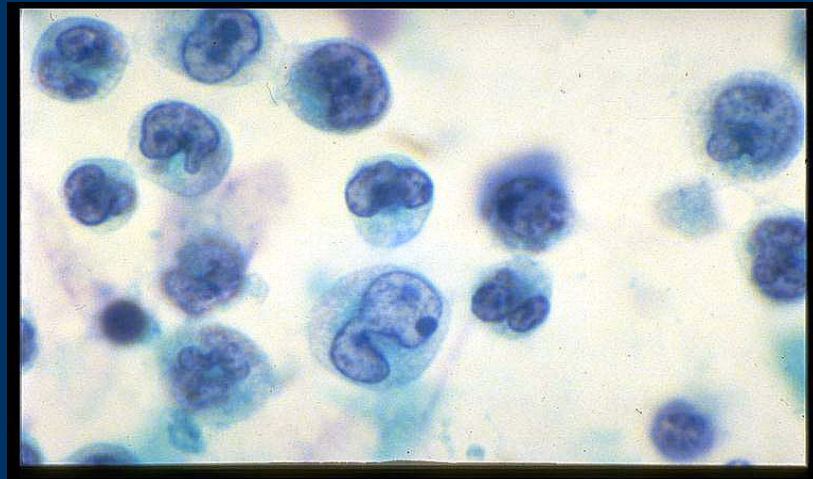


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ  
ΙΑΤΡΙΚΟ ΤΜΗΜΑ  
ΤΟΜΕΑΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΠΝΕΥΜΟΝΟΛΟΓΙΑΣ  
Δ/ΝΤΗΣ Ν.Μ. ΣΙΑΦΑΚΑΣ

# ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΩΝ  
ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΜΕΤΑΞΥ ΒΑΡΕΩΣ  
ΑΣΘΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΧΡΟΝΙΑΣ  
ΑΠΟΦΡΑΚΤΙΚΗΣ  
ΠΝΕΥΜΟΝΟΠΑΘΕΙΑΣ



Επιβλέπων:  
Καθηγητής Πνευμονολογίας Ν.Μ. ΣΙΑΦΑΚΑΣ

**ΤΣΟΥΜΑΚΙΔΟΥ ΜΑΡΙΑ, MD.**

Ηράκλειο Κρήτης 2004



**Αφιερώνεται στους γονείς μου, Λουκά και  
Ευγενία.**



## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή ξεκίνησε στα πλαίσια μια σειράς μελετών που έγιναν στην Πνευμονολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου για τον ρόλο υποπληθυσμών των Τ λεμφοκυττάρων στην παθογένεια της Χρόνια Αποφρακτικής Πνευμονοπάθειας (Χ.Α.Π.). Εμπνευστής αυτής της προσπάθειας ήταν ο καθηγητής Πνευμονολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης Σιαφάκας Νικόλαος. Σε μία πρόσφατη μελέτη του πνευμονολογικού τμήματος του Πανεπιστημίου Κρήτης βρέθηκε μειωμένος λόγος CD4/CD8 θετικών κυττάρων στα πτύελα ασθενών με Χ.Α.Π. Αυτή η ανακάλυψη επιβεβαίωσε προηγούμενες αναφορές σε βρογχικές βιοψίες ασθενών με Χ.Α.Π. για αυξημένους αριθμούς CD8 θετικών κυττάρων. Γνωρίζοντας ότι σε μία άλλη αποφρακτική πάθηση του πνεύμονα, στο άσθμα, αναφέρεται αύξηση των CD4 θετικών λεμφοκυττάρων, γεννήθηκε η ιδέα της συγκριτικής μελέτης του λόγου CD4/CD8 θετικών κυττάρων στα πτύελα ασθενών με Χ.Α.Π. ή άσθμα. Η προοπτική αυτής της ιδέας ήταν η πιθανή χρήση του λόγου αυτού στην διαφορική διάγνωση των δύο παθήσεων. Τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής είναι ενθαρρυντικά όσον αφορά την εφαρμογή της τεχνητής πρόκλησης παραγωγής πτυέλων στην διαφορική διάγνωση μεταξύ άσθματος και Χ.Α.Π., αλλά οπωσδήποτε χρειάζονται μεγαλύτερες μελέτες πριν θεωρηθεί αποδεκτή η χρήση της παραπάνω μεθόδου στην κλινική πράξη.

Ολοκληρώνοντας την συγγραφή της διδακτορικής μου διατριβής θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή Πνευμονολογίας Σιαφάκα Νικόλαο για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντας μου το εξαιρετικά ενδιαφέρον αυτό κομμάτι της έρευνας που διεξάγεται στο πνευμονολογικό τμήμα του Πανεπιστημίου Ηρακλείου. Τον ευχαριστώ επίσης για την πολύτιμη επιστημονική καθοδήγησή του σε όλη την διάρκεια εκπόνησης της διατριβής μου, αλλά και για την ακόμη πιο πολύτιμη καθοδήγησή του σε θέματα ηθικής της επιστήμης. Ευχαριστώ ακόμα όλους τους συνεργάτες του καθηγητή Σιαφάκα που συνέβαλλαν στην πραγματοποίηση της παρούσας διατριβής, ξεχωρίζοντας τον καθηγητή Επιδημιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης Τζανάκη Νικόλαο και την επίκουρο καθηγήτρια του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας Κυριάκου Δέσποινα.

Πριν κλείσω τον μικρό αυτό πρόλογο, θα ήταν σημαντική παράληψη εάν δεν ευχαριστούσα ιδιαίτερα και όλους τους ασθενείς που δέχτηκαν να

συμμετάσχουν σε αυτό το ερευνητικό πρωτόκολλο. Ας μην ξεχνάμε ότι η διεξαγωγή της παρούσας διατριβής έγινε εφικτή χάρη σε αυτούς τους ανθρώπους και ελπίζω να έρθει κάποτε η στιγμή που θα καρπωθούν και οι ίδιοι όφελος από τα αποτελέσματά της.

**Τσουμακίδου Μαρία, MD.**

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Βιογραφικό εκπονούντος την διατριβή.....	9
Περίληψη.....	17

### ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

<b>ΕΝΟΤΗΤΑ I: Άσθμα.....</b>	<b>23</b>
Κεφάλαιο 1	
Ορισμός.....	25
Κεφάλαιο 2	
Επιδημιολογία.....	27
Κεφάλαιο 3	
Παθογένεια.....	29
Κεφάλαιο 4	
Παθοφυσιολογία.....	41
Κεφάλαιο 5	
Παθολογική Ανατομία.....	49
Κεφάλαιο 6	
Διαγνωστική προσέγγιση.....	53
Κεφάλαιο 7	
Κατάταξη βαρύτητας.....	65
Κεφάλαιο 8	
Θεραπευτική προσέγγιση.....	69
Κεφάλαιο 9	
Βαρύ άσθμα.....	73
<b>ΕΝΟΤΗΤΑ II: Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια (Χ.Α.Π.).....</b>	<b>77</b>
Κεφάλαιο 1	
Ορισμός.....	79
Κεφάλαιο 2	
Επιδημιολογία.....	83
Κεφάλαιο 3	
Παθογένεια.....	87
Κεφάλαιο 4	
Παθοφυσιολογία.....	101
Κεφάλαιο 5	

Παθολογική Ανατομία.....	107
Κεφάλαιο 6	
Διαγνωστική προσέγγιση.....	113
Κεφάλαιο 7	
Κατάταξη βαρύτητας.....	119
Κεφάλαιο 8	
Θεραπευτική προσέγγιση.....	121
Κεφάλαιο 9	
Παρόξυνση.....	125
<b>ΕΝΟΤΗΤΑ III: Ομοιότητες και διαφορές μεταξύ άσθματος και Χ.Α.Π.....</b>	<b>129</b>
<b>ΕΝΟΤΗΤΑ IV: Η τεχνητή πρόκληση παραγωγής πτυέλων.....</b>	<b>137</b>
<b>ΕΝΟΤΗΤΑ V: Αναφορές γενικού μέρους.....</b>	<b>145</b>
<b>ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	
<b>ΕΝΟΤΗΤΑ I: Σύγκριση φλεγμονωδών κυττάρων και υποπληθυσμών T- λεμφοκυττάρων μεταξύ ασθενών με Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια και Βαρύ Επίμονο Άσθμα.....</b>	<b>183</b>
<b>ΕΝΟΤΗΤΑ II: Αλλαγές στους πληθυσμούς φλεγμονωδών κυττάρων και στους υποπληθυσμούς T-λεμφοκυττάρων στην οξεία βαριά παρόξυνση της Χρόνιας Αποφρακτικής Πνευμονοπάθειας.....</b>	<b>205</b>
<b>ΤΕΛΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>223</b>
<b>ΕΝΟΤΗΤΑ III: Ανακοινώσεις σε διεθνή συνέδρια και δημοσιευμένη εργασία.....</b>	<b>227</b>



# **ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ**

**ΕΠΩΝΥΜΟ:** Τσουμακίδου

**ΟΝΟΜΑ:** Μαρία

**ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ:** Φοίνικος 6, Μασταμπάς, Ηράκλειο, Κρήτη

**ΤΗΛΕΦΩΝΟ:** 281-031.41.29, ΚΙΝ: 6972213858

**ΗΜ. ΓΕΝΝΗΣΕΩΣ:** 21/12/1975

**ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΚΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ:** Άγαμος

**ΓΕΝΙΚΗ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ:** Απόφοιτος Γενικού Λυκείου με γενικό βαθμό Άριστα

**ΑΝΩΤΑΤΗ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ:** Πτυχιούχος Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου

Κρήτης με βαθμό 8.26

## **ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ**

1. Certificate of proficiency (University of Cambridge)
2. Diplôme Approfondie de Langue Française (D.A.L.F.)

## **ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ**

1. Υπηρεσία Υπαίθρου στο Περιφερειακό Ιατρείο Αλαγνίου, Κέντρο Υγείας Αρκαλοχωρίου, νομός Ηρακλείου Κρήτης, Δεκ 2001 – Νοε 2002
2. Ειδικότητα Πνευμονολογίας στο Βενιζέλειο Νοσοκομείο Ηρακλείου από τον Ιουν του 2002

## **ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ**

1. Τρίμηνη ερευνητική εργασία στο τμήμα Κλινικής και Πειραματικής Ιατρικής, Τομέας Πνευμονολογίας, Πανεπιστήμιο Πάδοβας, Ιταλία, Ιαν – Μαρτ 2002
2. Τριετής εκπόνηση διδακτορικής διατριβής στο ερευνητικό εργαστήριο Πνευμονολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης
3. Ερευνητικό μέλος σε τριετές πανευρωπαϊκό πρωτόκολλο μελέτης της παθογένειας του βαρέως άσθματος με την ονομασία BIOAIR (Biomarkers Airways) ([www. bioair.org](http://www.bioair.org))

## **ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΓΝΩΣΕΙΣ**

1. τεχνική πρόκλησης παραγωγής πτυέλων
2. επεξεργασία πτυέλων
3. ανοσοκυτταροχημεία, ανοσοιστοχημεία
4. ELISA

## **ΒΡΑΒΕΙΑ-ΔΙΑΚΡΙΣΕΙΣ**

1. Βραβείο προγράμματος 1999-2000 από το ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (I.K.Y.) για την διάκριση στις σπουδές και το ήθος για το ακαδημαϊκό έτος 1998-1999 (5ο έτος) στο τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Κρήτης

2. 3<sup>ο</sup> Βραβείο καλύτερης εργασίας στο 11<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακα με θέμα: <<Εκφραση περφορίνης και κυτταροτοξική δραστηριότητα των CD8 T- λεμφοκυττάρων στα προκληθέντα πτύελα ασθενών με Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονπάθεια.>>. Γ.Χρυσοφάκης, Ν.Τζανάκης, Δ.Κυριάκου, Ι.Τσιλιγιάννη, **Μ. Τσουμακίδου**, Ε.Παπαδοπούλη, Δ.Μπούρο, Ν.Σιαφάκα. Θεσσαλονίκη Δεκέμβριος 2001
3. Βράβευση από την Ευρωπαϊκή Πνευμονολογική Εταιρεία της εργασίας με τίτλο «Tc1/Tc2 subpopulations, perforin expression and cytotoxic activity of CD8<sup>+</sup> T-lymphocytes in induced sputum in COPD smokers » George Chrysophakis MD, Nikolaos Tzanakis MD, Maria Klimathianaki MD, Ioanna Mitrouska MD, Despina Kyriakou MD, **Maria Tsoumakidou** MD, Demosthenes Bouros MD & Nikolaos M. Sifakas MD, PhD. Dept. of Thoracic Medicine, University Hospital of Heraklion, Crete, Greece. 11ο Συνέδριο Ευρωπαϊκής Πνευμονολογικής Εταιρείας, Στοκχόλμη, 2002
4. Προσκεκλημένη εισηγήτρια στο Δ' ΚΛΙΝΙΚΟ ΦΡΟΝΤΙΣΤΗΡΙΟ με θέμα <<Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια. Από τη Θεωρία στην Πράξη>>, στα πλαίσια των ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΩΝ ΗΜΕΡΙΔΩΝ ΠΡΩΤΟΒΑΘΜΙΑΣ ΦΡΟΝΤΙΔΑΣ ΥΓΕΙΑΣ<<Γ.Παπαδάκης>>. Διοργάνωση Γ' Παθολογικό τμήμα του Π.Γ.Ν. Νικαίας, 10-14 Φεβρουαρίου 2004.

#### **ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΔΙΕΘΝΩΝ ΣΕΜΙΝΑΡΙΩΝ**

1. Σεμινάριο για τις διεθνείς θέσεις ομοφωνίας για την Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια, GOLD (Global Initiative on Chronic Obstructive Pulmonary Disease), 16 Μαρτίου, Μόδενα, Ιταλία, 2002
2. Ερευνητικό σεμινάριο της Ευρωπαϊκής Πνευμονολογικής Εταιρείας για τις αποφρακτικές παθήσεις του πνεύμονα <<Biomarkers in phenotypic and genomic research on severe airway disease>> , 31 Μαΐου-1 Ιουνίου 2003, Αθήνα

#### **ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΔΙΕΘΝΩΝ ΣΥΝΕΔΡΙΩΝ**

1. 9ο Συνέδριο Ευρωπαϊκής Πνευμονολογικής Εταιρείας 1999
2. 3ο Μεσογειακό Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακα και Φλεγμονωδών Διαταραχών του Πνεύμονα 2000
3. 97ο Συνέδριο Αμερικάνικης Πνευμονολογικής Εταιρείας 2001
4. 98ο Συνέδριο Αμερικάνικης Πνευμονολογικής Εταιρείας 2002
5. 99ο Συνέδριο Αμερικάνικης Πνευμονολογικής Εταιρείας 2002
6. 13ο Συνέδριο Ευρωπαϊκής Πνευμονολογικής Εταιρείας 2003

#### **ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΕΘΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ**

1. Έκφραση περφορίνης και κυτταροτοξική δραστηριότητα των CD8<sup>+</sup> λεμφοκυττάρων στο προκληθέν πτύελο καπνιστών με χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ).

Γ. Χρυσοφάκης, Ν.Τζανάκης, Δ.Κυριάκου, Ι.Τσιλιγιάννη, **Μ.Τσουμακίδου**, Ε.Παπαδοπούλη, Δ.Μπούρος, Ν.Μ.Σιαφάκας.

11<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος. Ελληνική Ιατρική, Τόμος 67-2001 Συμπληρωματικό Τεύχος.

2. Ο ρόλος των T-λεμφοκυττάρων στο άσθμα διαφορετικής βαρύτητας.

Ε.Παπαδοπούλη, **Μ.Τσουμακίδου**, Ν.Τζανάκης, Γ.Χρυσοφάκης, Γ.Μαλτεζάκης, Ν.Σιαφάκας.

11<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος. Ελληνική Ιατρική, Τόμος 67-2001 Συμπληρωματικό Τεύχος.

3. **Μ.Τσουμακίδου**, Ν.Τζανάκης, Δ.Κυριάκου, Ε.Παπαδοπούλη, Γ.Χρυσοφάκης, Γ.Μαλτεζάκης, Ν.Μ.Σιαφάκας. Σύγκριση κυτταρικών υποπληθυσμών των CD8<sup>+</sup> κυττάρων μεταξύ σοβαρών ασθματικών ασθενών και ασθενών με ΧΑΠ του ίδιου βαθμού απόφραξης.

11<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος. Ελληνική Ιατρική, Τόμος 67-2001 Συμπληρωματικό Τεύχος.

4. Ο ρόλος των υποπληθυσμών των CD8<sup>+</sup> κυττάρων στην έξαρση της ΧΑΠ.

**Μ.Τσουμακίδου**, Γ.Χρυσοφάκης, Ν.Τζανάκης, Δ.Κυριάκου, Ε.Παπαδοπούλη, Γ.Μαλτεζάκης, Ν.Μ.Σιαφάκας.

11<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος. Ελληνική Ιατρική, Τόμος 67-2001 Συμπληρωματικό Τεύχος.

5. Αυξημένη έκφραση περφορίνης των κυτταροτοξικών CD8<sup>+</sup> λεμφοκυττάρων στα πτύελα καπνιστών με χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια.

Γ.Χρυσοφάκης, Δ.Κυριάκου, Ν.Τζανάκης, Ι.Τσιλιγιάννη, **Μ.Τσουμακίδου**, Γ.Μεταξάρης, Δ.Μπούρος, Ν.Μ.Σιαφάκας.

11<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος. Ελληνική Ιατρική, Τόμος 67-2001 Συμπληρωματικό Τεύχος.

6. Αυξημένοι δείκτες φλεγμονής και οξειδωτικού stress στο πτύελο ασθενών με βαρεία έξαρση Χρόνιας Αποφρακτικής Πνευμονοπάθειας.

**Μ. Τσουμακίδου**, Γεώργιος Χρυσοφάκης, Νικόλαος Τζανάκης και Νικόλαος Μ. Σιαφάκας.

12<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος. Αθήνα, 2003

7. Δείκτες φλεγμονής και οξειδωτικού stress στο πτύελο ασθενών με Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια και Άσθμα παρουσιάζουν ισχυρή συσχέτιση με την βαρύτητα της απόφραξης των αεραγωγών.

**M. Τσουμακίδου**, Ευαγγελία Παπαδοπούλη, Βάσω Παστουρματζή, Μαρία Προφαντή, Νικόλαος Τζανάκης και Νικόλαος Μ. Σιαφάκας.

13<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος. Αθήνα, 2003

#### **ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ**

1. Effect of voluntary respiratory movements on breath holding.  
I.Mitrouska, **M. Tsoumakidou**, N. Tzanakis, D. Bouros and N.M. Siafakas.

Am Journal Respir Crit Care Med 1999; 159 (3) A783

2. Effect of voluntary regular and deep respiratory effort on breath holding time.

I.Mitrouska, **M. Tsoumakidou**, N. Tzanakis, D. Bouros and N.M. Siafakas.

European Respiratory Journal 1999; 14 (30) 207s

3. High expression of perforin and cytotoxicity of CD8+ lymphocytes in induced sputum of smokers with COPD.

N. Tzanakis, G. Chrysofakis, D. Kyriakou, I. Tsiligianni, **M. Tsoumakidou**, G. Maltezakis, D. Bouros, N.M. Siafakas.

Am Journal Respir Crit Care Med 2002; 165 (8) A823

4. The role of CD8+ subpopulations in COPD exacerbations.

**M. Tsoumakidou**, G. Chrysofakis, N. Tzanakis, D. Kyriakou, E. Papadopouli, G. Maltezakis, N.M. Siafakas.

Am Journal Respir Crit Care Med 2002; 165 (8) A823

5. The role of T-lymphocytes in asthma of varying severity.

E. Papadopouli, **M. Tsoumakidou**, N. Tzanakis, D. Kyriakou, G. Chrysofakis, G. Maltezakis, N.M. Siafakas.

Am Journal Respir Crit Care Med 2002; 165 (8) A558

6. 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. Chrysofakis, G. Maltezakis, N.M. Siafakas.

Am Journal Respir Crit Care Med 2002; 165 (8) A558

7. Neutrophilic inflammation in severe asthmatics and COPD patients with the same severity of airway obstruction.

**M. Tsoumakidou**, N. Tzanakis, E. Papadopouli, G. Chrysofakis, N.M. Siafakas.

European Respiratory Journal 2002; 20 (38) 505s

**8.** Acceleration of neutrophilic inflammation during COPD exacerbation.  
**M. Tsoumakidou**, G. Chrysofakis, N. Tzanakis, E. Papadopouli, N.M. Siafakas.

European Respiratory Journal 2002; 20 (38) 505s

**9.** Possible involvement of CD8+ cells and their subpoulations in COPD exacerbations.

**M. Tsoumakidou**, G. Chrysofakis, N. Tzanakis, E. Papadopouli, D. Kyriakou, N.M. Siafakas.

European Respiratory Journal 2002; 20 (38) 505s

**10.** Effect of voluntary respiratory efforts on breath-holding.

I. Mitrouska, **M. Tsoumakidou**, G. Prinianakis, N. M. Siafakas.

European Respiratory Journal 2002; 20 (38) 296s

**11.** The role of neutrophilic inflammation in asthma of different severity.

E. Papadopouli, N. Tzanakis, D. Kyriakou, **M. Tsoumakidou**, G. Chrysofakis, G. Meataxaris, N.M. Siafakas.

European Respiratory Journal 2002; 20 (38) 310s

**12.** The role of T-lymphocytes in asthma of different severity.

E. Papadopouli, **M. Tsoumakidou**, N. Tzanakis, G. Chrysofakis, M. Niniraki, M. Dialynas, N.M. Siafakas.

European Respiratory Journal 2002; 20 (38) 423s

**13.** T-lymphocyte subtypes in induced sputum determined by Facs analysis in asthmatic children and in adults.

E. Papadopouli, **M. Tsoumakidou**, N. Tzanakis, G. Chrysofakis, E. Michailidou, E. Matzourani and N.M. Siafakas.

Am Journal Respir Crit Care Med 2003; 167 (7) A632

**14.** Increased reactive nitrogen species production in COPD vs asthmatic patients.

**M. Tsoumakidou**, E. Papadopouli, N. Tzanakis, E. Tzortzaki, M. Zerbou, G. Chrysofakis, N.M. Siafakas.

Am Journal Respir Crit Care Med 2003; 167 (7) A125

**15.** Increased reactive nitrogen species production in severe COPD exacerbations.

**M. Tsoumakidou**, N. Tzanakis, G. Chrysofakis, E. Papadopouli, N.M. Siafakas.

Am Journal Respir Crit Care Med 2003; 167 (7) A228

**16.** Eosinophilic inflammation in severe COPD exacerbations.

**M.Tsoumakidou**, N.Tzanakis, V. Pastourmatzi, E.Papadopouli, G.Chrysofakis, N.M.Siafakas.

Am Journal Respir Crit Care Med 2003; 167 (7) A232

**17.** Increased sputum ECP levels in severe asthma and in COPD versus mild-moderate asthma.

**M.Tsoumakidou**, E.Papadopouli, V. Pastourmatzi, N.Tzanakis, N.M.Siafakas.

Am Journal Respir Crit Care Med 2003; 167 (7) A757

**18.** Increased sputum neutrophilic markers with increasing asthma severity. Comparison with COPD.

**M.Tsoumakidou**, E.Papadopouli, N.Tzanakis, E. Papadaku, M. Profanti, N.M.Siafakas.

European Respiratory Journal 2003;22 (45) 550s

**19.** Increased Heme Oxygenase-1 and -2 expression in severe COPD exacerbations.

**M.Tsoumakidou**, N.Tzanakis, G.Chrysofakis, N.M.Siafakas.

European Respiratory Journal 2003;22 (45) 549s

**20.** Genetic comparison between severe persistent asthma and COPD. M. I. Zervou, E. G. Tzortzaki, K. Samara, E. Papadopouli, M. Plataki, **M. Tsoumakidou**, N. M. Siafakas

European Respiratory Journal 2003;22 (45) 81s

**21.** Increased sputum inflammatory and oxidant markers during acute severe exacerbations of COPD.

M. Tsoumakidou, G.Chrysofakis, N.Tzanakis, N.M.Siafakas.

δεκτό για παρουσίαση στο Αμερικάνικο Πνευμονολογικό Συνέδριο, Orlando, 2004

**22.** Sputum inflammatory and oxidant markers in patients with severe, mild-moderate asthma and COPD.

M. Tsoumakidou, E. Papadopouli, V. Pastourmatzi, M. Profanti, N.Tzanakis, N.M.Siafakas.

δεκτό για παρουσίαση στο Αμερικάνικο Πνευμονολογικό Συνέδριο, Orlando, 2004

#### **ΣΥΓΓΡΑΦΗ ΚΕΦΑΛΑΙΩΝ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΒΙΒΛΙΑ**

**1.** Γ.Χρυσοφάκης, **M.Τσουμακίδου**. Παθογένεια της οξείας έξαρσης της Χρόνιας Αποφρακτικής Πνευμονοπάθειας(ΧΑΠ). *Ιατρική Εταιρεία Αθηνών*, 2001.

2. Ν.Σιαφάκας, **Μ.Τσουμακίδου**, Μ.Κλημαθιανάκη. ΧΑΠ η νέα παγκόσμια επιδημία. Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια. Εκδόσεις της Ελληνικής Πνευμονολογικής Εταιρίας. Αθήνα 2002.

#### **ΣΥΓΓΡΑΦΗ ΚΕΦΑΛΑΙΩΝ ΣΕ ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΑ ΒΙΒΛΙΑ**

1. N.M. Siafakas, E. Tzortzaki and **M. Tsoumakidou**.

Antibiotics in COPD in <<Long-term intervention in COPD>>, eds: R.Powels, D. P. Postma, S.Weiss, Marcel-Dekker, inc.publication (in press).

#### **ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΩΝ**

##### ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

1. Γ.Χρυσοφάκης, Ν.Τζανάκης, Δ.Κυριάκου, Ι.Τσιλιγιάννη, **Μ.Τσουμακίδου**, Ε.Παπαδοπούλη, Δ.Μπούρος, Ν.Μ.Σιαφάκας. Έκφραση περφορίνης και κυτταροτοξική δραστηριότητα των CD8+ λεμφοκυττάρων στα πύελα καπνιστών με χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια.

*Περιοδικό Πνεύμων, Τόμος 15.Τεύχος 1. Ιανουάριος-Απρίλιος 2002.*

##### ΣΕ ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

(καταχώρηση: medline database)

1. Effect of digoxin on global respiratory muscle strength after cholecystectomy: a double blind study.

N.M. Siafakas, M. Stathopoulou, N. Tzanakis, I. Mitrouska, **M. Tsoumakidou**, D. Georgopoulos.

Thorax 2000;55:0-4

2. Induced sputum in the investigation of airway inflammation in COPD.

**M.Tsoumakidou**, N. Tzanakis, N.M Siafakas.

Respiratory Medicine 2003;97:863-71

3. Perforin expression and cytotoxic activity of sputum CD8+ lymphocytes in patients with COPD.

G. Chrysofakis, N. Tzanakis, D. Kyriakou, **M. Tsoumakidou**, I. Tsiligianni, M. Klimathianaki and N.M. Siafakas.

Chest 2004;125:71-6.

4. Inflammatory cell profiles and T lymphocyte subsets in COPD and severe persistent asthma.

**M. Tsoumakidou**, N. Tzanakis, D. Kyriakou, G. Chrysofakis, N.M. Siafakas

Clinical and Experimental Allergy 2004; 34(2):234-240

5. Is there any correlation between the ATS, BTS, ERS and GOLD COPD's severity scales and the frequency of hospital admissions?

**M. Tsoumakidou**, N. Tzanakis, O. Voulgaraki, I. Mitrouska, G. Chrysofakis,  
M. Samiou, N.M. Siafakas.

Respiratory Medicine 2004;98:178-83

**6.** Induced sputum CD8+T lymphocytes subpopulations in COPD.

N. Tzanakis, G. Chrysofakis, **M. Tsoumakidou**, D. Kyriakou, I. Tsiligianni, D.  
Bouros and N.M. Siafakas. Respiratory Medicine 2004;98(1):57-65



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το άσθμα και η ΧΑΠ είναι οι δύο συχνότερες παθήσεις του πνεύμονα, με συνεχώς αυξανόμενα ποσοστά επιπολασμού, θνητότητας και θνησιμότητας. Αν και διαφορετικοί μηχανισμοί ενέχονται στις δύο παθήσεις είναι συχνό το διαφοροδιαγνωστικό πρόβλημα μεταξύ τους, ειδικά στην περίπτωση του Βαρέως Επίμονου Άσθματος (ΒΕΑ), που παρουσιάζει ομοιότητες με τη ΧΑΠ σε επίπεδο φυσιολογίας (αυξημένη συχνότητα μη αναστρέψιμης απόφραξης των αεραγωγών) και παθολογίας των αεραγωγών (αυξημένος αριθμός ουδετεροφίλων). Ο στόχος της παρούσας διατριβής ήταν να συγκρίνουμε δείκτες φλεγμονής μεταξύ ασθενών με ΧΑΠ και ΒΕΑ με την ίδια βαρύτητα απόφραξης των αεραγωγών. Συγκεντρώθηκαν 15 ασθενείς με ΧΑΠ ηλικίας (μ.ο.±απόκλιση) 68±8 έτη, πρώην καπνιστές, μέση FEV<sub>1</sub> 45%προβλ. και 13 ασθενείς με ΒΕΑ ηλικίας 55±10 έτη, μη καπνιστές, μέση FEV<sub>1</sub> 49%προβλ από το Τακτικό Πνευμονολογικό Ιατρείο του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου. Η διάγνωση της ΧΑΠ έγινε ακολουθώντας τα κριτήρια της ERS (Ευρωπαϊκή Πνευμονολογική Εταιρία). Όλοι οι ασθενείς παρουσίαζαν μη αναστρέψιμη απόφραξη των αεραγωγών, οριζόμενη ως ΔFEV<sub>1</sub><15% της FEV<sub>1</sub> προ βρογχοδιαστολής μετά από εισπνοή 400mcgr σαλβουταμόλης. Όλοι οι ασθενείς είχαν αρνητικές αλλεργικές δερματικές δοκιμασίες και αρνητικά RAST στον ορό, όπως και φυσιολογικές τιμές IgE ορού. Η διάγνωση του ΒΕΑ έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες του ΠΟΥ. Όλοι οι ασθματικοί ήταν ατοπικοί. 8 παρουσίαζαν μη αναστρέψιμη απόφραξη των αεραγωγών. Όλοι οι ασθενείς και από τις δύο ομάδες ελάμβαναν εισπνεόμενα κορτικοειδή (>800mg/ημ φλουτικαζόνης ή >1200mg/ημ βουδεσονίδης) και εισπνεόμενους μακράς δράσης β2 αγωνιστές. Κανένα άτομο δεν ελάμβανε κάποιο άλλο φαρμακευτικό σκεύασμα ή υπέφερε από κάποιο άλλο πνευμονολογικό ή συστηματικό νόσημα. Σε όλους τους ασθενείς έγινε λήψη δειγμάτων πτυέλων μετά από τεχνητή πρόκληση με υπέρτονο χλωριούχο νάτριο. Η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε για την πρόκληση παραγωγής πτυέλων και για την επεξεργασία των πτυέλων ήταν των Pin και συν. Μετρήθηκαν οι πληθυσμοί των φλεγμονωδών κυττάρων (συμπεριλαμβανομένων και των μεταχρωματικών κυττάρων) και οι υποπληθυσμοί των T-λεμφοκυττάρων στα πτύελα των δύο ομάδων ασθενών χρησιμοποιώντας τεχνικές κυτταροχημείας και ανοσοκυτταροχημείας. Το στατιστικό πακέτο StatsDirect (Camcode· Cambridge, UK) χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των αποτελεσμάτων. Οι

διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων ελέχθησαν χρησιμοποιώντας το Mann-Witney test για μη κανονικές και το t-test για κανονικές κατανομές. Το  $p < 0.05$  θεωρήθηκε στατιστικά σημαντικό. Αυξημένο ποσοστό ουδετεροφίλων βρέθηκε στους ασθενείς με ΧΑΠ σε σύγκριση με τους ασθενείς με ΒΕΑ ( $p < 0.03$ ), ενώ ίδιο ποσοστό ουδετεροφίλων σε σύγκριση με τους ασθενείς με ΒΕΑ και μη αναστρέψιμη απόφραξη των αεραγωγών. Στην ΧΑΠ βρέθηκε αρνητική συσχέτιση μεταξύ των ουδετεροφίλων και του δείκτη διάχυσης CO ( $r = -0.462$ ,  $p < 0.04$ ). Οι ασθενείς με ΒΕΑ παρουσίασαν αυξημένα ηωσινόφιλα και μεταχρωματικά κύτταρα σε σχέση με την ΧΑΠ ( $p < 0.04$ ,  $p < 0.007$  αντιστοίχως). Αυξημένος λόγος CD4/CD8 και μειωμένος λόγος CD4-INF $\gamma$ /CD4-IL4+ κυττάρων ( $p < 0.001$ ) βρέθηκε στο ΒΕΑ σε σχέση με τη ΧΑΠ. Στο ΒΕΑ ο λόγος CD4/CD8 συσχετιζόταν θετικά με τα ηωσινόφιλα στα πτύελα ( $r = 0.567$ ,  $p < 0.04$ ). Συμπεραίνουμε ότι παρά τη θεραπεία με εισπνεόμενα κορτικοειδή, οι ασθενείς με ΒΕΑ και ΧΑΠ παρουσιάζουν διαφορετικό τύπο φλεγμονής στα πτύελα, ο οποίος θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί στην διαφορική διάγνωση μεταξύ των δύο παθήσεων. Τα ανωτέρω αποτελέσματα δημοσιεύτηκαν στο περιοδικό Clinical and Experimental Allergy (**M. Tsoumakidou**, N. Tzanakis, D. Kyriakou, G. Chrysofakis, N.M. Siafakas. Inflammatory cell profiles and T lymphocyte subsets in COPD and severe persistent asthma. Clin Exp Allergy 2004; 34: 1-7)

#### Συμπληρωματικό πρωτόκολλο

Η ΧΑΠ είναι μία διαρκώς επιδεινούμενη πάθηση με συχνές παροξύνσεις, οι οποίες χαρακτηρίζονται από αύξηση του αισθήματος της δύσπνοιας, συριγμό, αίσθημα σφιξίματος στο στήθος, αύξηση του βήχα και των πτυέλων, ή κάποια μη ειδικά ενοχλήματα, που οδηγούν τον ασθενή στην αναζήτηση ιατρικής βοήθειας. Έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι η φλεγμονή αυξάνεται κατά την διάρκεια των παροξύνσεων της ΧΑΠ. Ο σκοπός του συμπληρωματικού πρωτοκόλλου της παρούσας διατριβής ήταν να μελετήσει αλλαγές σε δείκτες φλεγμονής κατά την βαριά παρόξυνση ΧΑΠ σε σχέση με την σταθερή κατάσταση. 14 ασθενείς με ΧΑΠ ηλικίας (μ.ο.+/-απόκλιση) 69+/-7 έτη, πρώην καπνιστές (68+/-23πακ-έτη), μη ατοπικοί, μέση FEV<sub>1</sub> σε σταθερή κατάσταση 40+/-14%προβλ., συγκεντρώθηκαν από το Επείγον Πνευμονολογικό Ιατρείο του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου κατά την έναρξη σοβαρής παρόξυνσης που χρειαζόταν εισαγωγή στο νοσοκομείο. Η παρόξυνση ορίστηκε ως βαριά σύμφωνα με τα ακόλουθα κριτήρια: χρήση επικουρικών

αναπνευστικών μυών, παράδοξες κινήσεις του αναπνευστικού τοιχώματος, αναπνευστική ανεπάρκεια. Προκλητά πτύελα πάρθηκαν στην παρόξυνση πριν από οποιαδήποτε θεραπευτική παρέμβαση. Έγινε ακτινογραφία θώρακος και ελήφθησαν αέρια αίματος. 12 από τους 14 ασθενείς επανεκτιμήθηκαν σε μια προγραμματισμένη επίσκεψη 16 εβδομάδες μετά την έξοδό τους από το νοσοκομείο. Πάρθηκαν εκ νέου προκλητά πτύελα και αέρια αίματος. Επίσης έγινε πλήρης λειτουργικός έλεγχος. 2 ασθενείς αποκλείστηκαν από την μελέτη, επειδή υπέστησαν νέα έξαρση ή οξεία λοίμωξη του αναπνευστικού κατά την διάρκεια των 16 εβδομάδων μετά την έξοδό τους από το νοσοκομείο. Μετρήθηκαν οι πληθυσμοί των φλεγμονωδών κυττάρων και οι υποπληθυσμοί των T-λεμφοκυττάρων στα δείγματα πτυέλων των ίδιων ασθενών σε παρόξυνση και σε σταθερή κατάσταση. Για τις μετρήσεις χρησιμοποιήθηκαν τεχνικές κυτταροχημείας και ανοσοκυτταροχημείας. Όλα τα δείγματα στάλθηκαν στο μικροβιολογικό τμήμα για καλλιέργειες για κοινά βακτήρια. 5 ασθενείς είχαν θετικές καλλιέργειες πτυέλων για κοινά μικρόβια στην παρόξυνση. Το στατιστικό πακέτο StatsDirect (Camcode· Cambridge, UK) χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των αποτελεσμάτων. Οι διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων ελέχθησαν χρησιμοποιώντας το Wilcoxon-signed rank test για μη κανονικές και το paired t-test για κανονικές κατανομές. Το  $p < 0.05$  θεωρήθηκε στατιστικά σημαντικό. Αυξημένο ποσοστό ουδετεροφίλων βρέθηκε στην παρόξυνση σε σχέση με την σταθερή κατάσταση ( $p < 0.002$ ). Οι λόγοι CD4/CD8 και CD8-INF $\gamma$ /CD8-IL4+ κυττάρων ήταν μειωμένοι στην παρόξυνση σε σύγκριση με την σταθερή κατάσταση ( $p = 0.03$  και  $p = 0.02$ , αντιστοίχως). Αυτές οι αλλαγές ήταν ανεξάρτητες από την παρουσία βακτηριακής λοίμωξης ή όχι. Συμπεραίνουμε ότι ο λόγος CD4/CD8 μειώνεται και η CD8+ τύπου 2 λεμφοκυτταρική αντίδραση επάγεται κατά την βαριά παρόξυνση ΧΑΠ. Περαιτέρω έρευνες πρέπει να γίνουν για να διερευνηθεί εάν αυτή η φλεγμονώδης απάντηση κατά την παρόξυνση της ΧΑΠ αντιπροσωπεύει έναν συγκεκριμένο φαινότυπο της νόσου. Τα ανωτέρω αποτελέσματα παρουσιάστηκαν στο Ευρωπαϊκό Πνευμονολογικό Συνέδριο το 2002 (M. Tsoumakidou, G. Chrysofakis, N. Tzanakis, E. Papadopouli, D. Kyriakou, N.M. Siafakas. Possible involvement of CD8+ cells and their subpoulations in COPD exacerbations. European Respiratory Journal 2002; 20 (38) 505s).



# ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



# **ΕΝΟΤΗΤΑ Ι**

## **ΑΣΘΜΑ**





# Κεφάλαιο 1

## ΟΡΙΣΜΟΣ

Πολλές προσπάθειες έγιναν στο παρελθόν για να οριστεί το άσθμα σε σχέση με την επίδρασή του στην πνευμονική λειτουργία, δηλαδή τον περιορισμό της ροής στους αεραγωγούς, την αναστρεψιμότητα του περιορισμού της ροής και την βρογχική υπεραντιδραστικότητα(1). Η κατανόηση του ρόλου της φλεγμονής στην παθογένεια του άσθματος οδήγησε σε έναν πιο πλήρη ορισμό(2). Έτσι, σύμφωνα με τις τελευταίες θέσεις ομοφωνίας του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (ΠΟΥ) και του Εθνικού Ινστιτούτου Καρδιάς, Πνευμόνων και Αίματος των Ηνωμένων Πολιτειών:

<<Το άσθμα είναι μία χρόνια φλεγμονώδης πάθηση των αεραγωγών στην οποία συμμετέχουν πολλά κύτταρα και κυτταρικά στοιχεία. Η χρόνια φλεγμονή προκαλεί αύξηση στην βρογχική υπεραντιδραστικότητα και οδηγεί σε επαναλαμβανόμενα επεισόδια συριγμού, δύσπνοιας, αίσθημα σφιξίματος στο στήθος και βήχα, ειδικά την νύχτα ή νωρίς το πρωί. Αυτά τα επεισόδια συνήθως συνοδεύονται από διάχυτο, αλλά μεταβαλλόμενο περιορισμό της ροής στους αγωγούς, ο οποίος αναστρέφεται αυτόματα ή μετά από θεραπεία.>>.

Ένα πολύ μεγάλο μέρος της σύγχρονης στρατηγικής στην αντιμετώπιση του άσθματος οφείλεται ακριβώς στην αναγνώριση ότι οι φλεγμονώδεις διεργασίες είναι χρόνιες και επίμονες και οι αλλαγές στην έντασή τους αντικατοπτρίζουν τις αλλαγές στην κλινική δραστηριότητα της νόσου.



# Κεφάλαιο 2

## ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Στις αναπτυσσόμενες χώρες το άσθμα συνδέεται στενά, αλλά όχι αποκλειστικά, με την ευαισθητοποίηση στον *Dermatophagoides pteronyssius* και σε άλλα περιβαλλοντικά αλλεργιογόνα. Το αλλεργικό άσθμα μπορεί να παρουσιαστεί για πρώτη φορά σε οποιαδήποτε ηλικία, αλλά η επίπτωση του είναι υψηλότερη στην παιδική ηλικία(3). Το άσθμα που εμφανίζεται κατά την παιδική ηλικία, συχνά υποχωρεί στην εφηβεία, αλλά μπορεί να επανεμφανιστεί κατά την ενήλικη ζωή(4). Το άσθμα που εμφανίζεται κατά την ενήλικη ζωή επιμένει σε όλη τη ζωή του ατόμου και συνήθως συνοδεύεται από επιταχυνόμενη έκπτωση της πνευμονικής λειτουργίας(5). Ο συριγμός κατά την διάρκεια λοιμώξεων του αναπνευστικού σε πολύ μικρή παιδική ηλικία, ο οποίος συνδέεται με μειωμένη πνευμονική λειτουργία στην ενήλικη ζωή, συνήθως λύεται τα πρώτα 2 έτη της ζωής και χαρακτηρίζεται ως άσθμα ή βρογχίτιδα με συριγμό <<wheezy bronchitis>>(6, 7). Οι θάνατοι από άσθμα είναι σήμερα σπάνιοι, ειδικά σε παιδιά και νέους ενήλικες. Στο παρελθόν συνέβαιναν περισσότερο συχνά, ως αποτέλεσμα χρήσης υψηλών δόσεων σχετικά μη ειδικών β-αγωνιστών(8, 9).

Ο περιγραφικός ορισμός του άσθματος που διατυπώνεται στις θέσεις ομοφωνίας για το άσθμα δυστυχώς δεν παρέχει ποσοτικά κριτήρια που να σταντάρουν την διάγνωση της νόσου για κλινικούς, επιδημιολογικούς και γενετικούς σκοπούς(2). Η κλινική διάγνωση του άσθματος σε νεαρούς ενήλικες είναι συχνό φαινόμενο σε χώρες με ανεπτυγμένο σύστημα υγείας. Σε αυτές τις χώρες ιατρικά διαγνωσμένο άσθμα αναφέρεται στο 5% όσων βρίσκονται σε ηλικία 20-44 έτη και σε περισσότερο από το 10% των παιδιών(10, 11). Για να αυξηθεί η αξιοπιστία και η εγκυρότητα των επιδημιολογικών μελετών για το άσθμα σε διαφορετικές χώρες και κουλτούρες, συνήθως χρησιμοποιείται ο αναφερόμενος συριγμός κατά το προηγούμενο έτος ως κριτήριο άσθματος. Ανεξάρτητα από το διαγνωστικό μέτρο που χρησιμοποιείται, υπάρχουν ενδείξεις για αύξηση του επιπολασμού του συριγμού και της διάγνωσης του άσθματος τα τελευταία έτη(12). Ο επιπολασμός της νόσου είναι υψηλότερος σε ανεπτυγμένες χώρες με εύκρατο κλίμα, χαμηλός σε επαρχιακές περιοχές και σε οικονομικά αναπτυσσόμενες κοινότητες, ενώ αυξάνει με την υιοθέτηση ενός οικονομικά πιο ανεβασμένου

τρόπου ζωής(10, 11, 13, 14). Η αύξηση του επιπολασμού του άσθματος στον αναπτυσσόμενο κόσμο φαίνεται να συμβαίνει στα πλαίσια μίας γενικής αύξησης στην αλλεργική ευαισθητοποίηση και στις αλλεργικές νόσους.

Αν και τα ανωτέρω ευρήματα αποδεικνύουν ότι οι περιβαλλοντικοί παράγοντες παίζουν σημαντικό ρόλο στην δημιουργία του άσθματος και της αλλεργίας, μελέτες οικογενειών με άσθμα δείχνουν ότι υπάρχει ισχυρό γενετικό στοιχείο στην πάθηση αυτή. Αυτό το προφανές παράδοξο μπορεί να οφείλεται, τουλάχιστο στον ανεπτυγμένο κόσμο, στην μεγάλη εξάπλωση περιβαλλοντικών παραγόντων κινδύνου για άσθμα, ώστε οι γενετικοί παράγοντες να έχουν μετατραπεί σε καθοριστικής σημασίας για την ανάπτυξη άσθματος. Στον αναπτυσσόμενο κόσμο ωστόσο, η αύξηση των περιστατικών άσθματος πιθανά αντικατοπτρίζει την ισχυρή επίδραση περιβαλλοντικών παραγόντων που συνδέονται με την οικονομική ανάπτυξη.

# Κεφάλαιο 3

## ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ

Η σύγχρονη αντίληψη στην παθογένεια του άσθματος είναι ότι μία χαρακτηριστική φλεγμονώδης διεργασία που αναπτύσσεται στο τοίχωμα των αεραγωγών προκαλεί περιορισμό της ροής στους αεραγωγούς και βρογχική υπεραντιδραστικότητα, η οποία προδιαθέτει σε στένωση των αεραγωγών ως αντίδραση προς διάφορα ερεθίσματα. Χαρακτηριστικά γνωρίσματα της ασθματικού τύπου φλεγμονής στους αεραγωγούς είναι ο αυξημένος αριθμός των ενεργοποιημένων ηωσινοφίλων, των μαστοκυττάρων, των μακροφάγων και των T λεμφοκυττάρων στο βλεννογόνο των αεραγωγών και στον αυλό. Αυτές οι αλλαγές μπορεί να είναι παρούσες ακόμη και όταν ο ασθενής είναι ασυμπτωματικός, ενώ η έντασή τους συνδέεται στενά με την κλινική βαρύτητα της νόσου. Παράλληλα με την χρόνια φλεγμονώδη διεργασία ο τραυματισμός του βρογχικού επιθηλίου προκαλεί την ανάπτυξη και μηχανισμών επιδιόρθωσης, οι οποίοι καταλήγουν σε αλλαγές στην αρχιτεκτονική και την λειτουργικότητα του πνεύμονα, γνωστές ως <<remodeling>>. Τα επαναλαμβανόμενα επεισόδια συμπτωμάτων και ο αναστρέψιμος περιορισμός της ροής στους αεραγωγούς που χαρακτηρίζει το άσθμα αντιπροσωπεύουν μία οξεία φλεγμονώδη αντίδραση η οποία δρα σε αρχιτεκτονικά και λειτουργικά αλλοιωμένους αεραγωγούς.

### ΦΛΕΓΜΟΝΗ

Η φλεγμονή των αεραγωγών στο άσθμα είναι εξαιρετικά περίπλοκη και αφορά ένα καταρράκτη γεγονότων όπου εμπλέκονται πολλά διαφορετικά και αλληλεπιδρώντα κύτταρα, παράγοντες και μεσολαβητές.

### Ανοσολογικοί μηχανισμοί

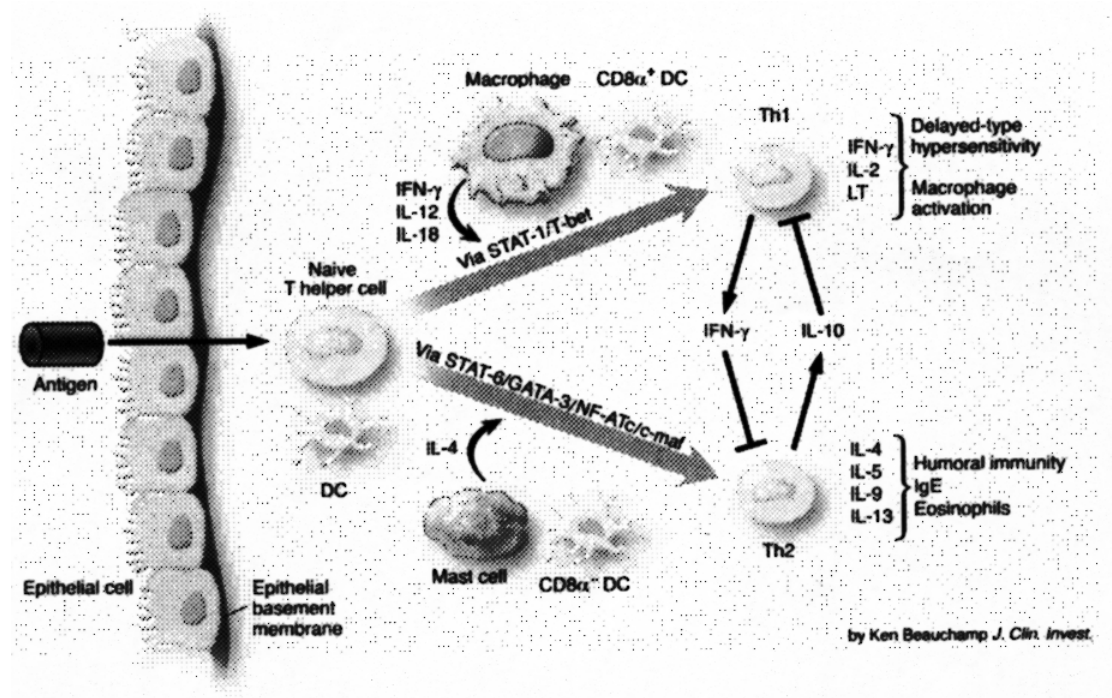
Το ανοσολογικό σύστημα χωρίζεται στην χημική ανοσία και στην κυτταρική ανοσία(15). Η χημική ανοσία χαρακτηρίζεται από την παραγωγή ειδικών αντισωμάτων από τα B λεμφοκύτταρα, ενώ η κυτταρική ανοσία στηρίζεται στα T λεμφοκύτταρα. Τα T λεμφοκύτταρα ελέγχουν την λειτουργία των B λεμφοκυττάρων και επίσης έχουν προ-φλεγμονώδεις ιδιότητες δρώντας κυτταροτοξικά (CD8+ κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα) και εκκρίνοντας κυτταροκίνες.

Σε πολλές περιπτώσεις, ειδικά στα παιδιά και στους νέους ενήλικες, το άσθμα συνδέεται με την παρουσία ατοπίας, η οποία δημιουργείται μέσω IgE μηχανισμών(16). Στον γενικό πληθυσμό η συμβολή της ατοπίας στον φαινότυπο του άσθματος υπολογίζεται στο 40% για παιδιά και ενήλικες μαζί(17). Μη-αναφυλαξιογόνο αντι-IgE μονοκλωνικό αντίσωμα (E-25) μπορεί να μειώσει σημαντικά την πρῶιμη και ὄψιμη αντίδραση στους αεραγωγούς, την βρογχική υπεραντιδραστικότητα και την είσοδο των ηωσινοφίλων στον αυλό των αεραγωγών που ακολουθεί την πρόκληση με εισπνεόμενα αλλεργιογόνα. Το αντι-IgE αντίσωμα είναι επίσης αποτελεσματικό στον έλεγχο του άσθματος σε κλινικές μελέτες. Αυτές οι παρατηρήσεις παρέχουν αναμφισβήτητες αποδείξεις για τον κεντρικό ρόλο της IgE σε ένα μεγάλο ποσοστό ασθενών(18, 19).

Αν και ήταν γνωστό για περισσότερο από 50 έτη ότι οι άνθρωποι αναπτύσσουν χημικοί ή κυτταρική ανοσία σε ειδικά αντιγόνα, η μεγάλη πρόοδος στον τομέα της ανοσολογίας επιτευχθεί όταν ανακαλύφθηκε, αρχικά στο ποντίκι και αργότερα στον άνθρωπο, ότι ο τύπος των T λεμφοκυττάρων που συγκεντρώνεται στο σημείο της εναπόθεσης του αντιγόνου, καθορίζει σε μεγάλο βαθμό την ανάπτυξη της ενός ή της άλλου τύπου ανοσίας. Στο ποντίκι ένας αριθμός λειτουργικά διαφορετικών CD4+ λεμφοκυττάρων έχει αναγνωριστεί βάση του προφίλ κυτταροκινών που παράγει. Αν και η διαφοροποίηση δεν είναι εξίσου ξεκάθαρη στους ανθρώπους, έχουν βρεθεί ήδη παρομοίως διαφοροποιημένα κύτταρα. Τα Th1 και τα Th2 κύτταρα είναι σήμερα στο επίκεντρο της έρευνας. Τα Th1 κύτταρα παράγουν INF-γ, IL-2 και λεμφοτοξίνη, τα Th2 κύτταρα IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 και IL-10, ενώ πολύ λιγότερα πράγματα είναι γνωστά για τα T ρυθμιστικά κύτταρα (T regulatory cells) και τα Th3 κύτταρα, τα οποία παράγουν IL-10 και TGF-β<sub>1</sub>, αντιστοίχως(20, 21). Όπως φαίνεται στο σχήμα 2, τα Th1 και τα Th2 κύτταρα σχηματίζονται από ένα κοινό προγονικό T λεμφοκύτταρο και διαφοροποιούνται σε διαφορετικούς πληθυσμούς ανάλογα με τα σήματα που δέχονται από το τοπικό περιβάλλον. Στο ποντίκι παρουσία CD8a+ δενδριτικών κυττάρων και/ή IL-12, IL-18, ή INF-γ διαφοροποιούνται προς Th1 κύτταρα. Αυτή η διαφοροποίηση επάγεται από τον παράγοντα STAT-1 (Signal Transducer and Activator of Transcription-1) και τον μεταγραφικό παράγοντα T-bet(20, 22). Παρουσία CD8a- δενδριτικών κυττάρων και/ή IL-4 (που μπορεί να παραχθεί από ενεργοποιημένα με IgE μαστοκύτταρα ή από δενδριτικά κύτταρα) σχηματίζονται τα Th2 κύτταρα. Για αυτή την περίπλοκη διαδικασία

απαιτείται ο παράγοντας STAT-6 και η ενεργοποίηση πολλών μεταγραφικών παραγόντων, συμπεριλαμβανομένων των GATA-3, NFAT<sub>c</sub> (nuclear factor of activated T cells-c) και c-maf(21, 23). Είναι ενδιαφέρον ότι Th1/Th2 αλληλο-ρύθμιση έχει επίσης περιγραφεί, με τον κάθε κυτταρικό πληθυσμό ικανό να αναστέλλει και/ή ρυθμίσει την διαφοροποίηση και/ή των φαινότυπο που επάγεται από τον άλλο. Το σχήμα 1 δείχνει τα δύο διαφορετικά αναπτυξιακά μονοπάτια που οδηγούν στην διαφοροποίηση των Th λεμφοκυττάρων του πνεύμονα σε Th1 ή Th2 λεμφοκύτταρα.

**Σχήμα 1-** Η ανάπτυξη των Th1 και Th2 λεμφοκυττάρων στο ποντίκι. Τα αντιγόνα εισέρχονται μέσω του ενδοβρογχικού δέντρου στον πνεύμονα, περνούν την επιθηλιακή επιφάνεια και αντιδρούν με αδιαφοροποίητα Th κύτταρα και δενδριτικά κύτταρα (DC). Με την επίδραση σημάτων από το μικροπεριβάλλον τα Th λεμφοκύτταρα διαφοροποιούνται σε Th1 ή Th2. Η πόλωση προς τον τύπο 1 επάγεται μέσω STAT-1 και T-bet εξαρτώμενων μονοπατιών, υπό την επίδραση CD8α<sup>+</sup> DC κυτταροκινών και κυτταροκινών από τα μακροφάγα. Η πόλωση προς τον τύπο 2 επάγεται μέσω STAT-6, GATA-3, nuclear factor of activated T cells-c (NFATc) και c-maf εξαρτώμενων μονοπατιών, υπό την επίδραση CD8α<sup>-</sup> DC κυτταροκινών και IL-4 από τα μαστοκύτταρα.



Οι Th1 τύπου αντιδράσεις διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στην ενεργοποίηση των μακροφάγων και στις επιβραδυνόμενου τύπου αντιδράσεις

υπερευαισθησίας. Είναι χαρακτηριστικό γνώρισμα παθήσεων όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα, η σαρκοείδωση και η φυματίωση. Αντιθέτως, οι Th2 τύπου αντιδράσεις διεγείρουν την παραγωγή αντισωμάτων, ενεργοποιούν τα μαστοκύτταρα και προκαλούν ιστική ηωσινοφιλία. Παίζουν κεντρικό ρόλο στις αλλεργίες και στις παρασιτικές λοιμώξεις. Αποτελούν τον κύριο τύπο ανοσολογικής απάντησης που λαμβάνει χώρα στους ασθματικούς αεραγωγούς, όπου αυξημένα επίπεδα IL-4, IL-5, IL-13 και IL-9 έχουν αναφερθεί από διάφορους ερευνητές(24).

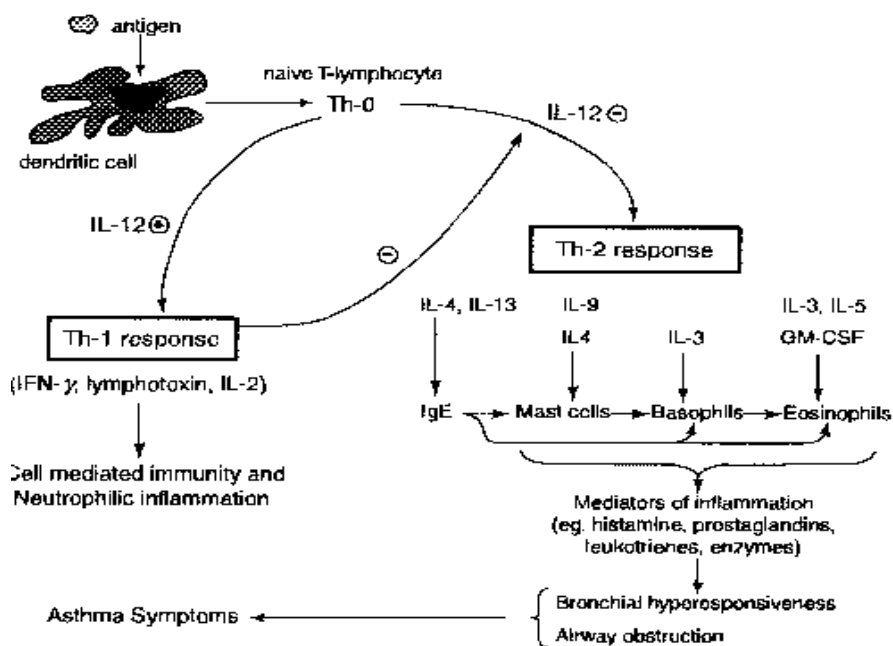
Η IL-4 είναι η κεντρική κυτταροκίνη της αλλεργικής αντίδρασης, η οποία προάγει την σύνθεση IgE από τα B κύτταρα, την διαφοροποίηση των T κυττάρων σε τύπου Th2 κύτταρα, την έκφραση VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1) και ρυθμίζει το επίπεδο έκφρασης της IgE Fc, των κυτταροκινών, των υποδοχέων και των λευκοκυττάρων που ενέχονται στον καταρράκτη της αλλεργίας. Η χορήγηση διαλυτού υποδοχέα της IL-4 (που συνδέεται με την ελεύθερη IL-4 και την εμποδίζει από το να συνδεθεί με κυτταρικούς υποδοχείς της IL-4) έχει δώσει καλά αντιφλεγμονώδη αποτελέσματα σε μοντέλα ζώων και σε πρώτες δοκιμές σε ανθρώπους(25, 26). Η IL-13, μία άλλη Th2 κυτταροκίνη έχει πολλαπλές ανοσολογικές δράσεις σε στο άσθμα και μπορεί επίσης να αποτελέσει στόχο για θεραπεία(27). Η IL-5 προάγει την αποκοκκίωση των ηωσινοφίλων και το επίπεδο έκφρασης της στον βλεννογόνο ασθενών με άσθμα συσχετίζεται με δείκτες ενεργοποίησης των ηωσινόφιλων και των λεμφοκυττάρων(28, 29).

Το πρωταρχικό βήμα στην γένεση της ανοσολογικής απάντησης είναι η ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων από αντιγόνα, τα οποία παρουσιάζονται κατάλληλα μέσω βοηθητικών κυττάρων (αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα). Στην παραπάνω διαδικασία ενέχονται μόρια του μείζονος συμπλόκου ιστοσυμβατότητας (MHC τάξης II στα CD4+ T κύτταρα και MHC τάξης I στα CD8+ T κύτταρα). Τα δενδριτικά κύτταρα είναι τα κύρια αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα στους αεραγωγούς. Προέρχονται από προγόνους τους στο νωτιαίο μυελό και σχηματίζουν ένα εκτεταμένο δίκτυο κάτω από το επιθήλιο των αεραγωγών. Μετά την λήψη του αντιγόνου μεταναστεύουν στους τοπικούς λεμφαδένες, υπό την επήρεια του αυξητικού παράγοντα των κοκκιοκυττάρων και των μακροφάγων GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor), ο οποίος απελευθερώνεται από ενεργοποιημένα επιθηλιακά κύτταρα, ινοβλάστες, T κύτταρα, μακροφάγα και μαστοκύτταρα. Στους λεμφαδένες τα δενδριτικά κύτταρα κατευθύνονται σε



περιοχές πλούσιες σε λεμφοκύτταρα, όπου με την δράση επιπλέον κυτταροκινών, ωριμάζουν σε δραστικά αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα(30). Στους ασθματικούς ασθενείς η αλληλεπίδραση δενδριτικών κυττάρων και Th0 λεμφοκυττάρων οδηγεί στην διαφοροποίηση των τελευταίων προς τον τύπο Th2. Εν συνεχεία τα διαφοροποιημένα λεμφοκύτταρα μεταναστεύουν στους αεραγωγούς, όπου οργανώνουν την ασθματικού τύπου ανοσολογική απάντηση. Στο σχήμα 2 φαίνονται συνοπτικά οι προαναφερθέντες ανοσολογικοί μηχανισμοί που ενέχονται στην παθογένεια του άσθματος.

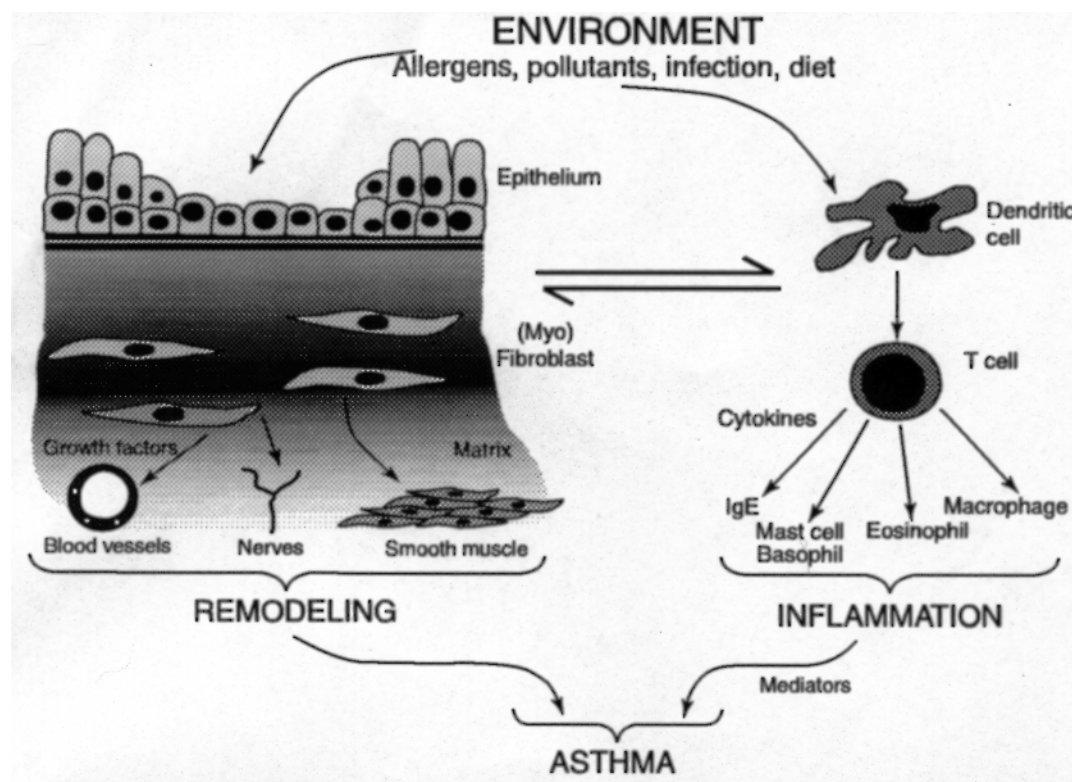
**Σχήμα 2-** Παθογένεια του άσθματος.



Η εισπνοή αλλεργιογόνου από αλλεργικά άτομα οδηγεί στην πρώιμη ανοσολογική απάντηση, που σε μερικές περιπτώσεις ακολουθείται από την όψιμη ανοσολογική απάντηση σε διάστημα 6-9 ωρών. Η πρώιμη απάντηση οφείλεται στην ενεργοποίηση μακροφάγων και μαστοκυττάρων από τις ειδικές για το συγκεκριμένο αλλεργιογόνο IgE ανοσοσφαιρίνες(31). Σε ασθενείς με ισχυρό το αλλεργικό στοιχείο, τα βασεόφιλα μπορεί επίσης να συμμετάσχουν. Η διασταυρούμενη σύνδεση συνδεδεμένων με IgE κυττάρων οδηγεί σε μια σειρά βιοχημικών γεγονότων που έχουν ως αποτέλεσμα την μη κυτταροτοξική έκκριση κοκκιοκυτταρικών μεσολαβητών, όπως η ισταμίνη, πρωτεολυτικά και γλυκολυτικά ένζυμα, και η ηπαρίνη και την γένεση νέων μεσολαβητών, όπως η προσταγλανδίνη PGD<sub>2</sub>, το λευκοτριένιο C<sub>4</sub>, η αδενοσίνη και το ενεργό οξυγόνο(32). Τα ανωτέρω επάγουν την σύσπαση των λείων μυϊκών ινών,

διεγείρουν τις προσαγωγές νευρικές ίνες, προκαλούν υπερέκκριση βλέννης, αγγειοδιαστολή και μικροαγγειακή διαφυγή (σχήμα 3)(33, 34).

**Σχήμα 3-** Φλεγμονή και αναδιάταξη των αεραγωγών (airway remodeling) στο άσθμα.



Η όψιμη ανοσολογική απάντηση θεωρείται το μοντέλο της κατανόησης των μηχανισμών του άσθματος(34). Κατά την όψιμη ανοσολογική απάντηση και κατά την φυσιολογική έκθεση σε αλλεργιογόνα, τα ενεργοποιημένα κύτταρα των αεραγωγών απελευθερώνουν κυτταροκίνες και χυμοκίνες στην κυκλοφορία, που διεγείρουν την απελευθέρωση από τον μυελό των οστών φλεγμονωδών λευκοκυττάρων, ειδικά ηωσινόφιλων και των προγόνων τους(35).

### **Ενδογενές μη αλλεργικό άσθμα**

Τα άτομα με ενδογενές άσθμα έχουν αρνητικές δερματικές δοκιμασίες και αρνητικό κλινικό ή οικογενειακό ιστορικό ατοπίας. Η ολική συγκέντρωση των IgE στον ορό συχνά είναι εντός φυσιολογικών ορίων και δεν ανευρίσκονται ειδικές IgE ανοσοσφαιρίνες ενάντιο κοινών αλλεργιογόνων. Αυτή η μορφή του άσθματος συνοδεύεται συχνά από αλλεργία στην ασπιρίνη και από την παρουσία ρινικών πολυπόδων και η έναρξή της συχνά έπεται ιογενούς λοίμωξης του αναπνευστικού. Προσβάλλει κυρίως γυναίκες. Οι ασθενείς με

ενδογενές άσθμα είναι συνήθως μεγαλύτεροι σε ηλικία από αυτούς με αλλεργικό άσθμα και η κλινική τους πορεία συνήθως είναι βαρύτερη. Μία ελβετική επιδημιολογική μελέτη (SAPALDIA) 8357 ατόμων 18-60 ετών αποκάλυψε ότι το 1/3 όλων των περιπτώσεων με άσθμα μπορούσαν να χαρακτηριστούν ως ενδογενές μη αλλεργικό άσθμα(36).

Από τότε που πρωτοπεριγράφηκε το ενδογενές άσθμα έχουν τεθεί πολλά ερωτηματικά όσον αφορά την σχέση του με την ατοπία. Μία υπόθεση είναι ότι το ενδογενές άσθμα αποτελεί αυτοάνοση πάθηση, ή αυτοαλλεργία η οποία πυροδοτείται από λοίμωξη. Άλλοι υποστηρίζουν ότι τα άτομα με ενδογενές άσθμα είναι ευαισθητοποιημένα σε ένα άγνωστο αντιγόνο(37). Αν και το ενδογενές άσθμα έχει διαφορετικό κλινικό προφίλ από το ατοπικό, δεν αποτελεί ξεχωριστή ανοσοπαθολογική οντότητα. Βιοψίες αεραγωγών ατόμων με ενδογενές άσθμα είναι πλούσιες σε τύπου Th2 κυτταροκίνες, όπως και στο ατοπικό άσθμα(38). Ένα μικρό ποσοστό περιστατικών με ενδογενές άσθμα μπορεί να οφείλεται στην ανάπτυξη στο χώρο εργασίας άγνωστων IgE ή σε μη- IgE ευαισθητοποίηση σε ενεργά χημικά.

### **Φλεγμονώδη κύτταρα**

Κύτταρα του περιφερικού αίματος, συμπεριλαμβανομένων των ηωσινοφίλων, των βασεοφίλων, των λεμφοκυττάρων και των μαστοκυττάρων, συγκεντρώνονται στους φλεγμένοντες αεραγωγούς. Η διαδικασία ξεκινά με την παραγωγή μιας σειράς ενδοθηλιακών μορίων προσκόλλησης μέσω ειδικών φλεγμονωδών μεσολαβητών. Αυτά τα μόρια προσκόλλησης συνδέονται με τα συνδετικά τους στα κυλιόμενα λευκοκύτταρα, με αποτέλεσμα την ισχυρή σύνδεση των λευκοκυττάρων στα ενδοθηλιακά κύτταρα των μικροαγγείων και κατόπιν την μετανάστευσή τους κατά μήκος του ενδοθηλίου στον περιαγγειακό χώρο(39). Κυτταρικές χυμοκίνες έχουν επίσης ρόλο στην παραπάνω διαδικασία, αντιδρώντας με υποδοχείς στα λευκοκύτταρα, ώστε σε συνεργασία με τις ηωσινοφιλοποιητικές κυτταροκίνες IL-5 και GM-CSF να πυροδοτήσουν και να κατευθύνουν την μετανάστευση των λευκοκυττάρων και να επάγουν σε αυτά την έκκριση διαφόρων μεσολαβητών(40, 41).

Η επιβίωση των φλεγμονωδών κυττάρων στους ιστούς εξαρτάται από εξωγενείς παράγοντες. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η απόπτωση (προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος) των φλεγμονωδών κυττάρων περιορίζει την καταστροφή των ιστών και προάγει την λύση αντί για την πρόοδο της φλεγμονής(42). Στο άσθμα, η επιβίωση ενεργοποιημένων φλεγμονωδών κυττάρων όπως τα ηωσινόφιλα αυξάνεται σημαντικά σαν

αποτελεσμα μειωμένης απόπτωσης(43). Πολλές κυτταροκίνες και χυμοκίνες και κάποια μόρια του διάμεσου ιστού, που υπερεκφράζονται στους αεραγωγούς ατόμων με άσθμα, ενισχύουν την επιβίωση των φλεγμονωδών κυττάρων(44).

