



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ  
ΤΟΜΕΑΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΠΝΕΥΜΟΝΟΛΟΓΙΑΣ  
Δ/ΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Ν.Μ. ΣΙΑΦΑΚΑΣ**

## **ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**«ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΣΤΗ ΦΛΕΓΜΟΝΗ ΤΩΝ  
ΑΕΡΑΓΩΓΩΝ ΚΑΙ ΤΟΥ ΡΙΝΙΚΟΥ  
ΒΛΕΝΝΟΓΟΝΟΥ ΜΕΤΑ ΤΗ ΔΙΑΚΟΠΗ ΤΟΥ  
ΤΣΙΓΑΡΟΥ»**

**Ιζόλδη-Αικατερίνη Η. Μπουλουκάκη**

**Ιατρός**

Επιβλέπων: Ν. Τζανάκης

Επικ. Καθηγητής Επιδημιολογίας-Δημόσιας Υγείας

Ηράκλειο Κρήτης, 2010

**Αφιερώνεται στο σύζυγο και στην κόρη μου**

## **Επιβλέπων**

**N. Τζανάκης, Επικ. Καθηγητής**

## **Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή**

N. Τζανάκης, Επικ. Καθηγητής

N. Μ. Σιαφάκας, Καθηγητής

E. Παπαδάκη, Καθηγήτρια

## **Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή**

N. Τζανάκης, Επικ. Καθηγητής

N. Μ. Σιαφάκας, Καθηγητής

E. Παπαδάκη, Καθηγήτρια

Δ. Μπούμπας, Καθηγητής

Χ.Λιονής, Καθηγητής

Σ. Σχίζα, Επικ. Καθηγήτρια

Χ.Τσατσάνης, Επικ. Καθηγητής

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο ερευνητικό εργαστήριο Πνευμονολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης. Εμπνευστής αυτής της προσπάθειας ήταν ο επίκουρος καθηγητής Επιδημιολογίας, Δημόσιας Υγείας του Πανεπιστημίου Κρήτης, Τζανάκης Νικόλαος. Τα ευρήματα μας παρέχουν νέες πληροφορίες για τις μεταβολές στη φλεγμονή των αεραγωγών και του ρινικού βλεννογόνου σε υγιείς καπνιστές μετά τη διακοπή του τσιγάρου. Στη μελέτη μας ελήφθησαν προκλητά πτύελα και ρινικό έκκριμα από υγιείς καπνιστές, οι οποίοι επισκέφτηκαν και ξεκίνησαν θεραπεία στο ιατρείο βοήθειας διακοπής του καπνίσματος. Σε αυτούς που κατάφεραν να διακόψουν επιτυχώς το κάπνισμα ελήφθησαν ξανά πτύελα και ρινικό έκκριμα μετά από 6 μήνες και 1 έτος. Βασιζόμενοι σε προηγούμενες αναφορές για τη μείωση της φλεγμονής των αεραγωγών και μεταβολής των υποπληθυσμών των T λεμφοκυττάρων στους πρώην καπνιστές σε σύγκριση με τους νυν καπνιστές, διεξήγαμε μια μακροχρόνια μελέτη για να διερευνήσουμε αν η φλεγμονή των αεραγωγών και κατ'επέκταση του ρινικού βλεννογόνου αναστρέφεται μετά από μία περίοδο 6 και 12 μηνών από τη διακοπή του καπνίσματος. Πρόκειται για μία πρωτότυπη μελέτη που διερευνά την επίδραση της διακοπής καπνίσματος στους υποπληθυσμούς των T λεμφοκυττάρων και οξειδωτικού stress στα προκλητά πτύελα και σε φλεγμονώδεις ουσίες του ρινικού εκκρίματος καπνιστών χωρίς υποκείμενο νόσημα ή επηρεασμένη αναπνευστική λειτουργία. Τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής υποστηρίζουν την αρχική μας υπόθεση και υποθέτουμε ότι αυτά τα νέα ευρήματα μπορούν να εξηγήσουν την αναστρεψιμότητα κάποιων επιβλαβών συνεπειών που παρατηρούνται μετά τη διακοπή του καπνίσματος.

Ολοκληρώνοντας την συγγραφή της διδακτορικής μου διατριβής θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όλους εκείνους που άμεσα ή έμμεσα συνέβαλαν στην ολοκλήρωση της προσπάθειας αυτής. Θέλω να εκφράσω τις πιο θερμές ευχαριστίες μου στον Επιβλέποντα Καθηγητή μου κ. Τζανάκη Νικόλαο για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντας μου το εξαιρετικά ενδιαφέρον αυτό κομμάτι της έρευνας που διεξάγεται στο πνευμονολογικό τμήμα του Πανεπιστημίου Ηρακλείου, καθώς επίσης και για την πολύτιμη επιστημονική καθοδήγησή του σε όλη την διάρκεια εκπόνησης της διατριβής



μου. Τον ευχαριστώ επίσης για την επιμονή του για το τέλειο αποτέλεσμα καθώς και για το μεγάλο ενδιαφέρον και τη διαρκή ενθάρρυνση σε όλες τις φάσεις της μελέτης μου. Θερμά ευχαριστώ τα υπόλοιπα μέλη της Τριμελούς Συμβουλευτικής μου Επιτροπής, τον Καθηγητή κ. Ν. Σιαφάκα και την Καθηγήτρια κ. Ε. Παπαδάκη για τη συμβολή τους στον καθορισμό της πορείας του διδακτορικού μου. Θα ήταν παράλειψη να μην ευχαριστήσω ιδιαίτερα την Επιμελήτρια Α Πνευμονολογίας κα Ιωάννα Μητρούσκα για την ανεκτίμητη βοήθεια και τη στήριξη που μου παρείχε όλα αυτά τα χρόνια, καθώς και της Επικουρική Επιμελήτρια Β Πνευμονολογίας Μαρία Τσουμακίδου, η οποία με τις επιστημονικές συμβουλές, τη φιλική συμπεριφορά της καθώς και το ανθρώπινο ενδιαφέρον της, αποτέλεσαν πολύτιμα εφόδια για την συνέχιση και ολοκλήρωση της προσπάθειας μου.

Ιζόλδη Μπουλουκάκη, MD

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Βιογραφικό εκπονούντος την διατριβή.....	8
Περίληψη.....	20

## ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

<b>ΕΝΟΤΗΤΑ I: Κάπνισμα.....</b>	<b>28</b>
Κεφάλαιο 1	
Επιδημιολογία.....	29
Κεφάλαιο 2	
Το μέγεθος του προβλήματος.....	33
Κεφάλαιο 3	
Επιδράσεις στο αναπνευστικό σύστημα.....	36
Κεφάλαιο 4	
Κάπνισμα, Φλεγμονή και πνευμονική βλάβη.....	44
Κεφάλαιο 5	
Παθητικό κάπνισμα.....	62
Κεφάλαιο 6	
Έκθεση στο παθητικό κάπνισμα και συσχέτιση με επιπρόσθετη θνητότητα από καρδιακή νόσο και καρκίνο του πνεύμονα στο προσωπικό ενός νοσοκομείου στην Κρήτη .....	66
Κεφάλαιο 7	
Κάπνισμα και ανθρώπινα δικαιώματα .....	79
Κεφάλαιο 8	
Πολιτική καπνίσματος στην Ελλάδα.....	85
<b>ΕΝΟΤΗΤΑ II: Διακοπή καπνίσματος.....</b>	<b>92</b>
Κεφάλαιο 1	
Οφέλη της διακοπής.....	93
Κεφάλαιο 2	
Επίδραση της διακοπής του καπνίσματος στα αναπνευστικά συμπτώματα, Αναπνευστική λειτουργία, υπεραντιδραστικότητα και φλεγμονή των αεραγωγών.....	96
Κεφάλαιο 3	

Φραγμοί στη διακοπή καπνίσματος.....	116
Κεφάλαιο 4	
Κατευθυντήριες οδηγίες διακοπής καπνίσματος.....	119
Κεφάλαιο 5	
Τρέχουσες φαρμακευτικές θεραπείες για τη διακοπή του καπνίσματος.....	128
Κεφάλαιο 6	
Εναλλακτικές προσεγγίσεις στη διακοπή καπνίσματος.....	136
<b>ΕΝΟΤΗΤΑ III: Η τεχνητή πρόκληση παραγωγής πτυέλων και λήψη ρινικού εκπλύματος.....</b>	<b>138</b>
<b>ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	
<b>ΕΝΟΤΗΤΑ I: Φλεγμονώδη κύτταρα πτυέλων πριν και μετά από τη διακοπή του καπνίσματος σε ‘υγιείς’ καπνιστές.....</b>	<b>153</b>
<b>ΕΝΟΤΗΤΑ II: Κυτταρικοί δείκτες πτυέλων οξειδωτικού stress πριν και μετά από τη διακοπή του καπνίσματος.....</b>	<b>176</b>
<b>ΕΝΟΤΗΤΑ III: Δείκτες φλεγμονής πτυέλων και ρινικού εκπλύματος πριν και μετά τη διακοπή του καπνίσματος.....</b>	<b>195</b>
<b>ΕΝΟΤΗΤΑ IV: Μείωση των ώριμων δένδριτικών κυττάρων των πτυέλων σε υγιείς καπνιστές και σε ασθενείς με χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια.....</b>	<b>210</b>
<b>ΤΕΛΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>235</b>
<b>ΕΝΟΤΗΤΑ V: Ανακοινώσεις σε διεθνή συνέδρια και δημοσιευμένες εργασίες.....</b>	<b>238</b>

## **ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ**

**ΕΠΩΝΥΜΟ:** Μπουλουκάκη

**ΟΝΟΜΑ:** Ιζόλδη-Αικατερίνη

**ΠΑΤΡΩΝΥΜΟ:** Ηρακλής

**ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ:** Χρυσοστόμου 70, Ηράκλειο, Κρήτη

**ΤΗΛΕΦΩΝΟ:** 2810381807, ΚΙΝ: 6932978636

**ΗΜ. ΓΕΝΝΗΣΕΩΣ:** 09/09/1977

**ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΚΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ:** Έγγαμη, μητέρα ενός παιδιού

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

**ΑΝΩΤΑΤΗ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ:** Πτυχιούχος Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου

Κρήτης με βαθμό 8.08

### **ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ**

First Certificate in English, University of Cambridge

### **ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ**

1. Τρίμηνη Εκπαίδευση καταμεμημένη ισομερώς σε τακτικά Παθολογικά, Καρδιολογικά και Χειρουργικά Εξωτερικά Ιατρεία και αντίστοιχα Ιατρεία Επείγοντων περιστατικών των Τμημάτων Α΄ Παθολογικού, Καρδιολογικού και Α΄ Χειρουργικού, στο πλαίσιο της υποχρεωτικής άσκησης προ της υπηρεσίας υπαίθρου. «Βενιζέλειο-Πανάκειο» Γενικό Νοσοκομείο Ηρακλείου, Ηράκλειο Κρήτης
2. Υπηρεσία Υπαίθρου στο Κέντρο Υγείας Μοιρών, νομός Ηρακλείου Κρήτης, 12/2002 – 8/2003
3. Ειδικότητα Γενικής Ιατρικής στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Ηρακλείου από το Σεπτέμβριο του 2006
4. Επιστημονικός συνεργάτης στο ιατρείο Διακοπής Καπνίσματος Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου και στο Εργαστήριο Μελέτης Διαταραχών της Αναπνοής στον Υπνο του Πνευμονολογικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Κρήτης.

