται όλο και μεγαλύτερες δόσεις φαρμάκων.^{217, 218}

Πάχυνση της δικτυωτής βασικής μεμβράνης (lamina reticularis)

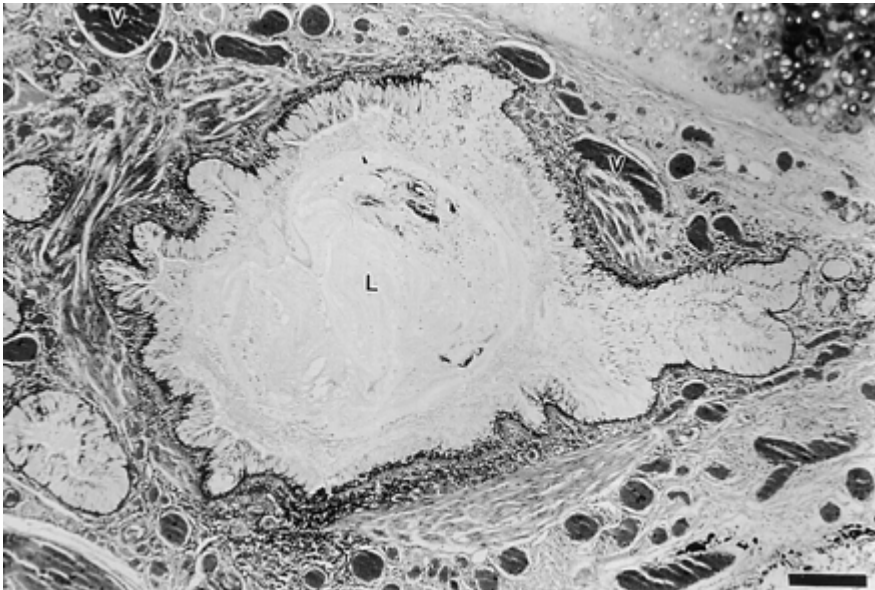
Η βασική μεμβράνη του αναπνευστικού επιθηλίου αποτελείται από τη βασική μεμβράνη (ή αληθή βασική μεμβράνη) και τη δικτυωτή βασική μεμβράνη (lamina reticularis). Η πάχυνση της δικτυωτής βασικής μεμβράνης είναι ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά του βρογχικού άσθματος

²¹² και μάλιστα νωρίς στην πορεία της νόσου και οφείλεται σε εναπόθεση δικτυωτού ιστού. Η βασική μεμβράνη παραμένει χωρίς ιδιαίτερες δομικές αλλαγές στο άσθμα ενώ η δικτυωτή βασική μεμβράνη εμφανίζει πάχυνση, η οποία σχετίζεται με εναπόθεση ανοσοσφαιρινών και/ή κολλαγόνου I και III φιμπρονεκτίνης.²²⁰ Ο πρόσθετος δικτυωτός ιστός της μεμβράνης οφείλεται στην ενεργοποίηση των μυοινοβλαστών²²¹ και οδηγεί στην ίνωση των αεραγωγών που σύμφωνα με τις περισσότερες μελέτες^{222, 223} είναι ανεξάρτητη με τη βαρύτητα της νόσου.

Αύξηση της Αγγειογένεσης και της Βρογχικής Αιματικής Ροής

Υπάρχει κάτω από το αναπνευστικό επιθήλιο ένα πλούσιο δίκτυο συστηματικών τριχοειδών. Η ανάπτυξη νέων αγγείων από τα ήδη υπάρχοντα ονομάζεται αγγειογένεση, παρατηρείται στο άσθμα και οφείλεται στη δράση διαφόρων ενδοθηλιακών αυξητικών παραγόντων όπως ο VEGF (vascular endothelial growth factor), ο PAF (platelets activating factor) και ο HGF (hepatocyte growth factor).^{221, 222} Η έκφραση του VEGF υπόκειται σε ρύθμιση από προσταγλανδίνες, κυτταροκίνες και αυξητικούς παράγοντες (TGFα, TGFβ, TNFα, PDGF). Επίσης φαίνεται από πρόσφατες εργασίες ότι

υπάρχει αυξημένη βρογχική αιματική ροή στο άσθμα, γεγονός που δίνει στους ερευνητές νέα κίνητρα για έρευνα στον τομέα αυτό²⁷ (εικόνα 4).



Εικόνα 4. Ιστολογικό παρασκεύασμα κατά μήκος βρόγχου ασθενούς με θανατηφόρο άσθμα όπου φαίνονται αρκετά διευρυμένα αγγεία (V) στο τοίχωμα του αεραγωγού. Εμφανίζεται επίσης υπερτροφία των λείων μυϊκών ινών, φλεγμονή και ο αυλός (L), ο οποίος είναι πλήρως αποφραγμένος. Κλίμακα = 180.0 μm .

Δομικές Αλλαγές στον Εξωκυττάριο Χώρο

Η εναπόθεση κολλαγόνου, η αυξημένη έκφραση γλυκοπρωτεϊνών του εξωκυτταρίου χώρου και η εναπόθεση ινώδους ιστού στον εξωκυττάριο χώρο είναι μερικές από τις διαδικασίες που συντελούν στην επαναδιάταξη των αεραγωγών.²²⁷⁻²³¹ Η παραγωγή ινώδους ιστού ελέγχεται από αυξητικούς παράγοντες που αλληλεπιδρούν με την εξωκυττάρια ουσία^{117, 232}, παράγονται από αρκετά κύτταρα που συμμετέχουν στην ασθματική φλεγμονώδη αντίδραση (ηωσινόφιλα, μακροφάγα, επιθηλιακά κύτταρα, ινοβλάστες)^{233, 234}. Σημαντικότεροι από αυτούς είναι TGFβ (Transforming Growth Factor) και ο PDGF (Platelet Derived Growth Factor).²³⁴⁻²³⁶

Όλες οι παραπάνω δομικές αλλαγές που συμβαίνουν στην αρχή ή και κατά την εξέλιξη της νόσου αποτέλεσμα έχουν τη μείωση της ελαστικότητας του πνεύμονα²³⁷⁻²⁴⁰, την ελάττωση του εύρους του αυλού των βρόγχων²⁴²⁻²⁴⁶ που τελικά οδηγούν σε βαρύτερες κρίσεις άσθματος και μειωμένη απάντηση στη βρογχοδιαστολή.

Παρόλο που το ενδιαφέρον για τους μηχανισμούς της επαναδιάταξης των αεραγωγών που προκαλούν τη μη αναστρέψιμη βρογχική απόφραξη έχει αυξηθεί τελευταία, το γεγονός ότι υπάρχουν και αρκετοί ασθματικοί ασθενείς με αναστρέψιμη απόφραξη του πνεύμονα μπορεί να υποδεικνύει ότι γενετικοί παράγοντες είναι αυτοί που καθορίζουν τις δομικές αλλαγές στους αεραγωγούς.²⁷

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΡΟΚΛΗΣΗΣ ΠΤΥΕΛΟΥ

2.1 Πρόκληση πτυέλου

Η φλεγμονή των αεραγωγών παίζει κεντρικό ρόλο στην παθογένεση του άσθματος. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνταν στο παρελθόν για τη μελέτη της φλεγμονής των αεραγωγών ήταν, είτε με άμεσο τρόπο, με τη συλλογή δειγμάτων από τους αεραγωγούς (βρογχικές βιοψίες, βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα) με το βρογχοσκόπιο, είτε έμμεσα με μετρήσεις δεικτών φλεγμονής και φλεγμονωδών κυττάρων στο περιφερικό αίμα. Αυτές οι μέθοδοι υπήρξαν χρήσιμες για την κατανόηση της παθογένειας του άσθματος. Ήταν όμως είτε επεμβατικές, όπως η βρογχοσκόπηση, όποτε και ανέφικτη η συχνή εφαρμογή τους για να υπάρχει παρακολούθηση και επαναληψιμότητα των ευρημάτων, είτε έμμεσες όσον αφορά τη φλεγμονή των αεραγωγών, με τις μετρήσεις των δεικτών φλεγμονής στο περιφερικό αίμα.

Πρώτη φορά το 1940 χρησιμοποιήθηκε κλινικά το προκλητό πτύελο ως μέθοδος συλλογής δειγμάτων για την ανίχνευση του βάκιλλου της φυματίωσης²⁴⁷, και αργότερα σε ανοσοκατασταλμένους ασθενείς με AIDS για την ανίχνευση της *Pneumocystis carinii*.²⁴⁸

Η ανάλυση του προκλητού πτυέλου έχει χρησιμοποιηθεί τα τελευταία χρόνια, ως μια σχετικά μη επεμβατική μέθοδος, για την εκτίμηση της φλεγμονής των αεραγωγών σε ασθένειες όπως το άσθμα και η ΧΑΠ. Το

1992, η Pin και οι συνεργάτες της χρησιμοποίησαν για πρώτη φορά την μικροσκοπική εξέταση του πτυέλου για να παρακολουθήσουν τη φλεγμονή των αεραγωγών.²⁴⁹

2.2 Μεθοδολογία Πρόκλησης Πτυέλου

Αργότερα, διάφορες ερευνητικές ομάδες ανέπτυξαν διαφορετικές μεθοδολογίες.²⁵⁰⁻²⁵³ Όλες αυτές οι μέθοδοι χρησιμοποιούν το υπέρτονο διάλυμα χλωριούχου νατρίου, εισπνεόμενο σε διαφορετικές συγκεντρώσεις και για διαφορετική διάρκεια, με σκοπό την πρόκληση πτυέλου. Κάποιες από τις μεθόδους διαλέγουν το πτύελο από το δείγμα που έχει αποχρεμπτεί, αφήνοντας τη σίελο,²⁴⁹ ενώ άλλες επεξεργάζονται όλο το δείγμα^{250, 251, 253} και σε άλλες μεθόδους ο ερευνητής ζητά από τον ασθενή να συλλέγει τη σίελο σε διαφορετικό δοχείο από αυτό που συλλέγει το πτύελο.²⁵² Η σύγκριση των δυο τελευταίων μεθόδων έχει δείξει ότι η ξεχωριστή συλλογή πτυέλου και σιέλου μειώνει την συγκέντρωση επιθηλιακών κυττάρων.²⁵⁴ Στο ίδιο συμπέρασμα καταλήγει και η σύγκριση των πρώτων δυο μεθόδων (επεξεργασίας όλου του δείγματος ή διαχωρισμός πτυέλου από τη σίελο).²⁵⁵ Με τις παραπάνω μελέτες έχει δοκιμαστεί η αξιοπιστία και η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων και έχει διαπιστωθεί ότι η μέθοδος

πρόκλησης πτυέλου, μπορεί να είναι δυνητικά χρήσιμη σε κλινικές μελέτες ασθματικών ασθενών για τον έλεγχο της φλεγμονώδους διαδικασίας στους αεραγωγούς. Όσον αφορά την ασφάλεια της μεθόδου έχουν γίνει μελέτες εφαρμογής της ακόμη και σε ασθενείς με σοβαρό άσθμα επιτυχώς.²⁵⁶

Για πρώτη φορά το 1993 εφαρμόστηκε από την Pin και τους συνεργάτες της σε παιδιά με υπεραπαντητικότητα στη μεταχολίνη, επιτυχώς η μέθοδος πρόκλησης πτυέλου με υπέρτονο διάλυμα.²⁵⁷ Έκτοτε έχει εφαρμοσθεί με ασφάλεια και είναι καλά ανεκτή μέθοδος, σε αρκετά ερευνητικά πρωτόκολλα, σε παιδιά με οξεία ασθματική κρίση, σε ήπιο, μέτριο και σοβαρό άσθμα παιδιών ηλικίας άνω των 5 ετών.²⁵⁸⁻²⁶⁰

Συμπερασματικά η μέθοδος πρόκλησης πτυέλου μπορεί να γίνει χρήσιμο εργαλείο για την παρακολούθηση της φλεγμονής των αεραγωγών των ενηλίκων και των παιδιών με άσθμα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Fletcher CM, Gilson JG, Hugh-Jones P, Scadding JG. Terminology, definitions and classification of chronic pulmonary emphysema and related conditions. A report of the conclusions of a Ciba symposium. *Thorax* 1959; 14: 285-299.
2. American Thoracic Society. Chronic bronchitis, asthma and pulmonary emphysema. *Am Rev Respir Dis.* 1962; 85: 762-8.
3. World Health Organization. Epidemiology of chronic non specific respiratory diseases. *Bull World Health Organ* 1975; 52: 251-9.
4. American Thoracic Society. Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and asthma.
Am Rev Respir Dis. 1987 Jul; 136(1):225-44.
5. National Heart, Lung, and Blood Institute and National Institute of Health. Guidelines for the diagnosis and management of asthma.
Bethesda MD: Department of Human Services, 1995.
6. National Heart, Lung, and Blood Institute and World Health Organization. Global Initiative for Asthma. Washington: US Government Printing Office, 2002.

7. Croner S, Kjellman N-IM. Natural history of bronchial asthma in childhood: a prospective study from birth up to 12-14 years of age. *Allergy* 1992;47: 150-157)
8. Martinez FD, Wright AL, Taussing LM et al. Asthma and wheezing in the first six years of life. *N Engl J Med* 1995;332:133-138
9. Von Mutius E. Presentation of new GINA guidelines for pediatrics, the global initiative on asthma *Clin Exp Allergy* 2000 Jun;Suppl 1:6-10
10. Viegli G., Annesi I., Matteelli G. *Epidemiology of Asthma*. ERS Monography 2003; 23:1-25.
11. Ronmark E. Asthma Incidence, remission and risk factors. Umea University Dissertations, New Series No. 630 0346-6612-ISBN 91-7191-708-X, 1999.
12. European Community Respiratory Health Survey. Variations in the prevalence of respiratory symptoms, self-reported asthma attacks, and use of asthma medication in the European Community Respiratory Health Study (ECRHS). *Eur Respir J* 1996; 9: 687–695
13. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee. Worldwide variations in the prevalence of asthma symptoms: the International Study of Asthma and Allergies in Childhood. *Eur Respir J* 1998; 12: 315–335.

14. World Health Organization (WHO). . Bronchial asthma. WHO Fact Sheet N° 206. <http://www.who.int/inf-fs/en/fact206.html>. Revised January 2000.
15. Viegi G, Baldacci S, Vellutini M. et al. Prevalence rates of diagnosis of asthma in general population samples of Northern and Central Italy. *Monaldi Arch Chest Dis* 1994; 49: 191–196.
16. Pedreschi M, Carrozzi L, Viegi G. et al. Morbidity e mortality per asma in Italia. *L'Ospedale Maggiore* 1993; 87: 169–175.
17. Seaton A, Godden DJ, Brown K. Increase in asthma: is a more toxic environment, or a more susceptible population? *Thorax* 1994; 94: 171–174
18. Goren AI, Hellmann S. Changing prevalence of asthma among schoolchildren in Israel. *Eur Respir J* 1997: 2279–2284
19. Weinberg EG. Urbanization and childhood asthma: an African perspective. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105: 224–231.
20. Desideri M, Viegi G, Carrozzi L. et al. Mortality rates for respiratory disorders in Italy 1979-1990. *Monaldi Arch Chest Dis* 1997; 52: 212–216.