Ηωσινόφιλα. Στο χρόνιο άσθμα αυξημένος αριθμός ενεργοποιημένων ηωσινοφίλων έχει βρεθεί σε βρογχικές βιοψίες, συνήθως κάτω από την βασική μεμβράνη. Τα περισσότερα άτομα με αλλεργικό ή μη-αλλεργικό άσθμα, ακόμα και αυτά με ήπιο άσθμα, έχουν ηωσινόφιλα στους βρόγχους τους και υπάρχει σημαντική, αν και ποικίλη συσχέτιση μεταξύ του βαθμού ενεργοποίησης των ηωσινοφίλων και της βαρύτητας του άσθματος και της βρογχικής υπεραντιδραστικότητας(45).

Τα ηωσινόφιλα διαθέτουν πολλές βιολογικές λειτουργίες, μεταξύ των οποίων η απελευθέρωση τοξικών κοκκιοκυτταρικών πρωτεϊνών, ελεύθερων ριζών οξυγόνου, εικοσανοειδών (σουλφιδό-πεπτιδικών λευκοτριενίων), παραγόντος ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF), Th2 κυτταροκινών και ένα μεγάλο αριθμό αυξητικών παραγόντων(46, 47). Μπορεί να ενεργοποιηθούν για την έκκριση μεσολαβητών που ενέχονται σε ανοσολογικούς, αλλά και σε μη ανοσολογικούς μηχανισμούς. Τα ενεργοποιημένα ηωσινόφιλα μπορεί να επάγουν την σύσπαση των λύων μυϊκών ινών, να αυξήσουν την μικροαγγειακή διαπερατότητα και να επάγουν την βρογχική υπεραντιδραστικότητα(48, 49). Ωστόσο, η χορήγηση αντι-IL-5 μονοκλωνικού αντισώματος για 16 εβδομάδες μείωσε τον αριθμό των ηωσινοφίλων στο αίμα και στα πτύελα σε σχεδόν μη ανιχνεύσιμα επίπεδα, αλλά δεν είχε καμία επίδραση στην πρώιμη και όψιμη αλλεργική αντίδραση ή στην βρογχική υπεραντιδραστικότητα(50) Αυτά τα ευρήματα θέτουν πολλά ερωτηματικά για τον ρόλο των ηωσινοφίλων ως προ-φλεγμονώδες κύτταρο σε όλους τους ασθενείς με άσθμα, ειδικά γιατί παρόμοιες μειώσεις στους αριθμούς των ηωσινοφίλων παράγονται με εξωγενή χορήγηση IL-12 ή INF-γ χωρίς να υπάρχει κάποιο κλινικό όφελος ή βελτίωση στην πνευμονική λειτουργία(51). Περισσότερες μελέτες χρειάζονται για το εάν αυτά τα ευρήματα επιβεβαιώνονται για την δράση των ηωσινοφίλων και στο χρόνιο άσθμα.

Μαστοκύτταρα. Τα μαστοκύτταρα βρίσκονται στους βρόγχους φυσιολογικών ατόμων και ασθενών με άσθμα(52). Στους ασθενείς με άσθμα είναι συχνά αποκοκκιωμένα, τόσο σε σταθερή φάση της νόσου, όσο κυρίως μετά από έκθεση σε αλλεργιογόνο(53). Επιπλέον της έκκρισης μεσολαβητών, τα μαστοκύτταρα είναι σημαντική πηγή πρωτεασών, ιδιαίτερα τρυπτάσης, η

οποία έχει ποικίλη δράση σε πρωτεΐνες, ειδικά σε υποδοχείς που ενεργοποιούνται από πρωτεάσες.

Ουδετερόφιλα. Τα πολυμορφοπύρρηνα ουδετερόφιλα για πολύ καιρό θεωρούνταν ως τελικά διαμορφωμένα κύτταρα, ανίκανα να συνθέσουν πρωτεΐνες τα οποία ασκούσαν μόνο έναν παθητικό ρόλο στην φλεγμονή, φαγοκυτταρώντας και απελευθερώνοντας προσχηματισμένα ένζυμα και κυτταροτοξικά μόρια. Ωστόσο, τα ουδετερόφιλα μπορούν να απελευθερώσουν ένα μεγάλο αριθμό ενζύμων, συμπεριλαμβανομένων πρωτεασών που διασπών τον εξωκυττάριο χώρο (π.χ. μεταλλοπρωτεϊννάση-9 (MMP-9) και ελαστάση), ενεργής ρίζες οξυγόνου, και κυτταροκίνες και χυμοκίνες, όπως η IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6, και IL-8(54). Τα ουδετερόφιλα αυξάνονται στους αεραγωγούς των ασθενών με χρόνια και σοβαρό άσθμα κατά την διάρκεια ιογενούς αιτιολογίας κρίσεων άσθματος ή μετά από έκθεση σε ρύπους, αλλά ο ακριβής τους ρόλος στις παθοφυσιολογικές διαταραχές του σοβαρού άσθματος χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση(55).

Μακροφάγα. Τα ιστικά μακροφάγα μπορούν να εκκρίνουν ένα μεγάλο αριθμό προϊόντων, πολλά από τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στους μηχανισμούς της πνευμονικής βλάβης και της επιδιόρθωσής της. Συνθέτουν και εκκρίνουν ενεργοποιητή του πλασμινογόνου και μία ομάδα μεταλλοπρωτεϊνών που μπορούν να διασπάσουν πολλά μακρομόρια του εξωκυττάριου χώρου, όπως η ελαστίνη(56). Τα μακροφάγα ενέχονται επίσης στην αναδιάταξη των αεραγωγών μέσω της έκκρισης αυξητικών παραγόντων, όπως ο αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγοντας (PDGF), βασικός ινοβλαστικός αυξητικός παράγοντας (b-FGF), και αυξητικός παράγοντας μεταμόρφωσης- $\beta$  (TGF- $\beta$ )(57).

## **ΝΕΥΡΟΓΕΝΗΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΩΝ ΑΕΡΑΓΩΓΩΝ**

Διάφορα ερεθίσματα (όπως η ομίχλη, το διοξείδιο του θείου, η σκόνη και ο κρύος αέρας) προκαλούν αντανακλαστικό βρογχόσπασμο ενεργοποιώντας τους αισθητικούς υποδοχείς των αεραγωγών. Σε φυσιολογικά άτομα και σε άτομα με άσθμα, αυτός ο φυσιολογικός μηχανισμός άμυνας μπορεί να προκαλέσει βρογχόσπασμο. Ωστόσο, στο άσθμα ο βρογχόσπασμος αναπτύσσεται σε χαμηλότερα επίπεδα διέγερσης και είναι πιο έντονος σε σύγκριση με φυσιολογικά άτομα. Έχει γίνει η πρόταση ότι η αυξημένη δραστηριότητα του αυτόνομου παρασυμπαθητικού συστήματος ευθύνεται για ένα μέρος της βρογχικής υπεραντιδραστικότητας σε ασθενείς με άσθμα. Αν και μπορεί να ενέχεται, δε φαίνεται να αποτελεί σημαντικό αίτιο περιορισμού

της ροής στους αεραγωγούς σε αυτή την πάθηση. Το σύστημα νεύρωσης των αεραγωγών είναι εξαιρετικά περίπλοκο. Επιπλέον των κλασσικών χολινεργικών και αδρενεργικών μηχανισμών, ένα δίκτυο μη χολινεργικών, μη αδενεργικών νευρικών οδών έχει περιγραφεί στους ανθρώπινους αεραγωγούς(58). Η ανακάλυψη ενός δικτύου νευρικών ινών που περιέχουν δραστικά νευροπεπτίδια και νευρορυθμιστές, επιπλέον από τους κλασσικούς νευροδιαβαστές, έχει αναζωπυρώσει το ενδιαφέρον για πιθανή ενοχή ανωμαλιών του νευρικού ελέγχου των αεραγωγών στην παθογένεια του άσθματος(58).

Το νιτρικό οξύ είναι ένα ενεργό αέριο που σχηματίζεται από την αργινίνη σε νευρικούς αλλά και μη νευρικούς ιστούς, με την δράση της συνθετάσης του νιτρικού οξέος(59). Στο άσθμα υπάρχουν ενδείξεις ότι η επαγομένη μορφή του ενζύμου (η οποία καταστέλλεται από τα κορτικοειδή) είναι αυξημένη στο επιθήλιο. Το νιτρικό οξύ έχει ισχυρή αγγειοδιασταλτική και βρογχοδιασταλτική δράση και πιθανά λειτουργεί ως νευρορυθμιστής που απελευθερώνεται από μη-αδρενεργικούς και μη-χολινεργικούς νευρώνες που ρυθμίζουν τον τόνο των λείων μυϊκών ινών των αεραγωγών, την ροή στα πνευμονικά αγγεία και τις τοπικές ανοσολογικές αντιδράσεις. Άρα, ανωμαλίες στην παραγωγή του νιτρικού οξέως και/ή στην διάσπαση του μπορεί να σχετίζονται με την παθοφυσιολογία του άσθματος(60).

Η παρατήρηση ότι τα μαστοκύτταρα και τα ηωσινόφιλα συγκεντρώνονται στα νευρικά γάγγλια των αεραγωγών και ότι οι διαβιβαστές τους εμπλέκονται στην μεταβίβαση των νευρικών ερεθισμάτων παρέχει επιπλέον πληροφορίες για συμμετοχή νευρογενών μηχανισμών στο άσθμα.

## **ΕΞΑΡΣΕΙΣ**

Η παροδική επιδείνωση είναι χαρακτηριστικό του άσθματος. Υπάρχουν πολλά αίτια εξάρσεων, όπως ερεθίσματα που προκαλούν βρογχόσπασμο, όπως ο κρύος αέρας, η ομίχλη ή η άσκηση ή ερεθίσματα που προκαλούν φλεγμονή στους αεραγωγούς, όπως αλλεργιογόνα, ευαισθητοποιές ουσίες στον επαγγελματικό χώρο, το όζον ή οι ιογενείς αναπνευστικές λοιμώξεις(61). Η άσκηση και ο υπεραερισμός με κρύο και ξηρό αέρα προκαλούν βρογχόσπασμο στο άσθμα κρυώνοντας και ξηραίνοντας τους αεραγωγούς, οδηγώντας στην απελευθέρωση ισταμίνης και λευκοτριενίων, που διεγείρουν την σύσπασση των λείων μυών(62). Τέτοια ερεθίσματα δεν αυξάνουν την βρογχική υπεραντιδραστικότητα σε άλλα ερεθίσματα και έτσι έχουν μικρή διάρκεια δράσης.

Οι εξάρσεις άσθματος μπορεί να αναπτυχθούν μέσα σε αρκετές ημέρες. Οι περισσότερες συνδέονται με ιογενείς λοιμώξεις του αναπνευστικού, ειδικά σε κοινούς ρινοϊούς(63). Οι ρινοϊοί μπορούν να προκαλέσουν φλεγμονώδη αντίδραση στους ενδοπνευμονικούς αεραγωγούς και σε ασθενείς με άσθμα αυτό συνοδεύεται από ποικίλη απόφραξη των αεραγωγών και από επιδείνωση της υπεραντιδραστικότητας(64). Η φλεγμονώδης αντίδραση των εξάρσεων περιλαμβάνει διήθηση και ενεργοποίηση από ηωσινόφιλα ή/και ουδετερόφιλα από κυτταροκίνες ή χημοκίνες που απελευθερώνονται από Τ λεμφοκύτταρα και/ή βρογχικά επιθηλιακά κύτταρα(65).

Είναι πολύ πιθανό ότι η έκθεση σε αλλεργιογόνα επίσης προκαλεί έξαρση σε ασθενείς με άσθμα(66). Ειδικά, οι ασθενείς με όψιμη ανοσολογική αντίδραση παρουσιάζουν έντονη ηωσινοφιλική φλεγμονή στους αεραγωγούς μετά από την έκθεση στο αλλεργιογόνο, που ακολουθείται από ένα επεισόδιο έντονης βρογχικής υπεραντιδραστικότητας(67). Η επαναλαμβανόμενη έκθεση σε αλλεργιογόνα σε επίπεδα χαμηλότερα από αυτά που προκαλούν βρογχόσπασμο, που πιθανά μιμείται την εποχιακή έκθεση, μπορεί επίσης να προκαλέσει τέτοια αντίδραση. Η πιθανότητα ότι τέτοιου είδους εκθέσεις μπορούν να προκαλέσουν επίμονη φλεγμονή και αναδιάταξη των αεραγωγών, όπως υποεπιθηλιακή εναπόθεση κολλαγόνου, δεν μπορεί να αποκλειστεί(68).

Επίμονες ανωμαλίες μπορούν να συμβούν μετά από έκθεση σε επαγγελματικούς παράγοντες που ενεργοποιούν τους ασθενείς με επαγγελματικό άσθμα(69). Ακόμα και μετά από μήνες από την διακοπή της έκθεσης, η βρογχική υπεραντιδραστικότητα και κάποια χαρακτηριστικά της φλεγμονής (μακροφάγα και ηωσινόφιλα στο βλεννογόνο) μπορεί να επιμένουν, ενώ άλλα χαρακτηριστικά (όπως η υποεπιθηλιακή εναπόθεση κολλαγόνου) συνήθως αναστρέφονται(70). Αυτά τα ευρήματα δείχνουν ότι υπάρχει περίπλοκη αλληλεπίδραση μεταξύ παθοφυσιολογικών μηχανισμών που ενέχονται στην παθογένεια των εξάρσεων και αυτών που ενέχονται στην παθογένεια του επίμονου άσθματος. Αυτή η αλληλεπίδραση περιπλέκεται και από αλληλεπιδράσεις μεταξύ διαφορετικών ερεθισμάτων, π.χ. επαγγελματικών και αερίων ρύπων(71).

Σε ένα περίπου 10% των ενήλικων ασθενών με άσθμα, τα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη που αναστέλλουν την κυκοξυγεννάση-1 επιδεινώνουν τις κρίσεις άσθματος(72). Αυτές οι κρίσεις μπορεί να είναι

επικίνδυνες. Σε μια μεγάλη αναδρομική μελέτη ασθενών με άσθμα που ετέθησαν σε μηχανικό αερισμό για την αντιμετώπιση μίας σχεδόν-θανατηφόρας κρίσης άσθματος, το 24% είχε ιστορικό δυσανεξίας στην ασπιρίνη(73).



# Κεφάλαιο 4

## ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ

### ΑΠΟΦΡΑΞΗ ΤΩΝ ΑΕΡΑΓΩΓΩΝ

Οι φλεγμονώδεις αλλαγές που παρατηρούνται στους αεραγωγούς ανθρώπων με άσθμα υπογραμμίζουν και τις ανωμαλίες στην πνευμονική τους λειτουργία: απόφραξη των αεραγωγών που προκαλεί περιορισμό στην ροή των αεραγωγών, η οποία μεταβάλλεται αυτόματα ή ως αποτέλεσμα της θεραπείας. Αυτές οι λειτουργικές αλλαγές συνδέονται με τα χαρακτηριστικά συμπτώματα του άσθματος-βήχας, αίσθημα σφιξίματος στο στήθος, και συριγμός- και με την βρογχική αντιδραστικότητα σε βρογχοσυσπαστικά ερεθίσματα. Ο βήχας πιθανά προκαλείται από διέγερση των αισθητικών νευρώνων των αεραγωγών από φλεγμονώδεις διαβιβαστές και ο συχνός βήχας μπορεί να είναι το μοναδικό σύμπτωμα άσθματος, ειδικά στα παιδιά (cough variant asthma)(74). Οι φλεγμονώδεις διαβιβαστές μπορεί επίσης να επηρεάζουν την αντίληψη της δύσπνοιας μέσω της δράσης τους στις προσαγωγές νευρικές ίνες. Στο ένα άκρο, η διέγερση των προσαγωγών ινών μπορεί να συμβάλλει, σε συνδυασμό με πιθανή υπερκαπνία ή υποξαιμία, σε δυσανάλογα μεγάλο drive για αναπνοή και κυψελιδικό υπεραερισμό, στα οποία οφείλεται μέρος του αισθήματος δύσπνοιας στην κρίση άσθματος. Στο άλλο άκρο, αλλαγές στην λειτουργία των προσαγωγών ινών, μπορεί να ευθύνονται για την μειωμένη ικανότητα αντίληψης της απόφραξης των αεραγωγών, ειδικά σε άτομα με χρόνια βαρύ άσθμα, γνωστά ως poor perceivers(75).

Η απόφραξη των αεραγωγών στο άσθμα είναι πολυπαραγοντικής αιτιολογίας. Η κύρια αιτία είναι η σύσπασση των λείων μυών που προκαλείται από αγωνιστές απελευθερωμένους από τα φλεγμονώδη κύτταρα. Σε αυτούς τους αγωνιστές περιλαμβάνονται η ισταμίνη, η τρυπτάση, η προσταγλανδίνη D2 και το λευκοτριένιο C4 από τα μαστοκύτταρα, τα νευροπεπτιδία από τα τοπικές προσαγωγές ίνες και η ακετυλοχολίνη από μεταγαγγλιονικές απαγωγές ίνες. Οι συνέπειες της σύσπασσης των λείων μυών επιδεινώνονται λόγω της πάχυνσης του τοιχώματος των αεραγωγών από το οξύ οίδημα, την κυτταρική διήθηση και την αναδιάταξη –την χρόνια υπερπλασία των λείων μυϊκών ινών, των αγγειακών και εκκριτικών κυττάρων και την εναπόθεση

διάμεσου ιστού στο τοίχωμα των αεραγωγών. Ακόμα μεγαλύτερος περιορισμός της ροής των αεραγωγών προκύπτει εάν ο αυλός των αεραγωγών γεμίσει με βλεννώδεις, κολλώδεις, πηκτές εκκρίσεις, που παράγονται από τα καλυκοειδή κύτταρα και τους υποβλεννογόνιους αδένες και με πρωτεΐνες πλάσματος που διαφεύγουν από τα βρογχικά μικροαγγεία(76, 77).

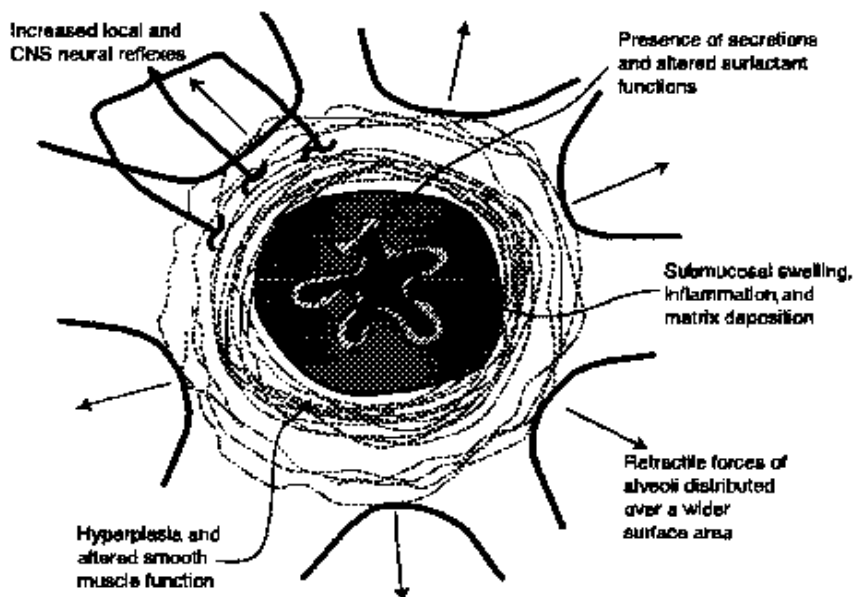
Ουσιαστικά, όλες οι φυσιολογικές διαταραχές στο άσθμα προκύπτουν από την στένωση των αεραγωγών, που επηρεάζει όλα τα μέρη του τραχειοβρογχικού δέντρου, αλλά πιθανά είναι μέγιστη στους μικρούς βρόγχους, διαμέτρου 2-5χιλ(78). Η αντίσταση των αεραγωγών αυξάνεται και η μέγιστη εκπνευστική ροή μειώνεται σε όλους τους πνευμονικούς όγκους. Οι στενωμένοι περιφερικοί αεραγωγοί κλείνουν σε μικρότερους όγκους, προκαλώντας μεγάλη αύξηση στον υπολειπόμενο όγκο. Επίσης, συμβάλλουν στην δημιουργία υπερδιάτασης, λόγω της ανάγκης για αναπνοή σε μεγαλύτερους όγκους, ώστε να μειωθεί η στένωση των αεραγωγών με την αύξηση της προς τα έξω έλξης στους ενδοπνευμονικούς αεραγωγούς(79). Αυτές οι αλλαγές αυξάνουν σημαντικά το έργο της αναπνοής: το έργο αντίστασης αυξάνει λόγω των μεγαλύτερων πιέσεων που χρειάζονται για να μετακινηθεί ο αέρας από τους στενωμένους αεραγωγούς, ενώ το ελαστικό έργο αυξάνει λόγω της χαμηλότερης διατασιμότητας του πνεύμονα και του θωρακικού τοιχώματος σε μεγαλύτερους όγκους. Η υπερδιάταση του θώρακα θέτει το διάφραγμα και τους μεσοπλεύριους μύες σε μειονεκτική θέση, γιατί παύουν να λειτουργούν στο καλύτερο τους μήκος σύμφωνα με την καμπύλη μήκους-πίεσης(80). Η αύξηση του έργου της αναπνοής σε συνδυασμό με την απώλεια της αποτελεσματικότητας των αναπνευστικών μυών δημιουργούν κόπωση και μπορεί να οδηγήσουν σε εξάντληση και αναπνευστική ανεπάρκεια.

## **ΒΡΟΓΧΙΚΗ ΥΠΕΡΑΝΤΙΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ**

Το άσθμα σχεδόν πάντοτε συνδέεται με αεραγωγούς που στενεύουν εύκολα ή πολύ σε προκλητικά ερεθίσματα(81). Η δυνατότητα για υπερβολική στένωση των αεραγωγών είναι κλινικά η πιο χαρακτηριστική φυσιολογική διαταραχή στο άσθμα. Ο μηχανισμός για αυτή την υπερβολική αντιδραστικότητα είναι άγνωστος, αλλά μπορεί να οφείλεται σε αλλοιωμένη αντίδραση των λείων μυών των αεραγωγών λόγω αλλαγών στην συσπαστικότητα ή στον φαινότυπό τους(82). Επιπλέον, φλεγμονώδεις αλλαγές στο τοίχωμα των αεραγωγών, ειδικά στην περιβρογχική περιοχή, θα μπορούσε σε μεγάλο

βαθμό να επιδεινώσει την στένωση των αεραγωγών κατά την σύσπαση των λείων μυών (σχήμα 1)(83).

**Σχήμα 1-Μηχανισμοί βρογχικής υπεραντιδραστικότητας**



Η βρογχική υπεραντιδραστικότητα εκτιμάται κλινικά με την παροχή στους αεραγωγούς αυξανόμενων δόσεων φαρμακολογικών ερεθιστικών ουσιών, όπως η ισταμίνη ή η μεταχολίνη-μέχρι που μία παράμετρος της αναπνευστικής λειτουργίας αλλάζει κατά ένα προκαθορισμένο ποσό(81). Πιο συχνά χρησιμοποιείται η μείωση της τιμής της FEV<sub>1</sub> και η βρογχική υπεραντιδραστικότητα εκφράζεται με όρους όπως <<προκλητή συγκέντρωση>> ή <<προκλητή δόση>> που προκαλεί μείωση 20%, η PC<sub>20</sub> ή PD<sub>20</sub>. PC<sub>20</sub> <8χγρ/κεκ για την ισταμίνη ή την μεταχολίνη επιβεβαιώνει την ύπαρξη βρογχικής υπεραντιδραστικότητας που είναι χαρακτηριστική στο άσθμα, αλλά μπορεί να βρεθεί και σε άλλες παθήσεις όπως η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια, η κυστική ίνωση και η αλλεργική ρινίτιδα. Στο άσθμα υπάρχει αδρή αρνητική συσχέτιση μεταξύ της PC<sub>20</sub> ή PD<sub>20</sub> και της βαρύτητας της νόσου(81). Η βρογχική υπεραντιδραστικότητα μπορεί επίσης να φανεί με την αύξηση ή ακόμα την απουσία μέγιστης αντίδρασης, που παρουσιάζεται με επιπέδωση της καμπύλης δόσης-ανταπόκρισης(81). Άλλα προκλητικά ερεθίσματα, όπως η άσκηση, η υπέρπνοια κρύου, ξηρού αέρα και αεροσολών υπερτονικού δ/τος άλατος, απεσταγμένου νερού και αδενοσίνης, δεν έχουν άμεση δράση στους λείους μύες, όπως έχει η ισταμίνη και η μεταχολίνη. Αντιθέτως, πιστεύεται ότι διεγείρουν την απελευθέρωση διαβιβαστών από τα μαστοκύτταρα, από τις νευρικές ίνες ή από άλλα κύτταρα

που εδράζουν στους αεραγωγούς και άρα έχουν το πλεονέκτημα ότι δρουν με τρόπο που προσομοιάζει αυτόν με τον οποίο προκαλείται βρογχόσπασμος στην καθημερινή ζωή(81). Η σύγκριση της βρογχικής υπεραντιδραστικότητας στην ισταμίνη, ένας άμεσος αγωνιστής των λείων μυών, με αυτήν στην αδενοσίνη, που δρα μέσω ενεργοποίησης των μαστοκυττάρων, έχει χρησιμοποιηθεί στην διαφοροδιάγνωση εάν αλλαγές στις μετρήσεις αντιδραστικότητας των αεραγωγών οφείλονται σε απελευθέρωση διαβιβαστών από τα μαστοκύτταρα ή σε αλλαγή της ανταπόκρισης των αεραγωγών σε αυτά.

## **ΛΕΙΟΣ ΜΥΙΚΟΣ ΙΣΤΟΣ**

Κάποιες μετρήσεις ιστονικής σύσπασης των λείων μυών σε άτομα με άσθμα έχουν δείξει μεγάλη σμίκρυνση του μήκους τους(84). Αυτή η αλλαγή στην συσπαστική λειτουργία πιθανά οφείλεται σε αλλαγές στην ελαστικότητα του λείου μυϊκού ιστού ή του εξωκυττάρου χώρου(85). Η αυξημένη συσπαστικότητα που παρουσιάζεται στους ασθενείς με άσθμα φαίνεται να συνδέεται με αυξημένη ταχύτητα σμίκρυνσης του μήκους των ινών(85). Αυτό το φαινόμενο μπορεί να συνοδεύεται από ανάπτυξη του λείου μυϊκού ιστού και/ή από αλλαγές στον φαινότυπο των λείων μυϊκών ινών, με κύτταρα που κυμαίνονται μεταξύ συσπαστικού, εκκριτικού και πολλαπλασιαστικού φαινοτύπου σε αλληλεπίδραση με τα φλεγμονώδη κύτταρα των αεραγωγών(86). Επιπλέον, υπάρχουν ενδείξεις ότι αλλαγές στην οργάνωση των λείων μυϊκών ινών ή στην πλαστικότητά τους μπορεί να διατηρεί την βρογχική υπεραντιδραστικότητα(87). Αυτό δείχνει ότι οι λειτουργικές ιδιότητες των λείων μυών είναι καθοριστικές για τις ιδιότητες των αεραγωγών.

Ο ρόλος της δυναμικής των αεραγωγών υπογραμμίζεται περαιτέρω από την υπόθεση της <<διαταραγμένης ισορροπίας>>, σύμφωνα με την οποία οι λείοι μύες των αεραγωγών στο άσθμα γίνονται άκαμπτοι επειδή δεν τεντώνονται περιοδικά, και έτσι οδηγούν σε επίμονη στένωση των αεραγωγών(88). Ένα τέτοιο είδος <<παγώματος>> και σύσπασης μπορεί να προκύψει μετά από λοίμωξη των αεραγωγών, που οδηγεί σε οίδημα του υποβλενογόννου και αρά σε αποσύνδεση της ελαστικής επαναφοράς από τον λείο μυ των αεραγωγών(88).

Φλεγμονώδεις μεταβιβαστές που απελευθερώνονται από τα μαστοκύτταρα, όπως η τρυπτάση και η ηωσινοφιλική κατιονική πρωτεΐνη-έχει δείξει ότι αυξάνουν την συσπαστική αντίδραση των λείων μυών σε άλλα ερθίσματα, όπως η ισταμίνη. Αυτά τα ευρήματα συνδέουν παράγωγα των

μαστοκυττάρων με την βρογχική υπεραντιδραστικότητα στον άνθρωπο. Το φλεγμονώδες περιβάλλον μπορεί να επηρεάζει άμεσα την συσπαστικότητα των λείων μυών και να έχει δευτερογενείς επιδράσεις μέσω αλλαγών στην γεωμετρία και την μηχανική τους(89).

## **ΥΠΕΡΕΚΚΡΙΣΗ ΒΛΕΝΝΗΣ**

Η χρόνια υπερβολική παραγωγή πτυέλων είναι το χαρακτηριστικό γνώρισμα της χρόνιας βρογχίτιδας, αλλά είναι επίσης χαρακτηριστικό ασθενών με άσθμα που δεν έχουν καπνίσει ποτέ τσιγάρα ή δουλέψει σε επαγγελματικό περιβάλλον με κόνεις. Οι μελέτες έχουν δείξει ότι το 30% των ασθενών με άσθμα αναφέρουν παραγωγή πτυέλων σε καθημερινή βάση και 70% την αναφέρουν ως σημαντικό σύμπτωμα κατά την διάρκεια των κρίσεων(90). Συχνά οι ασθενείς με άσθμα διαγιγνώσκονται ως <<υποτροπιάζουσες οξείες βρογχίτιδες>>. Υπερπλασία των καλυκοειδών κυττάρων και των υποβλεννογόνιων αδένων βρίσκονται συστηματικά στους αεραγωγούς ασθενών με άσθμα, και είναι χαρακτηριστικά της αναδιάταξης των αεραγωγών των ασθενών με άσθμα(91). Διάχυτη απόφραξη των αεραγωγών από βύσματα βλέννης σχεδόν πάντοτε παρατηρείται σε θανατηφόρα κρίση άσθματος και είναι πιθανά ένας σημαντικός λόγος απόφραξης που επιμένει παρά την έντονη βρογχοδιασταλτική αγωγή βαριών κρίσεων(92).

Οι βρογχικές εκκρίσεις ασθενών με άσθμα δεν είναι απλά αυξημένες σε όγκο σε σχέση με φυσιολογικά άτομα. Διαφέρουν επίσης στις ελαστικές και ρεολογικές ιδιότητες. Αυτές οι ποιοτικές και ποσοτικές διαφορές πιστεύεται ότι προκύπτουν τόσο από διήθηση του τοιχώματος των αεραγωγών από φλεγμονώδη κύτταρα όσο και από τις παθολογικές αλλαγές στα εκκριτικά κύτταρα και στα αγγεία του επιθηλίου και του υποβλεννογόνου. Η ανώμαλη πάχυνση και η κολλώδης υφή των εκκρίσεων δεν οφείλονται απλά σε υπερβολική παραγωγή μουκίνης, αλλά επίσης σε συνοθυλεύματα επιθηλιακών κυττάρων, σε διαφυγή αλβουμίνης από τα βρογχικά μικροαγγεία, από ηωσινοφιλικές βασικές πρωτεΐνες και από την παρουσία DNA από λυμένα κύτταρα(93). Αυτές οι αλλαγές ευθύνονται για την περιστασιακή εύρεση εκμαγείων των βρόγχων (σπειροειδή του Curschmann) στα πτύελα ασθενών με άσθμα(94).

Η υπερέκκριση βλέννης στο άσθμα αντανακλά δύο ξεχωριστούς παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς:την μεταπλασία και υπερπλασία των εκκριτικών κυττάρων και την αποκκοκίωση των εκκριτικών κυττάρων. Στους σημαντικούς μεταβιβαστές της μεταπλασίας και υπερπλασίας των

καλυκοειδών κυττάρων που απελευθερώνονται κατά την χαρακτηριστική ασθματική φλεγμονώδη αντίδραση περιλαμβάνονται επιδερμικοί και άλλοι αυξητικοί παράγοντες, IL-4, IL-9 IL-13(95, 96). Η αποκοκκίωση των καλυκοειδών κυττάρων προκαλείται από περιβαλλοντικά ερεθίσματα (καπνός, διοξειδίο του θείου, χλωρίνη και αμμωνία), πιθανά λόγω της τοπικής απελευθέρωσης νευροπεπτιδίων ή της ενεργοποίησης χολινεργικών αντανεκλαστικών. Πιθανά να είναι πιο σημαντική η αποκοκκίωση που προκαλείται από φλεγμονώδεις μεταβιβαστές με εκκριταγωγή δράση, όπως η ουδετεροφιλική ελασάση, η χυμάση των μαστοκυττάρων, τα λευκοτριένια, η ισταμίνη και άλλα προϊόντα των ουδετερόφιλων(97). Η εύρεση ελεύθερης ελασάσης στα πτύελα κατά την διάρκεια κρίσεων άσθματος δείχνει ότι μπορεί να αποτελεί ισχυρό εκκριταγωγό ερέθισμα(98).

### **ΜΗ ΑΝΑΣΤΡΕΨΙΜΗ ΑΠΟΦΡΑΞΗ**

Η πάχυνση του τοιχώματος των αεραγωγών, χαρακτηριστική της αναδιάταξης των αεραγωγών, συμβαίνει σε μεγάλους (με χόνδρο) και σε μικρούς (μεμβρανώδεις) αεραγωγούς και φαίνεται σε παθολογοανατομικές και ραδιογραφικές μελέτες(99). Οι αλλαγές στις ελαστικές ιδιότητες των αεραγωγών και η απώλεια αλληλοστήριξης αγωγών-παρεγχύματος, μαζί με την πάχυνση των αεραγωγών μπορεί να εξηγήσει την παρουσία επίμονης και μη πλήρως αναστρέψιμης στένωσης των αεραγωγών σε μια υποομάδα ασθενών με άσθμα. Οι μηχανισμοί του φαινομένου αυτού βρίσκονται στο επίκεντρο του ενδιαφέροντος, αλλά δεν έχουν καθοριστεί ακόμα. Πιστεύεται ότι συνδέονται με την χρόνια ή υποτροπιάζουσα φλεγμονή, ενώ υπάρχουν ενδείξεις ότι η απώλεια της πνευμονικής λειτουργίας, που αντικατοπτρίζει την αναδιάταξη των αεραγωγών, συμβαίνει ακόμα και στο ήπιο άσθμα πρόσφατης έναρξης, αλλά μπορεί να προληφθεί με την έγκυρη έναρξη αγωγής με εισπνεόμενα κορτικοειδή(100). Επίσης, η σκλήρυνση των λείων μυών συμβάλλει στην ανάπτυξη μη αναστρέψιμης απόφραξης της ροής. Το ποσοστό ασθενών με ήπιο άσθμα που βρίσκονται σε κίνδυνο ανάπτυξης κλινικά σημαντικής, χρόνιας, μη αναστρέψιμης απόφραξης των αεραγωγών είναι άγνωστο.

### **ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ ΑΕΡΙΩΝ ΑΙΜΑΤΟΣ**

Το άσθμα προκαλεί σοβαρές διαταραχές αερισμού-αιμάτωσης κατά τη διάρκεια σοβαρών κρίσεων. Ο βαθμός αρτηριακής υποξαιμίας συσχετίζεται αδρά με την βαρύτητα της απόφραξης των αεραγωγών η οποία δεν είναι ομοιογενής σε όλο τον πνεύμονα. Συχνά, κάποιοι αεραγωγοί είναι πλήρως

αποφραγμένοι, ενώ άλλοι σοβαρά στενωμένοι ή εντελώς ελεύθεροι. Οι διαταραχές αερισμού αιμάτωσης που προκύπτουν αυξάνουν την αρτηριοκυψελιδική διαφορά και ευθύνονται για τιμές πίεσης οξυγόνου 60-69mmHg που τυπικά εμφανίζονται σε κρίσεις άσθματος(101). Η υποκαπνία, που βρίσκεται σχεδόν πάντα σε ήπιες προς μέτριες κρίσεις αντανάκλα την αύξηση στο drive της αναπνοής. Μία αύξηση στην τιμή του αρτηριακού CO<sub>2</sub> δείχνει ότι η απόφραξη των αεραγωγών είναι τόσο βαριά που οι αναπνευστικοί μύες δεν μπορούν να διατηρήσουν την αναπνευστική συχνότητα που ζητείται από το αναπνευστικό drive (κυψελιδικός υποαερισμός). Η περαιτέρω επιδείνωση της απόφραξης των αεραγωγών ή της κόπωσης των αναπνευστικών μυών ή η μείωση στο αναπνευστικό drive, που μπορεί να προκληθεί από χορήγηση κατασταλτικών φαρμάκων, θα οδηγήσει σε περαιτέρω μείωση του κυψελιδικού αερισμού. Η αύξηση του αρτηριακού οξυγόνου τότε θα επιδεινώσει περαιτέρω την απόδοση των αναπνευστικών μυών και θα μειώσει το drive της αναπνοής, οδηγώντας σε αναπνευστική ανεπάρκεια και θάνατο(102). Η αρτηριακή υπερκαπνία δείχνει κρίση πολύ μεγάλης βαρύτητας, που χρειάζεται επιθετική αντιμετώπιση.





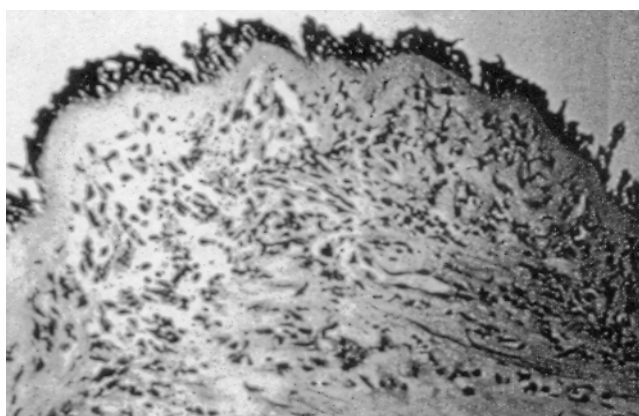
# Κεφάλαιο 5

## ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΤΟΜΙΑ

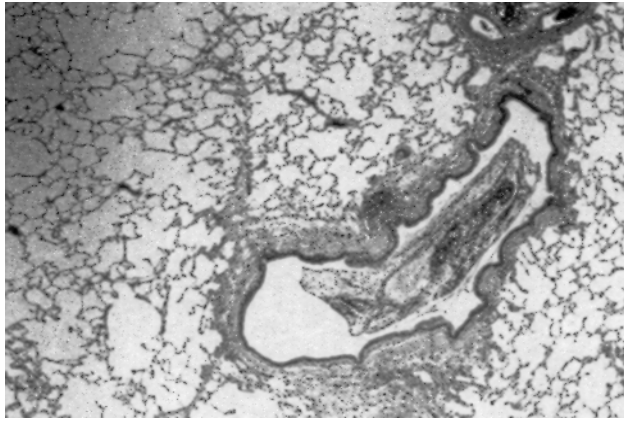
Στο άσθμα παρατηρείται αλλαγή της δομής των αεραγωγών(103). Αυτό το φαινόμενο οφείλεται σε μια ετερογενή διαδικασία, κατά την οποία αλλοιώνεται η σύσταση του συνδετικού ιστού και η αρχιτεκτονική των αεραγωγών, λόγω της αποδιαφοροποίησης, μετανάστευσης, διαφοροποίησης και ωρίμανσης των στηρικτικών κυττάρων(104).

Στους βρόγχους η βασική μεμβράνη είναι φυσιολογικού πάχους, αλλά υπάρχει πάχυνση στην δικτυωτή στιβάδα της μεμβράνης (lamina reticularis) από τα πρώτα στάδια της νόσου. Η πάχυνση προκαλείται από την εναπόθεση ινών κολλαγόνου I, III και V και φιμπρονεκτίνης, που παράγονται από ενεργοποιημένους μωινοβλάστες, οι οποίοι με την σειρά τους προέρχονται από ινοβλάστες που βρίσκονται ακριβώς κάτω από το επιθήλιο(105). Η παρατήρηση ότι αυξημένη εναπόθεση κολλαγόνου στην δικτυωτή στιβάδα συμβαίνει μόνο στο άσθμα, δείχνει ότι αυτή η ανωμαλία συνδέεται στενά με την παθογένεια της νόσου.

**Εικόνα 1-** Ο βρογχικός βλεννογόνος ασθενούς με άσθμα, όπως φαίνεται στο οπτικό μικροσκόπιο. Φαίνεται καθαρά η απώλεια του βρογχικού επιθηλίου και η πάχυνση της δικτυωτής στιβάδας της βασικής μεμβράνης.



**Εικόνα 2-** Βιοψία πνεύμονα ασθενούς με άσθμα, όπως φαίνεται στο οπτικό μικροσκόπιο. Φαίνεται καθαρά η απόφραξη των μικρών αεραγωγών από βύσματα βλέννης και η πάχυνση του τοιχώματος των αεραγωγών, ενώ οι κυψελίδες παραμένουν άθικτες.



Ο συνδυασμός βλάβης στο επιθήλιο, αναγέννησης του επιθηλίου, υπερπαραγωγής προ-ινωτικών αυξητικών παραγόντων (π.χ. TGF-β) και πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης των ινοβλαστών σε μυοινοβλάστες, πιστεύεται ότι διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στην αναδιάταξη των αεραγωγών. Οι ενεργοποιημένοι μυοινοβλάστες παράγουν μία σειρά αυξητικών παραγόντων, χυμοκινών και κυτταροκινών, που επάγουν τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών ινών των αεραγωγών και αυξάνουν την μικροαγγειακή διαπερατότητα και το νευρικό δίκτυο. Επειδή αυτές οι αλλαγές έχουν παρατηρηθεί σε παιδιά πριν την έναρξη του άσθματος, έχει προταθεί ότι η ενεργοποίηση της μεσεγχυματικής επιθηλιακής τροφικής μονάδας σε συνδυασμό με την φλεγμονή είναι αυτό που διαφοροποιεί την ανθρώπινη νόσο από την σχετικά οξεία αλλεργική φλεγμονώδη αντίδραση που παρατηρείται σε ζωικά μοντέλα της νόσου. Εναπόθεση μορίων του διάμεσου χώρου, όπως οι πρωτεογλυκάνες, βαθιά στο τοίχωμα των αεραγωγών έχει παρατηρηθεί σε ασθενείς που έχουν πεθάνει από άσθμα και η έκτασή της αυξάνει με την διάρκεια της νόσου.

Ο εξωκυττάριος διάμεσος χώρος είναι μια δυναμική κατασκευή που χαρακτηρίζεται υπό φυσιολογικές συνθήκες από ισορροπία μεταξύ της σύνθεσης και αποδόμησης των συστατικών του μορίων. Οι μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMP) που αποδομούν μόρια του εξωκυττάριου χώρου (MMP-2, MMP-9) έχουν ιδιαίτερη σημασία σε αυτή την διαδικασία, όπως και οι αντίστοιχοι αναστολείς τους, οι ιστικοί αναστολείς μεταλλοπρωτεϊνών -1 και -2 (TIMP-1, TIMP-2). Οι μεταλλοπρωτεϊνάσες έχουν επίσης εμπλακεί στην αγγειογένεση και στην υπερπλασία των λείων μυϊκών ινών μέσω της απελευθέρωσης ενεργών μορφών αυξητικών παραγόντων, ενώ ακόμα παίζουν σημαντικό ρόλο στην μετακίνηση φλεγμονωδών και στηρικτικών κυττάρων.

Μόρια του εξωκυττάριου χώρου επίσης αντιδρούν με φλεγμονώδη κύτταρα. Οι πρωτεογλυκάνες επίσης χρησιμοποιούνται για την αποθήκευση κυτταροκινών και αυξητικών παραγόντων, ως παγίδες για νερό, προκαλώντας οίδημα ιστού, ως συνδετικά μορίων προσκολλητικότητας των φλεγμονωδών κυττάρων, ενώ αυξάνουν την απελευθέρωση μεταβιβαστών και επάγουν την σύνθεση πρωτεϊνών του εξωκυττάριου χώρου(106-108).

Υπερτροφία και υπερπλασία των λείων μυϊκών ινών, των καλυκοειδών κυττάρων και των υποβλεννογόνιων αδένων συμβαίνει στους βρόγχους ανθρώπων με άσθμα, ειδικά σε αυτούς με χρόνια και βαριά νόσο. Γενικά, οι αεραγωγοί στο άσθμα παρουσιάζουν διάφορες δομικές αλλαγές που συνολικά συμβάλλουν στην γενική αύξηση του πάχους του τοιχώματος των αεραγωγών. Για χρόνια το άσθμα θεωρούταν μία πάθηση με αναστρέψιμη απόφραξη των αεραγωγών. Στην πλειονότητα των ασθενών ακόμα και μακροχρόνιες ανωμαλίες της FEV<sub>1</sub> αναστρέφονται μετά από θεραπεία με εισπνεόμενα κορτικοειδή. Ωστόσο, σε πολλούς ασθενείς με άσθμα υπάρχει περιορισμός της ροής στους αεραγωγούς, ακόμα και μετά από τέτοια αγωγή, ακόμα και σε ασυμπτωματικούς ασθενείς. Το παραπάνω πιθανά οφείλεται στην αναδιάταξη των αεραγωγών. Η αναδιάταξη των αεραγωγών μπορεί να είναι επίσης σημαντική στην παθογένεια της μη ειδικής βρογχικής υπεραντιδραστικότητας, ειδικά όταν αυτή αναστρέφεται πολύ αργά (σε 1-2 έτη) ή ημιτελώς μετά από αγωγή με εισπνεόμενα κορτικοειδή(109).



# Κεφάλαιο 6

## ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ

### ΙΣΤΟΡΙΚΟ ΚΑΙ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΟΛΟΓΙΑ

Η κλινική διάγνωση του άσθματος συχνά τίθεται από συμπτώματα όπως η δύσπνοια, ο συριγμός και το σφίξιμο στο στήθος. Η εποχική μεταβλητότητα των συμπτωμάτων και το θετικό οικογενειακό ιστορικό άσθματος και ατοπικής νόσου είναι επίσης χρήσιμοι διαγνωστικοί οδηγοί.

Στον πίνακα 1 βλέπουμε τις τυπικές ερωτήσεις που πρέπει να τίθενται σε έναν ασθενή με την υποψία άσθματος. Στον πίνακα 2 παρουσιάζεται ένα ερωτηματολόγιο που χρησιμοποιείται συχνά για την διάγνωση του άσθματος σε επιδημιολογικές μελέτες(110, 111). Η καταγραφή των συμπτωμάτων και της πνευμονικής λειτουργίας είναι σημαντικές παράμετροι στην εκτίμηση των χαρακτηριστικών του άσθματος του ασθενούς. Διάφορα συστήματα μέτρησης των συμπτωμάτων έχουν αναπτυχθεί, ώστε να ποσοτικοποιηθεί ο έλεγχος του άσθματος και η ποιότητα ζωής του ασθενούς(112-114). Τα συστήματα αυτά θα πρέπει να προσαρμόζονται στην ηλικία και στο πολιτιστικό υπόβαθρο του ασθενούς.

#### Πίνακας 1- Τυπικές ερωτήσεις για τη διάγνωση του άσθματος

- Είχε ο ασθενής ένα ή επαναλαμβανόμενα επεισόδια συριγμού;
- Ο ασθενής παρουσιάζει παροξυσμικό νυκτερινό βήχα;
- Ο ασθενής παρουσιάζει συριγμό, ή βήχα μετά από άσκηση;
- Ο ασθενής παρουσιάζει συριγμό, ή σφίξιμο στο στήθος, ή βήχα μετά από έκθεση σε αλλεργιογόνα ή ρύπους;
- Ο ασθενής παρουσιάζει συχνά λοιμώξεις του κατώτερου αναπνευστικού που χρειάζονται περισσότερες από 10 ημέρες να ιαθούν;
- Τα συμπτώματα υποχωρούν μετά από κατάλληλη αντι-ασθματική αγωγή;

## Πίνακας 2- Ερωτηματολόγιο άσθματος της Διεθνούς Ένωσης Κατά της Φυματίωσης και Ασθενειών του Πνεύμονα (IUATLD)

- Είχατε ποτέ συριγμό ή αίσθημα σφιξίματος στο στήθος;
- Είχατε ποτέ επεισόδιο δύσπνοιας μετά από έντονη άσκηση;
- Έχετε ξυπνήσει ποτέ λόγω συριγμού;
- Έχετε ξυπνήσει ποτέ λόγω παροξυσμικού βήχα;
- Είχατε ποτέ επεισόδιο δύσπνοιας ενώ βρισκόσασταν σε ηρεμία;

### ΦΥΣΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ

Επειδή η συμπτωματολογία του άσθματος ποικίλει, η φυσική εξέταση του αναπνευστικού συστήματος μπορεί να είναι φυσιολογική. Το πιο συχνό εύρημα κατά την ακρόαση του θώρακα είναι οι μουσικοί ήχοι. Ωστόσο, κάποιοι ασθενείς με άσθμα μπορεί να έχουν φυσιολογική ακρόαση θώρακα, παρά την σημαντική απόφραξη των αεραγωγών.

Κλινικά συμπτώματα όπως η δύσπνοια, η απόφραξη των αεραγωγών (μουσικοί ήχοι) και η υπερδιάταση των πνευμόνων είναι πιο πιθανό να παρουσιάζονται όταν οι ασθενείς βρίσκονται σε συμπτωματική περίοδο. Κατά τη διάρκεια μίας κρίσης άσθματος η σύσπωση των λείων μυϊκών ινών, το οίδημα και η υπερέκκριση βλέννης, τείνουν να κλείσουν τους μικρούς αεραγωγούς (οι οποίοι δεν περιβάλλονται από χονδρικό ιστό). Για να αντεπεξέλθει ο ασθενής αναπνέει σε υψηλότερους πνευμονικούς όγκους, ώστε να αυξήσει την προς τα έξω έλξη του τοιχώματος των αεραγωγών και να τους διατηρήσει ανοικτούς. Άρα, όσο πιο βαριά είναι η απόφραξη των αεραγωγών, τόσο πιο έντονη η τάση τους για σύγκλιση και τόσο μεγαλύτερος πρέπει να είναι ο πνευμονικός όγκος για να διατηρηθούν οι αεραγωγοί ανοικτοί. Ο συνδυασμός της υπερδιάτασης των πνευμόνων με την βαριά απόφραξη των αεραγωγών στην κρίση του άσθματος αυξάνει σε πολύ μεγάλο βαθμό το έργο της αναπνοής.

Αν και οι μουσικοί ήχοι είναι το πιο συχνό φυσικό εύρημα στο άσθμα, μπορεί να απουσιάζει σε βαριά κρίση άσθματος. Ωστόσο, ο ασθενής σε αυτήν την κατάσταση συνήθως παρουσιάζει άλλα φυσικά ευρήματα βαρύτητας, όπως η κυάνωση, η βυθιότητα, η δυσκολία στην ομιλία, η ταχυκαρδία, η διάταση του θώρακα, η χρήση επικουρικών αναπνευστικών μυών και η εισόλη των μεσοπλεύριων διαστημάτων.

## ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

### Πνευμονικός λειτουργικός έλεγχος.

Οι ασθενείς με άσθμα συχνά δεν αναγνωρίζουν τα συμπτώματά τους και την σοβαρότητα αυτών, ειδικά στην περίπτωση του χρόνιου βαρέως άσθματος(115). Η εκτίμηση συμπτωμάτων όπως η δύσπνοια και ο συριγμός από τους ιατρούς είναι επίσης συχνά ανακριβής. Οι μετρήσεις της πνευμονικής λειτουργίας, και ειδικά της αναστρεψιμότητας των διαταραχών αυτής, παρέχουν άμεση εκτίμηση της απόφραξης των αεραγωγών. Οι μετρήσεις της μεταβλητότητας της πνευμονικής λειτουργίας παρέχουν έμμεση εκτίμηση της βρογχικής υπεραντιδραστικότητας. Ωστόσο, αν και κάποια συσχέτιση έχει βρεθεί ανάμεσα σε εργαστηριακούς δείκτες βρογχικής υπεραντιδραστικότητας και στην ημερήσια διακύμανση της μέγιστης εκπνευστικής ροής (PEF), η μία δεν μπορεί να αντικαταστήσει την άλλη(116). Για παράδειγμα, η ημερήσια διακύμανση της PEF μπορεί να ανταποκριθεί γρήγορα στην χορήγηση γλυκοκορτικοειδών, ενώ η ανταπόκριση στην ισταμίνη ή την μεταχολίνη βελτιώνεται αργότερα(117). Βέβαια, οι μετρήσεις της απόφραξης των αεραγωγών, της αναστρεψιμότητά της και της μεταβλητότητά της θεωρούνται βασικές στην διάγνωση του άσθματος. Σε αυτές τις μετρήσεις στηρίζονται οι νέες θεραπευτικές στρατηγικές του άσθματος και η θέσπιση των νέων οδηγιών για το άσθμα. Ο πνευμονικός λειτουργικός έλεγχος για την διάγνωση και την παρακολούθηση του άσθματος αντιστοιχεί με τον έλεγχο άλλων χρόνιων παθήσεων. Για παράδειγμα, με την μέτρηση της αρτηριακής πίεσης με ένα σφυγμομανόμετρο για την διάγνωση και παρακολούθηση της αρτηριακής υπέρτασης, και με την μέτρηση του σακχάρου του αίματος για την διάγνωση και την παρακολούθηση του σακχαρώδους διαβήτη.

Υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός μεθόδων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εκτίμηση της βαρύτητας της απόφραξης των αεραγωγών, αλλά δύο μέθοδοι είναι κυρίως αποδεκτές για ασθενείς μεγαλύτερους των 5 ετών. Πρόκειται για την μέτρηση του βίαια εκπνεόμενου όγκου σε 1 δευτερόλεπτο (FEV<sub>1</sub>) και της αντίστοιχης ζωτικής χωρητικότητας (FVC), και για την μέτρηση της PEF. Και οι δύο αυτές μετρήσεις βασίζονται στην λογική ότι ο περιορισμός της ροής στους αεραγωγούς σχετίζεται απευθείας με το μέγεθος του αυλού των αεραγωγών και με τις ελαστικές ιδιότητες του περιβάλλοντος ιστού.

Σπιρομέτρηση. Η μέτρηση των FEV<sub>1</sub> και FVC γίνεται κατά την διάρκεια βίαιης εκπνευστικής προσπάθειας χρησιμοποιώντας ένα σπιρόμετρο. Οδηγίες για τη τεχνική της σπιρομέτρησης έχουν δημοσιευθεί(118, 119). Όταν αυτές ακολουθούνται, η σπιρομέτρηση έχει μεγάλη επαναληψιμότητα, αλλά εξαρτάται πάντοτε από την προσπάθεια του ατόμου. Κατά συνέπεια κατευθυντήριες οδηγίες για τον τρόπο διεξαγωγής της βίαιης εκπνευστικής προσπάθειας θα πρέπει οπωσδήποτε να δίνονται στον ασθενή και η καλύτερη από δύο ή τρεις προσπάθειες να καταγράφεται. Η δοκιμασία χάνει την αξιοπιστία της για τιμές της FEV<sub>1</sub> μικρότερες του 1 λίτρου. Οι προβλεπόμενες τιμές για την FEV<sub>1</sub>, την FVC και την PEF βασίζονται στην ηλικία, το φύλο και το ύψος και εξάγονται από μελέτες μεγάλου πληθυσμού ατόμων. Αν και συνεχώς ανανεώνονται, αποτελούν χρήσιμη βάση πάνω στην οποία μπορεί κάποιος να στηριχθεί για να αποφασίσει εάν μία τιμή είναι φυσιολογική ή όχι. Είναι σημαντικό οι προβλεπόμενες τιμές των FEV<sub>1</sub>, FVC και PEF να λαμβάνουν υπ'όψιν εθνικά χαρακτηριστικά και ακραίες ηλικίες. Επειδή και άλλες παθήσεις εκτός αυτών που προκαλούν απόφραξη στους αεραγωγούς μπορεί να οδηγήσουν σε μείωση της FEV<sub>1</sub>, ένας χρήσιμος τρόπος εκτίμησης της απόφραξης των αεραγωγών είναι ο υπολογισμός του λόγου FEV<sub>1</sub> προς FVC. Στον φυσιολογικό πνεύμονα η μείωση της ροής των αεραγωγών στην βίαιη εκπνοή συνεπάγεται λόγο FEV<sub>1</sub> προς FVC μεγαλύτερο του 80% και στα παιδιά μεγαλύτερο του 90%. Οποιοσδήποτε τιμές μικρότερες από αυτές πιθανολογούν περιορισμό της ροής των αεραγωγών.

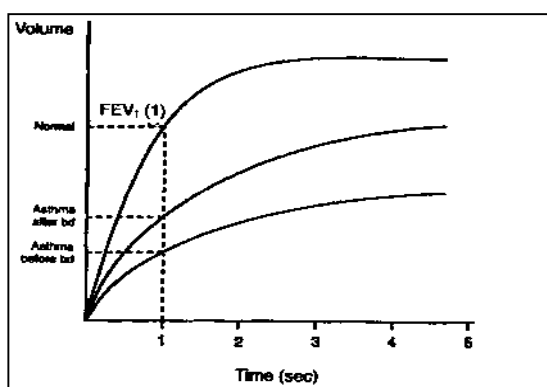
Η σπιρομέτρηση είναι χρήσιμη για την διάγνωση του άσθματος όταν υπάρχει τουλάχιστον 12% βελτίωση της FEV<sub>1</sub> είτε αυτόματα είτε μετά την χορήγηση εισπνεόμενου βρογχοδιασταλτικού ή γλυκοκορτικοειδών(120). Είναι επίσης χρήσιμη για την καταγραφή της εξέλιξης του άσθματος, κυρίως στην κλινική πράξη, γιατί η συσκευή είναι κάπως δύσχρηστη και ακριβή. Υπάρχουν μικρά φορητά ηλεκτρονικά σπιρόμετρα, αλλά το υψηλό κόστος περιορίζει την ευρεία τους αποδοχή. Ανεξάρτητα από αυτούς τους περιορισμούς, η καταγραφή της σπιρομέτρησης συμβάλλει σημαντικά στην διάγνωση του άσθματος και στην εκτίμηση της βαρύτητάς του, και οι περιοδικές μετρήσεις (ανάλογα με την βαρύτητα της νόσου) βοηθούν στην μακροχρόνια παρακολούθηση της εξέλιξης του άσθματος και της ανταπόκρισής του στις θεραπευτικές παρεμβάσεις. Η σπιρομέτρηση, σε αντίθεση με την μέτρηση της PEF, είναι ιδιαίτερος χρήσιμη στην εκτίμηση της βελτίωσης ασθενών με ιδιαίτερος επιβαρημένη αναπνευστική λειτουργία (π.χ.



ηλικιωμένα άτομα με άσθμα και ΧΑΠ) επειδή οι τιμές της PEF μπορεί να διατηρούνται σε καλά επίπεδα σε αυτούς τους ασθενείς σε σχέση με τις πολύ μειωμένες σπιρομετρικές τιμές.

Στο παρακάτω σχήμα βλέπουμε τα τυπικά σπιρογραφήματα ενός φυσιολογικού ασθενούς και ενός ασθενούς με άσθμα πριν και μετά την χορήγηση βρογχοδιαστολής.

**Σχήμα 1-** Σπιρογράφημα ενός φυσιολογικού ασθενούς, ενός ασθενούς με άσθμα και ενός ασθενούς με άσθμα μετά την χορήγηση βρογχοδιαστολής (bd).



Ροομετρία. Πολύ μεγάλη βοήθεια στην διάγνωση και θεραπεία του άσθματος παρέχει η μέτρηση της PEF (ροομετρία). Σε πολλές χώρες, όπως και στην Ελλάδα, τα ροόμετρα είναι εύκολά διαθέσιμα με μία απλή συνταγή ιατρού. Υπάρχουν συσκευές φθηνές, φορητές, πλαστικές και ιδανικές για καθημερινή κατ οίκον χρήση από ασθενείς για την παρακολούθηση της νόσου τους.

Τα ροόμετρα είναι χρησιμοποιούνται και στην κλινική πράξη για την διάγνωση του άσθματος. Μία τουλάχιστον 15% βελτίωση της PEF μετά από χορήγηση εισπνεόμενων βρογχοδιασταλτικών ή γλυκοκορτικοειδών είναι υπέρ της διάγνωσης του άσθματος(121). Τα ροόμετρα είναι επίσης χρήσιμα για την επίβλεψη του άσθματος, όταν η σπιρομέτρηση είναι αδύνατη. Τέλος, η τακτική παρακολούθηση της PEF μπορεί να βοηθήσει τον ασθενή στην έγκαιρη αναγνώριση πρώιμων συμπτωμάτων επιδείνωσης του άσθματος. Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι η καταγραφή των συμπτωμάτων των ασθενών είναι αναξιόπιστος δείκτης της μείωσης της ροής των αεραγωγών(122). Η πτωχή αντίληψη της σοβαρότητας του άσθματος από τον ασθενή ή τους ιατρούς είναι ένας κύριος λόγος που προκαλεί καθυστέρηση στην έναρξη θεραπευτικής αγωγής και ο οποίος συμβάλλει σε αυξημένη σοβαρότητα και θνησιμότητα από τις εξάρσεις άσθματος(123). Τα ανωτέρω

δεν ισχύουν για όλους τους ασθενείς. Μία μελέτη έδειξε ότι τα συμπτώματα προηγούνται της μείωσης της αναπνευστικής λειτουργίας(124).

Είναι σημαντικό να γίνει κατανοητό ότι οι μετρήσεις της PEF δεν συσχετίζονται πάντοτε με άλλες μετρήσεις της αναπνευστικής λειτουργίας και δεν χρησιμοποιούνται πάντα εναλλακτικά με αυτές στη εκτίμηση της βαρύτητας του άσθματος(125). Για παράδειγμα, στα παιδιά η PEF μπορεί να παραμείνει φυσιολογική, ενώ η απόφραξη των αεραγωγών και η ανταλλαγή των αερίων επιδεινώνονται. Επομένως, η PEF μπορεί να υποεκτιμήσει την σοβαρότητα της απόφραξης των αεραγωγών(126). Επίσης, στα παιδιά οι μετρήσεις της PEF δεν συσχετίζονται πάντα με τα συμπτώματα ή άλλες παραμέτρους βαρύτητας της νόσου(127). Για αυτό συνίσταται οι μετρήσεις PEF του κάθε ασθενούς να συγκρίνονται με τις καλύτερες προηγούμενες μετρήσεις του.

Πρέπει να δίνονται προσεκτικά οδηγίες στον ασθενή ώστε η μέτρηση της PEF να είναι αξιολογήσιμη, εφόσον εξαρτάται, όπως και οι FEV<sub>1</sub>, FVC, από την προσπάθεια του ασθενούς. Το ροόμετρο μπορεί να χρησιμοποιηθεί τακτικά για διάρκεια εβδομάδων και μηνών, ώστε να βοηθήσει στην εκτίμηση της βαρύτητας του άσθματος και στην παρακολούθηση της ανταπόκρισης στην θεραπεία. Η βαρύτητα του άσθματος δεν αντικατοπτρίζεται μόνο στην βαρύτητα της απόφραξης των αεραγωγών σε σταθερή κατάσταση, αλλά και στις μεταβολές αυτής, ειδικά εντός 24 ωρών. Ιδανικό είναι η PEF να μετράται νωρίς το πρωί όταν οι τιμές είναι οι χαμηλότερες και αργά το βράδυ όταν είναι υψηλότερες.

Μία μέθοδος περιγραφής της ημερήσιας διακύμανσης της PEF είναι το εύρος της διακύμανσης (η διαφορά μεταξύ της προ βρογχοδιαστολής πρωινής τιμής και της μετα βρογχοδιαστολής βραδυνής τιμής το προηγούμενο βράδυ), εκφραζόμενο ως ποσοστό της μέσης ημερήσιας τιμής PEF(128). Μία άλλη μέθοδος είναι η ελάχιστη πρωινή προ βρογχοδιαστολής τιμή PEF για μία εβδομάδα, εκφραζόμενη ως ποσοστό της πρόσφατης καλύτερης τιμής(129). Αυτή η τελευταία μέθοδος θεωρείται και καλύτερη γιατί χρειάζεται μία φορά την ημέρα μέτρηση, συσχετίζεται καλύτερα από οποιαδήποτε άλλη παράμετρο με την βρογχική υπεραντιδραστικότητα και ο υπολογισμός είναι απλός(129).

Ημερήσια διακύμανση της PEF μεγαλύτερη από 20% θεωρείται διαγνωστική για το άσθμα και το μέγεθος της διακύμανσης είναι σε μεγάλο βαθμό ανάλογο με την βαρύτητα του άσθματος(128). Ωστόσο, στο ήπιο

διαλλείπον άσθμα ή σε σοβαρή νόσο, η διακύμανση της PEF μπορεί να μην είναι παρούσα ή να έχει χαθεί. Στο σοβαρό άσθμα η διακύμανση της PEF και η αναστρεψιμότητά μπορεί να εμφανιστούν μετά από δοκιμή με γλυκοκορτικοειδή. Ακόμη και σε αυτή την περίπτωση, στις πιο βαριές μορφές νόσου μπορεί να χρειαστούν πολλές εβδομάδες θεραπείας πριν η αναστρεψιμότητα εμφανιστεί.

Χρησιμοποιώντας ένα συνδυασμό καταγραφής συμπτωμάτων και μέτρησης της PEF, οι ασθενείς μπορεί να εφαρμόζουν οδηγίες θεραπευτικής αγωγής ανάλογα με την βαρύτητα της νόσου και η πορεία του άσθματος καταγράφεται με πιο αποτελεσματικό τρόπο(130). Επιπλέον, ο ασθενής συμμορφώνεται καλύτερα με την θεραπευτική αγωγή όταν βλέπει ο ίδιος την ανταπόκρισή του σε αυτή.

Αν και η μακροχρόνια μέτρηση της PEF για τους περισσότερους ασθενείς με επίμονο άσθμα είναι πολύτιμη, αυτό δεν είναι πάντοτε εύκολο, για λόγους κόστους, συνεργασίας και διαθεσιμότητας ροομέτρων. Ωστόσο, η βραχυχρόνια μέτρηση συνίσταται ιδιαίτερα ώστε να τεθεί η διάγνωση, να αναγνωριστούν αίτια που προκαλούν κρίσεις άσθματος και να εκτιμηθεί η ανταπόκριση στην θεραπεία. Η μακροχρόνια μέτρηση της PEF συνίσταται στο βαρύ άσθμα, στους ασθενείς που δεν μπορούν να αντιληφθούν αλλαγές στην βαρύτητα και σε αυτούς που έχουν νοσηλευτεί στο παρελθόν λόγω άσθματος.

Οι μετρήσεις της PEF δεν χρειάζονται μόνο για την διάγνωση του άσθματος και την κατάταξη της βαρύτητας αυτού, αλλά και για την ανακάλυψη επαγγελματικών αιτιών άσθματος. Όταν χρησιμοποιείται για αυτό τον λόγο η PEF θα έπρεπε να μετράται περισσότερες φορές από 2 την ημέρα και ιδιαίτερη προσοχή θα πρέπει να δοθεί σε αλλαγές εντός και εκτός του επαγγελματικού χώρου(131).

Εάν παρά την παρουσία μη συχνών συμπτωμάτων οι ανωτέρω δοκιμασίες δεν μπορούν να υποστηρίξουν την διάγνωση του άσθματος, συνίσταται η επίβλεψη με περιοδικές μετρήσεις, έως ότου παρθεί ξεκάθαρα μία διαγνωστική απόφαση. Σε αυτές τις περιπτώσεις, ο ιατρός οφείλει να δώσει ιδιαίτερη σημασία στο οικογενειακό ιστορικό του ασθενούς, στην ηλικία, σε πιθανά αίτια άσθματος, πριν αποφασίσει για την διάγνωση ή την θεραπευτική αγωγή. Όταν υπάρχει αμφιβολία, μία δοκιμαστική αγωγή με βραχείας δράσης β2 αγωνιστές κατ'επίκλιση και με εισπνεόμενα κορτικοειδή θεωρείται ο πιο ενδεδειγμένος τρόπος για να τεθεί η διάγνωση του άσθματος, ειδικά εάν συνοδεύεται από παρακολούθηση της PEF. Η γνώση της

βαρύτητας της δυσλειτουργίας του πνεύμονα (όπως με την καθημερινή παρακολούθηση της PEF) για ένα χρονικό διάστημα, όχι μόνο εντοπίζει επαγγελματικά αίτια που σχετίζονται με το άσθμα, αλλά παρέχει επίσης κριτήρια για την εκτίμηση της βαρύτητας του άσθματος, πληροφορίες για τυχόν περιβαλλοντικές επιδράσεις και συμβάλλει στην παρακολούθηση της ανταπόκρισης στην αγωγή.

Ο ιατρός πρέπει πάντοτε να αισθάνεται σίγουρος όταν θέτει την διάγνωση του άσθματος διότι οι συνέπειες για τον ασθενή είναι σημαντικές και συνήθως έχουν επιπτώσεις για όλη τη διάρκεια της ζωής του. Οι προϋποθέσεις για την επιβεβαίωση της διάγνωσης σε ασθενείς με βαριά συμπτώματα και πολύ επιβαρημένη αναπνευστική λειτουργία διαφέρουν από αυτές που χρειάζονται για ασυμπτωματικούς ασθενείς.

### **Μετρήσεις βρογχικής υπεραντιδραστικότητας**

Για ασθενείς με συμπτώματα συμβατά με το άσθμα, αλλά φυσιολογική αναπνευστική λειτουργία, η μέτρηση της αντιδραστικότητας των αεραγωγών στην μεταχολίνη, στην ισταμίνη, ή στην άσκηση μπορεί να βοηθήσει στην θέσπιση της διάγνωσης του άσθματος(132). Αυτές οι μετρήσεις είναι ευαίσθητες, αλλά μη ειδικές για την διάγνωση του άσθματος. Αυτό σημαίνει ότι μία αρνητική δοκιμασία μπορεί να είναι χρήσιμη για τον αποκλεισμό της διάγνωσης του επίμονου άσθματος, αλλά μία θετική δοκιμασία δεν σημαίνει πάντοτε ότι ο ασθενής έχει άσθμα. Αυτό συμβαίνει γιατί η βρογχική υπεραντιδραστικότητα έχει περιγραφεί σε ασθενείς με αλλεργική ρινίτιδα και σε ασθενείς που η απόφραξη των αεραγωγών προκαλείται από άλλες καταστάσεις εκτός του άσθματος, όπως η κυστική ίνωση, οι βρογχεκτασίες, και η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια(133-135).

### **Μη επεμβατικοί δείκτες φλεγμονής**

Η εκτίμηση της φλεγμονής στους αεραγωγούς των ασθενών με άσθμα μπορεί να γίνει με την εξέταση αυτόματα ή προκλητά παραγόμενων πτυέλων(136). Επιπλέον, επίπεδα του εκπνεόμενο νιτρικού οξέως (NO) ή του μονοξειδίου του άνθρακα (CO) έχουν προταθεί σε μη επεμβατικοί δείκτες φλεγμονής στο άσθμα(137, 138). Τα επίπεδα του εκπνεόμενου NO και CO είναι υψηλά σε ασθενείς με άσθμα (που δεν λαμβάνουν εισπνεόμενα κορτικοειδή) σε σχέση με ασθενείς χωρίς άσθμα, ωστόσο αυτά τα ευρήματα δεν είναι ειδικά για το άσθμα. Ούτε η ηωσινοφιλία στα πτύελα, ούτε τα εκπνεόμενα αέρια έχουν ακόμα εκτιμηθεί προοπτικά σαν βοήθεια στην διάγνωση του άσθματος.

Υπάρχει ανάγκη να αναπτυχθούν περαιτέρω μη επεμβατικές ειδικές μετρήσεις της φλεγμονής των αεραγωγών.