### **ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ**

1. Πενταετής εκπόνηση διδακτορικής διατριβής στο ερευνητικό εργαστήριο Πνευμονολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης

## ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΓΝΩΣΕΙΣ

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

## ΔΙΔΑΚΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

3/2005 – 9/2006. Παρείχα διδακτικό έργο με σύμβαση ανάθεσης έργου στο Ινστιτούτο Επαγγελματικής Κατάρτισης (IEK) στα πλαίσια του μαθήματος Υγιεινή

## ΒΡΑΒΕΙΑ-ΔΙΑΚΡΙΣΕΙΣ

1. Έπαινος καλύτερης ανακοίνωσης στο 16ο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακα με θέμα: <<Ποσοστά επιτυχίας της υποβοηθούμενης διακοπής καπνίσματος και παράγοντες που την επηρεάζου.>>. **I. Μπουλουκάκη**, I. Μητρούσκα, N. Τζανάκης, N. Σιαφάκας. Αθήνα Δεκέμβριος 2007
2. Έπαινος καλύτερης ανακοίνωσης στο 16ο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακα με θέμα <<Μείωση ώριμων δενδριτικών κυττάρων στα πύελα υγιών καπνιστών και καπνιστών με ΧΑΠ>>.M. Τσουμακίδου, **I. Μπουλουκάκη**, I. Μητρούσκα, N. Τζανάκης, N. Σιαφάκας. Αθήνα Δεκέμβριος 2007
3. Βράβευση από την Ευρωπαϊκή Πνευμονολογική Εταιρεία (ERS Young Scientist Sponsorship) της εργασίας με τίτλο «Decreased pulmonary mature dendritic cells in healthy smokers and smoking COPD patients» M. Tsoumakidou, **I. Bouloukaki**, K. Koubidou, H. Koutala, N. Tzanakis, P. Jeffery, N. Siafakas. Thoracic Medicine, University Hospital of Heraklion, Crete, Greece. 16ο Συνέδριο Ευρωπαϊκής Πνευμονολογικής Εταιρίας, Στοκχόλμη, 2007
4. Βράβευση από την Ευρωπαϊκή Πνευμονολογική Εταιρεία (abstract has been rated among the top 5% submitted to the ERS Congress 2008 in Berlin) της εργασίας με τίτλο «Six month and 1 year smoking cessation decrease sputum inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine expression at the never-smokers' levels» **Izolda Bouloukaki**, Maria Tsoumakidou, Ioanna

Mitrouska, Nikolaos Siafakas, Nikolaos Tzanakis. Thoracic Medicine, University of crete, Heraklion, Greece. 17ο Συνέδριο Ευρωπαϊκής Πνευμονολογικής Εταιρίας, Στοκχόλμη, 2008

5. Βράβευση από την Ευρωπαϊκή Πνευμονολογική Εταιρεία (abstract has been rated among the top 5% submitted to the ERS Congress 2008 in Berlin) της εργασίας με τίτλο «Sputum secretory eukocyte inhibitor and Clara cell protein 16 levels are not altered after 6month and 1 year smoking cessation»

**Izolde Bouloukaki**, Maria Tsounakidou, Ioanna Mitrouska, Nikolaos Siafakas, Nikolaos Tzanakis. Thoracic Medicine, University of Crete, Heraklion, Greece. 17ο Συνέδριο Ευρωπαϊκής Πνευμονολογικής Εταιρίας, Στοκχόλμη, 2008

6. Υποτροφία από την Εταιρεία Πνευμονολογικής Ερευνας Πανεπιστημίου Κρήτης, για την εκπόνοση της διδακτορικής μου διατριβής με τίτλο «Μεταβολές στη φλεγμονή των αεραγωγών και του ρινικού βλεννογόνου μετά τη διακοπή του τσιγάρου»

#### **ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΔΙΕΘΝΩΝ ΣΕΜΙΝΑΡΙΩΝ**

1. Oral cancer Screening and Risk Assessment. An educational workshop for Primary Care Physicians and Dentists, July 7, 2008
2. ERS school courses, Smoking cessation, September 20-22, 2006

#### **ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΔΙΕΘΝΩΝ ΣΥΝΕΔΡΙΩΝ**

1. 9<sup>th</sup> WONCA Rural Health World Conference, 12-14 June, 2009
2. 17<sup>th</sup> International Conference on Health Promoting Hospitals and Health Services, 6-8 May 2009
3. 20<sup>th</sup> European Congress of Radiology, March 7-11, 2008
4. European Respiratory Society Annual Congress 2007, September 15-19, 2007
5. 3<sup>rd</sup> Aegean Postgraduate Radiology Course, October 10-12, 2003

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

1. Επίδραση της χορήγησης θετικής πίεσης αεραγωγών μέσω ρινικής μάσκας (PAP) στα επίπεδα της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης σε ασθενείς με σύνδρομο αποφρακτικών απνοιών στον ύπνο (ΣΑΑΥΥ).

**1. Μπουλουκάκη, Ν. Τζανάκης, Χ. Μερμίγκης, Ε. Τζωρτζάκη, Β. Μονιάκη, Ε. Μαυρουδή, Ν. Μ. Σιαφάκας, ΕΜ. Καλλέργης, ΣΕ. Σχίζα.**

18ο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος. Πνευμων, Τόμος 22, Συμπληρωματικό τεύχος 2, Θεσσαλονίκη, 2009

**2. Ποσοστά διακοπής και παράγοντες πρόβλεψης για η διακοπή του καπνίσματος**

**1. Μπουλουκάκη, Ι. Κομνηνός, Δ. Μωραιτάκη, Κ. Καραγιάννης, Ν. Σιαφάκας, Ι. Μητρούσκα.**

21<sup>ο</sup> Πανελλήνιο συνέδριο Γενικής Ιατρικής, Χαλκιδική 2009

**3. Προγνωστικοί παράμετροι συνδρόμου αποφρακτικών απνοιών υποπνοιών στον ύπνο (ΣΑΑΥΥ)**

**1. Μπουλουκάκη, Ι. Κομνηνός, Ν. Τζανάκης, Β. Μονιάκη, ΝΜ. Σιαφάκας, ΣΕ. Σχίζα.**

21<sup>ο</sup> Πανελλήνιο συνέδριο Γενικής Ιατρικής, Χαλκιδική 2009

**4. Ποσοστά διακοπής και παράγοντες πρόβλεψης για τη διακοπή του καπνίσματος.**

**1. Μπουλουκάκη, Δ. Μωραιτάκη, Κ. Καραγιάννης, Ν. Σιαφάκας, Ι. Μητρούσκα.**

5<sup>ο</sup> Πανελλήνιο συνέδριο προαγωγής και αγωγής της υγείας και 1<sup>ο</sup> πανελλήνιο συνέδριο προαγωγής υγείας στην κοινότητα, Τόμος περιλήψεων, σελ. 60, Α-82 Αθήνα 2008

**5. Χρησιμότητα αλγορίθμων πρόβλεψης της συνεχούς χορήγησης θετικής πίεσης στους αεραγωγούς μέσω ρινικής μάσκας (CPAP)**

**1. Μπουλουκάκη, Ν. Τζανάκης, Β. Μονιάκη, ΝΜ. Σιαφάκας, ΣΕ. Σχίζα.**

17ο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος, Πνεύμων, Τόμος 21, Συμπληρωματικό τεύχος 2008 ΕΑ 13, σελ 13

**6. Προγνωστικοί παράμετροι συνδρόμου αποφρακτικών απνοιών στον ύπνο (ΣΑΑΥΥ).**

**1. Μπουλουκάκη, Ν. Τζανάκης, Ε. Μαυρουδή, ΝΜ. Σιαφάκας, ΣΕ. Σχίζα.** 17ο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος, Πνεύμων, Τόμος 21, Συμπληρωματικό τεύχος 2008, ΑΑ 44, σελ. 32

**7. Σύγκριση θεραπείας με CPAP και CPAP και χαμηλών δόσεων ταδλαφίλης σε ασθενείς με στυτική δυσλειτουργία (ED) και σύνδρομο αποφρακτικών απνοιών υποπνοιών στον ύπνο (ΣΑΑΥΥ). Πρόδρομα αποτελέσματα.**

Β. Παπαδημητρίου, **Ι.Μπουλουκάκη**, Φ. Σοφράς, Ν. Τζανάκης, ΝΜ. Σιαφάκας, ΣΕ. Σχίζα,

17ο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος, Πνεύμων, Τόμος 21, Συμπληρωματικό τεύχος 2008 ΑΑ47, σελ. 33

**8.** Συσχέτιση στυτικής δυσλειτουργίας και συνδρόμου αποφρακτικών απνοιών υποπνοιών στον ύπνο (ΣΑΑΥΥ).

Β. Παπαδημητρίου, **Ι. Μπουλουκάκη**, Φ. Σοφράς, Ν. Τζανάκης, ΝΜ. Σιαφάκας, ΣΕ. Σχίζα.

17ο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος, Πνεύμων, Τόμος 21, Συμπληρωματικό τεύχος 2008, ΑΑ48, σελ. 33

**9.** Σύνδρομο αποφρακτικών απνοιών υποπνοιών στον ύπνο (ΣΑΑΥΥ) και φύλο: Ο ρόλος της παχυσαρκίας.

**Ι.Μπουλουκάκη**, Ν. Τζανάκης, Χ. Πρωτοπαπαδάκης, Νικόλαος Μ. Σιαφάκας. Σοφία Ε. Σχίζα.

17ο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος, Πνεύμων, Τόμος 21, Συμπληρωματικό τεύχος 2008, ΑΑ61, σελ. 37

**10.** Ποσοστά επιτυχίας της υποβοηθούμενης διακοπής καπνίσματος και παράγοντες που την επηρεάζουν.

**Ι. Μπουλουκάκη**, Ι. Μητρούσκα, Ν. Τζανάκης, Ν. Σιαφάκας

16ο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος, Πνεύμων, Τόμος 20, Συμπληρωματικό τεύχος 2007, ΠΑ 81, σελ. 28

**11.** Μείωση ώριμων δένδριτικών κυττάρων στα πτύελα υγιών καπνιστών και καπνιστώ με ΧΑΠ.

**Ι. Μπουλουκάκη**, Ι. Μητρούσκα, Ν. Τζανάκης, Ν. Σιαφάκας.

16ο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος, Πνεύμων, Τόμος 20, Συμπληρωματικό τεύχος 2007, ΠΑ 24, σελ. 13

**12.** Αυξημένη απόπτωση στα κύτταρα προκλητού πτυέλου ασθενών με σταθερή χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ).

Δ. Μακρής, Ε. Τζωρτζάκη, Θ. Βρεκούσης, **Ι. Μπουλουκάκη**, Α. Καλογεράκη, Κ. Δαριβιανάκη, Ν Τζανάκης, Ε. Λαμπίρη, ΝΜ Σιαφάκας.

16ο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος, Πνεύμων, Τόμος 20, Συμπληρωματικό τεύχος 2007, ΑΑ154, σελ. 70

**13.** Διαβητικοί ασθενείς στο ιατρείο καπνίσματος: Ποσοστό επιτυχίας διακοπής καπνίσματος.



- I. Μπουλουκάκη**, I. Μητρούσκα, Β. Μελάκη, Ν. Τζανάκης, Ν. Σιαφάκας.  
16ο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος, Πνεύμων, Τόμος 20, Συμπληρωματικό τεύχος 2007, ΠΑ 82, σελ. 28
- 14.** Η σχέση του συνδρόμου απνοιών υποπνοιών στον ύπνο (ΣΑΑΥ) και της στυτικής δυσλειτουργίας. (Προκαταρκτικά αποτελέσματα).  
Β. Παπαδημητρίου, **I. Μπουλουκάκη**, Χ. Πρωτοπαπαδάκης, Χ. Καλονάκη, Β. Μονιάκη, Φ. Σοφράς, Ν. Σιαφάκας, Σ. Σχίζα  
16ο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος, Πνεύμων, Τόμος 20, Συμπληρωματικό τεύχος 2007, ΑΑ092, σελ. 54
- 15.** Το 5λεπτο κορομετρικό τεστ εγρήγορσης είναι ευαίσθητο στη μοδαφινίλη: Διπλή τυφλή, διασταυρούμενη, placebo ελεγχόμενη μελέτη σε ασθενείς με Σύνδρομο Απνοιών Υποπνοιών στον ύπνο (ΣΑΑΥ).  
**I. Μπουλουκάκη**, Α. Νικολάου, Π. Ρούσσο, Σ. Γιακουμάκη, Ν. Σιαφάκας, Π. Μπίτσιος, Σ. Σχίζα.  
16ο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος, Πνεύμων, Τόμος 20, Συμπληρωματικό τεύχος 2007, ΠΑ 70, σελ. 25
- 16.** Χρησιμότητα ενός αλγορίθμου για την πρόβλεψη της συνεχούς χορήγησης θετικής πίεσης στους ανώτερους αεραγωγούς μέσω ρινικής μάσκας (CPAP).  
Σ. Σχίζα, **I. Μπουλουκάκη**, Ν. Τζανάκης, Φ. Οικονομίδου, Ν. Σιαφάκας  
15<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος, 2006. ΑΑ65, σελ. 50
- 17.** Διακοπή καπνίσματος – Βραχυπρόθεσμες επιδράσεις στη φλεγμονή των αεραγωγών.  
**I. Μπουλουκάκη**, I. Μητρούσκα, Ε. Κουταλα, Μ. Τσουμακίδου, Ν. Σιαφάκας, Ν. Τζανάκης.  
15<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος, 2006, ΑΑ95, σελ.57
- 18.** Χρησιμότητα ενός αλγορίθμου για την πρόβλεψη της συνεχούς χορήγησης θετικής πίεσης στους ανώτερους αεραγωγούς μέσω ρινικής μάσκας (CPAP).  
Σ. Σχίζα, **I. Μπουλουκάκη**, Ν. Τζανάκης, Φ. Οικονομίδου, Ν. Σιαφάκας  
13<sup>ο</sup> Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο, 2006
- 19.** Κοκκιωμάτωση Wegener με πνευμονική συμμετοχή στην Κρήτη : Κλινική εικόνα, διάγνωση, θεραπεία και πορεία Νόσου.

I. Μαμμάς, Α. Γιαουζάκη, **I. Μπουλουκάκη**, Ε. Δασκαλάκη, Μ. Φρουδαράκης.

7<sup>ο</sup> Συνέδριο Φοιτητών Ιατρικής Ελλάδος, Απρίλιος 2000, Θεσσαλονίκη

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

1. Sleep disordered breathing in patients with acute coronary syndromes

**I. Bouloukaki**, E. Simantirakis, C. Mermigis, D. Arfanakis, S. Chrysostomakis, E. Kallergis, P. Vardas, E. Vlachaki, N. Siafakas, S. Schiza.

ERS Congress 2010, P909

2. The role of endothelial dysfunction and oxidative stress in the pathogenesis of erectile dysfunction (ED) in obstructive sleep apnoea-hypopnoea syndrome (OSAHS) patients

V. Papadimitriou, F. Sofras, **I. Bouloukaki**, E. Vlachaki, N. Malliaraki, A. Margioris, N. Tzanakis, N. Siafakas, S. Schiza.