21. Chatkin JM, Barreto SM, Fonseca NA, Gutierrez CA, Sears MR. Trends in asthma mortality in young people in southern Brazil. *Ann Allergy Asthma Immunol* Vol. 1999: 287–292.
22. Organov RG, Maslennikova G Ya. Asthma mortality in Russia between 1980 and 1989. *Eur Respir J* 1999; 13: 287–289.
23. Pearce NE, Davis PB, Smith AH, Foster FH. Mortality and social class in New Zealand. III: male mortality and ethnic group. *N Z Med J* 1984; 97: 31–35.
24. Joseph CL, Ownby DR, Peterson EL, Johnson CC. Racial differences in physiologic parameters related to asthma among middle-class children. *Chest* 2000; 117: 1336–1344.
25. Fabre Ortiz DE, Cabrera Perez JF, Armas Perez L, Gonzales Ochoa E. Asthma mortality in Cuba during 1972]1993. *Allergol Immunopathol* 1997; 25: 289–292.
26. Ehrlich RI, Bourne DE. Asthma related deaths among coloured and white South Africans. *Respir Med* 1994; 88: 195–202.
27. Barnes P.J. Pathophysiology of Asthma. *Eur Respir Mon.* 2003; 23: 84-113.

28. Cookson WO, Moffatt MF. Genetics of asthma and allergic disease. *Hum Mol Genet* 2000; 9: 2359–2364.
29. Barnes KC. Evidence for common genetic elements in allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106: S192–S200.
30. Dunnill MS. The pathology of asthma, with special reference to the changes in the bronchial mucosa. *J Clin Pathol* 1960; 13: 27–33.
31. Busse WW, Lemanske RF. Asthma. *N Engl J Med* 2001; 344: 350–362.
32. Bousquet J, Jeffery PK, Busse WW, Johnson M, Vignola AM. Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 1720–1745.
33. Colasurdo GN, Larsen GL. Airway hyperresponsiveness. In: Busse W, Holgate S, editors. *Asthma and rhinitis*. Boston: Blackwell Scientific Publications; 1994. p.1044-56
34. Busse, W. W., and J. E. Gern. Viruses in asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1997; 100: 147-150.
35. Wardlaw, A. J. The role of air pollution in asthma. *Clin. Exp. Allergy* 1993; 23: 81-96.
36. Murray, J. J., A. B. Tonnel, A. R. Brash, L. D. Roberts, P. Gosset, R. Workman, A. Capron, and J. A. Oates. Prostaglandin D₂ is released

- during acute allergic bronchospasm in man. *Trans. Assoc. Am. Physicians* 1985; 98: 275-280.
37. Liu, M. C., W. C. Hubbard, D. Proud, B. A. Stealey, S. J. Galli, A. Kagey-Sobotka, E. R. Bleecker, and L. M. Lichtenstein. Immediate and late inflammatory responses to ragweed antigen challenge of the peripheral airways in allergic asthmatics: cellular, mediator, and permeability changes. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1991; 144: 51-58.
38. Tonnel, A. B., M. Joseph, P. Gosset, E. Fournier, and A. Capron. Stimulation of alveolar macrophages in asthmatic patients after local provocation test. *Lancet* 1983; 1: 1406-1408.
39. Calhoun, W. J., H. E. Reed, D. R. Moest, and C. A. Stevens. Enhanced superoxide production by alveolar macrophages and air-space cells, airway inflammation, and alveolar macrophage density changes after segmental antigen bronchoprovocation in allergic subjects. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1992; 145: 317-325.
40. Gounni, A. S., B. Lamkhioued, K. Ochiai, Y. Tanaka, E. Delaporte, A. Capron, J. P. Kinet, and M. Capron. High-affinity IgE receptor on eosinophils is involved in defence against parasites. *Nature* 1994;367:183-186.

41. Jarjour, N., W. Calhoun, E. Becky-Wells, G. Gleich, L. Schwartz, and W. Busse. The immediate and late-phase allergic response to segmental bronchopulmonary provocation in asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1997; 155: 1515-1521.
42. Wenzel, S. E., J. Y. Westcott, H. R. Smith, and G. L. Larsen. Spectrum of prostanoid release after bronchoalveolar allergen challenge in atopic asthmatics and in control groups: an alteration in the ratio of bronchoconstrictive to bronchoprotective mediators. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1989; 139: 450-457.
43. Persson, C. G., M. Andersson, L. Greiff, C. Svensson, J. S. Erjefalt, F. Sundler, P. Wollmer, U. Alkner, I. Erjefalt, B. Gustafsson, M. Linden, and M. Nilsson. Airway permeability. *Clin. Exp. Allergy* 1995; 25: 807-814.
44. Greiff, L., I. Erjefalt, C. Svensson, P. Wollmer, U. Alkner, M. Andersson, and C. G. Persson. Plasma exudation and solute absorption across the airway mucosa. *Clin. Physiol.* 1993; 13: 219-233.
45. Van-Vyve, T., P. Chanez, A. Bernard, J. Bousquet, P. Godard, R. Lauwerijs, and Y. Sibille. Protein content in bronchoalveolar lavage

- fluid of patients with asthma and control subjects. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1995; 95: 60-68.
46. Wanner, A., M. Salathe, and T. G. O'Riordan. Mucociliary clearance in the airways. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1996; 154: 1868-1902.
47. De Monchy, J. G., H. F. Kauffman, P. Venge, G. H. Koeter, H. M. Jansen, H. J. Sluiter, and K. De Vries. Bronchoalveolar eosinophilia during allergen-induced late asthmatic reactions. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1985; 131: 373-376.
48. Robinson, D., Q. Hamid, A. Bentley, S. Ying, A. B. Kay, and S. R. Durham. Activation of CD4⁺ T cells, increased Th₂-type cytokine mRNA expression, and eosinophil recruitment in bronchoalveolar lavage after allergen inhalation challenge in patients with atopic asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1993; 92: 313-324.
49. Guo, C. B., M. C. Liu, S. J. Galli, B. S. Bochner, A. Kagey-Sobotka, and L. M. Lichtenstein. Identification of IgE-bearing cells in the late-phase response to antigen in the lung as basophils. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1994; 10: 384-390.
50. Koh, Y. Y., R. Dupuis, M. Pollice, K. H. Albertine, J. E. Fish, and S. P. Peters. 1993. Neutrophils recruited to the lungs of humans by

- segmental antigen challenge display a reduced chemotactic response to leukotriene B₄. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1993; 8: 493-499.
51. Montefort, S., C. Gratziou, D. Goulding, R. Polosa, D. O. Haskard, P. H. Howarth, S. T. Holgate, and M. P. Carroll. Bronchial biopsy evidence for leukocyte infiltration and upregulation of leukocyte-endothelial cell adhesion molecules 6 hours after local allergen challenge of sensitized asthmatic airways. *J. Clin. Invest.* 1994; 93: 1411-1421.
52. Calhoun, W. J., N. N. Jarjour, G. J. Gleich, C. A. Stevens, and W. W. Busse. Increased airway inflammation with segmental versus aerosol antigen challenge. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1993; 147: 1465-1471.
53. Kay, A. B. "Helper" (CD4⁺) T cells and eosinophils in allergy and asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1992; 145: S22-S26.
54. Bradding, P., J. A. Roberts, K. M. Britten, S. Montefort, R. Djukanovic, R. Mueller, C. H. Heusser, P. H. Howarth, and S. T. Holgate. Interleukin-4, -5, and -6 and tumor necrosis factor-alpha in normal and asthmatic airways: evidence for the human mast cell as a source of these cytokines. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1994; 10: 471-480.

55. Bentley, A. M., Q. Meng, D. S. Robinson, Q. Hamid, A. B. Kay, and S. R. Durham. Increases in activated T lymphocytes, eosinophils, and cytokine mRNA expression for interleukin-5 and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor in bronchial biopsies after allergen inhalation challenge in atopic asthmatics. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1993; 8: 35-42.
56. Cockcroft, D. W., and K. Y. Murdock. Comparative effects of inhaled salbutamol, sodium cromoglycate, and beclomethasone dipropionate on allergen-induced early asthmatic responses, late asthmatic responses, and increased bronchial responsiveness to histamine. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1987; 79: 734-740.
57. Fabbri, L. M., M. Saetta, G. Picotti, and C. E. Mapp. Late asthmatic reactions, airway inflammation and chronic asthma in toluene-diisocyanate-sensitized subjects. *Respiration* 1991; 1: 18-21.
58. Holgate, S. T. The 1992 Cournand Lecture. Asthma: past, present and future. *Eur. Respir. J.* 1993; 6: 1507-1520.
59. Bochner, B. S., B. J. Udem, and L. M. Lichtenstein. Immunological aspects of allergic asthma. *Annu. Rev. Immunol.* 1994; 12: 295-335.
60. Robinson, D. S., R. Damia, K. Zeibecoglou, S. Molet, J. North, T. Yamada, A. Barry, Kay, and Q. Hamid. CD34(+)/interleukin-5 α

- messenger RNA+ cells in the bronchial mucosa in asthma: potential airway eosinophil progenitors. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1999; 20: 9-13.
61. Sehmi, R., K. Howie, D. R. Sutherland, W. Schragge, P. M. O'Byrne, and J. A. Denburg. Increased levels of CD34+ hemopoietic progenitor cells in atopic subjects. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1996; 15: 645-655.
62. Denburg, J. A., M. D. Inman, B. Leber, R. Sehmi, and P. M. O'Byrne. The role of the bone marrow in allergy and asthma. *Allergy* 1996; 51: 141-148.
63. Demoly, P., J. Simony-Lafontaine, P. Chanez, J. L. Pujol, N. Lequeux, F. B. Michel, and J. Bousquet. Cell proliferation in the bronchial mucosa of asthmatics and chronic bronchitics. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1994; 150: 214-217.
64. Georas, S. N., M. C. Liu, W. Newman, L. D. Beall, B. A. Stealey, and B. S. Bochner. Altered adhesion molecule expression and endothelial cell activation accompany the recruitment of human granulocytes to the lung after segmental antigen challenge. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1992; 7: 261-269.

65. Granger, D. N., and P. Kubes. The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. *J. Leukoc. Biol.* 1994; 55: 662-675.
66. Bochner, B., and R. Schleimer. The role of adhesion molecules in human eosinophil and basophil recruitment. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1994; 94: 427-439.
67. Nagata, M., J. B. Sedgwick, and W. W. Busse. Differential effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on eosinophil and neutrophil superoxide anion generation. *J. Immunol.* 1995; 155: 4948-4954.
68. Sur, S., G. J. Gleich, M. C. Swanson, K. R. Bartemes, and D. H. Broide. Eosinophilic inflammation is associated with elevation of interleukin-5 in the airways of patients with spontaneous symptomatic asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1995; 96: 661-668.
69. Lopez, A. F., C. J. Sanderson, J. R. Gamble, H. D. Campbell, I. G. Young, and M. A. Vadas. Recombinant human interleukin 5 is a selective activator of human eosinophil function. *J. Exp. Med.* 1988; 167: 219-224.
70. Neeley, S. P., K. J. Hamann, S. R. White, S. L. Baranowski, R. A. Burch, and A.R. Leff. Selective regulation of expression of surface

- adhesion molecules Mac-1, L-selectin, and VLA-4 on human eosinophils and neutrophils. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1993. 8: 633-639.
71. Sedgwick, J. B., S. F. Quan, W. J. Calhoun, and W. W. Busse. 1995. Effect of interleukin-5 and granulocyte-macrophage colony stimulating factor on in vitro eosinophil function: comparison with airway eosinophils. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1995; 96: 375-385.
72. Alam, R., S. Stafford, P. Forsythe, R. Harrison, D. Faubion, M. A. Lett-Brown, and J. A. Grant. RANTES is a chemotactic and activating factor for human eosinophils. *J. Immunol.* 1993; 150: 3442-3448.
73. Teran, L. M., N. Noso, M. Carroll, D. E. Davies, S. Holgate, and J. M. Schroder. Eosinophil recruitment following allergen challenge is associated with the release of the chemokine RANTES into asthmatic airways. *J. Immunol.* 1996; 157: 1806-1812.
74. Garcia-Zepeda, E. A., M. E. Rothenberg, R. T. Ownbey, J. Celestin, P. Leder, and A. D. Luster. Human eotaxin is a specific chemoattractant for eosinophil cells and provides a new mechanism to explain tissue eosinophilia. *Nat. Med.* 1996; 2: 449-456.

75. Elsner, J., R. Hochstetter, D. Kimmig, and A. Kapp. Human eotaxin represents a potent activator of the respiratory burst of human eosinophils. *Eur. J. Immunol.* 1996. 26: 1919-1925.
76. Sallusto, F., C. R. Mackay, and A. Lanzavecchia. Selective expression of the eotaxin receptor CCR3 by human T helper 2 cells. *Science* 1997; 277: 2005-2007.
77. Holgate, S. T., K. S. Bodey, A. Janezic, A. J. Frew, A. P. Kaplan, and L. M. Teran. Release of RANTES, MIP-1 alpha, and MCP-1 into asthmatic airways following endobronchial allergen challenge. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1997; 156: 1377-1383.
78. Cruikshank, W. W., A. Long, R. E. Tarpy, H. Kornfeld, M. P. Carroll, L. Teran, S. T. Holgate, and D. M. Center. Early identification of interleukin-16 (lymphocyte chemoattractant factor) and macrophage inflammatory protein 1 alpha (MIP1 alpha) in bronchoalveolar lavage fluid of antigen-challenged asthmatics. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1995; 13: 738-747.
79. Jeffery, P. K. Pathology of asthma. *Br. Med. Bull.* 1992; 48: 23-39.
80. Schwartz, L. B. Cellular inflammation in asthma: neutral proteases of mast cells. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1992; 145: S18-S21.

81. Henderson, W. Jr. The role of leukotrienes in inflammation. *Ann. Intern. Med.* 1994; 121: 684-697.
82. Barnes, P. NO or no NO in asthma? *Thorax* 1996; 51: 218-220.
83. Gleich, G. J., C. R. Adolphson, and K. M. Leiferman. The biology of the eosinophilic leukocyte. *Annu. Rev. Med.* 1993; 44: 85-101.
84. Holgate, S. Mediator and cytokine mechanisms in asthma. *Thorax* 1993; 48: 103-109.
85. Drazen, J. M., J. P. Arm, and K. F. Austen. Sorting out the cytokines of asthma. *J. Exp. Med.* 1996; 183: 1-5.
86. Shah, A., M. K. Church, and S. T. Holgate. Tumour necrosis factor alpha: a potential mediator of asthma. *Clin. Exp. Allergy* 1995; 25: 1038-1044.
87. Maestrelli, P., A. di Stefano, P. Occari, G. Turato, G. Milani, F. Pivrotto, C. E. Mapp, L. M. Fabbri, and M. Saetta. 1995. Cytokines in the airway mucosa of subjects with asthma induced by toluene diisocyanate. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1995; 151: 607-612.
88. Jarjour, N. N., and W. W. Busse. 1995. Cytokines in bronchoalveolar lavage fluid of patients with nocturnal asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1995; 152: 1474-1477.