### **Αλλεργικές δοκιμασίες**

Η παρουσία αλλεργικού στοιχείου στο άσθμα μπορεί να ανιχνευθεί με τις δερματικές δοκιμασίες ή με μέτρηση των ειδικών IgE στον ορό. Αν και αυτές οι δοκιμασίες βοηθούν λίγο στην διάγνωση του άσθματος, βοηθούν στην εντόπιση παραγόντων κινδύνου, ώστε να ληφθούν τα απαραίτητα προληπτικά μέτρα. Πρόκληση των αεραγωγών με το ύποπτο αλλεργιογόνο ή παράγοντα ευαισθητοποίησης μπορεί να βοηθήσει στην εύρεση του αιτίου, ειδικά στην περίπτωση του επαγγελματικού άσθματος, αλλά δε συνίσταται να γίνεται ως ρουτίνα, επειδή συχνά δε χρησιμεύει στο να τεθεί διάγνωση, και επίσης για λόγους ασφάλειας(131).

Οι δερματικές δοκιμασίες με αλλεργιογόνα αποτελούν το πιο ισχυρό διαγνωστικό εργαλείο ατοπίας. Τα skin-prick test είναι τα συχνότερα χρησιμοποιούμενα. Τα χαρακτηριστικά τους-απλότητα, ταχύτητα, οικονομία και μεγάλη ειδικότητα- δικαιολογούν την θέση τους. Ωστόσο, όταν δεν πραγματοποιούνται σωστά οδηγούν σε ψευδώς θετικά ή αρνητικά αποτελέσματα. Η μέτρηση των ειδικών IgE στον ορό δεν υπερβαίνει τις δερματικές δοκιμασίες και είναι περισσότερο ακριβή. Ο κύριος περιορισμός αυτής της μεθόδου είναι ότι μία θετική δοκιμασία δεν σημαίνει ότι η φύση του άσθματος είναι αλλεργική απαραίτητα, αφού πολλά άτομα έχουν ειδικές IgE στον ορό χωρίς συμπτώματα. Η σχετική έκθεση και ο συσχετισμός της με τα συμπτώματα πρέπει να επιβεβαιώνεται από το ιστορικό του ασθενούς. Η μέτρηση της ολικής IgE ορού δεν βοηθάει στην διάγνωση της ατοπίας.

### **ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΣΤΟΥΣ ΗΛΙΚΙΩΜΕΝΟΥΣ**

Μία ιδιαίτερη ομάδα ασθενών στην οποία η διάγνωση του άσθματος συχνά χάνεται είναι οι ηλικιωμένοι(139). Αν και η πνευμονική βλάβη από το κάπνισμα ή από την παρατεταμένη έκθεση σε εισπνεόμενα τοξικά αέρια ή κόνεις, μπορεί να οδηγήσει σε παθήσεις όπως η βρογχίτιδα, το εμφύσημα ή η πνευμονική ίνωση σε αυτή την ηλικιακή ομάδα, σήμερα αναγνωρίζεται όλο και περισσότερο ότι το αδιάγνωστο άσθμα αποτελεί συχνή αιτία αναπνευστικών συμπτωμάτων. Ένας παράγοντας που περιπλέκει την διάγνωση είναι η δυσκολία των ηλικιωμένων ατόμων στην εκτέλεση των δοκιμασιών της πνευμονικής λειτουργίας, συμπεριλαμβανομένης της μέτρησης της PEF. Αυτό σημαίνει ότι η διάγνωση του άσθματος ή της χρόνιας βρογχίτιδας θα πρέπει να στηρίζεται κυρίως στην συμπτωματολογία.

Το όψιμα εμφανιζόμενο άσθμα συχνά εμφανίζεται στα πλαίσια αγγειίτιδας και έντονης ηωσινοφιλίας (Churg-Strauss σύνδρομο). Στους πιο ηλικιωμένους ασθενείς το άσθμα μπορεί να συνυπάρχει με βρογχοπνευμονική ασπεργίλλωση. Χαρακτηριστικά, το όψιμο άσθμα δεν σχετίζεται με ειδική ευαισθητοποίηση σε αλλεργιογόνα.

Σε μεγάλες ηλικίες το κάπνισμα και τα υψηλά επίπεδα IgE ορού είναι ανεξάρτητοι παράγοντες χρόνιας απόφραξης στους αεραγωγούς, αν και πιθανά αλληλεπιδρούν μεταξύ τους(140). Αυτό έχει οδηγήσει στην άποψη ότι η ΧΑΠ, η οποία συνδέεται με ιστορικό καπνίσματος, μπορεί να έχει σημαντικούς φλεγμονώδεις παράγοντες, που ανταποκρίνονται σε αντιφλεγμονώδη αγωγή, κάνοντας ασαφή τα όρια μεταξύ άσθματος και άλλων μορφών αποφρακτικής πνευμονοπάθειας. Όταν υπάρχει αμφιβολία, μία δοκιμή με γλυκοκορτικοειδή που προκαλεί μεγαλύτερη από 12% βελτίωση στην FEV1 ή μεγαλύτερη από 15% βελτίωση στην PEF και συνοδεύεται από βελτίωση των συμπτωμάτων και από μειωμένη ανάγκη για χρήση βρογχοδιασταλτικών, συνήθως επιβεβαιώνουν ότι το άσθμα είναι η αιτία των χρόνιων αναπνευστικών συμπτωμάτων.

Οι ηλικιωμένοι παρουσιάζουν συχνά επεισόδια συριγμού, δύσπνοιας, και βήχα, λόγω ανεπάρκειας της αριστερής κοιλίας (που μερικοί ονομάζουν λανθασμένα καρδιακό άσθμα)(139). Η παρουσία αυξημένων συμπτωμάτων με την άσκηση και την νύχτα μπορεί να προκαλέσει διαγνωστική σύγχυση. Η προσεκτική λήψη ιστορικού και η φυσική εξέταση για στοιχεία συμφορητικής καρδιακής ανεπάρκειας και καρδιακής δυσλειτουργίας, μαζί με ένα ΗΚΓ και ακτινογραφία θώρακα, συνήθως ξεκαθαρίζουν την εικόνα, αλλά εάν συνεχίζει να υπάρχει αμφιβολία μπορεί να γίνει δοκιμαστική αγωγή με διουρητικά. Όχι μόνο είναι δύσκολη η διάγνωση του άσθματος στους ηλικιωμένους, αλλά και η εκτίμηση της βαρύτητας αποτελεί επίσης σημαντικό πρόβλημα, επειδή η αντίληψη των συμπτωμάτων και της βαρύτητας τους σε αυτές τις ηλικιακές ομάδες είναι μειωμένες σε σχέση με νεότερα άτομα και ως αποτέλεσμα συνήθειας.

## **ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΟ ΑΣΘΜΑ**

Το άσθμα που εμφανίζεται στον εργασιακό χώρο συχνά χάνεται, εκτός εάν ο ιατρός της εργασίας γνωρίζει αυτή την πιθανότητα. Πολλά εισπνεόμενα χημικά είναι σήμερα γνωστό ότι μπορούν να προκαλέσουν άσθμα στον εργασιακό χώρο. Ποικίλλουν από μικρού μοριακού βάρους, υψηλής αντιδραστικότητας χημικά, όπως το ισοκυάνιο, έως γνωστά ανοσογόνα, όπως

τα άλατα πλατίνας, και πολύπλοκα φυτικά ή ζωικά βιολογικά προϊόντα. Λόγω της ήπιας έναρξης της νόσου, το επαγγελματικό άσθμα συχνά χαρακτηρίζεται χρόνια βρογχίτιδα ή ΧΑΠ και είτε δεν θεραπεύεται καθόλου είτε ακολουθείται ακατάλληλη αγωγή. Για να τεθεί η διάγνωση απαιτούνται ξεκάθαρο ιστορικό έκθεσης σε ευαισθητοποιούς παράγοντες στην εργασία, απουσία συμπτωμάτων άσθματος πριν από την πρόσληψη στην εργασία και σαφή συσχέτιση μεταξύ ανάπτυξης συμπτωμάτων στον χώρο εργασίας και εξαφάνισης τους με την απομάκρυνση από αυτόν. Η επιβεβαίωση του επαγγελματικού άσθματος επιτυγχάνεται με την μέτρηση της πνευμονικής λειτουργίας, όπως με μια σειρά μετρήσεων της PEF στην δουλειά και μακριά από αυτήν (οι μεμονωμένες μετρήσεις είναι λιγότερο ευαίσθητες από τις επαναλαμβανόμενες), και με την δοκιμασία πρόκλησης(141). Η διαπίστωση ότι το επαγγελματικό άσθμα μπορεί να επιμένει, ή να συνεχίσει να χειροτερεύει ακόμα και με την διακοπή της έκθεσης στον βλαπτικό παράγοντα, τονίζει την ανάγκη της έγκυρης διάγνωσης, αυστηρή αποφυγή περαιτέρω έκθεσης και φαρμακολογική παρέμβαση(142).

## **ΕΠΟΧΙΚΟ ΑΣΘΜΑ**

Σε μερικά ευαισθητοποιημένα άτομα, το άσθμα μπορεί να επιδεινώνεται μετά αύξηση σε συγκεκριμένα αεροαλλεργιογόνα, για παράδειγμα, στο χόρτο, στην γύρη ή στην *alternaria*(143-145). Το εποχικό άσθμα συνήθως συνδέεται με αλλεργική ρινίτιδα. Αυτός ο τύπος του άσθματος μπορεί είναι διαλείπων, με τον ασθενή τελείως ασυμπτωματικό μεταξύ των εποχών. Εναλλακτικά, μπορεί να παρουσιαστεί εποχική επιδείνωση των ασθματικών συμπτωμάτων σε ασθενή με επίμονο άσθμα.

## **ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ**

Το άσθμα μπορεί να αποτελεί πολύ συχνό αίτιο αναπνευστικών συμπτωμάτων, αλλά είναι μία μόνο από τις αιτίες πνευμονικής νόσου. Ένα πολύ σημαντικό βήμα στην διάγνωση του άσθματος είναι η εύρεση αναστρέψιμης και μεταβλητής απόφραξης των αεραγωγών, κατά προτίμηση με σπιρομέτρηση.

Αν και στα παιδιά το άσθμα και οι οξείες λοιμώξεις του αναπνευστικού προκαλούν μουσικούς ήχους λόγω απόφραξης των αεραγωγών από βλέννη ή πύο ή λόγω οιδήματος, αναπνευστικά συμπτώματα μπορεί επίσης να προκληθούν από εντοπισμένη νόσο στους αεραγωγούς (πίεση από όγκο ή από διογκωμένους λεμφαδένες) και από εισπνοή ξένων σωμάτων, πιθανότητες που θα πρέπει πάντοτε να λαμβάνονται υπ όψιν στην διαφορική

διάγνωση(146). Μία άλλη διάγνωση που θα πρέπει πάντοτε να λαμβάνεται υπόψη σε ενήλικες και παιδιά είναι το ψευδοάσθμα, που προκαλείται από δυσλειτουργία των φωνητικών χορδών(147). Στους ενήλικες, η συνύπαρξη άσθματος με ΧΑΠ είναι συχνό πρόβλημα σε τέως ή νυν καπνιστές.



# Κεφάλαιο 7

## ΚΑΤΑΤΑΞΗ ΒΑΡΥΤΗΤΑΣ

Τα περισσότερα συστήματα εκτίμησης της βαρύτητας του άσματος συνδυάζουν την εκτίμηση συμπτωμάτων, την δοσολογία των βραγχοδιασταλτικών που χρειάζεται για ύφεση των συμπτωμάτων και τις δοκιμασίες ελέγχου πνευμονικής λειτουργίας. Έχει βρεθεί ότι η κατάταξη της βαρύτητας του άσματος με βάση τα κλινικά χαρακτηριστικά και την συμπτωματολογία του ασθενούς συσχετίζεται με δείκτες φλεγμονής των αεραγωγών(148).

Σύμφωνα με τις τελευταίες οδηγίες του Εθνικού Ινστιτούτου Καρδιάς, Πνευμόνων και Αίματος των Ηνωμένων Πολιτειών και του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας το άσθμα κατατάσσεται σε 4 τύπους : Διαλείπον, Ήπιο Επίμονο, Μέτριο Επίμονο, και Βαρύ Επίμονο (πίνακας 1).

Αυτή η κατάταξη γίνεται πριν την έναρξη θεραπευτικής αγωγής και είναι σημαντική για την λήψη θεραπευτικών μέτρων κατά την αρχική εκτίμηση του ασθενούς, αφού η θεραπεία γίνεται πιο επιθετική σε πιο βαριές μορφές της νόσου. Όταν ο ασθενής βρίσκεται ήδη υπό αγωγή η κατάταξη της βαρύτητας σύμφωνα με τις τελευταίες οδηγίες του Εθνικού Ινστιτούτου Καρδιάς, Πνευμόνων και Αίματος των Ηνωμένων Πολιτειών και του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας θα πρέπει να βασίζεται στα κλινικά χαρακτηριστικά και την καθημερινή τρέχουσα θεραπευτική αγωγή του ασθενούς (πίνακας 2)(149).

Άρα όταν ένας ασθενής έχει συμπτώματα ήπιου επίμονου άσματος παρά την κατάλληλη θεραπευτική αγωγή για ήπιο άσθμα, θεωρείται ότι έχει μέτριο επίμονο άσθμα. Ομοίως, όταν ένας ασθενής έχει συμπτώματα μέτριου επίμονου άσματος παρά την κατάλληλη θεραπευτική αγωγή για μέτριο άσθμα, θεωρείται ότι έχει σοβαρό επίμονο άσθμα. Άρα, ο συνδυασμός της βαρύτητας των συμπτωμάτων του ασθενούς με την ένταση της θεραπευτικής αγωγής που ο ασθενής λαμβάνει, θα πρέπει να βοηθήσει στην σωστή κατάταξη της σοβαρότητας του άσματος και στην επιλογή της αντίστοιχης θεραπευτικής αγωγής. Όταν επιτευχθεί ο έλεγχος του άσματος και διατηρηθεί για αρκετό καιρό, μπορεί να δοκιμαστεί μείωση στην θεραπευτική αγωγή. Εάν επιτευχθεί και πάλι έλεγχος του άσματος, η κατάταξη του ασθενούς θα αλλάξει. Η σοβαρότητα των κρίσεων άσματος συχνά υποεκτιμάτε από τους ασθενείς, τους συγγενείς τους, αλλά και από τους

εργαζόμενους στο χώρο υγείας. Η αιτιολογία για αυτό είναι πολύπλοκη, αλλά συμπεριλαμβάνει την μη μέτρηση της πνευμονικής λειτουργίας κατά την εκτίμηση του ασθενούς. Εάν μια σοβαρή κρίση άσθματος δεν αναγνωρισθεί και αντιμετωπιστεί κατάλληλα, μπορεί να γίνει θανατηφόρα(150). Είναι πάρα πολύ σημαντικό να γίνει κατανοητό ότι οποιοσδήποτε ασθενής με άσθμα, όσο ήπιο και εάν είναι αυτό, μπορεί να πάθει βαριά κρίση. Έχουν αναγνωρισθεί ειδικοί παράγοντες που συνδέονται με αυξημένη θνητότητα από άσθμα(151). Αυτοί συμπεριλαμβάνουν ιστορικό κρίσεων που απείλησαν την ζωή, νοσηλεία εντός του προηγούμενου έτους, ψυχολογικά προβλήματα, ιστορικό διασωλήνωσης λόγω άσθματος, πρόσφατη μείωση ή διακοπή των γλυκοκορτικοειδών και μη συμμόρφωση με την ιατρική θεραπεία.

**Πίνακας 1. Κατάταξη της βαρύτητας του άσθματος με βάση τα κλινικά χαρακτηριστικά πριν την έναρξη της θεραπείας.**

**Τύπος 1: Διαλείπων**

Συμπτώματα λιγότερο συχνά από 1 φορά την εβδομάδα  
 Ελαφριές εξάρσεις  
 Νυκτερινά συμπτώματα όχι συχνότερα από δύο φορές το μήνα

- FEV<sub>1</sub> ή PEF ≥80% του προβλεπόμενου
- Μεταβλητότητα της FEV<sub>1</sub> ή PEF <20%

**Τύπος 2: Ήπιο Επίμονο**

Συμπτώματα συχνότερα από 1 φορά την εβδομάδα και λιγότερο συχνά από 1 φορά την ημέρα  
 Εξάρσεις που μπορεί να επηρεάζουν την δραστηριότητα και τον ύπνο  
 Νυκτερινά συμπτώματα συχνότερα από δύο φορές το μήνα

- FEV<sub>1</sub> ή PEF ≥80% του προβλεπόμενου
- Μεταβλητότητα της FEV<sub>1</sub> ή PEF 20-30%

**Τύπος 3: Μέτριο Επίμονο**

Συμπτώματα καθημερινά  
 Εξάρσεις που μπορεί να επηρεάζουν την δραστηριότητα και τον ύπνο  
 Νυκτερινά συμπτώματα συχνότερα από μία φορά την εβδομάδα  
 Καθημερινή χρήση β<sub>2</sub> διεγερτών βραχείας δράσης

- FEV<sub>1</sub> ή PEF 60-80% του προβλεπόμενου
- Μεταβλητότητα της FEV<sub>1</sub> ή PEF >30%

## Τύπος 4: Βαρύ Επίμονο

Συμπτώματα καθημερινά

Συχνές εξάρσεις

Συχνά νυκτερινά συμπτώματα

Περιορισμός φυσικής δραστηριότητας

- FEV<sub>1</sub> ή PEF ≤60% του προβλεπόμενου
- Μεταβλητότητα της FEV<sub>1</sub> ή PEF >30%

**Πίνακας 2. Κατάταξη της βαρύτητας του άσθματος σύμφωνα με την καθημερινή θεραπευτική αγωγή και την ανταπόκριση στην θεραπεία**

	Τρέχουσα θεραπεία		
	Τίποτα	Βουδεσονίδη ≤500μg ή αντίστοιχο	Βουδεσονίδη 200-1000 μg ή αντίστοιχο και μακράς δράσης β <sub>2</sub> αγωνιστές
<b>Συμπτώματα και πνευμονική λειτουργία</b>			
<b>Βαρύτητα Άσθματος</b>			
Συμπτώματα λιγότερο συχνά από 1 φορά την εβδομάδα Ελαφριές εξάρσεις Νυκτερινά συμπτώματα όχι συχνότερα από δύο φορές το μήνα Φυσιολογική πνευμονική λειτουργία μεταξύ των κρίσεων	Ήπιο Επίμονο	Ήπιο Επίμονο	Μέτριο Επίμονο
Συμπτώματα συχνότερα από 1 φορά την εβδομάδα και λιγότερο συχνά από 1 φορά την ημέρα Νυκτερινά συμπτώματα συχνότερα από δύο φορές το μήνα Φυσιολογική πνευμονική λειτουργία μεταξύ των κρίσεων	Ήπιο Επίμονο	Μέτριο Επίμονο	Βαρύ Επίμονο

<b>Πίνακας 2. (συνέχεια)</b>			
	<b>Τρέχουσα θεραπεία</b>		
	Τίποτα	Βουδεσονίδη ≤500μg ή αντίστοιχο	Βουδεσονίδη 200-1000 μg ή αντίστοιχο και μακράς δράσης β <sub>2</sub> αγωνιστές
<b>Συμπτώματα και πνευμονική λειτουργία</b>			
<b>Βαρύτητα Άσθματος</b>			
Συμπτώματα καθημερινά Εξάρσεις που μπορεί να επηρεάζουν την δραστηριότητα και τον ύπνο Νυκτερινά συμπτώματα συχνότερα από μία φορά την εβδομάδα	Μέτριο Επίμονο	Βαρύ Επίμονο	Βαρύ Επίμονο
Συμπτώματα καθημερινά Συχνές εξάρσεις Συχνά νυκτερινά συμπτώματα	Βαρύ Επίμονο	Βαρύ Επίμονο	Βαρύ Επίμονο

# Κεφάλαιο 8

## ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ

Ένας ασθενής μπορεί να έχει μη ελεγχόμενο άσθμα λόγω κακής θεραπευτικής προσέγγισης. Ο πίνακας 1 δείχνει τους στόχους της θεραπείας στο άσθμα.

<b>Πίνακας 1:</b> Στόχοι θεραπείας
Να βοηθήσει τον ασθενή με άσθμα να: Έχει φυσιολογικό τρόπο ζωής, όσο είναι αυτό εφικτό, συμπεριλαμβανομένης της φυσιολογικής αντοχής στην άσκηση Να μη έχει νυκτερινές αφυπνίσεις λόγω άσθματος Να μην έχει εξάρσεις Να μην έχει σημαντικές παρενέργειες από την θεραπεία

Η κακή συμμόρφωση του ασθενούς με την θεραπεία, ειδικά με τα εισπνεόμενα κορτικοειδή, συνεχίζει να είναι σημαντική αιτία κακού ελέγχου της νόσου και χρειάζεται μεγάλη επιμονή στην προσπάθεια να κατανοήσει ο ασθενής πόσο σημαντικό είναι να λαμβάνει προφυλακτική αγωγή και τον κίνδυνο που διατρέχει επί μη συμμόρφωσης του. Ειδική προσοχή χρειάζεται σε ασθενείς που έχουν περισσότερες πιθανότητες μη συμμόρφωσης, όπως οι έφηβοι, άτομα χαμηλού κοινωνικού επιπέδου ή με ψυχολογικά προβλήματα(152). Η χρήση κοινά αποδεκτών οδηγιών για την θεραπεία του άσθματος, η χρήση των ροομέτρων και η βελτίωση της επιμόρφωσης του ασθενούς πάνω στη νόσο του, έχουν συμβάλει στον καλύτερο έλεγχο του άσθματος. Οι ασθενείς σήμερα είναι πιο υπεύθυνοι στην εκτίμηση της βαρύτητας της νόσου τους, και μπορούν προσαρμόζουν την θεραπεία τους ανάλογα με τις ανάγκες τους, σύμφωνα με γραπτές οδηγίες από τον θεράπον ιατρό τους.

Οι ασθενείς με άσθμα πρέπει να συμβουλευούνται να διακόψουν το κάπνισμα και να χάσουν βάρος εάν είναι υπέρβαροι, επειδή έχει αποδειχθεί ότι αυτά τα δύο βοηθούν στην βελτίωση της νόσου(153). Η αποφυγή αλλεργιογόνων μπορεί να είναι χρήσιμη σε ασθενείς με ειδικές ευαισθησίες σε αλλεργιογόνα, π.χ. σε κάποιο ζώο. Εάν και σε ποιο βαθμό η μείωση της συγκέντρωσης του ακάρεως της σκόνης είναι εφικτή και αποτελεσματική, είναι

αβέβαιο, αλλά γίνονται σήμερα σχετικές μελέτες. Συμπληρωματικές θεραπείες, όπως η γιόγκα, βοηθούν κάποιους ασθενείς, αλλά συνολικά έχουν μικρή δράση(154). Ο έλεγχος του άσθματος μερικές φορές βελτιώνεται με την ανοσοθεραπεία, αλλά εκτός των ασθενών με αλλεργία στις σφίγγες και στις μέλισσες, για τους υπόλοιπους ασθενείς ο κίνδυνος θανατηφόρου αλλεργικής αντίδρασης από την έγχυση αλλεργιογόνου είναι μεγαλύτερος από τα λίγα θετικά αποτελέσματα(155). Νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις (πίνακας 2), όπως ο εμβολιασμός με σύμπλοκα DNA είναι υπό διερεύνηση(156).

### Πίνακας 2- Νέα φάρμακα στην θεραπεία του άσθματος

Αναστολείς φωσφοδιεσταρέσης (PDE4 inhibitors)

Εισπνεόμενη κυκλοσπορίνη A

Μονοκλωνικά αντισώματα κατά των IgE, CD4 κυττάρων, και Th2 κυτταροκινών (π.χ. IL-4, IL-5)

Τροποποίηση της ισορροπίας Th1/ Th2 με εμβολιασμό (*Mycobacterium vaccae*, DNA CPG εμβολίων) ή ενίσχυση των Th1 κυτταροκινών (IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-18)

Πιο ειδικές ανοσοθεραπείες

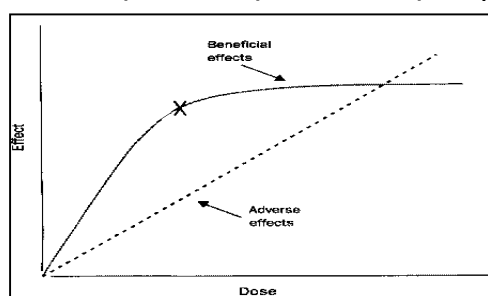
Ανταγωνιστές χυμοκινών, μορίων προσκόλλησης, προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών, TNF- $\alpha$ , IL-1

Γονιδιακή θεραπεία

Ανασταλτικές κυτταροκίνες: IL-10

Τα φάρμακα θα πρέπει να δίνονται από την εισπνευστική οδό, όταν είναι αυτό δυνατό, ώστε να επιτυγχάνονται τα ίδια θεραπευτικά αποτελέσματα με μικρότερες δόσεις και άρα λιγότερες παρενέργειες (σχήμα 1). Ο μεγάλος αριθμός συσκευών χορήγησης εισπνευστικών φαρμάκων συχνά προκαλεί σύγχυση και ο στόχος του ιατρού θα πρέπει να είναι να βρεθεί η καταλληλότερη συσκευή για τον κάθε ασθενή.

**Σχήμα 1-** Σχέση μεταξύ ωφέλιμων και βλαπτικών επιδράσεων των εισπνεόμενων κορτικοειδών με την αύξηση της δόσης τους.



Τις τελευταίες δύο δεκαετίες πολλές ερευνητικές ομάδες έχουν προσπαθήσει να ανακαλύψουν νέα φάρμακα για το άσθμα, αλλά μόνο οι τροποποιητές λευκοτριενίων κυκλοφορούν στην αγορά. Οι ασθενείς, όμως, έχουν ωφεληθεί από διάφορες μελέτες νέων φαρμάκων που είναι αυτή την στιγμή διαθέσιμα. Οι περισσότερες οδηγίες για το άσθμα, όπως αυτή του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας και του Εθνικού Ινστιτούτου Ηνωμένων Πολιτειών (GINA), συνιστούν την σταδιακή αύξηση της έντασης της αγωγής ανάλογα με την βαρύτητα της νόσου(157). Αυτό κυμαίνεται από β-αγωνιστές μόνο για το διαλείπον άσθμα, μέχρι από το στόμα κορτικοειδή για βαρύ χρόνιο άσθμα (πίνακας 1).

<b>Πίνακας 3-</b> Συνιστώμενη θεραπευτική αγωγή ενηλίκων ασθενών με άσθμα σύμφωνα με τις οδηγίες ομοφωνίας GINA.		
<b>Σε όλα τα στάδια:</b> Βραχείας δράσης β2 αγωνιστές θα πρέπει να δίνονται κατ'επίκλησιν για την ανακούφιση των συμπτωμάτων, αλλά όχι συχνότερα από 3-4 φορές την ημέρα.		
<b>Βαρύτητα άσθματος</b>	<b>Θεραπεία ελέγχου</b>	<b>Εναλλακτική θεραπεία</b>
Διαλείπον άσθμα	Καμία	
Ήπιο επίμονο άσθμα	Εισπνεόμενα κορτικοειδή ( $\leq 500\mu\text{g}$ βουδεσονίδης ή ανάλογο)	Θεοφυλλίνη βραδείας αποδέσμευσης ή Τροποποιητής λευκοτριενίων ή χρωμογλυκένιο
Μέτριο επίμονο άσθμα	Εισπνεόμενα κορτικοειδή ( $200-1000\mu\text{g}$ βουδεσονίδης ή ανάλογο) και β2 αγωνιστές μακράς δράσης	Εισπνεόμενα κορτικοειδή βουδεσονίδης ή ανάλογο) σμευσης, ή Εισπνεόμενα κορτικοειδή ( $500-1000\mu\text{g}$ βουδεσονίδης ή ανάλογο) και από το στόμα β2 αγωνιστές μακράς δράσης, ή Εισπνεόμενα κορτικοειδή σε αυξημένες δόσεις ( $>1000\mu\text{g}$ βουδεσονίδης ή ανάλογο), ή Εισπνεόμενα κορτικοειδή ( $500-1000\mu\text{g}$ βουδεσονίδης ή ανάλογο) και τροποποιητής λευκοτριενίων

Βαρύτητα άσθματος	Θεραπεία ελέγχου	Εναλλακτική θεραπεία
Βαρύ επίμονο άσθμα	<p>Εισπνεόμενα κορτικοειδή (200-1000μγ βουδεσονίδης ή ανάλογο) και β2 αγωνιστές μακράς δράσης και ένα ή περισσότερα από τα ακόλουθα, εάν απαραίτητο:</p> <p>Θεοφυλλίνη βραδείας αποδέσμευσης  Τροποποιητής λευκοτριενίων  Από το στόμα β2 αγωνιστές μακράς δράσης  Από το στόμα κορτικοειδή</p>	
<p><b>Σε όλα τα στάδια:</b> Αφού επιτευχθεί έλεγχος της νόσου για 3 τουλάχιστον μήνες, πρέπει να μειώνεται η δόση ελέγχου, ώστε να επιτευχθεί έλεγχος με την χαμηλότερη δυνατή δόση.</p>		



# Κεφάλαιο 9

## ΒΑΡΥ ΑΣΘΜΑ

Η παθοφυσιολογία, παθολογία και κλινική εικόνα του βαρέως άσθματος είναι πολύ λίγο κατανοητή. Ενώ ηπιότερες μορφές άσθματος αντιμετωπίζονται σχετικά εύκολα, οι πιο σοβαρές μορφές είναι ανθεκτικές προς την καλύτερη υπάρχουσα θεραπεία. Αν και αρκετοί ασθενείς με βαρύ άσθμα είχαν σοβαρή νόσο για όλη τους την ζωή, υπάρχει μια ομάδα που αναπτύσσει σοβαρή νόσο στην ενήλικη ζωή. Ακόμα, δεν είναι γνωστό ποιοι γενετικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες είναι πιο σημαντικοί στην ανάπτυξη βαρειάς νόσου. Από άποψη φυσιολογίας, οι ασθενείς έχουν παγίδευση αέρα στους πνεύμονες και απώλεια της ελαστικής επαναφοράς. Όσον αφορά την παθολογική εικόνα, τα ευρήματα είναι αρκετά ετερογενή έως σήμερα. Σε αυτά συμπεριλαμβάνεται η εμμένουσα ηωσινοφιλική φλεγμονή, οι δομικές αλλαγές του πνεύμονα, η νόσος των μικρών αεραγωγών, ενώ τουλάχιστον το 1/3 των ασθενών παρουσιάζει εντελώς διαφορετική παθολογική εικόνα. Η θεραπευτική προσέγγιση είναι πτωχή και πιθανά θα παραμείνει έως ότι βρεθούν νέα στοιχεία για την παθολογία της νόσου.

Οι ασθενείς με βαρύ άσθμα αποτελούν μικρό ποσοστό των ασθματικών ασθενών, πιθανά <5%. Ωστόσο, λόγω της έντονης θεραπείας και των συχνών εξάρσεων οι ασθενείς αυτοί αναλώνουν μεγάλο μέρος του συνολικού κόστους του άσθματος. Η χρήση ισχυρών εισπνεόμενων κορτικοειδών περιόρισε σημαντικά την χρήση των από το στόμα κορτικοειδών από αυτούς τους ασθενείς. Ωστόσο, πολύ λίγη περαιτέρω εξέλιξη έχει επιτευχθεί στην κατανόηση και βελτίωση της θεραπείας της νόσου.

Ορισμοί του βαρέως άσθματος έχουν δοθεί από διάφορες επιστημονικές και πνευμονολογικές κοινότητες(2, 158). Σύμφωνα με την Αμερικάνικη Πνευμονολογική Εταιρία, το βαρύ ή ανθεκτικό άσθμα ορίζεται από την παρουσία δύο κύριων κριτηρίων (π.χ. συνεχής χρήση μεγάλων δόσεων εισπνεόμενων κορτικοειδών ή από το στόμα κορτικοειδών για πάνω από το 50% του προηγούμενου έτους)(158). Στα δευτερεύοντα κριτήρια συμπεριλαμβάνονται δείκτες πνευμονικής λειτουργίας, εξάρσεις, σταθερότητα της νόσου και λήψη επιπλέον θεραπευτικών σκευασμάτων. Σύμφωνα με τον ορισμό του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας σε συνεργασία με το Εθνικό Ινστιτούτο Ηνωμένων Πολιτειών το βαρύ άσθμα χαρακτηρίζεται από συχνές

εξάρσεις, συχνά νυκτερινά συμπτώματα, περιορισμό της φυσικής δραστηριότητας του ατόμου και/ή FEV<sub>1</sub> ή PEF ≤60% του προβλεπόμενου και/ή μεταβλητότητα της FEV<sub>1</sub> ή PEF >30%(2).

## **ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ**

Εξαιρετικά λίγα πράγματα είναι γνωστά για την ανάπτυξη του βαρέως άσθματος. Δύο ευρωπαϊκές μελέτες έδειξαν ότι το άσθμα που ξεκινά στην ενήλικη ζωή χαρακτηρίζεται από ταχύτερη μείωση της πνευμονικής λειτουργίας(159, 160). Ωστόσο, σε μία άλλη μελέτη περισσότερων από 100 ατόμων με βαρύ άσθμα, τα 2/3 των ασθενών ανέφεραν έναρξη του άσθματος στην παιδική ηλικία, ενώ το υπόλοιπο 1/3 μετά την ηλικία των 20 ετών(161). Παραμένει άγνωστο εάν υπάρχουν φαινοτυπικές διαφορές μεταξύ του σοβαρού άσθματος με έναρξη στην παιδική ηλικία ή στην ενήλικη ζωή.

## **ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ**

Υπάρχουν διάφοροι γονιδιακοί τόποι που έχουν συνδεθεί με την ανάπτυξη του βαρέως άσθματος. Μεταλλάξεις στο γονίδιο της IL-4, ή του υποδοχέα αυτής έχει συνδεθεί με μειωμένη πνευμονική λειτουργία και σχεδόν-θανατηφόρα επεισόδια ασθματικών ασθενών(162, 163). Ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι παράγοντες που δεν σχετίζονται με την τύπου 2 ανοσολογική απάντηση, όπως ο TGF-β (transforming growth factor-beta) και η MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1), έχουν επίσης συσχετιστεί με την βαρύτητα του άσθματος(164, 165). Επειδή αυτοί οι παράγοντες προάγουν τις ινωτικές αντιδράσεις, πιθανόν να ενέχονται στην αναδόμηση των αεραγωγών.

Όσον αφορά περιβαλλοντικούς παράγοντες κινδύνου για το βαρύ άσθμα, σε αυτούς υπάγονται η έκθεση στο άκαρι της οικιακής σκόνης, σε αντιγόνα κατσαρίδας, στην αλτερνάρια και στον καπνό του τσιγάρου(166-169). Σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν και οι λοιμώξεις(160). Στους προδιαθεσικούς παράγοντες για την ανάπτυξη βαρέως άσθματος υπάγονται και η παχυσαρκία, η γαστροοισοφαγική παλινδρόμηση, η χρόνια ιγμορίτιδα και η κακή συμμόρφωση ως προς την θεραπευτική αγωγή (170).

## **ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ**

Η παθολογία του βαρέως άσθματος είναι πολύ λίγο κατανοητή μέχρι σήμερα. Πιστεύεται ότι κεντρικό ρόλο διαδραματίζουν η πτωχή ανταπόκριση στην θεραπευτική αγωγή και η αναδιάταξη των αεραγωγών. Επίσης, έχει ενοχοποιηθεί η εντόπιση της νόσου σε περιφερικότερα σημεία του πνεύμονα(170).

Είναι ήδη γνωστό ότι τα 2/3 των ασθενών με βαρύ άσθμα παρουσιάζουν επίμονη ιστική ηωσινοφιλία και αυξημένα T λεμφοκύτταρα, παρά την λήψη συστηματικών κορτικοειδών(171). Επίσης, πολλοί ασθενείς παρουσιάζουν έντονη ουδετεροφιλία στα πτύελα(172). Η αντοχή στα στεροειδή μπορεί να οφείλεται σε κορεσμό του υποδοχέα των κορτικοειδών (GR) από προ-φλεγμονώδεις μεσολαβητές, μειωμένη σύνδεση του υποδοχέα με το DNA ή υψηλά επίπεδα ενός τύπου υποδοχέα με μειωμένες δεσμευτικές ικανότητες(GR-β)(173-175). Μπορεί ακόμη να οφείλεται στο γεγονός ότι σε πολλούς ασθενείς υπερέχει η ουδετεροφιλική φλεγμονή, η οποία είναι ανθεκτική στα στεροειδή.

Τα τελευταία χρόνια πιστεύεται ότι η προοδευτική μείωση της αναπνευστικής λειτουργίας στο βαρύ άσθμα οφείλεται σε δομικές αλλαγές των αεραγωγών, αλλά και του παρεγχύματος. Αν και η βασική μεμβράνη είναι παχυσμένη στους ασθματικούς, δεν έχει διευκρινιστεί η συσχέτισή της με την βαρύτητα της νόσου. Έχει βρεθεί ότι ασθενείς με βαρύ άσθμα και επίμονη ηωσινοφιλική φλεγμονή έχουν παχύτερη βασική μεμβράνη σε σχέση με ασθενείς με ήπιο άσθμα, ή με βαρύ άσθμα χωρίς ηωσινοφιλία(171). Επίσης, η παρουσία βυσμάτων βλέννης στους μεσαίου και μικρού μεγέθους αεραγωγούς μπορεί να συμβάλλει στην απόφραξη της ροής στους αεραγωγούς των βαρέως ασθματικών. Πρώτες μελέτες δείχνουν ότι αλλοιωμένοι υποδοχείς του TGF-β ενέχονται στην μεταπλασία των καλυκοειδών κυττάρων και στην υπερπαραγωγή βλέννης(176). Η μάζα των λείων μυών έχει επίσης βρεθεί αυξημένη στο βαρύ άσθμα, αν και δεν υπάρχουν μελέτες που να εκτιμούν την συσχέτιση μάζας λείων μυών και βαρύτητας της νόσου. Ωστόσο, σε ασθενείς που πέθαναν από βαριά ασθματική κρίση βρέθηκε αυξημένη μυϊκή μάζα από τους μεγάλους μέχρι τους μικρούς αεραγωγούς(177).

Χαρακτηριστικό του βαρέως άσθματος είναι και η επέκταση της φλεγμονής και στους μικρούς αεραγωγούς. Μελέτες σε εν ζωή βαρείς ασθματικούς, αλλά και μεταθανάτιες παθολογοανατομικές μελέτες δείχνουν ότι η περιφερική φλεγμονή μπορεί να είναι πιο σημαντική από την κεντρική(78, 178). Αυτό θέτει σε αμφιβολίες την σύγχρονη θεραπευτική προσέγγιση του βαρέως άσθματος με εισπνεόμενα σωματίδια που δεν φτάνουν σε μεγάλες ποσότητες στους περιφερικούς αεραγωγούς.



# **ΕΝΟΤΗΤΑ ΙΙ**

**ΧΡΟΝΙΑ ΑΠΟΦΡΑΚΤΙΚΗ  
ΠΝΕΥΜΟΝΟΠΑΘΕΙΑ**



# Κεφάλαιο 1

## ΟΡΙΣΜΟΣ

Υπάρχουν πολλοί διαφορετικοί ορισμοί για την Χ.Α.Π. Η Αμερικάνικη Πνευμονολογική Εταιρία (ATS) έχει ορίσει την Χ.Α.Π. ως μία <<νοσολογική οντότητα που χαρακτηρίζεται από την παρουσία περιορισμού της ροής στους αεραγωγούς λόγω χρόνιας βρογχίτιδας ή εμφυσήματος. Ο περιορισμός της ροής είναι γενικά επιδεινούμενος, μπορεί να συνοδεύεται από βρογχική υπεραντιδραστικότητα και μπορεί να είναι μερικώς αναστρέψιμος>>(179). Η Ευρωπαϊκή Πνευμονολογική Εταιρία (ERS) ορίζει την Χ.Α.Π. ως << σταδιακά επιδεινούμενη μειωμένη μέγιστη εκπνευστική ροή και αργή βίαιη εκπνοή, κυρίως μη αναστρέψιμη με την παρούσα ιατρική θεραπεία>>(180). Σύμφωνα με τις θέσεις διεθνούς ομοφωνίας για την Χ.Α.Π. (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease – GOLD), που εκδόθηκαν από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας σε συνεργασία με το Εθνικό Ινστιτούτο των Η.Π.Α., η Χ.Α.Π. <<είναι μια νοσολογική οντότητα που χαρακτηρίζεται από περιορισμό της ροής στους αεραγωγούς που δεν είναι πλήρως αναστρέψιμος. Ο περιορισμός της ροής είναι συνήθως επιδεινούμενος και χαρακτηρίζεται από ανώμαλη φλεγμονώδη απάντηση των πνευμόνων σε τοξικά σωματίδια ή αέρια>>(181). Για αυτούς τους τρεις διαφορετικούς ορισμούς, ωστόσο, η ακριβής κατάταξη του περιορισμού της ροής, της αναστρεψιμότητας και της βαρύτητας της νόσου ποικίλλει.

Ο περιορισμός της ροής στους αεραγωγούς, όπως μετράται με την σπιρομέτρηση, χαρακτηρίζεται από επίμονα χαμηλή τιμή FEV<sub>1</sub> (Βίαια Εκπνεόμενος Όγκος στο 1<sup>ο</sup> δευτερόλεπτο) και λόγο FEV<sub>1</sub>/FVC (Βίαιη Ζωτική Χωρητικότητα) παρά την θεραπεία. Το 1995 ο ορισμός της ATS δεν καθόριζε ειδική τιμή FEV<sub>1</sub>/FVC λόγου για τον περιορισμό της ροής στους αεραγωγούς, ενώ η ERS όριζε τον περιορισμό της ροής ως λόγο FEV<sub>1</sub>/ Αργή Ζωτική Χωρητικότητα <88% για τους άνδρες και <89% για τις γυναίκες(179, 180). Οι θέσεις διεθνείς ομοφωνίας για την ΧΑΠ ορίζουν τον περιορισμό της ροής στους αεραγωγούς ως λόγο FEV<sub>1</sub>/FVC <70%(181).

Ένα μεγάλο μειονέκτημα της χρήσης συγκεκριμένων σπιρομετρικών κριτηρίων για την διάγνωση της ΧΑΠ. είναι ότι δεν γίνονται τροποποιήσεις ανάλογα με την ηλικία του ασθενούς. Αυτό έγινε για λόγους απλούστευσης, αλλά τελικά λειτουργεί σε βάρος της ειδικότητας της εξέτασης. Εφόσον ο

λόγος FEV<sub>1</sub>/FVC μειώνεται με την ηλικία, η οριοθέτηση μιας κατώτερης φυσιολογικής τιμής για την διάγνωση της Χ.Α.Π. γίνεται πιο ανακριβής όσο μεγαλώνει η ηλικία. Επιπλέον, η φυσιολογική μείωση της FEV<sub>1</sub> με την ηλικία συνεπάγεται ότι η χρήση της τιμής της FEV<sub>1</sub> για την κατάταξη της βαρύτητας της νόσου γίνεται πιο ανακριβής με την αύξηση της ηλικίας. Άρα η χρήση των θέσεων ομοφωνίας μπορεί να οδηγήσει σε σημαντική υπέρ-διάγνωση του επιπολασμού και της βαρύτητας της Χ.Α.Π. σε ηλικιωμένα άτομα. Για να αντιμετωπιστεί αυτό το πρόβλημα, και μέχρι να θεσπιστούν ειδικά διαγνωστικά κριτήρια Χ.Α.Π. για τους ηλικιωμένους ασθενείς, δε συνίσταται η χρήση της σπιρομέτρησης σαν <<screening test>> σε ηλικιωμένα άτομα χωρίς συμπτώματα Χ.Α.Π. τα οποία δεν έχουν εκτεθεί σε περιβαλλοντικούς παράγοντες κινδύνου Χ.Α.Π., αφού σε αυτή την περίπτωση θα υπάρχουν πολλά ψευδώς θετικά αποτελέσματα για ΧΑΠ.

Η αναστρεψιμότητα του περιορισμού της ροής μπορεί να οφείλεται σε ανταπόκριση σε εισπνεόμενα βρογχοδιασταλτικά, σε από το στόμα ή εισπνεόμενα κορτικοειδή(120, 181, 182). Ο ορισμός της ATS δεν καθορίζει ειδικά την αναστρεψιμότητα, ενώ η ERS την ορίζει ως >10% βελτίωση της αρχικής τιμής της FEV<sub>1</sub> μετά από λήψη βρογχοδιασταλτικού(179, 180). Οι θέσεις διεθνείς ομοφωνίας για την ΧΑΠ ορίζουν την αναστρεψιμότητα ως αύξηση στην τιμή της FEV<sub>1</sub> τουλάχιστον 200ml και 12% της αρχικής τιμής μετά από αγωγή με εισπνεόμενα κορτικοειδή ή με βρογχοδιασταλτικά(181).

Ο όρος μερική αναστρεψιμότητα αν και αναφέρεται συχνά δεν έχει πλήρως οριστεί. Πιθανά περιλαμβάνει ασθενείς που στην πραγματικότητα έχουν αναστρεψιμότητα ως απάντηση στην θεραπεία με κορτικοειδή ή με βρογχοδιασταλτικά, ωστόσο η καλύτερη τιμή της FEV<sub>1</sub> και του λόγου FEV<sub>1</sub>/FVC τους εντάσσει στην κατηγορία της μη αναστρέψιμης απόφραξης των αεραγωγών.

Σε παλαιότερους ορισμούς της Χ.Α.Π. δινόταν μεγάλη έμφαση στους όρους <<χρόνια βρογχίτις>> και <<εμφύσημα>> και οι ασθενείς κατατάσσονταν σε βρογχιτιδικούς ή blue bloater και εμφυσηματικούς ή pink puffer, ανάλογα με το εάν προεξήρχε το βρογχιτιδικό στοιχείο (που χαρακτηρίζεται από αυξημένη παραγωγή πτυέλων) ή το εμφυσηματικό (που χαρακτηρίζεται από καταστροφή των κυψελίδων)(183). Το εμφύσημα, ή η καταστροφή της επιφάνειας του πνεύμονα όπου γίνεται η ανταλλαγή των αερίων (κυψελίδες), είναι ένας παθολογοανατομικός όρος που χρησιμοποιείται λανθασμένα στην κλινική πράξη και περιγράφει μόνο μία από



τις πολλές αλλαγές στην αρχιτεκτονική του πνεύμονα που παρουσιάζουν οι ασθενείς με Χ.Α.Π. Ωστόσο, η χρόνια βρογχίτιδα, ή αλλιώς η παρουσία βήχα και η παραγωγή πτυέλων τουλάχιστον για 3 μήνες το κάθε έτος για δύο διαδοχικά έτη παραμένει ένας κλινικά και επιδημιολογικά χρήσιμος όρος(183).



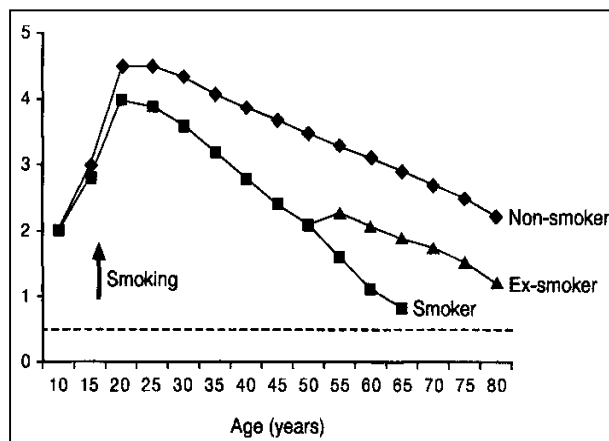
# Κεφάλαιο 2

## ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Αν και δεν υπάρχει μεγάλη ακρίβεια στις τιμές επιπολασμού της Χ.Α.Π., υπολογίζεται ότι 14 εκατομμύρια άνθρωποι μόνο στις Η.Π.Α. πάσχουν από αυτή τη νόσο(184). Συνολικά το 14% των λευκών καπνιστών και το 3% των λευκών μη καπνιστών πάσχει από Χ.Α.Π. Τα αντίστοιχα ποσοστά για τις γυναίκες και για τους μαύρους είναι κάπως μικρότερα. Η Χ.Α.Π. είναι σήμερα η τέταρτη αιτία θανάτου στις Η.Π.Α. και αποτελεί την μοναδική αιτία θανάτου με συνεχώς αυξανόμενη επίπτωση. Η θνησιμότητά της πιθανά υποεκτιμάτε, καθώς συνήθως συμβάλλει σε άλλες κοινές αιτίες θανάτου. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (ΠΟΥ) προβλέπει ότι το έτος 2020 η Χ.Α.Π. θα ανεβεί από την θέση της 6ης συχνότερης ασθένειας στον κόσμο, σε αυτή της 5ης και από την θέση της 6ης συχνότερης αιτίας θανάτου σε αυτή της 3ης(185). Η δραματική αύξηση της συχνότητας της Χ.Α.Π. οφείλεται στην αύξηση του καπνίσματος και στην αύξηση της περιβαλλοντικής μόλυνσης στις υπό ανάπτυξη χώρες.

Από τους διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες κινδύνου που σχετίζονται με την μείωση της πνευμονικής λειτουργίας και την ανάπτυξη Χ.Α.Π., το κάπνισμα είναι παγκοσμίως ο πιο σημαντικός(186, 187). Έχει αποδειχθεί ότι ο φυσιολογικός ρυθμός μείωσης της FEV<sub>1</sub> με την αύξηση της ηλικίας είναι αυξημένος στους καπνιστές.

**Σχήμα 1-** Η FEV<sub>1</sub> μειώνεται με την ηλικία. Ο ρυθμός μείωσης είναι μεγαλύτερος στους καπνιστές. Ο ρυθμός μείωσης των πρώην καπνιστών θα προσεγγίσει τελικά τον ρυθμό των καπνιστών. Η διακοπή του καπνίσματος συνοδεύεται από μικρή αλλά σημαντική αύξηση στην FEV<sub>1</sub>.



Η σχέση δόσης αποτελέσματος μεταξύ καπνίσματος και μείωσης της πνευμονικής λειτουργίας διαφέρει ανάλογα με την ύπαρξη ή μη και άλλων ατομικών παραγόντων για την ανάπτυξη Χ.Α.Π., παρουσία των οποίων η νόσος δημιουργείται σε πολύ χαμηλότερες δόσεις καπνίσματος (λιγότερα πακέτα-έτη)(186).

Αν και πάντοτε υπήρχε διαφορά στον επιπολασμό της Χ.Α.Π. ανάμεσα στο ανδρικό και το γυναικείο φύλο, με τους άνδρες να έχουν υψηλότερα ποσοστά, το χάσμα μεταξύ των δύο φύλων διαρκώς μειώνεται(183). Τα αυξανόμενα ποσοστά των γυναικών που καπνίζουν τα τελευταία 20-30 έτη έχουν στενά συνδεθεί με τα αυξανόμενα ποσοστά Χ.Α.Π. στις γυναίκες και τα αυξανόμενα ποσοστά θνητότητας λόγω Χ.Α.Π στις γυναίκες. Έχει επίσης διατυπωθεί η υπόθεση ότι οι γυναίκες είναι πιο επιρρεπείς σε σύγκριση με τους άνδρες στην βλαπτική δράση του καπνού(188). Για την ίδια δόση καπνίσματος, οι γυναίκες έχουν χαμηλότερη τιμή της FEV<sub>1</sub> και βαρύτερη νόσο των μικρών αεραγωγών(189). Ακόμα, ο ρυθμός μείωσης της FEV<sub>1</sub> στις γυναίκες καπνίστριες είναι σημαντικά μεγαλύτερος από ότι στους άνδρες καπνιστές(189). Η αυξημένη προδιάθεση των γυναικών για ανάπτυξη Χ.Α.Π. μπορεί να οφείλεται στην αυξημένη συχνότητα βρογχικής υπεραντιδραστικότητας στις γυναίκες.

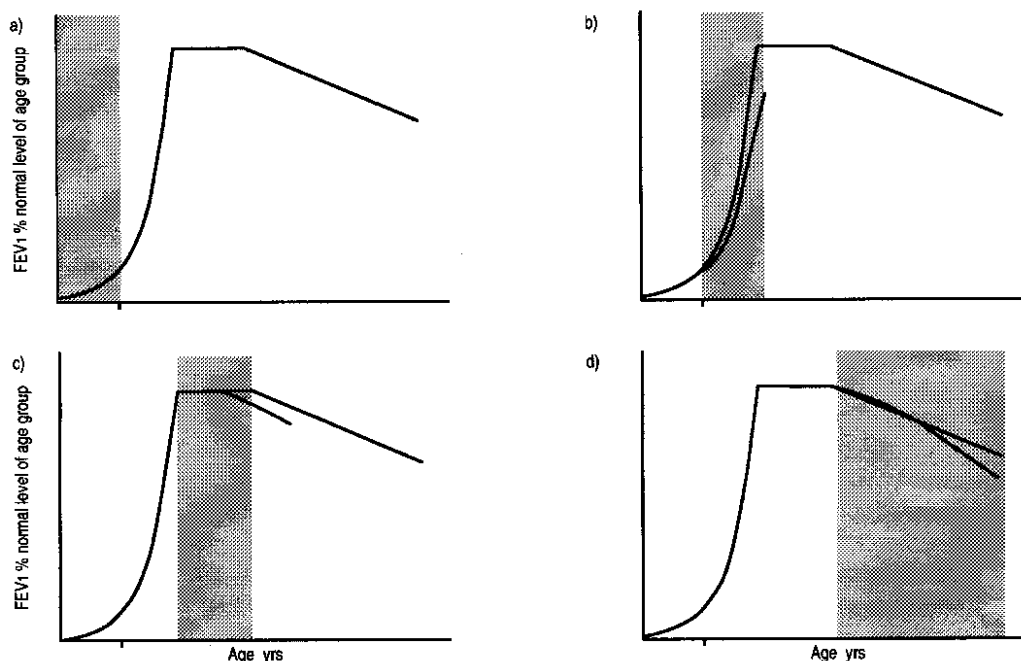
Οι περισσότεροι ασθενείς που είναι ευπαθείς σε πνευμονική βλάβη από το κάπνισμα αναφέρουν συχνά επεισόδια από το αναπνευστικό κατά την παιδική τους ηλικία(190). Η αύξηση της συχνότητας του άσθματος της παιδικής ηλικίας τα τελευταία έτη πιθανά να αυξήσει και τα ποσοστά της Χ.Α.Π. τα επόμενα έτη(191). Το παιδικό άσθμα και οι συχνές λοιμώξεις του αναπνευστικού κατά την παιδική ηλικία μειώνουν την τελική μέγιστη ανάπτυξη των πνευμόνων, επιταχύνουν την έλευση της φυσιολογικής μείωσης της πνευμονικής λειτουργίας και προδιαθέτουν στην εμφάνιση Χ.Α.Π.(192) (σχήμα 2).

**Σχήμα 2-** Οι τέσσερις τύποι ανάπτυξης και έκπτωσης της πνευμονικής λειτουργίας στην διάρκεια του κύκλου της ζωής. Οι καμπύλες ξεκινούν από την στιγμή της γέννησης.

α) Μειωμένη ενδομητρική ανάπτυξη, b) Μειωμένη ανάπτυξη, c) Μειωμένη διάρκεια μέγιστης ανάπτυξης (plateau), d) Αυξημένος ρυθμός έκπτωσης.

Οι συχνές λοιμώξεις της παιδικής ηλικίας μπορεί να μειώσουν την μέγιστη πνευμονική ανάπτυξη και να επιταχύνουν την έκπτωση της πνευμονικής

λειτουργίας. Οι περιοχές με σκίαση αντιπροσωπεύουν περιόδους σε διαφορετικές ηλικίες, όπου διαφορετικοί μηχανισμοί συμβάλλουν σε διεργασίες που οδηγούν στην μείωση της FEV<sub>1</sub> και πιθανά στην δημιουργία Χ.Α.Π. αργότερα στην ζωή.



Ο αλλεργικός φαινότυπος, που μπορεί να εκδηλώνεται με αύξηση της ολικής ή των ειδικών IgE του ορού, με αύξηση του ολικού αριθμού των ηωσινοφίλων του αίματος ή με θετικές αλλεργικές δερματικές δοκιμασίες για ειδικά αντιγόνα, είναι συχνός σε ασθενείς με Χ.Α.Π. Ειδικότερα, έχει βρεθεί ότι οι θετικές αλλεργικές δερματικές δοκιμασίες μπορούν να προβλέψουν αυξημένο ρυθμό μείωσης της FEV<sub>1</sub> και του λόγου FEV<sub>1</sub>/FVC(193). Η παρουσία βρογχικής υπεραντιδραστικότητας στην μεταχολίνη αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για ταχεία μείωση της FEV<sub>1</sub> και μπορεί να βοηθήσει στην ανίχνευση των ατόμων με προδιάθεση για ανάπτυξη Χ.Α.Π(193, 194). Έχει επίσης συνδεθεί με αυξημένα ποσοστά θνητότητας λόγω Χ.Α.Π(195).

Αν και οι περιβαλλοντικοί παράγοντες παίζουν σημαντικό ρόλο στην δημιουργία της Χ.Α.Π., μελέτες οικογενειών με Χ.Α.Π. δείχνουν ότι υπάρχει ισχυρό γενετικό στοιχείο στην πάθηση αυτή. Μέχρι σήμερα ο μοναδικός αποδεδειγμένα προδιαθεσικός γενετικός παράγοντας για την ανάπτυξη Χ.Α.Π. είναι η έλλειψη α<sub>1</sub> αντιθρυψίνης(196). Ωστόσο, οι πρώτου βαθμού συγγενείς ατόμων με βαριά Χ.Α.Π. έχουν σημαντικά χαμηλότερες τιμές FEV<sub>1</sub> και λόγου FEV<sub>1</sub>/FVC σε σύγκριση με άλλα άτομα με ίδιο ιστορικό καπνίσματος(197).

Διάφοροι γενετικοί τόποι έχουν συνδεθεί με την ανάπτυξη Χ.Α.Π., αλλά αυτό το πεδίο γνώσης βρίσκεται ακόμη υπό ανάπτυξη(198).

# Κεφάλαιο 3

## ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ

### Η ΒΡΕΤΑΝΙΚΗ ΚΑΙ Η ΟΛΛΑΝΔΙΚΗ ΥΠΟΘΕΣΗ

Μεταξύ των άλλων παραγόντων που έχουν συνδεθεί με την επιταχυνόμενη μείωση της πνευμονικής λειτουργίας σε ασθενείς με Χ.Α.Π. δύο είναι αυτοί για τους οποίους έχουν γίνει οι περισσότερες συζητήσεις. Πρόκειται για την υπερέκκριση βλέννης, που έχει συνδεθεί με την <<βρετανική υπόθεση>> της παθογένειας της Χ.Α.Π. και για την βρογχική υπεραντιδραστικότητα, που έχει συνδεθεί με την <<ολλανδική υπόθεση>> της παθογένειας της Χ.Α.Π.(199). Σύμφωνα με την <<βρετανική υπόθεση>> η υπερπαραγωγή βλέννης συνδέεται με την χρόνια φλεγμονώδη αντίδραση, που οδηγεί σε συχνές λοιμώξεις των αεραγωγών, εν συνεχεία σε περαιτέρω αύξηση της παραγωγής βλέννης και τελικά σε καταστροφή των αεραγωγών και περιορισμό της ροής. Σύμφωνα με την << ολλανδική υπόθεση>> η βρογχική υπεραντιδραστικότητα συνδέεται με την στένωση των αεραγωγών, η οποία όταν χρονίσει οδηγεί σε αναδιάταξη των αεραγωγών και μη ανατρέψιμη απόφραξη. Αυτές οι δύο υποθέσεις συνήθως αντιμετωπίζονται ως αντικρουόμενες.

Υπάρχουν αρκετές μελέτες που υποστηρίζουν την μία ή την άλλη υπόθεση. Για παράδειγμα, υπέρ της ολλανδική υπόθεσης ήταν η ανακάλυψη ότι οι ασθματικοί μη καπνιστές παρουσιάζουν δύο φορές γρηγορότερη μείωση της τιμής της FEV<sub>1</sub> σε σύγκριση με τους υγιείς μη καπνιστές, αλλά ίδια σε σύγκριση με τους ασθματικούς καπνιστές(200). Υπέρ της βρετανικής υπόθεσης ήταν η εύρεση αρνητικής συσχέτισης μεταξύ της υπερπαραγωγής βλέννης και της τιμής της FEV<sub>1</sub>, ακόμα και όταν γίνουν διορθώσεις για την FEV<sub>1</sub> αναφοράς και για το ιστορικό καπνίσματος του κάθε ασθενούς(201).

Είναι πιο λογικό, ωστόσο, οι δύο προαναφερθείσες υποθέσεις να αντιμετωπίζονται ως συμπληρωματικές και όχι ως ανταγωνιστικές. Κάτω από αυτή την σκοπιά, η επίδραση του καπνού του τσιγάρου ή άλλων ερεθιστικών ουσιών στον πνεύμονα δημιουργεί έντονη φλεγμονώδη αντίδραση στους αεραγωγούς και αυτή με τη σειρά της οδηγεί σε υπερέκκριση βλέννης και αυξάνει την αντιδραστικότητα των αεραγωγών. Όλοι αυτοί οι παράγοντες, και βέβαια μια σειρά από πολλούς ακόμα που θα αναλυθούν παρακάτω

κεφάλαια, οδηγούν στην αναδιάταξη των αεραγωγών και στην μη αναστρέψιμη απόφραξή τους.

## **ΦΛΕΓΜΟΝΗ**

### **Ανοσολογικοί μηχανισμοί και φλεγμονώδη κύτταρα**

Το ουδετερόφιλο ήταν το πρώτο κύτταρο που ενεπλάκη στην παθογένεια της ΧΑΠ(202). Ακολούθησε το κυψελιδικό μακροφάγο(203). Και τα δύο αυτά κύτταρα διαθέτουν πρωτεολυτικά ένζυμα απαραίτητα για την αποδόμηση του πνευμονικού παρεγχύματος και για την δημιουργία εμφυσήματος. Αργότερα, με την εφαρμογή πιο ακριβών ποσοτικών μεθόδων για την εκτίμηση της φλεγμονής, το T λεμφοκύτταρο εμφανίστηκε ως πρωταγωνιστής των παθολογικών διεργασιών στους αεραγωγούς και το παρέγχυμα ασθενών με Χ.Α.Π.(204, 205). Τελευταία, υπάρχουν μελέτες που ενοχοποιούν και το ηωσινόφιλο(206-208).

Αρχικά, η ανασκόπηση της εκτενούς βιβλιογραφίας που υπάρχει για την πνευμονική φλεγμονή στην Χ.Α.Π. φαίνεται να προκαλεί σύγχυση. Κάθε μελέτη παρουσιάζει και ένα άλλο φλεγμονώδη κύτταρο ως το υπεύθυνο για την ανάπτυξη της Χ.Α.Π. Είναι πιο πιθανό, ωστόσο, ότι όλα αυτά τα κύτταρα είναι σημαντικά και αλληλεπιδρούν στα πλαίσια της φλεγμονής ασθενών με ΧΑΠ. Ακολουθεί μια προσπάθεια σύνθεσης και καλύτερης κατανόησης των ήδη γνωστών δεδομένων.

Το πρώτο φλεγμονώδες κύτταρο που αντιδρά στο κάπνισμα είναι μάλλον το ουδετερόφιλο. Σε μελέτες σε ζώα, έκθεση στον καπνό του τσιγάρου προκαλεί την ταχεία συγκέντρωση ουδετεροφίλων στους αεραγωγούς. Έξι ώρες αργότερα από την έκθεση γουρουινίων γουινέας σε καπνό τσιγάρου, ο αριθμός των ουδετεροφίλων στο επιθήλιο των αεραγωγών τους αυξάνει 5 φορές περισσότερο σε σχέση με το επιθήλιο ελέγχου(209). Σε μία μελέτη καπνιστών με ή χωρίς Χ.Α.Π., φάνηκε ότι οι δύο ομάδες δεν παρουσιάζουν διαφορές στον αριθμό των ουδετεροφίλων στους αεραγωγούς(210). Ωστόσο, ο αριθμός των υποβλεννογόνιων ουδετεροφίλων συσχετιζόταν θετικά με τον αριθμό των τσιγάρων. Ο μηχανισμός με τον οποίο το κάπνισμα του τσιγάρου προκαλεί συγκέντρωση ουδετεροφίλων στον πνεύμονα δεν είναι ακόμα γνωστός, αλλά έχουν διατυπωθεί ενδιαφέρουσες υποθέσεις. Συστατικά του καπνού του τσιγάρου, όπως η νικοτίνη, έχουν χημειοτακτικές ιδιότητες για τα ουδετερόφιλα(211). Επίσης, ο ερεθισμός και τραυματισμός του επιθηλίου από τον καπνό του τσιγάρου θα μπορούσε να είναι νευρογενούς φλεγμονής μέσω της ουσίας P. Η ουσία P διεγείρει την έκκριση βλέννης από τους αεραγωγούς,



αυξάνει την μικροαγγειακή διαπερατότητα και την διάχυση των ουδετεροφίλων και προάγει την διέγερση των κυψελιδικών μακροφάγων. Αναισθησία με καψαΐνη των αισθητικών νευρώνων που παράγουν ουσία P αναστέλλει σημαντικά τα βλαπτικά αποτελέσματα του καπνού του τσιγάρου στον πνεύμονα(212).

Είναι πιθανόν εν συνεχεία, ότι ο ερεθισμός του επιθηλίου από το κάπνισμα του τσιγάρου προκαλεί την έναρξη της φλεγμονώδους διεργασίας, από τα πρώτα κιόλας στάδια της έκθεσης και ότι αυτή η διεργασία μπορεί να κρατήσει μέχρι το τέλος της ζωής του ασθενούς, ειδικά εάν συνεχίζει το κάπνισμα. Με αυτό τον τρόπο μπορεί να συγκεντρώνονται στον πνεύμονα ουδετερόφιλα, όπως και μακροφάγα. Μετά από χρόνια έκθεσης στον καπνό του τσιγάρου, τραυματισμό και αποδόμησης του πνευμονικού παρεγχύματος με την δράση των ουδετερόφιλων και των μακροφάγων, τα T λεμφοκύτταρα γίνονται το κύριο κύτταρο στον τόπο της βλάβης. Υπάρχουν δεδομένα υπέρ της συσχέτισης του αριθμού των CD3+ κυττάρων με τον αριθμό των κυψελιδικών μακροφάγων, ενώ και τα δύο είδη κυττάρων αυξάνουν όσο αυξάνει η βαρύτητα του εμφυσήματος, γεγονός που υποδεικνύει την συνεργασία τους στην πρόκληση της πνευμονικής βλάβης(205).

Ανώριμα, μη ενεργοποιημένα από αντιγόνα T λεμφοκύτταρα, δεν μένουν για μεγάλο διάστημα στον πνεύμονα. Είτε επιστρέφουν στην κυκλοφορία, είτε πεθαίνουν. Έτσι, η εύρεση μεγάλου αριθμού T λεμφοκυττάρων στον πνεύμονα ασθενών με Χ.Α.Π. σημαίνει ότι ενέχονται στην παθολογική φλεγμονώδη διεργασία της νόσου. Για να εποίκισουν τα T λεμφοκύτταρα τον πνεύμονα (όπως και κάθε άλλο όργανο) πρέπει πρώτα να ενεργοποιηθούν με την αναγνώριση κάποιου αντιγόνου και κατόπιν να συγκεντρωθούν στο όργανο που εκφράζει το αντιγόνο. Όταν βρεθούν στον πνεύμονα, τα ενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα ασκούν τις λειτουργικές τους δράσεις. Τα CD4 και CD8 + κύτταρα δρουν κυρίως μέσω της παραγωγής κυτταροκινών τύπου 1(IL-2, IFN-γ) ή τύπου 2 (IL-4, IL-5). Η παρουσία μεγάλων αριθμών κυψελιδικών μακροφάγων και η σημαντική συσχέτιση τους με τους αριθμούς των CD3+ κυττάρων δείχνει ότι T λεμφοκύτταρα τύπου 1 ενέχονται στην παραπάνω διαδικασία(213). Τα T λεμφοκύτταρα τύπου 1 (CD4+ και CD8+) παράγουν IFN-γ, την πιο ισχυρή κυτταροκίνη στην ενεργοποίηση των μακροφάγων. Κατά την ενεργοποίησή τους τα κυψελιδικά μακροφάγα εκφράζουν τις παρακάτω λειτουργίες: 1) παράγουν ενεργές ρίζες οξυγόνου και συνθετάση του NO; 2) ενεργοποιούν την οξεία φλεγμονή μέσω

της έκκρισης βραχύβιων μεσολαβητών (προσταγλανδίνες, λευκοτριένια, παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων, κ.α.) 3) γίνονται πιο ικανά ως αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα μέσω της αύξησης της έκφρασης αντιγόνων επιφανείας του μείζονου συμπλόκου ιστοσυμβατότητας τάξης II. Η αύξηση αυτή οφείλεται σε ενεργοποίηση της μεταγραφής των γονιδίων των ανωτέρω αντιγόνων από την IFN-γ(214), και 4) η IFN-γ ενεργοποιεί τα κυψελιδικά μακροφάγα να εκκρίνουν κυτταροκίνες, συμπεριλαμβανομένης της IL-12, η οποία ανατροφοδοτεί την διαφοροποίηση της T λεμφοκυτταρικής σειράς (CD4 και CD8+ κύτταρα) προς τον τύπο 1(213).

Μελέτες σε μοντέλα ζώων, αλλά και σε ανθρώπους τα τελευταία χρόνια, έχουν αναδείξει τον κεντρικό ρόλο των CD8+ λεμφοκυττάρων τύπου 1 και της IFN-γ στην παθογένεια της Χ.Α.Π.(215, 216). Ειδικότερα στους ασθενείς με Χ.Α.Π. παρατηρείται αύξηση των CD4+ τύπου 1 λεμφοκυττάρων (Th1) στο περιφερικό αίμα και αύξηση των CD8+ τύπου 1 λεμφοκυττάρων (Tc1) σε βιοψίες πνεύμονα (216, 217). Επίσης, παρατηρείται μείωση των CD4+ ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων. Τα ανωτέρω ευρήματα έχουν οδηγήσει στην διατύπωση της θεωρίας ότι η τύπου 1 ανοσολογική απάντηση είναι ενισχυμένη σε ασθενείς με Χ.Α.Π. και διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στις φλεγμονώδεις διεργασίες που οδηγούν στην δημιουργία της Χ.Α.Π. Ωστόσο οι παράγοντες που οδηγούν προς την τύπου 1 αντίδραση σε ασθενείς με Χ.Α.Π. παραμένουν αδιευκρίνιστοι.

Διάφοροι είναι οι παράγοντες από τους οποίους εξαρτάται το αν θα διαφοροποιηθούν τα T λεμφοκύτταρα σε τύπο 1, 2 ή σε ρυθμιστικά κύτταρα. Μεταξύ αυτών: το γενετικό υπόβαθρο του ατόμου, η φύση του αντιγονικού ερεθίσματος που δέχονται τα λεμφοκύτταρα, το μικροπεριβάλλον στο οποίο γίνεται η διαφοροποίησή τους. Το πρώτο βήμα για την διαφοροποίηση των T λεμφοκυττάρων είναι η ενεργοποίησή τους από τα αντιγονο-παρουσιαστικά κύτταρα (ΑΠΚ). Αυτή η αρχική αλληλεπίδραση μεταξύ ΑΠΚ και λεμφοκυττάρων πιστεύεται ότι καθορίζει τον τύπο της ανοσολογικής απάντησης. Τα δένδριτικά κύτταρα (ΔΚ) είναι τα κύρια ΑΠΚ. Τα τελευταία χρόνια εξαιρετικό ενδιαφέρον παρουσιάζουν ενδείξεις για πιθανή εμπλοκή των ΔΚ στην παθογένεια της ΧΑΠ. Φαίνεται ότι το κάπνισμα προκαλεί μείωση στον αριθμό των δένδριτικών κυττάρων του πνεύμονα(218). Ωστόσο, παραμένει υπό διερεύνηση ο μηχανισμός με τον οποίο αυτή η μείωση επάγει την τύπου 1 ανοσολογική απάντηση.