ERS Congress 2010, E2245

3. Angiogenic factors in obstructive sleep apnea syndrome (OSA). Effects of nasal continuous positive airway pressure treatment (CPAP)

**I. Bouloukaki**, E. Neofytou, N. Soultzizis, C. Protopapadakis, V. Moniaki, E. Tzortzaki, E. Vlachaki, C. Mermigis, N. Tzanakis, N. Siafakas, S. Schiza.

ERS Congress 2010, E2260

4. Effect of continuous positive airway pressure treatment (CPAP) in angiogenic growth factors' expression in patients with COPD and obstructive sleep apnea syndrome (OSAS)

E. Neofytou, N. Soultzizis, **I. Bouloukaki**, A. Solakis, E. Mavroudi, S. Schiza, N. Siafakas, E. Tzortzaki.

ERS Congress 2010, P4292

5. CPAP versus CPAP plus low dose of PDE-inhibitor in men with obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome (OSAHS) and erectile dysfunction (ED)

V. Papadimitriou, F. Sofras, **I. Bouloukaki**, N. Tzanakis, E. Vlachaki, C. Mermigis, N. Siafakas, S. Schiza.

ERS Congress 2010, P4418

6. Association between Obstructive Sleep Apnea Hypopnea Syndrome and Erectile Dysfunction.

V. Papadimitriou, F. Sofras, **I. Bouloukaki**, K. Stamatiou, E. Mavromanolakis, N. Siafakas, E. Vlachaki, N. Tzanakis, S. Schiza.

ATS congress 2010, Am J Respir Crit Care Med 181;2010:A3687

**7.** The evolution of C-reactive protein values in obstructive sleep apnea patients being under Continuous positive airway pressure therapy.

**I. Bouloukaki**, C. Mermigkis, E. Vlachaki, P. Panagou, E. Kallergis, E.G. Tzortzaki, N. Tzanakis, N. Siafakas, S. Schiza.

ATS congress 2010, Am J Respir Crit Care Med 181;2010:A5567

**8.** Effects of nasal continuous positive airway pressure treatment on C-reactive protein in patients with obstructive sleep apnea.

**I. Bouloukaki**, N. Tzanakis, E. Tzortzaki, V. Moniaki, E. Mauroudi, N. Siafakas, S. Schiza.

ERS congress 2009, 499s, E2846

**9.** Abstinence rates and predictors of outcome for smoking cessation.

**I. Bouloukaki** , I. Komninos , D. Moraitaki , K. Karagiannis, N. Siafakas, I. Mitrouska.

9<sup>th</sup> WONCA Rural Health World Conference, pp191, 2009

**10.** Predictive parameters for obstructive sleep apnea hypopnea syndrome.

**I. Bouloukaki**, I. Komninos, N. Tzanakis, V. Moniaki, S. Schiza.

9<sup>th</sup> WONCA Rural Health World Conference, pp194, 2009

**11.** Abstinence rates and predictors of outcome for smoking cessation.

**I. Bouloukaki** , D. Moraitaki , K. Karagiannis, N. Siafakas, I. Mitrouska.

17<sup>th</sup> International Conference on Health Promoting Hospitals and Health Services, 2009, pp 181, P219

**12.** Predictive Parameters for Obstructive Sleep Apnea Hypopnea Syndrome.

**I. Bouloukaki**, N. Tzanakis, E. Mauroudi, M. Plataki, N.M. Siafakas, S.E. Schiza.

ATS congress, 2009, Am J Respir Crit Care Med 179;2009:A2143

**13.** Six month and 1year smoking cessation decreases sputum inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine expression at the never-smokers' levels

**I. Bouloukaki**, M. Tsoumakidou, I. Mitrouska, N. Siafakas, N. Tzanakis.

ERS congress 2008, E437, 53s

**14.** Sleep patterns in patients with acute coronary syndromes.

S. Schiza, E. Simantirakis , **I. Bouloukaki**, D. Arfanakis, S. Chrysostomakis, E. Kallergis, P. Vardas, N. Siafakas.

ERS congress 2008, P836, 132s

**15.** Comparison between subjective and objective measurements in the evaluation of erectile dysfunction in patients with obstructive sleep apnea–hypopnea syndrome (OSAHS).

V. Papadimitriou, F. Sofras, **I. Bouloukaki**, V. Moniaki, N. Siafakas, S. Schiza.

ERS congress 2008, P858, 136s

**16.** Sputum secretory leukocyte inhibitor and Clara cell protein 16 levels are not altered after 6 month and 1 year smoking cessation.

**I. Bouloukaki**, M. Tsoumakidou, I. Mitrouska, N. Siafakas, N. Tzanakis.

ERS congress 2008, P1217, 210s

**17.** Increased Clara cell protein 16 levels in the bronchoalveolar lavage fluid of idiopathic pulmonary fibrosis patients.

M. Tsoumakidou, **I. Bouloukaki**, K. Thimaki, N. Tzanakis, N. Siafakas.

ERS congress 2008, P1876, 317s

**18.** Similar sputum secretory leukocyte inhibitor and Clara cell protein 16 levels between current and ex-smokers with COPD.

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

ERS congress 2008, P1977, 338s

**19.** Relation between Obstructive Sleep Apnea Hypopnea Syndrome and Erectile Dysfunction (Preliminary Report).

V. Papadimitriou, **I. Bouloukaki**, V. Moniaki, F. Sofras, C. Protopapadakis, N.M. Siafakas, S.E. Schiza.

ATS congress 2008, Am. J. Respir. Crit. Care Med 2008;177.Publication Page: A484

**20.** Sleep Patterns in Patients with Acute Coronary Syndromes: Preliminary Results,

S.E. Schiza, E. Simantirakis, **I. Bouloukaki**, D. Arfanakis, S. Chrysostomakis, E.M. Kallergis, P. Vardas, N.M. Siafakas.

ATS congress 2008, Am. J. Respir. Crit. Care Med 2008;177. Publication Page: A478

**21.** Abstinence rates and predictors of outcome for smoking cessation

**I. Bouloukaki**, I. Mitrouska, N. Tzanakis, N. Siafakas.

ERS congress 2007, P3023, 502s

**22.** Decreased pulmonary mature dendritic cells in healthy smokers and smoking COPD patients.

M. Tsoumakidou, **I. Bouloukaki**, K. Koubidou, H. Koutala, N. Tzanakis, P. Jeffery, N. Siafakas.

ERS congress 2007, 1311, 212s

**23.** Preliminary Results of a Study on Pulmonary Dendritic Cells in COPD.

M. Tsoumakidou, **I. Bouloukaki**, H. Koutala, K. Kouvidi, I. Mitrouska, N. Tzanakis, N.M. Siafakas

ATS congress 2007, Publication Page: A925

**24.** Environmental Tobacco Smoke Exposure (ETS) and Excess Lung Cancer Risk among Hospital Staff in Greece.  
C.I. Vardavas, **I. Bouloukaki**, M. Linardakis, N.M. Siafakas, N. Kafatos, N. Tzanakis.

ATS congress 2007, Publication Page: A824

**25.** Effects of 6 and 12 Months Smoking Cessation on Airway Inflammation.

**I.E. Bouloukaki**, M. Tsoumakidou, I. Mitrouska, F. Oikonomidou, N.M. Siafakas, N. Tzanakis

ATS congress 2007, Publication Page: A599

**26.** Sleep Disorders Related Symptomatology in Professional Drivers: Preliminary Results.

C. Papadaki, N. Tzanakis, **I. Bouloukaki**, F. Economidou, N.M. Siafakas, S.E. Schiza.

ATS congress 2007, Publication Page: A65

**27.** Short term effect of smoking cessation on airway inflammation: preliminary results.

**I. Bouloukaki**, I. Mitrouska, E. Koutala, N.M. Siafakas, N. Tzanakis.

ERS congress 2006, P2307, 390s

**28.** Effects of 6 and 12 months smoking cessation on airway inflammation.

**I. Bouloukaki**, M. Tsoumakidou, I. Mitrouska, F. Oikonomidou, N.M. Siafakas, N. Tzanakis.

ATS congress 2006,

**29.** Utility of an algorithm predicting nasal continuous positive airway pressure.

SE. Sophia, **I. Bouloukaki**, N. Tzanakis, F. Ekonomidou, N.M. Siafakas  
ERS Annual Congress, Eur Respir J 2005; 26: Suppl. 49

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΩΝ

### ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

1. **Μπουλουκάκη I.**, Βλαχάκη Ε., Σχίζα Σ.Ε. Πολυυπνογραφία – αξιολόγηση παραμέτρων. Πνεύμων 2009 Τόμος 22, Συμπληρωματικό Τεύχος 2β, σελ. 13-15
2. Γ. Σακελλάρης, **I. Μπουλουκάκη**, Α. Δημοπούλου, Γ. Χαρίσης. Φίμωση και περιτομή στα παιδιά. Ανασκόπηση. Παιδιατρική 2008;71:355-360

### ΣΕ ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ (καταχώρηση: medline database)

1. Tsoumakidou M, **Bouloukaki I**, Thimaki K, Tzanakis N, Siafakas NM. Innate immunity proteins in chronic obstructive pulmonary disease and idiopathic pulmonary fibrosis. Exp Lung Res. 2010 Aug;36(6):373-80
2. Schiza SE, Mermigkis C, Panagiotis P, **Bouloukaki I**, Kallergis E, Tzanakis N, Tzortzaki E, Vlachaki E, Siafakas NM. C-reactive protein evolution in obstructive sleep apnoea patients under CPAP therapy. Eur J Clin Invest. 2010 Jul 13. [Epub ahead of print]
3. Schiza SE, **Bouloukaki I**, Mermigkis C, Panagou P, Tzanakis N, Moniaki V, Tzortzaki E, Siafakas NM.  
Utility of formulas predicting the optimal nasal continuous positive airway pressure in a Greek population.  
Sleep Breath. 2010 Apr 28. [Epub ahead of print] (IF: 1.672)
4. **Bouloukaki I**, Tsoumakidou M, Vardavas CI, Mitrouska I, Koutala E, Siafakas NM, Schiza SE, Tzanakis N.  
Maintained smoking cessation for 6 months equilibrates the percentage of sputum CD8+ lymphocyte cells with that of nonsmokers.  
Mediators Inflamm. 2009;2009:812102. Epub 2010 Feb 23. (IF: 1.395)
5. Schiza SE, Simantirakis E, **Bouloukaki I**, Mermigkis C, Arfanakis D, Chrysostomakis S, Chlouverakis G, Kallergis EM, Vardas P, Siafakas NM.

Sleep patterns in patients with acute coronary syndromes. *Sleep Med.* 2010 Jan 16. [Epub ahead of print] (IF: 3.163)

**6.** Increased apoptosis of neutrophils in induced sputum of COPD patients.

Makris D, Vrekoussis T, **Izoldi M**, Alexandra K, Katerina D, Dimitris T, Michalis A, Tzortzaki E, Siafakas NM, Tzanakis N.

*Respir Med.* 2009 Aug;103(8):1130-5. Epub 2009 Mar 28.(IF:2.238)

**7.** Decreased Sputum Mature Dendritic Cells in Healthy Smokers and Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease.

Tsoumakidou M, **Bouloukaki I**, Koutala H, Kouvidi K, Mitrouska I, Zakynthinos S, Tzanakis N, Jeffery PK, Siafakas NM.

*Int Arch Allergy Immunol.* 2009;150(4):389-397. Epub 2009 Jul 1(IF:2.131)

**8.** Increased Bronchoalveolar Lavage Fluid CD1c Expressing Dendritic Cells in Idiopathic Pulmonary Fibrosis.

Tsoumakidou M, Karagiannis KP, **Bouloukaki I**, Zakynthinos S, Tzanakis N, Siafakas NM.

*Respiration.* 2009 Jun 24;78(4):446-452. [Epub ahead of print] (IF:1.985)

**9.** Smoke-free hospitals in Greece: Personnel perceptions, compliance and smoking habit.

Vardavas CI, **Bouloukaki I**, Linardakis MK, Tzilepi P, Tzanakis N, Kafatos AG.

*Tob Induc Dis.* 2009 Mar 31;5(1):8.

**10.** Second hand smoke exposure and excess heart disease and lung cancer mortality among hospital staff in Crete, Greece: a case study.

Vardavas CI, **Mpouloukaki I**, Linardakis M, Ntzilepi P, Tzanakis N, Kafatos A

*Int J Environ Res Public Health.* 2008 Sep;5(3):125-9. (IF:0.965)

**11.** Pharmacological approaches to smoking cessation.

Mitrouska I, **Bouloukaki I**, Siafakas NM.

*Pulm Pharmacol Ther.* 2007;20(3):220-32. Epub 2006 Feb 23. Review.(IF:2.244)

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το κάπνισμα αποτελεί το κύριο παράγοντα ανάπτυξης αρκετών χρόνιων παθήσεων του πνεύμονα, όπως η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ) και ο καρκίνος του πνεύμονα. Η διακοπή του καπνίσματος για 10 έτη μειώνει σημαντικά τον κίνδυνο για καρκίνο του πνεύμονα κατά 2-3 φορές. Επιπλέον, η διατήρηση της αποχής από το κάπνισμα μειώνει τον κίνδυνο μείωσης αναπνευστικής λειτουργίας στα επίπεδα των μη καπνιστών και μειώνει τον κίνδυνο ανάπτυξης κλινικά σημαντικής ΧΑΠ. Αυτά τα ευρήματα δείχνουν ότι οι επιδράσεις του καπνίσματος στον πνεύμονα είναι μερικώς αναστρέψιμες μετά τη διακοπή του καπνίσματος.