89. Mueller, R., P. Chanez, A. M. Campbell, J. Bousquet, C. Heusser, and G. R. Bullock. Different cytokine patterns in bronchial biopsies in asthma and chronic bronchitis. *Respir. Med.* 1996; 90: 79-85.
90. Campbell, A. M., P. Chanez, A. M. Vignola, J. Bousquet, I. Couret, F. B. Michel, and P. Godard. 1993. Functional characteristics of bronchial epithelium obtained by brushing from asthmatic and normal subjects. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1993; 147: 529-534.
91. Cromwell, O., Q. Hamid, C. J. Corrigan, J. Barkans, Q. Meng, P. D. Collins, and A. B. Kay. Expression and generation of interleukin-8, IL-6 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by bronchial epithelial cells and enhancement by IL-1 beta and tumour necrosis factor-alpha. *Immunology* 1992; 77: 330-337.
92. Lilly, C. M., H. Nakamura, H. Kesselman, C. Nagler-Anderson, K. Asano, E. A. Garcia-Zepeda, M. E. Rothenberg, J. M. Drazen, and A. D. Luster. Expression of eotaxin by human lung epithelial cells: induction by cytokines and inhibition by glucocorticoids. *J. Clin. Invest.* 1997; 99: 1767-1773.
93. Cambrey, A. D., O. J. Kwon, A. J. Gray, N. K. Harrison, M. Yacoub, P. J. Barnes, G. J. Laurent, and K. F. Chung. 1995. Insulin-like growth

- factor I is a major fibroblast mitogen produced by primary cultures of human airway epithelial cells. *Clin. Sci. Colch.* 1995; 89: 611-617.
94. Pertovaara, L., A. Kaipainen, T. Mustonen, A. Orpana, N. Ferrara, O. Saksela, and K. Alitalo. 1994. Vascular endothelial growth factor is induced in response to transforming growth factor-beta in fibroblastic and epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 1994; 269: 6271-6274.
95. Harkonen, E., I. Virtanen, A. Linnala, L. L. Laitinen, and V. L. Kinnula. 1995. Modulation of fibronectin and tenascin production in human bronchial epithelial cells by inflammatory cytokines in vitro. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1995; 13: 109-115.
96. Yao, P. M., J. M. Buhler, M. P. d'Ortho, F. Lebargy, C. Delclaux, A. Harf, and C. Lafuma. Expression of matrix metalloproteinase gelatinases A and B by cultured epithelial cells from human bronchial explants. *J. Biol. Chem.* 1996; 271: 15580-15589.
97. Nakamura, Y., L. Tate, R. F. Ertl, M. Kawamoto, T. Mio, Y. Adachi, D. J. Romberger, S. Koizumi, G. Gossman, R. A. Robbins, J. R. Spurzem, and S. I. Rennarol. Bronchial epithelial cells regulate fibroblast proliferation. *Am. J. Physiol.* 1995; 269: L377-L387.

98. Brightling CE, Bradding P, Symon FA, Holgate ST, Wardlaw AJ, Pavord ID. Mast-cell infiltration of airway smooth muscle in asthma. *N Engl J Med* 2002; 346: 1699–1705.
99. Bentley AM, Hamid Q, Robinson DS. et al. Prednisolone treatment in asthma. Reduction in the numbers of eosinophils, T cells, tryptase-only positive mast cells, and modulation of IL-4, IL-5, and interferon-gamma cytokine gene expression within the bronchial mucosa. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153: 551–556.
100. Akers IA, Parsons M, Hill MR. et al. Mast cell tryptase stimulates human lung fibroblast proliferation via protease-activated receptor-2. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; 278: L193–L201.
101. Williams CM, Galli SJ. The diverse potential effector and immunoregulatory roles of mast cells in allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105: 847–859.
102. Fahy JV. Reducing IgE levels as a strategy for the treatment of asthma. *Clin Exp Allergy* 2000; 30(1): 16–21.
103. Barnes PJ. Anti-IgE therapy in asthma: rationale and therapeutic potential. *Int Arch Allergy Immunol* 2000; 123: 196–204.

104. Milgrom H, Fick RB Jr, Su JQ. et al. Treatment of allergic asthma with monoclonal anti-IgE antibody. *New Engl J Med* 1999; 341: 1966–1973.
105. Zieg G, Lack G, Harbeck RJ, Gelfand EW, Leung DY. In vivo effects of glucocorticoids on IgE production. *J Allergy Clin Immunol* 1994; 94: 222–230.
106. Barnes PJ. Corticosteroids, IgE, and atopy. *J Clin Invest* 2001; 107: 265–266.
107. Barnes PJ. Are mast cells still important in asthma? *Rev Fr Allergol Immunol Clin* 2002; 42: 20–27.
108. Spiteri MA, Knight RA, Jeremy JY, Barnes PJ, Chung KF. Alveolar macrophage-induced suppression of peripheral blood mononuclear cell responsiveness is reversed by in vitro allergen exposure in bronchial asthma. *Eur Respir J* 1994; 7: 1431–1438.
109. Lee TH, Lane SJ. The role of macrophages in the mechanisms of airway inflammation in asthma. *Am Rev Respir Dis* 1992; 145: S27–S30.
110. Poulter LW, Burke CM. Macrophages and allergic lung disease. *Immunobiology* 1996; 195: 574–587.

111. Joseph, M., A. B. Tonnel, G. Torpier, A. Capron, B. Arnoux, and J. Benveniste. 1983. Involvement of immunoglobulin E in the secretory processes of alveolar macrophages from asthmatic patients. *J. Clin. Invest.* 1983; 71: 221-230.
112. Damon, M., C. Chavis, J. P. Daures, A. Crastes de Paulet, F. B. Michel, and P. Godard. Increased generation of the arachidonic metabolites LTB₄ and 5-HETE by human alveolar macrophages in patients with asthma: effect in vitro of nedocromil sodium. *Eur. Respir. J.* 1989; 2: 202-209.
113. Arnoux, B., E. Jouvin-Marche, A. Arnoux, J. Chrétien, and J. Benveniste. Release of PAF-acether from human monocytes. *Agents Action* 1982; 12: 713-716.
114. Borish L, Mascali JJ, Dishuck J, Beam WR, Martin RJ, Rosenwasser LJ. Detection of alveolar macrophage-derived IL-1 beta in asthma. Inhibition with corticosteroids. *J Immunol.* 1992; 149(9): 3078-82.
115. Chanez, P., A. M. Vignola, N. Paul-Eugene, B. Dugas, P. Godard, F. B. Michel, and J. Bousquet. Modulation by interleukin-4 of cytokine release from mononuclear phagocytes in asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1994; 94: 997-1005.

116. Sperber, K., P. Chanez, J. Bousquet, S. Goswami, and Z. Marom. Detection of a novel macrophage-derived mucus secretagogue (MMS-68) in bronchoalveolar lavage fluid of patients with asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1995; 95: 868-876.
117. Kovacs, E., and L. DiPietro. Fibrogenic cytokines and connective tissue production. *FASEB J.* 1994; 8: 854-861.
118. Fuller, R. W., G. O'Malley, A. J. Baker, and J. MacDermot. Human alveolar macrophage activation: inhibition by forskolin but not beta-adrenoceptor stimulation or phosphodiesterase inhibition. *Pulm. Pharmacol.* 1988; 1: 101-106.
119. Chanez, P., A. M. Vignola, B. Albat, D. R. Springall, J. M. Polak, P. Godard, and J. Bousquet.. Involvement of endothelin in mononuclear phagocyte inflammation in asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1996; 98: 412-420.
120. Cluzel, M., M. Damon, P. Chanez, J. Bousquet, A. Crastes de Paulet, F. B. Michel, and P. Godard. Enhanced alveolar cell luminol-dependent chemiluminescence in asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1987; 80: 195-201.
121. Kelly, C., C. Ward, C. S. Stenton, G. Bird, D. J. Hendrick, and E. H. Walters. Number and activity of inflammatory cells in

- bronchoalveolar lavage fluid in asthma and their relation to airway responsiveness. *Thorax* 1988; 43: 684-692.
122. Metzger, W. J., D. Zavala, H. B. Richerson, P. Moseley, P. Iwamoto, M. Monick, K. Sjoerdsma, and G. W. Hunninghake. Local allergen challenge and bronchoalveolar lavage of allergic asthmatic lungs: description of the model and local airway inflammation. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1987; 135: 433-440.
123. Gosset, P., A. Tsicopoulos, B. Wallaert, C. Vannimenus, M. Joseph, A. B. Tonnel, and A. Capron. Increased secretion of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 by alveolar macrophages consecutive to the development of the late asthmatic reaction. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1991; 88: 561-571.
124. John M, Lim S, Seybold J. et al. Inhaled corticosteroids increase IL-10 but reduce MIP-1a, GM-CSF and IFN-g release from alveolar macrophages in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 256–262.
125. Tang C, Ward C, Reid D, Bish R, O'Byrne PM, Walters EH. Normally suppressing CD40 coregulatory signals delivered by airway macrophages to TH2 lymphocytes are defective in patients with atopic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107: 863–870.

126. Holt PG, McMenamin C. Defence against allergic sensitization in the healthy lung: the role of inhalation tolerance. *Clin Exp Allergy* 1989; 19: 255–262.
127. Banchereau J, Briere F, Caux C. et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 767–811.
128. Hance, A. J. Pulmonary immune cells in health and disease: dendritic cells and Langerhans' cells. *Eur. Respir. J.* 1993; 6: 1213-1220.
129. Moser M, Murphy KM. Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development. *Nat Immunol* 2000; 1: 199–205.
130. Lambrecht BN, De Veerman M, Coyle AJ, Gutierrez-Ramos JC, Thielemans K, Pauwels RA. Myeloid dendritic cells induce Th2 responses to inhaled antigen, leading to eosinophilic airway inflammation. *J Clin Invest* 2000; 106: 551–559.
131. Gleich GJ. Mechanisms of eosinophil-associated inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105: 651–663.
132. Robinson DS, Kay AB, Wardlaw AJ. Eosinophils. *Clin Allergy Immunol* 2002; 16: 43–75.

133. Yukawa T, Read RC, Kroegel C. et al. The effects of activated eosinophils and neutrophils on guinea pig airway epithelium in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1990; 2: 341–354.
134. Adamko D, Lacy P, Moqbel R. Mechanisms of eosinophil recruitment and activation. *Curr Allergy Asthma Rep* 2002; 2: 107–116.
135. Woolley MJ, Denburg JA, Ellis R, Dahlback M, O'Byrne PM. Allergen-induced changes in bone marrow progenitors and airway responsiveness in dogs and the effect of inhaled budesonide on these parameters. *Am J Resp Cell Mol Biol* 1994; 11: 600–606.
136. Bousquet, J., P. Chanez, J. Y. Lacoste, G. Barneon, N. Ghavanian, I. Enander, P. Venge, S. Ahlstedt, J. Simony-Lafontaine, P. Godard, and F. B. Michel. Eosinophilic inflammation in asthma. *N. Engl. J. Med.* 1990; 323: 1033-1039.
137. Bradley, B. L., M. Azzawi, M. Jacobson, B. Assoufi, J. V. Collins, A. M. Irani, L. B. Schwartz, S. R. Durham, P. K. Jeffery, and A. B. Kay. Eosinophils, T-lymphocytes, mast cells, neutrophils, and macrophages in bronchial biopsy specimens from atopic subjects with asthma: comparison with biopsy specimens from atopic subjects without asthma and normal control subjects and relationship to

- bronchial hyperresponsiveness. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1991; 88: 661-674.
138. Azzawi, M., B. Bradley, P. K. Jeffery, A. J. Frew, A. J. Wardlaw, G. Knowles, B. Assoufi, J. V. Collins, S. Durham, and A. B. Kay. Identification of activated T lymphocytes and eosinophils in bronchial biopsies in stable atopic asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1990; 142: 1407-1413.
139. Tachimoto H, Bochner BS. The surface phenotype of human eosinophils. *Chem Immunol* 2000; 76: 45–62.
140. Wardlaw AJ. Molecular basis for selective eosinophil trafficking in asthma: A multistep paradigm. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104: 917–926.
141. Wegner CD, Gundel L, Reilly P, Haynes N, Letts LG, Rothlein R. Intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in the pathogenesis of asthma. *Science* 1990; 247: 456–459.
142. Pilewski JM, Albelda SM. Cell adhesion molecules in asthma: homing activation and airway remodelling. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995; 12: 1–3.

143. Lamas AM, Mulroney CM, Schleimer RP. Studies of the adhesive interaction between purified human eosinophils and cultured vascular endothelial cells. *J Immunol* 1988; 140: 1500–1510.
144. Blease K, Lukacs NW, Hogaboam CM, Kunkel SL. Chemokines and their role in airway hyper-reactivity. *Respir Res* 2000; 1: 54–61.
145. Park CS, Choi YS, Ki SY. et al. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor is the main cytokine enhancing the survival of eosinophils in asthmatic airways. *Eur Respir J* 1998; 12: 872–878.
146. Simon HU. Regulation of eosinophil and neutrophil apoptosis]similarities and differences. *Immunol Rev* 2001; 179: 156–162.
147. De Souza PM, Kankaanranta H, Michael A, Barnes PJ, Giembycz MA, Lindsay MA. Caspase-catalyzed cleavage and activation of Mst1 correlates with eosinophil but not neutrophil apoptosis. *Blood* 2002; 99: 3432–3438.
148. Leckie MJ, ten Brincke A, Khan J. et al. Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyperresponsiveness and the late asthmatic response. *Lancet* 2000; 356: 2144–2148.

149. Kips JC, O'Connor BJ, Langley SJ. et al. Results of a phase I trial with SCH55700, a humanized anti-IL-5 antibody in severe persistent asthma. *Am J Resp Crit Care Med* 2000; 161: A505.
150. Minshall EM, Leung DY, Martin RJ. et al. Eosinophil-associated TGF-beta1 mRNA expression and airways fibrosis in bronchial asthma *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997; 17 : 326–333.
151. Wenzel SE, Szeffler SJ, Leung DY, Sloan SI, Rex MD, Martin RJ. Bronchoscopic evaluation of severe asthma. Persistent inflammation associated with high dose glucocorticoids. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156: 737–743.
152. Jatakanon A, Uasaf C, Maziak W, Lim S, Chung KF, Barnes PJ. Neutrophilic inflammation in severe persistent asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: 1532–1539.
153. Gibson PG, Simpson JL, Saltos N. Heterogeneity of airway inflammation in persistent asthma: evidence of neutrophilic inflammation and increased sputum interleukin-8. *Chest* 2001; 119: 1329–1336.
154. Cox G. Glucocorticoid treatment inhibits apoptosis in human neutrophils. *J Immunol* 1995; 193: 4719–4725.