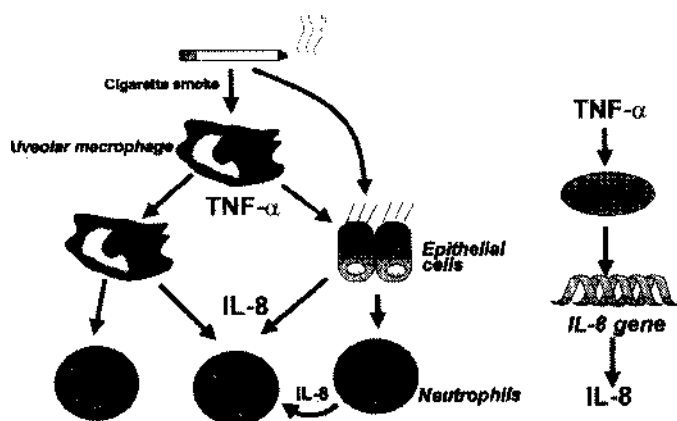
Μία ακόμα πολύ σημαντική λειτουργία των Τ λεμφοκυττάρων είναι η αλλαγή του μικροαγγειακού περιβάλλοντος. Κάτω από την επήρεια των κυτταροκινών που εκκρίνονται από τα ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα ή μέσω σημάτων που επάγονται με την άμεση επαφή, τα μικροαγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα επιτελούν τέσσερις σημαντικές για την φλεγμονή λειτουργίες(213): 1) αγγειοδιαστολή μέσω της προσταγλανδίνης I<sub>2</sub> και του NO, η οποία αυξάνει την τοπική ροή του αίματος και την μεταφορά των λευκοκυττάρων στα σημεία της φλεγμονής, 2) με την έκφραση νέων ή αυξημένων πρωτεϊνών επιφανείας, τα μετατριχοειδικά φλεβικά ενδοθηλιακά κύτταρα προσκολλούνται με τα λευκοκύτταρα, 3) ενεργοποιημένα από αντιγόνα Τ λεμφοκύτταρα προκαλούν στα ενδοθηλιακά κύτταρα την έκκριση χημοκινών, όπως η ιντερλευκίνη 8 και η μονοκυτταρική χημειοτακτική πρωτεΐνη 1, που δρουν στα λευκοκύτταρα και προκαλούν την εξαγγείωσή τους, και 4) κυτταροκίνες ή σήματα άμεσης επαφής από τα Τ λεμφοκύτταρα προκαλούν αλλαγές στο σχήμα των ενδοθηλιακών κυττάρων και αναδιάταξη της βασικής μεμβράνης που ευνοούν την εξαγγείωση μεγαλομορίων και κυττάρων. Άρα, η συνδυασμένη δράση μορίων προσκολλητικότητας και κυτταροκινών οδηγεί με έναν αρκετά περίπλοκο τρόπο στην συνάθροιση των λευκοκυττάρων στον πνεύμονα ασθενούς με Χ.Α.Π.

Υπάρχει ακόμα ενδείξεις ότι κάποιοι ασθενείς με Χ.Α.Π. παρουσιάζουν και ηωσινοφιλική φλεγμονή(206, 214, 219, 220). Αυτοί οι ασθενείς φαίνεται να έχουν ειδικά χαρακτηριστικά, όμοια με ασθματικών ασθενών: απαντούν στην θεραπεία με στεροειδή και παρουσιάζουν βρογχική υπεραντιδραστικότητα. Τα ηωσινόφιλα στην Χ.Α.Π. φαίνεται να είναι ενεργοποιημένα. Άρα, θα ήταν λογικό να υποθέσουμε ότι σε κάποιους ασθενείς, υπάρχουν τύπου 2 CD4+ λεμφοκύτταρα, που εκκρίνουν IL-4, IL-5.

Ο ρόλος των διαφόρων φλεγμονωδών κυττάρων που έχουν μέχρι σήμερα ενοχοποιηθεί για εμπλοκή στην παθογένεια της Χ.Α.Π., γίνεται καλύτερα κατανοητός αν τα κύτταρα συσχετιστούν μεταξύ τους. Πιθανά η πρώτη ανοσολογική αντίδραση αφορά τα ουδετερόφιλα, ακολουθούμενα από τα κυψελιδικά μακροφάγα σε όλες τις επιθηλιακές επιφάνειες του πνεύμονα. Αυτά τα κύτταρα εν καιρώ προκαλούν βλάβες στα επιθήλια και στις πρωτεΐνες του διάμεσου ιστού (ελαστίνη, πρωτεογλυκάνη, κολλαγενάση, κ.α.). Αυτές οι πρωτεΐνες μπορεί να μετατρέπονται από τα δένδριτικά κύτταρα σε αντιγονικά ενεργά πεππίδια, που αναγνωρίζονται από τα Τ λεμφοκύτταρα και έτσι ξεκινάει η ενεργοποίηση και ο πολλαπλασιασμός των λεμφοκυττάρων. Αυτά

τα Τ λεμφοκύτταρα πιθανά προσελκύουν άλλα φλεγμονώδη κύτταρα, όπως τα ουδετερόφιλα, τα κυψελιδικά μακροφάγα και τα ηωσινόφιλα. Άρα όλα τα φλεγμονώδη κύτταρα εργάζονται ταυτοχρόνως για την αλλοίωση των αεραγωγών, την καταστροφή του πνευμονικού παρεγχύματος και τελικά την δημιουργία Χ.Α.Π. Στο παρακάτω σχήμα φαίνονται μερικές από τις αλληλεπιδράσεις κυττάρων που ενέχονται στην παθογένεια της Χ.Α.Π.

**Σχήμα 1-** Αλληλεπιδράσεις μεταξύ μακροφάγων, ουδετερόφιλων και επιθηλιακών κυττάρων. Ο καπνός του τσιγάρου ενεργοποιεί τα μακροφάγα και τα επιθηλιακά κύτταρα ώστε να παράγουν TNF- $\alpha$ , ο οποίος με τη σειρά του ενεργοποιεί το γονίδιο της IL-8, η οποία προσελκύει ουδετερόφιλα. Αυτή η διαδικασία πραγματοποιείται με την μεσολάβηση του μεταγραφικού παράγοντα NF- $\kappa$ B.



### Πρωτεάσες, αντιπρωτεάσες και οξειδωτικό φορτίο

Τα συστατικά του διάμεσου χώρου, στα οποία περιλαμβάνονται το κολλαγόνο, η ελαστίνη και η φιμπρονεκτίνη παρέχουν μία δομική υποστήριξη στο πνευμονικό παρέγχυμα. Στο εμφύσημα η έκταση της βλάβης είναι αποτέλεσμα κυρίως της στρέβλωσης των μικρών αεραγωγών και της δημιουργίας «ανώμαλων» αεροχώρων. Η μείωση της ελαστίνης και η ανεπάρκεια των αμυντικών μηχανισμών αποτελούν τους κύριους μηχανισμούς που συμμετέχουν στην παθογένεια του εμφυσήματος. Η κυριαρχία των φλεγμονωδών κυττάρων στους πνεύμονες των καπνιστών και η απελευθέρωση πρωτεολυτικών ενζύμων αποτελούν κύριους μηχανισμούς βλάβης του πνευμονικού παρεγχύματος.

Σύμφωνα με μία από τις πιο γνωστές θεωρίες της παθογένειας του εμφυσήματος αυξημένοι αριθμοί ενεργοποιημένων ουδετεροφίλων και μακροφάγων απελευθερώνουν ελαστάσες, οι οποίες δεν μπορούν να

εξουδετερωθούν από τις αντιπρωτεάσες και τελικά προκαλούν κυτταρική καταστροφή.

Ο ενοχοποιητικός παράγοντας στην πρόκληση της βλάβης είναι η ελαστάση των λευκοκυττάρων, η οποία μπορεί πειραματικά να προκαλέσει εμφύσημα(221, 222). Πολλές φαρμακευτικές εταιρείες έχουν ερευνήσει το ρόλο συγκεκριμένων ανταγωνιστών της ελαστάσης των λευκοκυττάρων, ως πιθανούς φαρμακευτικούς παράγοντες ασθενών με Χ.Α.Π.

Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες η πρωτεάση-3 συμμετέχει στην παθογένεια του εμφυσήματος. Όπως η ελαστάση των λευκοκυττάρων, έτσι και η πρωτεάση-3 προκαλεί ελαστόλυση. Η πρωτεάση-3 έχει επίσης αποδειχθεί πειραματικά ότι προκαλεί εμφύσημα σε ζώα(223).

Είναι επίσης πιθανή η συμμετοχή πρωτεασών των μακροφάγων (μεταλλοπρωτεάσες και κυστεϊνικές πρωτεάσες) στην παθογένεια του εμφυσήματος που προκαλείται από το κάπνισμα. Οι μεταλλοπρωτεάσες του διάμεσου ιστού αποτελούν ένα σύνολο 14 πρωτεϊνών με δομικές ομοιότητες. Τρεις από αυτές, οι γελατινάσες με μοριακό βάρος 72KD και 92KD και η ελαστάση των μακροφάγων, προκαλούν ελαστόλυση in vitro(224). Η έκφραση της ελαστάσης των μακροφάγων παρατηρείται στα μακροφάγα των καπνιστών και των ασθενών με εμφύσημα(225).

Μια δεύτερη κατηγορία πρωτεασών που προέρχονται από τα μακροφάγα και ενέχονται στην παθογένεια του εμφυσήματος είναι οι κυστεϊνικές πρωτεάσες(226). Αυτές αποτελούν μια μεγάλη ομάδα παραγόντων που προέρχονται από φυτά και ζώα και οι οποίες μοιράζονται ομόλογες περιοχές αμινοξέων στις ενεργές θέσεις των μορίων. Στα ανθρώπινα μακροφάγα έχουν αναγνωριστεί τέσσερις ευδιάκριτες λυσοσωματικές κυστεϊνικές πρωτεάσες, οι οποίες έχουν τη δυνατότητα να αλλοιώνουν τις δομικές πρωτεΐνες του πνεύμονα. Στις παραπάνω λυσοσωματικές κυστεϊνικές πρωτεάσες περιλαμβάνονται οι καθεψίνες B, H, L και S. Οι καθεψίνες L και S προκαλούν ελαστόλυση. Παραμένει βέβαια να καθοριστούν οι ρυθμιστικοί μηχανισμοί με τους οποίους τα μακροφάγα χρησιμοποιούν τις κυστεϊνικές πρωτεάσες για την καταστροφή του συνδετικού ιστού του πνεύμονα.

Τα μακροφάγα επίσης εκκρίνουν ενεργό παράγοντα ιστικού πλασμινογόνου, ο οποίος ενεργοποιεί την πλασμίνη και προκαλεί μείωση της ελαστίνης(226). Σε μια ομάδα νέων καπνιστών οι Reilly και Charman έδειξαν ότι υπάρχει μια σχέση ανάμεσα στην αναλογία του δυναμικά εκπνεόμενου

όγκου αέρα στο πρώτο δευτερόλεπτο, της δυναμικής ζωτικής χωρητικότητας (FEV<sub>1</sub>/FVC) και των επιπέδων του ενεργού πλασμινογόνου των κυψελιδικών μακροφάγων(227). Οι παραπάνω ερευνητές υπέθεσαν ότι η αυξημένη δραστηριότητα του ενεργού πλασμινογόνου, επιταχύνει τη διάσπαση του πνευμονικού ιστού και της ελαστίνης ενεργοποιώντας την πλασμίνη, η οποία με τη σειρά της διασπά τις γλυκοπρωτεΐνες εκθέτοντας έτσι την ελαστίνη στην ελαστάση. Σύμφωνα με τα παραπάνω, διάφορες πρωτεάσες ενέχονται στην καταστροφή του πνευμονικού παρεγχύματος.

Στην παθογένεια του εμφυσήματος συμμετέχει όχι μόνο η απώλεια της εξωκυττάριας ουσίας αλλά και η έλλειψη διαφόρων κυτταρικών συστατικών. Ο μηχανισμός της καταστροφής του πνευμονικού παρεγχύματος δεν έχει ακόμα καθορισθεί, αλλά είναι γνωστό ότι συμβάλει η απώλεια της ικανότητας του πνεύμονα να επιστρατεύει τις αμυντικές του ικανότητες με την πρόοδο της βλάβης. Σύμφωνα με μια άλλη θεωρία ο μηχανισμός της καταστροφής του πνευμονικού παρεγχύματος πιθανόν να αποτελεί επέκταση της δράσης των πρωτεασών από τον εξωκυττάριο χώρο μέσα στα κύτταρα. Παράδειγμα αποτελεί η δράση των πρωτεασών των λεμφοκυττάρων(228). Ένας μηχανισμός με τον οποίο τα κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα και τα λεμφοκύτταρα «φονείς» (NK- κύτταρα) εξουδετερώνουν τα κύτταρα στόχους αποτελεί η έκκριση κυτταροπλασματικών κοκκίων που περιέχουν περφορίνη καθώς και η απελευθέρωση μιας ομάδας παραγόντων στους οποίους περιλαμβάνονται πρωτεάσες (granzymes), οι οποίες είναι ταυτόσημες με την ελαστάση των λευκοκυττάρων και την πρωτεάση-3.

Ο παραπάνω μηχανισμός κοκκιώδους εξωκυττάρωσης που προκαλεί κυτταρόλυση είναι σημαντικός στην παθογένεια της νόσου, αφού ενεργοποιεί την απόπτωση και οδηγεί σε διάσπαση του δεσοξυριβονουκλεϊκού οξέος (DNA). Με αυτόν το μηχανισμό η περφορίνη δημιουργεί πόρους στην εξωτερική μεμβράνη του κυττάρου-στόχου, διευκολύνοντας με αυτόν το μηχανισμό τα granzyme να έχουν πρόσβαση στις δομές των κυττάρων. Τα τελευταία ένζυμα μπορούν να μεταφερθούν από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα του κυττάρου, όπου στη συνέχεια συνδέονται με συγκεκριμένες πρωτεΐνες του πυρήνα, ενεργοποιώντας τις αυτολυτικές ενδονουκλεάσες και οδηγώντας τελικά στη διάσπαση του DNA.

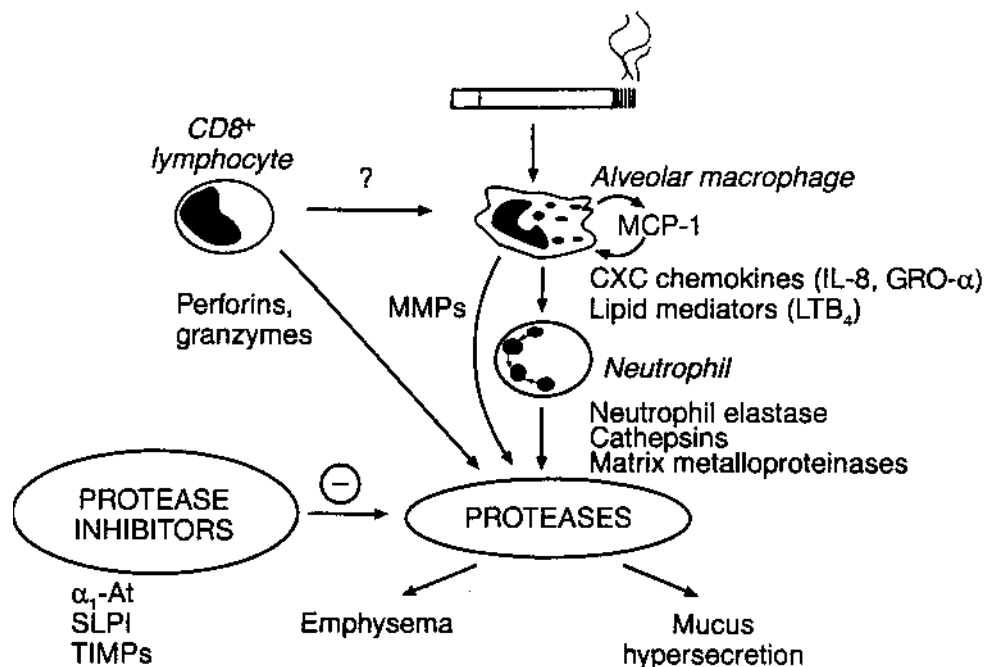
Θα μπορούσαν παρόμοια γεγονότα να συμβούν στο εμφύσημα; Υπάρχουν πρόσφατες ενδείξεις ότι η ελαστάση των λευκοκυττάρων μπορεί να προκαλέσει απόπτωση(229). Επιπλέον μια ελαστάση μοριακού βάρους 24

KD έχει πρόσφατα απομονωθεί από προ-μυελικά κύτταρα HL-60, η οποία μπορεί επίσης να προκαλέσει απόπτωση(230). Η παραπάνω πρωτεάση δεν έχει πλήρως ταυτοποιηθεί. Πρόσφατες επίσης μελέτες δείχνουν ότι τα T-λεμφοκύτταρα σχετίζονται σε μεγάλο βαθμό με την έκταση του εμφυσήματος, προτείνοντας έναν πιθανό πρωταγωνιστικό ρόλο των παραπάνω κυττάρων στην παθογένεια της νόσου(205).

Οι πρωτεάσες επίσης συμβάλλουν στην παθογένεια της φλεγμονής των αεραγωγών που χαρακτηρίζει τη νόσο. Η ελαστάση των λευκοκυττάρων και η καθεψίνη G, μια άλλη πρωτεΐνωση των πολυμορφοπυρήνων κυττάρων, αποτελούν παράγοντες ενεργοποίησης της έκκρισης βλέννης από τους υποβλεννογόνιους αδένες των αεραγωγών. Επίσης, η ελαστάση των λευκοκυττάρων ενεργοποιεί το γονίδιο της μεταγραφής της ιντερλευκίνης-8 (IL-8), προάγοντας έτσι την έκκρισή της από τα βρογχικά επιθηλιακά κύτταρα(231). Η ιντερλευκίνη-8 (IL-8) αποτελεί χημειοτακτικό παράγοντα καθώς επίσης και παράγοντα ενεργοποίησης των πολυμορφοπύρηνων κυττάρων και των λεμφοκυττάρων, παρέχοντας έτσι ένα μηχανισμό διαιώνισης της φλεγμονώδους διαδικασίας. Αν και υπάρχουν πειραματικές ενδείξεις που υποδεικνύουν το σημαντικό ρόλο των πρωτεασών στην παθογένεια της Χ.Α.Π., απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση του ρόλου τους(232).

Στο παρακάτω σχήμα συνοψίζονται οι μηχανισμοί εμπλοκής των πρωτεασών στην παθογένεια της Χ.Α.Π.

**Σχήμα 2-** Ο ρόλος των πρωτεασών στην Χ.Α.Π. Ο καπνός του τσιγάρου ενεργοποιεί τα μακροφάγα του τραχειοβρογχικού δέντρου, που απελευθερώνουν ουδετεροφιλικούς χημειοτακτικούς παράγοντες, όπως IL-8 και LTB-4. Αυτά τα κύτταρα απελευθερώνουν πρωτεάσες που καταστρέφουν το συνδετικό ιστό του πνευμονικού παρεγχύματος, προκαλώντας εμφύσημα και υπερέκκριση βλέννης. Η δράση αυτών των ενζύμων συνήθως αντισταθμίζεται από τους αναστολείς πρωτεασών, όπως α<sub>1</sub> αντιθρυψίνη, ιστικές μεταλλοπρωτεάσες και εκκριτικός αναστολέας λευκοπρωτεάσης (SLPI). Τα CD8+ λεμφοκύτταρα μπορεί επίσης να ενέχονται στην διαδικασία.



Ένας άλλος μηχανισμός που έχει ενοχοποιηθεί για έντονη συμμετοχή στην παθογένεια της Χ.Α.Π είναι το αυξημένο οξειδωτικό φορτίο(233). Ο καπνός του τσιγάρου περιέχει άφθονες ποσότητες οξειδωτικών ουσιών που προκαλούν οξείδωση στα μόρια των κυττάρων(234). Επίσης, πολλές μελέτες προτείνουν ότι τα φαγοκύτταρα στους καπνιστές απελευθερώνουν αυξημένες ποσότητες ενεργών ριζών οξυγόνου κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες. Τα κυψελιδικά μακροφάγα των καπνιστών όπως και τα πολυμορφοπύρηνα του αίματος απελευθερώνουν περισσότερο  $O_2^-$  σε σχέση με εκείνα των μη καπνιστών(235, 236). Έχει αποδειχθεί ένας συσχετισμός ανάμεσα στην απελευθέρωση του  $O_2^-$  των πολυμορφοπύρηνων και της ανάπτυξης βρογχικής υπεραντιδραστικότητας σε ασθενείς με Χ.Α.Π.(237). Μεγάλες ποσότητες οξειδωτικών ριζών  $O_2^-$  παράγονται επίσης και κατά τη διάρκεια των παροξυσμών της νόσου(233).

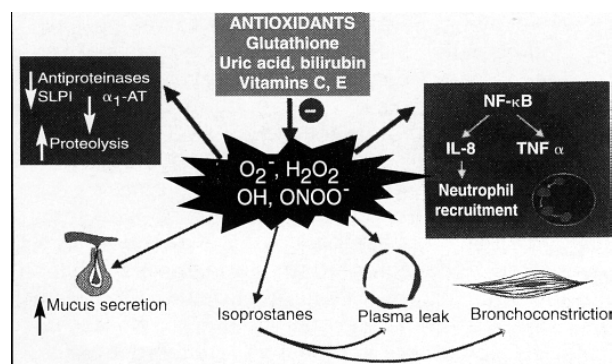
Έχουν ενοχοποιηθεί πολλοί μηχανισμοί με τους οποίους οι οξειδωτικοί παράγοντες προκαλούν βλάβη στον πνεύμονα. Οι παραπάνω παράγοντες αλληλεπιδρούν με κυτταρικά συστατικά οξειδώνοντας πρωτεΐνες, λιπίδια, βάσεις DNA, ένζυμα του διάμεσου μεταβολισμού και συστατικά του εξωκυττάρου χώρου όπως κολλαγόνο και υαλουρονικό οξύ(223-225, 227, 228). Τα επίπεδα των προϊόντων της υπεροξείδωσης των λιπιδίων είναι αυξημένα στο πλάσμα και στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα σε υγιείς καπνιστές και σε ασθενείς κατά τη διάρκεια των παροξυσμών της νόσου, συγκριτικά με τους υγιείς μη καπνιστές(233, 238). Η συγκέντρωση της ισοπροσάνης F2 στο πλάσμα, προϊόν του μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος, είναι επίσης



αυξημένη στους καπνιστές(239). Η ισοπροσάνη F2 δυσχεραίνει τη συνάθροιση των αιμοπεταλίων και προκαλεί επίσης αγγειοδιαστολή. Ανάλογα με την ένταση του οξειδωτικού στρες, τα κύτταρα που εκτίθενται στους οξειδωτικούς παράγοντες υφίστανται απόπτωση ή νέκρωση(240, 241). Τελικά οι οξειδωτικοί παράγοντες  $H_2O_2$  και  $O_2^-$ , μπορούν να προκαλέσουν την παραγωγή χημειοτακτικών παραγόντων ή μπορούν να προάγουν την προσκόλληση των λευκοκυττάρων στο ενδοθήλιο διάμεσου της ενεργοποίησης του πυρηνικού παράγοντα (NF)- $\kappa$ B(242-244). Η παραγωγή επομένως των οξειδωτικών παραγόντων στους καπνιστές προκαλεί την ενεργοποίηση ενός μηχανισμού φλεγμονώδους αντίδρασης που οδηγεί σε καταστροφή του πνευμονικού ιστού και σε οργανική δυσλειτουργία.

Η ικανότητα του αυξημένου οξειδωτικού φορτίου να προκαλεί πνευμονική βλάβη οφείλεται εν μέρει στη διαταραχή της ισορροπίας που υπάρχει ανάμεσα στους οξειδωτικούς και αντιοξειδωτικούς παράγοντες. Υπάρχουν λίγες πληροφορίες σχετικά με τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς άμυνας του πνεύμονα στους καπνιστές και ακόμα λιγότερες σε ασθενείς με ΧΑΠ. Μελέτες έχουν δείξει ότι τα επίπεδα γλουταθειόνης και βιταμίνης C είναι αυξημένα στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (BALF) καπνιστών, ενώ τα επίπεδα της βιταμίνης E είναι μειωμένα(245-247). Οι διάφορες μελέτες προτείνουν ότι αντιοξειδωτικοί παράγοντες βρίσκονται στα κυψελιδικά μακροφάγα κάποιων καπνιστών, αλλά όχι σε όλους(248, 249). Εάν η παρουσία των αντιοξειδωτικών παραγόντων στα κύτταρα κάποιων καπνιστών είναι επαρκής για να αντιμετωπίσει το υπερβολικό οξειδωτικό φορτίο δεν έχει τεκμηριωθεί. Οι κύριοι αντιοξειδωτικοί παράγοντες του πλάσματος, συμπεριλαμβανομένων της βιταμίνης E και του ασκορβικού οξέως, φαίνεται να είναι μειωμένοι στο πλάσμα των καπνιστών(250-252).

Παρατηρείται λοιπόν μια διαταραχή ισορροπίας ανάμεσα στους οξειδωτικούς και αντιοξειδωτικούς παράγοντες στους καπνιστές, με αποτέλεσμα την παρουσία αυξημένου οξειδωτικού φορτίου, που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της νόσου (σχήμα 3).



**Σχήμα 3-** Αύξηση του οξειδωτικού φορτίου στην Χ.Α.Π.

## ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΕΜΦΥΣΗΜΑΤΟΣ

Η φλεγμονή και οι ελλειπίες διαδικασίες επιδιόρθωσης οδηγούν στην δημιουργία του εμφυσήματος. Κύριο ρόλο διαδραματίζει η αποδόμηση της ελαστίνης των κυψελίδων. Σύμφωνα με αυτή την υπόθεση είναι και η ανάπτυξη εμφυσήματος σε ασθενείς που πάσχουν από έλλειψη α1-αντιθρυψίνης. Επίσης η χορήγηση ελαστάσης σε μοντέλα ζώων οδηγεί στην ανάπτυξη εμφυσήματος(253). Άλλες ελαστάσες μπορεί να είναι επίσης σημαντικές στην παραπάνω διαδικασία. Ειδικά, η μεταλλοελαστάση 12, που παράγεται από τα μακροφάγα (MMP-12), έχει συνδεθεί με την ανάπτυξη εμφυσήματος από το κάπνισμα(225). MMP-12 knockout ποντίκια που εκτίθενται στον καπνό του τσιγάρου δεν αναπτύσσουν εμφύσημα και δεν παρουσιάζουν αυξημένες συγκεντρώσεις μακροφάγων στους πνεύμονες, όπως τα ποντίκια ελέγχου και οι άνθρωποι. Είναι πιθανό ότι διασπασμένα τμήματα ελαστίνης από την MMP-12, συγκεντρώνουν μακροφάγα στον πνεύμονα(254).

Αν και στο φυσιολογικό πνεύμονα η ελαστίνη είναι ένα σχετικά σταθερό μόριο με λίγη αποδόμηση-αναδόμηση, το αντίθετο συμβαίνει στον εμφυσηματικό πνεύμονα. Οι ασθενείς με Χ.Α.Π. παρουσιάζουν αυξημένη συγκέντρωση δεσμοσίνης στα ούρα, η οποία είναι συνδετικό μόριο της ελαστίνης και δείκτης αυξημένου ρυθμού αποδόμησης-αναδόμησης της ελαστίνης(255). Μάλιστα, άτομα με αυξημένο ρυθμό έκπτωσης της πνευμονικής λειτουργίας παρουσιάζουν αυξημένη δεσμοσίνη στα ούρα(256). Μετά από έκθεση ζώων σε ελαστάση, επάγεται η έκφραση του γονιδίου της ελαστίνης(257). Έτσι, ενώ αρχικά τα επίπεδα ιστοικής ελαστίνης πέφτουν, γρήγορα επανέρχονται στα φυσιολογικά. Άρα, οι κυψελίδες του πνεύμονα μπορούν να ξεκινήσουν λειτουργίες επιδιόρθωσης μετά από οξεία βλάβη.

Υπάρχουν ενδείξεις ότι η ανεπάρκεια στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης των βλαβών του πνεύμονα οδηγεί στην δημιουργία εμφυσήματος. Για παράδειγμα, η νηστεία, που αναστέλλει τις αναβολικές λειτουργίες, μπορεί να οδηγήσει στο εμφύσημα ή να επιδεινώσει την δημιουργία εμφυσήματος από χορήγηση ελαστάσης σε μοντέλα ζώων(258, 259). Άτομα με μειωμένο δείκτη μάζας σώματος παρουσιάζουν αυξημένη θνησιμότητα από Χ.Α.Π., ενώ μεταξύ ατόμων με ίδια βαρύτητα απόφραξης των αεραγωγών, αυτά που έχουν μικρότερο βάρος παρουσιάζουν μικρότερο δείκτη διάχυσης CO, άρα βαρύτερο εμφύσημα(260, 261). Επίσης, η χορήγηση

αναστολέων σύνθεσης ελαστίνης σε ζώα εκτιθέμενα σε ελασάση προκαλεί σε αυτά βαρύτερο εμφύσημα(262).

Ο καπνός του τσιγάρου αναστέλλει την σύνθεση της ελαστίνης και μπορεί να οδηγήσει και με αυτό το μηχανισμό στην δημιουργία του εμφυσήματος(263). Ο καπνός του τσιγάρου αναστέλλει επίσης την συγκέντρωση και τον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών, την παραγωγή και αναδόμηση του εξωκυττάριου χώρου(264, 265). Τέλος, αναστέλλει την ικανότητα των επιθηλιακών κυττάρων να συμμετάσχουν στις διαδικασίες αναδόμησης(266).



# Κεφάλαιο 4

## ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ

### ΑΠΟΦΡΑΞΗ ΚΑΙ ΔΥΝΑΜΙΚΗ ΥΠΕΡΔΙΑΤΑΣΗ

Ο περιορισμός της ροής του αέρα στην εκπνοή είναι η κύρια αλλαγή στην πνευμονική λειτουργία ασθενών με Χ.Α.Π. Ο περιορισμός στη ροή του αέρα αποτελείται κυρίως από το μη αναστρέψιμο στοιχείο, αλλά όπως θα δούμε παρακάτω υπάρχει και ένα μικρό αναστρέψιμο στοιχείο. Διάφορα παθολογικά χαρακτηριστικά συμβάλλουν στην δημιουργία του περιορισμού της ροής και στις αλλαγές στη μηχανική του πνεύμονα.

Το μη αναστρέψιμο στοιχείο του περιορισμού της ροής του αέρα οφείλεται κυρίως στην αλλαγή της αρχιτεκτονικής των αεραγωγών (remodeling)(267-269). Η ίνωση και η στένωση των μικρών αεραγωγών προκαλεί μόνιμη απόφραξη στους αεραγωγούς και αύξηση στην αντίσταση των αεραγωγών. Το μέρος του πνεύμονα στο οποίο οφείλεται ο περιορισμός της ροής είναι οι μικροί αεραγωγοί, δηλαδή οι βρόγχοι και τα βρογχιόλια διαμέτρου <2mm. Στον φυσιολογικό πνεύμονα η αντίσταση των μικρών αεραγωγών αποτελεί ένα μικρό μόνο μέρος της ολικής αντίστασης των αεραγωγών του πνεύμονα(270). Στους ασθενείς με Χ.Α.Π. η ολική αντίσταση των αεραγωγών σχεδόν διπλασιάζεται και αυτό οφείλεται κυρίως σε αύξηση της περιφερικής αντίστασης(270). Αν και κάποιοι ερευνητές πιστεύουν ότι και στον υγιή πνεύμονα ένα μεγαλύτερο μέρος της αντίστασης θα έπρεπε να αποδίδεται στους μικρούς αεραγωγούς, είναι ευρέως αποδεκτό ότι στην Χ.Α.Π. οι μικροί αεραγωγοί είναι το κύριο μέρος της απόφραξης.

Η καταστροφή του πνευμονικού παρεγχύματος (εμφύσημα) παίζει λιγότερο σημαντικό ρόλο στην απόφραξη των αεραγωγών ασθενών με Χ.Α.Π., αλλά συμβάλλει στον περιορισμό της ροής του αέρα και στην αύξηση της αντίστασης των αεραγωγών με διάφορους τρόπους. Η καταστροφή των προσφύσεων των κυψελίδων στους μικρούς αεραγωγούς αναστέλλει την ικανότητά τους να παραμένουν ανοικτοί κατά την εκπνοή(271). Η καταστροφή των κυψελίδων συνδέεται επίσης με την απώλεια της ελαστικής επαναφοράς του πνεύμονα, που μειώνει την ενδοκυψελιδική πίεση που οδηγεί την εκπνοή(272, 273).

Αν και τα δύο, δηλαδή η καταστροφή των κυψελιδικών προσφύσεων στο εξωτερικό τοίχωμα των μικρών αεραγωγών, όπως και η απώλεια της ελαστικής επαναφοράς του πνεύμονα, που παρατηρούνται στο εμφύσημα, έχουν συνδεθεί με τον περιορισμό της ροής του αέρα στους αεραγωγούς, απευθείας μετρήσεις της αντίστασης των αεραγωγών έχουν δείξει ότι οι δομικές αλλοιώσεις του τοιχώματος των αεραγωγών είναι η σημαντικότερη αιτία του περιορισμού της ροής σε αυτούς(270, 273).

Η σύσπαση των λείων μυών των αεραγωγών, η φλεγμονή των αεραγωγών, και η ενδοαυλική συγκέντρωση βλέννης και εξιδρώματος, μπορεί να σχετίζονται με το αναστρέψιμο μετά την θεραπεία στοιχείο του περιορισμού της ροής του αέρα στην Χ.Α.Π. Η φλεγμονή και η συγκέντρωση βλέννης και εξιδρώματος πιθανά παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο κατά την διάρκεια των εξάρσεων(274).

Ο περιορισμός της ροής του αέρα μετράται καλύτερα με την σπιρομέτρηση. Οι κύριες σπιρομετρικές παράμετροι που χρησιμοποιούνται για την διάγνωση και την παρακολούθηση της Χ.Α.Π. είναι η FEV<sub>1</sub> και ο λόγος FEV<sub>1</sub>/FVC. Καθώς η Χ.Α.Π. εξελίσσεται, με αύξηση του πάχους του τοιχώματος των αεραγωγών, απώλεια των προσφύσεων των κυψελίδων και απώλεια της ελαστικής επαναφοράς, οι παραπάνω τιμές μειώνονται. Η μείωση του λόγου FEV<sub>1</sub>/FVC είναι το πρώτο σημάδι ανάπτυξης περιορισμού της ροής στους αεραγωγούς. Η μειώνεται φυσιολογικά με την ηλικία, αλλά ο ρυθμός μείωσης στους ασθενείς με Χ.Α.Π. είναι πολύ μεγαλύτερος.

Με την αύξηση του περιορισμού της ροής, εμφανίζεται ο περιορισμός στην εκπνευστική ροή. Αρχικά αυτό γίνεται εμφανές μόνο κατά την άσκηση, ενώ αργότερα και στην ηρεμία. Παράλληλα, η λειτουργική υπολειπόμενη χωρητικότητα αυξάνεται, λόγω της απώλειας των ελαστικών ιδιοτήτων του πνεύμονα, της πρώιμης σύγκλισης των αεραγωγών και ενός ποικίλου δυναμικού στοιχείου που αντικατοπτρίζει ένα νέο σχήμα αναπνοής που υιοθετεί ο ασθενής για να αντιμετωπίσει τις αλλαγές στην μηχανική του πνεύμονα. Καθώς αναπτύσσεται ο περιορισμός της ροής στους αεραγωγούς ο ρυθμός με τον οποίο ο πνεύμονας αδειάζει από αέρα μειώνεται και το διάστημα μεταξύ των εισπνευστικών προσπαθειών δεν είναι αρκετό για να φτάσει ο πνεύμονας στο τέλος της εκπνοής στον όγκο χαλάρωσης. Έτσι αναπτύσσεται η δυναμική υπερδιάταση. Η αύξηση στην λειτουργική υπολειπόμενη χωρητικότητα μπορεί να βλάψει την λειτουργία των αναπνευστικών μυών, αν και η συσπαστικότητα του διαφράγματος, όταν

διορθωθεί για τον όγκο των πνευμόνων, παραμένει φυσιολογική. Αυτές οι αλλαγές συμβαίνουν όσο η νόσος προχωράει, αλλά σχεδόν πάντα αρχικά φαίνονται στην άσκηση, όταν το μεταβολικό ερέθισμα στην αναπνοή μειώνει την ικανότητα της αναπνευστικής αντλίας να διατηρήσει την ανταλλαγή αερίων.

## **ΥΠΕΡΕΚΚΡΙΣΗ ΒΛΕΝΝΗΣ**

Η χρόνια υπερέκκριση βλέννης είναι κύριο γνώρισμα της ΧΑΠ. Ωστόσο, ο ρόλος της στην ανάπτυξη χρόνιας απόφραξης παραμένει υπό διερεύνηση(275). Το 1996 τα αποτελέσματα μιας μεγάλης μελέτης έδειξαν ότι η χρόνια παραγωγή πτυέλων συνοδεύεται με ταχεία μείωση της FEV<sub>1</sub> και αυξημένο κίνδυνο νοσηλείας λόγω ΧΑΠ, υποστηρίζοντας έναν ρόλο για την υπερέκκριση βλέννης στην ανάπτυξη του περιορισμού της ροής(201). Η βλέννη παράγεται από τους βρογχικούς αδένες και από τα καλυκοειδή κύτταρα που βρίσκονται κάτω από το επιθήλιο. Στα υγιή άτομα οι περιφερικοί αεραγωγοί περιέχουν ελάχιστα καλυκοειδή κύτταρα, αλλά η μεταπλασία των καλυκοειδών κυττάρων είναι συχνή σε διαταραχές του αναπνευστικού. Δύο καταστάσεις σχετίζονται με την υπερπαραγωγή βλέννης: η αύξηση των κυττάρων που παράγουν βλέννη και η αύξηση στην αποκοκκίωση του περιεχομένου αυτών των κυττάρων.

Η υπερτροφία των βρογχικών αδένων που παράγουν βλέννη πιστευόταν παλαιότερα ότι παίζει κύριο ρόλο στην δημιουργία της χρόνιας βρογχίτιδας. Ωστόσο, οι περιγραφές για μεγεθυμένους υποβλενογόννιους αδένες που έγιναν στην δεκαετία του 50, δεν επιβεβαιώθηκαν από επόμενες ποσοτικές ιστολογικές μελέτες(276, 277). Στην δεκαετία του 80, δύο διαφορετικές μελέτες κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η μεγέθυνση των βρογχικών αδένων δεν σχετίζεται με την υπερπαραγωγή πτυέλων(204). Αντιθέτως, οι καπνιστές με χρόνια βρογχίτιδα είχαν εντονότερη φλεγμονή γύρω από τους αδενικούς πόρους βρόγχων μεγαλύτερης διαμέτρου από 4 χιλ. Ο χαρακτηρισμός των φλεγμονωδών κυττάρων των υποβλενογονίων αδένων έδειξε ότι η αυξημένη διήθηση τους από ουδετερόφιλα σε μικρή απόσταση από τα αδενικά κύτταρα, είναι χαρακτηριστικό καπνιστών με ΧΑΠ, συγκριτικά με μη καπνιστές(278). Η διήθηση από ουδετερόφιλα του βρογχικού επιθηλίου μπορεί να επάγει την υπερέκκριση με την απευθείας αντίδραση με τα βλεννο-παραγωγά κύτταρα. Σε μοντέλα ζώων έχει δειχθεί ότι η συνδεδεμένη με τα ουδετερόφιλα ελασάση και όχι η ελεύθερη ελασάση, ενέχεται στην αποκοκκίωση των βλεννο-παραγωγών κυττάρων. Επιπλέον, για

να επιτευχθεί η αποκοκκίωση των αδενικών κυττάρων στην τραχεία είναι απαραίτητη η σύνδεση των ουδετεροφίλων μέσω της β2 ιντεγκρίνης (CD11b/CD18) στο ICAM-1 των επιθηλιακών κυττάρων(279).

Νευρογενείς μηχανισμοί μπορεί επίσης να ενέχονται στην παθοφυσιολογία της Χ.Α.Π. συμβάλλοντας στην δημιουργία των συμπτωμάτων (βήχας, παραγωγή πτυέλων) και, πιθανά, στην φλεγμονώδη αντίδραση(280). Μεσολαβητές φλεγμονωδών κυττάρων μπορεί να επηρεάζουν την απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών, που στην συνέχεια μπορεί να ρυθμίζουν την φλεγμονώδη αντίδραση. Η υπόθεση ότι νευροπεπτίδια ενέχονται στην υπερέκκριση βλέννης στους ανθρώπους υποστηρίζεται από μία μελέτη σε βρογχικές βιοψίες, που αποκάλυψε σημαντική αύξηση στην ανοσοθετικότητα των νευρικών ινών των βρογχικών αδένων καπνιστών με χρόνια βρογχίτιδα για το αγγειοδραστικό εντερικό πεπτίδιο (VIP)(281).

Αν και η υπερέκκριση βλέννης στους μεγάλους αεραγωγούς συνοδεύεται από συμπτώματα χρόνιας βρογχίτιδας, δηλαδή βήχα και πτύελα, η υπερβολική παραγωγή πτυέλων στους περιφερικούς αεραγωγούς συμβάλλει στην απόφραξη της ροής. Οι εκκρίσεις μπορεί να αλλοιώσουν την επιφανειακή τάση του καλυπτικού υγρού των αγωγών, κάνοντας τους περιφερικούς αγωγούς ασταθείς και επιρρεπείς στην δυναμική σύγκλιση ή στην μηχανική απόφραξη του αυλού τους με τον σχηματισμό βυσμάτων βλέννης(267, 282). Σε φυσιολογικά άτομα τα καλυκοειδή κύτταρα εδράζονται στους μεγάλους αεραγωγούς. Η εμφάνιση καλυκοειδών κυττάρων και στους περιφερικούς αεραγωγούς καπνιστών έχει αναφερθεί από κάποιους ερευνητές, αλλά όχι συστηματικά(267, 276, 283, 284). Πρόσφατα πραγματοποιήθηκε πιο ακριβής ποσοτικοποίηση των βλεννο-παραγωγών κυττάρων στο επιθήλιο των περιφερικών αεραγωγών. Σε χειρουργικά δείγματα ασθενών χειρουργηθέντων για εκτομή εντοπισμένης βλάβης στον πνεύμονα, οι καπνιστές με συμπτώματα χρόνιας βρογχίτιδας και απόφραξης των αεραγωγών παρουσίαζαν αυξημένο αριθμό καλυκοειδών κυττάρων στους αεραγωγούς διαμέτρου <1mm. Οι ασθενείς με Χ.Α.Π. παρουσίαζαν αυξημένο αριθμό καλυκοειδών κυττάρων συγκριτικά με μη καπνιστές, αλλά τον ίδιο αριθμό συγκριτικά με υγιείς καπνιστές, ενώ η απουσία συσχέτισης με τις τιμές της FEV<sub>1</sub> έδειξε ότι ο καθοριστικός παράγοντας της υπερπλασίας των καλυκοειδών κυττάρων είναι το ίδιο το κάπνισμα. Ο μηχανισμός της υπερπλασίας των καλυκοειδών κυττάρων είναι άγνωστος. Σε μοντέλα ζώων



έχει ενοχοποιηθεί η ενεργοποίηση του υποδοχέα του επιδερμικού παράγοντα ανάπτυξης (EGF-R)(285). Πολλαπλά ερεθίσματα μπορεί να ενεργοποιήσουν τον παραπάνω υποδοχέα και να προκαλέσουν υπερέκκριση. Μεταξύ αυτών κατατάσσονται οι οξειδωτικές ουσίες του καπνού ή αυτές που παράγονται από τα φλεγμονώδη κύτταρα, όπως επίσης και κυτταροκίνες (TNF-1, IL-8, IL-13)(286).

## **ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ ΑΕΡΙΩΝ ΑΙΜΑΤΟΣ**

Στην προχωρημένη Χ.Α.Π. η απόφραξη των περιφερικών αεραγωγών, η καταστροφή του παρεγχύματος και οι ανωμαλίες των πνευμονικών αγγείων μειώνουν την ικανότητα του πνεύμονα για ανταλλαγή αερίων, προκαλώντας αρχικά υποξαιμία και αργότερα υπερκαπνία. Η συσχέτιση μετρήσεων της πνευμονικής λειτουργίας με τα αέρια αίματος είναι πτωχή, αλλά γενικά σοβαρή υποξαιμία ή υπερκαπνία είναι σπάνια όταν η FEV<sub>1</sub> είναι μεγαλύτερη του 1 λίτρου(287). Αρχικά η υποξαιμία παρουσιάζεται μόνο στην άσκηση, ενώ αργότερα και στην ηρεμία.

Οι διαταραχές αερισμού-αιμάτωσης είναι ο κύριος μηχανισμός υποξαιμίας στην Χ.Α.Π., ανάλογα με το στάδιο της νόσου(181). Στους περιφερικούς αεραγωγούς ο τραυματισμός του τοιχώματος των αεραγωγών σχετίζεται με τις διαταραχές αερισμού-αιμάτωσης, όπως φαίνεται από τη συσχέτιση της έντασης της φλεγμονής στα βρογχιόλια και της κατανομής του αερισμού(288). Στο παρέγχυμα, η καταστροφή της επιφάνειας ανταλλαγής αερίων, λόγω του εμφυσήματος, μειώνει την ικανότητα διάχυσης και αναστέλλει την ανταλλαγή αερίων. Οι περιοχές με υψηλό λόγο αερισμού-αιμάτωσης πιθανά αντιπροσωπεύουν περιοχές εμφυσηματικές με καταστροφή των κυψελίδων και απώλεια της πνευμονικής αγγείωσης. Η βαρύτητα του πνευμονικού εμφυσήματος σχετίζεται με τη συνολική αναποτελεσματικότητα του πνεύμονα στην ανταλλαγή αερίων. Αυτό αντανακλάται στην καλή συσχέτιση μεταξύ του δείκτη διάχυσης CO ανά λίτρο κυψελιδικού όγκου με την βαρύτητα του μακροσκοπικού εμφυσήματος. Ο μειωμένος αερισμός λόγω της απώλειας της ελαστικής επαναφοράς του εμφυσηματικού πνεύμονα, μαζί με την απώλεια τις τριχοειδικής κοίτης και της γενικευμένης ανομοιογένειας στον αερισμό λόγω της πολύπλοκης φύσεως των αλλαγών αυτών, οδηγεί σε βαριά διαταραχή του αερισμού-αιμάτωσης και αρτηριακή υποξαιμία.

Οι διαταραχές των πνευμονικών αγγείων σχετίζονται με την υποξαιμία. Όσο πιο βαριά η βλάβη του αγγειακού τοιχώματος, τόσο λιγότερο αντιστρεπτή

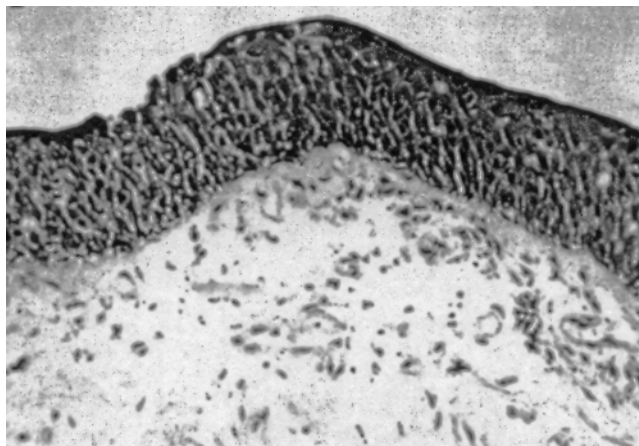
η υποξική αγγειοσύσπαση μετά την χορήγηση οξυγόνου(289). Άρα, η παθολογία του αγγειακού τοιχώματος ενέχεται στις διαταραχές αερισμού-αιμάτωσης. Η χρόνια υπερκαπνία συνήθως οφείλεται στην δυσλειτουργία των εισπνευστικών αναπνευστικών μυών και στον κυψελιδικό υποαερισμό.

# Κεφάλαιο 5

## ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΤΟΜΙΑ

Η κύρια θέση της υπερέκκρισης βλέννης, που εκφράζεται κλινικά ως χρόνια βρογχίτιδα, είναι οι κεντρικοί αεραγωγοί. Η υπερτροφία των βλεννογόνων αδένων που είχε χαρακτηριστεί στο παρελθόν ως το ιστολογικό σημείο αναφοράς της χρόνιας βρογχίτιδας, δεν έχει επιβεβαιωθεί από πιο πρόσφατες αναφορές(277, 290, 291). Δομικές αλλαγές έχουν βρεθεί στο επιθήλιο των μεγάλων αεραγωγών σε άτομα με χρόνια βρογχίτιδα και σε αυτές περιλαμβάνονται η ατροφία, η μετάπλαση και οι ανωμαλίες του κροσσωτού επιθηλίου(292-295) (εικόνα 1).

**Εικόνα 1-** Εικόνα βρογχικού βλεννογόνου ασθενούς με Χ.Α.Π., όπως φαίνεται με το οπτικό μικροσκόπιο. Παρατηρείται μεταπλασία των επιθηλιακών πλακωδών κυττάρων και λεπτότερη του φυσιολογικού βασική μεμβράνη.



Τα φλεγμονώδη κύτταρα που διηθούν την υποεπιθηλιακή ζώνη σε βρογχικές βιοψίες καπνιστών παρουσιάζουν έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον. Τα μονοπύρρηνα κύτταρα αποτελούν τον κύριο κυτταρικό πληθυσμό, με τη συνοδό παρουσία μερικών ουδετερόφιλων(296). Σημαντική αύξηση στον αριθμό των ολικών λευκοκυττάρων (CD45) , T-λεμφοκυττάρων (CD3), ενεργών T-λεμφοκυττάρων (CD25) και μακροφάγων (CD68) έχουν επίσης αναφερθεί(208). Επιπλέον, παρατηρείται αυξημένη προσκόλληση μορίων που σχετίζονται με τη φλεγμονή στην αγγειακή και επιθηλιακή ζώνη(207, 297). Στη χρόνια βρογχίτιδα και ιδιαίτερα στους παροξυσμούς παρατηρείται αυξημένη ιστική ηωσινοφιλία(298). Έχει προταθεί ότι, σε αντίθεση με το άσθμα, τα ιστικά ηωσινόφιλα στη ΧΑΠ δεν αποκοκκίζονται και δεν

σχετίζονται με αυξημένη έκφραση ιντερλευκίνης- 5 (IL-5)(299). Αντιθέτως, τα ηωσινόφιλα που ανευρίσκονται στα πτύελα ασθενών με ΧΑΠ είναι έντονα ενεργοποιημένα. Καθώς ο περιορισμός της ροής του αέρα προοδευτικά επιδεινώνεται τα Τ-λεμφοκύτταρα και τα μακροφάγα αυξάνουν στην υποεπιθηλιακή ζώνη του πνεύμονα(300). Μία πρόσφατη μελέτη αναφέρει ότι τα κυτταροτοξικά CD8<sup>+</sup> Τ-λεμφοκύτταρα βρίσκονται αυξημένα σε ασθενείς με Χ.Α.Π. Η επικράτηση των παραπάνω κυττάρων σχετίζεται με την έκπτωση της αναπνευστικής λειτουργίας (301). Τα παραπάνω δεδομένα υποστηρίζουν το ρόλο των κυτταροτοξικών CD8<sup>+</sup> Τ-λεμφοκυττάρων στην παθογένεια της νόσου(302).

Ενδιαφέρουν προκαλούν τα ευρήματα του χαμηλού αριθμού των ουδετεροφίλων στις βιοψίες βρόγχου ασθενών με ΧΑΠ, σε αντίθεση με τα αυξημένα επίπεδα τους στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (BALF) και στα πτύελα(207, 295, 303). Η παραπάνω δυσαναλογία έχει οδηγήσει στην υπόθεση ότι η φλεγμονή στον βρογχικό αυλό μπορεί να διαφέρει από αυτή που παρουσιάζεται στο βρογχικό τοίχωμα αυτών των ασθενών. Παρόλα αυτά, η πλειονότητα των μελετών σε βρογχικές βιοψίες έχουν εστιάσει την προσοχή τους στην υποεπιθηλιακή ζώνη και όχι στο επιθήλιο ή στους βρογχικούς αδένες. Πρόσφατες μελέτες σε βιοψίες βρόγχου δείχνουν ένα αυξημένο αριθμό ουδετεροφίλων στο επιθήλιο και στους βρογχικούς αδένες των ασθενών(278).

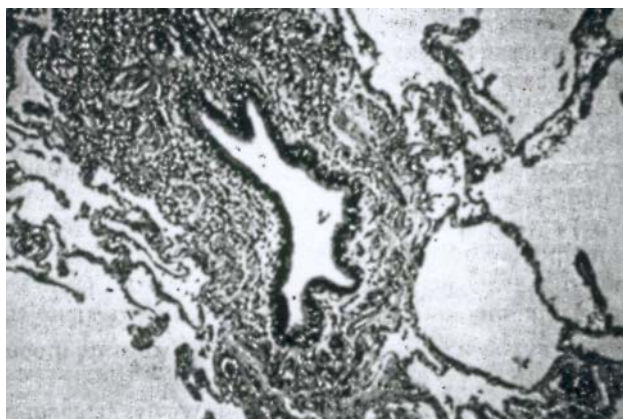
Οι παραπάνω μελέτες μας βοηθούν να κατανοήσουμε τις διαφορές των ευρημάτων που παρατηρούνται ανάμεσα στον αυλό των αεραγωγών και στον ιστό των ασθενών και παρέχουν αποδείξεις ότι τα ουδετερόφιλα ευρίσκονται όχι μόνο στον αυλό των αεραγωγών αλλά επίσης και σε συγκεκριμένες περιοχές του τοιχώματος των αεραγωγών.

Το 1968 ο Hogg και οι συνεργάτες του υπέδειξαν ότι η κύρια θέση της αυξημένης αντίστασης στους καπνιστές με περιορισμό της ροής του αέρα ήταν οι περιφερικοί αεραγωγοί, δείχνοντας ότι η αύξηση αυτή οφειλόταν σε φλεγμονώδεις και δομικές αλλαγές στην περιφερική ζώνη του πνεύμονα(270). Οι περιφερικοί αεραγωγοί περιλαμβάνουν τους μικρούς βρόγχους και τα βρογχιόλια με διάμετρο μικρότερη των 2mm(283). Οι πρώιμες δομικές αλλαγές που προκαλούνται από το κάπνισμα σε αυτούς τους αεραγωγούς έχουν περιγραφεί σε μία μελέτη στην οποία έγινε σύγκριση των παθολογοανατομικών ευρημάτων πνευμόνων νέων καπνιστών και μη καπνιστών της ίδιας ηλικίας που είχαν αιφνίδιο θάνατο. Στους παραπάνω

ασθενείς οι δομικές αλλαγές αποτελούνταν από: απόφραξη του αυλού από βλέννα, μετάπλαση των καλυκοειδών κυττάρων, φλεγμονή του τοιχώματος του αεραγωγού, ίνωση και υπερτροφία των λείων μυϊκών ινών(267, 283, 304-306).

Με την αύξηση του πάχους των αεραγωγών αυτές οι μεταβολές μπορεί να προκαλέσουν στένωση των αεραγωγών με επακόλουθο τον περιορισμό της ροής του αέρα. Επιπλέον, η έλλειψη του επιφανειοδραστικού παράγοντα ως αποτέλεσμα της αντικατάστασης των κυττάρων Clara από καλυκοειδή κύτταρα, οδηγεί σε ανώμαλη επιφανειακή τάση και σε αστάθεια των αεραγωγών(307, 308). Η φλεγμονή των αεραγωγών θα μπορούσε επίσης να συμβάλλει στην καταστροφή των κυψελιδικών τοιχωμάτων. Αυτή η απώλεια των κυψελιδικών προσφύσεων συμβάλλει περαιτέρω στον περιορισμό της ροής του αέρα, επιτρέποντας την παραμόρφωση του τοιχώματος των αεραγωγών και τη στένωση του αυλού τους(309, 310) (εικόνα 2).

**Εικόνα 2-** Εικόνα βιοψίας πνεύμονα ασθενούς με Χ.Α.Π., όπως φαίνεται με το οπτικό μικροσκόπιο. Παρατηρείται καταστροφή των προσφύσεων των κυψελιδικών στα βρογχιόλια και κεντρολοβιώδες εμφύσημα, με συνέπεια το <κολάπσους> των αεραγωγών, ειδικά στην εκπνοή.



Η πλειοψηφία των μελετών στη φλεγμονή των περιφερικών αεραγωγών σε ασθενείς με χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια έχουν βασισθεί σε ιστολογικές εξετάσεις τμημάτων των αεραγωγών. Οι ιστολογικές όμως μέθοδοι δεν επιτρέπουν το διαχωρισμό ανάμεσα στους διάφορους τύπους των φλεγμονωδών κυττάρων. Πρόσφατα έχει επιτευχθεί ο προσδιορισμός του ανοσοφαινότυπου των φλεγμονωδών κυττάρων των περιφερικών αεραγωγών καπνιστών με Χ.Α.Π. χρησιμοποιώντας τεχνικές ανοσοϊστοχημείας. Βάση αυτών έγινε γνωστή η διήθηση του έξω χιτώνα των

αγγείων ασθενών με ΧΑΠ από Β-λεμφοκύτταρα και των τοιχωμάτων των αεραγωγών από κυτταροτοξικά CD8<sup>+</sup>T-λεμφοκύτταρα(204, 210). Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί υπερτροφία των λείων μυϊκών ινών των περιφερικών αεραγωγών(204, 268).

Το εμφύσημα ορίζεται ανατομικά ως η μόνιμη διάταση των αεροφόρων χώρων περιφερικά των τελικών βρογχιολίων χωρίς εμφανή ίνωση(311)(εικόνα 3.3). Πρόσφατα όμως δεδομένα έχουν δείξει ότι η καταστροφική διαδικασία συνοδεύεται από αύξηση της μάζας του κολλαγόνου, προτείνοντας έτσι σε αντίθεση με τον παραπάνω ορισμό την παρουσία ίνωσης στους ιστούς των κυψελιδικών τοιχωμάτων(312).

Ένας σημαντικός παράγοντας στον ορισμό του εμφυσήματος είναι η καταστροφική διαδικασία η οποία ανιχνεύεται μικροσκοπικά στα κυψελιδικά τοιχώματα των καπνιστών, ακόμα και όταν δεν υπάρχουν μακροσκοπικά ενδείξεις διάτασης των αεροφόρων χώρων(313). Η λειτουργική σημασία μίας τέτοιας πρώιμης βλάβης εκτιμάται από τη σχέση του περιορισμού της ροής του αέρα και της απώλειας της ελαστικής δύναμης επαναφοράς των πνευμόνων. Αυτή η καταστροφή σχετίζεται με την παρουσία φλεγμονωδών κυττάρων στα κυψελιδικά τοιχώματα, τα οποία μπορούν να παίξουν ένα ρόλο όχι μόνο στη διαδικασία της καταστροφής, αλλά και στην διαδικασία της αναδόμησης(314, 315).

Αρχικά η διάγνωση του εμφυσήματος γινόταν από μακροσκοπικές παρατηρήσεις σε δείγματα βιοψιών πνεύμονα. Στη συνέχεια μικροσκοπικές τεχνικές χρησιμοποιήθηκαν στον υπολογισμό της έκτασης του εμφυσήματος(314). Οι παραπάνω όμως τεχνικές είναι χρονοβόρες και είναι δύσκολο να πραγματοποιηθούν σε μικρά τεμάχια πνεύμονα. Κατά τη διάρκεια των τελευταίων ετών η υπολογιστική τομογραφία θώρακος υψηλής ευκρίνειας (HRCT) είναι η πιο αξιόπιστη απεικονιστική μέθοδος για τη διάγνωση και τη μορφολογική ταυτοποίηση του εμφυσήματος in vivo(316).

Υπάρχουν δύο κύριοι μορφολογικοί τύποι πνευμονικού εμφυσήματος. Αυτοί διαχωρίζονται ανατομικά με βάση την περιοχή του λοβιδίου το οποίο καταστρέφεται.

Το κεντρολοβιώδες εμφύσημα χαρακτηρίζεται από εστιακή καταστροφή που περιορίζεται στα αναπνευστικά βρογχιόλια και στα κεντρικά τμήματα του λοβιδίου. Αυτός ο τύπος εμφυσήματος είναι κοινός σε καπνιστές και συνήθως εντοπίζεται στους άνω λοβούς των πνευμόνων. Το πανλοβιώδες εμφύσημα χαρακτηρίζεται από καταστροφή των κυψελιδικών

τοιχωμάτων που αφορά όλη την έκταση του λοβιδίου. Ο τύπος αυτός παρατηρείται κυρίως σε καπνιστές που αναπτύσσουν εμφύσημα σε πρώιμη ηλικία και σε αντίθεση με το κεντρολοβιώδες εμφύσημα εντοπίζεται κυρίως στις βάσεις των πνευμόνων. Ο συνήθης τύπος του πανλοβιώδους εμφυσήματος είναι αυτός που προκαλείται από την ανεπάρκεια της α1-αντιθρυψίνης.

Η φλεγμονώδης διαδικασία που παρουσιάζεται στους περιφερικούς αεραγωγούς των καπνιστών θα μπορούσε να προκαλέσει την καταστροφή των κεντρικών τμημάτων των λοβιδίων με αποτέλεσμα τον περιορισμό της ροής του αέρα. Στο πανλοβιώδες όμως εμφύσημα ο περιορισμός της ροής του αέρα φαίνεται να προκαλείται κυρίως από την απώλεια της ελαστικής δύναμης επαναφοράς του πνεύμονα και λιγότερο από τη φλεγμονή των περιφερικών αεραγωγών(317).

Ως ειδικός τύπος εμφυσήματος αναγνωρίζονται οι φυσαλίδες «bullae». Οι φυσαλίδες είναι υποϋπεζωκοτικές εμφυσηματικές περιοχές οι οποίες έχουν διάμετρο μεγαλύτερη από 1cm. Τρεις τύποι φυσαλίδων «bullae» αναγνωρίζονται. Ο τύπος I παρουσιάζει υποϋπεζωκοτική εντόπιση και δεν συνοδεύεται από γενικευμένο εμφύσημα. Οι τύποι II και III σχετίζονται με την παρουσία γενικευμένου εμφυσήματος. Ο τύπος II εντοπίζεται συνήθως υποϋπεζωκοτικά, ενώ ο τύπος III παρουσιάζεται σε κεντρικότερα τμήματα του πνεύμονα.





# Κεφάλαιο 6

## ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ

Μέχρι πρόσφατα ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα στην διάγνωση της Χ.Α.Π. ήταν η ύπαρξη διαφορετικών διαγνωστικών κριτηρίων από τις πνευμονολογικές κοινότητες και η έλλειψη αποδείξεων για το ποια κριτήρια από αυτά θα έπρεπε να ακολουθηθούν. Το πόσο μεγάλες ήταν οι παραπάνω διαφορές φάνηκε καθαρά σε μια ιταλική μελέτη επιπολασμού της Χ.Α.Π. για συγκεκριμένο πληθυσμό ατόμων άνω των 45 ετών(318). Ενώ ο επιπολασμός της νόσου ήταν 12% με τα διαγνωστικά κριτήρια της Ευρωπαϊκής Πνευμονολογικής Κοινότητας ανέβαινε στο 57% με τα κριτήρια της Αμερικανικής Πνευμονολογικής Κοινότητας. Το Εθνικό Ινστιτούτο Καρδιάς, Πνεύμονα και Αίματος των Ηνωμένων Πολιτειών σε συνεργασία με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας ξεκίνησε το 1997 μία προσπάθεια, γνωστή με την ονομασία GOLD (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease), για την ενημέρωση του κοινού σχετικά με την Χ.Α.Π. και για την μείωση των ποσοστών θνητότητας και θνησιμότητάς της[National Heart, April 2001 #232]. Ένα από τα μέσα που θα βοηθούσαν στην επίτευξη των παραπάνω στόχων ήταν και η παροχή προς τους εργαζόμενους στον χώρο υγείας αποδεκτά κοινών οδηγιών για την διάγνωση και αντιμετώπιση της Χ.Α.Π. Τον Απρίλιο του 2001 εκδόθηκαν οι θέσεις GOLD, δηλαδή οι πρώτες θέσεις ομοφωνίας για την διάγνωση, αντιμετώπιση και πρόληψη της Χ.Α.Π.(183).

## ΙΣΤΟΡΙΚΟ ΚΑΙ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΟΛΟΓΙΑ

Ο βήχας είναι το πρώτο σύμπτωμα που συνήθως εμφανίζεται σε ασθενείς με Χ.Α.Π.(319). Συχνά εκλαμβάνεται από τους ασθενείς σαν αποτέλεσμα του καπνίσματος. Είναι χρόνιος και μπορεί να παρουσιάζεται ανά διαστήματα ή καθημερινά. Μπορεί να είναι παρόν καθ όλη την διάρκεια της ημέρας, ή σπανίως μόνο κατά τη διάρκεια της νύκτας. Μπορεί να είναι παραγωγικός ή μη. Ο ιατρός οφείλει να κάνει διαφοροδιάγνωση με άλλα αίτια χρόνιου βήχα, ενδοθωρακικά (όπως βρογχικό άσθμα, βρογχεκτασίες, βρογχογενές καρκίνωμα, διάμεση πνευμονοπάθεια, αριστερή καρδιακή ανεπάρκεια) και εξωθωρακικά (όπως οπισθορινικές εκκρίσεις, γαστροοισοφαγική παλινδρόμηση, λήψη αναστολέα μετατρεπτικού ενζύμου).

Χρόνια παραγωγή πτυέλων οποιασδήποτε μορφής μπορεί να σημαίνει Χ.Α.Π.(320). Συνήθως πρόκειται για μικρές ποσότητες πηκτών πτυέλων μετά από βήχα. Είναι δύσκολο να εκτιμηθεί η παραγωγή πτυέλων γιατί πολλοί ασθενείς καταπίνουν τα πτύελα αντί να τα αποβάλλουν.

Η δύσπνοια είναι το πιο χαρακτηριστικό σύμπτωμα της Χ.Α.Π. και αποτελεί τον συχνότερο λόγο για τον οποίο προσέρχονται στον ιατρό οι ασθενείς με ΧΑ.Π(321). Είναι προοδευτικά επιδεινούμενη, εμφανίζεται σε καθημερινή βάση και περιγράφεται από τον ασθενή σαν <<δυσκολία αναπνοής>>, <<βάρος στο στήθος>> ή <<έλλειψη αέρα>>. Αρχικά εμφανίζεται μόνο στην έντονη άσκηση και κατά την διάρκεια λοιμώξεων του αναπνευστικού, ενώ σε τελικά στάδια είναι παρούσα στις καθημερινές δραστηριότητες του ατόμου, όπως στο ντύσιμο, ή και στην ηρεμία.

Ο συριγμός και το αίσθημα σφιξίματος στο στήθος, αν και εμφανίζονται συχνότερα σε ασθενείς με άσθμα, μπορεί επίσης να εμφανιστούν στην Χ.Α.Π. Ο συριγμός δημιουργείται στο επίπεδο του λάρυγγα και μπορεί να συνοδεύεται από μουσικούς ήχους στην ακρόαση του θώρακα. Το αίσθημα σφιξίματος είναι μυϊκού χαρακτήρα και οφείλεται σε ισομετρική σύσπαση των μεσοπλεύριων μυών.

Οι ασθενείς που παρουσιάζουν συμπτώματα Χ.Α.Π. αλλά έχουν φυσιολογική σπιρομέτρηση, χαρακτηρίζονται ως υψηλού κινδύνου για την ανάπτυξη Χ.Α.Π. και κατατάσσονται ως στάδιο 0 σύμφωνα με τα κριτήρια GOLD (183). Δυστυχώς, υπάρχουν αρκετές αμφιβολίες για το κατά πόσο η κατάταξη κάποιων ατόμων στο στάδιο 0 συμβάλλει και στην ανίχνευση των ατόμων που βρίσκονται σε κίνδυνο για την ανάπτυξη της Χ.Α.Π.(322).

Σύμφωνα με τα ανωτέρω οι τυπικές ερωτήσεις που θα πρέπει να τίθενται σε κάθε ασθενή με υποψία Χ.Α.Π. εκτίθενται στον πίνακα 1.

<b>Πίνακας 1- Τυπικές ερωτήσεις για τη διάγνωση της Χ.Α.Π.</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>- Ο ασθενής καπνίζει ή κάπνιζε στο παρελθόν και πόσο;</li><li>- Ο ασθενής αναφέρει χρόνια βήχα;</li><li>- Ο ασθενής αναφέρει χρόνια παραγωγή πτυέλων;</li><li>- Ο ασθενής παρουσιάζει επεισόδια δύσπνοιας στην κόπωση ή μετά από άσκηση;</li><li>- Ο ασθενής παρουσιάζει συχνά λοιμώξεις του κατώτερου αναπνευστικού που χρειάζονται περισσότερες από 10 ημέρες να ιαθούν;</li></ul>

## ΦΥΣΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ

Η φυσική εξέταση είναι σπανίως διαγνωστική της Χ.Α.Π.(323). Τα φυσικά σημεία του περιορισμού της ροής στους αεραγωγούς συνήθως εμφανίζονται μετά από σημαντική έκπτωση της πνευμονικής λειτουργίας και η ανίχνευσή τους έχει μικρή ευαισθησία και ειδικότητα. Πολλά φυσικά σημεία μπορεί να υπάρχουν σε έναν ασθενή με Χ.Α.Π., αλλά η απουσία τους δεν αποκλείει την διάγνωση(324).

Επισκόπηση. Κυάνωση, ανωμαλίες του θωρακικού τοιχώματος λόγω της υπερδιάτασης των πνευμόνων (όπως οριζοντίωση των πλευρών και προπέτουσα κοιλία, παράδοξη εισόλη των κατώτερων πλευρών λόγω επιπέδωσης των ημιδιαφραγμάτων), περισσότερες από 20 αναπνοές το λεπτό, εκπνοή με κλειστά χείλη, οιδήματα κάτω άκρων λόγω δεξιάς καρδιακής ανεπάρκειας.

Ψηλάφηση. Δυσκολία στην ψηλάφηση της καρδιακής ώσης και μετατόπιση του κάτω ορίου του ήπατος προς τα κάτω λόγω υπερδιάτασης των πνευμόνων.

Ακρόαση. Μειωμένο αναπνευστικό ψιθύρισμα, μουσικοί ήχοι, μη μουσικοί ήχοι. Προσοχή! Οι μουσικοί ήχοι που ακούγονται μόνο κατά την βίαιη εκπνοή δεν έχουν καμία διαγνωστική αξία.

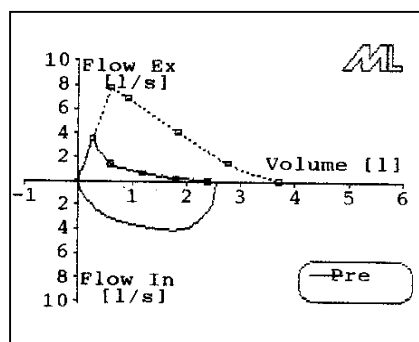
## ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

### Σπιρομέτρηση

Θα πρέπει να γίνεται σε κάθε ασθενή με υποψία Χ.Α.Π. Για να ανιχνευθούν ασθενείς σε αρχικά στάδια της νόσου, η σπιρομέτρηση θα πρέπει να γίνεται ακόμα και σε όσους προσέρχονται λόγω χρόνιου βήχα ή χρόνιας παραγωγής πτυέλων, ακόμα κι αν δεν παρουσιάζουν συμπτώματα δύσπνοιας(181). Η σπιρομέτρηση θα πρέπει να γίνεται σε κλινικά σταθερούς και ελεύθερους από λοίμωξη του αναπνευστικού ασθενείς. Αν και δεν παρουσιάζει πολύ καλή συσχέτιση με την ποιότητα ζωής του ασθενούς, αποτελεί το <<gold standard>> της διάγνωσης και παρακολούθησης της νόσου. Είναι η καλύτερα στανταρισμένη, περισσότερο επαναλήψιμη και πιο αντικειμενική μέθοδος εκτίμησης του περιορισμού της ροής στους αεραγωγούς. Για να θεωρείται μία σπιρομέτρηση αποδεκτή θα πρέπει η καμπύλη της εκπνοής να είναι ομαλή. Επίσης, ο χρόνος εκπνοής θα πρέπει να είναι αρκετός, ίσως και περισσότερο από 12 δευτερόλεπτα σε ασθενείς με σοβαρή νόσο, ώστε να επιτευχθεί η επιπέδωση της καμπύλης του εκπνεόμενου όγκου[National Heart, April 2001 #232]. Οι τιμές FEV<sub>1</sub> και FVC που θα καταγραφούν θα πρέπει να είναι οι

καλύτερες μεταξύ 3 τεχνικά αποδεκτών σπιρομετρήσεων και δεν θα πρέπει να διαφέρουν μεταξύ τους πάνω από 5% ή 100ml. Το σχήμα 1 δείχνει ένα φυσιολογικό σπιρογράφημα και ένα σπιρογράφημα ασθενούς με τυπική μέτρια προς βαριά Χ.Α.Π.