Οι μηχανισμοί της πνευμονικής βλάβης που προκαλείται από το κάπνισμα δεν έχουν ακόμη πλήρως διευκρινιστεί. Όμως, έχει προταθεί ότι οι πρώιμες φλεγμονώδεις αντιδράσεις στον καπνό του τσιγάρου είναι κρίσιμες για την ανάπτυξη επακόλουθης ιστικής βλάβης και νόσου σε ευαίσθητα άτομα. Ο στόχος της παρούσας διατριβής ήταν να μελετήσουμε δείκτες φλεγμονής και οξειδωτικού stress στα πτύελα και ρινικό έκκριμα 'υγιών καπνιστών' πριν και μετά από μία περίοδο 6 και 12 μηνών από τη διακοπή του καπνίσματος.

Συγκεντρώθηκαν 76 υγιείς καπνιστές ηλικίας (μ.ο.  $\pm$  απόκλιση)  $48 \pm 9$  έτη, με ιστορικό καπνίσματος  $57 \pm 18$  pack years,  $FEV_1$  (% προβλ.)  $104 \pm 11$ , και Fagerstrom score  $8 \pm 2$ , από το ιατρείο διακοπής καπνίσματος, πριν την έναρξη του πρωτοκόλλου διακοπής του καπνίσματος. Όλοι οι καπνιστές συμμετείχαν στο ίδιο πρόγραμμα συμπεριφοράς και ανάλογα με το βαθμό εξάρτησης (Fagerstrom test) έλαβαν θεραπεία υποκατάστασης με νικοτίνη και/ή βουπροπιόνη για τη θεραπεία διακοπής καπνίσματος. Δέκα μη καπνιστές (που δεν είχαν καπνίσει ποτέ) επιστρατεύτηκαν μέσω διαφήμισης και αποτέλεσαν την ομάδα των μαρτύρων (controls). Όλα τα άτομα ήταν ελεύθερα λοιμώξεων αναπνευστικού κατά τη μελέτη ή κατά το μήνα που προηγήθηκε της μελέτης και στον επανέλεγχο μετά από 6 και 12 μήνες. Τα άτομα δεν έπασχαν από κάποια νόσο και δεν ελάμβαναν φαρμακευτική αγωγή στην πρώτη επίσκεψη, ενώ κανείς δεν παρουσίασε συμπτώματα χρόνιας βρογχίτιδας. Επιπλέον, ο έλεγχος λειτουργικών δοκιμασιών του



πνεύμονα ήταν εντός φυσιολογικών ορίων και η ακτινογραφία θώρακος ήταν φυσιολογική.

Κατόπιν έγινε πρόκληση και επεξεργασία των πτυέλων καθώς και λήψη ρινικού εκκρίματος. Μετρήθηκαν πριν τη διακοπή του καπνίσματος και 6 και 12 μήνες μετά τη διακοπή του καπνίσματος, σε ασθενείς που είχαν επαρκές και καλής ποιότητας πτύελο, οι πληθυσμοί των φλεγμονωδών κυττάρων και οι υποπληθυσμοί των T-λεμφοκυττάρων στα πτύελα χρησιμοποιώντας τεχνικές κυτταροχημείας και ανοσοκυτταροχημείας, καθώς και δείκτες nitrosative/οξειδωτικού stress με τον υπολογισμό των iNOS και νιτροτυροσίνης με την τεχνική της ανοσοϊστοχημείας. Επιπλέον στα υπερκείμενα των πτυέλων και ρινικών εκκριμάτων υπολογίστηκαν οι δείκτες φλεγμονής SLPI, CC16, ελαφίνη και HBD-2. Το στατιστικό πακέτο StatsDirect (SPSS Statistics 17.0.0 CHICAGO IL, USA) χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των αποτελεσμάτων. Στην ομάδα των ατόμων που επιτυχώς κατάφεραν να διακόψουν το κάπνισμα, διαφορές μεταξύ καπνιστών πριν και μετά από 6 και 12 μήνες από τη διακοπή του καπνίσματος ελέγχθηκαν χρησιμοποιώντας το Friedman test ακολουθούμενο από το Wilcoxon signed-rank test. Διαφορές μεταξύ καπνιστών και της ομάδας των control ελέγχθηκαν με το Mann-Whitney U test. Το  $p < 0.05$  θεωρήθηκε στατιστικά σημαντικό.

Συγκρίνοντας τα δείγματα καπνιστών πριν τη διακοπή του καπνίσματος (baseline) με αυτά των μη καπνιστών, τα ποσοστά των φλεγμονωδών κυττάρων (ουδετερόφιλα, μακροφάγα) στα πτύελα δε βρέθηκαν να διαφέρουν μεταξύ καπνιστών και μη καπνιστών στο baseline, και δε βρέθηκαν να μεταβάλλονται στους καπνιστές 6 μήνες μετά τη διακοπή του καπνίσματος. Όμως, μετά από 12 μήνες διακοπής του καπνίσματος, το ποσοστό των ουδετεροφίλων ήταν υψηλότερο (61 vs. 55,  $p < 0.05$ ) και το ποσοστό των μακροφάγων χαμηλότερο (34.5 vs. 40.6,  $p < 0.05$ ) σε σύγκριση με τις μετρήσεις αναφοράς (baseline). Επιπλέον οι μη καπνιστές βρέθηκε να έχουν υψηλότερο ποσοστό υποπληθυσμών CD8<sup>+</sup> λεμφοκυττάρων και επακόλουθα χαμηλότερο λόγο CD4<sup>+</sup> /CD8<sup>+</sup> (22.3 vs. 13.9,  $p < 0.05$  and 2.3 vs. 3.8,  $p < 0.05$  αντίστοιχα). Επιπρόσθετα, το ποσοστό των CD8<sup>+</sup> T-κυττάρων αυξήθηκε μετά από 6 μήνες σε αυτούς που διέκοψαν το κάπνισμα και έφτασε τα επίπεδα των controls. Από τον 6 έως και το 12 μήνα του επανελέγχου, το ποσοστό των CD8<sup>+</sup> T-κυττάρων δεν διέφερε σημαντικά. Το ποσοστό των CD4<sup>+</sup> T-

λεμφοκυττάρων δε βρέθηκε να διαφέρει μεταξύ των καπνιστών και των controls, ούτε βρέθηκε να μεταβάλλεται μετά τη διακοπή τόσο μετά από 6, όσο και μετά από 12 μήνες στον επανέλεγχο. Όταν υπολογίστηκε ο λόγος CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>, βρέθηκε πιο αυξημένος στους καπνιστές στο baseline από ότι στους controls. Άλλωστε, μειώθηκε μέσα σε 6 μήνες από τη διακοπή του καπνίσματος, ενώ, όπως και με το ποσοστό των CD8<sup>+</sup> κυττάρων, ο λόγος CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> δεν άλλαξε μετά από τους 6 μήνες της διακοπής.

Όσον αφορά την έκφραση των iNOS και νιτροτυροσίνης στα φλεγμονώδη κύτταρα του πτυέλου (μακροφάγα, ουδετερόφιλα) πριν και μετά τη διακοπή καπνίσματος, βρέθηκε ότι το ποσοστό των iNOS<sup>+</sup> και το ποσοστό των νιτροτυροσίνη θετικών φλεγμονωδών κυττάρων ήταν αυξημένο στους καπνιστές (baseline) σε σύγκριση με τους μη καπνιστές ( $p < 0.0001$  and  $p = 0.001$ , αντίστοιχα). Επιπλέον, τα % iNOS<sup>+</sup> φλεγμονώδη κύτταρα μειώθηκαν 6 μήνες ( $p < 0.0001$ ) και μετά από 1 έτος από τη διακοπή του καπνίσματος ( $p = 0.002$ ), πλησιάζοντας τα επίπεδα των μη καπνιστών. Ομοίως, τα % nitrotyrosine<sup>+</sup> φλεγμονώδη κύτταρα μειώθηκαν 6 μήνες ( $p = 0.001$ ) και 1 έτος μετά τη διακοπή του καπνίσματος ( $p = 0.004$ ) στα επίπεδα των μη καπνιστών.

Τέλος, όσον αφορά τους δείκτες φλεγμονής στα υπερκείμενα των πτυέλων και των ρινικών εκκρινμάτων, οι συγκεντρώσεις των SLPI και ελαφίνης βρέθηκαν σημαντικά αυξημένες στο ρινικό έκκριμα σε σύγκριση με τα πτύελα ( $p = 0.0001$  και  $p = 0.022$ , αντίστοιχα), ενώ το αντίθετο παρατηρήθηκε για την CC16 ( $p = 0.001$ ). Τα επίπεδα της HBD-2 στο ρινικό έκκριμα δεν ήταν ανιχνεύσιμα. Συγκρίνοντας τα δείγματα καπνιστών πριν τη διακοπή του καπνίσματος (baseline) με αυτά των μη καπνιστών, οι τελευταίοι βρέθηκε να έχουν χαμηλότερα επίπεδα SLPI ( $p = 0.005$ ) καθώς και χαμηλότερα επίπεδα CC16 ( $p = 0.08$ ), ενώ δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στα επίπεδα της ελαφίνης και HBD-2. Επιπλέον, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο προαναφερθεισών ομάδων στις συγκεντρώσεις των SLPI και CC16 στο ρινικό έκκριμα, εκτός από τα επίπεδα της ελαφίνης που βρέθηκαν χαμηλότερα στους μη καπνιστές σε σύγκριση με τους καπνιστές ( $p = 0.007$ ). Τα επίπεδα των SLPI και CC16 δε διέφεραν πριν και 6 μήνες μετά τη διακοπή του καπνίσματος ( $p = 0.118$  και  $p = 0.543$  αντίστοιχα), ούτε πριν και 1 έτος μετά τη διακοπή του καπνίσματος ( $p = 0.363$  και  $p = 0.470$  αντίστοιχα) στα πτύελα, ενώ

στο ρινικό έκκριμα μόνο τα επίπεδα του SLPI μειώθηκαν 12 μήνες μετά τη διακοπή καπνίσματος ( $p=0.033$ ).

Ανακεφαλαιώνοντας, τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι η διακοπή του καπνίσματος αυξάνει το ποσοστό των CD8<sup>+</sup> T-κυττάρων και μειώνει το λόγο CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>, καθώς επίσης και τους δείκτες nitrosative/οξειδωτικού stress στα προκλητά πτύελα μέσα σε 6 μήνες από τη διακοπή του καπνίσματος στο επίπεδο των μη καπνιστών, και διατηρούνται στο επίπεδο αυτό σε αυτούς που διατήρησαν την αποχή τους από το κάπνισμα στους 12 μήνες. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι κάποιοι παράγοντες της φλεγμονής και των ανοσολογικών διεργασιών που λαμβάνουν χώρα στους αεραγωγούς των καπνιστών χωρίς προϋπάρχουσα αναπνευστική διαταραχή ή τρέχουσα λοίμωξη αναπνευστικού μπορούν να αναστραφούν στα άτομα αυτά που καταφέρνουν επιτυχώς να διακόψουν το κάπνισμα. Μέρος των ανωτέρω αποτελεσμάτων δημοσιεύτηκαν στο περιοδικό *Mediators of Inflammation* (**Bouloukaki I, Tsoumakidou M, Vardavas CI, Mitrouska I, Koutala E, Siafakas NM, Schiza SE, Tzanakis N. Maintained smoking cessation for 6 months equilibrates the percentage of sputum CD8+ lymphocyte cells with that of nonsmokers. Mediators Inflamm. 2009;2009:812102. Epub 2010 Feb 23**)

### Συμπληρωματικό Πρωτόκολλο 1

Το κάπνισμα αποτελεί μια κύρια αιτία νοσηρότητας και θνητότητας παγκοσμίως καθώς και την κύρια αιτία της χρόνιας αποφρακτικής πνευμονοπάθειας (ΧΑΠ). Παρά την εκτενή έρευνα, η παθογένεση των νόσων που σχετίζονται με το κάπνισμα παραμένει αρκετά απροσδιόριστη. Πρόσφατα, βρέθηκε ότι τα δενδριτικά κύτταρα (DCs) στον πνεύμονα ίσως συνεισφέρουν στην παθογένεση των νόσων που σχετίζονται με το κάπνισμα, όπως η ΧΑΠ. Σκοπός του συμπληρωματικού πρωτοκόλλου της παρούσας διατριβής είναι να μελετήσει τα ώριμα DCs στον πνεύμονα σε υγιείς καπνιστές και σε ασθενείς με ΧΑΠ που καπνίζουν.