155. Meagher LC, Cousin JM, Seckl JR, Haslett C. Opposing effects of glucocorticoids on the rate of apoptosis in neutrophilic and eosinophilic granulocytes. *J Immunol* 1996; 156: 4422–4428.
156. Kay AB. Allergy and allergic diseases. *N Engl J Med* 2001; 344: 109–113.
157. Prescott SL, Macaubas C, Smallacombe T, Holt BJ, Sly PD, Holt PG. Development of allergen-specific T-cell memory in atopic and normal children. *Lancet* 1999; 353: 196–200.
158. Holt PG, Sly PD. Prevention of adult asthma by early intervention during childhood: potential value of new generation immunomodulatory drugs. *Thorax* 2000; 55: 700–703.
159. Ball TM, Castro-Rodriguez JA, Griffith KA, Holberg CJ, Martinez FD, Wright AL. Siblings, day-care attendance, and the risk of asthma and wheezing during childhood. *N Engl J Med* 2000; 343: 538–543.
160. Christiansen SC. Day care, siblings, and asthma]please, sneeze on my child. *N Engl J Med* 2000; 343: 574–575.
161. Naseer T, Minshall EM, Leung DY. et al. Expression of IL-12 and IL-13 mRNA in asthma and their modulation in response to steroids. *Am J Resp Crit Care Med* 1997; 155: 845–851.

162. Levings MK, Sangregorio R, Roncarolo MG. Human cd25(+)cd4(+) t regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function. *J Exp Med* 2001; 193: 1295–1302.
163. Roncarolo MG, Bacchetta R, Bordignon C, Narula S, Levings MK. Type 1 T regulatory cells. *Immunol Rev* 2001; 182: 68–79.
164. Gould HJ, Beavil RL, Vercelli D. IgE isotype determination: epsilon-germline gene transcription, DNA recombination and B-cell differentiation. *Br Med Bull* 2000; 56: 908–924.
165. Costa JJ, Weller PF, Galli SJ. The cells of the allergic response: mast cells, basophils, and eosinophils. *JAMA* 1997; 278: 1815–1822.
166. Macfarlane AJ, Kon OM, Smith SJ. et al. Basophils, eosinophils, and mast cells in atopic and nonatopic asthma and in late-phase allergic reactions in the lung and skin. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105: 99–107.
167. Braunstahl GJ, Overbeek SE, Fokkens WJ. et al. Segmental bronchoprovocation in allergic rhinitis patients affects mast cell and basophil numbers in nasal and bronchial mucosa. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: 858–865.

168. Gauvreau GM, Lee JM, Watson RM, Irani AM, Schwartz LB, O'Byrne PM. Increased numbers of both airway basophils and mast cells in sputum after allergen inhalation challenge of atopic asthmatics. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 1473–1478.
169. Herd CM, Page CP. Pulmonary immune cells in health and disease: platelets. *Eur Respir J* 1994; 7: 1145–1160.
170. Sullivan PJ, Jafar ZH, Harbinson PL, Restricker LJ, Costello JF, Page CP. Platelet dynamics following allergen challenge in allergic asthmatics. *Respiration* 2000; 67: 514–517.
171. Moritani C, Ishioka S, Haruta Y, Kambe M, Yamakido M. Activation of platelets in bronchial asthma. *Chest* 1998; 113: 452–458.
172. Abi-Younes S, Si-Tahar M, Luster AD. The CC chemokines MDC and TARC induce platelet activation via CCR4. *Thromb Res* 2001; 101: 279–289.
173. Drazen JM, Israel E, O'Byrne PM. Treatment of asthma with drugs modifying the leukotriene pathway. *N Engl J Med* 1999; 340: 197–206.

174. Diamant Z, Hiltermann JT, van Rensen EL. et al. The effect of inhaled leukotriene D4 and methacholine on sputum cell differentials in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155: 1247–1253.
175. Chung KF. Platelet-activating factor in inflammation and pulmonary disorders *Clin Sci (Colch)* 1992; 83: 127–138.
176. Freitag A, Watson RM, Mabos G, Eastwood C, O'Byrne PM. Effect of a platelet activating factor antagonist, WEB 2086, on allergen induced asthmatic responses. *Thorax* 1993; 48: 594–598.
177. Kuitert LM, Angus RM, Barnes NC. et al. The effect of a novel potent PAF antagonist, modipafant, in chronic asthma *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151: 1331–1335.
178. Spence DPS, Johnston SL, Calverley PMA. et al. The effect of the orally active platelet-activating factor antagonist WEB 2086 in the treatment of asthma. *Am J Resp Crit Care Med* 1994; 149: 1142–1148.
179. Stafforini DM, Numao T, Tsodikov A. et al. Deficiency of platelet-activating factor acetylhydrolase is a severity factor for asthma. *J Clin Invest* 1999; 103: 989–997.

180. Taha R, Olivenstein R, Utsumi T. et al. Prostaglandin H synthase 2 expression in airway cells from patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 636–640.
181. Cowburn AS, Sladek K, Soja J. et al. Overexpression of leukotriene C4 synthase in bronchial biopsies from patients with aspirin-intolerant asthma. *J Clin Invest* 1998; 101: 834–846.
182. Matsuoka T, Hirata M, Tanaka H. et al. Prostaglandin D2 as a mediator of allergic asthma. *Science* 2000; 287: 2013–2017.
183. Hirai H, Tanaka K, Yoshie O. et al. Prostaglandin D2 selectively induces chemotaxis in T helper type 2 cells, eosinophils, and basophils via seven-transmembrane receptor CRTH2. *J Exp Med* 2001; 193: 255–261.
184. Chung KF, Barnes PJ. Cytokines in asthma. *Thorax* 1999; 54: 825–857.
185. Barnes PJ. Cytokines as mediators of chronic asthma. *Am J Resp Crit Care Med* 1994; 150: S42–S49.
186. Wills-Karp M. IL-12/IL-13 axis in allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2001 Jan; 107(1): 9-18.

187. Borish LC, Nelson HS, Corren J. et al. Efficacy of soluble IL-4 receptor for the treatment of adults with asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2001; 107: 963–970.
188. Greenfeder S, Umland SP, Cuss FM, Chapman RW, Egan RW. The role of interleukin-5 in allergic eosinophilic disease. *Respir Res* 2001; 2: 71–79.
189. Levitt RC, McLane MP, MacDonald D. et al. IL-9 pathway in asthma: new therapeutic targets for allergic inflammatory disorders. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103: S485–S491.
190. Zhou Y, McLane M, Levitt RC. Interleukin-9 as a therapeutic target for asthma. *Respir Res* 2001; 2: 80–84.
191. Kips JC, Tavernier JH, Joos GF, Peleman RA, Pauwels RA. The potential role of tumor necrosis factor α in asthma. *Clin Exp Allergy* 1993; 23: 247–250.
192. Thomas PS, Yates DH, Barnes PJ. Tumor necrosis factor- α increases airway responsiveness and sputum neutrophils in normal human subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152: 76–80.
193. Rossi D, Zlotnik A. The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 217–242.

194. Gutierrez-Ramos JC, Lloyd C, Gonzalo JA. Eotaxin: from an eosinophilic chemokine to a major regulator of allergic reactions. *Immunol Today* 1999; 20: 500–504.
195. Ying S, Robinson DS, Meng Q. et al. Enhanced expression of eotaxin and CCR3 mRNA and protein in atopic asthma. Association with airway hyperresponsiveness and predominant co-localization of eotaxin mRNA to bronchial epithelial and endothelial cells. *Eur J Immunol* 1997; 27: 3507–3516.
196. Ying S, Meng Q, Zeibecoglou K. et al. Eosinophil chemotactic chemokines (eotaxin, eotaxin-2, RANTES, monocyte chemoattractant protein-3 (MCP-3), and MCP-4), and C-C chemokine receptor 3 expression in bronchial biopsies from atopic and nonatopic (Intrinsic) asthmatics. *J Immunol* 1999; 163: 6321–6329.
197. Sabroe I, Peck MJ, Van Keulen BJ. et al. A small molecule antagonist of chemokine receptors CCR1 and CCR3. Potent inhibition of eosinophil function and CCR3-mediated HIV-1 entry. *J Biol Chem* 2000; 275: 25985–25992.
198. White JR, Lee JM, Dede K. et al. Identification of potent, selective non-peptide CC chemokine receptor-3 antagonist that

- inhibits eotaxin-, eotaxin-2-, and monocyte chemoattractant protein-4-induced eosinophil migration. *J Biol Chem* 2000; 275: 36626–36631.
199. Gonzalo JA, Lloyd CM, Kremer L. *et al.* Eosinophil recruitment to the lung in a murine model of allergic inflammation. The role of T cells, chemokines, and adhesion receptors. *J Clin Invest* 1996; 98: 2332–2345.
200. Campbell EM, Charo IF, Kunkel SL. *et al.* Monocyte chemoattractant protein-1 mediates cockroach allergen-induced bronchial hyperreactivity in normal but not CCR2^{-/-} mice: the role of mast cells. *J Immunol* 1999; 163: 2160–2167.
201. Holgate ST. Cellular and mediator basis of asthma in relationship to natural history. *Lancet* 1997; 35:S115–S119.
202. Rennard, S. I. Repair mechanisms in asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1996; 98: S278-S286.
203. Bousquet, J., P. Chanez, J. Y. Lacoste, R. White, P. Vic, P. Godard, and F. B. Michel. 1992. Asthma: a disease remodeling the airways. *Allergy* 1992; 47: 3-11.
204. Halayko, A. J., and N. L. Stephens. Potential role for phenotypic modulation of bronchial smooth muscle cells in chronic asthma. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 1994; 72: 1448-1457.

205. Noveral, J. P., and M. M. Grunstein. Role and mechanism of thromboxane-induced proliferation of cultured airway smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* 1992; 263: L555-L561.
206. De, S., E. T. Zelazny, J. F. Souhrada, and M. Souhrada. IL-1 beta and IL-6 induce hyperplasia and hypertrophy of cultured guinea pig airway smooth muscle cells. *J. Appl. Physiol.* 1995; 78: 1555-1563.
207. Noveral, J. P., S. M. Rosenberg, R. A. Anbar, N. A. Pawlowski, and M. M. Grunstein. Role of endothelin-1 in regulating proliferation of cultured rabbit airway smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* 1992; 263: L317-L324.
208. Stewart, A. G., G. Grigoriadis, and T. Harris. Mitogenic actions of endothelin-1 and epidermal growth factor in cultured airway smooth muscle. *Clin. Exp. Pharmacol Physiol* 1994; 21: 277-285.
209. Shiels, I. A., S. D. Bowler, and S. M. Taylor. Airway smooth muscle proliferation in asthma: the potential of vascular leakage to contribute to pathogenesis. *Med. Hypotheses.* 1995; 45: 37-40.
210. John, M., S. J. Hirst, P. J. Jose, A. Robichaud, N. Berkman, C. Witt, C. H. Twort, P. J. Barnes, and K. F. Chung. Human airway smooth muscle cells express and release RANTES in response to T

- helper 1 cytokines: regulation by T helper 2 cytokines and corticosteroids. *J. Immunol.* 1997; 158: 1841-1847.
211. Hirst, S. J.. Airway smooth muscle cell culture: application to studies of airway wall remodelling and phenotype plasticity in asthma. *Eur. Respir. J.* 1996; 9: 808-820.
212. Dunnill, M., G. Massarella, and J. Anderson. Comparison of the quantitative anatomy of the bronchi in normal subjects, in status asthmaticus, in chronic bronchitis, and in emphysema. *Thorax* 1969; 24: 176-179.
213. Carroll, N., J. Elliot, A. Morton, and A. James. The structure of large and small airways in nonfatal and fatal asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1993; 147: 405-410.
214. Dunnill, M.. The pathology of asthma with special references of changes in the bronchial mucosa. *J. Clin. Pathol.* 1960; 13: 27-33.
215. Cluroe, A., L. Holloway, K. Thomson, G. Purdie, and R. Beasley. Bronchial gland duct ectasia in fatal bronchial asthma: association with interstitial emphysema. *J. Clin. Pathol.* 1989; 42: 1026-1031.

216. Cluroe, A. D., R. Beasley, S. Lorimer, and L. Holloway. The relationship between pulmonary interstitial emphysema and clinical features in fatal asthma. *J. Asthma* 1994; 31: 65-69.
217. Reid, L. M.. The presence or absence of bronchial mucus in fatal asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1987; 80: 415-416.
218. Pavia, D., J. R. Bateman, N. F. Sheahan, J. E. Agnew, and S. W. Clarke. Tracheobronchial mucociliary clearance in asthma: impairment during remission. *Thorax* 1985; 40: 171-175.
219. Cutz, E., H. Levison, and D. M. Cooper. Ultrastructure of airways in children with asthma. *Histopathology* 1978; 2: 407-421.
220. Roche, W. R., R. Beasley, J. H. Williams, and S. T. Holgate. 1989. Subepithelial fibrosis in the bronchi of asthmatics. *Lancet* 1989; 1: 520-524.
221. Brewster, C. E., P. H. Howarth, R. Djukanovic, J. Wilson, S. T. Holgate, and W. R. Roche. 1990. Myofibroblasts and subepithelial fibrosis in bronchial asthma. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1990; 3: 507-511.
222. Jeffery, P. K., A. J. Wardlaw, F. C. Nelson, J. V. Collins, and A. B. Kay. Bronchial biopsies in asthma: an ultrastructural,

- quantitative study and correlation with hyperreactivity. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1989; 140: 1745-1753.
223. Saetta, M., P. Maestrelli, A. Di Stefano, N. De Marzo, G. F. Milani, F. Pivrotto, C. E. Mapp, and L. M. Fabbri. Effect of cessation of exposure to toluene diisocyanate (TDI) on bronchial mucosa of subjects with TDI-induced asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1992; 145: 169-174.
224. Battegay, E. J. 1995. Angiogenesis: mechanistic insights, neovascular diseases, and therapeutic prospects. *J. Mol. Med.* 1995; 73: 333-346.
225. Beck, L. Jr., and P. D'Amore. 1997. Vascular development: cellular and molecular regulation. *FASEB J.* 1997; 11: 365-373.
226. Brown, L. F., M. Detmar, K. Claffey, J. A. Nagy, D. Feng, A. M. Dvorak, and H. F. Dvorak.. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a multifunctional angiogenic cytokine. *J. Histochem. Cytochem.* 1997; 79: 233-269.
227. Raghow, R. The role of extracellular matrix in postinflammatory wound healing and fibrosis. *FASEB J.* 1994; 8: 823-831.

228. McGowan, S. E. Extracellular matrix and the regulation of lung development and repair. *FASEB J.* 1992; 6: 2895-2904.
229. Goldring, K., and J. A. Warner. Cell matrix interactions in asthma. *Clin. Exp. Allergy* 1997; 27: 22-27.
230. Van der Rest, M., and R. Garrone. Collagen family of proteins. *FASEB J.* 1991; 5: 2814-2823.
231. Wilson, J., and X. Li. The measurement of reticular basement membrane and submucosal collagen in the asthmatic airway. *Clin. Exp. Allergy* 1997; 27: 363-371.
232. Taipale, J., and J. Keski-Oja. Growth factors in the extracellular matrix. *FASEB J.* 1997; 11: 51-59.
233. Ohno, I., R. G. Lea, K. C. Flanders, D. A. Clark, D. Banwatt, J. Dolovich, J. Denburg, C. B. Harley, J. Gauldie, and M. Jordana. Eosinophils in chronically inflamed human upper airway tissues express transforming growth factor beta 1 gene (TGF beta 1). *J. Clin. Invest.* 1992; 89: 1662-1668.
234. Border, W., and N. Noble. Transforming growth factor β in tissue fibrosis. *N. Engl. J. Med.* 1994; 331: 1286-1292.
235. Ross, R. et al. Platelet-derived growth factor. *Lancet* 1989; 1: 1179-1182.
236. Heldin, C. H. et al Structural and functional studies on platelet-derived growth factor. *EMBO J.* 1992; 11: 4251-4259.