**Σχήμα 1-** Φυσιολογικό σπιρογράφημα (διακεκομμένη γραμμή) και σπιρογράφημα ασθενούς με μέτρια προς βαριά Χ.Α.Π (συνεχόμενη γραμμή).



Σύμφωνα με τις θέσεις ομοφωνίας η διάγνωση της Χ.Α.Π. τίθεται με την εύρεση λόγου του βίαια εκπνεόμενου όγκου στο πρώτο δευτερόλεπτο ( $FEV_1$ ) προς την βίαια ζωτική χωρητικότητα (FVC), δηλαδή λόγο  $FEV_1/FVC$  μικρότερο από 70%, με το ασθενή υπό βρογχοδιαστολή(183). Αν και σύμφωνα με τον ορισμό <<Η Χ.Α.Π. είναι μία πάθηση που χαρακτηρίζεται από περιορισμό της ροής στους αεραγωγούς, ο οποίος δεν είναι πλήρως αναστρέψιμος >>, η μη αναστρέψιμότητα του περιορισμού της ροής στους αεραγωγούς δεν αποτελεί διαγνωστικό κριτήριο της Χ.Α.Π, αφού αρκετοί ασθενείς παρουσιάζουν καλή ανταπόκριση στην βρογχοδιαστολή. Βέβαια, όπως θα δούμε παρακάτω σε αυτές τις περιπτώσεις πρέπει να γίνεται προσεκτικά διαφοροδιάγνωση με το άσθμα.

Ένα μεγάλο μειονέκτημα των σπιρομετρικών κριτηρίων της Χ.Α.Π. σύμφωνα με τις θέσεις ομοφωνίας GOLD είναι ότι δεν υπάρχουν τροποποιήσεις ανάλογα με την ηλικία του ασθενούς(322). Αυτό έγινε για λόγους απλούστευσης, αλλά τελικά λειτουργεί σε βάρος της ειδικότητας της εξέτασης. Εφόσον ο λόγος  $FEV_1/FVC$  μειώνεται με την ηλικία, η οριοθέτηση μιας κατώτερης φυσιολογικής τιμής για την διάγνωση της Χ.Α.Π. γίνεται πιο ανακριβής όσο μεγαλώνει η ηλικία. Επιπλέον, η φυσιολογική μείωση της  $FEV_1$  με την ηλικία συνεπάγεται ότι η χρήση της τιμής της  $FEV_1$  για την κατάταξη της βαρύτητας της νόσου γίνεται πιο ανακριβής με την αύξηση της ηλικίας. Άρα η χρήση των θέσεων ομοφωνίας μπορεί να οδηγήσει σε σημαντική υπέρ-διάγνωση του επιπολασμού και της βαρύτητας της Χ.Α.Π. σε ηλικιωμένα άτομα(325). Για να αντιμετωπιστεί αυτό το πρόβλημα, και μέχρι να

θεσπιστούν ειδικά διαγνωστικά κριτήρια Χ.Α.Π. για τους ηλικιωμένους ασθενείς, δε συνίσταται η χρήση της σπιρομέτρησης σαν <<screening test>> σε ηλικιωμένα άτομα χωρίς συμπτώματα Χ.Α.Π. τα οποία δεν έχουν εκτεθεί σε περιβαλλοντικούς παράγοντες κινδύνου Χ.Α.Π., αφού σε αυτή την περίπτωση θα υπάρχουν πολλά ψευδώς θετικά αποτελέσματα για Χ.Α.Π.

### **Ροομετρία**

Είναι σημαντικό να γίνει κατανοητό ότι η ροομετρία δεν μπορεί να αντικαταστήσει την σπιρομέτρηση, αφού σε ασθενείς με Χ.Α.Π. η σχέση μεταξύ PEF και FEV<sub>1</sub> είναι πτωχή και συχνά η PEF υποεκτιμά την βαρύτητα του περιορισμού της ροής στους αεραγωγούς αυτών των ασθενών.

### **Ακτινογραφία θώρακα**

Είναι σπανίως διαγνωστική για Χ.Α.Π., εκτός εάν απεικονίζονται εμφανώς μπούλες. Συνήθη ακτινολογικά ευρήματα περιλαμβάνουν σημεία υπερδιάτασης των πνευμόνων (επιπεδωμένα διαφράγματα στην πλάγια ακτινογραφία και αύξηση του οπισθοστερνικού όγκου αέρα) και υπερδιαύγαση των πνευμόνων.

### **Αξονική τομογραφία**

Δεν συνίσταται ως εξέταση ρουτίνας, αλλά μπορεί να βοηθήσει στην διαφορική διάγνωση όπου υπάρχει αμφιβολία για την διάγνωση Χ.Α.Π.

### **Έλεγχος για έλλειψη α1 αντιθρυψίνης**

Θα πρέπει να γίνεται σε όλους τους ασθενείς που αναπτύσσουν Χ.Α.Π. σε ηλικία μικρότερη των 45 ετών.

### **Μέτρηση των αερίων αίματος**

Θα πρέπει να γίνεται σε όλους τους ασθενείς που έχουν FEV<sub>1</sub><40% του προβλεπόμενου ή κλινικά σημεία αναπνευστικής ή δεξιάς καρδιακής ανεπάρκειας. Η οξυμετρία είναι χρήσιμη στην επιλογή των ασθενών με SO<sub>2</sub><92% για λήψη αερίων αίματος, αλλά δεν παρέχει πληροφορίες για την τιμή του CO<sub>2</sub>.

### **Πνευμονικοί όγκοι και διάχυση CO**

Η μέτρηση των πνευμονικών όγκων και της διαχυτικής ικανότητας του CO δεν συνίσταται να γίνονται ως εξέταση ρουτίνας στους ασθενείς με Χ.Α.Π., αλλά μπορούν να χρησιμοποιηθούν όταν υπάρχει διαφοροδιαγνωστικό πρόβλημα και για την προεγχειρητική εκτίμηση της αναπνευστικής λειτουργίας ασθενών με Χ.Α.Π. Σε βαριά νόσο υπάρχει μεγάλη αύξηση των πνευμονικών όγκων (δυναμική υπερδιάταση των πνευμόνων) και μείωση του δείκτη διάχυσης CO (εμφύσημα).

## ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Η κύρια νόσος με την οποία θα πρέπει να γίνει διαφορική διάγνωση είναι το άσθμα. Στην προσπάθεια για διαφοροδιάγνωση μεταξύ των δύο παθήσεων ο ιατρός οφείλει να λαμβάνει πάντοτε υπ όψιν του ότι ένα 10% περίπου των ασθενών με Χ.Α.Π. πάσχει και από άσθμα. Ένας ασθενής με αναστρέψιμο περιορισμό της ροής στους αεραγωγούς (δηλαδή με αύξηση στην τιμή της FEV<sub>1</sub>περισσότερο από 200ml και περισσότερο από 12% της προ βρογχοδιαστολής τιμής) και έναρξη συμπτωμάτων σε νεαρή ηλικία πάσχει σίγουρα από άσθμα αν είναι μη καπνιστής, ενώ αν είναι μέσης ηλικίας καπνιστής είναι πιθανό να πάσχει και από τις δύο παθήσεις. Οι ασθενείς με χρόνια επίμονο άσθμα συχνά αναπτύσσουν μη αναστρέψιμο περιορισμό της ροής στους αεραγωγούς, οπότε αν έχουν εκτεθεί και σε κάποιο περιβαλλοντικό παράγοντα κινδύνου για ανάπτυξη Χ.Α.Π. μπορεί να είναι αδύνατη η διαφορική διάγνωση με την Χ.Α.Π. Σε αυτή την περίπτωση η θεραπευτική προσέγγιση που ακολουθείται είναι του άσθματος. Άλλοι παράγοντες που θα πρέπει να συνεκτιμούνται στην διαφορική διάγνωση μεταξύ των δύο παθήσεων είναι η συμπτωματολογία (στην Χ.Α.Π. συμπτώματα διαρκή και σταδιακά επιδεινούμενα, στο άσθμα κυρίως το βράδυ ή νωρίς το πρωί και με διακυμάνσεις από μέρα σε μέρα), η παρουσία αλλεργικής ρινίτιδας, ρινικών πολυπόδων, αλλεργίας στην ασπιρίνη, ή εκζέματος (άσθμα) και το οικογενειακό ιστορικό(ιστορικό άσθματος είναι υπέρ της διάγνωσης του άσθματος).

Άλλες παθήσεις που πρέπει να τεθούν στην διαφορική διάγνωση της Χ.Α.Π. είναι η συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια, οι βρογχεκτασίες, η φυματίωση, η αποφρακτική βρογχολίτιδα και η διάχυτη πανβρογχιολίτιδα(183).

# Κεφάλαιο 7

## ΚΑΤΑΤΑΞΗ ΒΑΡΥΤΗΤΑΣ

Η κατάταξη της βαρύτητας του ασθενούς σύμφωνα με τις θέσεις ομοφωνίας βασίζεται στην βαρύτητα των συμπτωμάτων, στην βαρύτητα του περιορισμού της ροής στους αεραγωγούς και στην παρουσία επιπλοκών, όπως η δεξιά καρδιακή ανεπάρκεια (πίνακας 1). Όπως για την διάγνωση, έτσι και για την κατάταξη της βαρύτητας της Χ.Α.Π. η χρήση συγκεκριμένων τιμών FEV<sub>1</sub> για την οριοθέτηση διαφορετικών επιπέδων βαρύτητας είναι αναξιόπιστη σε μεγάλες ηλικιακά ομάδες, αλλά εξυπηρετεί λόγους απλούστευσης.

<b>Στάδιο</b>	<b>Χαρακτηριστικά</b>
<b>0:</b> Υψηλού κινδύνου	<ul style="list-style-type: none"><li>• Φυσιολογική σπιρομέτρηση</li><li>• Χρόνια συμπτώματα (βήχας, πτύελα)</li></ul>
<b>I:</b> Ήπια Χ.Α.Π.	<ul style="list-style-type: none"><li>• FEV<sub>1</sub>/FVC&lt;70%</li><li>• FEV<sub>1</sub>≥80% προβλ.</li><li>• με ή χωρίς χρόνια συμπτώματα (βήχας, πτύελα)</li></ul>
<b>II:</b> Μέτρια Χ.Α.Π.	<ul style="list-style-type: none"><li>• FEV<sub>1</sub>/FVC&lt;70%</li><li>• 50%≤ FEV<sub>1</sub>&lt;80% προβλ.</li><li>• με ή χωρίς χρόνια συμπτώματα (βήχας, πτύελα, δύσπνοια)</li></ul>
<b>III:</b> Βαριά Χ.Α.Π.	<ul style="list-style-type: none"><li>• FEV<sub>1</sub>/FVC&lt;70%</li><li>• 30%≤ FEV<sub>1</sub>&lt;50% προβλ.</li><li>• με ή χωρίς χρόνια συμπτώματα (βήχας, πτύελα, δύσπνοια)</li></ul>
<b>IV:</b> Πολύ Βαριά Χ.Α.Π.	<ul style="list-style-type: none"><li>• FEV<sub>1</sub>/FVC&lt;70%</li><li>• FEV<sub>1</sub>&lt;30% προβλ. ή FEV<sub>1</sub>&lt;50% και αναπνευστική ανεπάρκεια</li></ul>





# Κεφάλαιο 8

## ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ

Η συνολική θεραπευτική προσέγγιση ενός ασθενούς με Χ.Α.Π. θα πρέπει να στηρίζεται στην σταδιακή αύξηση της θεραπευτικής αγωγής ανάλογα με την βαρύτητα της νόσου. Αντίθετα με το άσθμα, στην Χ.Α.Π. η δόση δεν θα πρέπει να μειώνεται σε περίπτωση βελτίωσης των συμπτωμάτων. Η αντιμετώπιση της Χ.Α.Π. έχει διάφορους στόχους, οι οποίοι θα πρέπει να επιτυγχάνονται με τις λιγότερες δυνατό παρενέργειες από την θεραπεία. Βασίζεται στην ατομική εκτίμηση της βαρύτητας της νόσου και στην ανταπόκριση σε διάφορες θεραπείες. Η κατάταξη της βαρύτητας της Χ.Α.Π. που είδαμε παραπάνω παρέχει μια εκτίμηση της βαρύτητας της νόσου και μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν οδηγός για την λήψη αποφάσεων για την θεραπευτική στρατηγική που θα πρέπει να ακολουθηθεί για τον κάθε ασθενή (πίνακας 1). Η θεραπεία εξαρτάται επίσης από το μορφωτικό επίπεδο του κάθε ασθενούς και από την θέλησή του να εφαρμόσει την συνιστώμενη θεραπευτική αγωγή.

Η φαρμακολογική θεραπεία χρησιμοποιείται για να προλάβει και να ελέγξει τα συμπτώματα, να μειώσει τη συχνότητα και την σοβαρότητα των εξάρσεων, να βελτιώσει το επίπεδο υγείας και να βελτιώσει την ανοχή στην άσκηση. Καμία από τις υπάρχουσες θεραπείες για την Χ.Α.Π. δεν έχει δειχθεί ότι τροποποιεί την μακροχρόνια έκπτωση της πνευμονικής λειτουργίας που είναι το κεντρικό γνώρισμα της νόσου. Ωστόσο, αυτό δεν πρέπει να αποτρέπει προσπάθειες για την χρήση φαρμακοθεραπείας για τον έλεγχο των συμπτωμάτων.

<b>Πίνακας 1-</b> Συνιστώμενη θεραπευτική αγωγή ασθενών με Χ.Α.Π. σύμφωνα με τις διεθνείς θέσεις ομοφωνίας.	
<b>Στάδιο</b>	<b>Συνιστώμενη αγωγή</b>
<b>Όλα</b>	Αποφυγή παραγόντων κινδύνου Αντιγριπτικό εμβόλιο
<b>0</b>	
<b>I</b>	Βραχείας δράσης βργχοδιασταλτικά κατ'επίκλισιν

II	<p>Τακτική αγωγή με ένα ή περισσότερα βρογχοδιασταλτικά</p> <p>Θεραπεία αποκατάστασης</p> <p>Εισπνεόμενα κορτικοειδή, εάν υπάρχουν βαριά συμπτώματα και ανταπόκριση της πνευμονικής λειτουργίας</p>
III	<p>Τακτική αγωγή με ένα ή περισσότερα βρογχοδιασταλτικά</p> <p>Θεραπεία αποκατάστασης</p> <p>Εισπνεόμενα κορτικοειδή, εάν υπάρχουν βαριά συμπτώματα ή συχνές εξάρσεις</p>
IV	<p>Τακτική αγωγή με ένα ή περισσότερα βρογχοδιασταλτικά</p> <p>Θεραπεία αποκατάστασης</p> <p>Εισπνεόμενα κορτικοειδή, εάν υπάρχουν βαριά συμπτώματα ή συχνές εξάρσεις</p> <p>Θεραπεία επιπλοκών</p> <p>Χρόνια κατ'οίκον οξυγονοθεραπεία εάν <math>PaO_2 &lt; 55\text{mmHg}</math> ή <math>PaO_2 &lt; 60\text{mmHg}</math> και πνευμονική υπέρταση, περιφερικά οιδήματα λόγω καρδιακής ανεπάρκειας ή πολυερυθραιμία</p> <p>Χειρουργική αντιμετώπιση</p>

Πολλές μελέτες έχουν ασχοληθεί με την βραχυχρόνια επίδραση των εισπνεόμενων κορτικοειδών σε παραμέτρους της πνευμονικής λειτουργίας. Αν και κάποιες μελέτες έδειξαν σημαντική βελτίωση, αρκετές άλλες όχι(181). Το μεγαλύτερο πρόβλημα των περισσότερων μελετών είναι ο μικρός αριθμός ασθενών και η βραχεία περίοδος της θεραπείας. Τα αποτελέσματα τεσσάρων μεγάλων μελετών για τις μακροχρόνιες επιδράσεις των εισπνεομένων κορτικοειδών παρέχουν ενδείξεις ότι η χρήση των εισπνεόμενων κορτικοειδών θα πρέπει να περιορίζεται στους ασθενείς με καταγεγραμμένη σπироμετρική

ανταπόκριση στα εισπνεόμενα κορτικοειδή ή σε αυτούς με FEV1 <50% (στάδιο 3 και 4) και επαναλαμβανόμενες παροξύνσεις(326-329).

Η χρησιμότητα γνωστών φαρμακευτικών ουσιών, όπως η θεοφυλλίνη, τα βλεννολυτικά, οι αντιοξειδωτικοί παράγοντες, τα αντιβιοτικά, παραμένει υπό διερεύνηση(181). Νέα φάρμακα διατίθενται αυτή την στιγμή στο εμπόριο, ή δοκιμάζονται σε μελέτες (πίνακας 2).

<b>Πίνακας 2-Νέα φάρμακα στη θεραπεία της Χ.Α.Π.</b>
--

Ανταγωνιστές διαφόρων μεσολαβητών (αντί-LTB4, αντί-5-lipoxygenase, αντί-IL-8, αντί-TNF, αντί-COX2).
---

Νέα αντιφλεγμονώδη φάρμακα (αναστολείς φωσφοδιεστεράσης -4, αναστολείς NF-kB, ανάλογα IL-10, αναστολείς μορίων προσκολλητικότητας, αναστολείς P38MAP κινάσης)
---

Αναστολείς πρωτεασών (αναστολείς ουδετεροφιλικής ελαστάσης και ελαστολυτικών κυστεινικών πρωτεασών).
--



# Κεφάλαιο 9

## ΠΑΡΟΞΥΝΣΗ

Τα τελευταία έτη έχει επικεντρωθεί μεγάλο μέρος του επιστημονικού ενδιαφέροντος στις αιτίες και στους μηχανισμούς παρόξυνσης Χ.Α.Π., καθώς οι τελευταίες αυξάνουν την θνησιμότητα και την θνητότητα ασθενών με Χ.Α.Π. και μειώνουν σημαντικά την ποιότητα ζωής των ασθενών. Οι παροξύνσεις Χ.Α.Π. γίνονται συχνότερες με την αύξηση της βαρύτητας της νόσου και συνοδεύονται από σημαντική επιδείνωση της πνευμονικής λειτουργίας και αύξηση στην ένταση της φλεγμονής(330).

Οι πρώτες περιγραφές παροξύνσεων Χ.Α.Π. έγιναν σε νοσηλευόμενους ασθενείς, αλλά οι περισσότερες παροξύνσεις αντιμετωπίζονται στην κοινότητα. Οι ασθενείς με Χ.Α.Π. έχουν συνηθίσει στις συχνές αλλαγές στην βαρύτητα της συμπτωματολογίας τους και για αυτό συνήθως δεν αναφέρουν όλες τις παροξύνσεις τους στους γιατρούς. Συμπερασματικά, είναι δύσκολο να υπολογιστεί με ακρίβεια η μέση συχνότητα εμφάνισης παροξύνσεων σε ασθενείς με Χ.Α.Π.

Σε μία πρόσφατη μελέτη οι ασθενείς με ΧΑ.Π. χωρίστηκαν σε δύο ομάδες ανάλογα με την συχνότητα των παροξύνσεων τους ανά έτος και βρέθηκε ότι οι ασθενείς με συχνές παροξύνσεις έχουν χαμηλότερη ποιότητα ζωής, αναφέρουν συχνότερα βήχα και παραγωγή πτυέλων και παρουσιάζουν συχνότερες παροξύνσεις κατά το αμέσως προηγούμενο έτος(330).

Σε μια άλλη μεγάλη μελέτη βρέθηκε ότι η πτώση των τιμών της FEV<sub>1</sub> και της PEF είναι γενικά μικρή κατά την διάρκεια των παροξύνσεων, ενώ μεγάλη πτώση συνοδεύεται από έντονα συμπτώματα δύσπνοιας, από την παρουσία κρυολογήματος και από μακρόχρονη ανάνηψη (331).

Αν και πιθανά οι παροξύνσεις Χ.Α.Π. συνοδεύονται από αύξηση της έντασης της φλεγμονής στους αεραγωγούς, υπάρχουν πολύ λίγες πληροφορίες σχετικά με την φύση της φλεγμονής, λόγω της δυσκολίας στην λήψη βρογχικών βιοψιών από ασθενείς με παρόξυνση Χ.Α.Π.

Σε μία μελέτη όπου ελήφθησαν βρογχικές βιοψίες από ασθενείς με ήπια Χ.Α.Π., βρέθηκε αύξηση στην ηωσινοφιλική φλεγμονή(298, 331). Παρατηρήθηκαν επίσης μέτριες αυξήσεις στους αριθμούς των ουδετεροφίλων, Τ λεμφοκυττάρων, TNF-a θετικών κυττάρων, ενώ δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές στους αριθμούς των CD4, CD8 θετικών κυττάρων, μακροφάγων ή

μαστοκυττάρων. Σε άλλη μελέτη προκλητών πτυέλων, που θεωρείται σχετικά ασφαλής τεχνική για ασθενείς με παρόξυνση Χ.Α.Π., έγινε προσπάθεια να συσχετιστούν δείκτες φλεγμονής των πτυέλων με συμπτώματα και φυσιολογικές παραμέτρους σε σταθερή κατάσταση και κατά την διάρκεια παροξύνσεων(332). Βρέθηκε θετική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων IL-6, IL-8 σε σταθερή κατάσταση και την συχνότητα των παροξύνσεων. Επειδή ο αριθμός των κυττάρων των πτυέλων στην σταθερή κατάσταση δεν ήταν αυξημένος, είναι πιθανό οι παραπάνω κυτταροκίνες να είχαν παραχθεί από το βρογχικό επιθήλιο. Και επειδή η λοίμωξη από ρινο-ιούς αυξάνει την παραγωγή κυτταροκινών από τα επιθηλιακά κύτταρα, δεν αποκλείεται η επαναλαμβανόμενες ιογενείς λοιμώξεις να επάγουν την αυξημένη παραγωγή κυτταροκινών στους αεραγωγούς ασθενών με συχνές παροξύνσεις Χ.Α.Π. Στην ίδια μελέτη βρέθηκε αύξηση στα επίπεδα IL-6 κατά την διάρκεια των παροξύνσεων. Μάλιστα, υψηλά επίπεδα IL-6 σχετίστηκαν με την παρουσία κρουολογήματος. Σημαντικά αυξημένα επίπεδα IL-8 στην παρόξυνση δεν βρέθηκαν, ίσως γιατί ήταν ήδη αρκετά αυξημένα στην σταθερή κατάσταση. Πιστεύεται άλλωστε ότι αν και η φλεγμονή αυξάνει στις παροξύνσεις Χ.Α.Π. είναι λιγότερο έντονη σε σύγκριση με τις παροξύνσεις άσθματος, το οποίο εν μέρει εξηγεί την μειωμένη ανταπόκριση ασθενών με παρόξυνση Χ.Α.Π. στα κορτικοειδή, σε σύγκριση με τους ασθενείς με παρόξυνση άσθματος. Στην ίδια πάντα μελέτη κανένας δείκτης φλεγμονής δεν συσχετίστηκε με την ένταση ή με την διάρκεια των συμπτωμάτων ή με την έκπτωση της φυσιολογικής λειτουργίας του πνεύμονα στην παρόξυνση Χ.Α.Π.

Μέχρι σήμερα παραμένει άγνωστη η συσχέτιση του τύπου και της έντασης της φλεγμονώδους αντίδρασης που αναπτύσσεται στην παρόξυνση Χ.Α.Π. και της αιτιολογίας της παρόξυνσης Χ.Α.Π. Στον πίνακα 1 εκτίθενται τα συχνότερα αίτια παρόξυνσης Χ.Α.Π. Ο ρινο-ιός είναι το συχνότερο αίτιο και αποτελεί σημαντικό στόχο της θεραπείας πρόληψης. Η θεραπεία πρόληψης είναι ένας από τους πρωταρχικούς στόχους της θεραπευτικής προσέγγισης της Χ.Α.Π., αφού η μείωση των παροξύνσεων θα μειώσει σημαντικά και την θνητότητα και θνησιμότητα που σχετίζονται με την Χ.Α.Π.(333).

Πίνακας 1- Αίτια παροξύνσεων Χ.Α.Π.
<p>Ιοί</p> <p><i>Rινοιοί</i> (κοινό κρυολόγημα)</p> <p><i>Influenza</i></p> <p><i>Parainfluenza</i></p> <p><i>Κορονοιοί</i></p> <p><i>Αδενοιοί</i></p> <p>Αναπνευστικό</p> <p>Συγκυτιακός Ιός</p> <p><i>Χλαμύδιο της πνευμονίας</i></p> <p>Βακτήρια</p> <p><i>H influenzae</i></p> <p><i>S pneumoniae</i></p> <p><i>M catarrhalis</i></p> <p><i>Staphylococcus aureus</i></p> <p><i>P aeruginosa</i></p> <p>Αέριοι Ρύποι</p> <p>Διοξείδιο του αζώτου</p> <p>Particulates</p> <p>Διοξείδιο του θείου</p> <p>Όζον</p>





# **ΕΝΟΤΗΤΑ ΙΙΙ**

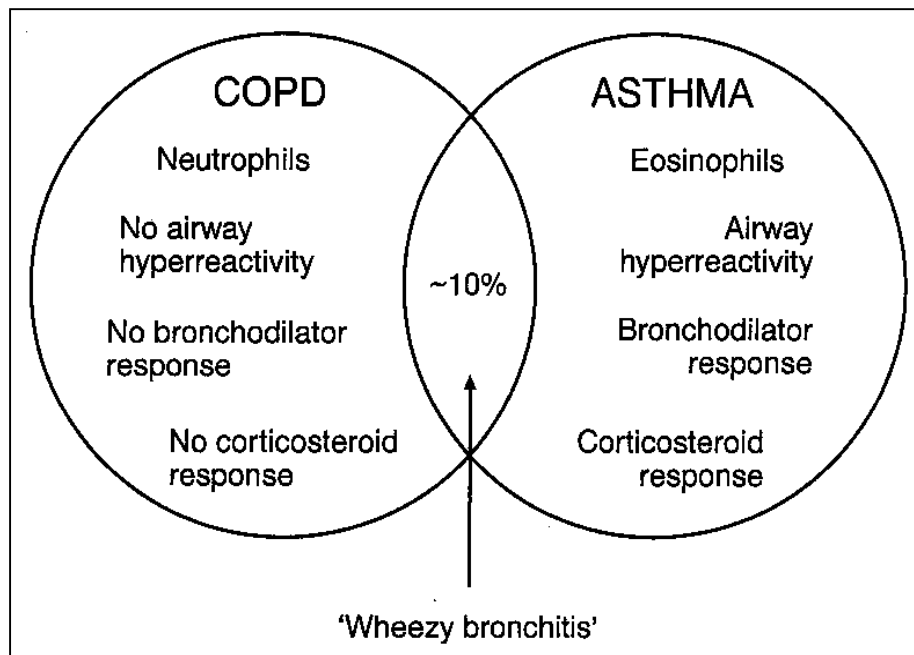
## **ΟΜΟΙΟΤΗΤΕΣ ΚΑΙ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΜΕΤΑΞΥ ΑΣΘΜΑΤΟΣ ΚΑΙ Χ.Α.Π.**



## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στο παρελθόν έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι το άσθμα και η Χ.Α.Π. έχουν κοινές ρίζες, αλλά τώρα είναι ευρέως αποδεκτό ότι πρόκειται για διαφορετικές παθήσεις που χαρακτηρίζονται από απόφραξη των αεραγωγών. Επειδή το άσθμα και η Χ.Α.Π. παρουσιάζουν υψηλά ποσοστά επιπολασμού, είναι αναμενόμενο ότι αρκετά άτομα θα πάσχουν ταυτοχρόνως από άσθμα και από Χ.Α.Π. Συγκεκριμένα, το 10% των ασθενών με Χ.Α.Π. φέρει παθολογικά χαρακτηριστικά ασθματικών ασθενών (334). Η ομάδα αυτή των αποφρακτικών ασθενών είναι γνωστή ως <<wheezy bronchitis>> ή σε ελεύθερη μετάφραση ομάδα <<σπαστικής βρογχίτιδας>>. Η σύγχυση κάποιων ειδικών στην αντιμετώπιση των δύο παθήσεων ως ένα κοινό νόσημα με δύο διαφορετικούς φαινοτύπους, οφείλεται εν μέρει στην ύπαρξη αυτής της ομάδας των ασθενών(σχήμα 1).

**Σχήμα 1-** Αλληλεπικάλυψη άσθματος και Χ.Α.Π. Περίπου 10% των ασθενών με Χ.Α.Π. έχουν επίσης άσθμα.



Συνοψίζοντας τα παθολογικά, παθολογοανατομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά ασθενών με άσθμα ή Χ.Α.Π., όπως περιγράφηκαν αναλυτικά στις προηγούμενες ενότητες, γίνεται κατανοητό ότι πρόκειται για δύο διαφορετικές παθήσεις(335).

## ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ

Αν και οι δύο παθήσεις χαρακτηρίζονται από απόφραξη των αεραγωγών και επίμονη φλεγμονή, η φύση της φλεγμονής διαφέρει σημαντικά μεταξύ των

δύο. Το άσθμα χαρακτηρίζεται από ηωσινοφιλική φλεγμονή, ενώ η Χ.Α.Π. από ουδετεροφιλική. Στο άσθμα ενέχονται κυρίως τα ηωσινόφιλα, τα μαστοκύτταρα, και τα CD4 λεμφοκύτταρα, ενώ στην Χ.Α.Π. κυρίως τα ουδετερόφιλα, τα μακροφάγα και τα CD8 λεμφοκύτταρα. Όσον αφορά τους μεσολαβητές, στο άσθμα ενέχονται κυρίως οι ιντερλευκίνες 4, 5 και 13, η ηωταξίνη, ο RANTES, και η ισταμίνη ενώ στην Χ.Α.Π. η ιντερλευκίνη 8, ο TNF-a και ο GRO-a. Το οξειδωτικό φορτίο είναι αυξημένο και στις δύο παθήσεις, αλλά περισσότερο στην Χ.Α.Π. Η υπερέκκριση βλέννης μπορεί να υπάρχει και στις δύο παθήσεις, αλλά συνηθέστερα στην Χ.Α.Π. Η βρογχική υπεραντιδραστικότητα μπορεί να υπάρχει και στις δύο παθήσεις, αλλά είναι διαφορετική όσον αφορά το ερέθισμα. Στον πίνακα 1 φαίνεται ο επιπολασμός της βρογχικής υπεραντιδραστικότητας στο άσθμα και στην Χ.Α.Π. σε διάφορα ερεθίσματα (είτε σε άμεσα όπως την μεταχολίνη και την ισταμίνη, είτε σε έμμεσα όπως τον υπεραερισμό με κρύο αέρα και το AMP). Γενικά, οι ασθενείς με άσθμα αντιδρούν περισσότερο σε έμμεσα ερεθίσματα σε σχέση με τους ασθενείς με Χ.Α.Π.

<b>Πίνακας 1-</b> Επιπολασμός της βρογχικής υπεραντιδραστικότητας σε ασθενείς με άσθμα και Χ.Α.Π.		
Ερέθισμα	Άσθμα	Χ.Α.Π.
Ακετυλοχολίνη	75	64
Μεταχολίνη	80	70
Ισταμίνη	82	36
Προπρανολόλη	67	21
SO <sub>2</sub>	95	30
AMP	90	90/39**
Υπεραερισμός*	96	11
Ομίχλη	30	81

\*Υπεραερισμός με κρύο αέρα.

\*\*90% σε καπνιστές και 39% σε μη καπνιστές

## **ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΤΟΜΙΑ**

Οι φλεγμονώδεις διεργασίες στο άσθμα λαμβάνουν χώρα κυρίως στους κεντρικούς (μεγάλους) αεραγωγούς, ενώ στην Χ.Α.Π. κυρίως στους περιφερικούς (μικρούς). Ηωσινοφιλία στους μικρούς αεραγωγούς, ακόμα και στις κυψελίδες έχει πρόσφατα αναφερθεί σε ασθματικούς, αλλά η συσχέτισή της με την παθολογία της νόσου δεν έχει διευκρινιστεί ακόμα(336). Στην

Χ.Α.Π. παρατηρείται εμφύσημα, ενώ στο άσθμα όχι. Στο άσθμα το βρογχικό επιθήλιο είναι εύθραυστο και συχνά έχει αποσπαστεί από την βασική μεμβράνη, ενώ στην Χ.Α.Π. παρατηρείται μεταπλασία του βρογχικού επιθηλίου και πυρηνικές ατυπίες. Όσον αφορά την δικτυωτή στιβάδα της βασικής μεμβράνης, στο άσθμα είναι πεπαχυσμένη με αυξημένη συγκέντρωση κολλαγόνου τύπου III και V, ενώ στην Χ.Α.Π. φυσιολογική. Ο λείος μυϊκός ιστός των βρόγχων είναι αυξημένος και στις δύο παθήσεις, αλλά στο μεν άσθμα κυρίως στους μεγάλους, στην δε Χ.Α.Π. κυρίως στους μικρούς αεραγωγούς. Τέλος, όσον αφορά τους βρογχικούς αδένες, στο άσθμα είναι αυξημένοι σε μέγεθος, αλλά παράγουν φυσιολογικής σύστασης βλέννη, ενώ στην Χ.Α.Π. είναι αυξημένοι και παράγουν βλέννη με αυξημένες αξιδικές γλυκοπρωτείνες.

### **ΔΕΙΚΤΕΣ ΠΕΥΜΟΝΙΚΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ**

Ο φυσιολογικός ρυθμός μείωσης της τιμής της FEV<sub>1</sub> είναι περίπου 30mL/έτος για τους υγιείς μη καπνιστές(337). Ο ρυθμός μείωσης στους καπνιστές είναι περίπου διπλάσιος του φυσιολογικού, ενώ στους καπνιστές υψηλού κινδύνου για ανάπτυξη Χ.Α.Π. φτάνει το διπλάσιο του μέσου όρου των καπνιστών (70-120mL/έτος)(337). Ασθματικοί μη καπνιστές με μεγάλη αναστρεψιμότητα στην βρογχοδιαστολή και συχνή λήψη από το στόμα κορτικοειδών παρουσιάζουν επίσης αυξημένο ρυθμό μείωσης της τιμής της FEV<sub>1</sub>, περίπου στα 50mL/έτος, ο οποίος μπορεί να οδηγήσει σε μη αναστρέψιμη απόφραξη της ροής των αεραγωγών(338).

Αν και σε ασθενείς με Χ.Α.Π. ή χρόνιο άσθμα μπορεί να υπάρχει μείωση των τιμών της FEV<sub>1</sub>, ο ίδιος βαθμός μείωσης δεν συνοδεύεται με τον ίδιο βαθμό πνευμονικής υπερδιάτασης. Πιο συγκεκριμένα, η υπερδιάταση είναι πιο χαρακτηριστικό φαινόμενο της Χ.Α.Π. παρά του άσθματος(337).

Η διαχυτική ικανότητα του CO, όπως μετράται με την μέθοδο της μίας εισπνοής, μπορεί να χρησιμεύσει στην διαφορική διάγνωση της απόφραξης που οφείλεται στο άσθμα ή στην Χ.Α.Π. Στην Χ.Α.Π. ο δείκτης διάχυσης CO είναι μειωμένος λόγω καταστροφής της αρχιτεκτονικής των κυψελίδων, ενώ στο άσθμα φυσιολογικός ή αυξημένος. Η εξήγηση αυτού του φαινομένου δεν είναι εντελώς ξεκάθαρη. Πιθανά οφείλεται σε μειωμένη ανάμιξη των ενδοπνευμονικών αερίων.

### **ΜΗ ΕΠΕΜΒΑΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΦΛΕΓΜΟΝΗΣ**

Όπως είδαμε στις προηγούμενες ενότητες η κυτταρική σύνθεση των πτυέλων διαφέρει μεταξύ του άσθματος και της Χ.Α.Π. Σε υγιή άτομα το μέσο

ποσοστό των ηωσινοφίλων είναι κάτω από 1%, ενώ το μέσο ποσοστό των ουδετεροφίλων κυμαίνεται από 9-32%(339). Υπό σταθερές συνθήκες το μέσο ποσοστό των ηωσινοφίλων στα πτύελα είναι σημαντικά αυξημένο στο άσθμα σε σύγκριση με την Χ.ΑΠ(340, 341). Το ποσοστό των ουδετεροφίλων στο άσθμα κυμαίνεται από 14% έως 90%, σε κάποιους ασθενείς με βαρύ επίμονο άσθμα ή με έξαρση άσθματος(341, 342).

Η συγκέντρωση του εκπνεόμενου ΝΟ, που έχει προταθεί ως δείκτης φλεγμονής των αεραγωγών σε διάφορες παθήσεις του πνεύμονα, είναι αυξημένη σε ασθματικούς ασθενείς που δεν λαμβάνουν κορτικοειδή(60). Επίσης, είναι αυξημένη σε ασθενείς με Χ.Α.Π. που δεν καπνίζουν, ενώ είναι μειωμένη σε καπνιστές με Χ.Α.Π(343).

### **ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΗ ΣΤΗΝ ΑΝΤΙΦΛΕΓΜΟΝΩΔΗ ΑΓΩΓΗ**

Η ανταπόκριση στην αγωγή διαφέρει σημαντικά μεταξύ των ασθενών με άσθμα ή με Χ.Α.Π. Η ηωσινοφιλική φλεγμονή στο άσθμα καταστέλλεται χαρακτηριστικά από τα κορτικοειδή(344). Εξαφανίζονται τα ηωσινόφιλα από τα πτύελα και από το βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα και μειώνεται η βρογχική υπεραντιδραστικότητα. Αντιθέτως, τα κορτικοειδή δεν φαίνεται να έχουν οποιαδήποτε επίδραση στην φλεγμονή των ασθενών με Χ.Α.Π., δεν μειώνουν την ουδετεροφιλία, ούτε ελαττώνουν τα επίπεδα των μεσολαβητών της φλεγμονής(345).

### **ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ**

Υπάρχει έντονη φλεγμονή στους αεραγωγούς των ασθενών με άσθμα ή Χ.Α.Π., αλλά σημαντικές διαφορές όσον αφορά τον κύριο φαινότυπο, το ανατομικό μέρος που κυρίως εδράζεται η φλεγμονή και τις φυσιολογικές συνέπειες αυτής. Η εμπλοκή ενεργοποιημένων λεμφοκυττάρων στην παθογένεια και των δύο παθήσεων είναι κοινή συνιστώσα, αν και ο υπότυπος των λεμφοκυττάρων είναι διαφορετικός (CD4 στο άσθμα, CD8 στην Χ.Α.Π.). Στην Χ.Α.Π. οι συνέπειες της ιστικής καταστροφής και αναδιάταξης είναι πιο έντονες στην περιφέρεια, ενώ αντιθέτως στο άσθμα εμπλέκονται οι μεγάλοι, κεντρικοί αεραγωγοί. Πάχυνση της δικτυωτής στιβάδας της βασικής μεμβράνης και μεγέθυνση της μάζας των βρογχικών λείων μυών δεν παρατηρούνται στους μεγάλους αεραγωγούς των ασθενών με Χ.Α.Π.

Σήμερα οι γνώσεις μας όσον αφορά τις ιστολογικές, ανοσολογικές και μοριακές διαφορές μεταξύ άσθματος και Χ.Α.Π. είναι ενδιαφέρουσες, αλλά όχι απόλυτες. Ωστόσο, με την προσεκτική καταγραφή των κλινικών πληροφοριών και την εφαρμογή νέων κυτταρολογικών, ανοσολογικών και μοριακών

τεχνικών γίνεται όλο και περισσότερο προσιτή η διαφορική διάγνωση μεταξύ του άσθματος και της Χ.Α.Π.





# **ΕΝΟΤΗΤΑ IV**

## **Η ΤΕΧΝΗΤΗ ΠΡΟΚΛΗΣΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΠΤΥΕΛΩΝ**



## **ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

Η εισπνοή εναιωρήματος υπέρτονου υγρού στην τεχνική της πρόκλησης πτυέλων χρησιμοποιήθηκε αρχικά από τον Bickerman και τους συνεργάτες του το 1958 στην κυτταρολογία του καρκίνου του πνεύμονα(346). Αργότερα τα προκληθέντα πτύελα χρησιμοποιήθηκαν κλινικά για την ανίχνευση διάφορων παθογόνων μικροοργανισμών(347-349). Στις αρχές του 1990, η τεχνική της πρόκλησης πτυέλων παρουσιάστηκε από την Pin και τους συνεργάτες της ως μέθοδος μελέτης της φλεγμονής των αεραγωγών στο άσθμα(350). Από τότε, η μέθοδος χρησιμοποιείται ευρέως στην έρευνα των νοσημάτων που χαρακτηρίζονται από φλεγμονή των αεραγωγών. Ιδιαίτερα βρίσκει εφαρμογή στη μελέτη των παθογενετικών μηχανισμών της χρόνιας αποφρακτικής πνευμονοπάθειας και του άσθματος.

## **ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ**

Η διαδικασία της πρόκλησης πτυέλων επιτυγχάνεται με την εισπνοή υπέρτονου διαλύματος χλωριούχου νατρίου το οποίο παράγεται από νεφελοποιητή υπερήχων.

Λόγω της σχετικής επεμβατικότητας της μεθόδου είναι αναγκαίος ο εξοπλισμός του εργαστηρίου με βρογχοδιασταλτικά, με συσκευές χορήγησης οξυγόνου καθώς και με εξοπλισμό ανάνηψης. Η παρουσία ιατρού ο οποίος επιβλέπει τη διαδικασία της πρόκλησης είναι αναγκαία. Οι παραπάνω περιορισμοί όπως και το υψηλό κόστος της συσκευής χορήγησης του νεφελώματος περιορίζουν την χρήση της μεθόδου μόνο σε εξειδικευμένα νοσοκομεία.

Οι ερευνητές διαφωνούν σχετικά με τον τρόπο με τον οποίο πρέπει να πραγματοποιείται η διαδικασία πρόκλησης πτυέλων και σχετικά με το κατά πόσο πρέπει να μελετάται ολόκληρο το δείγμα πτυέλων ή μόνο τα βύσματα. Αυτό προκαλεί σύγχυση όταν γίνεται σύγκριση δεδομένων διάφορων μελετών με διαφορές στην μεθοδολογία. Η Ευρωπαϊκή Πνευμονολογική Εταιρεία (ERS) έχει προσπαθήσει να προτυποποιήσει την τεχνική πρόκλησης πτυέλων καθώς και τον τρόπο ανάλυσης τους(351, 352).

Υπάρχουν δυο κύριες διαδικασίες με τις οποίες επιτυγχάνεται πρόκληση πτυέλων. Ο Iredal και οι συνεργάτες του προτείνουν την εισπνοή της ίδιας ποσότητας υπέρτονου εναιωρήματος (4,5%) για αυξανόμενα χρονικά διαστήματα, ενώ οι Pin και συνεργάτες προτείνουν την ισόχρονη εισπνοή διαδοχικά αυξανόμενων συγκεντρώσεων υπέρτονου εναιωρήματος (3%, 4%, 5%)(350, 353). Μία μελέτη έχει δείξει ότι η εισπνοή υπέρτονου εναιωρήματος

περιεκτικότητας 3% είναι το ίδιο επιτυχής στη πρόκληση πτυέλων όσο η εισπνοή υπέρτονου εναιωρήματος σε διαδοχικά αυξανόμενες συγκεντρώσεις (3% - 5%)(354). Στο εργαστήριο μας χρησιμοποιείται η μέθοδος των Pin και συνεργατών με ποσοστό επιτυχίας 95% και χωρίς σοβαρές επιπλοκές, ακόμα και σε ασθενείς με σοβαρή ΧΑΠ(355).

Κατά την έναρξη της διαδικασίας πραγματοποιείται λειτουργικός έλεγχος του αναπνευστικού με καταγραφή του δυναμικά εκπνεόμενου όγκου αέρα στο πρώτο δευτερόλεπτο ( $FEV_1$ ). Ακολουθεί εισπνοή  $\beta_2$ -διεγέρτη βραχείας δράσης (σαλβουταμόλη) με δοσιμετρική συσκευή εισπνοών (200 $\mu$ g) και 10 λεπτά αργότερα γίνεται νέα σπιρομέτρηση. Έχει αποδειχθεί ότι η χορήγηση  $\beta_2$  αγωνιστή πριν την έναρξη της διαδικασίας δεν επηρεάζει τους παράγοντες της φλεγμονής στο δείγμα του πτυέλου καθώς και τη συγκέντρωση της ηωσινοφιλικής κατιονικής πρωτεΐνης (ECP) στα πτύελα(354, 356). Στη συνέχεια ακολουθεί η διαδικασία της πρόκλησης. Ο ασθενής εισπνέει υπέρτονο διάλυμα για χρονικό διάστημα δέκα λεπτών (10min). Η περιεκτικότητα του εισπνεόμενου εναιωρήματος αυξάνεται διαδοχικά σε κάθε συνεδρία από 3% σε 4% και τέλος σε 5%.

Μετά το πέρας της χορήγησης του νεφελώματος ζητείτε από τους ασθενείς να φυσήξουν την μύτη τους, να ξεπλύνουν το στόμα τους και να προσπαθήσουν να αποβάλουν τα πτύελα σε αποστειρωμένο δοχείο. Με την παραπάνω τεχνική η πιθανότητα επιμόλυνσης των πτυέλων με σίελο ελαχιστοποιείται, ενώ το ποσοστό των επιθηλιακών κυττάρων του δείγματος μειώνεται(357). Η καλύτερη ποιότητα δείγματος επιτυγχάνεται με ελεγχόμενη απόχρεμψη στην προσπάθεια πρόκλησης βήχα. Η παραγωγή εκκρίσεων με το φτάρνισμα και τους γαργαρισμούς πρέπει να αποφεύγεται. Το στάδιο αυτό της διαδικασίας είναι πολύ σημαντικό για να πραγματοποιηθεί λήψη εκκρίσεων αντιπροσωπευτικών των αεραγωγών.

Μετά από κάθε συνεδρία εισπνοής του υπέρτονου εναιωρήματος πραγματοποιείται σπιρομέτρηση με σκοπό να υπολογιστεί η πτώση της τιμής της  $FEV_1$ . Η διαδικασία διακόπτεται όταν γίνει επαρκής συλλογή δείγματος (περίπου 1g), εάν παρουσιαστούν επιπλοκές ή εάν η  $FEV_1$  παρουσιάσει πτώση μεγαλύτερη από το 20% της αρχικής τιμής. Ο συγκεκριμένος μηχανισμός με τον οποίο η εισπνοή του υπέρτονου εναιωρήματος προκαλεί την παραγωγή πτυέλων δεν έχει διευκρινιστεί. Σαν πιθανές ερμηνείες προτείνονται η ομωτικές ιδιότητες του νεφελώματος, η αύξηση της

βλεννοκροσσωτής κάθαρσης, καθώς και μία αύξηση στη διέγερση των αδενικών κυττάρων(358-361).

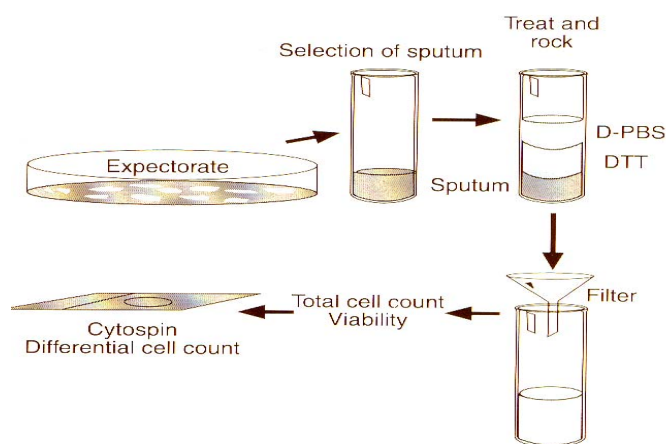
## **ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΠΤΥΕΛΩΝ**

Η επεξεργασία των πτυέλων πραγματοποιείται μέσα στα επόμενα 30 λεπτά ή το αργότερο μέσα σε δύο ώρες από τη λήψη των πτυέλων, με το δείγμα να διατηρείται πάντα σε πάγο. Σε πολλά εργαστήρια πραγματοποιείται επεξεργασία ολόκληρου του δείγματος του πτυέλου. Η παραπάνω τεχνική χρησιμοποιείται από τον Fahy και τους συνεργάτες του(93). Άλλοι ερευνητές προτιμούν να συλλέγουν και να αναλύουν τα βύσματα των πτυέλων όπως περιγράφεται από τους Pin και συν(350). Και οι δυο διαδικασίες που αναφέρθηκαν παραπάνω έχουν αποδειχθεί ότι είναι έγκυρες και αναπαραγώγιμες. Η μέθοδος όμως της επιλογής των κολλωδών τμημάτων των πτυέλων παρέχει μεγαλύτερη βιωσιμότητα και καλύτερη ποιότητα κυττάρων(362, 363).

Μετά την επιλογή και το ζύγισμα των βυσμάτων, προστίθεται διθειοθρεϊτόλη (DTT) και μετά Dulbecco's phosphate buffer saline (D-PBS). Στη συνέχεια το δείγμα φιλτράρεται και ακολουθεί φυγοκέντρηση. Το υπερκείμενο υγρό αναρροφάτε και ψύχετε στους  $-80^{\circ}\text{C}$  με σκοπό να αναλυθεί αργότερα. Το κυτταρικό εναιώρημα αργότερα αναμιγνύεται ξανά με D-PBS και 10% FCS (Fetal calf serum). Γίνεται μέτρηση του ολικού αριθμού κυττάρων του φιλτραρισμένου δείγματος, κατά προτίμηση πριν την φυγοκέντρηση του, και στη συνέχεια εξετάζεται η βιωσιμότητα των κυττάρων μέσω της μεθόδου αποκλεισμού με μπλε της τολουιδίνης(364).

Εάν η βιωσιμότητα των κυττάρων είναι μικρότερη από το 50% και η επιμόλυνση από τα επιθηλιακά κύτταρα είναι πάνω από 20%, το δείγμα δεν είναι αξιόπιστο και κατά συνέπεια δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για περαιτέρω μελέτη(365). Το υπερκείμενο των πτυέλων τοποθετείται σε σωληνάρια Eppendorf. Τόσο το υπερκείμενο όσο και το κυτταρικό εναιώρημα διατηρούνται στους  $-80^{\circ}\text{C}$  για την μετέπειτα επεξεργασία τους. Ο διαχωρισμός των διαφόρων κυτταρικών τύπων συνήθως επιτελείται με τη χρωστική μέθοδο May-Grunwald Giemsa, αποκλείοντας τα επιθηλιακά κύτταρα (εικόνα 1).

**Εικόνα 1.** Διαδικασία της επεξεργασίας των πτυέλων.



Στο πρώτο βήμα της επεξεργασίας των πτυέλων, προστίθεται διθειοθρειτόλη (DDT). Πρόκειται για ένα παράγοντα ο οποίος εξουδετερώνει τις γλυκοπρωτεΐνες της βλέννας επιτυγχάνοντας ρευστοποίηση και ομογενοποίηση του πτυέλου. Παρόλα αυτά, μπορεί να καταστρέψει τους υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας καθώς και διάφορους διαλυτούς μεσολαβητές. Μπορεί επίσης να αντιδράσει με τα αντισώματα που χρησιμοποιούνται στις διάφορες τεχνικές της ανοσοκυταροχημείας. Πολλές μελέτες έχουν δείξει την επίδραση της διθειοθρειτόλης (DDT) στην βιωσιμότητα των κυττάρων, στα λεμφοκύτταρα, στα ηωσινόφιλα, καθώς και στους διάφορους μεσολαβητές της φλεγμονής(366-372).

## **ΕΠΑΝΑΛΗΨΙΜΟΤΗΤΑ**

Υπάρχουν πολλές μελέτες που δείχνουν ότι οι μετρήσεις των κυττάρων στα προκλητά πτύελα μας δίνουν πολλές πληροφορίες, ιδιαίτερα όταν η βιωσιμότητα των κυττάρων είναι υψηλή και η επιμόλυνση με επιθηλιακά κύτταρα διατηρείται σε χαμηλά επίπεδα(373, 374). Επίσης έχει διαπιστωθεί η επαναληψιμότητα της μεθόδου σε δείγματα πτυέλων που πάρθηκαν από τον ίδιο ασθενή σε διαφορετικές μέρες (375-377).

Κάποιοι ερευνητές όμως υποστηρίζουν ότι τα διαδοχικά δείγματα προκλητών πτυέλων διαφέρουν στην κυτταρική τους σύνθεση(377, 378). Ο Nightingale και οι συνεργάτες του έχουν αναφέρει πρόσφατα αύξηση του αριθμού και των ποσοστών των ουδετερόφιλων σε διαδοχικά δείγματα προκλητών πτυέλων που πάρθηκαν από υγιείς εθελοντές μέσα σε 8 ή 24 ώρες. Σύμφωνα με τους συγγραφείς, αυτή η παρατήρηση οφείλεται στην φλεγμονώδη αντίδραση των αεραγωγών που προκαλείται από την διαδικασία της πρόκλησης των πτυέλων. Υπάρχουν αποδείξεις από μελέτες τόσο σε υγιείς όσο και σε ασθματικούς, ότι η υψηλή συγκέντρωση σιέλου προκαλεί

αύξηση των ουδετεροφίλων στους αεραγωγούς(340, 379). Διαφορές στη σύνθεση των προκλητών πτυέλων παρατηρούνται ανάλογα με τον τύπο και τη βαρύτητα της νόσου. Επίσης μελέτες αναφέρουν ότι τα αρχικά δείγματα των προκλητών πτυέλων αντιπροσωπεύουν υλικό που λαμβάνεται από τους κεντρικούς αεραγωγούς, ενώ υπόλοιπα δείγματα αντιπροσωπεύουν συστατικά των περιφερικών αεραγωγών.

## **ΑΣΦΑΛΕΙΑ**

Είναι γνωστό ότι η πρόκληση πτυέλων μπορεί να προκαλέσει σύσπαση των λείων μυϊκών ινών των βρόγχων. Η υπερτονικότητα του διαλύματος, το ποσό του εισπνεόμενου αέρα και ο ρυθμός μεταφοράς του επηρεάζουν την πιθανότητα πρόκλησης σύσπασης των βρόγχων(354, 380). Λίγες όμως μελέτες τεκμηριώνουν τις παραπάνω πληροφορίες(381, 382).

Σε πολλές μελέτες αναφέρεται ότι δεν υπήρξαν επιπλοκές κατά τη διαδικασία της πρόκλησης των πτυέλων σε ασθενείς με Χ.Α.Π. ή ήπιο άσθμα. Υπάρχουν όμως μελέτες στις οποίες αναφέρεται δύσπνοια και/ή πτώση της FEV<sub>1</sub> μεγαλύτερη από το 10% της αρχικής τιμής σε ένα σημαντικό ποσοστό ασθενών με βαριά Χ.Α.Π. ή βαρύ άσθμα, τα οποία όμως αναστρέφονται εύκολα με την χορήγηση βρογχοδιασταλτικών ουσιών(383-385).

Τα παραπάνω στοιχεία επιβάλλουν την πραγματοποίηση σπιρομέτρησης κατά τη διάρκεια εκτέλεσης της μεθόδου με σκοπό να ανιχνεύεται έγκαιρα η σύσπαση των αεραγωγών. Στο εργαστήριο μας εάν παρατηρηθεί πτώση του FEV<sub>1</sub> από 10% έως 20%, συγκριτικά με την αρχική τιμή, κατά τη διαδικασία της πρόκλησης δεν αυξάνουμε την συγκέντρωση του υπέρτονου εναιωρήματος και αν η πτώση του FEV<sub>1</sub> είναι μεγαλύτερη από 20% τότε σταματάμε τη διαδικασία(355).

## **ΣΥΚΡΙΣΗ ΜΕ ΑΛΛΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ**

Τα πτύελα (αυτόματα ή προκλητά παραγόμενα), βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (BALF) και οι βρογχικές βιοψίες αποτελούν τις κύριες πηγές άντλησης πληροφοριών σχετικά με την φλεγμονή των αεραγωγών που χαρακτηρίζει την παθογένεια των αποφρακτικών νοσημάτων. Τα δείγματα βρογχικού ιστού υπερέχουν στην παροχή πληροφοριών για τη διαδικασία της φλεγμονής σε όλη την έκταση του πνεύμονα (στους αεραγωγούς, στις αρτηρίες και στο πνευμονικό παρέγχυμα). Ωστόσο, προφανείς τεχνικές δυσκολίες και δεοντολογικά ζητήματα συχνά καθιστούν δυσχερή την ανάλυσή τους για ερευνητικούς σκοπούς.

Τα δείγματα αυτόματα παραγόμενων πτυέλων περιέχουν μικρότερο αριθμό βιώσιμων κυττάρων συγκριτικά με τα προκλητά παραγόμενα πτύελα(136). Ωστόσο, σε μια πρόσφατη μελέτη φάνηκε ότι όταν η βιωσιμότητα των κυττάρων της αυτόματης απόχρεμψης είναι υψηλότερη από το 50%, η κυτταρική σύνθεση και οι δείκτες της φλεγμονής της υγρής φάσης των πτυέλων προσδιορίζονται με την ίδια ακρίβεια. Έτσι σε περιπτώσεις όπου η τεχνητή πρόκλησης πτυέλων δεν μπορεί να εφαρμοστεί με μεγάλη ασφάλεια, όπως σε παρόξυνση Χ.Α.Π. ή άσθματος, τα δείγματα πτυέλων της αυτόματης απόχρεμψης αποτελούν μια εναλλακτική λύση.

Η κυτταρική σύνθεση των δειγμάτων πτυέλων διαφέρει συγκριτικά με το βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα και με τις βρογχικές βιοψίες. Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι τα πτύελα προέρχονται κυρίως από τους μεγάλους αεραγωγούς, τα δείγματα του βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος από τα βρογχιόλια και τις κυψελίδες, ενώ οι βρογχικές βιοψίες κυρίως από τους μεγάλους ή μικρούς αεραγωγούς ανάλογα με την τοποθεσία επιλογής(219). Τα πτύελα αποτελούνται κυρίως από ουδετερόφιλα κύτταρα και από μακροφάγα, ενώ έχουν πολύ λιγότερα λεμφοκύτταρα. Το βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα αποτελείται κυρίως από μακροφάγα και από λεμφοκύτταρα, ενώ έχει λιγότερα ουδετερόφιλα. Ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι τα πτύελα έχουν μεγαλύτερη πυκνότητα, περισσότερα φλεγμονώδη κύτταρα και αυξημένους δείκτες φλεγμονής συγκριτικά με το βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα(386). Στις βρογχικές βιοψίες επικρατούν κυρίως τα λεμφοκύτταρα. Ο αριθμός των ηωσινοφίλων κυττάρων δεν διαφέρει σημαντικά ανάμεσα στα πτύελα, στο BALF υγρό και στις βρογχικές βιοψίες(386-388).



# **ΕΝΟΤΗΤΑ V**

**ΑΝΑΦΟΡΕΣ**

**ΓΕΝΙΚΟΥ**

**ΜΕΡΟΥΣ**



1. Standards. ATSCoD. Definitions and classification of chronic bronchitis, asthma, and pulmonary emphysema. *Am Rev Respir Dis* 1962;85:762.
2. WHO/NHLBI Workshop Report. National Institutes of Health NH, Lung, and Blood Institute, Bethesda, MD. Global Strategy for Asthma Management and Prevention. Publication No.95-3659.1995 updated April 2002.
3. Dodge RR, Burrows B. The prevalence and incidence of asthma and asthma-like symptoms in a general population sample. *Am Rev Respir Dis* 1980;122(4):567-75.
4. Jenkins MA, Hopper JL, Bowes G, Carlin JB, Flander LB, Giles GG. Factors in childhood as predictors of asthma in adult life. *Bmj* 1994;309(6947):90-3.
5. Lange P, Parner J, Vestbo J, Schnohr P, Jensen G. A 15-year follow-up study of ventilatory function in adults with asthma. *N Engl J Med* 1998;339(17):1194-200.
6. Lowe L, Murray CS, Custovic A, Simpson BM, Kissen PM, Woodcock A. Specific airway resistance in 3-year-old children: a prospective cohort study. *Lancet* 2002;359(9321):1904-8.
7. Martinez FD, Wright AL, Taussig LM, Holberg CJ, Halonen M, Morgan WJ. Asthma and wheezing in the first six years of life. The Group Health Medical Associates. *N Engl J Med* 1995;332(3):133-8.
8. Stolley PD, Schinnar R. Association between asthma mortality and isoproterenol aerosols: a review. *Prev Med* 1978;7(4):519-38.
9. Beasley R, Burgess C, Crane J, Pearce N. The New Zealand asthma mortality epidemic. *Clin Sci (Lond)* 1995;88(1):14-7.
10. Janson C, Chinn S, Jarvis D, Burney P. Physician-diagnosed asthma and drug utilization in the European Community Respiratory Health Survey. *Eur Respir J* 1997;10(8):1795-802.
11. Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee. *Lancet* 1998;351(9111):1225-32.
12. Magnus P, Jaakkola JJ. Secular trend in the occurrence of asthma among children and young adults: critical appraisal of repeated cross sectional surveys. *Bmj* 1997;314(7097):1795-9.

13. Weinberg EG. Urbanization and childhood asthma: an African perspective. *J Allergy Clin Immunol* 2000;105(2 Pt 1):224-31.
14. Bjorksten B, Dumitrascu D, Foucard T, Khetsuriani N, Khaitov R, Leja M, et al. Prevalence of childhood asthma, rhinitis and eczema in Scandinavia and Eastern Europe. *Eur Respir J* 1998;12(2):432-7.
15. Roitt IM. Immunology, physiology, pathology and clinic. London:Blackwell Scientific 1992.
16. Bukantz SC, Lockey RF. IgE immediate hypersensitivity. In: Weiss EB, Stein M, eds. *Bronchial asthma. Mechanisms and therapeutics*. Boston:Little, Brown 1993:68-79.
17. Pearce N, Pekkanen J, Beasley R. How much asthma is really attributable to atopy? *Thorax* 1999;54(3):268-72.
18. Milgrom H, Fick RB, Jr., Su JQ, Reimann JD, Bush RK, Watrous ML, et al. Treatment of allergic asthma with monoclonal anti-IgE antibody. rhuMAb-E25 Study Group. *N Engl J Med* 1999;341(26):1966-73.
19. Fahy JV, Cockcroft DW, Boulet LP, Wong HH, Deschesnes F, Davis EE, et al. Effect of aerosolized anti-IgE (E25) on airway responses to inhaled allergen in asthmatic subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160(3):1023-7.
20. Neurath MF, Finotto S, Glimcher LH. The role of Th1/Th2 polarization in mucosal immunity. *Nat Med* 2002;8(6):567-73.
21. Umetsu DT, McIntire JJ, Akbari O, Macaubas C, DeKruyff RH. Asthma: an epidemic of dysregulated immunity. *Nat Immunol* 2002;3(8):715-20.
22. Finotto S, Neurath MF, Glickman JN, Qin S, Lehr HA, Green FH, et al. Development of spontaneous airway changes consistent with human asthma in mice lacking T-bet. *Science* 2002;295(5553):336-8.
23. Ray A, Cohn L. Th2 cells and GATA-3 in asthma: new insights into the regulation of airway inflammation. *J Clin Invest* 1999;104(8):985-93.
24. Tournoy KG, Kips JC, Pauwels RA. Is Th1 the solution for Th2 in asthma? *Clin Exp Allergy* 2002;32(1):17-29.
25. Henderson WR, Jr., Chi EY, Maliszewski CR. Soluble IL-4 receptor inhibits airway inflammation following allergen challenge in a mouse model of asthma. *J Immunol* 2000;164(2):1086-95.
26. Borish LC, Nelson HS, Lanz MJ, Claussen L, Whitmore JB, Agosti JM, et al. Interleukin-4 receptor in moderate atopic asthma. A phase I/II

- randomized, placebo-controlled trial. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160(6):1816-23.
27. Wills-Karp M, Luyimbazi J, Xu X, Schofield B, Neben TY, Karp CL, et al. Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. *Science* 1998;282(5397):2258-61.
  28. Lampinen M, Rak S, Venge P. The role of interleukin-5, interleukin-8 and RANTES in the chemotactic attraction of eosinophils to the allergic lung. *Clin Exp Allergy* 1999;29(3):314-22.
  29. Kay AB. Asthma and inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 1991;87(5):893-910.
  30. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998;392(6673):245-52.
  31. Tonnel AB, Joseph M, Gosset P, Fournier E, Capron A. Stimulation of alveolar macrophages in asthmatic patients after local provocation test. *Lancet* 1983;1(8339):1406-8.
  32. Comhair SA, Bhatena PR, Dweik RA, Kavuru M, Erzurum SC. Rapid loss of superoxide dismutase activity during antigen-induced asthmatic response. *Lancet* 2000;355(9204):624.
  33. Persson CG. Role of plasma exudation in asthmatic airways. *Lancet* 1986;2(8516):1126-9.
  34. Bochner BS, Undem BJ, Lichtenstein LM. Immunological aspects of allergic asthma. *Annu Rev Immunol* 1994;12:295-335.
  35. Denburg JA. The origins of basophils and eosinophils in allergic inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 1998;102(5):S74-6.
  36. Leuenberger P, Kunzli N, Ackermann-Liebrich U, Schindler C, Bolognini G, Bongard JP, et al. [Swiss Study on Air Pollution and Lung Diseases in Adults (SAPALDIA)]. *Schweiz Med Wochenschr* 1998;128(5):150-61.
  37. Umibe T, Kita Y, Nakao A, Nakajima H, Fukuda T, Yoshida S, et al. Clonal expansion of T cells infiltrating in the airways of non-atopic asthmatics. *Clin Exp Immunol* 2000;119(3):390-7.
  38. Humbert M, Menz G, Ying S, Corrigan CJ, Robinson DS, Durham SR, et al. The immunopathology of extrinsic (atopic) and intrinsic (non-atopic) asthma: more similarities than differences. *Immunol Today* 1999;20(11):528-33.

39. Montefort S, Roche WR, Howarth PH, Djukanovic R, Gratziau C, Carroll M, et al. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and endothelial leucocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1) expression in the bronchial mucosa of normal and asthmatic subjects. *Eur Respir J* 1992;5(7):815-23.
40. Sedgwick JB, Quan SF, Calhoun WJ, Busse WW. 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(3):375-85.
41. Teixeira MM, Wells TN, Lukacs NW, Proudfoot AE, Kunkel SL, Williams TJ, et al. Chemokine-induced eosinophil recruitment. Evidence of a role for endogenous eotaxin in an in vivo allergy model in mouse skin. *J Clin Invest* 1997;100(7):1657-66.
42. White E. Life, death, and the pursuit of apoptosis. *Genes Dev* 1996;10(1):1-15.
43. Simon HU, Blaser K. Inhibition of programmed eosinophil death: a key pathogenic event for eosinophilia? *Immunol Today* 1995;16(2):53-5.
44. Vignola AM, Chanez P, Chiappara G, Siena L, Merendino A, Reina C, et al. Evaluation of apoptosis of eosinophils, macrophages, and T lymphocytes in mucosal biopsy specimens of patients with asthma and chronic bronchitis. *J Allergy Clin Immunol* 1999;103(4):563-73.
45. Bradley BL, Azzawi M, Jacobson M, Assoufi B, Collins JV, Irani AM, et al. 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(4):661-74.
46. Weller PF. The immunobiology of eosinophils. *N Engl J Med* 1991;324(16):1110-8.
47. Gleich GJ, Adolphson CR, Leiferman KM. The biology of the eosinophilic leukocyte. *Annu Rev Med* 1993;44:85-101.
48. Rabe KF, Munoz NM, Vita AJ, Morton BE, Magnussen H, Leff AR. Contraction of human bronchial smooth muscle caused by activated human eosinophils. *Am J Physiol* 1994;267(3 Pt 1):L326-34.
49. Leff AR. Inflammatory mediation of airway hyperresponsiveness by peripheral blood granulocytes. The case for the eosinophil. *Chest* 1994;106(4):1202-8.

50. Leckie MJ, ten Brinke A, Khan J, Diamant Z, O'Connor BJ, Walls CM, et al. Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response. *Lancet* 2000;356(9248):2144-8.
51. Bryan SA, O'Connor BJ, Matti S, Leckie MJ, Kanabar V, Khan J, et al. Effects of recombinant human interleukin-12 on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response. *Lancet* 2000;356(9248):2149-53.
52. Koshino T, Arai Y, Miyamoto Y, Sano Y, Takaishi T, Hirai K, et al. Mast cell and basophil number in the airway correlate with the bronchial responsiveness of asthmatics. *Int Arch Allergy Immunol* 1995;107(1-3):378-9.
53. Beasley R, Roche WR, Roberts JA, Holgate ST. Cellular events in the bronchi in mild asthma and after bronchial provocation. *Am Rev Respir Dis* 1989;139(3):806-17.
54. Lloyd AR, Oppenheim JJ. Poly's lament: the neglected role of the polymorphonuclear neutrophil in the afferent limb of the immune response. *Immunol Today* 1992;13(5):169-72.
55. Wenzel SE, Szefer 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(3 Pt 1):737-43.
56. Senior RM, Connolly NL, Cury JD, Welgus HG, Campbell EJ. Elastin degradation by human alveolar macrophages. A prominent role of metalloproteinase activity. *Am Rev Respir Dis* 1989;139(5):1251-6.
57. Vignola AM, Chanez P, Chiappara G, Merendino A, Zinnanti E, Bousquet J, et al. Release of transforming growth factor-beta (TGF-beta) and fibronectin by alveolar macrophages in airway diseases. *Clin Exp Immunol* 1996;106(1):114-9.
58. Barnes PJ, Baraniuk JN, Belvisi MG. Neuropeptides in the respiratory tract. Part II. *Am Rev Respir Dis* 1991;144(6):1391-9.
59. Hamid Q, Springall DR, Riveros-Moreno V, Chanez P, Howarth P, Redington A, et al. Induction of nitric oxide synthase in asthma. *Lancet* 1993;342(8886-8887):1510-3.
60. Kharitonov SA, Yates D, Robbins RA, Logan-Sinclair R, Shinebourne EA, Barnes PJ. Increased nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients. *Lancet* 1994;343(8890):133-5.

61. Dolovich J, Hargreave F. The asthma syndrome: inciters, inducers, and host characteristics. *Thorax* 1981;36(9):641-3.
62. Scoggin C. Exercise-induced asthma. *Chest* 1985;87(1 Suppl):48S-49S.
63. Johnston SL. Viruses and asthma. *Allergy* 1998;53(10):922-32.
64. Grunberg K, Timmers MC, de Klerk EP, Dick EC, Sterk PJ. Experimental rhinovirus 16 infection causes variable airway obstruction in subjects with atopic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160(4):1375-80.
65. Grunberg K, Smits HH, Timmers MC, de Klerk EP, Dolhain RJ, Dick EC, et al. Experimental rhinovirus 16 infection. Effects on cell differentials and soluble markers in sputum in asthmatic subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156(2 Pt 1):609-16.
66. Djukanovic R, Feather I, Gratziau C, Walls A, Peroni D, Bradding P, et al. Effect of natural allergen exposure during the grass pollen season on airways inflammatory cells and asthma symptoms. *Thorax* 1996;51(6):575-81.
67. Busse WW, Sedgwick JB. Eosinophil eicosanoid relations in allergic inflammation of the airways. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* 1994;22:241-9.
68. Sterk PJ. Repeated low dose allergen exposure: a new investigational model of asthma as a persistent disease? *Eur Respir J* 1998;11(4):798-800.
69. Chan-Yeung M, Malo JL. Occupational asthma. *N Engl J Med* 1995;333(2):107-12.
70. Saetta M, Maestrelli P, Turato G, Mapp CE, Milani G, Pivrotto F, et al. Airway wall remodeling after cessation of exposure to isocyanates in sensitized asthmatic subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151(2 Pt 1):489-94.
71. Krishna MT, Mudway I, Kelly FJ, Frew AJ, Holgate ST. Ozone, airways and allergic airways disease. *Clin Exp Allergy* 1995;25(12):1150-8.
72. Szczeklik A, Nizankowska E, Bochenek G, Nagraba K, Mejza F, Swierczynska M. Safety of a specific COX-2 inhibitor in aspirin-induced asthma. *Clin Exp Allergy* 2001;31(2):219-25.
73. Marquette CH, Saulnier F, Leroy O, Wallaert B, Chopin C, Demarcq JM, et al. Long-term prognosis of near-fatal asthma. A 6-year follow-up study of 145 asthmatic patients who underwent mechanical ventilation for a near-fatal attack of asthma. *Am Rev Respir Dis* 1992;146(1):76-81.