Έγινε αναγνώριση των DCs στα πτύελα που εκφράζουν τους δείκτες ωρίμανσης CD83 και DC-lysosome associated membrane protein (DC-LAMP) και των υποπληθυσμών των DC (μυελοειδών και πλασμακυτοειδών DCs) με

κυτταρομετρία ροής σε υγιείς καπνιστές ηλικίας (μ.ο.  $\pm$  απόκλιση)  $51 \pm 9$  έτη, ιστορικό καπνίσματος  $62 \pm 31$  pack years και  $FEV_1$   $101 \pm 12$  % προβλ. , πριν την είσοδο τους σε πρόγραμμα διακοπής καπνίσματος ( $n = 30$ ), στους ίδιους καπνιστές 6 μήνες μετά τη διακοπή του καπνίσματος ( $n = 11$ ) και σε ασθενείς με ΧΑΠ ηλικίας  $60 \pm 7$  έτη, και  $FEV_1$   $64 \pm 12$  ( $n = 28$ , 14 νυν και 14 πρώην καπνιστές). Η επιστράτευση των ατόμων έγινε από το ιατρείο διακοπής καπνίσματος του τμήματος εξωτερικών ιατρείων του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου. Μελετήσαμε μόνο μη αλλεργικά και μη ατοπικά άτομα (η ατοπία εκτιμήθηκε με δερματικές δοκιμασίες νυγμού). Τα άτομα που ανέφεραν λοίμωξη αναπνευστικού ή επιδείνωση κατά τις προηγούμενες 6 εβδομάδες αποκλείστηκαν. Δώδεκα υγιείς μη καπνιστές χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες. Οι αριθμοί των DC εκφράστηκαν ως ποσοστό των συνολικών  $CD45 +$  λευκοκυττάρων των πτυέλων. Οι διαφορές μεταξύ των ίδιων καπνιστών πριν και μετά τη διακοπή του καπνίσματος ( $n = 11$ ) εξετάστηκαν με το Wilcoxon signed ranks test. Οι διαφορές μεταξύ των ασθενών με ΧΑΠ ( $n = 28$ ), της συνολικής ομάδας των καπνιστών πριν τη διακοπή του καπνίσματος ( $n = 30$ ), των καπνιστών μετά τη διακοπή του καπνίσματος ( $n = 11$ ) και των μη καπνιστών ( $n = 12$ ) ελέγχθηκαν με την Kruskal-Wallis ανάλυση ακολουθούμενη από το Mann-Whitney U test. Το software SPSS 16.0 για windows (SPSS Inc., Chicago, Ill, USA) χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των αποτελεσμάτων. Το  $p < 0.05$  θεωρήθηκε στατιστικά σημαντικό.

Τα  $CD83 +$  και  $DC-LAMP +$  ώριμα DCs βρέθηκαν μειωμένα στους υγιείς καπνιστές πριν τη διακοπή του καπνίσματος σε σύγκριση με μετά τη διακοπή του καπνίσματος ( $p = 0.003$  και  $p = 0.049$ , αντίστοιχα) και στους καπνιστές πριν τη διακοπή του καπνίσματος σε σύγκριση με τους μη καπνιστές ( $p = 0.027$  και  $p = 0.028$  αντίστοιχα). Οι ασθενείς με ΧΑΠ, τόσο οι νυν, όσο και οι πρώην καπνιστές, παρουσίασαν μειωμένα  $CD83 +$  ώριμα DCs σε σύγκριση με τους μη καπνιστές και τους καπνιστές μετά τη διακοπή του καπνίσματος ( $p = 0.042$  και  $p = 0.004$ , αντίστοιχα).

Συμπεραίνουμε ότι το κάπνισμα και η ΧΑΠ σχετίζονται με μείωση των ώριμων DCs στον πνεύμονα. Υποθέτουμε ότι αυτή η μείωση εμπλέκεται στην ανοσοπαθογένεση των νόσων που σχετίζονται με το κάπνισμα, όπως η ΧΑΠ.

Τα ανωτέρω αποτελέσματα δημοσιεύτηκαν στο περιοδικό International Archives of Allergy and Immunology (Tsoumakidou M, **Bouloukaki I**, Koutala H, Kouvidi K, Mitrouska I, Zakyntinos S, Tzanakis N, Jeffery PK, Siafakas NM. Decreased Sputum Mature Dendritic Cells in Healthy Smokers and Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Int Arch Allergy Immunol. 2009;150(4):389-97. Epub 2009 Jul 1).

### Συμπληρωματικό πρωτόκολλο 2

Η έκθεση στο παθητικό κάπνισμα (Secondhand smoke-SHS) αποτελεί μια σοβαρή απειλή για τη δημόσια υγεία, καθώς και μια σημαντική αιτία καρκίνου του πνεύμονα και καρδιακής νόσου στους μη καπνιστές. Αν και στα ελληνικά νοσοκομεία υπάρχει νόμος για την απαγόρευση του καπνίσματος από το 2002, δεν τηρείται επαρκώς. Σκοπός του συμπληρωματικού πρωτοκόλλου της παρούσας διατριβής είναι να μετρήσουμε την έκθεση του παθητικού καπνού σε διάφορους χώρους σε ένα μεγάλο ελληνικό δημόσιο νοσοκομείο και να εκτιμήσουμε τον επιπρόσθετο κίνδυνο θνητότητας καρκίνου του πνεύμονα και καρδιακής νόσου του προσωπικού του νοσοκομείου λόγω της επαγγελματικής τους έκθεσης στο παθητικό κάπνισμα. Καταγράφηκαν αναπνεόμενα αιωρούμενα σωματιδία (respirable suspended particles - RSP) στον αέρα των PM<sub>2.5</sub> και ο επιπρόσθετος κίνδυνος θνητότητας του προσωπικού εκτιμήθηκε με τη βοήθεια εξισώσεων πρόβλεψης.

Δεν μετρήθηκαν καθόλου επίπεδα SHS-RSP μόνο στη μονάδα εντατικής θεραπείας και στις αίθουσες των χειρουργείων με μέσο επίπεδο SHS-RSP των 11  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ , που είναι ακόμη χαμηλότερα από τα επίπεδα του εξωτερικού περιβάλλοντος αναφοράς των 27  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ . Από την άλλη μεριά, στις περισσότερες κλινικές το κάπνισμα είτε ήταν αντιληπτό, ή προφανές. Το μέσο επίπεδο SHS-RSP στις ανοικτές κλινικές εκτιμάται στα 84  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ , με εύρος από 17 έως 141  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ , με τις κατώτερες τιμές στις παιδιατρικές κλινικές (γενική παιδιατρική, παιδιατρική αιματολογία, κτλ.)

Κατά μέσο όρο 1.12 (0.23 με 1.88) εργάτες ανά 1000 στις ανοικτές κλινικές και 2.35 ανά 1000 (0.55-12.2) του προσωπικού διοίκησης θα πεθάνει από καρκίνο του πνεύμονα λόγω της έκθεσης στον SHS του νοσοκομείου. Ο

επιπρόσθετος κίνδυνος θνητότητας καρκίνου του πνεύμονα στη ΜΕΘ ή στα χειρουργεία δεν υπολογίστηκε επειδή οι μετρήσεις περιβαλλοντικού αερολύματος ήταν ακόμη πιο μικρές από τα βασικές μετρήσεις του εξωτερικού περιβάλλοντος και επομένως δεν μπορεί να αποδοθεί στο SHS. Η επιπρόσθετη θνητότητα από καρδιακή νόσο υπολογίστηκε δεκαπλάσια από των περιπτώσεων επιπρόσθετου καρκίνου του πνεύμονα και η συνάθροιση και των δύο οδήγησε στις συνολικές επιπρόσθετες περιπτώσεις θνητότητας των 12.3 (2.5 to 20.7) και 25.9 ανά 1000 (6-134) των περιπτώσεων ανά 1000 ανά 40 έτη στις ανοικτές κλινικές και στην πτέρυγα διοίκησης αντίστοιχα.

Από τη μελέτη μας, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι ο παθητικός καπνός σε ένα τυπικό νοσοκομείο στην Ελλάδα είναι διαδεδομένος και θέτει σε κίνδυνο την υγεία των ασθενών και του προσωπικού του νοσοκομείου. Παρόλο που υπάρχει πολιτική που απαγορεύει το κάπνισμα στα νοσοκομεία, αγνοείται απερίφραστα. Όταν κάποιος σκεφτεί τον επιπρόσθετο κίνδυνο θνητότητας και τις άμεσες επιπτώσεις στην υγεία του παθητικού καπνού, είναι επιβεβλημένο ότι η νομοθεσία που απαγορεύει το κάπνισμα στα νοσοκομεία στην Ελλάδα να επιβληθεί για την προστασία όχι μόνο των ασθενών αλλά επίσης και του ιατρικού και νοσηλευτικού προσωπικού από την ακούσια έκθεση στον παθητικό καπνό και τις συνέπειές του. Τα ανωτέρω αποτελέσματα δημοσιεύτηκαν στο περιοδικό *International Journal of Environmental Research and Public Health* (Vardavas CI, **Mpouloukaki I**, Linardakis M, Ntzilepi P, Tzanakis N, Kafatos A. Second hand smoke exposure and excess heart disease and lung cancer mortality among hospital staff in Crete, Greece: a case study. *Int J Environ Res Public Health*. 2008 Sep;5(3):125-9)

# **ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

# **ΕΝΟΤΗΤΑ Ι**

## **ΚΑΠΝΙΣΜΑ**



# Κεφάλαιο 1

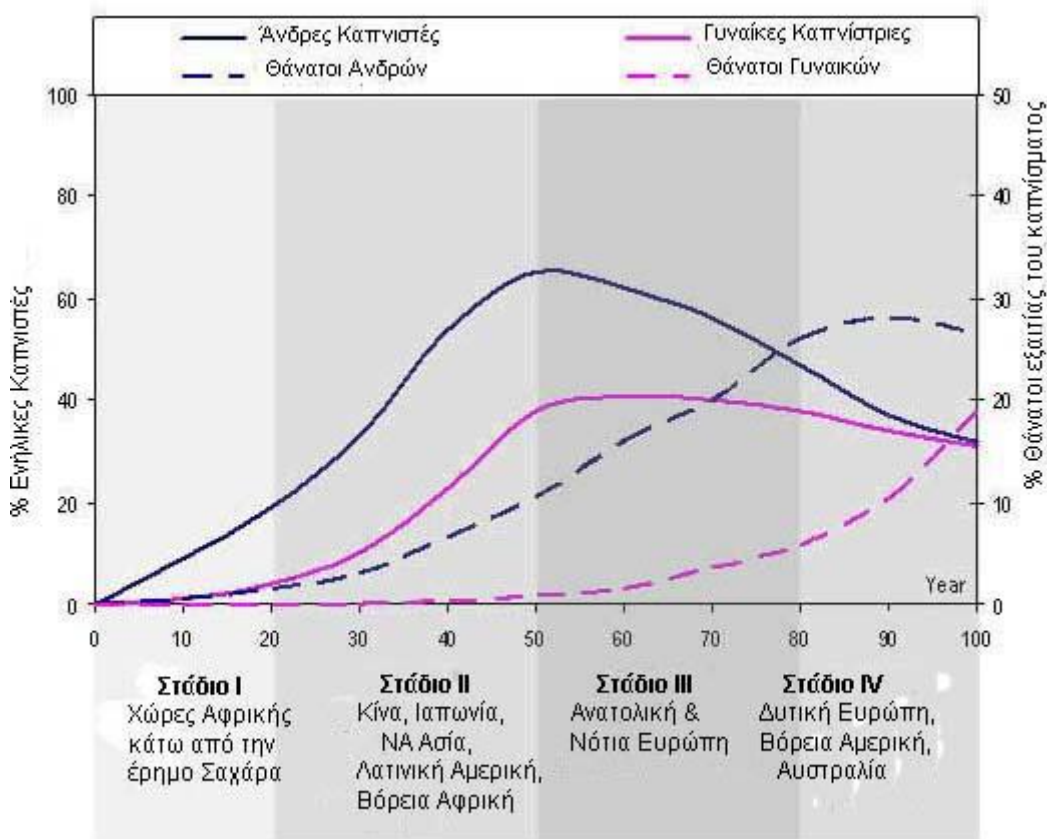
## ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Το κάπνισμα αποτελεί ένα από τα μεγαλύτερα προβλήματα δημόσιας υγείας όχι μόνο σε χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης όπως η Ελλάδα, αλλά και παγκοσμίως. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας υπολογίζονται σε 1,25 δισεκατομμύρια οι καπνιστές παγκοσμίως, η πλειοψηφία των οποίων ζουν στις αναπτυσσόμενες χώρες (800 εκατομμύρια). Ο καπνός προκαλεί περίπου τέσσερα εκατομμύρια θανάτους ετησίως σε παγκόσμιο επίπεδο, αριθμός που ισοδυναμεί με 10.000 θανάτους ημερησίως, από ασθένειες που σχετίζονται με το κάπνισμα. Με τον τρέχοντα ρυθμό εξέλιξης, μέχρι το τέλος της δεκαετίας του 2020, οι θάνατοι θα έχουν αυξηθεί σε περίπου 10 εκατομμύρια ετησίως. Τα προϊόντα του καπνού ευθύνονται για 1,2 εκατομμύρια θανάτους ετησίως στην Ευρωπαϊκή Περιοχή του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (1).

Ενώ το κάπνισμα γενικά είναι πέντε φορές πιο διαδεδομένο στους άνδρες από ότι στις γυναίκες (2), το χάσμα φαίνεται να μειώνεται σε νεότερες ηλικίες (3,4). Στις αναπτυγμένες χώρες το ποσοστό του καπνίσματος έχει φτάσει στο αποκορύφωμά του και έχει ξεκινήσει να μειώνεται, όμως στις γυναίκες συνεχίζει να ανεβαίνει (5). Από το 2002 περίπου 20% των νέων εφήβων (13-15) καπνίζουν παγκοσμίως, από τα οποία 80,000 με 100,000 παιδιά ξεκινούν το κάπνισμα κάθε μέρα-περίπου τα μισά από αυτά ζουν στην Ασία. Τα μισά που ξεκινούν το κάπνισμα στην εφηβεία συνεχίζουν να καπνίζουν για 15 με 20 έτη (6).