237. Cade, J. et al Lung mechanics during provocation of asthma. Clin. Sci. 1971; 40: 381-386.
238. Colebatch, H., K. Finucane, and M. Smith. Pulmonary conductance and elastic recoil in asthma and emphysema. J. Appl. Physiol. 1973; 34: 143-153.
239. McCarthy, D. S., and M. Sigurdson. Lung elastic recoil and reduced airflow in clinically stable asthma. Thorax 1980; 35: 298-302.
240. Woolcock, A., and J. Read. The static elastic properties of the lung in asthma. Am. Rev. Respir. Dis. 1968; 98: 788-794.
241. Zapletal, A., K. J. Desmond, D. Demizio, and A. L. Coates. Lung recoil and the determination of airflow limitation in cystic fibrosis and asthma. Pediatr. Pulmonol. 1993; 15: 13-18.
242. Brown, P. J., H. W. Greville, and K. E. Finucane. Asthma and irreversible airflow obstruction. Thorax 1984; 39: 131-136.
243. Greenough, A., B. G. Loftus, J. Pool, and J. F. Price. Abnormalities of lung mechanics in young asthmatic children. Thorax 1987; 42: 500-505.
244. Connolly, M. J., A. J. Avery, E. H. Walters, and D. J. Hendrick. The relationship between bronchial responsiveness to methacholine

- and bronchial responsiveness to histamine in asthmatic subjects. *Pulm. Pharmacol.* 1988; 1: 53-58.
245. Boulet, L. P., H. Turcotte, and A. Brochu. 1994. Persistence of airway obstruction and hyperresponsiveness in subjects with asthma remission. *Chest* 105: 1024-1031.
246. Hudon C, Turcotte H, Laviolette M, Carrier G, Boulet LP. Characteristics of bronchial asthma with incomplete reversibility of airflow obstruction. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 1997 Feb; 78(2): 195-202.
247. Herbut PA, Clerf LH. Cytology of bronchial secretions: a diagnostic aid in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Am Rev Tuberc* 1946; 54:488-494
248. Bigby TD, Margolskee D, Curtis JL, et al. The usefulness of induced sputum in the diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *Am Rev Respir Dis* 1986;133:515-518
249. Pin I, Gibson PG, Kolendowicz R et al. Use of induced sputum cell counts to investigate airway inflammation in asthma. *Thorax* 1992; 47:25-29

250. Fahy JV, Liu J, Wong H. Cellular and biochemical analysis of induced sputum from asthmatic and from healthy subjects. *Am Rev Respir Dis* 1993;147:1126-1131
251. van't Veer JCCM, de Grouw HWFM, et al. Repeatability of cellular and soluble markers of inflammation in induced sputum from patients with asthma. *Eur Respir J* 1996;9:2441-2447
252. Keatings VM, Collins PD, Scott DM, Barnes PJ. Differences in IL-8 and TNF in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153:530-534
253. Gelder CM, Thomas PS, Yates DH et al. Cytokine expression in normal, atopic, and asthmatic subjects using combination of sputum induction and the polymerase chain reaction. *Thorax* 1995;50:1033-1037
254. Gershman NH, Wong HH, Liu JT, et al. Comparison of two methods of collecting induced sputum in asthmatic subjects. *Eur Respir J* 1996;9:2448-2453
255. Pizzichini E, Pizzichini MM, Efthimiadis A, Hargreave FE et al. Measurement of inflammatory indices in induced sputum: effects

- on selection of sputum to minimize salivary contamination. *Eur Respir J* 1996;9:1174-118
256. te Brinke Annete, de Lange Cindy, Bel Elisabeth. Sputum induction in severe asthma by a standardized protocol. Predictors of excessive bronchoconstriction. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:749-753
257. Pin I, Radford S, Kolendowicz R et al. Airway inflammation in symptomatic and asymptomatic children with metacholine hyperresponsiveness. *Eur Respir J* 1993;6:1249-1256
258. Jones P, Hankin R, Simpson J et al. The tolerability, safety and success of sputum induction and combined hypertonic saline challenge in children. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164(7):1146-1149
259. Twaddell SH, Gibson PG, Carty KL, et al. Assessment of airway inflammation in children with acute asthma using induced sputum. *Eur Respir J* 1996;9:2104-2108
260. Covar R, Spahn J, Martin R et al. Safety and application of induced sputum analysis in childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2004;9:575-582).

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΣΚΟΠΟΣ

Αν και τόσο το παιδικό, όσο και το ενήλικο άσθμα μοιράζονται παρόμοιους παθογενετικούς μηχανισμούς, υπάρχουν επιδημιολογικά και κλινικά χαρακτηριστικά που προτείνουν ότι η φλεγμονή των αεραγωγών στις δυο ηλικιακές ομάδες πιθανόν να είναι διαφορετική.^{2, 3} Περισσότερα από 50% των παιδιών με άσθμα πάσχουν από άσθμα και στην ενήλικο ζωή τους.¹ Παρόλο που πολλές μελέτες έχουν γίνει στο ήπιο επίμονο παιδικό άσθμα και στη μετάβασή του σε ενήλικο, η εξέλιξη της νόσου σε κάθε ασθενή δεν είναι προβλέψιμη.² Το άσθμα που ξεκινάει στην ενήλικη ζωή, φαίνεται να διαφέρει από το παιδικό άσθμα που υποτροπιάζει στην ενήλικο ζωή, όσο αφορά το φύλο, τη σοβαρότητα των συμπτωμάτων, την πνευμονική λειτουργία, την επίπτωση και τα χαρακτηριστικά της ατοπίας.⁴ Η ασθματική φλεγμονώδης απάντηση στους ενήλικες φαίνεται να ρυθμίζεται από τα CD4+ type 2 λεμφοκύτταρα (Th2).⁵ Τα μαστοκύτταρα, τα ηωσινόφιλα παίζουν επίσης σημαντικό ρόλο.⁵ Υποθέσαμε ότι συγκρίνοντας τη φλεγμονή των αεραγωγών στα παιδιά και σε ενήλικες με ίδια βαρύτητα και διάρκεια νόσου, θα διασαφηνιστεί αν το παιδικό άσθμα και το άσθμα με έναρξη στην ενήλικο ζωή είναι δυο όμοιες ή διαφορετικές οντότητες.

Σκοπός της παρούσης μελέτης ήταν να περιγράψει τις διαφορές στους φλεγμονώδεις παράγοντες στις εκκρίσεις αεραγωγών παιδιών και ενηλίκων

με ήπιο επίμονο άσθμα και με ίδια διάρκεια νόσου και να επιβεβαιώσει την ασφάλεια της μεθόδου πρόκλησης πτυέλου στα παιδιά με άσθμα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2
ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Ασθενείς

Συνολικά 47 ασθενείς εισήχθησαν στην μελέτη από το Τακτικό παιδιατρικό και πνευμονολογικό Ιατρείο του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου. Η διάγνωση του άσθματος είχε τεθεί από το ιστορικό των επαναλαμβανόμενων επεισοδίων βρογχίτιδας, αναπνευστικής δυσχέρειας, και την προηγούμενη διάγνωση από Πνευμονολόγο ή Παιδίατρο, σύμφωνα με τα κριτήρια του Διεθνούς Ινστιτούτου Καρδιάς, Πνεύμονα και Αίματος.¹

Η βαρύτητα του άσθματος προσδιοριζόταν με βάση:

1. το προηγούμενο ιατρικό ιστορικό του ασθενούς που αφορούσε το άσθμα
2. την ημερήσια καταγραφή των συμπτωμάτων
3. την σπιρομέτρηση ¹

Ο πληθυσμός της μελέτης περιελάμβανε μια ομάδα ενήλικων ασθματικών, με έναρξη της νόσου στην ενήλικη ζωή και μια ομάδα παιδιών με άσθμα. Η έναρξη του άσθματος σε όλους τους ενήλικες ασθενείς ήταν μετά την ηλικία των 15 χρόνων και αυτό ήταν επαρκώς επιβεβαιωμένο από τον ιατρικό φάκελο του κάθε ασθενούς, ότι δηλαδή δεν έπασχαν από άσθμα κατά την παιδική τους ηλικία, δεν είχαν παρουσιάσει βρογχολίτιδα ή κρίση

βρογχικού άσθματος, ούτε είχαν χρησιμοποιήσει κορτικοειδή εισπνεόμενα ή από το στόμα, ούτε βραχείας ή μακράς δράσης β_2 διεγέρτες πριν από την ηλικία των 15 χρόνων. Η πρώτη αυτή ομάδα (ομάδα 1) αποτελούνταν από 32 ασθενείς με μέση ηλικία 42.8 έτη και η δεύτερη ομάδα (ομάδα 2) αποτελούνταν από 15 παιδιά, μέσης ηλικίας τα 11.7 έτη.

Τα απαραίτητα κριτήρια που έπρεπε να πληρούν οι ασθματικοί ασθενείς για να συμπεριληφθούν στην ομάδα των ασθματικών ήταν :

1. Μη καπνιστές, με ιστορικό άσθματος διαγνωσμένο από ειδικό
2. αύξηση της $FEV_1 \geq 12\%$ της προβλεπόμενης τιμής μετά από χορήγηση 400 μ g σαλβουταμόλης .

Όλοι οι ασθματικοί ασθενείς ήταν υπό αγωγή με εισπνεόμενα κορτικοστεροειδή καθημερινά σε δόση η οποία κυμαινόταν από 200-800 μ g βουδεζονίδης ή 100-400 μ g φλουτικαζόνης και βραχείας δράσης β_2 διεγέρτες χρησιμοποιούμενοι κατ'επίκληση.

Όλοι οι ασθενείς είχαν ίδια διάρκεια νόσου.

Κανείς από τους ασθενείς δεν λάμβανε μακράς δράσης β_2 διεγέρτες, αντιχολινεργικά ή θεοφυλλίνη ή κορτικοειδή από το στόμα και η θεραπεία, εκτός από τη χρήση των βραχείας δράσης β_2 διεγερτών, ήταν σταθερή τουλάχιστον ένα μήνα πριν την ένταξη τους στη μελέτη. Επιπρόσθετα δεν

υπήρχε ιστορικό λοίμωξης του αναπνευστικού έξι εβδομάδες πριν την ένταξή τους στην μελέτη.

Τα κριτήρια αποκλεισμού ασθενούς από τη μελέτη ήταν:

1. ασθενής με ενεργό πνευμονικό νόσημα διαφορετικό από το άσθμα
2. ασθενής με ιστορικό καρκίνου
3. ασθενής υπό ανοσοκατασταλτικά φάρμακα, εκτός των κορτικοστεροειδών
4. ασθενής υπό χρόνια οξυγονοθεραπεία
5. ασθενής με πνευματική καθυστέρηση
6. εγκυμονούσες

Η μελέτη εγκρίθηκε από την επιστημονική επιτροπή του νοσοκομείου και όλοι οι ασθενείς συναίνεσαν εγγράφως για τη συμμετοχή τους στο ερευνητικό πρόγραμμα.

2.2 Σχεδιασμός Μελέτης

Εξετάσθηκαν 47 ασθματικοί ασθενείς, που προσήλθαν από τα Τακτικά Ιατρεία του ΠΑ.Γ.Ν.Η. Κάθε ασθενής εκπλήρωνε δυο μέρες κλινικής μελέτης. Κατά την πρώτη επίσκεψη, συμπληρωνόταν ένα αναλυτικό ιατρικό ιστορικό. Ακολουθούσε κλινική εξέταση κατά συστήματα, εκτίμηση της πνευμονικής λειτουργίας με σπιρομέτρηση προ και μετά βρογχοδιαστολή

και εκτελούνταν δερματικές δοκιμασίες αλλεργίας (skin prick tests). Κατά τη δεύτερη επίσκεψη, η οποία χρονικά πραγματοποιούταν όχι αργότερα από επτά μέρες από την πρώτη, γινόταν αιμοληψία και πρόκληση πτυέλου. Από την αιμοληψία στέλνονταν δείγματα για γενική αίματος, πλήρη βιοχημικό έλεγχο (για νεφρική, ηπατική λειτουργία) και έλεγχο των ειδικών αλλεργικών αντισωμάτων RAST καθώς και την ολική ανοσοσφαιρίνη IgE.

2.3 Σπυρομέτρηση- πρόκληση πτυέλου

Σύμφωνα με τυποποιημένα κριτήρια και οδηγίες ο κάθε ασθενής υποβαλλόταν σε σπυρομέτρηση προ και μετά βρογχοδιαστολής (MasterLab; 2.12, Jaeger, Wuerzburg, Germany).⁹ Οι ασθενείς δεν χρησιμοποιούσαν τα βραχεία δράσης βρογχοδιασταλτικά τους 12 ώρες πριν την εκτίμηση της πνευμονικής τους λειτουργίας και δεν έπιναν τσάι ή καφέ το πρωί της ίδιας μέρας. Τόσο η σπυρομέτρηση, όσο και η πρόκληση πτυέλου, διεξάγονταν στον ίδιο χώρο και την ίδια ώρα, 10.00 το πρωί. Η μέθοδος της πρόκλησης πτυέλων έγινε σε όλα τα άτομα της μελέτης σύμφωνα με τη πρωτόκολλο που περιγράφεται από τη διεθνή βιβλιογραφία.¹⁰ Το πρώτο στάδιο ήταν η εκτίμηση της πνευμονικής λειτουργίας με τη σπυρομέτρηση και τη χορήγηση 200mcg σαλβουταμόλης. Στη συνέχεια ο ερευνητής εξηγούσε τη μέθοδο που θα ακολουθούσε και επιδείκνυε τον τρόπο διεξαγωγής, δηλαδή τον

τρόπο που ο ασθενής θα έπρεπε να καθαρίσει το στόμα του, να φυσήξει τη μύτη και να φτύσει το δείγμα στο δοχείο.

Στη συνέχεια χορηγούνταν νεφελοποιούμενο διάλυμα NaCl αρχικής συγκέντρωσης 3 % για 7 λεπτά. Η νεφελοποίηση του αλατούχου διαλύματος γινόταν με τη βοήθεια νεφελοποιητή υπερήχων (Ultra-neb; Devilbiss Health Care Inc, Somerset, PA, USA). Μετά από αυτό το στάδιο εκ νέου γινόταν σπιρομέτρηση στον ασθενή. Σε περίπτωση που παρουσιαζόταν πτώση της $FEV_1 > 10\%$ της προηγούμενης τιμής του ασθενούς, η διαδικασία διακοπτόταν. Σε αντίθετη περίπτωση, αφού γινόταν η λήψη των πτυέλων προχωρούσαμε στη χορήγηση διαλύματος NaCl συγκέντρωσης 4 % για 7 ακόμα λεπτά για τη λήψη του δεύτερου δείγματος πτυέλων. Στη συνέχεια γινόταν τρίτος σπιρομετρικός έλεγχος όπου επί πτώσης της $FEV_1 > 20\%$ μετά βρογχοδιαστολής τιμής, θα έπρεπε να διακοπεί η διαδικασία.