74. McFadden ER, Jr. Exertional dyspnea and cough as preludes to acute attacks of bronchial asthma. *N Engl J Med* 1975;292(11):555-9.
75. Veen JC, Smits HH, Ravensberg AJ, Hiemstra PS, Sterk PJ, Bel EH. Impaired perception of dyspnea in patients with severe asthma. Relation to sputum eosinophils. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158(4):1134-41.
76. Wiggs BR, Bosken C, Pare PD, James A, Hogg JC. A model of airway narrowing in asthma and in chronic obstructive pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis* 1992;145(6):1251-8.
77. Shimura S, Andoh Y, Haraguchi M, Shirato K. Continuity of airway goblet cells and intraluminal mucus in the airways of patients with bronchial asthma. *Eur Respir J* 1996;9(7):1395-401.
78. Carroll N, Elliot J, Morton A, James A. The structure of large and small airways in nonfatal and fatal asthma. *Am Rev Respir Dis* 1993;147(2):405-10.
79. Ding DJ, Martin JG, Macklem PT. Effects of lung volume on maximal methacholine-induced bronchoconstriction in normal humans. *J Appl Physiol* 1987;62(3):1324-30.
80. McFadden ER, Jr., Kiser R, DeGroot WJ. Acute bronchial asthma. Relations between clinical and physiologic manifestations. *N Engl J Med* 1973;288(5):221-5.
81. Sterk PJ, Fabbri LM, Quanjer PH, Cockcroft DW, O'Byrne PM, Anderson SD, et al. Airway responsiveness. Standardized challenge testing with pharmacological, physical and sensitizing stimuli in adults. Report Working Party Standardization of Lung Function Tests, European Community for Steel and Coal. Official Statement of the European Respiratory Society. *Eur Respir J Suppl* 1993;16:53-83.
82. Solway J, Fredberg JJ. Perhaps airway smooth muscle dysfunction contributes to asthmatic bronchial hyperresponsiveness after all. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997;17(2):144-6.
83. Macklem PT. A theoretical analysis of the effect of airway smooth muscle load on airway narrowing. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153(1):83-9.
84. Thomson RJ, Bramley AM, Schellenberg RR. Airway muscle stereology: implications for increased shortening in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154(3 Pt 1):749-57.

85. Stephens NL, Li W, Wang Y, Ma X. The contractile apparatus of airway smooth muscle. *Biophysics and biochemistry. Am J Respir Crit Care Med* 1998;158(5 Pt 3):S80-94.
86. Chung KF. Airway smooth muscle cells: contributing to and regulating airway mucosal inflammation? *Eur Respir J* 2000;15(5):961-8.
87. Gunst SJ, Tang DD. The contractile apparatus and mechanical properties of airway smooth muscle. *Eur Respir J* 2000;15(3):600-16.
88. Feuerlein RJ, Weber RE. Oxygen equilibria of cathodic eel hemoglobin analysed in terms of the MWC model and Adair's successive oxygenation theory. *J Comp Physiol [B]* 1996;165(8):597-606.
89. King GG, Pare PD, Seow CY. The mechanics of exaggerated airway narrowing in asthma: the role of smooth muscle. *Respir Physiol* 1999;118(1):1-13.
90. Shimura S, Sasaki T, Sasaki H, Takishima T. Chemical properties of bronchorrhea sputum in bronchial asthma. *Chest* 1988;94(6):1211-5.
91. Johnson PR, Ammit AJ, Carlin SM, Armour CL, Caughey GH, Black JL. Mast cell tryptase potentiates histamine-induced contraction in human sensitized bronchus. *Eur Respir J* 1997;10(1):38-43.
92. Earle B. Fatal bronchial asthma. *Thorax* 1953;8:195-206.
93. Fahy JV, Liu J, Wong H, Boushey HA. Cellular and biochemical analysis of induced sputum from asthmatic and from healthy subjects. *Am Rev Respir Dis* 1993;147(5):1126-31.
94. Sakula A. Charcot-Leyden crystals and Curschmann spirals in asthmatic sputum. *Thorax* 1986;41(7):503-7.
95. Takeyama K, Dabbagh K, Lee HM, Agusti C, Lausier JA, Ueki IF, et al. Epidermal growth factor system regulates mucin production in airways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(6):3081-6.
96. Grunig G, Warnock M, Wakil AE, Venkayya R, Brombacher F, Rennick DM, et al. Requirement for IL-13 independently of IL-4 in experimental asthma. *Science* 1998;282(5397):2261-3.
97. Wanner A, Salathe M, O'Riordan TG. Mucociliary clearance in the airways. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154(6 Pt 1):1868-902.
98. Nadel JA, Takeyama K, Agusti C. Role of neutrophil elastase in hypersecretion in asthma. *Eur Respir J* 1999;13(1):190-6.

99. Paganin F, Seneterre E, Chanez P, Daures JP, Bruel JM, Michel FB, et al. Computed tomography of the lungs in asthma: influence of disease severity and etiology. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153(1):110-4.
100. Selroos O, Pietinalho A, Lofroos AB, Riska H. Effect of early vs late intervention with inhaled corticosteroids in asthma. *Chest* 1995;108(5):1228-34.
101. McFadden ER, Jr., Lyons HA. Arterial-blood gas tension in asthma. *N Engl J Med* 1968;278(19):1027-32.
102. Ferrer A, Roca J, Wagner PD, Lopez FA, Rodriguez-Roisin R. Airway obstruction and ventilation-perfusion relationships in acute severe asthma. *Am Rev Respir Dis* 1993;147(3):579-84.
103. Baldwin L, Roche WR. Does remodelling of the airway wall precede asthma? *Paediatr Respir Rev* 2002;3(4):315-20.
104. 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(5):1720-45.
105. Brewster CE, Howarth PH, Djukanovic R, Wilson J, Holgate ST, Roche WR. Myofibroblasts and subepithelial fibrosis in bronchial asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1990;3(5):507-11.
106. Lipscombe RJ, Nakhoul AM, Sanderson CJ, Coombe DR. Interleukin-5 binds to heparin/heparan sulfate. A model for an interaction with extracellular matrix. *J Leukoc Biol* 1998;63(3):342-50.
107. Laurent TC, Fraser JR. Hyaluronan. *Faseb J* 1992;6(7):2397-404.
108. Neeley SP, Hamann KJ, Dowling TL, McAllister KT, White SR, Leff AR. Augmentation of stimulated eosinophil degranulation by VLA-4 (CD49d)-mediated adhesion to fibronectin. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1994;11(2):206-13.
109. Kips JC, Pauwels RA. Airway wall remodelling: does it occur and what does it mean? *Clin Exp Allergy* 1999;29(11):1457-66.
110. Abramson MJ, Hensley MJ, Saunders NA, Wlodarczyk JH. Evaluation of a new asthma questionnaire. *J Asthma* 1991;28(2):129-39.
111. Burney PG, Laitinen LA, Perdrizet S, Huckauf H, Tattersfield AE, Chinn S, et al. Validity and repeatability of the IUATLD (1984) Bronchial Symptoms Questionnaire: an international comparison. *Eur Respir J* 1989;2(10):940-5.

112. Juniper EF, O'Byrne PM, Guyatt GH, Ferrie PJ, King DR. Development and validation of a questionnaire to measure asthma control. *Eur Respir J* 1999;14(4):902-7.
113. Juniper EF, Guyatt GH, Cox FM, Ferrie PJ, King DR. Development and validation of the Mini Asthma Quality of Life Questionnaire. *Eur Respir J* 1999;14(1):32-8.
114. Jones PW. Quality of life measurement in asthma. *Eur Respir J* 1995;8(6):885-7.
115. Killian KJ, Summers E, Watson RM, O'Byrne PM, Jones NL, Campbell EJ. Factors contributing to dyspnoea during bronchoconstriction and exercise in asthmatic subjects. *Eur Respir J* 1993;6(7):1004-10.
116. Ryan G, Latimer KM, Dolovich J, Hargreave FE. Bronchial responsiveness to histamine: relationship to diurnal variation of peak flow rate, improvement after bronchodilator, and airway calibre. *Thorax* 1982;37(6):423-9.
117. van Essen-Zandvliet EE, Hughes MD, Waalkens HJ, Duiverman EJ, Pocock SJ, Kerrebijn KF. Effects of 22 months of treatment with inhaled corticosteroids and/or beta-2-agonists on lung function, airway responsiveness, and symptoms in children with asthma. The Dutch Chronic Non-specific Lung Disease Study Group. *Am Rev Respir Dis* 1992;146(3):547-54.
118. Standardized lung function testing. Official statement of the European Respiratory Society. *Eur Respir J Suppl* 1993;16:1-100.
119. Standardization of Spirometry, 1994 Update. American Thoracic Society. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152(3):1107-36.
120. Lung function testing: selection of reference values and interpretative strategies. American Thoracic Society. *Am Rev Respir Dis* 1991;144(5):1202-18.
121. Quanjer PH, Lebowitz MD, Gregg I, Miller MR, Pedersen OF. Peak expiratory flow: conclusions and recommendations of a Working Party of the European Respiratory Society. *Eur Respir J Suppl* 1997;24:2S-8S.
122. Killian KJ, Watson R, Otis J, St Amand TA, O'Byrne PM. Symptom perception during acute bronchoconstriction. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162(2 Pt 1):490-6.

123. Nowak RM, Pensler MI, Sarkar DD, Anderson JA, Kvale PA, Ortiz AE, et al. Comparison of peak expiratory flow and FEV1 admission criteria for acute bronchial asthma. *Ann Emerg Med* 1982;11(2):64-9.
124. Gibson PG, Wong BJ, Hepperle MJ, Kline PA, Girgis-Gabardo A, Guyatt G, et al. A research method to induce and examine a mild exacerbation of asthma by withdrawal of inhaled corticosteroid. *Clin Exp Allergy* 1992;22(5):525-32.
125. Sawyer G, Miles J, Lewis S, Fitzharris P, Pearce N, Beasley R. Classification of asthma severity: should the international guidelines be changed? *Clin Exp Allergy* 1998;28(12):1565-70.
126. Eid N, Yandell B, Howell L, Eddy M, Sheikh S. Can peak expiratory flow predict airflow obstruction in children with asthma? *Pediatrics* 2000;105(2):354-8.
127. Brand PL, Duiverman EJ, Waalkens HJ, van Essen-Zandvliet EE, Kerrebijn KF. Peak flow variation in childhood asthma: correlation with symptoms, airways obstruction, and hyperresponsiveness during long-term treatment with inhaled corticosteroids. Dutch CNSLD Study Group. *Thorax* 1999;54(2):103-7.
128. Quackenboss JJ, Lebowitz MD, Krzyzanowski M. The normal range of diurnal changes in peak expiratory flow rates. Relationship to symptoms and respiratory disease. *Am Rev Respir Dis* 1991;143(2):323-30.
129. Reddel HK, Salome CM, Peat JK, Woolcock AJ. Which index of peak expiratory flow is most useful in the management of stable asthma? *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151(5):1320-5.
130. D'Souza WJ, Te Karu H, Fox C, Harper M, Gemmell T, Ngatuere M, et al. Long-term reduction in asthma morbidity following an asthma self-management programme. *Eur Respir J* 1998;11(3):611-6.
131. Venables KM, Chan-Yeung M. Occupational asthma. *Lancet* 1997;349(9063):1465-9.
132. Cockcroft DW, Hargreave FE. Airway hyperresponsiveness. Relevance of random population data to clinical usefulness. *Am Rev Respir Dis* 1990;142(3):497-500.
133. Ramsdale EH, Morris MM, Roberts RS, Hargreave FE. Asymptomatic bronchial hyperresponsiveness in rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 1985;75(5):573-7.

134. van Haren EH, Lammers JW, Festen J, Heijerman HG, Groot CA, van Herwaarden CL. The effects of the inhaled corticosteroid budesonide on lung function and bronchial hyperresponsiveness in adult patients with cystic fibrosis. *Respir Med* 1995;89(3):209-14.
135. Ramsdale EH, Morris MM, Roberts RS, Hargreave FE. Bronchial responsiveness to methacholine in chronic bronchitis: relationship to airflow obstruction and cold air responsiveness. *Thorax* 1984;39(12):912-8.
136. Pizzichini MM, Popov TA, Efthimiadis A, Hussack P, Evans S, Pizzichini E, et al. Spontaneous and induced sputum to measure indices of airway inflammation in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154(4 Pt 1):866-9.
137. Kharitonov S, Alving K, Barnes PJ. Exhaled and nasal nitric oxide measurements: recommendations. The European Respiratory Society Task Force. *Eur Respir J* 1997;10(7):1683-93.
138. Horvath I, Barnes PJ. Exhaled monoxides in asymptomatic atopic subjects. *Clin Exp Allergy* 1999;29(9):1276-80.
139. Dow L. Asthma in older people. *Clin Exp Allergy* 1998;28(Suppl 5):195-202; discussion 203-5.
140. Tracey M, Villar A, Dow L, Coggon D, Lampe FC, Holgate ST. The influence of increased bronchial responsiveness, atopy, and serum IgE on decline in FEV1. A longitudinal study in the elderly. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151(3 Pt 1):656-62.
141. Tarlo SM, Boulet LP, Cartier A, Cockcroft D, Cote J, Hargreave FE, et al. Canadian Thoracic Society guidelines for occupational asthma. *Can Respir J* 1998;5(4):289-300.
142. Chan-Yeung M, MacLean L, Paggiaro PL. Follow-up study of 232 patients with occupational asthma caused by western red cedar (*Thuja plicata*). *J Allergy Clin Immunol* 1987;79(5):792-6.
143. Harju T, Keistinen T, Tuuponen T, Kivela SL. Seasonal variation in childhood asthma hospitalisations in Finland, 1972-1992. *Eur J Pediatr* 1997;156(6):436-9.
144. O'Hollaren MT, Yunginger JW, Offord KP, Somers MJ, O'Connell EJ, Ballard DJ, et al. Exposure to an aeroallergen as a possible precipitating factor in respiratory arrest in young patients with asthma. *N Engl J Med* 1991;324(6):359-63.

145. Boulet LP, Cartier A, Thomson NC, Roberts RS, Dolovich J, Hargreave FE. Asthma and increases in nonallergic bronchial responsiveness from seasonal pollen exposure. *J Allergy Clin Immunol* 1983;71(4):399-406.
146. Mok Q, Piesowicz AT. Foreign body aspiration mimicking asthma. *Intensive Care Med* 1993;19(4):240-1.
147. Place R, Morrison A, Arce E. Vocal cord dysfunction. *J Adolesc Health* 2000;27(2):125-9.
148. Bousquet J, Chanez P, Lacoste JY, Barneon G, Ghavanian N, Enander I, et al. Eosinophilic inflammation in asthma. *N Engl J Med* 1990;323(15):1033-9.
149. Cockcroft DW, Swystun VA. Asthma control versus asthma severity. *J Allergy Clin Immunol* 1996;98(6 Pt 1):1016-8.
150. Strunk RC. Identification of the fatality-prone subject with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1989;83(2 Pt 1):477-85.
151. Jalaludin BB, Smith MA, Chey T, Orr NJ, Smith WT, Leeder SR. Risk factors for asthma deaths: a population-based, case-control study. *Aust N Z J Public Health* 1999;23(6):595-600.
152. Rona RJ. Asthma and poverty. *Thorax* 2000;55(3):239-44.
153. Stenius-Aarniala B, Poussa T, Kvarnstrom J, Gronlund EL, Ylikahri M, Mustajoki P. Immediate and long term effects of weight reduction in obese people with asthma: randomised controlled study. *Bmj* 2000;320(7238):827-32.
154. Lewith GT. Respiratory illness: a complementary perspective. *Thorax* 1998;53(10):898-904.
155. Abramson MJ, Puy RM, Weiner JM. Is allergen immunotherapy effective in asthma? A meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151(4):969-74.
156. Spiegelberg HL, Orozco EM, Roman M, Raz E. DNA immunization: a novel approach to allergen-specific immunotherapy. *Allergy* 1997;52(10):964-70.
157. WHO/NHLBI Workshop Report. National Institutes of Health NH, Lung, and Blood Institute, Bethesda, MD. Global Strategy for Asthma Management and Prevention. Publication No.95-3659.1995 updated April 2002.
158. Proceedings of the ATS workshop on refractory asthma: current understanding, recommendations, and unanswered questions. American Thoracic Society. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162(6):2341-51.

159. Ulrik CS, Lange P. Decline of lung function in adults with bronchial asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;150(3):629-34.
160. ten Brinke A, van Dissel JT, Sterk PJ, Zwinderman AH, Rabe KF, Bel EH. Persistent airflow limitation in adult-onset nonatopic asthma is associated with serologic evidence of *Chlamydia pneumoniae* infection. *J Allergy Clin Immunol* 2001;107(3):449-54.
161. Gibbs R, Miranda C, Wenzel S, et al. Initial demographic information from an extensive data base of severe, steroid dependent asthmatics studied at National Jewish [abstract]. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;165:A119.
162. Sandford AJ, Chagani T, Zhu S, Weir TD, Bai TR, Spinelli JJ, et al. Polymorphisms in the IL4, IL4RA, and FCER1B genes and asthma severity. *J Allergy Clin Immunol* 2000;106(1 Pt 1):135-40.
163. Burchard EG, Silverman EK, Rosenwasser LJ, Borish L, Yandava C, Pillari A, et al. Association between a sequence variant in the IL-4 gene promoter and FEV<sub>1</sub> in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160(3):919-22.
164. Pulleyn LJ, Newton R, Adcock IM, Barnes PJ. TGFbeta1 allele association with asthma severity. *Hum Genet* 2001;109(6):623-7.
165. Szalai C, Kozma GT, Nagy A, Bojszko A, Krikovszky D, Szabo T, et al. Polymorphism in the gene regulatory region of MCP-1 is associated with asthma susceptibility and severity. *J Allergy Clin Immunol* 2001;108(3):375-81.
166. Squillace SP, Sporik RB, Rakes G, Couture N, Lawrence A, Merriam S, et al. Sensitization to dust mites as a dominant risk factor for asthma among adolescents living in central Virginia. Multiple regression analysis of a population-based study. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156(6):1760-4.
167. Halonen M, Stern DA, Wright AL, Taussig LM, Martinez FD. *Alternaria* as a major allergen for asthma in children raised in a desert environment. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155(4):1356-61.
168. Rosenstreich DL, Eggleston P, Kattan M, Baker D, Slavin RG, Gergen P, et al. The role of cockroach allergy and exposure to cockroach allergen in causing morbidity among inner-city children with asthma. *N Engl J Med* 1997;336(19):1356-63.
169. Siroux V, Pin I, Oryszczyn MP, Le Moual N, Kauffmann F. Relationships of active smoking to asthma and asthma severity in the EGEA



- study. Epidemiological study on the Genetics and Environment of Asthma. *Eur Respir J* 2000;15(3):470-7.
170. Wenzel S. Severe/fatal asthma. *Chest* 2003;123(3 Suppl):405S-10S.
171. Wenzel SE, Schwartz LB, Langmack EL, Halliday JL, Trudeau JB, Gibbs RL, et al. Evidence that severe asthma can be divided pathologically into two inflammatory subtypes with distinct physiologic and clinical characteristics. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160(3):1001-8.
172. Jatakanon A, Uasuf C, Maziak W, Lim S, Chung KF, Barnes PJ. Neutrophilic inflammation in severe persistent asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160(5 Pt 1):1532-9.
173. Kam JC, Szeffler SJ, Surs W, Sher ER, Leung DY. Combination IL-2 and IL-4 reduces glucocorticoid receptor-binding affinity and T cell response to glucocorticoids. *J Immunol* 1993;151(7):3460-6.
174. Lane SJ, Adcock IM, Richards D, Hawrylowicz C, Barnes PJ, Lee TH. Corticosteroid-resistant bronchial asthma is associated with increased c-fos expression in monocytes and T lymphocytes. *J Clin Invest* 1998;102(12):2156-64.
175. Leung DY, Hamid Q, Vottero A, Szeffler SJ, Surs W, Minshall E, et al. Association of glucocorticoid insensitivity with increased expression of glucocorticoid receptor beta. *J Exp Med* 1997;186(9):1567-74.
176. Takeyama K, Fahy JV, Nadel JA. Relationship of epidermal growth factor receptors to goblet cell production in human bronchi. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163(2):511-6.
177. James AL, Pare PD, Hogg JC. The mechanics of airway narrowing in asthma. *Am Rev Respir Dis* 1989;139(1):242-6.
178. Carroll NG, Mutavdzic S, James AL. Distribution and degranulation of airway mast cells in normal and asthmatic subjects. *Eur Respir J* 2002;19(5):879-85.
179. Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease. American Thoracic Society. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152(5 Pt 2):S77-121.
180. Siafakas NM, Vermeire P, Pride NB, Paoletti P, Gibson J, Howard P, et al. Optimal assessment and management of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). The European Respiratory Society Task Force Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease. American Thoracic Society

- Lung function testing: selection of reference values and interpretative strategies. American Thoracic Society
- Bronchodilator and corticosteroid reversibility in ambulatory patients with airways obstruction. *Eur Respir J* 1995;8(8):1398-420.
181. Pauwels RA, Buist AS, Calverley PM, Jenkins CR, Hurd SS. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI/WHO Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) Workshop summary. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163(5):1256-76.
182. Dirksen A, Christensen H, Evald T, Jensen BV, Jensen JI, Keittelmann S, et al. Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease. American Thoracic Society
- Lung function testing: selection of reference values and interpretative strategies. American Thoracic Society
- Bronchodilator and corticosteroid reversibility in ambulatory patients with airways obstruction. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152(5 Pt 2):S77-121.
183. National Heart LaBl. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. Global strategy for the diagnosis, management and prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. NHLBI/WHO Workshop Report. April 2001:Publication Number 2701.
184. National Heart LaBl. Morbidity & Mortality: chartbook on cardiovascular, lung and blood diseases. Bethesda, MD: US Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health;1998. Available from:URL: [www.nhlbi.nih.gov/nhlbi/seiin//other/cht-book/htm](http://www.nhlbi.nih.gov/nhlbi/seiin//other/cht-book/htm).
185. Murray C, IOPEZ A. Evidence based health policy-lessons from the Global Burden of Disease Study. *Science* 1996;274:740-3.
186. Burrows B, Knudson RJ, Cline MG, Lebowitz MD. Quantitative relationships between cigarette smoking and ventilatory function. *Am Rev Respir Dis* 1977;115(2):195-205.
187. Auerbach O, Hammond EC, Garfinkel L, Benante C. Relation of smoking and age to emphysema. Whole-lung section study. *N Engl J Med* 1972;286(16):853-7.
188. Xu X, Weiss ST, Rijcken B, Schouten JP. Smoking, changes in smoking habits, and rate of decline in FEV1: new insight into gender differences. *Eur Respir J* 1994;7(6):1056-61.

189. Xu X, Li B, Wang L. Gender difference in smoking effects on adult pulmonary function. *Eur Respir J* 1994;7(3):477-83.
190. Gold DR, Tager IB, Weiss ST, Tosteson TD, Speizer FE. Acute lower respiratory illness in childhood as a predictor of lung function and chronic respiratory symptoms. *Am Rev Respir Dis* 1989;140(4):877-84.
191. Mannino DM, Homa DM, Pertowski CA, Ashizawa A, Nixon LL, Johnson CA, et al. Surveillance for asthma--United States, 1960-1995. *MMWR CDC Surveill Summ* 1998;47(1):1-27.
192. Weiss ST, Ware JH. Overview of issues in the longitudinal analysis of respiratory data. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154(6 Pt 2):S208-11.
193. Gottlieb DJ, Sparrow D, O'Connor GT, Weiss ST. Skin test reactivity to common aeroallergens and decline of lung function. The Normative Aging Study. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153(2):561-6.
194. Rijcken B, Schouten JP, Weiss ST, Speizer FE, van der Lende R. The association of airways responsiveness to respiratory symptom prevalence and to pulmonary function in a random population sample. *Bull Eur Physiopathol Respir* 1987;23(4):391-4.
195. Hoppers JJ, Postma DS, Rijcken B, Weiss ST, Schouten JP. Histamine airway hyper-responsiveness and mortality from chronic obstructive pulmonary disease: a cohort study. *Lancet* 2000;356(9238):1313-7.
196. Eriksson S. Studies in alpha 1-antitrypsin deficiency. *Acta Med Scand Suppl* 1965;432:1-85.
197. Silverman EK, Chapman HA, Drazen JM, Weiss ST, Rosner B, Campbell EJ, et al. Genetic epidemiology of severe, early-onset chronic obstructive pulmonary disease. Risk to relatives for airflow obstruction and chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157(6 Pt 1):1770-8.
198. Hoidal JR. Genetics of COPD: present and future. *Eur Respir J* 2001;18(5):741-3.
199. Rennard SI. COPD: overview of definitions, epidemiology, and factors influencing its development. *Chest* 1998;113(4 Suppl):235S-241S.
200. Peat JK, Woolcock AJ, Cullen K. Rate of decline of lung function in subjects with asthma. *Eur J Respir Dis* 1987;70(3):171-9.
201. Vestbo J, Prescott E, Lange P. Association of chronic mucus hypersecretion with FEV1 decline and chronic obstructive pulmonary disease morbidity. Copenhagen City Heart Study Group. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153(5):1530-5.

202. Hunninghake GW, Crystal RG. Cigarette smoking and lung destruction. Accumulation of neutrophils in the lungs of cigarette smokers. *Am Rev Respir Dis* 1983;128(5):833-8.
203. Wewers MD, Gadek JE. The protease theory of emphysema. *Ann Intern Med* 1987;107(5):761-3.
204. Saetta M, Di Stefano A, Turato G, Facchini FM, Corbino L, Mapp CE, et al. CD8+ T-lymphocytes in peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157(3 Pt 1):822-6.
205. Finkelstein R, Fraser RS, Ghezzi H, Cosio MG. Alveolar inflammation and its relation to emphysema in smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152(5 Pt 1):1666-72.
206. Lams BE, Sousa AR, Rees PJ, Lee TH. Immunopathology of the small-airway submucosa in smokers with and without chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158(5 Pt 1):1518-23.
207. Di Stefano A, Maestrelli P, Roggeri A, Turato G, Calabro S, Potena A, et al. Upregulation of adhesion molecules in the bronchial mucosa of subjects with chronic obstructive bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;149(3 Pt 1):803-10.
208. Saetta M, Di Stefano A, Maestrelli P, Ferraresso A, Drigo R, Potena A, et al. Activated T-lymphocytes and macrophages in bronchial mucosa of subjects with chronic bronchitis. *Am Rev Respir Dis* 1993;147(2):301-6.
209. Hulbert WM, McLean T, Hogg JC. The effect of acute airway inflammation on bronchial reactivity in guinea pigs. *Am Rev Respir Dis* 1985;132(1):7-11.
210. Bosken CH, Hards J, Gatter K, Hogg JC. Characterization of the inflammatory reaction in the peripheral airways of cigarette smokers using immunocytochemistry. *Am Rev Respir Dis* 1992;145(4 Pt 1):911-7.
211. Totti N, 3rd, McCusker KT, Campbell EJ, Griffin GL, Senior RM. Nicotine is chemotactic for neutrophils and enhances neutrophil responsiveness to chemotactic peptides. *Science* 1984;223(4632):169-71.
212. Colten HR, Krause JE. Pulmonary inflammation--a balancing act. *N Engl J Med* 1997;336(15):1094-6.
213. Abbas A, Lichtman A, Pober J. *Cellular and Molecular Immunology*, 3rd ed. W.B. Saunders, Philadelphia. 1997.

214. Chanez P, Vignola AM, O'Shaugnessy T, Enander I, Li D, Jeffery PK, et al. Corticosteroid reversibility in COPD is related to features of asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155(5):1529-34.
215. Wang Z, Zheng T, Zhu Z, Homer RJ, Riese RJ, Chapman HA, Jr., et al. Interferon gamma induction of pulmonary emphysema in the adult murine lung. *J Exp Med* 2000;192(11):1587-600.
216. Saetta M, Mariani M, Panina-Bordignon P, Turato G, Buonsanti C, Baraldo S, et al. Increased expression of the chemokine receptor CXCR3 and its ligand CXCL10 in peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165(10):1404-9.
217. Majori M, Corradi M, Caminati A, Cacciani G, Bertacco S, Pesci A. Predominant TH1 cytokine pattern in peripheral blood from subjects with chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol* 1999;103(3 Pt 1):458-62.
218. Robbins CS, Dawe DE, Goncharova SI, Pouladi MA, Drannik AG, Swirski FK, et al. Cigarette Smoke Decreases Pulmonary Dendritic Cells and Impacts Anti-Viral Immune Responsiveness. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003.
219. Maestrelli P, Saetta M, Di Stefano A, Calcagni PG, Turato G, Ruggieri MP, et al. Comparison of leukocyte counts in sputum, bronchial biopsies, and bronchoalveolar lavage. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152(6 Pt 1):1926-31.
220. Pizzichini E, Pizzichini MM, Gibson P, Parameswaran K, Gleich GJ, Berman L, et al. Sputum eosinophilia predicts benefit from prednisone in smokers with chronic obstructive bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158(5 Pt 1):1511-7.
221. Janoff A, Sloan B, Weinbaum G, Damiano V, Sandhaus RA, Elias J, et al. Experimental emphysema induced with purified human neutrophil elastase: tissue localization of the instilled protease. *Am Rev Respir Dis* 1977;115(3):461-78.
222. Senior RM, Tegner H, Kuhn C, Ohlsson K, Starcher BC, Pierce JA. The induction of pulmonary emphysema with human leukocyte elastase. *Am Rev Respir Dis* 1977;116(3):469-75.
223. Kao RC, Wehner NG, Skubitz KM, Gray BH, Hoidal JR. Proteinase 3. A distinct human polymorphonuclear leukocyte proteinase that produces emphysema in hamsters. *J Clin Invest* 1988;82(6):1963-73.

224. Shapiro SD. Elastolytic metalloproteinases produced by human mononuclear phagocytes. Potential roles in destructive lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;150(6 Pt 2):S160-4.
225. Hautamaki RD, Kobayashi DK, Senior RM, Shapiro SD. Requirement for macrophage elastase for cigarette smoke-induced emphysema in mice. *Science* 1997;277(5334):2002-4.
226. Chapman HA, Jr., Munger JS, Shi GP. The role of thiol proteases in tissue injury and remodeling. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;150(6 Pt 2):S155-9.
227. Reilly JJ, Chapman HA, Jr. Association between alveolar macrophage plasminogen activator activity and indices of lung function in young cigarette smokers. *Am Rev Respir Dis* 1988;138(6):1422-8.
228. Smyth MJ, Trapani JA. Granzymes: exogenous proteinases that induce target cell apoptosis. *Immunol Today* 1995;16(4):202-6.
229. Trevani AS, Andonegui G, Giordano M, Nociari M, Fontan P, Dran G, et al. Neutrophil apoptosis induced by proteolytic enzymes. *Lab Invest* 1996;74(3):711-21.
230. Wright SC, Wei QS, Zhong J, Zheng H, Kinder DH, Larrick JW. Purification of a 24-kD protease from apoptotic tumor cells that activates DNA fragmentation. *J Exp Med* 1994;180(6):2113-23.
231. Nakamura H, Yoshimura K, McElvaney NG, Crystal RG. Neutrophil elastase in respiratory epithelial lining fluid of individuals with cystic fibrosis induces interleukin-8 gene expression in a human bronchial epithelial cell line. *J Clin Invest* 1992;89(5):1478-84.
232. Vallet V, Chraïbi A, Gaeggeler HP, Horisberger JD, Rossier BC. An epithelial serine protease activates the amiloride-sensitive sodium channel. *Nature* 1997;389(6651):607-10.
233. Rahman I, Morrison D, Donaldson K, MacNee W. Systemic oxidative stress in asthma, COPD, and smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154(4 Pt 1):1055-60.
234. Pryor WA. Biological effects of cigarette smoke, wood smoke, and the smoke from plastics: the use of electron spin resonance. *Free Radic Biol Med* 1992;13(6):659-76.
235. Ludwig PW, Hoidal JR. Alterations in leukocyte oxidative metabolism in cigarette smokers. *Am Rev Respir Dis* 1982;126(6):977-80.

236. Richards GA, Theron AJ, Van der Merwe CA, Anderson R. Spirometric abnormalities in young smokers correlate with increased chemiluminescence responses of activated blood phagocytes. *Am Rev Respir Dis* 1989;139(1):181-7.
237. Postma DS, Renkema TE, Noordhoek JA, Faber H, Sluiter HJ, Kauffman H. Association between nonspecific bronchial hyperreactivity and superoxide anion production by polymorphonuclear leukocytes in chronic air-flow obstruction. *Am Rev Respir Dis* 1988;137(1):57-61.
238. Petruzzelli S, Hietanen E, Bartsch H, Camus AM, Mussi A, Angeletti CA, et al. Pulmonary lipid peroxidation in cigarette smokers and lung cancer patients. *Chest* 1990;98(4):930-5.
239. Morrow JD, Frei B, Longmire AW, Gaziano JM, Lynch SM, Shyr Y, et al. Increase in circulating products of lipid peroxidation (F2-isoprostanes) in smokers. Smoking as a cause of oxidative damage. *N Engl J Med* 1995;332(18):1198-203.
240. Andreoli SP, Mallett C, McAteer JA, Williams LV. Antioxidant defense mechanisms of endothelial cells and renal tubular epithelial cells in vitro: role of the glutathione redox cycle and catalase. *Pediatr Res* 1992;32(3):360-5.
241. Lennon SV, Martin SJ, Cotter TG. Dose-dependent induction of apoptosis in human tumour cell lines by widely diverging stimuli. *Cell Prolif* 1991;24(2):203-14.
242. DeForge LE, Preston AM, Takeuchi E, Kenney J, Boxer LA, Remick DG. Regulation of interleukin 8 gene expression by oxidant stress. *J Biol Chem* 1993;268(34):25568-76.
243. Sellak H, Franzini E, Hakim J, Pasquier C. Reactive oxygen species rapidly increase endothelial ICAM-1 ability to bind neutrophils without detectable upregulation. *Blood* 1994;83(9):2669-77.
244. Marui N, Offermann MK, Swerlick R, Kunsch C, Rosen CA, Ahmad M, et al. Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) gene transcription and expression are regulated through an antioxidant-sensitive mechanism in human vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 1993;92(4):1866-74.
245. Linden M, Hakansson L, Ohlsson K, Sjodin K, Tegner H, Tunek A, et al. Glutathione in bronchoalveolar lavage fluid from smokers is related to humoral markers of inflammatory cell activity. *Inflammation* 1989;13(6):651-8.

246. Bui MH, Sauty A, Collet F, Leuenberger P. Dietary vitamin C intake and concentrations in the body fluids and cells of male smokers and nonsmokers. *J Nutr* 1992;122(2):312-6.
247. Pacht ER, Kaseki H, Mohammed JR, Cornwell DG, Davis WB. Deficiency of vitamin E in the alveolar fluid of cigarette smokers. Influence on alveolar macrophage cytotoxicity. *J Clin Invest* 1986;77(3):789-96.
248. McCusker K, Hoidal J. Selective increase of antioxidant enzyme activity in the alveolar macrophages from cigarette smokers and smoke-exposed hamsters. *Am Rev Respir Dis* 1990;141(3):678-82.
249. Kondo T, Tagami S, Yoshioka A, Nishimura M, Kawakami Y. Current smoking of elderly men reduces antioxidants in alveolar macrophages. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;149(1):178-82.
250. van Antwerpen L, Theron AJ, Myer MS, Richards GA, Wolmarans L, Booyesen U, et al. Cigarette smoke-mediated oxidant stress, phagocytes, vitamin C, vitamin E, and tissue injury. *Ann N Y Acad Sci* 1993;686:53-65.
251. Pelletier O. Vitamin C status of cigarette smokers and nonsmokers. *Am J Clin Nutr* 1970;23(5):520-4.
252. Chow CK, Thacker RR, Changchit C, Bridges RB, Rehm SR, Humble J, et al. Lower levels of vitamin C and carotenes in plasma of cigarette smokers. *J Am Coll Nutr* 1986;5(3):305-12.
253. Snider GL, Lucey EC, Stone PJ. Animal models of emphysema. *Am Rev Respir Dis* 1986;133(1):149-69.
254. Senior RM, Griffin GL, Mecham RP. Chemotactic activity of elastin-derived peptides. *J Clin Invest* 1980;66(4):859-62.
255. Stone PJ, Gottlieb DJ, O'Connor GT, Ciccolella DE, Breuer R, Bryan-Rhadfi J, et al. Elastin and collagen degradation products in urine of smokers with and without chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151(4):952-9.
256. Gottlieb DJ, Stone PJ, Sparrow D, Gale ME, Weiss ST, Snider GL, et al. Urinary desmosine excretion in smokers with and without rapid decline of lung function: the Normative Aging Study. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154(5):1290-5.
257. Lucey EC, Goldstein RH, Stone PJ, Snider GL. Remodeling of alveolar walls after elastase treatment of hamsters. Results of elastin and collagen mRNA in situ hybridization. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158(2):555-64.



258. Sahebji H, Wirman JA. Emphysema-like changes in the lungs of starved rats. *Am Rev Respir Dis* 1981;124(5):619-24.
259. Sahebji H, Domino M. Effects of starvation and refeeding on elastase-induced emphysema. *J Appl Physiol* 1989;66(6):2611-6.
260. Schols AM, Slangen J, Volovics L, Wouters EF. Weight loss is a reversible factor in the prognosis of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157(6 Pt 1):1791-7.
261. Sahebji H, Doers JT, Render ML, Bond TL. Anthropometric and pulmonary function test profiles of outpatients with stable chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Med* 1993;94(5):469-74.
262. Kuhn C, 3rd, Starcher BC. The effect of lathyrogens on the evolution of elastase-induced emphysema. *Am Rev Respir Dis* 1980;122(3):453-60.
263. Laurent P, Janoff A, Kagan HM. Cigarette smoke blocks cross-linking of elastin in vitro. *Chest* 1983;83(5 Suppl):63S-65S.
264. Nakamura Y, Romberger DJ, Tate L, Ertl RF, Kawamoto M, Adachi Y, et al. Cigarette smoke inhibits lung fibroblast proliferation and chemotaxis. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151(5):1497-503.
265. Carnevali S, Nakamura Y, Mio T, Liu X, Takigawa K, Romberger DJ, et al. Cigarette smoke extract inhibits fibroblast-mediated collagen gel contraction. *Am J Physiol* 1998;274(4 Pt 1):L591-8.
266. Cantral DE, Sisson JH, Veys T, Rennard SI, Spurzem JR. Effects of cigarette smoke extract on bovine bronchial epithelial cell attachment and migration. *Am J Physiol* 1995;268(5 Pt 1):L723-8.
267. Cosio M, Ghezzi H, Hogg JC, Corbin R, Loveland M, Dosman J, et al. The relations between structural changes in small airways and pulmonary-function tests. *N Engl J Med* 1978;298(23):1277-81.
268. Kuwano K, Bosken CH, Pare PD, Bai TR, Wiggs BR, Hogg JC. Small airways dimensions in asthma and in chronic obstructive pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis* 1993;148(5):1220-5.
269. Matsuba K, Wright JL, Wiggs BR, Pare PD, Hogg JC. The changes in airways structure associated with reduced forced expiratory volume in one second. *Eur Respir J* 1989;2(9):834-9.
270. Hogg JC, Macklem PT, Thurlbeck WM. Site and nature of airway obstruction in chronic obstructive lung disease. *N Engl J Med* 1968;278(25):1355-60.

271. Deyman H. Mechanics of airflow in health and emphysema. *J Clin Invest* 1951;30:1175-90.
272. Butler J, Caro CG, Alcala R, Dubois AB. Physiological factors affecting airway resistance in normal subjects and in patients with obstructive respiratory disease. *J Clin Invest* 1960;39:584-91.
273. Mead J, Turner JM, Macklem PT, Little JB. Significance of the relationship between lung recoil and maximum expiratory flow. *J Appl Physiol* 1967;22(1):95-108.
274. Burnett D, Stockley RA. Serum and sputum alpha 2 macroglobulin in patients with chronic obstructive airways disease. *Thorax* 1981;36(7):512-6.
275. Turato G, Di Stefano A, Maestrelli P, Mapp CE, Ruggieri MP, Roggeri A, et al. Effect of smoking cessation on airway inflammation in chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152(4 Pt 1):1262-7.
276. Reid LM. Pathology of chronic bronchitis. *Lancet* 1954;266(6806):274-8.
277. Mullen JB, Wright JL, Wiggs BR, Pare PD, Hogg JC. Reassessment of inflammation of airways in chronic bronchitis. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1985;291(6504):1235-9.
278. Saetta M, Turato G, Facchini FM, Corbino L, Lucchini RE, Casoni G, et al. Inflammatory cells in the bronchial glands of smokers with chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156(5):1633-9.
279. Nadel JA. Role of neutrophil elastase in hypersecretion during COPD exacerbations, and proposed therapies. *Chest* 2000;117(5 Suppl 2):386S-9S.
280. Barnes PJ, Baraniuk JN, Belvisi MG. Neuropeptides in the respiratory tract. Part I. *Am Rev Respir Dis* 1991;144(5):1187-98.
281. Lucchini RE, Facchini F, Turato G, Saetta M, Caramori G, Ciaccia A, et al. Increased VIP-positive nerve fibers in the mucous glands of subjects with chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156(6):1963-8.
282. Macklem PT. The physiology of small airways. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157(5 Pt 2):S181-3.
283. Niewoehner DE, Kleinerman J, Rice DB. Pathologic changes in the peripheral airways of young cigarette smokers. *N Engl J Med* 1974;291(15):755-8.
284. Hale KA, Ewing SL, Gosnell BA, Niewoehner DE. Lung disease in long-term cigarette smokers with and without chronic air-flow obstruction. *Am Rev Respir Dis* 1984;130(5):716-21.

285. Takeyama K, Jung B, Shim JJ, Burgel PR, Dao-Pick T, Ueki IF, et al. Activation of epidermal growth factor receptors is responsible for mucin synthesis induced by cigarette smoke. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001;280(1):L165-72.
286. Takeyama K, Dabbagh K, Jeong Shim J, Dao-Pick T, Ueki IF, Nadel JA. Oxidative stress causes mucin synthesis via transactivation of epidermal growth factor receptor: role of neutrophils. *J Immunol* 2000;164(3):1546-52.
287. Lane DJ, Howell JB, Giblin B. Relation between airways obstruction and CO<sub>2</sub> tension in chronic obstructive airways disease. *Br Med J* 1968;3(620):707-9.
288. McLean A, Warren PM, Gillooly M, MacNee W, Lamb D. Microscopic and macroscopic measurements of emphysema: relation to carbon monoxide gas transfer. *Thorax* 1992;47(3):144-9.
289. Barbera JA, Riverola A, Roca J, Ramirez J, Wagner PD, Ros D, et al. Pulmonary vascular abnormalities and ventilation-perfusion relationships in mild chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;149(2 Pt 1):423-9.
290. Reid L. Measurement of the bronchial mucous gland layer: a diagnostic yardstick in chronic bronchitis. *Thorax* 1960;15:132-41.
291. Nagai A, West WW, Thurlbeck WM. The National Institutes of Health Intermittent Positive-Pressure Breathing trial: pathology studies. II. Correlation between morphologic findings, clinical findings, and evidence of expiratory air-flow obstruction. *Am Rev Respir Dis* 1985;132(5):946-53.
292. Wright RR, Stuart CM. Chronic Bronchitis with Emphysema: A Pathological Study of the Bronchi. *Med Thorac* 1965;22:210-9.
293. Gonzalez S, von Bassewitz DB, Grundmann E, Nakhosteen JA, Muller KM. Atypical cilia in hyperplastic, metaplastic, and dysplastic human bronchial mucosa. *Ultrastruct Pathol* 1985;8(4):345-56.
294. Chang SC. Microscopic properties of whole mounts and sections of human bronchial epithelium of smokers and nonsmokers. *Cancer* 1957;10(6):1246-62.
295. Miskovits G, Appel J, Szule P. Ultrastructural changes of ciliated columnar epithelium and goblet cells in chronic bronchitis biopsy material. *Acta Morphol Acad Sci Hung* 1974;22(1):91-103.

296. Ollerenshaw SL, Woolcock AJ. Characteristics of the inflammation in biopsies from large airways of subjects with asthma and subjects with chronic airflow limitation. *Am Rev Respir Dis* 1992;145(4 Pt 1):922-7.
297. Vignola AM, Campbell AM, Chanez P, Bousquet J, Paul-Lacoste P, Michel FB, et al. HLA-DR and ICAM-1 expression on bronchial epithelial cells in asthma and chronic bronchitis. *Am Rev Respir Dis* 1993;148(3):689-94.
298. Saetta M, Di Stefano A, Maestrelli P, Turato G, Ruggieri MP, Roggeri A, et al. Airway eosinophilia in chronic bronchitis during exacerbations. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;150(6 Pt 1):1646-52.
299. Saetta M, Di Stefano A, Maestrelli P, Turato G, Mapp CE, Pieno M, et al. Airway eosinophilia and expression of interleukin-5 protein in asthma and in exacerbations of chronic bronchitis. *Clin Exp Allergy* 1996;26(7):766-74.
300. Di Stefano A, Turato G, Maestrelli P, Mapp CE, Ruggieri MP, Roggeri A, et al. Airflow limitation in chronic bronchitis is associated with T-lymphocyte and macrophage infiltration of the bronchial mucosa. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153(2):629-32.
301. O'Shaughnessy TC, Ansari TW, Barnes NC, Jeffery PK. Inflammation in bronchial biopsies of subjects with chronic bronchitis: inverse relationship of CD8+ T lymphocytes with FEV1. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155(3):852-7.
302. Fournier M, Lebagry F, Le Roy Ladurie F, Lenormand E, Pariente R. Intraepithelial T-lymphocyte subsets in the airways of normal subjects and of patients with chronic bronchitis. *Am Rev Respir Dis* 1989;140(3):737-42.
303. Thompson AB, Daughton D, Robbins RA, Ghafouri MA, Oehlerking M, Rennard SI. Intraluminal airway inflammation in chronic bronchitis. Characterization and correlation with clinical parameters. *Am Rev Respir Dis* 1989;140(6):1527-37.
304. Cosio MG, Hale KA, Niewoehner DE. Morphologic and morphometric effects of prolonged cigarette smoking on the small airways. *Am Rev Respir Dis* 1980;122(2):265-21.
305. Mitchell RS, Stanford RE, Johnson JM, Silvers GW, Dart G, George MS. The morphologic features of the bronchi, bronchioles, and alveoli in chronic airway obstruction: a clinicopathologic study. *Am Rev Respir Dis* 1976;114(1):137-45.

306. Bignon J, Khoury F, Even P, Andre J, Brouet G. Morphometric study in chronic obstructive bronchopulmonary disease. Pathologic, clinical, and physiologic correlations. *Am Rev Respir Dis* 1969;99(5):669-95.
307. Gil J, Weibel ER. Extracellular lining of bronchioles after perfusion-fixation of rat lungs for electron microscopy. *Anat Rec* 1971;169(2):185-99.
308. Macklem PT, Proctor DF, Hogg JC. The stability of peripheral airways. *Respir Physiol* 1970;8(2):191-203.
309. Saetta M, Ghezzi H, Kim WD, King M, Angus GE, Wang NS, et al. Loss of alveolar attachments in smokers. A morphometric correlate of lung function impairment. *Am Rev Respir Dis* 1985;132(4):894-900.
310. Saetta M, Finkelstein R, Cosio MG. Morphological and cellular basis for airflow limitation in smokers. *Eur Respir J* 1994;7(8):1505-15.
311. The definition of emphysema. Report of a National Heart, Lung, and Blood Institute, Division of Lung Diseases workshop. *Am Rev Respir Dis* 1985;132(1):182-5.
312. Lang MR, Fiaux GW, Gillyooly M, Stewart JA, Hulmes DJ, Lamb D. Collagen content of alveolar wall tissue in emphysematous and non-emphysematous lungs. *Thorax* 1994;49(4):319-26.
313. Saetta M, Shiner RJ, Angus GE, Kim WD, Wang NS, King M, et al. Destructive index: a measurement of lung parenchymal destruction in smokers. *Am Rev Respir Dis* 1985;131(5):764-9.
314. Eidelman D, Saetta MP, Ghezzi H, Wang NS, Hoidal JR, King M, et al. Cellularity of the alveolar walls in smokers and its relation to alveolar destruction. Functional implications. *Am Rev Respir Dis* 1990;141(6):1547-52.
315. Hoidal JR, Niewoehner DE. The role of tissue repair and leukocytes in the pathogenesis of emphysema. *Chest* 1983;83(5 Suppl):58S-59S.
316. Gould GA, MacNee W, McLean A, Warren PM, Redpath A, Best JJ, et al. CT measurements of lung density in life can quantitate distal airspace enlargement--an essential defining feature of human emphysema. *Am Rev Respir Dis* 1988;137(2):380-92.
317. Saetta M, Kim WD, Izquierdo JL, Ghezzi H, Cosio MG. Extent of centrilobular and panacinar emphysema in smokers' lungs: pathological and mechanical implications. *Eur Respir J* 1994;7(4):664-71.
318. Viegi G, Pedreschi M, Pistelli F. Prevalence of airways obstruction in a general population: European Respiratory Society vs American Thoracic Society definition. *Chest* 2000;117(Suppl. 2):339s-345s.

319. Georgopoulos D, Antonishen N. Symptoms and signs of COPD. In: Cherniack NS, ed. Toronto: WB Saunders 1991:p.357-63.
320. Definition and classification of chronic bronchitis for clinical and epidemiological purposes. A report to the Medical Research Council by their Committee on the Aetiology of Chronic Bronchitis. *Lancet* 1965;1(7389):775-9.
321. Simon PM, Schwartzstein RM, Weiss JW, Fencel V, Teghtsoonian M, Weinberger SE. Distinguishable types of dyspnea in patients with shortness of breath. *Am Rev Respir Dis* 1990;142(5):1009-14.
322. Weiss ST, DeMeo DL, Postma DS. COPD: problems in diagnosis and measurement. *Eur Respir J Suppl* 2003;41:4s-12s.
323. Badgett RG, Tanaka DJ, Hunt DK, Jelley MJ, Feinberg LE, Steiner JF, et al. Can moderate chronic obstructive pulmonary disease be diagnosed by historical and physical findings alone? *Am J Med* 1993;94(2):188-96.
324. Kesten S, Chapman KR. Physician perceptions and management of COPD. *Chest* 1993;104(1):254-8.
325. Hardie J, Buist A, Vollmer W, Ellingsen I, Bakke P, Murkve O. Risk of overdiagnosis of COPD in asymptomatic elderly never-smokers. *Eur Respir J* 2002;20:1117-1122.
326. Pauwels RA, Lofdahl CG, Laitinen LA, Schouten JP, Postma DS, Pride NB, et al. Long-term treatment with inhaled budesonide in persons with mild chronic obstructive pulmonary disease who continue smoking. European Respiratory Society Study on Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *N Engl J Med* 1999;340(25):1948-53.
327. Vestbo J, Sorensen T, Lange P, Brix A, Torre P, Viskum K. Long-term effect of inhaled budesonide in mild and moderate chronic obstructive pulmonary disease: a randomised controlled trial. *Lancet* 1999;353(9167):1819-23.
328. Burge PS, Calverley PM, Jones PW, Spencer S, Anderson JA, Maslen TK. Randomised, double blind, placebo controlled study of fluticasone propionate in patients with moderate to severe chronic obstructive pulmonary disease: the ISOLDE trial. *Bmj* 2000;320(7245):1297-303.
329. Effect of inhaled triamcinolone on the decline in pulmonary function in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2000;343(26):1902-9.
330. Seemungal TA, Donaldson GC, Paul EA, Bestall JC, Jeffries DJ, Wedzicha JA. Effect of exacerbation on quality of life in patients with chronic

- obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157(5 Pt 1):1418-22.
331. Seemungal TA, Donaldson GC, Bhowmik A, Jeffries DJ, Wedzicha JA. Time course and recovery of exacerbations in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161(5):1608-13.
332. Bhowmik A, Seemungal TA, Sapsford RJ, Wedzicha JA. Relation of sputum inflammatory markers to symptoms and lung function changes in COPD exacerbations. *Thorax* 2000;55(2):114-20.
333. Wedzicha JA. Exacerbations: etiology and pathophysiologic mechanisms. *Chest* 2002;121(5 Suppl):136S-141S.
334. Barnes PJ. Mechanisms in COPD: differences from asthma. *Chest* 2000;117(2 Suppl):10S-4S.
335. Jeffery PK. Differences and similarities between chronic obstructive pulmonary disease and asthma. *Clin Exp Allergy* 1999;29 Suppl 2:14-26.
336. Kraft M, Djukanovic R, Wilson S, Holgate ST, Martin RJ. Alveolar tissue inflammation in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154(5):1505-10.
337. Magnussen H, Richter K, Taube C. Are chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and asthma different diseases? *Clin Exp Allergy* 1998;28 Suppl 5:187-94; discussion 203-5.
338. Ulrik CS, Backer V. Nonreversible airflow obstruction in life-long nonsmokers with moderate to severe asthma. *Eur Respir J* 1999;14(4):892-6.
339. Fahy JV, Liu J, Wong H, Boushey HA. Cellular and biochemical analysis of induced sputum from asthmatic and from healthy subjects. *Am Rev Respir Dis* 1993;147(5):1126-31.
340. Richter K, Holz O, Jorres RA, Mucke M, Magnussen H. Sequentially induced sputum in patients with asthma or chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 1999;14(3):697-701.
341. Tsoumakidou M, Tzanakis N, Kyriakou D, Chrysofakis G, Siafakas N. Inflammatory cell profiles and T lymphocyte subsets in chronic obstructive pulmonary disease and severe persistent asthma. *Clin Exp Allergy* 2004;34(2):234-240.
342. Fahy JV, Kim KW, Liu J, Boushey HA. Prominent neutrophilic inflammation in sputum from subjects with asthma exacerbation. *J Allergy Clin Immunol* 1995;95(4):843-52.

343. Montuschi P, Kharitonov SA, Barnes PJ. Exhaled carbon monoxide and nitric oxide in COPD. *Chest* 2001;120(2):496-501.
344. Barnes PJ. Mechanisms of action of glucocorticoids in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154(2 Pt 2):S21-6; discussion S26-7.
345. Keatings VM, Jatakanon A, Worsdell YM, Barnes PJ. Effects of inhaled and oral glucocorticoids on inflammatory indices in asthma and COPD. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155(2):542-8.
346. Bickerman HA, Sproul, E.E., Barach, A.L. An aerosol method of producing bronchial secretions in human subjects: a clinical technique for the detection of lung cancer. *Dis. Chest* 1958;33:347-362.
347. Larson JL, Ridzon R, Hannan MM. Sputum induction versus fiberoptic bronchoscopy in the diagnosis of tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163(5):1279-80.
348. Leigh TR, Parsons P, Hume C, Husain OA, Gazzard B, Collins JV. Sputum induction for diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Lancet* 1989;2(8656):205-6.
349. Bandyopadhyay T, Gerardi DA, Metersky ML. A comparison of induced and expectorated sputum for the microbiological diagnosis of community acquired pneumonia. *Respiration* 2000;67(2):173-6.
350. Pin I, Gibson PG, Kolendowicz R, Girgis-Gabardo A, Denburg JA, Hargreave FE, et al. Use of induced sputum cell counts to investigate airway inflammation in asthma. *Thorax* 1992;47(1):25-9.
351. Djukanovic R, Sterk PJ, Fahy JV, Hargreave FE. Standardised methodology of sputum induction and processing. *Eur Respir J Suppl* 2002;37:1s-2s.
352. Vignola AM, Rennar SI, Hargreave FE, Fah JV, Bonsignore MR, Djukanovic R, et al. Standardised methodology of sputum induction and processing. Future directions. *Eur Respir J Suppl* 2002;37:51s-55s.
353. Iredale MJ, Wanklyn SA, Phillips IP, Krausz T, Ind PW. Non-invasive assessment of bronchial inflammation in asthma: no correlation between eosinophilia of induced sputum and bronchial responsiveness to inhaled hypertonic saline. *Clin Exp Allergy* 1994;24(10):940-5.
354. Popov TA, Pizzichini MM, Pizzichini E, Kolendowicz R, Punthakee Z, Dolovich J, et al. Some technical factors influencing the induction of sputum for cell analysis. *Eur Respir J* 1995;8(4):559-65.



355. Tsoumakidou M, Tzanakis N, Siafakas NM. Induced sputum in the investigation of airway inflammation of COPD. *Respiratory Journal* 2003;97:863-71.
356. Cianchetti S, Bacci E, Ruocco L, Bartoli ML, Carnevali S, Dente FL, et al. Salbutamol pretreatment does not change eosinophil percentage and eosinophilic cationic protein concentration in hypertonic saline- induced sputum in asthmatic subjects. *Clin Exp Allergy* 1999;29(5):712-8.
357. Gershman NH, Wong HH, Liu JT, Mahlmeister MJ, Fahy JV. Comparison of two methods of collecting induced sputum in asthmatic subjects. *Eur Respir J* 1996;9(12):2448-53.
358. Eggleston PA, Kagey-Sobotka A, Lichtenstein LM. A comparison of the osmotic activation of basophils and human lung mast cells. *Am Rev Respir Dis* 1987;135(5):1043-8.
359. Jongejan RC, De Jongste JC, Raatgeep RC, Bonta IL, Kerrebijn KF. Effects of changes in osmolarity on isolated human airways. *J Appl Physiol* 1990;68(4):1568-75.
360. Pavia D, Thomson ML, Clarke SW. Enhanced clearance of secretions from the human lung after the administration of hypertonic saline aerosol. *Am Rev Respir Dis* 1978;117(2):199-203.
361. Robinson M, Regnis JA, Bailey DL, King M, Bautovich GJ, Bye PT. Effect of hypertonic saline, amiloride, and cough on mucociliary clearance in patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153(5):1503-9.
362. Pizzichini E, Pizzichini MM, Efthimiadis A, Hargreave FE, Dolovich J. Measurement of inflammatory indices in induced sputum: effects of selection of sputum to minimize salivary contamination. *Eur Respir J* 1996;9(6):1174-80.
363. Spanevello A, Beghe B, Bianchi A, Migliori GB, Ambrosetti M, Neri M, et al. Comparison of two methods of processing induced sputum: selected versus entire sputum. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157(2):665-8.
364. Efthimiadis A, Hussack, P., Weston, S., et al. Induced sputum:effect of centrifugation on the total and differential cell counts. *Eur Respir J* 2000;Abstract.
365. Efthimiadis A, Pizzichini, M.M.M., Pizzichini, E., Kolendowicz, R., Weston, S., Dolovich, J, Hargreave, F.E. The influence of cell viability and squamous cell contamination on the reliability of sputum differential counts (abstract). *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151:A384.

366. Efthimiadis A, Pizzichini MM, Pizzichini E, Dolovich J, Hargreave FE. Induced sputum cell and fluid-phase indices of inflammation: comparison of treatment with dithiothreitol vs phosphate-buffered saline. *Eur Respir J* 1997;10(6):1336-40.
367. Hansel TT, Braunstein JB, Walker C, Blaser K, Bruijnzeel PL, Virchow JC, Jr., et al. Sputum eosinophils from asthmatics express ICAM-1 and HLA-DR. *Clin Exp Immunol* 1991;86(2):271-7.
368. Wu MS, Hwang, K.H., Lin, H.C., Kuo, H.P. The preservation of neutrophil activity in induced sputum by repeated washing and dithiothreitol method (abstract). *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155:A622.
369. Loppow D, Bottcher M, Gercken G, Magnussen H, Jorres RA. Flow cytometric analysis of the effect of dithiothreitol on leukocyte surface markers. *Eur Respir J* 2000;16(2):324-9.
370. Cai Y, Carty K, Gibson P, Henry R. Comparison of sputum processing techniques in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 1996;22(6):402-7.
371. Grebski E, Peterson C, Medici TC. Effect of physical and chemical methods of homogenization on inflammatory mediators in sputum of asthma patients. *Chest* 2001;119(5):1521-5.
372. Woolhouse IS, Bayley DL, Stockley RA. Effect of sputum processing with dithiothreitol on the detection of inflammatory mediators in chronic bronchitis and bronchiectasis. *Thorax* 2002;57(8):667-71.
373. Peleman RA, Ryttila PH, Kips JC, Joos GF, Pauwels RA. The cellular composition of induced sputum in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 1999;13(4):839-43.
374. Spanevello A, Migliori GB, Sharara A, Ballardini L, Bridge P, Pisati P, et al. Induced sputum to assess airway inflammation: a study of reproducibility. *Clin Exp Allergy* 1997;27(10):1138-44.
375. Brightling CE, Monterio W, Green RH, Parker D, Morgan MD, Wardlaw AJ, et al. Induced sputum and other outcome measures in chronic obstructive pulmonary disease: safety and repeatability. *Respir Med* 2001;95(12):999-1002.
376. in 't Veen JC, de Gouw HW, Smits HH, Sont JK, Hiemstra PS, Sterk PJ, et al. Repeatability of cellular and soluble markers of inflammation in induced sputum from patients with asthma. *Eur Respir J* 1996;9(12):2441-7.
377. Nightingale JA, Rogers DF, Barnes PJ. Effect of repeated sputum induction on cell counts in normal volunteers. *Thorax* 1998;53(2):87-90.

378. Pavord ID. Sputum induction to assess airway inflammation: is it an inflammatory stimulus? *Thorax* 1998;53(2):79-80.
379. Gershman NH, Liu H, Wong HH, Liu JT, Fahy JV. Fractional analysis of sequential induced sputum samples during sputum induction: evidence that different lung compartments are sampled at different time points. *J Allergy Clin Immunol* 1999;104(2 Pt 1):322-8.
380. Bacci E, Cianchetti S, Paggiaro PL, Carnevali S, Bancalari L, Dente FL, et al. Comparison between hypertonic and isotonic saline-induced sputum in the evaluation of airway inflammation in subjects with moderate asthma. *Clin Exp Allergy* 1996;26(12):1395-400.
381. de la Fuente PT, Romagnoli M, Godard P, Bousquet J, Chanez P. Safety of inducing sputum in patients with asthma of varying severity. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157(4 Pt 1):1127-30.
382. Grootendorst DC, van den Bos JW, Romeijn JJ, Veselic-Charvat M, Duiverman EJ, Vrijlandt EJ, et al. Induced sputum in adolescents with severe stable asthma. Safety and the relationship of cell counts and eosinophil cationic protein to clinical severity. *Eur Respir J* 1999;13(3):647-53.
383. Tsoumakidou M, Tzanakis N, Kyriakou D, Chrysofakis G, Siafakas N. Inflammatory cell profiles and T lymphocyte subsets in chronic obstructive pulmonary disease and severe persistent asthma. *Clin Exp Allergy* 2004;34(2):234-240.
384. Ryttila PH, Lindqvist AE, Laitinen LA. Safety of sputum induction in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2000;15(6):1116-9.
385. Bhowmik A, Seemungal TA, Sapsford RJ, Devalia JL, Wedzicha JA. Comparison of spontaneous and induced sputum for investigation of airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 1998;53(11):953-6.
386. Fahy JV, Wong H, Liu J, Boushey HA. Comparison of samples collected by sputum induction and bronchoscopy from asthmatic and healthy subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152(1):53-8.
387. Keatings VM, Evans DJ, O'Connor BJ, Barnes PJ. Cellular profiles in asthmatic airways: a comparison of induced sputum, bronchial washings, and bronchoalveolar lavage fluid. *Thorax* 1997;52(4):372-4.
388. Pizzichini E, Pizzichini MM, Kidney JC, Efthimiadis A, Hussack P, Popov T, et al. Induced sputum, bronchoalveolar lavage and blood from mild

asthmatics: inflammatory cells, lymphocyte subsets and soluble markers compared. *Eur Respir J* 1998;11(4):828-34.

# **ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**



# **ΕΝΟΤΗΤΑ Ι**

**Σύγκριση Φλεγμονωδών  
Κυττάρων και Υποπληθυσμών  
Τ-Λεμφοκυττάρων μεταξύ  
Ασθενών με Χρόνια  
Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια  
και Βαρύ Επίμονο Άσθμα**





## Περίληψη

Είναι συχνό το διαφοροδιαγνωστικό πρόβλημα μεταξύ της Χρόνιας Αποφρακτικής Πνευμονοπάθειας (Χ.Α.Π.) και του άσθματος, ειδικά στην περίπτωση του Βαρύς Επίμονου Άσθματος (Β.Ε.Α.), που χαρακτηρίζεται από ουδετεροφιλική φλεγμονή και μη αναστρέψιμη απόφραξη των αεραγωγών. Ο στόχος της μελέτης μας ήταν να συγκρίνουμε τους πληθυσμούς φλεγμονωδών κυττάρων και τους υποπληθυσμούς Τ-λεμφοκυττάρων στα πτύελα ασθενών με Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια και Βαρύ Επίμονο Άσθμα με την ίδια βαρύτητα απόφραξης των αεραγωγών. Λειτουργικός έλεγχος και τεχνητή πρόκληση παραγωγής πτυέλου πραγματοποιήθηκαν σε 15 ασθενείς με Χ.Α.Π. ηλικίας (μ.ο.±απόκλιση) 68±8 έτη, πρώην καπνιστές, μέση FEV<sub>1</sub> 45%προβλ. και 13 ασθενείς με Β.Ε.Α. ηλικίας 55±10 έτη, μη καπνιστές, μέση FEV<sub>1</sub> 49%προβλ. Όλοι οι ασθενείς ελάμβαναν εισπνεόμενα κορτικοειδή. 8 ασθενείς με Β.Ε.Α. παρουσίαζαν μη αναστρέψιμη απόφραξη των αεραγωγών. Οι πληθυσμοί των φλεγμονωδών κυττάρων (συμπεριλαμβανομένων και των μεταχρωματικών κυττάρων) και οι υποπληθυσμοί των Τ-λεμφοκυττάρων μετρήθηκαν στο πτύελο χρησιμοποιώντας τεχνικές κυτταροχημείας και ανοσοκυτταροχημείας. Αυξημένο ποσοστό ουδετεροφίλων βρέθηκε στους ασθενείς με ΧΑΠ σε σύγκριση με τους ασθενείς με Β.Ε.Α. ( $p < 0.03$ ), ενώ ίδιο ποσοστό ουδετεροφίλων σε σύγκριση με τους ασθενείς με Β.Ε.Α. και μη αναστρέψιμη απόφραξη των αεραγωγών. Στην Χ.Α.Π. βρέθηκε αρνητική συσχέτιση μεταξύ των ουδετεροφίλων και του δείκτη διάχυσης CO ( $r = -0.462$ ,  $p < 0.04$ ). Οι ασθενείς με Β.Ε.Α. παρουσίασαν αυξημένα ηωσινόφιλα και μεταχρωματικά κύτταρα σε σχέση με την Χ.Α.Π. ( $p < 0.04$ ,  $p < 0.007$  αντιστοίχως). Αυξημένος λόγος CD4/CD8 και μειωμένος λόγος CD4-INF $\gamma$ /CD4-IL4+ κυττάρων ( $p < 0.001$ ) βρέθηκε στο Β.Ε.Α. σε σχέση με τη Χ.Α.Π. Στο Β.Ε.Α. ο λόγος CD4/CD8 συσχετιζονταν θετικά με τα ηωσινόφιλα στα πτύελα ( $r = 0.567$ ,  $p < 0.04$ ). Συμπεραίνουμε ότι παρά τη θεραπεία με εισπνεόμενα κορτικοειδή, οι ασθενείς με Β.Ε.Α. και Χ.Α.Π. παρουσιάζουν διαφορετικό τύπο φλεγμονής στα πτύελα, ο οποίος θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί στην διαφορική διάγνωση μεταξύ των δύο παθήσεων.

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το άσθμα και η Χ.Α.Π. είναι οι δύο συχνότερες παθήσεις του πνεύμονα, με συνεχώς αυξανόμενα ποσοστά επιπολασμού, θνητότητας και θνησιμότητας (1, 2). Αν και σημαντική πρόοδος έχει επιτελεστεί στην κατανόηση της

παθογένειας των δύο αυτών νόσων, ο ακριβής ρόλος των φλεγμονωδών κυττάρων και των μεσολαβητών που ενέχονται στην κάθε πάθηση δεν έχει γίνει πλήρως κατανοητός.

Η Χ.Α.Π. χαρακτηρίζεται από απόφραξη των αεραγωγών η οποία δεν είναι πλήρως αναστρέψιμη και οφείλεται στη φλεγμονώδη απάντηση των αεραγωγών σε τοξικά σωματίδια ή αέρια (1). Κυρίως προσβάλλονται τα βρογχιόλια και το παρέγχυμα (3, 4). Στον αυλό των αεραγωγών των ασθενών με Χ.Α.Π. έχουν βρεθεί αυξημένα ουδετερόφιλα, ενώ στον βλεννογόνο αυξημένα μακροφάγα και CD8+ λεμφοκύτταρα (5-7). Τα CD8+ λεμφοκύτταρα μπορεί να παράγουν ιντερφερόνη γάμα-INF $\gamma$  (Tc1), ιντερλευκίνη 4-IL4(Tc2), ή και τα δύο Tc0 (8). Υπάρχουν ενδείξεις ότι τα Tc1 κύτταρα εμπλέκονται στην παθογένεια της ΧΑΠ (9).

Τα άσθμα είναι επίσης μία φλεγμονώδης διαταραχή των αεραγωγών που χαρακτηρίζεται από αυξημένη βρογχική υπεραντιδραστικότητα και συχνά επεισόδια συριγμού, δύσπνοιας και βήχα (2). Λειτουργικά, παρατηρείται απόφραξη των αεραγωγών, η οποία είναι συνήθως αναστρέψιμη. Ωστόσο, ασθενείς με Βαρύ Επίμονο Άσθμα, συχνά παρουσιάζουν μη αναστρέψιμη απόφραξη και σταδιακή μείωση της τιμής της FEV<sub>1</sub> (10). Σε αντίθεση με την ΧΑΠ, στο άσθμα η φλεγμονή παρατηρείται κυρίως στους μεγάλους αεραγωγούς (4). Τα ηωσινόφιλα και τα μαστοκύτταρα αυξάνονται, ενώ τα CD4+ λεμφοκύτταρα ορχηστρώνουν την φλεγμονώδη διεργασία με την τοπική απελευθέρωση κυτταροκινών (11). Τα CD4+ λεμφοκύτταρα κατατάσσονται ανάλογα με την παραγωγή INF $\gamma$ , IL4, ή και των δύο, σε Th1, Th2 και Th0 αντιστοίχως (8). Τα Th2 κύτταρα εμπλέκονται στην ασθματική αντίδραση (12).

Αν και διαφορετικοί φλεγμονώδεις μηχανισμοί ενέχονται στην Χ.Α.Π. και στο άσθμα, μερικοί ασθενείς έχουν χαρακτηριστικά και από τις δύο παθήσεις (13). Αυξημένα ηωσινόφιλα έχουν βρεθεί στα πτύελα ασθενών με Χ.Α.Π. και αναστρέψιμη απόφραξη των αεραγωγών ή ανταπόκριση στα στεροειδή (14, 15) και αυξημένα μαστοκύτταρα σε βρογχικές βιοψίες ασθενών με Χ.Α.Π. (16). Επίσης, οι ασθενείς με Β.Ε.Α. έχουν αυξημένα ουδετερόφιλα στα πτύελα και στο βρογχιολοκυψελιδικό έκπλυμα (17, 18) και ασθενείς σε <<status asthmaticus>> παρουσιάζουν έντονη ουδετεροφιλία (19).