Συνήθως η 'επιδημία του καπνίσματος' σε ένα πληθυσμό αναπτύσσεται σε τέσσερα στάδια: μία αύξηση και κατόπιν μία μείωση του επιπολασμού του καπνίσματος, ακολουθούμενες από μια όμοια τάση σε ασθένειες που σχετίζονται από το κάπνισμα δύο με τρεις δεκαετίες αργότερα (Εικόνα 1). Διάφορες χώρες βρίσκονται σε διαφορετικά στάδια της επιδημίας του καπνίσματος, με τρεις έως τέσσερις δεκαετίες καθυστέρηση μεταξύ της αιχμής στην επίπτωση του καπνίσματος και της επακόλουθης αιχμής στους οφειλομένους στο κάπνισμα θανάτους. Και ενώ οι αναπτυγμένες χώρες ίσως είναι στο στάδιο 4 της καπνιστικής επιδημίας, σε αρκετές αναπτυσσόμενες

χώρες η επιδημία είναι μόλις στην αρχή (7). Τις τελευταίες δύο δεκαετίες η επίπτωση του καπνίσματος έχει μειωθεί στις υψηλού εισοδήματος χώρες, ενώ αντίθετα οι ρυθμοί καπνίσματος αυξάνονται στις χαμηλού και μέσου εισοδήματος χώρες. Επιπλέον, σε γενικές γραμμές ο πληθυσμός των αναπτυσσόμενων χωρών είναι λιγότερο ενημερωμένος για τους κινδύνους της υγείας που απορρέουν από το κάπνισμα, αλλά και για τα ουσιαστικά οφέλη που προκύπτουν από τη διακοπή του καπνίσματος. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας 58.8 εκατομμύρια θάνατοι σημειώνονται παγκοσμίως (8) από τους οποίους τα 5.4 εκατομμύρια αποδίδονται στο κάπνισμα (9) και από το 2002, το 70% των θανάτων αυτών σημειώνεται στις αναπτυσσόμενες χώρες (10).



**Εικόνα 1.** Στάδια της παγκόσμιας επιδημίας του καπνίσματος. Από τους Lopez AD, et al. Ένα περιγραφικό μοντέλο της επιδημίας του καπνίσματος στις αναπτυσσόμενες χώρες. 1993;3:242-247

Η Ελλάδα είναι μία από τις χώρες με τα υψηλότερα ποσοστά κατανάλωσης καπνού παγκοσμίως (57% των ανδρών και 23% των γυναικών). Ανάλογα με την ηλικία και τον τόπο διαμονής ο επιπολασμός του

καπνίσματος ποικίλει, με περιοχές πόλεων, όπως η Αθήνα, να έχουν υψηλότερα ποσοστά καπνίσματος ενηλίκων (51% των ανδρών και 39% των γυναικών) σε σχέση με αγροτικές περιοχές (Πίνακας 1). Αξίζει να σημειωθεί όμως ότι στην Κρήτη το ποσοστό καπνίσματος στις γυναίκες είναι υψηλότερο από αυτό του συνολικού πληθυσμού (55% των ανδρών και 38% των γυναικών) (11).

**Πίνακας 1.** Μελέτες επιπολασμού του καπνίσματος στην Ελλάδα (2000-2005). Από τους Vardavas CI, Kafatos A. Smoking policy and prevalence in Greece: an overview. *European Journal of Public Health*. 2007;17:211–213.

Year <sub>i</sub>	Study <sub>ii</sub>	Where	Population	Age group	Smoking prevalence			Authors
					Male	Female	General	
2005	Adults	Greece <sub>iii</sub>	5489	25–59	57%	23%	40%	Huisman et al. <sup>12</sup>
2005	High School students	Athens	909	16–19	–	–	50.2%	Labiris et al. <sup>7</sup>
2005	High School students	Northern Greek cities	9276	15–18	32.6%	26.7%	30%	Sichletidis L et al. <sup>11</sup>
2003	Medical Students	Crete	865	20–24	33.2%	28.4%	–	Mammas et al. <sup>8</sup>
2003	Medical Students	Athens	430	–	–	–	28%	Avlonitou et al. <sup>9</sup>
2003	Adults	Athens	3042	18–89	51%	39%	–	Pitsavos et al. <sup>3</sup>
2003	Adults	Crete	1192	18+	55%	38%	–	
	Children	Crete	634	15	–	–	10%	Linardakis et al. <sup>5</sup>
2002	University Students (Non health studies)	Ioannina,-Athens	794	17–30	44%	42.5%	–	Steptoe et al. <sup>10</sup>
				13–14	–	–	16.2%	
2000	High School students	Athens, Thessaloniki	8557	15–16	–	–	32.1%	Kokkevi et al. <sup>6</sup>
				17–18	–	–	40.1%	

## **Βιβλιογραφία**

1. Peto R. Smoking and death: the past 40 years and the next 40. *BMJ* 1994;309:937-939
2. Guindon, G. Emmanuel; Boisclair, David (2003) Past, current and future trends in tobacco use, Washington DC: The International Bank for Reconstruction and Development / The World Bank, pp. 13–16,
3. The World Health Organization, and the Institute for Global Tobacco Control, Johns Hopkins School of Public Health (2001). "Women and the Tobacco Epidemic: Challenges for the 21st Century" World Health Organization. pp. 5–6.
4. "Surgeon General's Report—Women and Smoking". Centers for Disease Control and Prevention. 2001. pp. 47.
5. Peto, Richard; Lopez, Alan D; Boreham, Jillian; Thun, Michael (2006) Mortality from Smoking in Developed Countries 1950-2000: indirect estimates from national vital statistics, Oxford University Press, p. 9,
6. "WHO/WPRO-Smoking Statistics". World Health Organization Regional Office for the Western Pacific. 2002-05-28.
7. Lopez AD, Collishaw NE, Piha T. A descriptive model of the cigarette epidemic in developed countries. *Tobacco control* 1993;3:242-247
8. The Global Burden of Disease 2004 Update 2008, p. 8
9. The Global Burden of Disease 2004 Update 2008, p. 23
10. WHO/WPRO-Tobacco Fact sheet". World Health Organization Regional Office for the Western Pacific. 2007-05-29.
11. Vardavas CI, Kafatos A. Smoking policy and prevalence in Greece: an overview. *European Journal of Public Health*. 2007;17:211–213.

## Κεφάλαιο 2

### ΤΟ ΜΕΓΕΘΟΣ ΤΟΥ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΟΣ

#### Για την Υγεία

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, το κάπνισμα είναι νόσος και μάλιστα η συχνότερη χρόνια νόσος. Ο καπνιστής είναι ασθενής και έτσι πρέπει αν αντιμετωπίζεται. Έχει αποδειχθεί ότι το κάπνισμα προκαλεί τουλάχιστον 25 απειλητικές για τη ζωή ασθένειες ή ομάδες ασθενειών, πολλές από τις οποίες μπορούν να προληφθούν, να καθυστερήσουν ή να μετριαστούν με τη διακοπή του καπνίσματος. Ο κίνδυνος εκδήλωσης νόσου δεν είναι ίδιος σε όλους τους καπνιστές. Υπάρχει ισχυρή δόσο-εξαρτώμενη σχέση, ενώ το βαρύ κάπνισμα, η διάρκεια καπνίσματος, και η πρώιμη ηλικία έναρξης σχετίζονται με υψηλότερο κίνδυνο νόσου και θνητότητας που αποδίδεται στο κάπνισμα. Έρευνες έχουν δείξει ότι η διακοπή του καπνίσματος μειώνει σημαντικά τον κίνδυνο ασθενειών που σχετίζονται με τον καπνό, έτσι ώστε οι περισσότεροι από αυτούς τους θανάτους να μπορούν πιθανώς να προληφθούν μέσω εντατικών παρεμβάσεων για τη διακοπή του καπνίσματος. Για παράδειγμα 1 χρόνο μετά τη διακοπή, ο κίνδυνος εκδήλωσης καρδιακής νόσου μειώνεται στο μισό (1).

Οι μεγαλύτερες επιπτώσεις του καπνίσματος αφορούν νόσους του αναπνευστικού και καρδιαγγειακού συστήματος, όπως χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ), καρκίνο των πνευμόνων, στεφανιαία νόσο, άσθμα και εγκεφαλικά επεισόδια, οι οποίες μπορούν να γίνουν απειλητικές για τη ζωή. Αξίζει να σημειωθεί ότι ο κίνδυνος αυξάνεται στους νεότερους καπνιστές. Για παράδειγμα, ο κίνδυνος καρδιακού επεισοδίου είναι τουλάχιστον διπλάσιος πάνω από την ηλικία των 60 ετών, αλλά στους καπνιστές κάτω των 50 ετών ο κίνδυνος αυξάνεται πάνω από 5 φορές. Οι καπνιστές επίσης είναι σε μεγαλύτερο κίνδυνο για άλλες ασθένειες, όπως οστεοπόρωση, περιοδοντική νόσος, ανικανότητα, ανδρική στειρότητα και καταρράκτης. Το κάπνισμα στην εγκυμοσύνη σχετίζεται με αυξημένα ποσοστά εμβρυικού και περιγενετικού θανάτου και μειωμένο βάρος γέννησης. Το κάπνισμα μπορεί

επίσης να προκαλέσει εύκολη κόπωση, μείωση της όσφρησης και της γεύσης, ανικανότητα και επιτάχυνση της διαδικασίας της σωματικής γήρανσης.

Το συνολικό προσδόκιμο επιβίωσης επίσης μειώνεται στους συστηματικούς καπνιστές, από 10 ως 17.9 έτη λιγότερα σε σχέση με τους μη καπνιστές (2-4). Περίπου τα 2/3 των ανδρών καπνιστών θα πεθάνουν από ασθένειες λόγω του καπνίσματος (5). Τα άτομα που έχουν καπνίσει σε κάποια στιγμή στη ζωή τους έχουν περίπου 1 στις 10 πιθανότητα ανάπτυξης καρκίνου του πνεύμονα στη διάρκεια της ζωής τους (6). Στα άτομα που συνεχίζουν να καπνίζουν, ο κίνδυνος αυξάνεται στον 1 στους 6 (7). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μιας 50ετούς μελέτης 34,439 Βρετανών ιατρών, τουλάχιστον οι μισοί από τους ισόβιους καπνιστές πεθαίνουν νωρίτερα λόγω του καπνίσματος (8).

## **Για την οικονομία**

Η βιομηχανία του καπνού αποτελεί μία από τις πιο κερδοφόρες επιχειρήσεις. Αλλά το κόστος του καπνίσματος δεν περιορίζεται μόνο στα έσοδα από τις πωλήσεις των τσιγάρων, αλλά επεκτείνεται και στις τεράστιες ιατρικές δαπάνες κάθε χρόνο από τα προβλήματα υγείας που σχετίζονται με το κάπνισμα, καθώς και στη μείωση της παραγωγικότητας των καπνιστών. Για παράδειγμα, στις Ηνωμένες Πολιτείες, το οικονομικό κόστος του καπνίσματος ποικίλει από 0.6% έως 0.85% του ακαθάριστου εγχώριου προϊόντος, δηλαδή η δημόσια υπηρεσία υγείας εκτιμά συνολικό κόστος των 50 δισεκατομμυρίων δολλαρίων το έτος για τη θεραπεία ασθενειών που σχετίζονται με το κάπνισμα, και επιπρόσθετα 47 δις για την απώλεια εσόδων και παραγωγικότητας (9). Μάλιστα πολλές ασφαλιστικές εταιρίες δεν ασφαλίζουν καπνιστές. Το κόστος είναι σημαντικό αν υπολογιστεί επιπλέον τα έξοδα καθαριότητας, η σπατάλη για τις διαφημίσεις και η καταστροφή του περιβάλλοντος από τις πυρκαγιές που προκαλούνται από το τσιγάρο.

## **Βιβλιογραφία**

1. "Smoking Cessation Guidelines" American Heart Foundation
2. Doll R, Peto R, Boreham J, Sutherland I (2004). "Mortality in relation to smoking: 50 years' observations on male British doctors". *BMJ* 328 (7455): 1519.
3. Contingencies May–June 1990.  
<http://tobaccodocuments.org/ti/TIMN0020615-0620.html>
4. Ferrucci L, Izmirlian G, Leveille S, et al. (1999). "Smoking, physical activity, and active life expectancy". *Am. J. Epidemiol.* 149 (7): 645–53.
5. Doll R, Peto R, Wheatley K, Gray R, Sutherland I (1994). "Mortality in relation to smoking: 40 years' observations on male British doctors". *BMJ* 309 (6959): 901–11.
6. David C. Christiani. "Lung Cancer Susceptibility and Outcomes study". Harvard School of Public Health
7. Villeneuve PJ, Mao Y (1994). "Lifetime probability of developing lung cancer, by smoking status, Canada". *Canadian journal of public health. Revue canadienne de santé publique* 85 (6): 385–8.
8. *BMJ*, doi:10.1136/bmj.38142.554479.AE (published 22 June 2004)
9. Perrott S, Godfrey C. Economics of smoking cessation. *ABC of smoking cessation*, Blackwell Publishing, 34-36.