Η διαδικασία επαναλαμβανόταν με αυξανόμενη συγκέντρωση άλατος μέχρι τελικής συγκεντρώσεως 5% καθώς και συνεχή σπιρομετρικό έλεγχο. Καμία ανεπιθύμητη αντίδραση ασθενούς δεν παρατηρήθηκε και όλοι οι ασθματικοί ασθενείς και τα άτομα της ομάδας ελέγχου ολοκλήρωσαν τη διαδικασία με επιτυχία.

2.4 Επεξεργασία πτυέλου

Η επεξεργασία του πτυέλου γινόταν μέσα σε 15 λεπτά μετά το τέλος της διαδικασίας πρόκλησης.

Ακολουθούσε διαχωρισμός των ορατών βυσμάτων του πτυέλου από τη σίελο, όπως έχει ήδη περιγραφεί.¹⁰ Ακολουθούσε ζύγιση των βυσμάτων και ετοιμαζόταν το διάλυμα της διθιοτρεϊτόλης σε διάλυση 1: 10 με αποστειρωμένο νερό, σύμφωνα με τις οδηγίες των κατασκευαστών (DTT, Sputolysine; Calbiochem Corp, San Diego, CA, USA).

Στο δείγμα του ασθενούς προσθέταμε όγκο του διαλύματος διπλάσιο του βάρους των βυσμάτων. Τα δείγματα στη συνέχεια ομογενοποιούνταν για 30 δευτερόλεπτα σε ένα σωλήνα των 50ml με επικάλυψη πολυπροπυλενίου, ειδικού για κυτταρικές καλλιέργειες και τοποθετούνταν σε υδατόλουτρο για 15 λεπτά στους 37° C για να ολοκληρωθεί η ομογενοποίηση.

Το πτύελο στη συνέχεια διαλυόταν περαιτέρω με ρυθμιστικό διάλυμα Dulbecco's phosphate (D-PBS) σε όγκο ίσο με τον όγκο το πτυέλου και του DTT. Μετά το φιλτράραμε διαμέσου ειδικού φίλτρου 48μm διάμετρο (Thompson, Ontario, Canada), ώστε να απομακρυνθούν πιθανά υπόλοιπες προσμίξεις.

Ακολουθούσε εκατοστιαία μέτρηση κυττάρων και γινόταν έλεγχος της ζωτικότητας των κυττάρων με τη μέθοδο αποκλεισμού με trypan blue.

Τα δείγματα επαναδιαλύονταν στην αρχική συγκέντρωση. Στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν σε 400g στροφές για 5 λεπτά και απαναδιαλύθηκαν με 500μl RPMI-1640 + 10% fetal calf serum (FCS).

Το υπερκείμενο διάλυμα αναρροφάται και φυλάσσεται σε eppendorfs cups στους -80°C για περαιτέρω ανάλυση.

Τα κύτταρα διαλύονταν με τρόπο ώστε να επιτευχθεί συγκέντρωση 0.75×10^6 κυττάρων/ ml. Χρησιμοποιώντας 50μl του διαλύματος με τα κύτταρα, στην κυτταροφυγόκεντρο, στρώθηκαν ειδικές super frost plus αντικειμενοφόρους πλάκες.

Δυο από τις παραπάνω βάφτηκαν με May Grunwald Giemsa για εκατοστιαία μέτρηση κυττάρων. Η εκατοστιαία μέτρηση κυττάρων γίνεται με τη μέτρηση 500 εμπύρηνων μη επιθηλιακών κυττάρων τυφλά, από δυο διαφορετικούς ερευνητές. Για ανάλυση χρησιμοποιήθηκε ο μέσος όρος των τιμών. Μετρήσιμα θεωρήθηκαν τα δείγματα εκείνα που η πρόσμιξη σιέλου ήταν χαμηλή (<20% πλακώδη επιθηλιακά κύτταρα) και η ζωτικότητα των κυττάρων ήταν > 75%. Τέλος 300μl δείγματος επεξεργάστηκε για κυτταρομετρία ροής.

2.5 Κυτταρομετρία Ροής

Τα δείγματα προετοιμασμένα, όπως αναφέρεται παραπάνω, αναλύθηκαν με τη μέθοδο Epics Elite (Coultronics, Louton, United Kingdom) fluorescence activated κυτταρομετρία ροής, όπως έχει ήδη περιγραφεί¹¹.

Εν συντομία τα λεμφοκύτταρα were tightly gated by volume and complexity on a forward, and side light scattering mode and by CD45+ expression (pan leukocyte marker). Τουλάχιστον 10^5 κύτταρα αναλύθηκαν σε κάθε περίπτωση. Επίσης χρησιμοποιήθηκε το απαραίτητο αντίσωμα ελέγχου.

Μετρήθηκαν τα ποσοστά ένα, δύο και τριών θετικών σε ειδική χρώση κυττάρων. Χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω μονοκλωνικά αντί-ανθρώπινα αντισώματα από ποντίκι, για το labeling sputum των κυττάρων του πτυέλου, προμηθευμένα από την Immunotech (Marseille, France): Phycocyanate (Pcy-5) conjugated anti- CD45+, phycoerythrin (PE) conjugated anti- CD3+, fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugated anti- CD4+, PE conjugated anti- CD25+ and FITC- conjugated anti- CD8+. Χρησιμοποιήθηκαν ως αντισώματα ελέγχου mouse anti-mouse isotype matched FITC-, PE-, or Pcy-5-conjugated immunoglobulins.

2.6 Μετρήσεις διαλυτών παραγόντων στο Υπερκείμενο

Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) για τη μέτρηση της IL-8, GM-CSF (Immunotech. Marseille, France). Για την IL-8 η ευαισθησία της μεθόδου ήταν 8pg/gr, με intra-assay- CV of 2-5% και inter- assay- CV of 7-10%. Για τον GM-CSF η ευαισθησία ήταν 5 pg/gr, με intra- CV of 3% και inter- assay- CV of 4-13%. Η ECP μετρήθηκε με IniCap Fluoroenzymeimmunoassay (ArtNo. 10-9261-01, Pharmacia. Uppsala, Sweden), με ευαισθησία 0.5μg/gr intra assay- CV of 2-3% και g inter- assay-CV of 4-5%.

Το διάλυμα της ECP έγινε με 0.2% CTAB. Όλες οι μετρήσεις έγιναν δυο φορές για κάθε δείγμα και για τα αποτελέσματα έγινε ο μέσος όρος.

Η μέση intra-sample ήταν πάντα <4%. Για την εφαρμογή των παραπάνω μεθόδων ακολουθήθηκαν οι οδηγίες της European Respiratory Society.¹²

Η ακρίβεια της μεθόδου μέτρησης των ECP, IL8 και GM-CSF, ως spiking recovery of ECP, IL-8 and GM-CSF, διαπιστώθηκε προσθέτοντας γνωστή ποσότητα κεκαθαρμένου παράγοντα σε τυχαία δείγματα πτυέλου. Γνωρίζοντας ότι η recovery ίσως να διαφέρει μεταξύ των ασθενών, λόγω διαφορών σε παράγοντες στο πτύελο που αλληλεπιδρούν, χρησιμοποιήθηκαν πτύλα από ασθενείς της ομάδας 1, με παιδικό άσθμα (n=5) και από την ομάδα 2, με άσθμα ενηλίκων (n=5). Η αναμενόμενη συγκέντρωση των spiked mediators, υποθέτοντας recovery 100%, ήταν στο

μέσο της καμπύλης, που χρησιμοποιήθηκε για σταντάρισμα. Η spiking recovery για κάθε mediator υπολογίστηκε ως ποσοστό της προβλεπόμενης τιμής, η οποία ήταν το άθροισμα των κεκαθαρμένων spiked mediators και της συγκέντρωσης των mediator στο πρότυπο δείγμα πτυέλου. Τα πειράματα που έγιναν για τη μελέτη της ακρίβειας της μεθόδου, έδειξαν καλή recovery (mean>80%) για όλους τους mediators.

2.7 Στατιστική ανάλυση

Τα δεδομένα παρουσιάστηκαν ως mean \pm SD για τις κανονικές και ως median (range) για τις μη κανονικά κατανεμημένες μεταβλητές. Η κανονικότητα ελέγχτηκε με τη δοκιμασία Shapiro-Wilk. Οι διαφορές μεταξύ των δυο ομάδων βρέθηκε με τη μέθοδο Mann-Whitney για μη κανονικές κατανομές και με το t-test για τις κανονικές κατανομές.

Συσχετίσεις έγιναν με τη μέθοδο Spearman's-Rho για μη κανονικές και την Pearson για κανονικά κατανεμημένες κατανομές.

Το στατιστικό υπολογιστικό πρόγραμμα StatsDirect 2,2,12 (Camcode Cambridge, UK, 2003) χρησιμοποιήθηκε για ολόκληρη τη μελέτη. Η τιμή της $p < 0.05$ θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Κλινικά και δημογραφικά χαρακτηριστικά των ασθενών μελέτης

Τρία από τα 15 (20%) παιδιά και έξι από τους 32 (19%) ενήλικες ήταν αδύνατο να παράγουν ικανοποιητικό πτύελο (όπως ορίζεται με βάση την κυτταρική σύσταση σε <20% πλακώδη επιθηλιακά κύτταρα).

Τα δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών της μελέτης φαίνονται στον πίνακα 1.

Η ομάδα των ασθενών με το άσθμα έναρξης στην ενήλικη ζωή, είχαν χαμηλότερες τιμές FEV1 σε σύγκριση με την ομάδα των παιδιών με άσθμα, αλλά η διαφορά αυτή δεν ήταν στατιστικά σημαντική.

Οι δυο ομάδες δεν διέφεραν όσον αφορά το φύλο, τη θεραπεία με εισπνεόμενα στεροειδή, την κατάσταση ατοπίας ή τη διάρκεια της νόσου (διάρκεια (\pm SD) στα παιδιά 7.6 ± 3.6 χρόνια, στους ενήλικες 7.9 ± 5.9 χρόνια, $p<0.05$).

Η μέθοδος πρόκλησης πτυέλου ήταν πολύ καλά ανεκτή από όλους τους ασθενείς, χωρίς κανένα ανεπιθύμητο συμβάν.

Πίνακας 1: Δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά παιδιών και ενηλίκων με άσθμα

	παιδιά n=12	ενήλικες n=26
Φύλο (M/F)	9/3	9/17
Ηλικία (x±SD)	10±2.9	40.8±2.9*
<u>Διάρκεια νόσου (έτη ηλικίας)</u>	7±4	33±16*
Διάρκεια (x±SD), έτη	7.6±3.6	7.9±5.9 [§]
FEV ₁ (% pred) (x±SD)	97±17	90±19 [§]
ΔFEV ₁ (% of prebronchodilation) (x±SD)	9±7	11±10 [§]
Ατοπία (%)	91	85 [§]
Θεραπεία (% χρήσης)		
<i>B₂ αγωνιστών (βραχείας δράσης)</i>	100	100 [§]
<i>Εισπνεόμενων κορτικοειδών</i>	100	100 [§]

* p< 0.05

[§] p μη σημαντικό

3.2 Κύτταρα στο προκλητό πτύελο

Η ζωτικότητα των κυττάρων στο προκλητό πτύελο δεν διέφερε μεταξύ των ασθματικών παιδιών και ενηλίκων.

Το ποσοστό των πλακωδών επιθηλιακών κυττάρων στην εκατοστιαία μέτρηση κυττάρων ήταν $9 \pm 8\%$ στα παιδιά και $8 \pm 6.5\%$ στους ενήλικες. Ο συνολικός αριθμός κυττάρων και η εκατοστιαία μέτρηση κυττάρων στο προκλητό πτύελο απεικονίζονται στο figure 1.

Παρατηρήθηκε μια τάση για μεγαλύτερο ποσοστό ουδετεροφίλων στους ενήλικες, σε σύγκριση με τα παιδιά, αλλά η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική (44 ± 15 vs. 36 ± 10 , $p=0.10$). Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στο ποσοστό των μακροφάγων, ηωσινοφίλων και λεμφοκυττάρων μεταξύ των δυο ομάδων.

Τα παιδιά είχαν στατιστικά μεγαλύτερο ολικό αριθμό κυττάρων ($\times 10^5$ cells/gr sputum) (\pm SD), συγκριτικά με τους ενήλικες ασθενείς 161 ± 43 vs. 77 ± 10 , $p=0.002$. Αυτό ισχύει και για τον ολικό αριθμό ουδετεροφίλων ($\times 10^5$ cells/gr sputum) (\pm SD) (60 ± 55 vs. 33 ± 23 , $p=0.05$), μακροφάγων (88 ± 93 vs. 38 ± 29 , $p=0.001$), λεμφοκυττάρων (6 ± 8 vs. 2 ± 2 , $p=0.006$), και ηωσινοφίλων (0.07 ± 0.06 vs. 0.03 ± 0.03 , $p=0.006$) (figure 1).

3.3 Κυτταρομετρία ροής

Οι υποπληθυσμοί των T-λεμφοκυττάρων CD4+, CD8+ and CD25+ φαίνονται στην εικόνα 2. Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά CD4+ and CD8+ κύτταρα μεταξύ των ενηλίκων και ασθματικών παιδιών (εικόνα 2). Παρομοίως δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στο πηλίκιο CD4/CD8 ratio ($\bar{x}\pm\text{SD}$) μεταξύ των δυο ηλικιακών ομάδων (4.5 ± 3.1 vs. 3.7 ± 2.2 , $p=0.2$). Το ποσοστό των CD25+ κυττάρων (% of CD3) στα παιδιά βρέθηκε να είναι στατιστικά σημαντικά ψηλότερο σε σύγκριση με τους ενήλικες, $p=0.04$ (εικόνα 2).

3.4 Διαλυτές στο υπερκείμενο κυτταροκίνες

Τα επίπεδα των IL-8, GM-CSF and ECP στο υπερκείμενο του πτυέλου φαίνονται στην εικόνα 3. Στατιστικά σημαντική διαφορά δεν βρέθηκε μεταξύ των δυο ομάδων.