Αυτά τα ευρήματα δείχνουν ότι οι ασθενείς με Β.Ε.Α. αποτελούν μια ξεχωριστή νοσολογική οντότητα που μοιάζει με τη Χ.Α.Π. λειτουργικά (αυξημένη συχνότητα μη αναστρέψιμης απόφραξης των αεραγωγών) και παθολογικά (αυξημένος αριθμός ουδετεροφίλων). Ο σκοπός αυτής της

μελέτης ήταν να συγκρίνουμε την φλεγμονή στους αεραγωγούς μεταξύ Β.Ε.Α. και Χ.Α.Π. σε ασθενείς με την ίδια βαρύτητα απόφραξης των αεραγωγών. Εστίασαμε ιδιαίτερα στα Τ-λεμφοκύτταρα και στους υποπληθυσμούς τους γιατί η ασθματική φλεγμονή ελέγχεται από τα Th2 (CD4+) κύτταρα, ενώ τα Tc1 (CD8+) κύτταρα ενοχοποιούνται για την παθογένεση της Χ.Α.Π. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν σημαντικές διαφορές στους υποπληθυσμούς των Τ-λεμφοκυττάρων στα πτύελα ασθενών με Χ.Α.Π. και Β.Ε.Α.

## **ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ**

### **ΑΣΘΕΝΕΙΣ**

13 ασθενείς με Β.Ε.Α., μη καπνιστές και 15 με ασθενείς Χ.Α.Π., πρώην καπνιστές, επιστρατεύθηκαν από το Εξωτερικό Πνευμονολογικό Ιατρείο του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου.

Η διάγνωση της Χ.Α.Π. έγινε ακολουθώντας τα κριτήρια της ERS (Ευρωπαϊκή Πνευμονολογική Κοινότητα) (20). Όλοι οι ασθενείς παρουσίαζαν μη αναστρέψιμη απόφραξη των αεραγωγών, οριζόμενη ως  $\Delta FEV_1 < 15\%$  της  $FEV_1$  προ βρογχοδιαστολής μετά από εισπνοή 400mcgr σαλβουταμόλης. Όλοι οι ασθενείς είχαν αρνητικές αλλεργικές δερματικές δοκιμασίες και αρνητικά RAST στον ορό, όπως και φυσιολογικές τιμές IgE ορού.

Η διάγνωση του Β.Ε.Α. έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες GINA (2). Όλοι οι ασθματικοί ήταν ατοπικοί. 8 παρουσίαζαν μη αναστρέψιμη απόφραξη των αεραγωγών.

Όλοι οι ασθενείς και από τις δύο ομάδες ελάμβαναν εισπνεόμενα κορτικοειδή (>800mg/ημ φλουτικαζόνης ή >1200mg/ημ βουδεσονίδης) και εισπνεόμενους μακράς δράσης β2 αγωνιστές. Κανένα άτομο δεν ελάμβανε κάποιο άλλο φαρμακευτικό σκεύασμα ή υπέφερε από κάποιο άλλο πνευμονολογικό ή συστηματικό νόσημα. Κανένα άτομο δεν παρουσίασε λοίμωξη του αναπνευστικού τουλάχιστον 6 εβδομάδες πριν την μελέτη.

Η Επιστημονική Επιτροπή του Νοσοκομείου ενέκρινε το πρωτόκολλο και όλοι οι ασθενείς έδωσαν την γραπτή τους συγκατάθεση.

### **ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ**

1<sup>η</sup> μέρα : Ελήφθη ιατρικό ιστορικό, έγιναν δερματικές αλλεργικές δοκιμασίες, σπιρομέτρηση προ και μετά βρογχοδιαστολής και η μέθοδος της μίας εισπνοής για την μέτρηση του δείκτη διάχυσης CO (Kco) (MasterLab, Jaeger 2.12· Wuerzburg, Germany) (21).

2<sup>η</sup> μέρα : Αιμοληψία για μέτρηση IgE ορού, RAST στον ορό και πρόκληση πτυέλου.

## ΠΡΟΚΛΗΣΗ ΠΤΥΕΛΟΥ ΚΑΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΥΤΟΥ

Τα πτύελα προκλήθηκαν και επεξεργάστηκαν βασιζόμενοι στην μέθοδο του Pin, όπως έχουμε ήδη περιγράψει (22, 23). Τα λεμφοκύτταρα διεγέρθηκαν μετά από επώαση κυτταρικού διαλύματος συγκέντρωσης  $2 \times 10^6$  κυτ/μl για 5 ώρες, υπό 5% CO<sub>2</sub> στους 37°C, σε RPMI 1640 με 10% FCS παρουσία phorbol 12-myristate 13-acetate 25ng/ml (PMA), ionomycin 1μmol/L και brebeldin A 10μg/ml (Sigma). Τα πλακάκια στρώθηκαν μετά από φυγοκέντρηση 50μl ενός 3500 κυτ/μl κυτταρικού διαλύματος και φυλάχθηκαν στους -80°C για ανάλυση αργότερα. Περίπου 175000 κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν στο κάθε πλακάκι, μεταξύ των οποίων υπήρχαν κατά μέσο όρο 1500 T-λεμφοκύτταρα.

Δύο πλακάκια βάφτηκαν με May-Grunwald-Giemsa για να υπολογιστεί ο τύπος των φλεγμονωδών κυττάρων στο πτύελο και δύο άλλα με μπλε της τολουιδίνης για να μετρηθούν τα μεταχρωματικά κύτταρα.

## ΑΝΟΣΟΚΥΤΤΑΡΟΧΗΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Αφού αποψύχθηκαν, τα πλακάκια μονιμοποιήθηκαν με ακετόνη και επανενυδατώθηκαν σε TBS. Η μέθοδος της διπλής ανοσοκυτταροχημείας εφαρμόστηκε, όπως έχει ήδη περιγραφεί (24). Δύο ερευνητές διάβασαν τα πλακάκια κάτω από διπλό οπτικό και υπεριώδες μικροσκόπιο και από τα αποτελέσματά τους υπολογίστηκε ο μέσος όρος. Το οπτικό φίλτρο χρησιμοποιήθηκε για να διαχωριστούν τα κύτταρα με βάση την μορφολογία τους, ενώ το υπεριώδες φίλτρο για να μετρηθούν τα φθορίζοντα λεμφοκύτταρα στο ίδιο οπτικό πεδίο. Τρεις μετρήσεις έγιναν από κάθε ερευνητή σε 10 πλακάκια. Η intra- και inter-observer CV (coefficient of variation) ήταν <15%. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως λόγος CD4/CD8 και λόγος CD4-INFγ/CD4-IL4 + κυττάρων. Για τον υπολογισμό του κάθε λόγου μετρήθηκαν 500 λεμφοκύτταρα, γιατί ο αριθμός αυτός ήταν αρκετός για να μας δώσει μία μέση τιμή που παρέμενε σταθερή με παραπάνω αύξηση του μετρούμενου αριθμού κυττάρων.

### *Μέτρηση CD4+ και CD8+ T-λεμφοκυττάρων*

Το πρωτογενές anti-CD4 mouse anti-human monoclonal αντίσωμα (Caltag· Burlingame, CA, USA) με το δευτερογενές rabbit anti-mouse IgG-FITC αντίσωμα (Immunotech· Marseille, France) και το πρωτογενές anti-CD8 mouse anti-human monoclonal αντίσωμα (Caltag) με το δευτερογενές rabbit anti-mouse IgG- phycoerythrin-conjugated (IgG-PE) αντίσωμα (Marseille)

χρησιμοποιήθηκαν. 500 CD4+ και CD8+ κύτταρα μετρήθηκαν για τον υπολογισμό του λόγου CD4/CD8.

*Μέτρηση των CD8-IFN $\gamma$ +, των CD8-IL4+ κυττάρων, των CD4- IFN $\gamma$  + κυττάρων και των CD4- IL4+ λεμφοκυττάρων*

Το πρωτογενές anti-CD8 mouse anti-human monoclonal αντίσωμα με το δευτερογενές rabbit anti-mouse IgG-FITC αντίσωμα και το πρωτογενές anti-IFN $\gamma$  mouse anti-human monoclonal αντίσωμα (Caltag) με το δευτερογενές rabbit anti-mouse IgG- phycoerythrin-conjugated (IgG-PE) αντίσωμα χρησιμοποιήθηκαν για να μετρηθούν τα CD8+ κύτταρα που παράγουν IFN $\gamma$ . 500 CD8+ κύτταρα μετρήθηκαν για τον υπολογισμό των CD8-IFN $\gamma$ + κυττάρων. Η αντίστοιχη μέθοδος εφαρμόστηκε για την σήμανση των CD8+ κυττάρων με το anti-IL4 αντίσωμα (Immunotech) και των CD4+ κυττάρων με το anti-IFN $\gamma$  ή anti-IL4 αντίσωμα.

Αρνητικά control πλακάκια λήφθηκαν με την χρήση mouse-anti-mouse ανοσοσφαιρίνης, ώστε να υπολογιστεί η μη ειδική σύνδεση. Θετικά control πλακάκια λήφθηκαν με τη φυγοκέντρηση κυττάρων από T-λέμφωμα.

## **ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ**

Διαφορές μεταξύ δύο ομάδων ελέχθησαν χρησιμοποιώντας το Mann-Witney test για μη κανονικές και το t-test για κανονικές κατανομές. Οι συσχετίσεις έγιναν με Spearman's-Rho correlation coefficient. Το software StatsDirect (Camcode: Cambridge, UK) χρησιμοποιήθηκε. Το  $p < 0.05$  θεωρήθηκε στατιστικά σημαντικό.

## **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

### **ΑΣΘΕΝΕΙΣ**

Τα χαρακτηριστικά των ασθενών και ο λειτουργικός τους έλεγχος φαίνονται στον πίνακα I. Οι ασθενείς ήταν όμοιοι σε ηλικία και θεραπευτική αγωγή. Όλοι παρουσίαζαν απόφραξη των αεραγωγών, όπως φαίνεται από τις χαμηλές τιμές FEV<sub>1</sub> και FEV<sub>1</sub>/FVC. Οι FEV<sub>1</sub> προ βρογχοδιαστολής (%προβλ) ήταν παρόμοιες μεταξύ των δύο ομάδων ( $p=0.2$ ). Οι ασθματικοί χωρίζονταν περαιτέρω σε δύο υποομάδες ανάλογα με την αναστρεψιμότητα ή όχι της απόφραξης στους αεραγωγούς (αναστρέψιμη- $\Delta$ FEV<sub>1</sub> $\geq 15\%$ , μη αναστρέψιμη- $\Delta$ FEV<sub>1</sub> $< 15\%$ ). Ο συντελεστής διάχυσης του CO διορθωμένος για τον κυψελιδικό αερισμό (TLco/VA) ήταν σημαντικά υψηλότερος στο άσθμα (εντός φυσιολογικών ορίων), συγκριτικά με την Χ.Α.Π. ( $p < 0.04$ ).

Ικανοποιητικό δείγμα πτυέλου ελήφθη από όλους τους ασθενείς. Η τεχνική πρόκλησης παραγωγής πτυέλου έγινε καλά ανεκτή από όλους τους

ασθενείς με Χ.Α.Π., ενώ μόνο 4 ασθενείς με Β.Ε.Α. ανέφεραν ήπια συμπτώματα (31%) και σε 1 ασθενή η FEV1 έπεσε >20% της αρχικής τιμής. Σε αυτούς τους ασθενείς η διαδικασία τερματίστηκε. Όλοι οι ασθενείς ανταποκρίθηκαν στην βρογχοδιασταλτική αγωγή. Δεν αναφέρθηκαν εξάρσεις μετά την πρόκληση σε καμιά ομάδα.

### **ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΗ ΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ ΥΠΟΠΛΗΘΥΣΜΟΙ Τ-ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ**

Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σαν μέσος όρος±απόκλιση για κανονικές κατανομές και σαν διάμεσος(ελάχιστο, μέγιστο) για μη κανονικές κατανομημές. Η ζωτικότητα των κυττάρων του πτυέλου ήταν  $79\pm 15\%$  και  $83\pm 16\%$  για το Β.Ε.Α. και τη Χ.Α.Π., αντιστοίχως. Το ποσοστό των πλακωδών κυττάρων ήταν  $7.5\pm 7\%$  για το Β.Ε.Α. και  $4.6\pm 5.5\%$  για τη Χ.Α.Π. Δεν βρέθηκαν διαφορές μεταξύ Β.Ε.Α. και Χ.Α.Π. στον ολικό αριθμό των κυττάρων του πτυέλου, [διάμεσος(ελάχιστο, μέγιστο)  $8190000(331200, 33982600)$  vs  $1872000(656500, 65320000)$  κυτ/γρ πτυέλου αντιστοίχως], στο ποσοστό των μακροφάγων [διάμεσος(ελάχιστο, μέγιστο)  $39(1, 59)\%$  vs  $27(10, 41)\%$  των μη πλακωδών κυττάρων] ή των λεμφοκυττάρων [διάμεσος(ελάχιστο, μέγιστο)  $3(0.4, 5)\%$  vs  $1(0.4, 6)\%$  των μη πλακωδών κυττάρων]. Το ποσοστό των ουδετεροφίλων ήταν σημαντικά αυξημένο στην Χ.Α.Π. σε σχέση με το Β.Ε.Α. ( $p<0.03$ ) (σχεδιαγρ.Ι). Ωστόσο, τα ποσοστά των ουδετεροφίλων δεν διέφεραν μεταξύ της υποομάδας των 8 ασθματικών ασθενών με τη μη αναστρέψιμη απόφραξη των αεραγωγών και των ασθενών με Χ.Α.Π. Τα ποσοστά των ηωσινοφίλων ήταν σημαντικά αυξημένα στο Β.Ε.Α. και οριακά αυξημένα στην υποομάδα των ασθματικών με μη αναστρέψιμη απόφραξη των αεραγωγών σε σχέση με την ΧΑΠ ( $p<0.04$  και  $p=0.05$  αντιστοίχως) (σχεδιαγρ.Ι). Ηωσινοφιλία στο πτύελο, όπως ορίζεται με ποσοστό ηωσινοφίλων στο πτύελο  $\geq 3\%$  των μη πλακωδών κυττάρων, βρέθηκε σε 8 ασθενείς, με αναστρέψιμη και με μη αναστρέψιμη απόφραξη των αεραγωγών.

Τα μεταχρωματικά κύτταρα ήταν σημαντικά αυξημένα στο Β.Ε.Α. και οριακά αυξημένα στην υποομάδα των ασθματικών με μη αναστρέψιμη απόφραξη των αεραγωγών σε σχέση με την Χ.Α.Π. ( $p<0.007$  και  $p=0.05$  αντιστοίχως).

Το σχεδιάγραμμα ΙΙ δείχνει τους λόγους CD4/CD8+κυττάρων στα πτύελα. Οι ασθματικοί είχαν υψηλότερο λόγο CD4/CD8+ κυττάρων σε σχέση με την Χ.Α.Π. Στο διάγραμμα ΙΙΙ φαίνονται οι λόγοι CD4-INFγ/CD4-IL4 και CD8-INFγ/CD8-IL4+ κυττάρων στο πτύελο. Οι ασθματικοί είχαν χαμηλότερο λόγο CD4-INFγ/CD4-IL4+ κυττάρων. Οι δύο ομάδες δεν διέφεραν όσον

αφορά τον λόγο CD8-IFN $\gamma$ /CD8-IL4+ κυττάρων. Όταν μόνο οι ασθματικοί με μη ανατρέψιμη απόφραξη των αεραγωγών συγκρίθηκαν με την Χ.Α.Π., παρόμοιες στατιστικές διαφορές βρέθηκαν στους λόγους CD4/CD8 και CD4-IFN $\gamma$ /CD4-IL4+ κυττάρων ( $p < 0.01$  και  $p < 0.001$  αντιστοίχως).

Στην Χ.Α.Π. τα ουδετερόφιλα έδειξαν αρνητική συσχέτιση με τον Kco ( $r = -0.462$ ,  $p = 0.04$ ) και στο άσθμα ο λόγος CD4/CD8+ κυττάρων σχετιζόνταν θετικά με τα ηωσινόφιλα ( $r = 0.567$ ,  $p = 0.04$ ).

## **ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

Η μελέτη μας έδειξε ότι τα πτύελα ασθενών με Χ.Α.Π. και άσθμα με ίδιο βαθμό απόφραξης των αεραγωγών και ίδια λαμβανόμενη δόση εισπνεόμενων στεροειδών, παρουσιάζουν διαφορετικούς πληθυσμούς φλεγμονωδών κυττάρων και υποπληθυσμούς T-λεμφοκυττάρων. Περισσότερα ηωσινόφιλα, μεταχρωματικά κύτταρα και CD4/CD8+ κύτταρα, λιγότερα ουδετερόφιλα και χαμηλότερος λόγος CD4-IFN- $\gamma$ /CD4-IL-4+ κυττάρων βρέθηκαν στο άσθμα σε σύγκριση με τη Χ.Α.Π. Ωστόσο, στο άσθμα με μη αναστρέψιμη απόφραξη των αεραγωγών παρατηρήθηκαν ίδια ποσοστά ουδετεροφίλων με τη Χ.Α.Π.

Είναι γνωστό ότι η θεραπεία με κορτικοειδή αλλοιώνει σε σημαντικό βαθμό τους δείκτες φλεγμονής πτυέλων ασθματικών ασθενών (25). Από την άλλη όμως, υπάρχουν αντιφατικά στοιχεία όσον αφορά την επίδραση των εισπνεόμενων στεροειδών στους δείκτες φλεγμονής πτυέλων ασθενών με Χ.Α.Π. (25, 26). Αναγνωρίζουμε ότι τα στεροειδή δεν δρουν με τον ίδιο τρόπο και στις δύο παθήσεις και μπορεί να έχουν επηρεάσει με διαφορετικό τρόπο τα αποτελέσματα στο άσθμα και στη ΧΑΠ. Ωστόσο, αποφασίσαμε να ερευνήσουμε και τις δύο ομάδες υπό την ίδια αντιφλεγμονώδη αγωγή, με σκοπό να αποφύγουμε όσον το δυνατό περισσότερο τον επηρεασμό των αποτελεσμάτων μας από την θεραπεία των ασθενών καθώς και για προφανείς ηθικούς λόγους .

Λόγω της γνωστής επικάλυψης των δύο παθήσεων –άσθμα και ΧΑΠ– προσπαθήσαμε να αποκλείσουμε τους ασθενείς εκείνους οι οποίοι εμφάνιζαν και τις δύο διαταραχές. Οι ασθενείς μας με Χ.Α.Π. δεν είναι πιθανό να έπασχαν από άσθμα, καθώς δεν ήταν αλλεργικοί, δεν παρουσίαζαν ατοπία και εμφάνιζαν όλοι μη αναστρέψιμη απόφραξη των αεραγωγών. Επιπλέον, ο δείκτης διάχυσης CO ήταν κάτω από τα φυσιολογικά αναμενόμενα επίπεδα στους ασθενείς με Χ.Α.Π. Βεβαιωθήκαμε επίσης ότι όλοι οι ασθματικοί που συμμετείχαν στη μελέτη, ακόμα και αυτοί με μη αναστρέψιμη απόφραξη των

αεραγωγών, δεν έπασχαν από Χ.Α.Π. αφού ήταν όλοι μη καπνιστές, αλλεργικοί, με ατοπία και με ιστορικό άσθματος το λιγότερο 13 έτη.

Η εργασία μας επιβεβαίωσε ότι η πρόκληση πτυέλων είναι μία ασφαλής μέθοδος μελέτης της φλεγμονής στο Β.Ε.Α. (18). Μόνο ένας ασθματικός ασθενής εμφάνισε πτώση της FEV<sub>1</sub> > 20% κατά τη διάρκεια εισπνοής υπέρτονου διαλύματος άλατος η οποία αμέσως διορθώθηκε με χορήγηση βρογχοδιασταλτικών. Επίσης, αποδείξαμε ότι οι υποπληθυσμοί και οι υποπληθυσμοί των λεμφοκυττάρων στα πτύελα μπορούν να μελετηθούν με ανοσοκυτταροχημικές μεθόδους. Πριν από την ανοσοκυτταροχημεία τα Τ-λεμφοκύτταρα διεγέρθηκαν με PMA και ionomycin. Θεωρητικά αυτή η παρέμβαση θα μπορούσε να τους αλλοιώσει το προφίλ παραγωγής κυτταροκινών. Ωστόσο, υποθέτουμε ότι οι διαφορές οι οποίες εντοπίστηκαν στους υποπληθυσμούς των Τ-λεμφοκυττάρων *in vitro* αντικατοπτρίζουν τη διαφορά που υπάρχει και *in vivo*, αφού τα δείγματα από τις δύο ομάδες ασθενών διεγέρθηκαν με τον ίδιο τρόπο .

Θεωρώντας σημαντικό να επιτύχουμε υψηλού βαθμού επαναληψιμότητα στα αποτελέσματά μας προσπαθήσαμε όσον το δυνατό περισσότερο να εξαλείψουμε τη μεταβλητότητα κατά τη δειγματοληψία των πτυέλων. Διαφορά στη διάρκεια εισπνοής άλατος ή στη συγκέντρωση άλατος θα μπορούσαν να αλλοιώσουν τον τύπο φλεγμονής στα πτύελα (27). Προκειμένου να αποκλείσουμε αυτούς τους παράγοντες ο χρόνος εισπνοής ορίστηκε στα 25 λεπτά σε όλους τους ασθενείς (με εξαίρεση τους 4 ασθενείς οι οποίοι εμφάνισαν ενοχλητικά συμπτώματα πριν το τέλος αυτού του χρόνου) και χρησιμοποιήθηκε διάλυμα με την ίδια πάντα συγκέντρωση άλατος (0.9% N/S). Επιπλέον, όλες οι προκλήσεις πτυέλων πραγματοποιήθηκαν από τον ίδιο ερευνητή.

Στη συγκεκριμένη μελέτη βρέθηκαν σημαντικές διαφορές στα πτύελα όσον αφορά τα Τ-λεμφοκύτταρα μεταξύ ασθενών που πάσχουν από Β.Ε.Α. και Χ.Α.Π. Στο Β.Ε.Α. ήταν αυξημένος ο λόγος CD4/CD8+ κυττάρων σε σύγκριση με τη Χ.Α.Π. (σχ.ΙΙ), γεγονός που επιβεβαιώνει προηγούμενα ευρήματα αυξημένων CD4+ κυττάρων στο άσθμα και CD8+ κυττάρων στη Χ.Α.Π., σε περιφερικό αίμα, βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα και βιοψίες πνεύμονα (12, 28). Ομοίως, η πρόσφατη μελέτη των Fabbri και συν. σύγκρινε βαρείς ασθματικούς με μη αναστρέψιμη απόφραξη αεραγωγών με ασθενείς με Χ.Α.Π. και βρήκε υψηλότερο λόγο CD4/CD8+ κυττάρων στο άσθμα (29). Αντιθέτως οι Leckie et al απέτυχαν να βρουν οποιαδήποτε διαφορά στα



πτύελα όσον αφορά τους κυτταρικούς πληθυσμούς CD4 και CD8+ κυττάρων μεταξύ ασθενών με άσθμα, Χ.Α.Π. και υγιείς μάρτυρες (30). Αυτή η ασυμφωνία μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι εμείς και οι Fabbri και συν. μελετήσαμε μόνο το Β.Ε.Α.

Σημαντικά χαμηλότερος λόγος CD4-INF- $\gamma$ /CD4-IL-4+ κυττάρων βρέθηκε επίσης στα πτύελα ασθενών με Β.Ε.Α. σε σχέση με τη Χ.Α.Π. (σχ.ΙΙΙ). Αφού τα Th0 κύτταρα παράγουν τόσο INF- $\gamma$  όσο και IL-4, ο χαμηλότερος λόγος CD4-INF- $\gamma$ /CD4-IL-4+ κυττάρων αντιστοιχεί σε χαμηλότερο λόγο Th1/Th2 κυττάρων. Επομένως η τύπου Th2 απάντηση είναι αυξημένη στα πτύελα ασθενών με Β.Ε.Α. σε σχέση με την Χ.Α.Π. Τα CD4+ κύτταρα τύπου 2 έχουν βρεθεί επίσης αυξημένα στο αίμα, σε βιοψίες και στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα ασθματικών ασθενών (12). Αυτά τα κύτταρα εκφράζουν ρυθμιστικές κυτοκίνες, όπως IL-5 η οποία προάγει τη διαφοροποίηση, ενεργοποίηση και επιβίωση των ηωσινόφιλων, καθώς και IL-4 και IL-13, οι οποίες προάγουν την παραγωγή IgE και την προσκόλληση ηωσινόφιλων μέσω έκφρασης VCAM-1 μορίων στο αγγειακό ενδοθήλιο (11). Πραγματικά, ο λόγος CD4/CD8+ κυττάρων στα πτύελα στην ομάδα των ασθματικών της μελέτης μας συσχετιζόταν θετικά με τον αριθμό και την επί τοις εκατό αναλογία των ηωσινόφιλων. Παρόλο που μία τέτοια συσχέτιση δεν υποδεικνύει πάντα μία σχέση αιτίου-αποτελέσματος, μπορεί να εξηγεί γιατί η ηωσινοφιλία επιμένει παρά τη χορήγηση στεροειδών σε ορισμένους ασθματικούς. Έχει παλαιότερα βρεθεί ότι σε ασθματικούς ασθενείς με κορτικοανθεκτική νόσο, εμμένει η έκφραση του γονιδίου για την IL-5, παρά τη χορήγηση στεροειδών (31). Πιθανά η υψηλή αναλογία CD4-Th2 κυττάρων, η οποία παρατηρήθηκε στη μελέτη μας σε ορισμένους ασθενείς με Β.Ε.Α., να συνδέεται με αυξημένη παραγωγή IL-5 και με τους αυξημένους αριθμούς ηωσινοφίλων, παρά τη θεραπεία με στεροειδή.

Από προηγούμενες μελέτες είναι γνωστό ότι τα CD8+ κύτταρα αυξάνουν στον αυλό των αεραγωγών και στο πνευμονικό παρέγχυμα σε ασθενείς με Χ.Α.Π. (6, 7). Η παρούσα μελέτη έδειξε μία αύξηση στα CD8+ κύτταρα σε σχέση με τα CD4+ κύτταρα στη Χ.Α.Π. σε σχέση με το Β.Ε.Α. (σχ. ΙΙ). Τα CD8+ κύτταρα είναι επίσης γνωστά ως κυτταροτοξικά και δρουν μέσω απελευθέρωσης περφορινών, granzymes ή μέσω της fas ligand οδού (32). Ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι μπορούν να προκαλέσουν πνευμονική βλάβη μέσω του TNF- $\alpha$  (33). Παρόλο που προηγούμενες έρευνες έχουν δείξει μία αρνητική συσχέτιση μεταξύ CD8+ κυττάρων και της FEV<sub>1</sub> σε ασθενείς με

Χ.Α.Π. (6, 7, 28), μία τέτοια συσχέτιση δεν επιβεβαιώθηκε από τα δικά μας αποτελέσματα. Αυτό αποδόθηκε στο γεγονός ότι κατά τη διάρκεια του σχεδιασμού της έρευνάς μας όλοι οι ασθενείς με Χ.Α.Π. είχαν παραπλήσιες τιμές FEV<sub>1</sub>, έτσι ώστε καμία συσχέτιση δεν μπορούσε να γίνει μεταξύ FEV<sub>1</sub> και οποιασδήποτε άλλης παραμέτρου .

Πρόσφατα στοιχεία αποδεικνύουν ότι τα CD8+ κύτταρα που εμπλέκονται στη ΧΑΠ είναι τύπου 1. Οι Saetta και συν. έχουν βρει υψηλούς αριθμούς Tc1 κυττάρων στους περιφερικούς αγωγούς ασθενών με ΧΑΠ σε σύγκριση με υγιείς καπνιστές ή μη-καπνιστές, ενώ η τύπου 1 αντίδραση έχει βρεθεί αυξημένη και στο περιφερικό αίμα. ασθενών με Χ.Α.Π. (9, 34). Στην παρούσα μελέτη δεν βρέθηκε διαφορά στο λόγο CD8-IL4+ κυττάρων μεταξύ των ασθενών με Χ.Α.Π. και Β.Ε.Α., αλλά και στις δύο ομάδες τα CD8-INFγ+ κύτταρα ήταν περισσότερα από τα CD8-IL4+ (σχ.III). Αφού τα Tc0 κύτταρα παράγουν INF-γ καθώς και IL-4, αύξηση των CD8-INF-γ+ κυττάρων σημαίνει αύξηση των Tc1 κυττάρων. Τα Tc1 κύτταρα μπορεί να εμπλέκονται στους μηχανισμούς φλεγμονής οι οποίοι λαμβάνουν χώρα στον αυλό των αεραγωγών τόσο στη Χ.Α.Π. όσο και στη Β.Ε.Α. Τα τύπου 1 T-λεμφοκύτταρα παίζουν σημαντικό ρόλο στις ιογενείς λοιμώξεις και οι ιογενείς λοιμώξεις είναι συχνές στους ασθενείς με Χ.Α.Π. και άσθμα (35-37). Τα Tc1 κύτταρα εκφράζουν INF-γ η οποία μπορεί να προκαλέσει εμφύσημα σε ζωικά μοντέλα, ενώ εμπλέκονται και στην παθογένεια του άσθματος επειδή προάγουν την βρογχική υπεραντιδραστικότητα (38).

Προηγούμενες μελέτες έχουν αναφέρει συμμετοχή των ουδετερόφιλων στην παθογένεση της Χ.Α.Π. και του Β.Ε.Α. Αυξημένα ουδετερόφιλα βρέθηκαν στους ασθενείς με Χ.Α.Π. και άσθμα και στην παρούσα μελέτη. Ενώ τα στεροειδή μπορεί να προκαλούν αύξηση των ουδετερόφιλων στα πτύελα , η θεραπεία με μακράς δράσης β2-αγωνιστές μπορεί να προκαλέσει μείωση στα ουδετερόφιλα (39). Παρόλο που η θεραπεία με στεροειδή και β2-αγωνιστές ήταν ανάλογη και στις δύο ομάδες μας, οι ασθενείς με Β.Ε.Α. είχαν λιγότερα ουδετερόφιλα σε σχέση με τη ΧΑΠ ( $p < 0,003$ ) (σχ.I). Πρόσφατα, οι Fabri και συν. βρήκαν λιγότερα ουδετερόφιλα στα πτύελα ασθενών με σοβαρό άσθμα σε σύγκριση με την ΧΑΠ (29). Ωστόσο, στα πτύελα ασθματικών με μη αναστρέψιμη απόφραξη των αεραγωγών δεν βρέθηκε στατιστικά αυξημένο ποσοστό ουδετεροφίλων σε σχέση με την Χ.Α.Π. Παρόλο που αυτή η παρατήρηση θα πρέπει να ερμηνευτεί πολύ προσεχτικά λόγω του χαμηλού αριθμού των ασθενών με Β.Ε.Α. και μη αναστρέψιμη απόφραξη αεραγωγών

και λόγω του μεγάλου εύρους κατανομής των ποσοστών των ουδετεροφίλων, υποδεικνύει την πιθανή εμπλοκή των ουδετεροφίλων στη μη αναστρέψιμη απόφραξη των αεραγωγών. Ενδείξεις υπέρ αυτής της υπόθεσης έχουν προηγουμένως δοθεί από τους Lacoste και συν., οι οποίοι βρήκαν υψηλότερα ποσοστά ουδετεροφίλων σε ασθενείς με Χ.Α.Π. σε σχέση με ασθενείς με χρόνια βρογχίτιδα (40). Τα ουδετερόφιλα μπορεί να συμβάλλουν στη δημιουργία της μη αναστρέψιμης απόφραξης των αεραγωγών και στην Χ.Α.Π. και στο άσθμα μέσω απελευθέρωσης πρωτεολυτικών ενζύμων κατά τη διαδικασία της αναδιαμόρφωσης του τοιχώματος των αεραγωγών και του παρεγχύματος (41). Ωστόσο, η δράση τους μπορεί να επηρεάζει διαφορετικά μέρη του αναπνευστικού συστήματος (παρέγχυμα στη Χ.Α.Π., μεγάλοι αεραγωγοί στο άσθμα). Η διαπίστωση μας ότι ο δείκτης διάχυσης CO, που είναι δείκτης βαρύτητας του εμφυσήματος, συσχετίζεται αρνητικά με τον αριθμό των ουδετεροφίλων στο πτύελο ασθενών με Χ.Α.Π. έρχεται σε συμφωνία με αυτή την υπόθεση.

Ο ρόλος των ηωσινοφίλων στο Β.Ε.Α. δεν είναι ακόμα ξεκάθαρος. Η ανάλυση των πτυέλων των βαρέως ασθματικών σε προηγούμενες μελέτες έδειξε εμμένουσα ηωσινοφιλική φλεγμονή, παρά τη λήψη υψηλών δόσεων κορτικοειδών (18, 29). Οι Wenzel και συν. βρήκαν ότι υπάρχουν δύο τύποι σοβαρού άσθματος, οι οποίοι καθορίζονται με βάση την παρουσία ή την απουσία ηωσινοφίλων στις ενδοβρογχικές βιοψίες (42). Η ομάδα των ασθματικών στην παρούσα μελέτη είχε σαν σύνολο σημαντικά αυξημένα ηωσινοφιλικά ποσοστά σε σχέση με την ομάδα των ασθενών με Χ.Α.Π. ( $p < 0,045$ ). Εντούτοις κάποιοι ασθματικοί είχαν χαμηλά ποσοστά ηωσινοφίλων ( $< 3\%$ ). Οι Gibson και συν. έχουν ήδη αναφέρει ετερογένεια στον αριθμό ηωσινοφίλων στα πτύελα βαρέων ασθματικών (43). Αυτό υποδεικνύει ότι υπάρχουν δύο φαινότυποι στο Β.Ε.Α. ανάλογα με την παρουσία ή την απουσία ηωσινοφίλων στους αεραγωγούς.

Στην παρούσα μελέτη υψηλοί αριθμοί μεταχρωματικών κυττάρων (μαστοκύτταρα και βασεόφιλα) βρέθηκαν στο Β.Ε.Α. σε σύγκριση με την Χ.Α.Π. ( $p < 0,007$ ). Μέχρι σήμερα, αυξημένοι αριθμοί μεταχρωματικών κυττάρων έχουν βρεθεί στα πτύελα ασθματικών ασθενών (22, 44) και αυξημένος αριθμός μαστοκυττάρων σε βιοψίες ασθενών με Χ.Α.Π., αλλά όχι στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (45). Παρόλο που τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι τα μεταχρωματικά κύτταρα είναι σπάνια στους αυλούς των

αεραγωγών ασθενών με Χ.Α.Π., η πιθανή εμπλοκή τους στην παθογένεια της νόσου δεν μπορεί να αποκλειστεί.

Ανακεφαλαιώνοντας, ο διαφορετικός τύπος φλεγμονής στα πτύελα ασθενών με Β.Ε.Α. και Χ.Α.Π. δείχνει ότι δύο ξεχωριστοί μηχανισμοί φλεγμονής ενέχονται στην παθογένεια των δύο αυτών αποφρακτικών νοσημάτων του πνεύμονα. Από την ανάλυση δειγμάτων πτυέλων φάνηκε η συμμετοχή των CD4–Th2 κυττάρων στο άσθμα και των CD8+ κυττάρων στη ΧΑΠ. Διαφορές εντοπίστηκαν στα ποσοστά ηωσινοφίλων, ουδετεροφίλων και μεταχρωματικών κυττάρων, παρόλο που τα ποσοστά των ουδετερόφιλων δεν ήταν σημαντικά αυξημένα στο Β.Ε.Α. με μη αναστρέψιμη απόφραξη των αεραγωγών σε σχέση με τη Χ.Α.Π. Ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι όλες οι παραπάνω διαφορές διαπιστώθηκαν παρά τη χορήγηση θεραπείας με κορτικοστεροειδή . Αυτά τα ευρήματα ενισχύουν τη σημασία της εισαγωγής της ανάλυσης πτυέλων στο ερευνητικό πεδίο της αποφρακτικών νοσημάτων του πνεύμονα και υποδεικνύουν έναν πιθανό ρόλο για την μεθόδου αυτή στη διαφορική διάγνωση μεταξύ Β.Ε.Α. και Χ.Α.Π.

## Πίνακας Ι

### ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΣΘΕΝΩΝ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

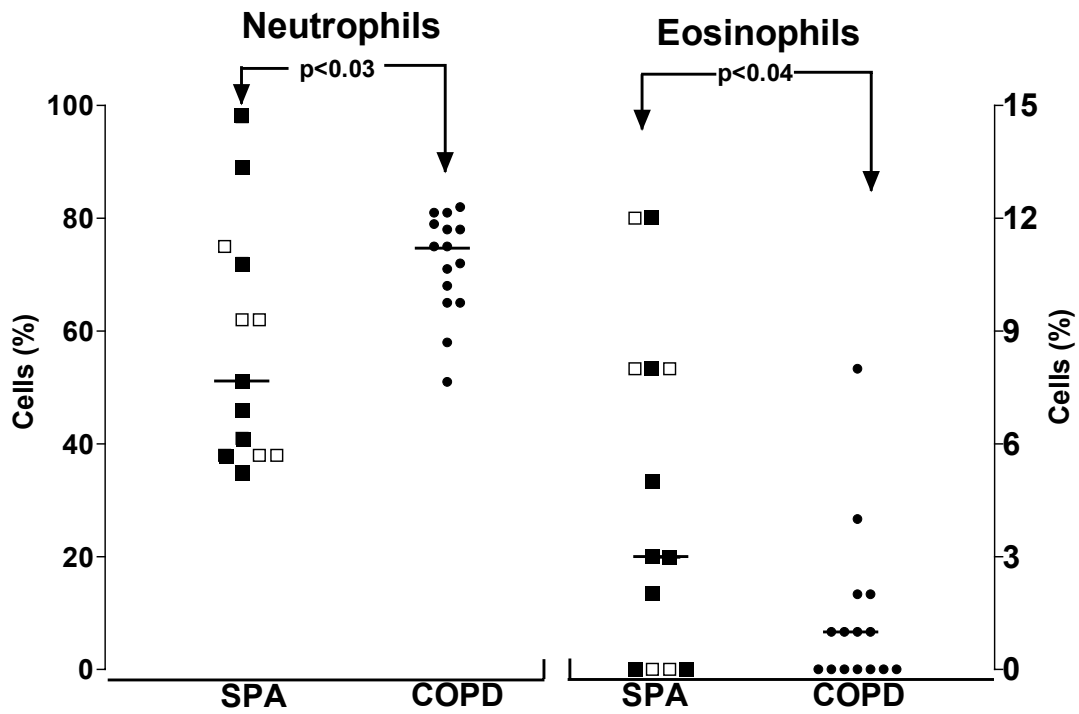
	ΒΕΑ (όλοι)	(Μη αναστρέψιμη απόφραξη)*	ΧΑΠ	ρ
Αριθμός	13	(8)	15	
Ηλικία (έτη)	55±10	(57±12)	68±8	
Φύλλο	3Α/10Θ	(2Α/6Θ)	15Μ/0F	†
Ατοπία	13/13	(8/8)	0/15	†
Κάπνισμα (p/y)	0±0	(0±0)	65±26	†
Διάρκεια νόσου (έτη)	20±7	(21±8)	15±9	
FEV <sub>1</sub> /FVC (%προβλ)	58±12	(54±10)	53±10	
FEV <sub>1</sub> (%προβλ)	49±10	(47±8)	45±7	
Δ FEV <sub>1</sub> (%)	13 ± 10	(6±4)	3 ± 3	†
TLco/VA (Kco) (%προβλ)	103±10	(107±13)	76±10	†

Τα δεδομένα εκφράζονται ως μέσος όρος±απόκλιση; ΔFEV<sub>1</sub> είναι η διαφορά στην FEV<sub>1</sub> (%προβλ) μετά από εισπνοή 400mcg σαλβουταμόλης; TLco/VA: ο δείκτης διάχυσης του CO/Κυψελιδικός αερισμός.

\*Η υποομάδα των βαρέων ασθματικών με μη αναστρέψιμη απόφραξη των αεραγωγών (ΔFEV<sub>1</sub><15%)

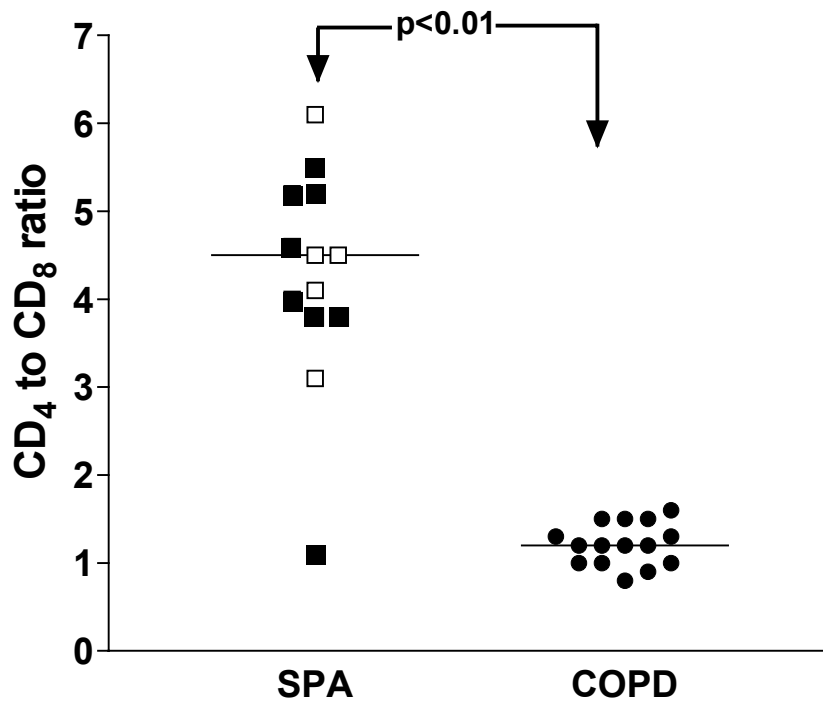
†p<0.05

## Σχεδιάγραμμα I



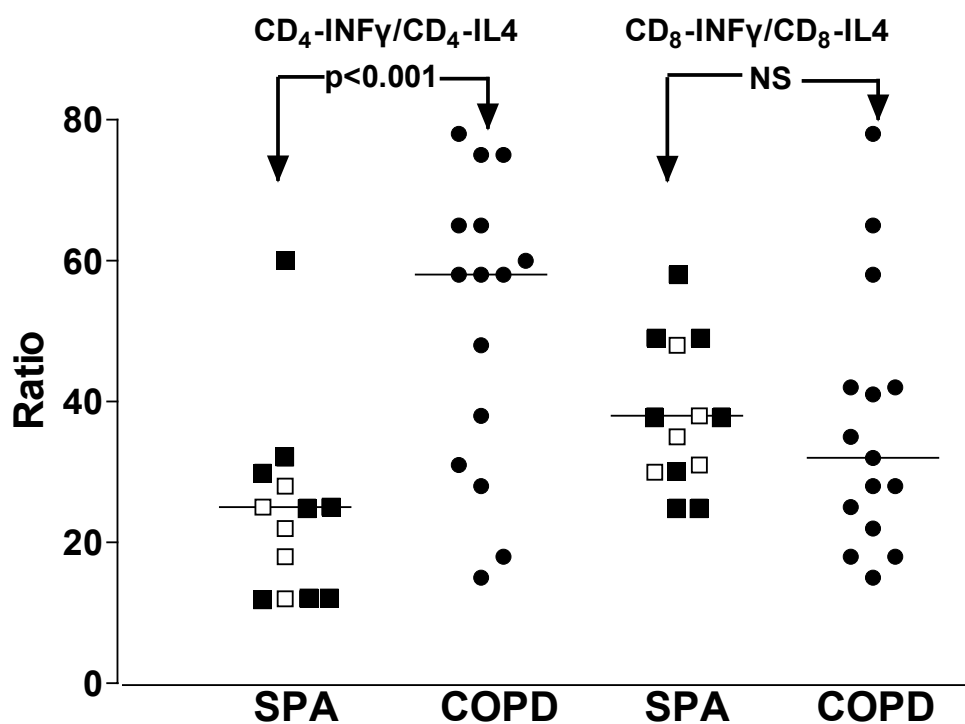
Ποσοστά ουδετεροφίλων (neutrophils) και ηωσινοφίλων (eosinophils) (%των μη πλακωδών κυττάρων) στο BEA (SPA) (με αναστρέψιμη απόφραξη των αεραγωγών (□) ή με μη αναστρέψιμη απόφραξη των αεραγωγών (■)) και στη ΧΑΠ (COPD) (●).

## Σχεδιάγραμμα II



Λόγος CD4/CD8+ κυττάρων στα πτύελα ασθενών με ΒΕΑ (SPA) (με αναστρέψιμη απόφραξη των αεραγωγών (□) ή με μη αναστρέψιμη απόφραξη των αεραγωγών (■)) και στη ΧΑΠ (COPD) (●).

### Σχεδιάγραμμα III



Λόγοι CD4-INFγ/CD4-IL4+ κυττάρων και CD8-INFγ/CD8-IL4+ κυττάρων στα πτύελα ασθενών με BEA (SPA) (με αναστρέψιμη απόφραξη των αεραγωγών (□) ή με μη αναστρέψιμη απόφραξη των αεραγωγών (■)) και στη ΧΑΠ (COPD) (●).





## Αναφορές

1. Pauwels RA, Buist AS, Calverley PM, et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI/WHO Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) Workshop summary. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163(5):1256-76.
2. WHO/NHLBI Workshop Report. National Institutes of Health NH, Lung, and Blood Institute, Bethesda, MD. Global Strategy for Asthma Management and Prevention. Publication No.95-3659.1995;
3. Cosio MG, Guerassimov A. Chronic obstructive pulmonary disease. Inflammation of small airways and lung parenchyma. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160(5 Pt 2):S21-5.
4. Jeffery PK. Comparison of the structural and inflammatory features of COPD and asthma. Giles F. Filley Lecture. *Chest* 2000;117(5 Suppl 1):251S-60S.
5. Maestrelli P, Saetta M, Di Stefano A, et al. Comparison of leukocyte counts in sputum, bronchial biopsies, and bronchoalveolar lavage. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152(6 Pt 1):1926-31.
6. O'Shaughnessy TC, Ansari TW, Barnes NC, et al. Inflammation in bronchial biopsies of subjects with chronic bronchitis: inverse relationship of CD8+ T lymphocytes with FEV1. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155(3):852-7.
7. Saetta M, Baraldo S, Corbino L, et al. CD8+ve cells in the lungs of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160(2):711-7.
8. Kemeny DM, Vyas B, Vukmanovic-Stejic M, et al. CD8(+) T cell subsets and chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160(5 Pt 2):S33-7.
9. Saetta M, Mariani M, Panina-Bordignon P, et al. Increased Expression of the Chemokine Receptor CXCR3 and Its Ligand CXCL10 in Peripheral Airways of Smokers with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165(10):1404-9.
10. Ulrik CS, Backer V. Nonreversible airflow obstruction in life-long nonsmokers with moderate to severe asthma. *Eur Respir J* 1999;14(4):892-6.

11. Muro S, Minshall EM, Hamid QA. The pathology of chronic asthma. *Clin Chest Med* 2000;21(2):225-44.
12. Colavita AM, Reinach AJ, Peters SP. Contributing factors to the pathobiology of asthma. The Th1/Th2 paradigm. *Clin Chest Med* 2000;21(2):263-77, viii.
13. Barnes PJ. Mechanisms in COPD: differences from asthma. *Chest* 2000;117(2 Suppl):10S-4S.
14. Chanez P, Vignola AM, O'Shaugnessy T, et al. Corticosteroid reversibility in COPD is related to features of asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155(5):1529-34.
15. Papi A, Romagnoli M, Baraldo S, et al. Partial reversibility of airflow limitation and increased exhaled NO and sputum eosinophilia in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162(5):1773-7.
16. Grashoff WF, Sont JK, Sterk PJ, et al. Chronic obstructive pulmonary disease: role of bronchiolar mast cells and macrophages. *Am J Pathol* 1997;151(6):1785-90.
17. Wenzel SE, Szeffler SJ, Leung DY, et al. Bronchoscopic evaluation of severe asthma. Persistent inflammation associated with high dose glucocorticoids. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156(3 Pt 1):737-43.
18. Jatakanon A, Uasuf C, Maziak W, et al. Neutrophilic inflammation in severe persistent asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160(5 Pt 1):1532-9.
19. Lamblin C, Gosset P, Tillie-Leblond I, et al. Bronchial neutrophilia in patients with noninfectious status asthmaticus. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157(2):394-402.
20. Siafakas NM, Vermeire P, Pride NB, et al. Optimal assessment and management of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). The European Respiratory Society Task Force. *Eur Respir J* 1995;8(8):1398-420.
21. 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 Suppl* 1993;16:5-40.
22. Pin I, Gibson PG, Kolendowicz R, et al. Use of induced sputum cell counts to investigate airway inflammation in asthma. *Thorax* 1992;47(1):25-9.

23. 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(3):205-10.
24. Kyriakoy D, Karkavitsas N, Eliopoulos G, et al. Immunohistochemical analysis of the ras p21 oncoprotein in Hashimoto's thyroiditis. *Anticancer Res* 1992;12(4):1189-94.
25. Keatings VM, Jatakanon A, Worsdell YM, et al. Effects of inhaled and oral glucocorticoids on inflammatory indices in asthma and COPD. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155(2):542-8.
26. Culpitt SV, Maziak W, Loukidis S, et al. Effect of high dose inhaled steroid on cells, cytokines, and proteases in induced sputum in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160(5 Pt 1):1635-9.
27. Tsoumakidou M, Tzanakis N, Siafakas NM. Induced sputum in the investigation of airway inflammation of COPD. *Respiratory Journal* 2003;97:863-71.
28. Tzanakis N, Chrysofakis G, Tsoumakidou M, et al. Induced sputum CD8+T lymphocytes subpopulations in COPD. *Respiratory Journal* (in press).
29. Fabbri LM, Romagnoli M, Corbetta L, et al. Differences in airway inflammation in patients with fixed airflow obstruction due to asthma or chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;167(3):418-24.
30. 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;58(1):23-9.
31. Leung DY, Martin RJ, Szeffler SJ, et al. Dysregulation of interleukin 4, interleukin 5, and interferon gamma gene expression in steroid-resistant asthma. *J Exp Med* 1995;181(1):33-40.
32. Berke G. The binding and lysis of target cells by cytotoxic lymphocytes: molecular and cellular aspects. *Annu Rev Immunol* 1994;12:735-73
33. Liu AN, Mohammed AZ, Rice WR, et al. Perforin-independent CD8(+) T-cell-mediated cytotoxicity of alveolar epithelial cells is preferentially mediated by tumor necrosis factor- alpha: relative insensitivity to Fas ligand. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999;20(5):849-58.

34. Majori M, Corradi M, Caminati A, et al. Predominant TH1 cytokine pattern in peripheral blood from subjects with chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol* 1999;103(3 Pt 1):458-62.
35. Retamales I, Elliott WM, Meshi B, et al. Amplification of inflammation in emphysema and its association with latent adenoviral infection. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164(3):469-73.
36. Fabbri L, Beghe B, Caramori G, et al. Similarities and discrepancies between exacerbations of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 1998;53(9):803-8.
37. Hogg JC. Childhood viral infection and the pathogenesis of asthma and chronic obstructive lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160(5 Pt 2):S26-8.
38. Magnan AO, Mely LG, Camilla CA, et al. Assessment of the Th1/Th2 paradigm in whole blood in atopy and asthma. Increased IFN-gamma-producing CD8(+) T cells in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161(6):1790-6.
39. Johnson M. Effects of beta2-agonists on resident and infiltrating inflammatory cells. *J Allergy Clin Immunol* 2002;110(6 Suppl):S282-90.
40. Lacoste JY, Bousquet J, Chanez P, et al. Eosinophilic and neutrophilic inflammation in asthma, chronic bronchitis, and chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol* 1993;92(4):537-48.
41. Stockley RA. Neutrophils and protease/antiprotease imbalance. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160(5 Pt 2):S49-52.
42. Wenzel SE, Schwartz LB, Langmack EL, et al. Evidence that severe asthma can be divided pathologically into two inflammatory subtypes with distinct physiologic and clinical characteristics. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160(3):1001-8.
43. 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(5):1329-36.
44. Gibson PG, Girgis-Gabardo A, Morris MM, et al. Cellular characteristics of sputum from patients with asthma and chronic bronchitis. *Thorax* 1989;44(9):693-9.
45. Pesci A, Rossi GA, Bertorelli G, et al. Mast cells in the airway lumen and bronchial mucosa of patients with chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;149(5):1311-6.

# **ΕΝΟΤΗΤΑ ΙΙ**

**Αλλαγές στους Πληθυσμούς  
Φλεγμονωδών Κυττάρων και  
στους Υποπληθυσμούς Τ-  
Λεμφοκυττάρων στην Οξεία  
Βαριά Παρόξυνση της Χρόνιας  
Αποφρακτικής  
Πνευμονοπάθειας**



## Περίληψη

Νεότερα επιστημονικά δεδομένα υποστηρίζουν τον κεντρικό ρόλο των CD8+ T-λεμφοκυττάρων στην ανάπτυξη της φλεγμονής που χαρακτηρίζει την Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια (Χ.Α.Π.). Ο τύπος της φλεγμονής στην παρόξυνση της Χ.Α.Π. δεν είναι ακόμη ξεκάθαρος, αλλά πιθανά να ενέχει τα T-λεμφοκύτταρα. Ο στόχος της μελέτης μας ήταν να ερευνήσουμε εάν η CD8+ λεμφοκυτταρική απάντηση επάγεται κατά την οξεία βαριά παρόξυνση Χ.Α.Π. και να εξακριβώσουμε τον τύπο της λεμφοκυτταρικής απάντησης (τύπος 1 ή 2) που επικρατεί στην βαριά παρόξυνση Χ.Α.Π. 12 ασθενείς με Χ.Α.Π. ηλικίας (μ.ο.+/-απόκλιση) 69+/-7 έτη, πρώην καπνιστές (68+/-23πακ-έτη), μέση FEV<sub>1</sub> 40+/-14%προβλ. μελετήθηκαν κατά την έναρξη βαριάς παρόξυνσης Χ.Α.Π. και 16 εβδομάδες μετά την υποχώρηση της παρόξυνσης. Δείγματα πτυέλων συγκεντρώθηκαν με την μέθοδο της τεχνητής πρόκλησης παραγωγής πτυέλων σε παρόξυνση και σε σταθερή κατάσταση. Οι πληθυσμοί των φλεγμονωδών κυττάρων και οι υποπληθυσμοί των T-λεμφοκυττάρων μετρήθηκαν χρησιμοποιώντας τεχνικές κυτταροχημείας και ανοσοκυτταροχημείας. Όλα τα δείγματα στάλθηκαν στο μικροβιολογικό τμήμα για καλλιέργεια για κοινά μικρόβια. 5 ασθενείς είχαν θετικές καλλιέργειες πτυέλων στην παρόξυνση. Αυξημένο ποσοστό ουδετεροφίλων βρέθηκε στην παρόξυνση σε σχέση με την σταθερή κατάσταση ( $p < 0.002$ ). Οι λόγοι CD4/CD8 και CD4-INF $\gamma$ /CD4-IL4+ κυττάρων ήταν μειωμένοι στην παρόξυνση σε σύγκριση με την σταθερή κατάσταση ( $p = 0.03$  και  $p = 0.02$ , αντιστοίχως). Αυτές οι αλλαγές ήταν ανεξάρτητες από την παρουσία βακτηριακής λοίμωξης ή όχι. Συμπεραίνουμε ότι ο λόγος CD4/CD8 μειώνεται και η CD8+ τύπου 2 λεμφοκυτταρική αντίδραση επάγεται κατά την βαρεία παρόξυνση ΧΑΠ. Περαιτέρω έρευνες πρέπει να γίνουν για να διερευνηθεί εάν αυτή η φλεγμονώδης απάντηση κατά την παρόξυνση της Χ.Α.Π. αντιπροσωπεύει έναν συγκεκριμένο φαινότυπο της νόσου.

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η Χ.Α.Π. είναι μία φλεγμονώδης πάθηση του πνεύμονα (1). Αυξημένος αριθμός CD8+ T-λεμφοκυττάρων έχει βρεθεί στους αεραγωγούς και στο παρέγχυμα ασθενών με Χ.Α.Π. σε σχέση με <υγείς> καπνιστές (2-4). Επίσης, ισχυρή αρνητική συσχέτιση έχει βρεθεί μεταξύ των τιμών της FEV<sub>1</sub> και του αριθμού των CD8+ κυττάρων στο βρογχιολοκυψελιδικό έκπλυμα, στα πτύελα και σε βιοψίες ασθενών με ΧΑΠ (2-5). Τα CD8+ T-λεμφοκυττάρων χωρίζονται σε τρεις υποπληθυσμούς ανάλογα με το προφίλ κυτταροκινών που παράγουν

(6). Τα τύπου 1 κύτταρα (Tc1) παράγουν ιντερφερόνη γάμα (INF $\gamma$ ) και απαντούν σε ιογενείς και βακτηριακές λοιμώξεις, τα τύπου 2 παράγουν ιντερλευκίνη 4 (IL4) και ρυθμίζουν την αλλεργική αντίδραση, ενώ τα τύπου 0 παράγουν και τις δύο κυτταροκίνες. Τα Tc1 και τα Tc2 κύτταρα έχουν ίδια κυτταροτοξικότητα (7). Σήμερα διερευνάτε ποιος είναι ο τύπος των CD8+ λεμφοκυττάρων που ενέχεται στην παθογένεια της Χ.Α.Π. Οι πρώτες ενδείξεις από μελέτες στο αίμα και σε βιοψίες υποστηρίζουν ότι στην Χ.Α.Π. επικρατεί ο τύπος αντίδρασης 1 (8, 9).

Η Χ.Α.Π. είναι μία διαρκώς επιδεινούμενη πάθηση με περιοδικές παροξύνσεις, οι οποίες χαρακτηρίζονται από αύξηση του αισθήματος της δύσπνοιας, συριγμό, αίσθημα σφιξίματος στο στήθος, αύξηση του βήχα και των πτυέλων, ή κάποια μη ειδικά ενοχλήματα, που οδηγούν τον ασθενή στην αναζήτηση ιατρικής βοήθειας (1). Αν και πιθανολογείται ότι η φλεγμονή αυξάνει κατά την διάρκεια των παροξύνσεων της Χ.Α.Π., υπάρχουν πολύ λίγες πληροφορίες για τον τύπο της φλεγμονής στην οξεία παρόξυνση Χ.Α.Π. (10-16). Αυτό εν μέρει οφείλεται στις τεχνικές δυσκολίες που προκύπτουν κατά την μελέτη βαριά πασχόντων ασθενών. Η τεχνική της πρόκλησης παραγωγής πτυέλων είναι μία σχετικά ασφαλής, μη επεμβατική μέθοδος για την μελέτη ασθενών σε παρόξυνση Χ.Α.Π. (17).

Τα μέχρι τώρα δεδομένα δείχνουν ότι τα ηωσινόφιλα αυξάνουν κατά την διάρκεια των ήπιων παροξύνσεων, ενώ τα ουδετερόφιλα και οι ουδετεροφιλικοί δείκτες κατά την διάρκεια των σοβαρών παροξύνσεων Χ.Α.Π. (10, 13, 14). Αν και αυξημένος αριθμός CD8+ λεμφοκυττάρων έχει βρεθεί σε σταθερούς ασθενείς με Χ.Α.Π., η πιθανή συμμετοχή των κυττάρων αυτών στην παθογένεια των παροξύνσεων δεν έχει μέχρι τώρα εξεταστεί. Κάτι τέτοιο θα αναμενόταν από το γεγονός ότι οι λοιμώξεις του αναπνευστικού δέντρου είναι η πιο συχνή αιτία παρόξυνσης Χ.Α.Π. και οι λοιμώξεις πυροδοτούν λεμφοκυτταρική απάντηση (18). Ο σκοπός της μελέτης μας ήταν να διερευνήσουμε εάν η CD8+ λεμφοκυτταρική φλεγμονή αυξάνεται κατά την σοβαρή παρόξυνση Χ.Α.Π. σε σχέση με την σταθερή κατάσταση και να εξακριβώσουμε τον τύπο της φλεγμονής (τύπος 1 ή 2) που επικρατεί στην σοβαρή παρόξυνση Χ.Α.Π. Αποφασίσαμε να μελετήσουμε ειδικά την βαριά παρόξυνση, επειδή αποτελεί συχνή αιτία νοσηλείας στο νοσοκομείο, έχει υψηλό ποσοστό θνησιμότητας και σημαντική αρνητική επίπτωση στην ποιότητα ζωής του ασθενούς με Χ.Α.Π. (1,19). Τα αποτελέσματά μας έδειξαν σημαντικές μειώσεις στους λόγους CD4/CD8 και CD4-INF $\gamma$ /CD4-IL4 +



κυττάρων στα πτύελα ασθενών με σοβαρή παρόξυνση Χ.Α.Π. σε σύγκριση με την σταθερή κατάσταση.

## **ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ**

### **ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ**

12 ασθενείς Χ.Α.Π., πρώην καπνιστές, μελετήθηκαν στην έναρξη βαριάς παρόξυνσης Χ.Α.Π. και 16 εβδομάδες μετά την υποχώρηση αυτής. Η διάγνωση της Χ.Α.Π. έγινε σύμφωνα με τα κριτήρια GOLD (1). Για να συμμετάσχει ένας ασθενής στην μελέτη θα έπρεπε να τηρεί τα παρακάτω κριτήρια: 1) γνωστή διάγνωση Χ.Α.Π., 2) ιστορικό καπνίσματος τουλάχιστον 20 πακ-έτη, 3) μη αναστρέψιμη απόφραξη των αεραγωγών με αναστρεψιμότητα στην σαλβουταμόλη <15%. Κριτήρια αποκλεισμού από την μελέτη ήταν: 1) ιστορικό αλλεργίας, 2) νυν-καπνιστής ή καπνιστής τα 2 έτη πριν την μελέτη, 3) χρήση άλλων φαρμάκων εκτός από εισπνεόμενα βρογχοδιασταλτικά και στεροειδή, 4) ύπαρξη άλλης πνευμονολογικής ή συστηματικής πάθησης (π.χ. βρογχεκτασίες, καρδιακή ανεπάρκεια) που θα μπορούσαν να προδιαθέσουν σε συχνές παροξύνσεις Χ.Α.Π., 5) χρόνια κατ'οίκον οξυγονοθεραπεία.

14 ασθενείς που πληρούσαν τα παραπάνω κριτήρια επιστρατεύθηκαν από το Επείγον Πνευμονολογικό Ιατρείο του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου κατά την έναρξη βαριάς παρόξυνσης Χ.Α.Π. που χρειαζόταν εισαγωγή σε νοσοκομείο. Η παρόξυνση ορίστηκε ως σοβαρή σύμφωνα με τα ακόλουθα κριτήρια: χρήση επικουρικών αναπνευστικών μυών, παράδοξες κινήσεις του αναπνευστικού τοιχώματος, αναπνευστική ανεπάρκεια. Προκλητά πτύελα πάρθηκαν στην παρόξυνση πριν από οποιαδήποτε θεραπευτική παρέμβαση. Έγινε ακτινογραφία θώρακος και ελήφθησαν αέρια αίματος. 12 από τους 14 ασθενείς επανεκτιμήθηκαν σε μια προγραμματισμένη επίσκεψη 16 εβδομάδες μετά την έξοδό τους από το νοσοκομείο. Πάρθηκαν εκ νέου προκλητά πτύελα και αέρια αίματος. Επίσης έγιναν: σπιρομέτρηση προ και μετά βρογχοδιαστολής και αλλεργικές δερματικές δοκιμασίες. 2 ασθενείς αποκλείστηκαν από την μελέτη, επειδή υπέστησαν νέα έξαρση ή οξεία λοίμωξη του αναπνευστικού κατά την διάρκεια των 16 εβδομάδων μετά την έξοδό τους από το νοσοκομείο. Τα δείγματα πτυέλων από τους ίδιους ασθενείς σε παρόξυνση και σε σταθερή κατάσταση επεξεργάστηκαν κατάλληλα για ανάλυση των πληθυσμών φλεγμονωδών κυττάρων και των υποπληθυσμών των T-λεμφοκυττάρων και στάλθηκαν στο μικροβιολογικό τμήμα για καλλιέργειες για κοινά βακτήρια.

Η Επιστημονική Επιτροπή του νοσοκομείου ενέκρινε το πρωτόκολλο και όλοι οι ασθενείς έδωσαν την γραπτή τους συγκατάθεση.

### **ΠΡΟΚΛΗΣΗ ΠΤΥΕΛΟΥ ΚΑΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΥΤΟΥ**

Τα πτύελα προκλήθηκαν και επεξεργάστηκαν βασιζόμενοι στην μέθοδο του Pin, όπως έχουμε ήδη περιγράψει (20-22). Τα λεμφοκύτταρα διεγέρθηκαν μετά από επώαση κυτταρικού διαλύματος συγκέντρωσης  $2 \times 10^6$  κυτ/μl για 5 ώρες, υπό 5% CO<sub>2</sub> στους 37°C, σε RPMI 1640 με 10% FCS παρουσία phorbol 12-myristate 13-acetate 25ng/ml (PMA), ionomycin 1μmol/L και brebeldin A 10μg/ml (Sigma). Τα πλακάκια στρώθηκαν μετά από φυγοκέντρηση 50μl ενός 3500 κυτ/μl κυτταρικού διαλύματος και φυλάχθηκαν στους -80°C για ανάλυση αργότερα. Περίπου 175000 κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν στο κάθε πλακάκι, μεταξύ των οποίων υπήρχαν κατά μέσο όρο 1500 T-λεμφοκύτταρα.

Δύο πλακάκια βάφτηκαν με May-Grunwald-Giemsa για να υπολογιστεί ο τύπος των φλεγμονωδών κυττάρων στο πτύελο.

### **ΑΝΟΣΟΚΥΤΤΑΡΟΧΗΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ**

Αφού αποψύχθηκαν, τα πλακάκια μονιμοποιήθηκαν με ακετόνη και επανυδατώθηκαν σε TBS. Η μέθοδος της διπλής ανοσοκυτταροχημείας εφαρμόστηκε, όπως έχει ήδη περιγραφεί (23). Δύο ερευνητές διάβασαν τα πλακάκια κάτω από διπλό οπτικό και υπεριώδες μικροσκόπιο και από τα αποτελέσματά τους υπολογίστηκε ο μέσος όρος. Το οπτικό φίλτρο χρησιμοποιήθηκε για να διαχωριστούν τα κύτταρα με βάση την μορφολογία τους, ενώ το υπεριώδες φίλτρο για να μετρηθούν τα φθορίζοντα λεμφοκύτταρα στο ίδιο οπτικό πεδίο. Τρεις μετρήσεις έγιναν από κάθε ερευνητή σε 10 πλακάκια. Η intra- και inter-observer CV (coefficient of variation) ήταν <15%. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως λόγος CD4/CD8 και λόγος CD4-INFγ/CD4-IL4 + κυττάρων. Για τον υπολογισμό του κάθε λόγου μετρήθηκαν 500 λεμφοκύτταρα, γιατί ο αριθμός αυτός ήταν αρκετός για να μας δώσει μία μέση τιμή που παρέμενε σταθερή με παραπάνω αύξηση του μετρούμενου αριθμού κυττάρων.

#### *Μέτρηση CD4+ και CD8+ T-λεμφοκυττάρων*

Το πρωτογενές anti-CD4 mouse anti-human monoclonal αντίσωμα (Caltag· Burlingame, CA, USA) με το δευτερογενές rabbit anti-mouse IgG-FITC αντίσωμα (Immunotech· Marseille, France) και το πρωτογενές anti-CD8 mouse anti-human monoclonal αντίσωμα (Caltag) με το δευτερογενές rabbit anti-mouse IgG- phycoerythrin-conjugated (IgG-PE) αντίσωμα (Marseille)

χρησιμοποιήθηκαν. 500 CD4+ και CD8+ κύτταρα μετρήθηκαν για τον υπολογισμό του λόγου CD4/CD8.

#### *Μέτρηση των CD8-IFN $\gamma$ + και των CD8-IL4+ κυττάρων*

Το πρωτογενές anti-CD8 mouse anti-human monoclonal αντίσωμα με το δευτερογενές rabbit anti-mouse IgG-FITC αντίσωμα και το πρωτογενές anti-IFN $\gamma$  mouse anti-human monoclonal αντίσωμα (Caltag) με το δευτερογενές rabbit anti-mouse IgG- phycoerythrin-conjugated (IgG-PE) αντίσωμα χρησιμοποιήθηκαν για να μετρηθούν τα CD8+ κύτταρα που παράγουν IFN $\gamma$ . 500 CD8+ κύτταρα μετρήθηκαν για τον υπολογισμό των CD8-IFN $\gamma$ + κυττάρων. Η αντίστοιχη μέθοδος εφαρμόστηκε για την σήμανση των CD8+ κυττάρων με το anti-IL4 αντίσωμα (Immunotech).

Αρνητικά control πλακάκια λήφθηκαν με την χρήση mouse-anti-mouse ανοσοσφαιρίνης, ώστε να υπολογιστεί η μη ειδική σύνδεση. Θετικά control πλακάκια λήφθηκαν με τη φυγοκέντρηση κυττάρων από T-λέμφωμα.

### **ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ**

Διαφορές μεταξύ έξαρσης και σταθερής κατάστασης ελέγχθησαν χρησιμοποιώντας το Wilcoxon signed-rank test για μη κανονικές και το paired t-test για κανονικές κατανομές. Το software StatsDirect (Camcode· Cambridge, UK) χρησιμοποιήθηκε. Το  $p < 0.05$  θεωρήθηκε στατιστικά σημαντικό.

### **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

#### **ΑΣΘΕΝΕΙΣ**

Τα χαρακτηριστικά των ασθενών στην σταθερή κατάσταση και στην παρόξυνση ΧΑΠ φαίνονται στον πίνακα I. Όλοι οι ασθενείς είχαν αρνητικές αλλεργικές δερματικές δοκιμασίες. Κανένας ασθενής δεν κατάφερε να κάνει αποδεκτή σπιρομέτρηση κατά την παρόξυνση. Είναι φανερή η αύξηση του βήχα, των πτυέλων και η επιδείνωση των αερίων αίματος σε όλους τους ασθενείς στην παρόξυνση. Όλοι παρουσίαζαν αναπνευστική ανεπάρκεια στην παρόξυνση ( $PO_2 < 60\text{mmHg}$ ). 5 ασθενείς είχαν θετικές καλλιέργειες πτυέλων στην παρόξυνση (3 για στρεπτόκοκκο και 2 για ψευδομονάδα). Οι ακτινογραφίες θώρακα δεν έδειξαν πνευμοθώρακα ή πνευμονία σε κανέναν ασθενή.

#### **ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΗ ΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ ΥΠΟΠΛΗΘΥΣΜΟΙ T-ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ**

Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σαν μέσος όρος+/-απόκλιση για κανονικώς κατανομημένες τιμές και σαν διάμεσος(ελάχιστο, μέγιστο) για μη κανονικώς κατανομημένες τιμές. Η ζωτικότητα των κυττάρων του πτυέλου ήταν 89(59-

99)% και 89(63-98)% στην παρόξυνση και στην σταθερή κατάσταση, αντιστοίχως. Το ποσοστό των πλακωδών κυττάρων ήταν 0.2(0.04-1)% στην παρόξυνση και 1.3(0.1-4.7)% στην σταθερή κατάσταση. Δεν βρέθηκαν διαφορές μεταξύ παρόξυνσης και σταθερής κατάστασης στην ζωτικότητα των πτυέλων ή στην πρόσμιξη πλακωδών κυττάρων. Ο πίνακας 2 δείχνει τους πληθυσμούς φλεγμονωδών κυττάρων και στις δύο καταστάσεις. Τα ποσοστά των ουδετεροφίλων ήταν σημαντικά αυξημένα στην παρόξυνση ( $p < 0.002$ ), ενώ τα ποσοστά των μακροφάγων σημαντικά αυξημένα στην σταθερή κατάσταση ( $p < 0.003$ ). Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στα ποσοστά των ηωσινοφίλων, των λεμφοκυττάρων ή στον ολικό αριθμό των κυττάρων των πτυέλων.

Χαμηλότεροι λόγοι CD4/CD8+ κυττάρων ( $p = 0.03$ ) και CD8-INF $\gamma$ /CD8-IL4+ κυττάρων ( $p = 0.02$ ) βρέθηκαν στα πτύελα ασθενών στην παρόξυνση Χ.Α.Π. σε σχέση με την σταθερή κατάσταση (σχεδιαγράμματα 1 και 2).