# Κεφάλαιο 3

## ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΣΤΟ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

Οι επιδράσεις του καπνίσματος στο αναπνευστικό σύστημα αφορούν τους αεραγωγούς με αποτέλεσμα να εμφανίζεται φλεγμονή και αναστρέψιμη απόφραξη των αεραγωγών (βρογχόσπασμος) (1), υπερέκκριση βλέννας και δυσκινησία των κροσσών (που συχνά οδηγεί σε εμφάνιση παραγωγικού βήχα, αύξηση της απόχρεμψης των καπνιστών και σε χρόνια βρογχίτιδα) (2), και το πνευμονικό παρέγχυμα με απελευθέρωση ελαστάσης και καταστροφή του παρεγχύματος του πνεύμονα (εμφύσημα). Το πρώτο από αυτά – η φλεγμονή- είναι γενικότερα εμφανής στους αυξημένους αριθμούς λευκοκυττάρων του βρογχιολοκυψελιδικού εκκρίματος και των δειγμάτων βιοψιών (3). Το δεύτερο – ο γνωστός παγκοσμίως βήχας των καπνιστών, προκαλείται από μεγάλο ποσό εκκρίσεων που προέρχονται από ένα μεγαλύτερο από το συνηθισμένο αριθμό βλεννωδών κυττάρων στο επιθήλιο των αεραγωγών (4). Όμως, το πιο κατανοητό από όλα τα παραπάνω είναι η απώλεια πνευμονικού παρεγχύματος, το εμφύσημα, που εμφανίζεται μόνο σε ορισμένους καπνιστές, πιθανώς λόγω του ξεχωριστού γενετικού υλικού του κάθε καπνιστή.

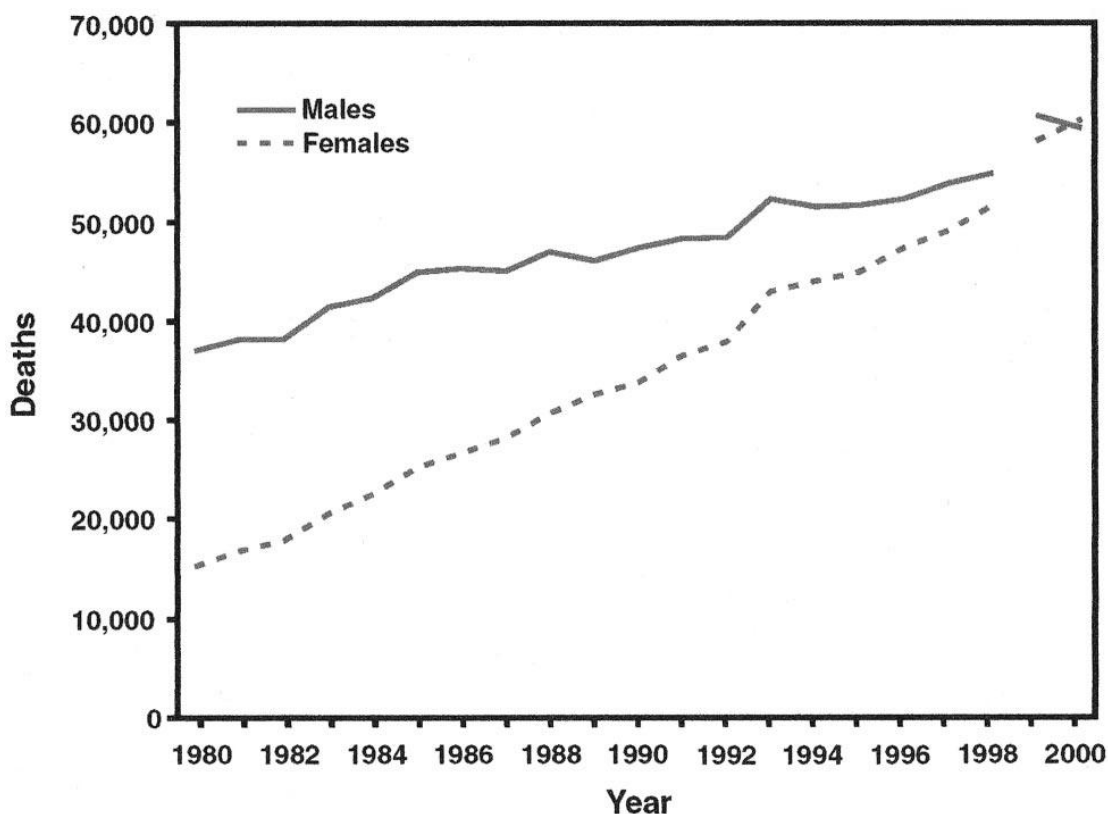
Πολλές παθήσεις του αναπνευστικού συστήματος συνδέονται με το κάπνισμα, οι κυριότερες των οποίων είναι η απλή βρογχίτιδα, η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια όπου το κάπνισμα που αποτελεί και το σημαντικότερο παράγοντα ανάπτυξής της, η πνευμονική υπέρταση, το άσθμα, οι διάμεσες πνευμονικές νόσοι και βεβαίως ο καρκίνος του πνεύμονα. Υπολογίζεται ότι το κάπνισμα προκαλεί περίπου 114,000 πρόωρους θανάτους κάθε χρόνο (5), από τους οποίους το ¼ αποδίδονται στον καρκίνο του πνεύμονα και περίπου το 1/5 στη χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ). Το αναπνευστικό σύστημα είναι ζωτικής αξίας και οτιδήποτε εμποδίζει τη λειτουργία του μπορεί να οδηγήσει στο θάνατο. Συχνά οι καρκίνοι αυτοί δεν ανακαλύπτονται μέχρις ότου είναι πολύ αργά-93% των ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα πεθαίνουν μέσα σε 5 έτη από τη διάγνωση και 75% πεθαίνουν μέσα στον πρώτο χρόνο (6).



Ο καρκίνος του πνεύμονα ήταν από τις πρώτες νόσους που βρέθηκαν ότι προκαλούνταν από το κάπνισμα. Μάλιστα φαίνεται ότι σκοτώνει περισσότερους ανθρώπους από ότι οποιοσδήποτε άλλος καρκίνος και περίπου 90% αυτών των θανάτων προκαλούνται από το κάπνισμα (7). Σε σύγκριση με τους μη καπνιστές, οι άνδρες που καπνίζουν είναι 23 φορές περισσότερο πιθανό να αναπτύξουν καρκίνο του πνεύμονα, ενώ οι γυναίκες που καπνίζουν 13 φορές περισσότερο. Το κάπνισμα τσιγάρων με λιγότερη πίσσα δε μειώνει σημαντικά τον κίνδυνο καρκίνου του πνεύμονα. Αν και τα χαρακτηριστικά των τσιγάρων έχουν αλλάξει τα τελευταία 50 έτη και το ποσό της πίσσας και της νικοτίνης έχουν μειωθεί σημαντικά, ο κίνδυνος καρκίνου του πνεύμονα στους καπνιστές δεν έχει μειωθεί. Η επίπτωση και τα ποσοστά θνητότητας στους άνδρες τώρα αρχίζουν και μειώνονται, αντανακλώνοντας τα παλαιά πρότυπα χρήσης τσιγάρου, ενώ τα ποσοστά στις γυναίκες ακόμη ανεβαίνουν. Το αδενοκαρκίνωμα έχει γίνει τώρα ο πιο συχνός τύπος καρκίνου του πνεύμονα στους καπνιστές. Ο κίνδυνος καρκίνου του πνεύμονα γενικά αυξάνεται ευθέως με τον αριθμό των τσιγάρων και τον αριθμό των ετών καπνίσματος (8). Ο κίνδυνος αυτός μειώνεται γενικά μετά τη διακοπή του καπνίσματος. Παρ' όλα αυτά, ακόμη και μετά από πολλά χρόνια διακοπής, ο κίνδυνος στους πρώην καπνιστές παραμένει υψηλότερος από τα άτομα που δεν έχουν καπνίσει ποτέ.

Το μακροχρόνιο κάπνισμα οδηγεί επίσης στην ανάπτυξη της χρόνιας αποφρακτικής πνευμονοπάθειας (ΧΑΠ), μια νόσο που προοδευτικά οδηγεί σε αναπηρία. Το 2000, για πρώτη φορά, ο αριθμός των γυναικών που πέθαναν από ΧΑΠ ξεπέρασε τον αντίστοιχο αριθμό των ανδρών (Σχεδιάγραμμα 1) (9). Το 2001 η ΧΑΠ αποτελούσε την 4<sup>η</sup> αιτία θανάτου στις Ηνωμένες Πολιτείες, οδηγώντας σε περισσότερους από 118,000 θανάτους, από τους οποίους 90% αποδίδονταν στο κάπνισμα. Σύμφωνα με την American Cancer Society's second Cancer Prevention Study, οι γυναίκες καπνίστριες έχουν περίπου 13 φορές περισσότερη πιθανότητα να πεθάνουν από ΧΑΠ σε σχέση με τις γυναίκες που δεν έχουν καπνίσει ποτέ, ενώ στους άνδρες περίπου 12 φορές περισσότερο. Ο επιπολασμός της ΧΑΠ ποικίλει ανάλογα με τα διαφορετικά διαγνωστικά κριτήρια και τα κριτήρια αναπνευστικής λειτουργίας που χρησιμοποιούνται για τον ορισμό της νόσου (10). Μια ανασκόπηση 37 μελετών εκτιμά τον επιπολασμό της ΧΑΠ σε 7,5%. Αντικειμενικοί ορισμοί

τείνουν να εμφανίσουν υψηλότερο επιπολασμό από τις αναφερόμενων των ασθενών διαγνώσεις. Για παράδειγμα τα σπυρομετρικά κριτήρια αποδίδουν υψηλότερο επιπολασμό σε σύγκριση με τον αναφερόμενο από τους ασθενείς για ΧΑΠ. Επιπρόσθετα με το κάπνισμα, ο επιπολασμός της ΧΑΠ επηρεάζεται κυρίως από την ηλικία (11). Ο κίνδυνος ανάπτυξης ΧΑΠ μπορεί να αυξηθεί όχι μόνο από τον καθημερινά υψηλό αριθμό τσιγάρων, αλλά ακόμη περισσότερο από τα αθροιστικά πακέτα-έτη (pack-years) (12). Μια ισπανική μελέτη έδειξε ότι επιπρόσθετα της υψηλής κατανάλωσης καπνού, οι καπνιστές με ΧΑΠ είχαν υψηλότερα επίπεδα μονοξειδίου του άνθρακα στον εκπνεόμενο αέρα και μεγαλύτερη εξάρτηση από τη νικοτίνη σε σύγκριση με τους υγιείς καπνιστές (13). Κάποια δεδομένα υποστηρίζουν ότι οι γυναίκες ίσως να είναι πιο ευαίσθητες στις επιβλαβείς επιδράσεις του καπνίσματος για την ανάπτυξη ΧΑΠ. Στη Copenhagen City Heart Study ο κίνδυνος νοσηλείας ήταν υψηλότερος στις γυναίκες σε σχέση με τους άνδρες για ένα δεδομένο αριθμό pack year (14).



1. Σχεδιάγραμμα 1. Θάνατοι από ΧΑΠ ανάλογα με το φύλο, 1980-2000. από τους Mannino DM. Chronic obstructive pulmonary disease: definition and epidemiology. Respir Care. 2003;48:1185-91

Το κάπνισμα επίσης προκαλεί αναπνευστικά συμπτώματα, όπως βήχα, απόχρεμψη, δύσπνοια και συριγμό. Δεδομένα από δείγματα γενικού πληθυσμού επιβεβαιώνουν ότι τα αναπνευστικά συμπτώματα συμβαίνουν πιο συχνά στους νυν καπνιστές από ότι στους μη καπνιστές, τόσο στους άνδρες όσο και στις γυναίκες. Ανάμεσα στους νυν καπνιστές ο επιπολασμός αυτών που αναφέρουν χρόνια βήχα και απόχρεμψη αυξάνεται με τη βαρύτητα του καπνίσματος μετρούμενο σε pack years (15). Μακροχρόνιες μελέτες δείχνουν ότι οι πρώην καπνιστές έχουν υψηλότερο ποσοστό ύφεσης των αναπνευστικών συμπτωμάτων από τους παραμένοντες καπνιστές (16).

Αξίζει να σημειωθεί ότι το ενεργό κάπνισμα μειώνει την ταχύτητα ανάπτυξης της αναπνευστικής λειτουργίας κατά τη διάρκεια της εφηβείας, προβλέπει την ηλικία έναρξης μείωσης της αναπνευστικής λειτουργίας στην πρώιμη ενήλικη ζωή, και επιταχύνει τη μείωση της αναπνευστικής λειτουργίας στην όψιμη ενήλικη ζωή και στους ηλικιωμένους. Μακροχρόνιες μελέτες δείχνουν ότι το μέτριο με βαρύ κάπνισμα στους άνδρες οδηγεί κατά μέσο όρο σε κατά 15 ml/έτος μεγαλύτερη μείωση σε σχέση με τους μη καπνιστές, ενώ στις γυναίκες η επίδραση αυτή σημειώνεται ελαφρώς μικρότερη (17). Στη Lung Health Study, η 11χρονη παρακολούθηση ασθενών με ήπια απόφραξη των αεραγωγών έδειξε ότι αυτοί που διατηρούσαν την αποχή τους από το κάπνισμα είχαν απώλεια αναπνευστικής λειτουργίας με σημαντικότερα πιο αργό ρυθμό από ότι αυτούς που συνέχιζαν να καπνίζουν (27 ml/έτος vs 60 ml/έτος), με αυτούς που περιοδικά έκοβαν το κάπνισμα να είναι μεταξύ των δύο ομάδων (48ml/έτος) (18). Η παρακολούθηση ενός έτους στην ίδια μελέτη έδειξε ότι η μεγαλύτερη βελτίωση στα επίπεδα της FEV1 μετά τη διακοπή του καπνίσματος σημειώθηκε στα άτομα που κάπνιζαν τα περισσότερα τσιγάρα την ημέρα πριν τη διακοπή (19).