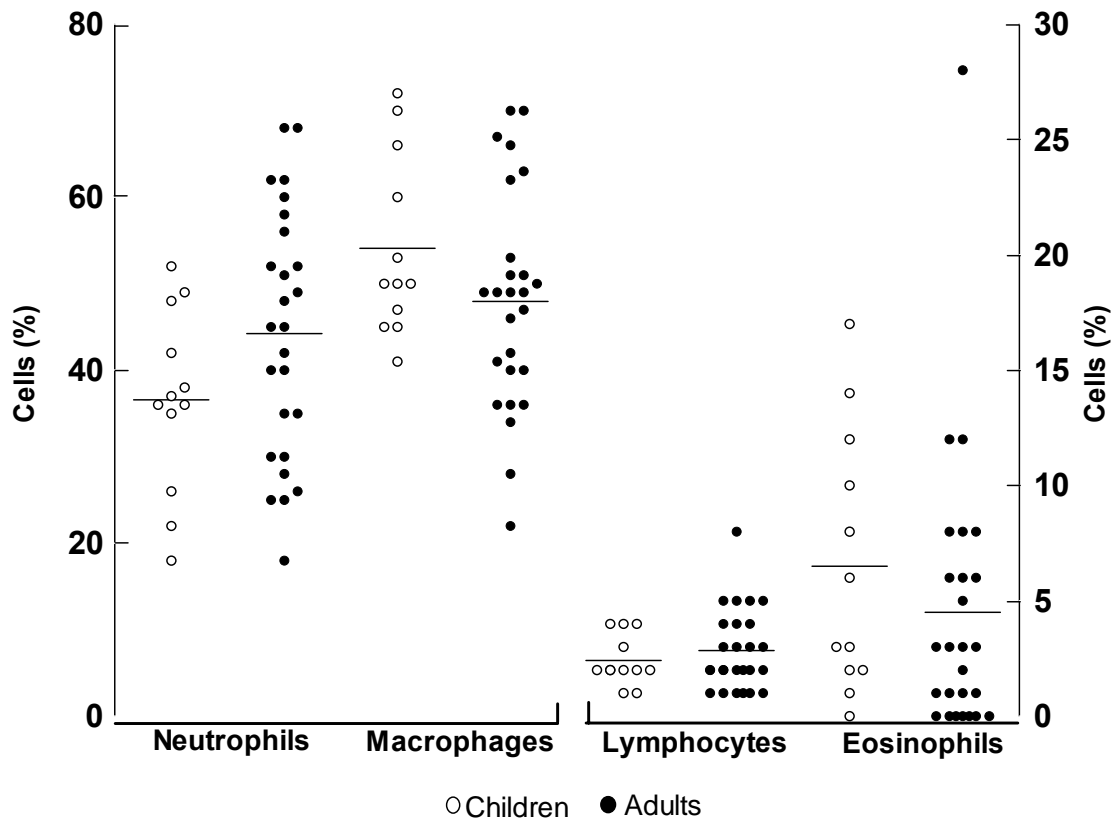
3.5 Συσχετίσεις

Ασθενής αλλά σημαντική συσχέτιση βρέθηκε μεταξύ των επιπέδων της ECP και της FEV1 (% of pred.) ($r=-0.338$, $p=0.04$) στο σύνολο του πληθυσμού της μελέτης (ενήλικες και παιδιά). Όταν όμως εξετάστηκε κάθε ομάδα του πληθυσμού μελέτης ξεχωριστά, η συσχέτιση δεν βρέθηκε να είναι στατιστικά σημαντική.

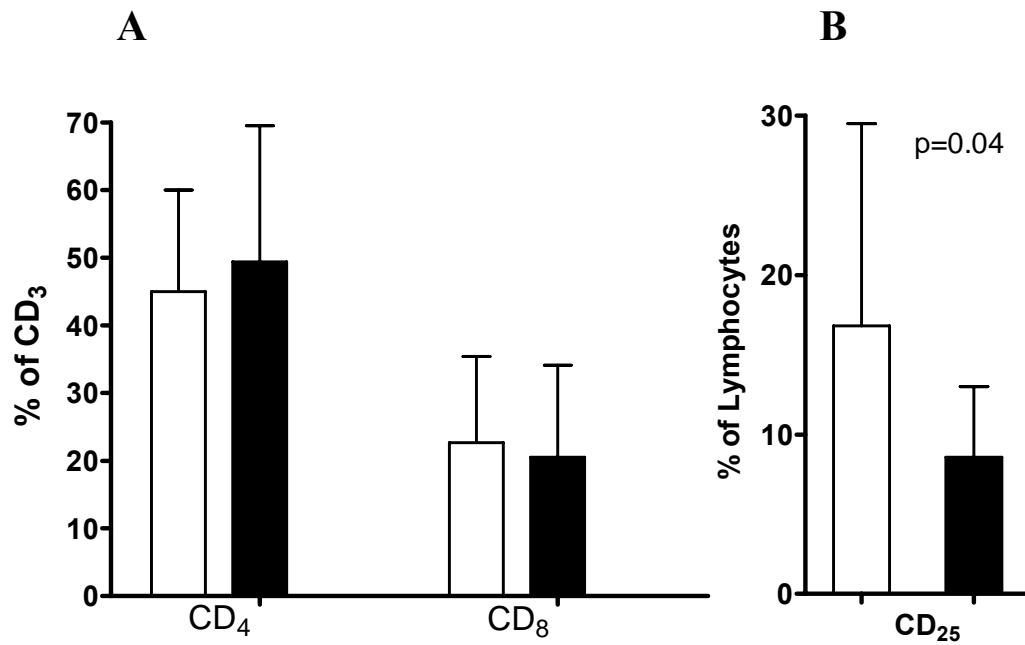
Μόνο στην ομάδα των παιδιών, στατιστικά σημαντική συσχέτιση διαπιστώθηκε μεταξύ των επιπέδων της ECP και του πηλίκου CD4/CD8 ($r=0.631$, $p=0.03$).

Στους ενήλικες, στατιστικά σημαντική συσχέτιση βρέθηκε μεταξύ της διάρκειας της νόσου και της FEV1 (% pred.) ($r=-0.452$, $p=0.02$).

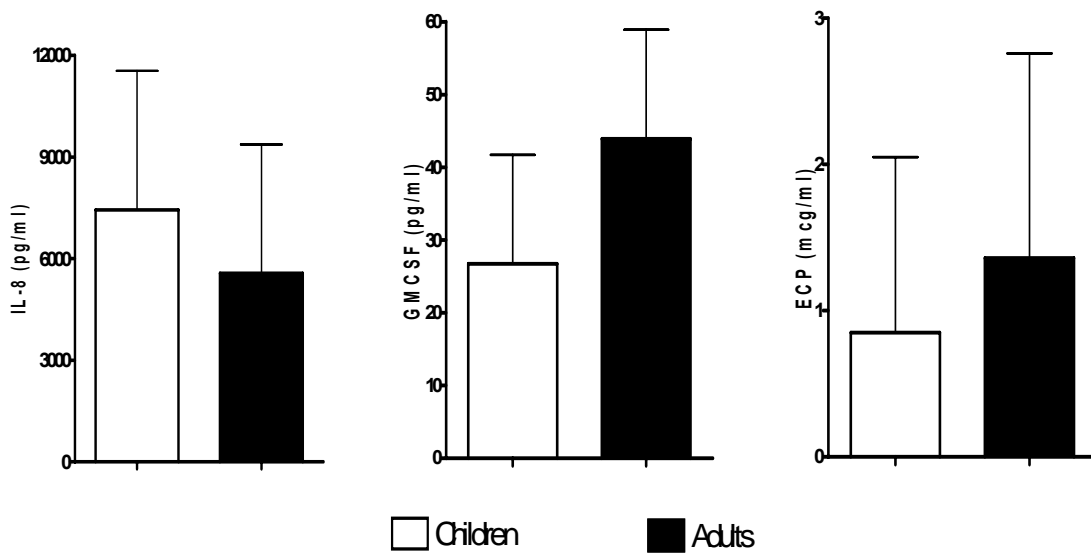
Εικόνα 1: Εκατοστιαία μέτρηση των κυττάρων στο προκλητό πτύελο παιδιών και ενηλίκων με άσθμα.



Εικόνα 2: Υποπληθυσμοί T- λεμφοκυττάρων: (A) CD4+, CD8+, and (B) CD25+, στο παιδικό και ενήλικο άσθμα.



Εικόνα 3: Τα επίπεδα των IL-8, GM-CSF και ECP στο υπερκείμενο του πτυέλου ασθματικών παιδιών και ενηλίκων.



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Το κύριο εύρημα αυτής της μελέτης ήταν ότι τα φλεγμονώδη κύτταρα στο πτύελο, οι υποπληθυσμοί T- λεμφοκυττάρων και οι φλεγμονώδεις κυτταροκίνες, δεν διαφέρουν μεταξύ των ενηλίκων με άσθμα έναρξης στην ενήλικη ζωή και παιδιών με άσθμα. Αυτό μπορεί να σημαίνει οι μηχανισμοί που οδηγούν στη φλεγμονή των αεραγωγών ίσως να ξεκινούν και να συνεχίζουν από την παιδική ηλικία στην ενήλικη ζωή. Αυτό το εύρημα ενισχύει τη χρήση κοινών θεραπευτικών προσεγγίσεων και στις δυο ομάδες. Για το σκοπό αυτό της επιβεβαίωσης των κοινών παθογενετικών μηχανισμών, πρέπει να διεξαχθεί μια μελέτη που να συγκρίνει υποπληθυσμούς κυττάρων και δείχτες φλεγμονώδεις στο πτύελο, μεταξύ δυο ομάδων ενηλίκων ασθματικών, αυτών με έναρξη νόσου στην παιδική ηλικία και αυτών με έναρξη νόσου στην ενήλικη ζωή.

Η φλεγμονή των αεραγωγών στους ενήλικες ασθματικούς έχει διαπιστωθεί ότι είναι απάντηση κυτταροκινών τύπου Th2, που καθοδηγείται από ενεργοποιημένα CD4+ T κυττάρων.¹³ Αν και το άσθμα είναι μια από τις συχνότερες ασθένειες της παιδικής ηλικίας, η παθογένειά του δεν έχει μελετηθεί εκτεταμένα. Στα παιδιά είναι πιο δύσκολο να εφαρμόζονται επεμβατικές μέθοδοι για την λήψη βιοψιών από το πνευμονικό παρέγχυμα, μόνο για ερευνητικούς σκοπούς. Σε μια μελέτη με βρογχικές βιοψίες από παιδιά με δύσκολα ελεγχόμενο άσθμα, δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική

διαφορά όσον αφορά τη διεισδυτικότητα των κυττάρων σε CD4+, IL-5 ή IL-4m RNA+ μεταξύ ασθματικών παιδιών και υγείων.¹⁴ Όμως στην ομάδα των ασθματικών παιδιών, βρέθηκαν στατιστικά σημαντικά αρνητικές συσχετίσεις μεταξύ των CD4+ T λεμφοκυττάρων και της FEV1 και του πηλίκου FEV1/FVC. Σε μια μελέτη με ασθματικά παιδιά και υγιή, οι απόλυτοι αριθμοί των CD4+ και CD8+ T λεμφοκυττάρων στο περιφερικό αίμα δεν διέφεραν μεταξύ τους, αλλά τα αυξημένα ποσοστά μαζί των CD4+ και CD8+ κυττάρων έκφραζαν ενεργούς δείχτες στα ασθματικά παιδιά.¹⁵ Αυτή είναι η πρώτη προσπάθεια για μελέτη των υποπληθυσμών των T-λεμφοκυττάρων με κυτταρομετρία ροής στο προκλητό πτύελο ασθματικών παιδιών. Είναι γνωστό ότι τα λεμφοκύτταρα στο πτύελο αντιπροσωπεύουν μόνο το 2% του συνόλου λευκών αιμοσφαιρίων, μελέτες που έχουν γίνει σε ενήλικες με άσθμα, έχουν δείξει ότι προέχουν τα CD4+ T κύτταρα στο πτύελο αυτών των ασθενών.^{11,16,17} Οι μελέτες που έχουν χρησιμοποιήσει κυτταρομετρία για να μετρήσουν T-λεμφοκύτταρα και τους υποπληθυσμούς τους σε παιδιά με άσθμα είναι περιορισμένες.^{18,19} Η παρούσα μελέτη επιβεβαιώνει το συμπέρασμα της υπεροχής των CD4+ έναντι των CD8+ T-λεμφοκυττάρων στα παιδιά με άσθμα. Η θετική συσχέτιση που βρέθηκε στην παραπάνω ηλικιακή ομάδα, μεταξύ των CD4/CD8 πηλίκου και των επιπέδων της ECP (ένας δείκτης ηωσινοφίλων), μπορεί να σημαίνει την

παρουσία χρόνιας φλεγμονής μεσολαβούμενης από τα CD4+ κύτταρα στο παιδικό άσθμα.

Η μόνη διαφορά που βρέθηκε όσον αφορά τους κυτταρικούς υποπληθυσμούς μεταξύ των δυο ομάδων, ήταν στα CD25+ κύτταρα, όπου στα παιδιά εμφανίζονται σε μεγαλύτερο ποσοστό (figure 2). Τα ρυθμιστικά κύτταρα (CD25+) είναι υποπληθυσμός των CD4+ λεμφοκυττάρων, που αντιπροσωπεύουν περίπου το 5-10% σε φυσιολογικά άτομα, και εκφράζουν τον υποδοχέα της α- αλυσού της IL-2.^{20,21} Τα CD4+CD25+ T κύτταρα πιθανόν παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των T κυττάρων και φαίνεται να ελέγχουν την εξέλιξη αυτοάνοσων νοσημάτων.^{20,21}

Αν και έχει βρεθεί ότι στο περιφερικό αίμα ασθενών με άσθμα, τα CD4+CD25+ κύτταρα είναι αυξημένα, οι Shi και οι συνεργάτες, έδειξαν ότι ο αριθμός των κυκλοφορούντων CD4+CD25+ T κυττάρων σε υγιή άτομα της ομάδας ελέγχου, δεν διέφεραν από αυτόν σε ατοπικά μη άσθματικά ή άσθματικά άτομα.^{22, 23, 24} Παρατήρησαν όμως μια αύξηση των CD4+CD25+ κυττάρων στους άσθματικούς κατά τη διάρκεια των παροξύνσεων του άσθματος, και όχι σε σταθερούς άσθματικούς.²⁴ Οι συγγραφείς καταλήγουν ότι, αν και η λειτουργία των CD4+CD25+ κυττάρων είναι φυσιολογική σε ατοπικούς άσθματικούς, η κατασταλτική τους δράση δεν επαρκεί για να εμποδίσει την εξέλιξη του άσθματος, αλλά

ίσως να είναι ικανή να επηρεάσει την σοβαρότητα των οξέων παροξύνσεων.

20

Υπάρχουν επίσης διάφορες μελέτες που έχουν δείξει πώς τα στεροειδή έχουν την ικανότητα να επιδρούν στη λειτουργία των T κυττάρων και να έχουν δράση στην αντιφλεγμονώδη και ανοσοκατασταλτική τους ικανότητα.