Καμία διαφορά δεν παρατηρήθηκε στους πληθυσμούς φλεγμονωδών κυττάρων και στους υποπληθυσμούς των Τ-λεμφοκυττάρων μεταξύ των ασθενών με θετικές ή αρνητικές καλλιέργειες πτυέλων στην παρόξυνση.

## **ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

Παρόλο που φλεγμονώδεις διεργασίες ενοχοποιούνται για την παθογένεση της Χ.Α.Π., σχετικά λίγα είναι γνωστά για το ποιος είναι ο ρόλος της φλεγμονής στις παροξύνσεις της νόσου. Η συγκεκριμένη μελέτη εξέτασε αλλαγές στους υποπληθυσμούς των Τ-λεμφοκυττάρων σε ασθενείς με οξεία βαριά έξαρση Χ.Α.Π., σε σχέση με τη σταθερή κατάσταση. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι στην παρόξυνση οι ασθενείς με Χ.Α.Π. τείνουν να μειώνουν τους λόγους CD4/CD8 και CD8-INF $\gamma$ /CD8-IL4+ κυττάρων. Οι παραπάνω αλλαγές στους υποπληθυσμούς των Τ-λεμφοκυττάρων μπορεί να συνδέονται με τους μηχανισμούς της οξεία βαριάς παρόξυνσης της Χ.Α.Π.

Οι υποπληθυσμοί Τ-λεμφοκυττάρων στα πτύελα μελετήθηκαν με ανοσοκυτταροχημικές μεθόδους. Πριν την ανοσοκυτταροχημεία τα Τ-λεμφοκύτταρα διεγέρθηκαν με PMA και ionomykin. Παρόλο που μετά τη διαφοροποίηση τους σε Th1 και Th2 υποπληθυσμούς, τα λεμφοκύτταρα εμφανίζουν σταθερό μοντέλο παραγωγής κυτταροκινών και σπάνια, αν ποτέ, αλλάζουν σε άλλο φαινότυπο, αυτή η παρέμβαση μπορεί να έχει αλλοιώσει το 'προφίλ' παραγωγής κυτταροκινών (7). Εντούτοις οι διαφορές στους υποπληθυσμούς των Τ-λεμφοκυττάρων *in vitro* πρέπει να αντιστοιχούν στις *in vivo* διαφορές, αφού όλα τα δείγματα διεγέρθηκαν με τον ίδιο τρόπο .

Παλαιότερες έρευνες σε ασθενείς με Χ.Α.Π. έχουν δείξει αύξηση των CD8+ T-λεμφοκυττάρων και στενή συσχέτιση μεταξύ του αριθμού αυτών των κυττάρων και βαρύτητας της απόφραξης των αεραγωγών (2-5). Τα CD8+ κύτταρα είναι επίσης γνωστά ως κυτταροτοξικά κύτταρα, τα οποία δρουν μέσω της απελευθέρωσης των περφορινών, των granzymes και της Fas ligand οδού (24, 25). Ο ακριβής ρόλος τους στην παθοφυσιολογία της ΧΑΠ δεν είναι ακόμα βέβαιος. Ενδιαφέροντα στοιχεία δείχνουν ότι μπορεί να προκαλέσουν πνευμονική βλάβη μέσω του TNFα (26). Η Saaetta και συν. έχουν προτείνει την υπόθεση ότι η αύξηση των CD8+ T-λεμφοκυττάρων μπορεί να προκαλείται ως απάντηση σε επαναλαμβανόμενες ιογενείς λοιμώξεις σε ορισμένους καπνιστές (3, 4).

Τα αποτελέσματά μας έδειξαν παρόμοιους αριθμούς λεμφοκυττάρων τόσο σε παρόξυνση όσο και σε σταθερή κατάσταση, αλλά σημαντικά μειωμένο λόγο CD4/CD8+ κυττάρων κατά την έναρξη οξείας σοβαρής παρόξυνσης Χ.Α.Π. ( $p=0.03$ ) (σχ.1). Επομένως, η φλεγμονώδης απάντηση χαρακτηρίζεται από σχετική υπεροχή των CD8+ T-λεμφοκυττάρων κατά την παρόξυνση (18). Είναι γνωστό ότι τα CD8+ κύτταρα αυξάνουν κατά την διάρκεια των λοιμώξεων και οι ιικές και βακτηριακές λοιμώξεις είναι το συχνότερο αίτιο παρόξυνσης Χ.Α.Π. (19). Δεν είναι εύκολο να καθοριστούν τα αίτια που προκάλεσαν τις παροξύνσεις στους ασθενείς της μελέτης μας, εν μέρει γιατί ο βακτηριακός αποικισμός του αναπνευστικού επιθηλίου και οι ιογενείς λοιμώξεις είναι συχνές σε ασθενείς με Χ.Α.Π. ακόμα και σε σταθερή κατάσταση (27, 28). Στην παρούσα μελέτη 6 ασθενείς παρουσίαζαν πυώδη πτύελα κατά την έναρξη της παρόξυνσης και οι 5 από αυτούς τους 6 είχαν θετικές καλλιέργειες κατά την παρόξυνση, όχι όμως και κατά τη σταθερή κατάσταση (πιν .1). Διαφορά δεν παρατηρήθηκε όσον αφορά το λόγο CD4/CD8+ κυττάρων ανάμεσα σε ασθενείς με βακτηριακή θετική ή αρνητική παρόξυνση. Αυτό το αποτέλεσμα ήταν αναμενόμενο αφού οι ιογενείς λοιμώξεις μπορούν να προκαλέσουν την CD8+ λεμφοκυτταρική απάντηση σε βακτηριακή αρνητική παρόξυνση, προκαλώντας παρόμοια απάντηση μεταξύ βακτηριακής αρνητικής και θετικής παρόξυνσης.

Παρόλο που η κύρια διαφορά στο λόγο CD4/CD8+ κυττάρων ανάμεσα στην παρόξυνση και στην σταθερή κατάσταση ήταν στατιστικά σημαντική, 5 ασθενείς δεν εμφάνισαν αλλαγή είτε εμφάνισαν μικρή αύξηση στο λόγο CD4/CD8+ κυττάρων (σχ.1). Οι ασθενείς με Χ.Α.Π. και μείωση του λόγου CD4/CD8+ κυττάρων κατά την παρόξυνση μπορεί να αντιπροσωπεύουν έναν

ενδιαφέρον φαινότυπο ο οποίος να σχετίζεται με επιταχυνόμενη στένωση των αεραγωγών και χειροτέρευση της νόσου. Από την άλλη πλευρά, μερικοί ασθενείς μπορεί να μην αυξάνουν τον αριθμό των CD8+ κυττάρων κατά την παρόξυνση λόγω του ήδη μέγιστου αριθμού των CD8+ κυττάρων στην σταθερή κατάσταση ή γιατί το αίτιο της έξαρσης τους δεν είναι λοίμωξη της αναπνευστικής οδού. Οι παραπάνω υποθέσεις χρειάζονται περαιτέρω εξέταση, πριν βγουν οποιαδήποτε ασφαλή συμπεράσματα .

Προχωρήσαμε περαιτέρω στην αξιολόγηση της αύξησης των CD8+ λεμφοκυττάρων σε βαριές παροξύνσεις Χ.Α.Π. και βρήκαμε σημαντική μείωση στο λόγο CD8- $\text{INF}\gamma$ /CD8-IL4+ κυττάρων ( $p=0.02$ ) (σχ.2). Αφού τα Tc0 κύτταρα παράγουν  $\text{INF}\gamma$  καθώς και IL-4, μείωση στο λόγο CD8- $\text{INF}\gamma$ /CD8-IL4+ κυττάρων αντιστοιχεί σε μείωση στο λόγο Tc1/Tc2. Επομένως, η απάντηση των Tc2 κυττάρων ισχυροποιείται σε βαριές παροξύνσεις ΧΑΠ. Οι Saetta και συν. αναφέρουν υψηλούς αριθμούς Tc1 κυττάρων στους περιφερικούς αεραγωγούς ασθενών με σταθερή Χ.Α.Π. σε σύγκριση με <υγιείς> καπνιστές ή μη καπνιστές, ενώ η τύπου 1 αντίδραση είναι αυξημένη στο περιφερικό αίμα ασθενών με Χ.Α.Π. (8, 9). Η στροφή προς τον τύπο 2 αντίδρασης σε οξεία βαρεία παρόξυνση Χ.Α.Π. μπορεί να εμπλέκεται στις φλεγμονώδεις διεργασίες της έξαρσης. Τα Tc2 κύτταρα δεν παράγουν  $\text{INF}\gamma$  και η μειωμένη ικανότητα παραγωγής  $\text{INF}\gamma$  εμποδίζει την εξάλειψη των παθογόνων (29, 30). Εντούτοις, μειωμένη αντιική δράση των Tc2 in vivo μπορεί να μην οφείλεται πάντα σε μειωμένη συγκέντρωση  $\text{INF}\gamma$  αλλά σε μειωμένη έκφραση ή μειωμένη δραστηριότητα των μορίων προσκόλλησης (31). Επιπλέον, τα Tc2 κύτταρα παράγουν IL-4, η οποία καταστέλλει ορισμένα στάδια της κυτταρικής απάντησης απαραίτητα για την προστασία του ξενιστή (29, 30). Επομένως, μία αύξηση των Tc2 κυττάρων μπορεί να οδηγήσει στην εκδήλωση βαριάς φλεγμονής της αναπνευστικής οδού και συνεπώς σε βαριά παρόξυνση Χ.Α.Π.

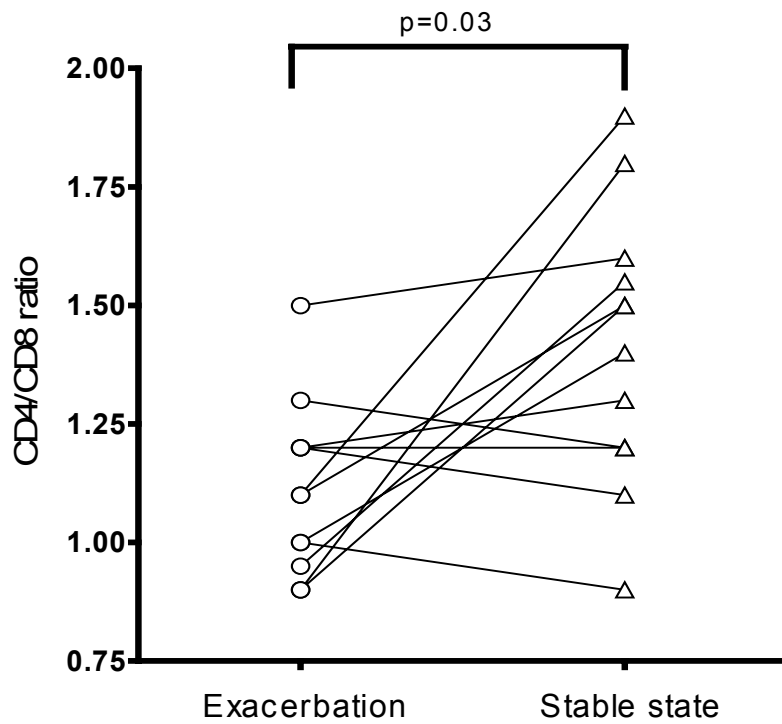
Παρόλο που η συνολική διαφορά ανάμεσα σε έξαρση και σταθερή κατάσταση ήταν στατιστικά σημαντική, 5 ασθενείς δεν παρουσίασαν αλλαγή στο λόγο CD8- $\text{INF}\gamma$ /CD8-IL4+ κυττάρων ανάμεσα στην παρόξυνση και στη σταθερή κατάσταση. Από αυτούς τους ασθενείς δύο δεν παρουσίασαν αλλαγή ούτε στο λόγο CD4/CD8+ κυττάρων. Προφανώς αλλαγές στους υποπληθυσμούς των T-λεμφοκυττάρων δεν συμβαίνουν σε όλους τους ασθενείς με Χ.Α.Π. σε παρόξυνση, το οποίο επίσης ενισχύει την υπόθεση της ύπαρξης περισσότερων από ένα φαινοτύπων σε οξεία παρόξυνση Χ.Α.Π. Θα

ήταν ενδιαφέρον να μελετήσουμε περαιτέρω τη φυσική πορεία της νόσου των ασθενών με διαφορετικούς φαινότυπους παρόξυνσης.

Αυξημένα ποσοστά ουδετερόφιλων στα πτύελα παρουσιάστηκαν κατά την έναρξη οξείας βαριάς παρόξυνσης. Τα ουδετερόφιλα μπορεί να εμπλέκονται στην παθολογία των εξάρσεων της Χ.Α.Π μέσα από την απελευθέρωση πρωτεολυτικών ενζύμων και ενεργών ριζών οξυγόνου (32). Είναι γνωστό ότι οι βακτηριακές φλεγμονές της αναπνευστικής οδού προκαλούν ουδετεροφιλικού τύπου φλεγμονή. Ομοίως, οι Aaron και συν. βρήκαν ότι ασθενείς με Χ.Α.Π παρουσιάζουν εκσεσημασμένη ουδετεροφιλία στα πτύελα κατά τη διάρκεια παροξύνσεων, ανεξαρτήτως από μια παρούσα ιογενούς ή βακτηριακής λοίμωξης των αεραγωγών (11). Σε αντίθεση, οι Sethi και συν. βρήκαν αυξημένη φλεγμονή στους αεραγωγούς ασθενών με παρόξυνση και λοίμωξη από H. Influenza και M. Cattarhalis σε σύγκριση με τους αρνητικούς για λοίμωξη ασθενείς ή με τους ασθενείς με λοίμωξη από H. Parainfluenza (15). Είναι πιθανόν ότι οι Aaron και συν. και εμείς δε βρήκαμε συσχέτιση ανάμεσα στη φλεγμονή των αεραγωγών και στις βακτηριακές θετικές παροξύνσεις λόγω του μικρού αριθμού ασθενών που συμπεριλήφθηκαν στις δύο μελέτες.

Ανακεφαλαιώνοντας, οι ασθενείς με Χ.Α.Π. κατά την έναρξη μιας βαριάς έξαρσης και ανεξάρτητα από το αίτιο που προκάλεσε την έξαρση εμφανίζουν στα πτύελα μειωμένους λόγους CD4/CD8 και CD8-INF $\gamma$ /CD8-IL-4+ κυττάρων. Τα αποτελέσματά αυτά δείχνουν σημαντικές αλλαγές στον τύπο φλεγμονής των πτυέλων στην βαριά παρόξυνση ΧΑΠ, που οδηγούν σε έναν περισσότερο ουδετεροφιλικό, CD8+ τύπου 2 λεμφοκυτταρικό φαινότυπο. Παρόλα αυτά νέες μελέτες είναι απαραίτητες πρώτου φαινότυποι της φλεγμονώδους απάντησης κατά τη διάρκεια των παροξύνσεων ΧΑΠ καθοριστούν επακριβώς.

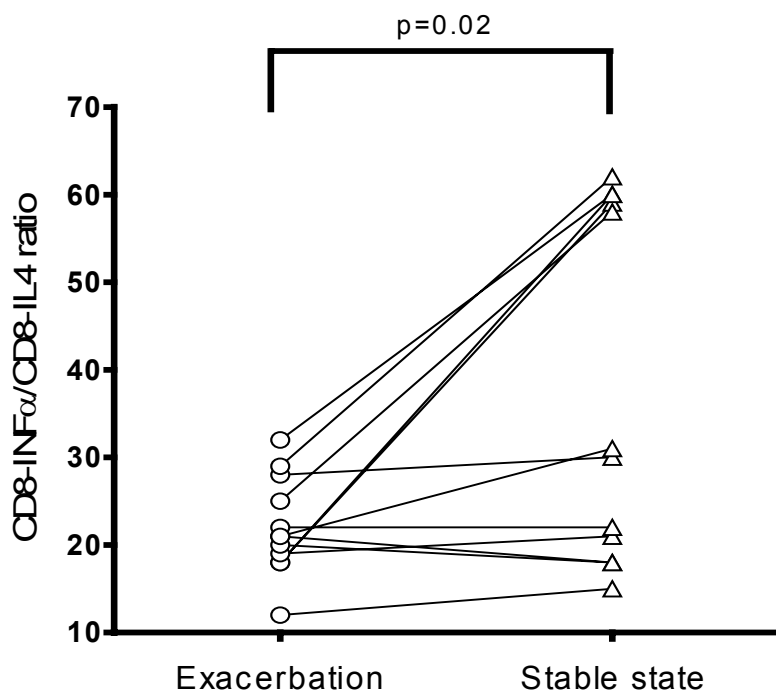
## Σχεδιάγραμμα Ι



Λόγοι CD4/CD8+ κυττάρων στα πτύελα των ίδιων ασθενών με παρόξυνση ΧΑΠ (exacerbation) και σε σταθερή κατάσταση (stable state).



## Σχεδιάγραμμα II



Λόγοι CD8-IFN $\gamma$ /CD8-IL4+ κυττάρων στα πτύελα των ίδιων ασθενών με παρόξυνση ΧΑΠ (exacerbation) και σε σταθερή κατάσταση (stable state).

**Πίνακας I-** Χαρακτηριστικά των ίδιων ασθενών σε παρόξυνση ΧΑΠ (Π-ΧΑΠ) και σε σταθερή κατάσταση (Σ-ΧΑΠ).

Άρρεν	11	
Θήλυ	1	
Ηλικία	69±7έτη	
Ιστορικό καπνίσματος	68±23 πακ-έτη	
	Σ-ΧΑΠ	Π-ΧΑΠ
FEV1(%pred)	40±14	†
FEV1/FVC (%pred)	53±11	†
ΔFEV1(%baseline)	4(-4,9)	†
PO <sub>2</sub>	72±11	51±7*
PCO <sub>2</sub>	39±5	53±8*
Πυώδη πτύελα	0/12	6/12
Θετικές πτυέλων καλιές	0/12	5/12
Βήχας	4/12	9/12
Δύσπνοια ηρεμίας	3/12	11/12

\*p<0.05

† Οι ασθενείς δεν κατάφεραν να εκτελέσουν αποδεκτή σπιρομέτρηση κατά την παρόξυνση.

**Πίνακας II-** Ολικός αριθμός μη πλακωδών κυττάρων (κυτ/γρ πτυέλων), ποσοστά ουδετεροφίλων, λεμφοκυττάρων, μακροφάγων και ηωσινοφίλων (%των μη πλακωδών κυττάρων) στους ίδιους ασθενείς σε παρόξυνση (Π) και σε σταθερή κατάσταση (Σ).

	Ουδετερόφιλα†		Λεμφοκύτταρα		Μακροφάγα†		Ηωσινόφιλα		Ολικός αριθμός κυττάρων	
	Π	Σ	Π	Σ	Π	Σ	Π	Σ	Π	Σ
1	99	99	0.5	0	0,5	1	0	0	30970000	41600000
2	99	81	0	1	1	18	0	0	68640000	7980000
3	90	51	1	2	8	42	1,5	0,5	36000000	23690000
4	99	85	0	1	1	14	0	0	14833000	22713600
5	98	79	1	1	1	19	0	1	55467000	11240000
6	93	69	1	2	6	29	0	0	28202666	64625000
7	100	99	0	0	0	0	0	1	64800000	6120000
8	98	91	1	0	1	9	0	0	39900000	9891000
9	95	89	0	0	5	9	0	2	100000000	77070000
10	99	82	0.1	1	0,9	13	0	4	5700000	20160000
11	97	82	2	2	1	15	0	1	44000000	29000000
12	93	85	1	2	5	13	0,1	0	35000000	32000000

† = p<0.05

## Αναφορές

1. Pauwels RA, Buist AS, Calverley PM, et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI/WHO Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) Workshop summary. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163(5):1256-76.
2. O'Shaughnessy TC, Ansari TW, Barnes NC, et al. Inflammation in bronchial biopsies of subjects with chronic bronchitis: inverse relationship of CD8+ T lymphocytes with FEV1. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155(3):852-7.
3. Saetta M, Di Stefano A, Turato G, et al. CD8+ T-lymphocytes in peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157(3 Pt 1):822-6.
4. Saetta M, Baraldo S, Corbino L, et al. CD8+ve cells in the lungs of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160(2):711-7.
5. Tzanakis N, Chrysofakis G, Tsoumakidou M, et al. Induced sputum CD8+T lymphocytes subpopulations in COPD. In press in *Respiratory Medicine*;
6. Kemeny DM, Vyas B, Vukmanovic-Stejic M, et al. CD8(+) T cell subsets and chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160(5 Pt 2):S33-7.
7. Vukmanovic-Stejic M, Vyas B, Gorak-Stolinska P, et al. Human Tc1 and Tc2/Tc0 CD8 T-cell clones display distinct cell surface and functional phenotypes. *Blood* 2000;95(1):231-40.
8. Saetta M, Mariani M, Panina-Bordignon P, et al. Increased Expression of the Chemokine Receptor CXCR3 and Its Ligand CXCL10 in Peripheral Airways of Smokers with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165(10):1404-9.
9. Majori M, Corradi M, Caminati A, et al. Predominant TH1 cytokine pattern in peripheral blood from subjects with chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol* 1999;103(3 Pt 1):458-62.
10. Piattella M, Maestrelli P, Saetta M. Sputum eosinophilia during mild exacerbations and sputum neutrophilia during severe exacerbations of COPD. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153(Suppl):A822

11. Aaron SD, Angel JB, Lunau M, et al. Granulocyte inflammatory markers and airway infection during acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163(2):349-55.
12. Bhowmik A, Seemungal TA, Sapsford RJ, et al. Relation of sputum inflammatory markers to symptoms and lung function changes in COPD exacerbations. *Thorax* 2000;55(2):114-20.
13. Saetta M, Di Stefano A, Maestrelli P, et al. Airway eosinophilia and expression of interleukin-5 protein in asthma and in exacerbations of chronic bronchitis. *Clin Exp Allergy* 1996;26(7):766-74.
14. Saetta M, Di Stefano A, Maestrelli P, et al. Airway eosinophilia in chronic bronchitis during exacerbations. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;150(6 Pt 1):1646-52.
15. Sethi S, Muscarella K, Evans N, et al. Airway inflammation and etiology of acute exacerbations of chronic bronchitis. *Chest* 2000;118(6):1557-65.
16. Zhu J, Qiu YS, Majumdar S, et al. Exacerbations of Bronchitis: bronchial eosinophilia and gene expression for interleukin-4, interleukin-5, and eosinophil chemoattractants. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164(1):109-16.
17. Pizzichini E, Pizzichini MM, Leigh R, et al. Safety of sputum induction. *Eur Respir J Suppl* 2002;37:9s-18s.
18. Voelkel NF, Tuder R. COPD: exacerbation. *Chest* 2000;117(5 Suppl 2):376S-9S.
19. Seemungal TA, Donaldson GC, Paul EA, et al. Effect of exacerbation on quality of life in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157(5 Pt 1):1418-22.
20. Pin I, Gibson PG, Kolendowicz R, et al. Use of induced sputum cell counts to investigate airway inflammation in asthma. *Thorax* 1992;47(1):25-9.
21. 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(3):205-10.
22. Tsoumakidou M, Tzanakis N, Siafakas NM. Induced sputum in the investigation of airway inflammation of COPD. *Respir Med* 2003;97(8):863-71.
23. Kyriakoy D, Karkavitsas N, Eliopoulos G, et al. Immunohistochemical analysis of the ras p21 oncoprotein in Hashimoto's thyroiditis. *Anticancer Res* 1992;12(4):1189-94.

24. Chrysofakis G, Tzanakis N, Kyriakou D, et al. Perforin expression and cytotoxic activity of sputum CD8<sup>+</sup> lymphocytes in patients with COPD. In press in Chest;
25. Berke G. The binding and lysis of target cells by cytotoxic lymphocytes: molecular and cellular aspects. *Annu Rev Immunol* 1994;12:735-73
26. Liu AN, Mohammed AZ, Rice WR, et al. Perforin-independent CD8(+) T-cell-mediated cytotoxicity of alveolar epithelial cells is preferentially mediated by tumor necrosis factor- alpha: relative insensitivity to Fas ligand. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999;20(5):849-58.
27. Retamales I, Elliott WM, Meshi B, et al. Amplification of inflammation in emphysema and its association with latent adenoviral infection. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164(3):469-73.
28. Sethi S, Murphy TF. Bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease in 2000: a state-of-the-art review. *Clin Microbiol Rev* 2001;14(2):336-63.
29. Kemeny DM, Noble A, Holmes BJ, et al. Immune regulation: a new role for the CD8<sup>+</sup> T cell. *Immunol Today* 1994;15(3):107-10.
30. Seder RA, Le Gros GG. The functional role of CD8<sup>+</sup> T helper type 2 cells. *J Exp Med* 1995;181(1):5-7.
31. Wirth S, van den Broek M, Frossard CP, et al. CD8(+) T cells secreting type 2 lymphokines are defective in protection against viral infection. *Cell Immunol* 2000;202(1):13-22.
32. Stockley RA. Neutrophils and the pathogenesis of COPD. *Chest* 2002;121(5 Suppl):151S-155S.

**ΤΕΛΙΚΑ**

**ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**





Η Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια (Χ.Α.Π.) και το άσθμα είναι αποφρακτικά νοσήματα του πνεύμονα, με αρκετές ομοιότητες αλλά και σημαντικές διαφορές σε επίπεδο φυσιολογίας, παθοφυσιολογίας και παθολογικής ανατομίας. Αν και πολλές συζητήσεις έχουν γίνει μέχρι σήμερα, παραμένει για αρκετούς επιστήμονες ακόμα ανοικτό το ερώτημα εάν το άσθμα και η Χ.Α.Π. είναι διαφορετικές παθήσεις. Βέβαια, η άποψη της πλειοψηφίας των ειδικών στα αποφρακτικά νοσήματα του πνεύμονα είναι ότι εφόσον διαφορετικά γεννεσιουργά αίτια, μέσα από διαφορετικούς μηχανισμούς παθογένεσης, δημιουργούν διαφορετικού τύπου απόφραξη στους αεραγωγούς ασθενών με άσθμα ή Χ.Α.Π., δεν πρόκειται για την ίδια πάθηση. Μπορεί η απόφραξη της ροής των αεραγωγών να μην είναι το μόνο κοινό στοιχείο μεταξύ άσθματος και Χ.Α.Π., ωστόσο φαίνεται πράγματι ότι πρόκειται για δύο διαφορετικές παθήσεις.

Στην παρούσα διδακτορική μελέτη έγινε σύγκριση του τύπου της φλεγμονής που αναπτύσσεται στους αεραγωγούς ασθενών με βαρύ άσθμα ή Χ.Α.Π. χρησιμοποιώντας δείγματα προκλητών πτυέλων. Το βαρύ άσθμα είναι μια ιδιαίτερη νοσολογική οντότητα που παρουσιάζεται συχνά με μη αναστρέψιμη απόφραξη της ροής των αεραγωγών. Επειδή η μη αναστρέψιμη απόφραξη είναι ο ακρογωνιαίος λίθος στη διάγνωση της Χ.Α.Π. είναι εμφανές το έντονο διαφοροδιαγνωστικό πρόβλημα.

Η ανάλυση των δειγμάτων προκλητών πτυέλων έδειξε πολλές διαφορές σε πληθυσμούς φλεγμονωδών κυττάρων και σε υποπληθυσμούς T λεμφοκυττάρων. Η σημαντικότητα αυτών των αποτελεσμάτων έγκειται σε δύο σημεία:

Πρώτον, ενισχύουν την άποψη ότι το άσθμα και η Χ.Α.Π. είναι διαφορετικές παθήσεις, και

Δεύτερον, υποδεικνύουν την πιθανή κλινική εφαρμογή της ανάλυσης πτυέλων στην διαφορική διάγνωση μεταξύ βαρέως άσθματος και Χ.Α.Π. Αυτή η προοπτική ενισχύεται και από το γεγονός ότι η πρόκληση παραγωγής πτυέλων είναι μια σχετικά ασφαλής, μη επεμβατική, καλά ανεκτή μέθοδος.

Πολλές μελέτες έχουν από καιρό φέρει στο φως την κεντρική σημασία της φλεγμονής των αεραγωγών στις αποφρακτικές παθήσεις, ωστόσο η διαγνωστική προσέγγιση και παρακολούθηση ασθενών με Χ.Α.Π. ή άσθμα στηρίζεται κυρίως σε μετρήσεις της φυσιολογικής λειτουργίας του πνεύμονα. Επίσης, έχει δειχθεί πτωχή συσχέτιση μεταξύ της βαρύτητας των συμπτωμάτων, της ανταπόκρισης στην θεραπευτική αγωγή και των δεικτών

της πνευμονικής λειτουργίας. Αυτές οι παρατηρήσεις σε συνδυασμό με τα νεότερα δεδομένα για τον σημαντικό ρόλο της φλεγμονής στην δημιουργία της απόφραξης κρίνουν αναγκαία την εισαγωγή στην κλινική προσέγγιση ασθενών με Χ.Α.Π. ή με άσθμα μιας μη επεμβατικής μεθόδου εκτίμησης της φλεγμονής των αεραγωγών και η παρούσα διδακτορική διατριβή παρουσιάζει ισχυρές ενδείξεις ότι η τεχνητή πρόκληση παραγωγής πτυέλων μπορεί να εφαρμοστεί μελλοντικά στην διαγνωστική προσέγγιση των αποφρακτικών νοσημάτων του πνεύμονα.

# **ΕΝΟΤΗΤΑ ΙΙΙ**

**Ανακοινώσεις σε Διεθνή**

**Συνέδρια και**

**Δημοσιευμένη Εργασία**



# EUROPEAN RESPIRATORY JOURNAL

OFFICIAL  
JOURNAL OF  
THE EUROPEAN  
RESPIRATORY  
SOCIETY

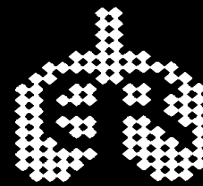
On-line  
[www.ersnet.org](http://www.ersnet.org)

## Abstracts

12th ERS Annual Congress  
Stockholm, Sweden, September 14–18, 2002

On-line submissions: <http://erj.manuscriptcentral.com>

VOLUME 20 • SUPPLEMENT 38  
SEPTEMBER 2002



P3156

### Possible involvement of CD8+ cells and their subpopulations in COPD exacerbations

Maria Tsoumakidou<sup>1</sup>, George Chrysafakis<sup>1</sup>, Nikos Tzanakis<sup>1</sup>,  
Evangelia Papadopoulou<sup>1</sup>, Despoina Kyriakou<sup>2</sup>, Nikos M. Siafakas<sup>1, 2</sup> *Department  
of Thoracic Medicine, University General Hospital, Heraklion, Greece;*  
*<sup>2</sup>Department of Haematology, University General Hospital, Larissa, Greece*

COPD characterized by an ongoing airway inflammation as a response of inhalation of smoking and other noxious agents. Although many studies have investigated the type of inflammation on the steady state of the disease, about the findings of the type of airway inflammation during the COPD exacerbation are few and controversial.

**Aim:** The aim of this study was to investigate the possible involvement of CD8+ cells and their subpopulations in COPD exacerbation.

**Methods:** A group of 10 COPD patients (68±23 pack/years), aged 69±7 years, FEV1 40±14% pred, non-atopics participated in the study. Exacerbation was defined by the criteria ERS statement (*Eur Respir J* 1995;8:1398-1420). The subpopulation of CD4+ cells (Th1, and Th2), and CD8+ cells (Tc1 and Tc2) counts in spontaneous sputum on exacerbation and in induced sputum during remission using immunocytochemistry (trousse de dosage immunoenzymatique enzyme immunoassay kit for IL-8 and GM-CSF from Immunotech) were performed.

**Results:** Statistical significant differences between exacerbation and steady state were found in the ratio CD4/CD8,  $p < 0.04$ , median (range) 1.05 (0.9-1.5) vs 1.45 (0.9-1.9), as well as in the ratio Tc1/Tc2,  $p < 0.02$ , median (range) 21.5 (12-32) vs. 44 (15-62).

**Conclusion:** We conclude that an imbalance of T-lymphocytes CD4/CD8 ratio and the CD8+ cells subpopulation was detected during COPD exacerbation in comparison to steady state disease.



AMERICAN JOURNAL OF

# Respiratory and Critical Care Medicine

Volume 165 • Number 8 • April 2002

## Abstracts

### 2002 INTERNATIONAL CONFERENCE

MAY 1-7, 2002, ATLANTA, GEORGIA  
AMERICAN THORACIC SOCIETY

For more information, visit <http://www.atsjournals.org> or <http://www.atsjournals.com>

AN OFFICIAL JOURNAL OF THE AMERICAN THORACIC SOCIETY

#### THE ROLE OF CD8+ SUBPOPULATIONS IN COPD EXACERBATIONS.

M. Tsoumakidou, G. Chrysofakis, N. Tzanakis, D. Kyriakou, E. Papadopoulou, G. Maltezakis, N.M. Siafakas.  
Department of Pneumology, Medical School, University of Crete, Greece

COPD is an inflammatory disease of the airway and lung parenchyma. Although many studies investigate the type of inflammation on stable condition, little is known about the type of airway inflammation during exacerbation. **The aim** of our study was to investigate the role of CD8+ cells and their subpopulations in the pathogenesis of COPD exacerbation. **Methods.** We studied a group of 9 COPD patients (68 pack yrs) mean age 68 yrs, on exacerbation and a group of 10 stable COPD patients (61 pack yrs) mean age 71 yrs. We performed a count of Th1, Th2, Tc1 and Tc2 cells in induced sputum using immunocytochemistry. **Results.** We found statistical significant difference in the total lymphocyte count between patients on exacerbation and stable condition ( $x \pm SD$ ),  $[(0.5 \pm 0.4 \text{ vs. } 1.64 \pm 1.63)]$ ,  $p < 0.05$ . We found no significant difference in the subpopulation of T-suppressors cells between the two groups. **Conclusion.** Our results showed that the CD8+ subpopulation did not differ between stable COPD and exacerbation.

#### COMPARISON OF CD8+ SUBPOPULATIONS BETWEEN SEVERE ASTHMATICS AND COPD PATIENTS WITH THE SAME LEVEL OF AIRWAY OBSTRUCTION.

M. Tsoumakidou, N. Tzanakis, D. Kyriakou, E. Papadopoulou, G. Chrysofakis, G. Maltezakis, N.M. Siafakas.  
Department of Pneumology, Medical School, University of Crete, Greece.

It is well known that asthma and COPD are two different obstructive lung diseases caused by different types of lung inflammation. On the contrary little is known about the role of CD8+ cells, which are implicated in COPD pathogenesis, on the airways of severe asthmatics. **The aim** of our study was to investigate the possible involvement of CD8+ cells and their subpopulations in severe asthma pathogenesis. **Methods.** We studied a group of 10 severe asthmatic patients mean age 56 yrs, mean FEV<sub>1</sub> 51% (% pred.), and compare them with a group of 11 COPD patients (61 pack/years) mean age 71 yrs, mean FEV<sub>1</sub> 44 (% pred.), with irreversible airway obstruction. We performed a count of Th1, Th2, Tc1 and Tc2 cells in induced sputum using immunocytochemistry. **Results.** Statistical significant differences were found in CD4/CD8 ratio between severe asthmatics and COPD patients ( $X \pm SD$ ),  $[(4.4 \pm 0.7 \text{ vs. } 1.2 \pm 0.3)]$ ,  $p < 0.001$ , in Th1/Th2 ratio  $[(20 \pm 75) \text{ vs. } (60 \pm 12)]$ ,  $p < 0.001$  and in Tc1/Tc2 ratio  $[(40 \pm 8 \text{ vs. } 29 \pm 8.6)]$ ,  $p < 0.02$ . **Conclusion.** Our findings showed that airway inflammation in severe asthma and COPD is different, as far as CD8+ subpopulations are concerned.

This abstract is funded by

## Inflammatory cell profiles and T lymphocyte subsets in chronic obstructive pulmonary disease and severe persistent asthma

M. Tsoumakidou, N. Tzanakis, D. Kyriakou, G. Chrysofakis and N. M. Siafakas

Department of Thoracic Medicine, University of Crete, Medical School, Greece

### Summary

**Background** Severe persistent asthma (SPA) and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) are both associated with non-reversible airflow limitation and airway neutrophilia.

**Objective** To compare inflammatory cell profiles and T lymphocyte subsets between SPA and COPD patients with similar severity of airflow limitation.

**Methods** Sputum induction and lung function tests were performed in 15 COPD patients aged (mean  $\pm$  SD)  $68 \pm 8$  years, ex-smokers, mean forced expiratory volume in 1 s (FEV<sub>1</sub>) 45% of predicted (%pred) and 13 SPA aged  $55 \pm 10$  years, non-smokers, mean FEV<sub>1</sub> 49%pred. All patients were on inhaled steroid treatment. Eight asthmatics exhibited irreversible airflow limitation. Differential cell count, metachromatic cell count and double immunocytochemistry for the analysis of T lymphocyte subsets were performed on sputum slides.

**Results** COPD patients had increased sputum neutrophils in comparison with SPA ( $P < 0.03$ ), but similar to SPA with fixed obstruction. In COPD sputum, neutrophils negatively correlated with the transfer factor for carbon monoxide ( $K_{CO}$ ) ( $r = -0.462$ ,  $P = 0.04$ ). SPA showed significantly increased eosinophils and metachromatic cells vs. COPD patients ( $P < 0.04$ ,  $P < 0.007$ , respectively). Increased CD4/CD8 and decreased CD4-IFN- $\gamma$ /CD4-IL4<sup>+</sup> cell ratio ( $P < 0.001$ ) were found in SPA vs. COPD. In SPA, CD4/CD8<sup>+</sup> cell ratio correlated with sputum eosinophils ( $r = 0.567$ ,  $P = 0.04$ ).

**Conclusion** In spite of treatment with inhaled steroids, SPA and COPD exhibit distinct sputum inflammatory cell patterns, although SPA with fixed airflow limitation and COPD patients have similar numbers of neutrophils.

**Keywords** CD4, CD8, COPD, lymphocytes, severe asthma, sputum, Tc1, Tc2, Th1, Th2

Submitted 27 February 2003; revised 19 September 2003; accepted 15 October 2003

### Introduction

Asthma and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) are the two most common pulmonary diseases, with continuously increasing morbidity, mortality and prevalence rates [1, 2]. Although considerable progress has been made in understanding the underlying pathology of both diseases, the complex interactions between inflammatory cells and mediators involved in each disease are not fully understood.

COPD is characterized by airflow limitation that is not fully reversible. The airflow limitation is usually progressive and associated with an abnormal inflammatory response of the lungs to noxious particles or gases [1]. Similar cell profiles have been found in the various pulmonary compartments, but the bronchioles and parenchyma are primarily affected [3, 4]. In the airway lumen, there is evidence of neutrophilic inflammation, while in the mucosa there is predominance of macrophages and CD8<sup>+</sup> lymphocytes [5-7]. CD8<sup>+</sup> lympho-

cytes may produce IFN- $\gamma$  (Tc1), IL4 (Tc2) or both (Tc0) [8]. Recent evidence suggests that CD8<sup>+</sup> lymphocytes of type 1 (Tc1) are implicated in COPD [9].

Asthma is also an inflammatory disorder of the airways, associated with increased airway hyper-responsiveness that leads to recurrent episodes of wheezing, breathlessness, chest tightness and coughing [2]. These episodes are associated with variable airway obstruction that is generally reversible. However, a subgroup of asthmatics, defined as severe persistent asthmatics (SPA) in the classification of the Global Initiative for Asthma (GINA) [2], often exhibit irreversible obstruction, with a concurrent steep rate of decline in forced expiratory volume in 1 s (FEV<sub>1</sub>) [10]. In contrast to COPD, inflammation in asthma affects mainly the proximal airways [4]. Eosinophils and mast cells are increased, while lymphocytes of the CD4<sup>+</sup> rather than the CD8<sup>+</sup> subset orchestrate the inflammatory process by the local release of regulatory cytokines [11]. CD4<sup>+</sup> lymphocytes are further phenotyped according to their levels of production of IFN- $\gamma$  (Th1), IL4 (Th2) or both (Th0) [8]. Evidence suggests that Th2 cells lead the asthmatic disorder [12].

Although different inflammatory mechanisms are involved in asthma and in COPD, some patients share features of both

Correspondence: N. M. Siafakas, Department of Thoracic Medicine, University of Crete, Medical School, PO Box 1352, 71110 Heraklion, Crete, Greece.

E-mail: siafak@med.uoc.gr

diseases [13]. High numbers of sputum eosinophils have been reported in COPD patients with partial reversibility of airflow limitation or with steroid response [14, 15] and increased mastocytes have been found in bronchial biopsies of COPD patients [16]. On the other hand, SPA has high concentrations of neutrophils in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and sputum [17, 18] and patients with non-infectious status asthmaticus exhibit prominent neutrophilia [19].

These findings indicate that SPA is a distinct disease state resembling COPD functionally (increased prevalence of irreversible airflow limitation) and pathologically (increased neutrophil numbers). The aim of this study was to compare airway inflammation between SPA and COPD patients with a similar severity of airway obstruction. We especially focused on T lymphocytes and its subsets because the asthmatic inflammation is driven by the Th2 subset of CD4<sup>+</sup> cells, while the Tc1 subset of CD8<sup>+</sup> cells is implicated in the pathogenesis of COPD. Our results showed significant differences in sputum T cell subsets between patients with SPA and COPD.

## Materials and methods

### Subjects

Thirteen patients with SPA, non-smokers and 15 with COPD, ex-smokers, were recruited from the pulmonary outpatient department of the University Hospital of Heraklion.

The diagnosis of COPD was made according to the European Respiratory Society criteria [20]. All COPD patients had irreversible airflow limitation as defined by  $\Delta FEV_1 < 15\%$  of predicted (%pred) baseline FEV<sub>1</sub> after inhalation of 400 mcg salbutamol. All had negative skin prick reaction and RAST and normal IgE count.

The diagnosis of SPA was made according to the GINA classification [2]. All asthmatics were atopic. Eight exhibited irreversible airflow limitation.

All studied patients were treated with inhaled steroids (>800 mg/day fluticasone or >1200 mg/day budesonide) and long-acting  $\beta_2$ -agonists. No subject was receiving other drugs or suffered from another pulmonary or systemic disease. No subject had a respiratory infection at least 6 weeks preceding the study.

The Hospital Ethical Committee approved the protocol and subjects gave their consent.

### Study design

Day 1: medical history, skin prick tests, spirometry and the single breath method for measurement of the transfer factor for carbon monoxide ( $K_{CO}$ ) were performed (MasterLab, Jaeger 2.127, Wuerzburg, Germany) [21]. Day 2: total serum IgE count, RASTs and sputum induction.

### Sputum induction and processing

Sputum was induced and processed based on the method of Pin et al. [22] as previously described [23]. Lymphocytes were stimulated by incubating the cell suspension in 24-well plates at a concentration of  $2 \times 10^6$  cells/mL for 5 h, under 5% CO<sub>2</sub>, at 37°C, in RPMI 1640 at 10% FCS in the presence of phorbol 12-myristate 13-acetate 25 ng/mL (PMA), ionomycin

1  $\mu$ mol/L and brebeldin A 10  $\mu$ g/mL (Sigma). Cytospins were made using cytocentrifugation of 50  $\mu$ L of a 3500 cells/ $\mu$ L cell suspension and were stored at -80°C for immunocytochemical analysis later. Approximately 175000 cells were cytospined on each slide, among which there was a mean of 1500 T lymphocytes per slide to stain.

Two slides were stained with May-Grünwald-Giemsa for differential cell count and two others with toluidine-blue for metachromatic cell count. The results from the two slides were averaged.

### Immunocytochemical analysis

After defrosting, the cytopins were fixed in acetone and rehydrated in TBS. The double immunocytochemical method was performed as previously described [24]. Two investigators examined the slides under double visual and ultraviolet microscope and their results were averaged. The visual filter was used to differentiate cells by morphology and the UV filter to count fluorescent lymphocytes in the same optical field. Three replicate measurements were performed by each observer in 10 slides. Both intra- and inter-observer coefficient of variation were <15%. The results were expressed as CD4/CD8, CD4-IFN- $\gamma$ /CD4-IL4 and CD8-IFN- $\gamma$ /CD8-IL4<sup>+</sup> cell ratio. For the estimation of each ratio 500 T cells were counted, with more than one cytospin stained if necessary, because this number was sufficient to obtain a mean value per subject that remained constant after further increasing the number of cells counted.

**Measurement of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells** The primary anti-CD4 mouse anti-human monoclonal antibody (Caltag?, Burlingame, CA, USA) with secondary rabbit anti-mouse IgG-fluorescein isothiocyanate (FITC) antibody (Immunotech?, Marseille, France) and the primary anti-CD8 mouse anti-human monoclonal antibody (Caltag) with secondary rabbit anti-mouse IgG-phycoerythrin (IgG-PE)-conjugated antibody (Marseille) were used. Five hundred CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells were counted for each patient to estimate CD4/CD8 ratio.

**Measurement of CD8<sup>+</sup>-IFN- $\gamma$ -producing, CD8<sup>+</sup>-IL4-producing, CD4<sup>+</sup>-IFN- $\gamma$ -producing and CD4<sup>+</sup>-IL4-producing T cells** The primary anti-CD8 mouse anti-human monoclonal antibody with secondary rabbit anti-mouse IgG-FITC antibody and the primary anti-IFN- $\gamma$  mouse anti-human monoclonal antibody (Caltag) with secondary rabbit anti-mouse IgG-PE-conjugated antibody were used to detect CD8<sup>+</sup>-IFN- $\gamma$ -producing T cells. Five hundred CD8<sup>+</sup> cells were counted for each patient to estimate the number of CD8-IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> cells. The same method was applied for staining CD8<sup>+</sup> cells with anti-IL4 antibody (Immunotech) and CD4<sup>+</sup> cells with anti-IFN- $\gamma$  or anti-IL4 antibody.

Negative controls were obtained by the use of mouse-anti-mouse Ig to estimate the non-specific binding. Positive controls were obtained by the use of T lymphoma cells cytospined on slides.

### Statistical analysis

The differences among three groups were tested using the Kruskal-Wallis test for non-normally and the ANOVA test for



normally distributed variables. The differences between two groups were tested using the Mann Whitney test for non-normally and the *t*-test for normally distributed variables. Correlations were analysed using the Spearman's-Rho correlation coefficient. The software StatsDirect (Camcode?, Cambridge, UK) was used. A  $P < 0.05$  was considered significant.

## Results

### Subjects

Patient characteristics and the mean lung function data are shown in Table 1. Subjects in the two groups had similar age and treatment regimes. All patients showed airflow limitation, as indicated by low FEV<sub>1</sub> and FEV<sub>1</sub>/FVC (forced vital capacity) ratio. Baseline FEV<sub>1</sub> (%pred) was comparable between the two groups ( $P = 0.2$ ). Asthmatics could be further divided into two subgroups according to the reversibility of their airway obstruction (reversible -  $\Delta$ FEV<sub>1</sub> = 15%, irreversible -  $\Delta$ FEV<sub>1</sub> < 15%). The lung transfer factor for CO corrected for alveolar ventilation (TL<sub>CO</sub>/VA) was significantly higher in asthma (within normal limits), than in COPD ( $P < 0.04$ ).

An adequate sputum sample was obtained from all subjects. The sputum induction procedure was well tolerated by all COPD subjects, while four SPA reported mild troublesome symptoms (31%) and in one the FEV<sub>1</sub> value fell more than 20% of baseline predicted. In these patients the procedure was terminated. All subjects responded well to bronchodilator treatment. There were no exacerbations after the induction in either group.

### Inflammatory indices

Data are expressed as mean  $\pm$  SD for normally distributed variables and median(range) for non-normally distributed variables. The viability of cells recovered by sputum induction

was  $79 \pm 15\%$  and  $83 \pm 16\%$  in the asthmatic and COPD group, respectively. The percentage of squamous epithelial cells on differential counting was  $7.5 \pm 7\%$  in asthma and  $4.6 \pm 5.5\%$  in COPD. No significant difference between asthmatics and COPD patients was observed in the total cell count [median(range) 8 190 000(331 200, 33 982 600) vs. 1 872 000(656 500, 65 320 000) cells/g sputum], percentages of macrophages [median(range) 39(1, 59)% vs. 27(10, 41)% non-squamous cells] or lymphocytes [median(range) 3(0.4, 5)% vs. 1(0.4, 6)% non-squamous cells]. Neutrophil percentages were significantly higher in the COPD group than in the asthma group ( $P < 0.03$ ) (Fig. 1). However, the neutrophil percentages did not differ between the subgroup of eight asthmatic patients with irreversible obstruction and COPD patients. Eosinophil percentages were significantly higher in the overall asthma group and in the subgroup of asthmatics with irreversible obstruction than in the COPD group ( $P < 0.04$  and  $P = 0.05$ , respectively) (Fig. 1). Sputum eosinophilia, as defined by sputum eosinophils = 3% of non-squamous cells, was found in eight asthmatics, irreversible and reversible.

Metachromatic cells were significantly higher in asthmatics than in COPD patients ( $P < 0.007$ ). When only irreversible asthmatics were compared with COPD patients, the difference between the two groups became marginally significant ( $P = 0.05$ ).

Figure 2 shows sputum CD4/CD8<sup>+</sup> cell ratios. Asthmatics showed a higher CD4/CD8<sup>+</sup> cell ratio than COPD. In Fig. 3, sputum CD4-IFN- $\gamma$ /CD4-IL4<sup>+</sup> and CD8-IFN- $\gamma$ /CD8-IL4<sup>+</sup> cell ratios are shown. Asthmatics showed a lower CD4-IFN- $\gamma$ /CD4-IL4<sup>+</sup> cell ratio. The two groups did not differ as far as the CD8-IFN- $\gamma$ /CD8-IL4<sup>+</sup> cell ratio was concerned. When only asthmatics with irreversible airway obstruction were compared with COPD, similar statistical differences were observed in sputum CD4/CD8<sup>+</sup> cell ratio and CD4-IFN- $\gamma$ /CD4-IL4<sup>+</sup> cell ratio ( $P < 0.01$  and  $P < 0.001$ , respectively).

In COPD sputum neutrophils showed a negative correlation to K<sub>CO</sub> ( $r = -0.462$ ,  $P = 0.04$ ) and in the asthmatic group CD4/CD8<sup>+</sup> cell ratio positively correlated to sputum eosinophils ( $r = 0.567$ ,  $P = 0.04$ ).

Table 1. Patient characteristics and lung function data

	SPA Total (irreversible)*	COPD	<i>P</i>
Number	13 (8)	15	
Age (years)	55 $\pm$ 10 (57 $\pm$ 12)	68 $\pm$ 8	
Sex	3M/10F (2M/8F)	15M/0F	+
Atopy	13/13 (8/8)	0/15	+
Smoking (p/year)	0 $\pm$ 0 (0 $\pm$ 0)	65 $\pm$ 26	+
Duration of disease (years)	20 $\pm$ 7 (21 $\pm$ 8)	15 $\pm$ 9	
FEV <sub>1</sub> /FVC (%pred)	58 $\pm$ 12 (4 $\pm$ 10)	53 $\pm$ 10	
FEV <sub>1</sub> (%pred)	49 $\pm$ 10 (47 $\pm$ 8)	45 $\pm$ 7	
$\Delta$ FEV <sub>1</sub> (%)	13 $\pm$ 10 (6 $\pm$ 4)	3 $\pm$ 3	+
TL <sub>CO</sub> /VA (K <sub>CO</sub> ) (%pred)	103 $\pm$ 10 (107 $\pm$ 13)	76 $\pm$ 10	+

Data are expressed as mean  $\pm$  SD;  $\Delta$ FEV<sub>1</sub> is change in FEV<sub>1</sub> (%pred baseline) after inhalation of 400 mcg salbutamol. SPA, severe persistent asthma; COPD, chronic obstructive pulmonary disease; FEV<sub>1</sub>, forced expiratory volume in 1 s; FVC, forced vital capacity; TL<sub>CO</sub>/VA, lung transfer factor for CO/alveolar ventilation; M, male; F, female; %pred, % of predicted. \*Subgroup of SPA with irreversible airflow limitation ( $\Delta$ FEV<sub>1</sub> < 15%). + $P < 0.05$ .

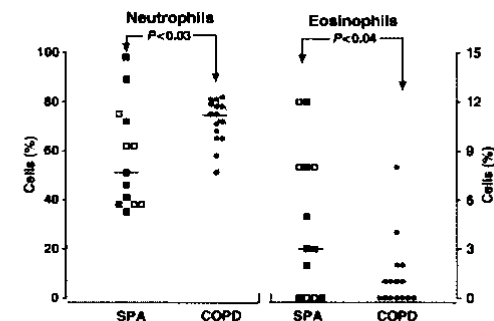


Fig. 1. Sputum neutrophilic and eosinophilic percentages (% of total non-squamous cell count) in severe persistent asthma (SPA) patients (with reversible (□) or with irreversible airway obstruction (■)) and in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) (•).

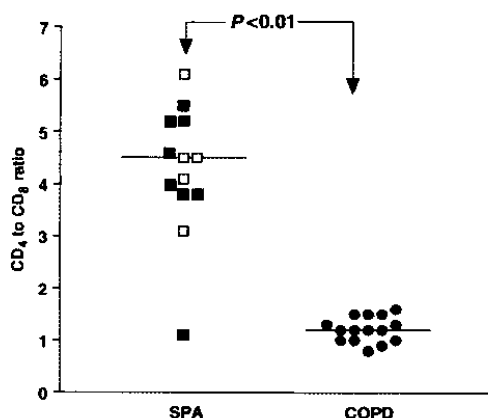


Fig. 2. Sputum CD4/CD8<sup>+</sup> cell ratios in severe persistent asthma (SPA) patients (with reversible (□) or with irreversible airway obstruction (■)) and in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) (●).

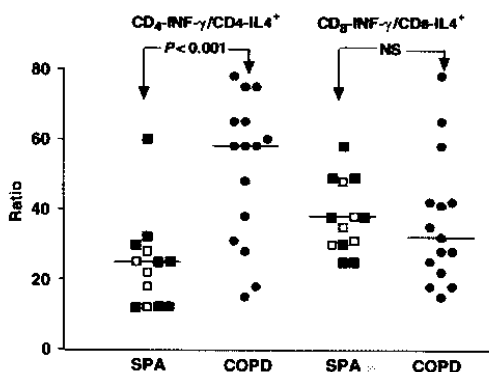


Fig. 3. Sputum CD4-IFN- $\gamma$ /CD4-IL4<sup>+</sup> cell ratios and CD8-IFN- $\gamma$ /CD8-IL4<sup>+</sup> cell ratios in severe persistent asthma (SPA) patients (with reversible (□) or with irreversible airway obstruction (■)) and in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) (●).

## Discussion

This study showed that sputum samples from patients with COPD and SPA with similar degrees of airflow limitation and similar steroid intake have different inflammatory cell profiles. High eosinophils, metachromatic cells, CD4/CD8<sup>+</sup> cell ratios, low neutrophils and CD4-IFN- $\gamma$ /CD4-IL4<sup>+</sup> cell ratios were found in asthma in comparison with COPD. These findings suggest that two different inflammatory processes, driven by T lymphocytes, are taking place in the lungs of SPA and COPD patients and may support a role for sputum induction in the differential diagnosis of asthma and COPD. However, SPA with irreversible airway obstruction exhibits similar neutrophil numbers with COPD patients.

It is well known that corticosteroid treatment significantly alters sputum-inflammatory markers in asthmatic patients [25]. On the other hand, there is conflicting evidence regarding

the effect of inhaled steroids on sputum-inflammatory indices in COPD patients [25, 26]. Admittedly, steroids do not act in the same way in the two diseases and they may have differently influenced the results in SPA and COPD. However, we decided to investigate both groups under the same anti-inflammatory treatment in order to avoid the confound effect of the treatment as much as possible, as well as for obvious ethical reasons.

Because of the well-known overlap between asthma and COPD, we tried carefully to exclude subjects with both disorders. Our COPD patients were unlikely to have asthma, because they were all non-allergic, non-atopic, with fixed bronchoconstriction. Furthermore, the values of  $K_{(x)}$  were below the normal predicted in COPD patients. We are also certain that our asthmatics, even those with irreversible airflow limitation, did not have COPD, because they were all non-smokers, allergic, atopic, with a history of asthma for a minimum of 13 years.

Our study confirms that sputum induction is a safe method to investigate airway inflammation in SPA [18]. Only one asthmatic patient exhibited a fall in FEV<sub>1</sub> > 20% during the inhalation of hypertonic saline, which was readily reversed by bronchodilator administration. We also provide evidence that lymphocyte subpopulations and subtypes in the sputum can be studied by immunocytochemical methods. Before immunocytochemistry, T lymphocytes were stimulated with PMA and ionomycin. Theoretically, this intervention may alter the cytokine profile of the cells. However, we speculate that the differences found in T cell subsets *in vitro* reflect real differences *in vivo*, since the samples from both diseases were stimulated in the same way.

Considering it important to achieve high repeatability of our results, we tried as much as possible to eliminate variability in sputum sampling. Differences in induction time or in saline concentration could alter sputum inflammatory pattern [27]. To exclude these factors the induction time was set up to 25 min in all patients (except four patients who reported troublesome symptoms before the end of time) and a standard saline concentration was always used (N/S). Moreover, all sputum induction and processing were performed from the same investigator. By using a relatively high cell count per slide and by minimizing variability in sputum sampling, we achieved good agreement in the analysis of different sputum aliquots. Ten different slides from the same sputum sample of five patients were stained for T lymphocyte subpopulations and counted. The intra-sample coefficient of variation was < 7%. Although the repeatability of our results in one patient over time was not tested, previous studies have shown high repeatability of sputum differential cell count and inflammatory mediator measurements under standard experimental conditions [27].

In the present study, significant differences were found in sputum T lymphocytes between SPA and COPD patients. SPA exhibited an increase in CD4/CD8<sup>+</sup> cell ratio in comparison with COPD patients (Fig. 2) ( $P < 0.001$ ). The significantly higher ratio of CD4/CD8<sup>+</sup> cells in SPA confirms the enhancement of CD4<sup>+</sup> cells' response in asthma and CD8<sup>+</sup> cells' response in COPD, as it has been already suggested from peripheral blood, BALF and lung biopsy studies [12, 28]. Accordingly, the recent study of Fabbri et al. [29] compared severe asthmatics with fixed airflow obstruction

tion and COPD patients and found a higher CD4/CD8<sup>+</sup> cell ratio of T cells infiltrating the airway mucosa of the first. On the contrary, Leckie et al. [30] failed to find any difference in the number of sputum CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cell populations of patients with asthma, COPD or healthy subjects. This discrepancy could be attributed to the fact that we and Fabbri et al. have studied only SPA.

A significantly lower CD4-IFN- $\gamma$ /CD4-IL4<sup>+</sup> cell ratio was also found in sputum cells from SPA vs. COPD patients (Fig. 3). Since Th0 cells are IFN- $\gamma$  as well as IL-4<sup>+</sup>, the lower CD4-IFN- $\gamma$ /CD4-IL4<sup>+</sup> cell ratio means a lower Th1/Th2 ratio. Therefore, the Th2-type reaction is enhanced in sputum samples from SPA vs. COPD patients.

CD4<sup>+</sup> cells of type 2 have also been found increased in blood, biopsies and BALF of asthmatic patients [12]. They express regulatory cytokines, like IL-5 that promotes eosinophil differentiation, activation and survival, as well as IL-4 and IL-13, which induce IgE production and eosinophil recruitment via VCAM-1 expression on the vascular endothelium [11]. Indeed, the sputum CD4/CD8 ratio in our asthmatic group positively correlated to the number and percentages of eosinophils. Although a correlation does not always imply a cause-and-effect relationship, this finding could provide an explanation why eosinophilia persists despite steroid treatment in some asthmatics. It has been previously shown that in patients with corticosteroid-resistant asthma, there is resistance to IL-5 gene repression by steroids [31]. Possibly, the higher CD4-Th2 cell numbers observed in our study among some SPA also reflect a persisting release of IL-5 from the above cells, which both support higher eosinophil levels, despite steroid treatment.

An increase in CD8<sup>+</sup> cells in the airway lumen and lung parenchyma of COPD patients has been previously reported [6, 7]. This study demonstrated an increase in CD8<sup>+</sup> cells relative to CD4<sup>+</sup> in COPD vs. SPA (Fig. 2). CD8<sup>+</sup> cells are also known as cytotoxic cells, which act through the release of perforin, granzymes or through the Fas ligand pathway [32]. Interesting evidence suggests that they can cause a TNF- $\alpha$ -mediated lung injury [33]. Although previous studies have shown a negative correlation between CD8<sup>+</sup> cells and FEV<sub>1</sub> value in COPD patients [6, 7, 28]; such a correlation was not confirmed by our results. This is attributed to the fact that due to the design of the study, our COPD patients all had similar FEV<sub>1</sub> values, so that a correlation could not be established between FEV<sub>1</sub> and any other parameter.

Recent evidence suggests that the CD8<sup>+</sup> cells implicated in COPD are of type 1. Saetta et al. [9] have reported high Tc1 numbers in peripheral airways of COPD patients when compared with healthy smokers or non-smokers, while a type 1 cytokine phenotype has been demonstrated in peripheral blood [34]. In the present study, no difference was found in the CD8-IFN- $\gamma$ /CD8-IL4<sup>+</sup> cell ratio between COPD patients and SPA, but in both groups CD8-IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> cells were more than CD8-IL4<sup>+</sup> cells (Fig. 3). Since Tc0 cells are IFN- $\gamma$  as well as IL4<sup>+</sup>, increased CD8-IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> cells means increased Tc1 cells. Tc1 cells may be involved in the inflammatory processes taking place in the airway lumen of both COPD patients and SPA. Type 1 T lymphocytes are crucial in the response to viral infections and viral infections are frequent in patients with COPD or asthma [35–37]. Tc1 cells express IFN- $\gamma$ , which can induce emphysema in animal models and

are also implicated in the asthmatic disorder through the induction of airway responsiveness [38].

Previous studies have suggested that neutrophils are involved in the pathogenesis of COPD and severe asthma. Increased sputum neutrophils were found in COPD patients and SPA included in the present study. While steroids may increase sputum neutrophils, long-acting  $\beta_2$ -agonists may reduce them [39]. Although steroid and long-acting  $\beta_2$ -agonist treatment was similar in both our groups, SPA had less neutrophils than COPD patients ( $P < 0.03$ ) (Fig. 1). Recently, Fabbri et al. [29] found fewer neutrophils in the sputum of severe asthmatics vs. COPD patients with a similar severity of fixed airflow obstruction [29]. However, in our study the subgroup of asthmatics with irreversible airway obstruction showed no statistical difference in the percentage of sputum neutrophils with COPD patients. Although this observation must be carefully interpreted, due to the low number of patients with irreversible SPA and to the large scatter of values, it may implicate neutrophils in irreversible obstruction. Evidence supporting such a hypothesis has already been given by Lacoste et al. [40], who found greater percentages of neutrophils in patients with COPD than in those with chronic bronchitis. Neutrophils could contribute to the development of irreversible obstruction in both COPD and in asthma by the release of proteolytic enzymes during the processes of airway wall and parenchymal remodelling [41]. However, their effect could alter different locations of the respiratory system (parenchyma in COPD vs. airways in asthma). Our finding that K<sub>CO</sub>, a marker of emphysema severity and neutrophil numbers are negatively correlated in COPD patients is in agreement with this hypothesis.

The role of eosinophils in SPA is not clear either. Wenzel et al. [42] have demonstrated that there are two subtypes of severe asthma, depending on the absence or presence of eosinophils in endobronchial biopsies. Sputum analysis of severe asthmatics has provided evidence for persistent eosinophilic inflammation [18, 29]. Similarly, our overall asthmatic group had significantly higher eosinophil percentages than the COPD group ( $P < 0.045$ ). However, some asthmatics had low eosinophil numbers (<3%) (Fig. 1). Gibson et al. [43] have already reported heterogeneity regarding sputum eosinophil numbers in severe asthmatics. This suggests that there are two phenotypes in SPA depending on the presence or absence of eosinophils in the airways.

In the present study, higher metachromatic cell numbers (mast cells and basophils) were found in SPA compared with COPD ( $P < 0.007$ ). Previously, increased metachromatic cell numbers were found in sputum from asthmatics [22, 44] and increased mast cell numbers in biopsies from COPD patients, but not in BALF [45]. Although our results also suggest that metachromatic cells are rare in the airway lumen of COPD patients, their role in COPD pathogenesis remains to be determined.

In summary, evidence of different sputum inflammatory cell profiles between SPA and COPD suggests that two distinct inflammatory mechanisms are involved in the pathogenesis of these two obstructive disorders. The enhancement of the CD4-Th2 cell response in asthma and CD8 response in COPD was confirmed in sputum samples. Apparent differences were also detected in eosinophil,

neutrophil percentages and metachromatic cells, although similar neutrophil numbers were found between SPA with irreversible airway obstruction and COPD patients. Interestingly, all differences were demonstrated in spite of corticosteroid treatment. These findings support the important role of sputum induction in the research field of obstructive lung diseases and indicate the potential utility of this method in the differential diagnosis of SPA and COPD.

#### Acknowledgement

This study has been supported by an unrestricted grant from Boehringer Ingelheim Greece.

#### References

- Pauwels RA, Buist AS, Calverley PM et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI/WHO Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) Workshop summary. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163:1256-76.
- WHO/NHLBI Workshop Report. Global Strategy for Asthma Management and Prevention, Publication No.95-3659, National Institutes of Health NH, Lung, and Blood Institute, Bethesda, MD, 1995.
- Cosio MG, Guerassimov A. Chronic obstructive pulmonary disease. Inflammation of small airways and lung parenchyma. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160 (5 Part 2):S21-5.
- Jeffery PK. Comparison of the structural and inflammatory features of COPD and asthma. Giles F. Filley Lecture. *Chest* 2000; 117 (5 Suppl. 1):251S-60S.
- Maestrelli P, Saetta M, Di Stefano A et al. Comparison of leukocyte counts in sputum, bronchial biopsies, and bronchoalveolar lavage. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152 (6 Part 1):1926-31.
- O'Shaughnessy TC, Ansari TW, Barnes NC et al. Inflammation in bronchial biopsies of subjects with chronic bronchitis: inverse relationship of CD8+ T lymphocytes with FEV1. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155:852-7.
- Saetta M, Baraldo S, Corbino L et al. CD8+ve cells in the lungs of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160:711-7.
- Kemeny DM, Vyas B, Vukmanovic-Stejić M et al. CD8(+) T cell subsets and chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160 (5 Part 2):S33-7.
- Saetta M, Mariani M, Pagina-Bordignon P et al. Increased expression of the chemokine receptor CXCR3 and its ligand CXCL10 in peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165:1404-9.
- Ulrik CS, Backer V. Nonreversible airflow obstruction in life-long nonsmokers with moderate to severe asthma. *Eur Respir J* 1999; 14:892-6.
- Muro S, Minshall EM, Hamid QA. The pathology of chronic asthma. *Clin Chest Med* 2000; 21:225-44.
- Colavita AM, Reinach AJ, Peters SP. Contributing factors to the pathobiology of asthma. The Th1/Th2 paradigm. *Clin Chest Med* 2000; 21:263-77.
- Barnes PJ. Mechanisms in COPD: differences from asthma. *Chest* 2000; 117 (2 Suppl.):10S-4S.
- Chanez P, Vignola AM, O'Shaughnessy T et al. Corticosteroid reversibility in COPD is related to features of asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155:1529-34.
- Papi A, Romagnoli M, Baraldo S et al. Partial reversibility of airflow limitation and increased exhaled NO and sputum eosinophilia in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162:1773-7.
- Grashoff WF, Sont JK, Sterk PJ et al. Chronic obstructive pulmonary disease: role of bronchiolar mast cells and macrophages. *Am J Pathol* 1997; 151:1785-90.
- Wenzel SE, Szefer SJ, Leung DY et al. Bronchoscopic evaluation of severe asthma. Persistent inflammation associated with high dose glucocorticoids. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156 (3 Part 1):737-43.
- Jatakanon A, Uasuf C, Maziak W et al. Neutrophilic inflammation in severe persistent asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160 (5 Part 1):1532-9.
- Lamblin C, Gosset P, Tillie-Leblond I et al. Bronchial neutrophilia in patients with noninfectious status asthmaticus. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157:394-402.
- Siafakas NM, Vermeire P, Pride NB et al. Optimal assessment and management of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). The European Respiratory Society Task Force. *Eur Respir J* 1995; 8:1398-420.
- 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 (Suppl.):5-40.
- Pin I, Gibson PG, Kojłendowicz R et al. Use of induced sputum cell counts to investigate airway inflammation in asthma. *Thorax* 1992; 47:25-9.
- 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; 19:205-10.
- Kyriakou D, Karkavitsas N, Eliopoulos G et al. Immunohistochemical analysis of the ras p21 oncoprotein in Hashimoto's thyroiditis. *Anticancer Res* 1992; 12:1189-94.
- Keatings VM, Jatakanon A, Worsdell YM et al. Effects of inhaled and oral glucocorticoids on inflammatory indices in asthma and COPD. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155:542-8.
- Culpitt SV, Maziak W, Loukidis S et al. Effect of high dose inhaled steroid on cells, cytokines, and proteases in induced sputum in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160 (5 Part 1):1635-9.
- Tsoumakidou M, Tzanakis N, Siafakas NM. Induced sputum in the investigation of airway inflammation of COPD. *Respir J* 2003; 97:863-71.
- Tzanakis N, Chrysafakis G, Tsoumakidou M et al. Induced sputum CD8+ T lymphocytes subpopulations in COPD. *Respir J* (in press).
- Fabbri LM, Romagnoli M, Corbetta L et al. Differences in airway inflammation in patients with fixed airflow obstruction due to asthma or chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167:418-24.
- 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; 58:23-9.
- Leung DY, Martin RJ, Szefer SJ et al. Dysregulation of interleukin 4, interleukin 5, and interferon gamma gene expression in steroid-resistant asthma. *J Exp Med* 1995; 181:33-40.
- Berke G. The binding and lysis of target cells by cytotoxic lymphocytes: molecular and cellular aspects. *Annu Rev Immunol* 1994; 12:735-73.
- Liu AN, Mohammed AZ, Rice WR et al. Perforin-independent CD8(+) T-cell-mediated cytotoxicity of alveolar epithelial cells is preferentially mediated by tumor necrosis factor-alpha: relative insensitivity to Fas ligand. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999; 20:849-58.

- 34 Majori M, Corradi M, Caminati A et al. Predominant TH1 cytokine pattern in peripheral blood from subjects with chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103 (3 Part 1):458-62.
- 35 Retamales I, Elliott WM, Meshi B et al. Amplification of inflammation in emphysema and its association with latent adenoviral infection. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164:469-73.
- 36 Fabbri L, Beghe B, Caramori G et al. Similarities and discrepancies between exacerbations of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 1998; 53:803-8.
- 37 Hogg JC. Childhood viral infection and the pathogenesis of asthma and chronic obstructive lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160 (5 Part 2):S26-8.
- 38 Magnan AO, Mely LG, Camilla CA et al. Assessment of the Th1/Th2 paradigm in whole blood in atopy and asthma. Increased IFN-gamma-producing CD8(+) T cells in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161:1790-6.
- 39 Johnson M. Effects of beta2-agonists on resident and infiltrating inflammatory cells. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110 (6 Suppl.):S282-90.
- 40 Lacoste JY, Bousquet J, Chanez P et al. Eosinophilic and neutrophilic inflammation in asthma, chronic bronchitis, and chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol* 1993; 92:537-48.
- 41 Stockley RA. Neutrophils and protease/antiprotease imbalance. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160 (5 Part 2):S49-52.
- 42 Wenzel SE, Schwartz LB, Langmack EL et al. Evidence that severe asthma can be divided pathologically into two inflammatory subtypes with distinct physiologic and clinical characteristics. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160:1001-8.
- 43 Gibson PG, Simpson JL, Saltos N. Heterogeneity of airway inflammation in persistent asthma: evidence of neutrophilic inflammation and increased sputum interleukin-8. *Chest* 2001; 119:1329-36.
- 44 Gibson PG, Girgis-Gabardo A, Morris MM et al. Cellular characteristics of sputum from patients with asthma and chronic bronchitis. *Thorax* 1989; 44:693-9.
- 45 Pesci A, Rossi GA, Bertorelli G et al. Mast cells in the airway lumen and bronchial mucosa of patients with chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149:1311-6.