²⁰ Από την άλλη μεριά, σε μια μελέτη του περιφερικού αίματος σε ασθματικά παιδιά, βρέθηκε αυξημένο το ποσοστό των T κυττάρων που έκφραζαν CD25 τόσο σε ατοπικά και μη ατοπικά ασθματικά παιδιά συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου. ¹⁵ Επιπρόσθετα το ποσοστό αυτό των κυττάρων παρουσίαζε σημαντική μείωση μετά τη θεραπεία με εισπνεόμενα κορτικοειδή. ¹⁵ Σύμφωνα με τη μελέτη των Redington και συνεργατών ο υψηλός αριθμός των CD25+ κυττάρων σχετίζεται με επίμονη ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων των αεραγωγών, χωρίς όμως αυτό να σημαίνει και τη συμμετοχή και ενεργοποίηση και άλλων φλεγμονωδών κυττάρων μέσα στους αεραγωγούς. ²⁵ Τα αντικρουόμενα δεδομένα των παραπάνω μελετών δείχνουν ότι ο ρόλος των CD25+ παραμένει ακόμη όχι επαρκώς καθορισμένος και απαιτείται περαιτέρω έρευνα για την αποσαφήνισή του. Στην παρούσα μελέτη, ο αριθμός των CD25+ κυττάρων στα παιδιά ήταν σαφώς αυξημένος, συγκριτικά με τους ενήλικες ασθματικούς. Μια ασφαλής εξήγηση γι' αυτό το εύρημα δεν μπορεί να δοθεί, μια και η μόνη διαφορά

των δυο ομάδων ήταν η ηλικία και ίσως η χρονική διάρκεια έκθεσης σε αλλεργιογόνα.

Το επικρατόν κύτταρο στο πτύελο σε υγιή παιδιά είναι το μακροφάγο και το ανώτερο όριο για τα ηωσινόφιλα του πτυέλου στα παιδιά είναι το 2.5%.^{2,3}

Σε αυτή τη μελέτη βρέθηκε ότι ο συνολικός αριθμός κυττάρων στο πτύελο στα παιδιά ήταν αυξημένος συγκριτικά με τους ενήλικες. Παρόμοια νούμερα του TCC όμως επιβεβαιώνονται και σε άλλες μελέτες.^{26,27,28} Στην παρούσα μελέτη και οι δυο ομάδες μελέτης εμφάνισαν αυξημένο ποσοστό ηωσινοφίλων, ενήλικες (5%) και παιδιά (6.5%), χωρίς όμως να υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δυο ομάδων. Η σχέση μεταξύ της θεραπείας του άσθματος και των ηωσινοφίλων του πτυέλου έχει ερευνηθεί σε αρκετές μελέτες, όπου έχει βρεθεί ότι τα ηωσινόφιλα στο πτύελο ήταν σε μικρότερο ποσοστό σε παιδιά που ήταν υπό αγωγή με εισπνεόμενα κορτικοειδή, σε σχέση με αυτά χωρίς αγωγή.^{29, 30} Παρόλο που και οι δυο ομάδες της μελέτης ήταν υπό αγωγή με εισπνεόμενα κορτικοειδή, με βάση διεθνή οδηγίες, ακόμη παρουσίαζαν αυξημένο ποσοστό των ηωσινοφίλων.

Στο άσθμα τα επίπεδα της ECP στον ορό και στο πτύελο σχετίζονται με τη φλεγμονώδη δραστηριότητα της νόσου και μπορεί να χρησιμοποιηθούν για

τη ρύθμιση και παρακολούθηση της αντιφλεγμονώδους θεραπείας σε παιδιά και ενήλικες με άσθμα.²⁹

Σε αυτή τη μελέτη δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δυο πληθυσμών μελέτης, όσον αφορά τα ηωσινόφιλα και τα επίπεδα της ECP στο πτύελο. Αυτό επιβεβαιώνεται και σε άλλες μελέτες σε παιδιά, όπου τα αποτελέσματα ήταν παρόμοια με αυτά που αναφέρονται σε μελέτες ενηλίκων.^{6,31,32} Επιπρόσθετα, δεν βρέθηκε διαφορά στα επίπεδα των GM-CSF και IL-8 καθώς και στο ποσοστό των ουδετεροφίλων στο πτύελο μεταξύ των δυο ομάδων, που περιλάμβαναν ήπιους ασθματικούς. Στους ενήλικες η ουδετεροφιλική φλεγμονή συμβαίνει σε πιο σοβαρές μορφές άσθματος, αν αυτό ισχυεί και στα παιδιά με σοβαρό άσθμα πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω.

Μια σημαντική αρνητική συσχέτιση βρέθηκε μεταξύ της FEV1 και των επιπέδων της ECP στο πτύελο των ασθενών της μελέτης. Σε μελέτες που έχουν γίνει σε ενήλικες έχει επίσης δείχτει ότι υψηλότερα επίπεδα της ECP στο πτύελο, σχετίζεται με μεγαλύτερη απόφραξη των αεραγωγών (όπως αυτή εκτιμάται με την FEV1).^{29,31,32} Όμως όταν η σχέση αυτή μελετήθηκε ξεχωριστά για κάθε ομάδα μελέτης, η συσχέτιση που βρέθηκε δεν ήταν στατιστικά σημαντική, πιθανόν λόγω του μικρού αριθμού ασθενών. Επιπρόσθετα, η συσχέτιση μεταξύ των σπιρομετρικών μεταβλητών και των

δειχτών φλεγμονής στο παιδικό άσθμα είναι ακόμη αντικρουόμενη. Σε συμφωνία με τη δική μας μελέτη οι Piacentini et al και Wilson et al, που μελέτησαν παιδιά με ήπιο έως μέτριο άσθμα, δεν βρήκαν κάποια συσχέτιση.^{30,33} Αντίθετα, διάφορες εργασίες σε ενήλικες και μια σε εφήβους με σοβαρό άσθμα βρήκαν μια συσχέτιση μεταξύ της πνευμονικής λειτουργίας και των δειχτών φλεγμονής.^{31,34} Μια πιθανή εξήγηση είναι ότι το remodeling των αεραγωγών σχετίζεται με τη χρόνια φλεγμονή των αεραγωγών και συμβαίνει μετά από αρκετό χρόνο. Στην παρούσα μελέτη η μεγαλύτερη πλειοψηφία των παιδιών είχαν ήπια νόσο και περισσότερα από τα 94% από αυτά είχαν FEV1 >81 (% pred.), η οποία είναι σχεδόν σε φυσιολογικά όρια. Έτσι δεν υπήρχε μεγάλη διαβάθμιση στις τιμές της FEV1, ώστε να βρεθεί σημαντική συσχέτιση.^{29,34}

Μια πρόσφατη μελέτη των Zieger και συνεργατών, έδειξε ότι η διάρκεια του άσθματος σχετίζεται με επηρεασμένη πνευμονική λειτουργία στα παιδιά.³⁵ Στην ομάδα των παιδιών της παρούσας μελέτης δεν επιβεβαιώθηκε το συμπέρασμα αυτό. Μια πιθανή εξήγηση είναι ο μικρός αριθμός των ασθενών. Παρολ' αυτά, στην ομάδα των ενηλίκων ασθματικών μια αρνητική συσχέτιση βρέθηκε μεταξύ της διάρκειας της νόσου και της FEV1. Αντίθετα ο Jenkins διαπίστωσε ότι παιδιά και ενήλικες, που η έναρξη του άσθματος

συνέβει στην παιδική ηλικία, σχετίζονταν με τη διάρκεια της νόσου, ενώ αυτό δεν συνέβαινε σε ασθενείς με άσθμα έναρξης στην ενήλικη ζωή.³

Δευτερευόντως η μελέτη αυτή είχε σκοπό να επιβεβαιώσει την ασφάλεια και την καλή ανοχή των ασθματικών παιδιών στη μέθοδο πρόκλησης πτυέλου. Προηγούμενες μελέτες ανέφεραν ποσοστά επιτυχίας 76 έως 100% της πρόκλησης πτυέλου στα παιδιά, συμπεριλαμβανομένων και των ασθματικών.^{9,26} Στην παρούσα μελέτη 100% των ασθματικών παιδιών ανέχτηκαν πολύ καλά τη διαδικασία και κατάλληλα για ανάλυση δείγματα έδωσαν το 82% των ενηλίκων ασθενών και το 80% των παιδιών ηλικίας από 6 έως 15 χρόνων. Επιβεβαιώνεται με τη μελέτη αυτή ότι η μέθοδος πρόκλησης πτυέλου είναι εύκολη στη διεξαγωγή της, μη επεμβατική και ασφαλής μέθοδος μελέτης της φλεγμονής των αεραγωγών σε παιδιά ηλικίας πάνω από 6 χρόνων.

Συμπερασματικά, τα κύτταρα στο προκλητό πτύελο και οι διαλυτές κυτταροκίνες που μελετήθηκαν σε παιδιά με ήπιο επίμονο άσθμα δεν διέφεραν από τους ενήλικες με άσθμα ίδιας βαρύτητας. Αν η μελέτη αυτών των δειχτών φλεγμονής συνεισφέρει στην κλινική παρακολούθηση του παιδικού άσθματος παραμένει να ερευνηθεί σε μεγαλύτερες μελέτες.

Επιπλέον η παρούσα μελέτη επιβεβαίωσε ότι η πρόκληση πτυέλου είναι χρήσιμη μέθοδος για τη μελέτη της φλεγμονής των αεραγωγών στο παιδικό άσθμα και στο άσθμα ενηλίκων, με ασφάλεια και επιτυχία.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Von Mutius E. Presentation of new GINA guidelines for paediatrics. The Global Initiative on Asthma. Clin Exp Allergy 2000; 30 Suppl 1:6-10
2. Gerritsen J. Follow-up studies of asthma from childhood to adulthood. Paediatr Respir Rev 2002; 3:184-192
3. Jenkins HA, Cherniack R, Szeffler SJ, et al. A comparison of the clinical characteristics of children and adults with severe asthma. Chest 2003; 124:1318-1324
4. Segala C, Priol G, Soussan D, et al. Asthma in adults: comparison of adult-onset asthma with childhood-onset asthma relapsing in adulthood. Allergy 2000; 55:634-640
5. Holgate ST. The inflammation-repair cycle in asthma: the pivotal role of the airway epithelium. Clin Exp Allergy 1998; 28 Suppl 5:97-103
6. La Grutta S, Gagliardo R, Mirabella F, et al. Clinical and biological heterogeneity in children with moderate asthma. Am J Respir Crit Care Med 2003; 167:1490-1495
7. Bel EH. Clinical phenotypes of asthma. Curr Opin Pulm Med 2004; 10:44-50

8. Chedevergne F, Le Bourgeois M, de Blic J, et al. The role of inflammation in childhood asthma. *Arch Dis Child* 2000; 82 Suppl 2:II6-9
9. Quanjer PH, Tammeling GJ, Cotes JE, et al. Lung volumes and forced ventilatory flows. Report Working Party Standardization of Lung Function Tests, European Community for Steel and Coal. Official Statement of the European Respiratory Society. *Eur Respir J* 1993; 16:5S-40S
10. Tsoumakidou M, Tzanakis N, Kyriakou D, et al. Inflammatory cell profiles and T-lymphocyte subsets in chronic obstructive pulmonary disease and severe persistent asthma. *Clin Exp Allergy* 2004; 34:234-240
11. Tsiligianni J, Tzanakis N, Kyriakou D, et al. Comparison of sputum induction with bronchoalveolar lavage cell differential counts in patients with sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 2002; 19:205-210
12. Kelly MM, Keatings V, Leigh R, et al. Analysis of fluidphase mediators. *Eur Respir J* 2002; 20:24S-39S
13. Robinson DS, Hamid Q, Sun Y, et al. Predominant Th2 like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *New England J Med* 1992; 326:298-304

14. Payne DNR, Qiu Y, Zhu J, et al. Airway inflammation in children with difficult asthma : relationships with airflow limitation and persistent symptoms. *Thorax* 2004;59:862-869
15. Gemou- Engesaeth V, Fagerhol MK, Toda M, et al. Expression of activation markers and cytokine m-RNA by peripheral blood CD4 and CD8 T cells in atopic and nonatopic childhood asthma: effect of inhaled glucocorticoid therapy. *Pediatrics* 2002; 109:24
16. Leckie MJ, Jenkins GR, Khan J et al. Sputum T lymphocytes in asthma, COPD and healthy subjects have the phenotype of activated intraepithelial T cells (CD69+CD103+). *Thorax* 2003 Jan;58(1):23-9
17. Dominguez Ortega J, Leon F, Martinez Alonso JC et al. Fluorocytometric analysis of induced sputum cells in an asthmatic population. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2004;14(2):108-13
18. Brown V, Warke TJ, Shields MD, et al. T cell cytokine profiles in childhood asthma. *Thorax* 2003; 58:311-316
19. Tsoumakidou M, Chrysofakis G, Tzanakis N, et al. The role of CD8+ subpopulations in COPD exacerbations [abstract]. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165:A823
20. Shi H-Z, Qin X-J. CD4+CD25+ regulatory T lymphocytes in allergy and asthma. *Allergy* 2005;60:986-995

21. Umetsu DT, Akbari O, DeKruyff RH. Regulatory T cells control the development of allergic disease and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 112; 3:480-487
22. Corrigan CJ, Haczku A, Gemou-Engesaeth V et al. CD4 T lymphocyte activation in asthma is accompanied by increased serum concentrations of interleukin-5. Effect of glucocorticoid therapy. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147:540-547
23. Lara-Marquez ML, Moan MJ, Cartwright S et al. Atopic asthma: differential activation phenotypes among memory T helper cells. *Clin Exp Allergy* 2001;31:1232-1241
24. Shi HZ, Li S, Xie ZF et al. Regulatory CD4⁺CD25⁺ T lymphocytes in peripheral blood from patients with atopic asthma. *Clin Immunol* 2004;113:172-178
25. Redington AE, Wilson JW, Walls AF, et al. Persistent airway T-Lymphocyte activation in chronic corticosteroid-treated symptomatic asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2000; 85:501-507
26. Gibson PG, Henry RL, Thomas P. The non-invasive assessment of airway inflammation in children: induced sputum, exhaled nitric oxide and breath condensate. *Eur Respir J* 2000; 16:1008-1015

27. Djukanovic R, Homeyard S, Gratziou C, et al. The effect of treatment with oral corticosteroids on asthma symptoms and airway inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155:826-832
28. Gibson PG, Simpson JL, Hankin R, et al. Relationship between induced sputum eosinophils and the clinical pattern of childhood asthma. *Thorax* 2003; 58:116-121
29. Wilson NM, James A, Uasuf C, et al. Asthma severity and inflammation markers in children. *Pediatr Allergy Immunol* 2001; 12:125-132
30. Piacentini GL, Bodini A, Costello S, et al. Exhaled nitric oxide and sputum eosinophil markers of inflammation in asthmatic children. *Eur Respir J* 1999; 13:1386-1390
31. Grootendorst DC, Van den Bos JW, Romeijn JJ, et al. Induced sputum in adolescents with severe stable asthma. Safety and the relationship of cell counts and eosinophilic cationic protein to clinical severity. *Eur Respir J* 1999; 13:647-653
32. Piacentini GL, Martinati L, Mingoni S, et al. Influence of allergen avoidance on the eosinophilic phase of airway inflammation in children with allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 97:1079-1084

33. Wilson NM, Bridge P, Spanevello A, et al. Induced sputum in children: feasibility, repeatability and relation of findings to asthma severity. *Thorax* 2000; 55:768-774
34. Grootendorst DC, Sont JK, Willems LN, et al. Comparison of inflammatory cell counts in asthma: induced sputum vs bronchoalveolar lavage and bronchial biopsies. *Clin Exper Allergy* 1997; 27:769-779
35. Zeiger RS, Dawson C, Weiss S, et al. Relationships between duration of asthma and asthma severity among children in the CAMP. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103:376-387