Επιπρόσθετα το κάπνισμα αποτελεί και αιτία συμπτωμάτων που σχετίζονται με το άσθμα (π.χ. συριγμός), στην παιδική ηλικία και στην εφηβεία καθώς και σε μειωμένο έλεγχο του άσθματος. Είναι επίσης γνωστό ότι οι ασθματικοί ασθενείς παρουσιάζουν μεγαλύτερη μείωση στην FEV1 από τους μη ασθματικούς, αλλά αν καπνίζουν, η μείωση γίνεται πιο σημαντική, τόσο στους άνδρες όσο και στις γυναίκες (20). Επίσης έχει αναφερθεί ότι η αποτελεσματικότητα της θεραπείας με βραχείας δράσης κορτικοστεροειδών

από το στόμα διαταράσσεται σε χρόνιους σταθερούς ασθματικούς καπνιστές (21).

Το κάπνισμα φαίνεται επιπλέον ότι προκαλεί και πνευμονία. Σε ένα γενικό ισπανικό πληθυσμό, η αναλογία των περιπτώσεων πνευμονίας της κοινότητας που αποδίδονταν σε οποιαδήποτε χρήση καπνού ήταν 32.4% των περιπτώσεων, που σημαίνει ότι περίπου μία στις τρεις περιπτώσεις πνευμονίας στους ενήλικες θα μπορούσαν να είχαν αποφευκτεί αν δεν υπήρχε η κατανάλωση καπνού (22). Τέλος το κάπνισμα που αυξάνει τη φλεγμονή στον πνεύμονα θα μπορούσε να αυξήσει τον κίνδυνο ιδιοπαθούς πνευμονικής ίνωσης. Αρκετές μελέτες δείχνουν συσχέτιση μεταξύ καπνίσματος και ιδιοπαθούς πνευμονικής ίνωσης, όμως τα δεδομένα είναι περιορισμένα και περαιτέρω μελέτες απαιτούνται (23).

## Βιβλιογραφία

1. Hogg JC, Macklem PT, Thurlbeck WM. Site and nature of airway obstruction in chronic obstructive lung disease. *N Engl J Med* 1968;278:1355–60.
2. Cerveri I, Accordini S, Verlato G, et al. European Community Respiratory Health Survey (ECRHS) Study Group. Variations in the prevalence across countries of chronic bronchitis and smoking habits in young adults. *Eur Respir J* 2001;18:85–92.
3. Cosio MG, Guerassimov A. Chronic obstructive pulmonary disease. Inflammation of small airways and lung parenchyma. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:S21–5.
4. Saetta M, Turato G, Baraldo S, et al. Goblet cell hyperplasia and epithelial inflammation in peripheral airways of smokers with both symptoms of chronic bronchitis and chronic airflow limitation. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161:1016–21.
5. Smoking Statistics. British Heart Foundation, January 2004 [www.heartstats.org](http://www.heartstats.org)
6. .CancerStats: Lung cancer and smoking - UK. Cancer Research UK, April 2004 CancerStats: Mortality - UK. Cancer Research UK, 2002
7. European Respiratory Society, European Lung Foundation. European Lung White Book. The first comprehensive survey on respiratory health in Europe. Sheffield:ERSJ Ltd, 2003.
8. Alberg AJ, Samet JM Epidemiology of lung cancer. *Chest*. 2003 Jan;123(1 Suppl):21S-49S.
9. Mannino DM. Chronic obstructive pulmonary disease: definition and epidemiology. *Respir Care*. 2003 Dec;48(12):1185-91
10. Halbert RJ, Natoli JL, Gano A, Badamgarav E, Buist AS, Mannino DM. Global burden of COPD: systematic review and meta-analysis. *Eur Respir J*. 2006 Sep;28(3):523-32. Epub 2006 Apr 12.
11. Mannino DM, Watt G, Hole D, Gillis C, Hart C, McConnachie A, Davey Smith G, Upton M, Hawthorne V, Sin DD, Man SF, Van Eeden S, Mapel DW, Vestbo J. The natural history of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*. 2006 Mar;27(3):627-43. R

12. de Marco R, Accordini S, Cerveri I, Corsico A, Sunyer J, Neukirch F, Künzli N, Leynaert B, Janson C, Gislason T, Vermeire P, Svanes C, Anto JM, Burney P; European Community Respiratory Health Survey Study Group. An international survey of chronic obstructive pulmonary disease in young adults according to GOLD stages. *Thorax*. 2004 Feb;59(2):120-5.
13. Jiménez-Ruiz CA, Masa F, Miravittles M, Gabriel R, Viejo JL, Villasante C, Sobradillo V. Smoking characteristics: differences in attitudes and dependence between healthy smokers and smokers with COPD. *Chest*. 2001 May;119(5):1365-70.
14. Prescott E, Bjerg AM, Andersen PK, Lange P, Vestbo J. Gender difference in smoking effects on lung function and risk of hospitalization for COPD: results from a Danish longitudinal population study. *Eur Respir J*. 1997 Apr;10(4):822-7.
15. Cerveri I, Accordini S, Corsico A, Zoia MC, Carrozzi L, Cazzoletti L, Beccaria M, Marinoni A, Viegi G, de Marco R; ISAYA Study Group. Chronic cough and phlegm in young adults. *Eur Respir J*. 2003 Sep;22(3):413-7.
16. Eagan TM, Gulsvik A, Eide GE, Bakke PS. Remission of respiratory symptoms by smoking and occupational exposure in a cohort study. *Eur Respir J*. 2004 Apr;23(4):589-94.
17. Kerstjens HA, Rijcken B, Schouten JP, Postma DS. Decline of FEV1 by age and smoking status: facts, figures, and fallacies. *Thorax*. 1997 Sep;52(9):820-7.
18. Anthonisen NR, Connett JE, Murray RP. Smoking and lung function of Lung Health Study participants after 11 years. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002 Sep 1;166(5):675-9.
19. Scanlon PD, Connett JE, Waller LA, Altose MD, Bailey WC, Buist AS. Smoking cessation and lung function in mild-to-moderate chronic obstructive pulmonary disease. The Lung Health Study. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000 Feb;161(2 Pt 1):381-90.
20. 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 Oct 22;339(17):1194-200.

21. Thomson NC, Chaudhuri R, Livingston E. Asthma and cigarette smoking. *Eur Respir J.* 2004 Nov;24(5):822-33.
22. Almirall J, González CA, Balanzó X, Bolívar I. Proportion of community-acquired pneumonia cases attributable to tobacco smoking. *Chest.* 1999 Aug;116(2):375-9.
23. Ryu JH, Colby TV, Hartman TE, Vassallo R. Smoking-related interstitial lung diseases: a concise review. *Eur Respir J.* 2001 Jan;17(1):122-32.

## Κεφάλαιο 4

### ΚΑΠΝΙΣΜΑ, ΦΛΕΓΜΟΝΗ ΚΑΙ ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗ

### ΒΛΑΒΗ

Μελέτες δείχνουν ότι το κάπνισμα μπορεί να προκαλέσει φλεγμονώδη αντίδραση στους αεραγωγούς πρώιμα στη ζωή, η οποία όμως δεν εξελίσσεται σε όλους τους καπνιστές. Ο καπνός του τσιγάρου αποτελεί ένα σύνθετο μείγμα συστατικών που είναι γνωστά καρκινογόνα, συνκαρκινογόνα, μεταλλαξιογόνα, καθώς και άλλων τοξικών ουσιών. Όπως αναφέρθηκε συνδέεται με ποικιλία χρόνιων διαταραχών του πνεύμονα και αποτελεί μείζονα αιτία νοσηρότητας και θνησιμότητας. Αν και οι μηχανισμοί με τους οποίους το κάπνισμα προκαλεί νόσο δεν είναι ακόμη γνωστοί, η χρόνια φλεγμονή αποτελεί ένα σημαντικό παράγοντα στην παθογένεση των νόσων που σχετίζονται με το κάπνισμα, όπως ο καρκίνος του πνεύμονα, η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ) και το άσθμα. Πληθυσμοί φλεγμονωδών κυττάρων και κυτταρικών μεσολαβητών διαφέρουν σε αυτές τις νόσους, αλλά είναι σαφές ότι η φλεγμονώδης ενεργοποίηση των κυττάρων μπορεί να διαιωνίσει τη φλεγμονή μέσω απελευθέρωσης κυτταροκινών και χημειοκινών, καθώς και να προκαλέσουν πνευμονική βλάβη με τη απελευθέρωση πρωτεασών και άλλων μεσολαβητών. Η φλεγμονώδης απάντηση συνεισφέρει σε μια ποικιλία καταστάσεων, όπως η νόσος των μικρών αεραγωγών, ο περιορισμός της ροής, η επαγωγή των πρωτεασών, η καταστροφή της κυψελιδοβρογχικής σύνδεσης, η ανταπόκριση των κυτταρικών, η υπερέκκριση βλέννης και η ίνωση που χαρακτηρίζει του μικρούς αεραγωγούς (1).

Παρά την επαγωγή της φλεγμονής από το κάπνισμα, δεν αναπτύσσουν όλοι οι καπνιστές πνευμονική νόσο. Είναι γνωστό ότι η επαγόμενη από το κάπνισμα φλεγμονώδης απάντηση είναι μεγαλύτερη σε άτομα που αναπτύσσουν ΧΑΠ, φλεγμονή που παραμένει μετά τη διακοπή του καπνίσματος και θεωρείται κεντρική σημασίας στην παθογένεση της νόσου. Σύμφωνα με τις μέχρι τώρα μελέτες μόνο 10 -15% των καπνιστών αναπτύσσουν ΧΑΠ (2) και οι πρώιμες μεταβολές στους αεραγωγούς δεν



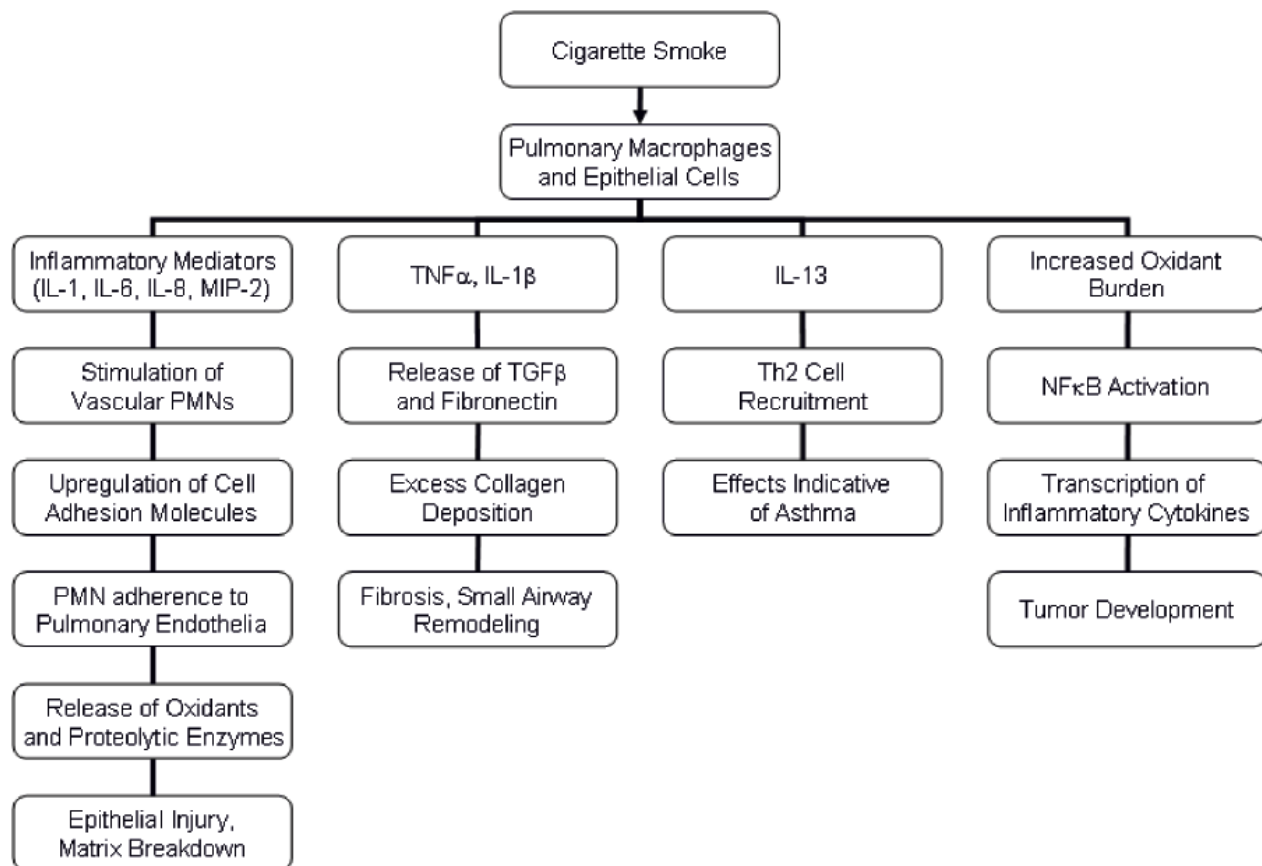
έχουν επαρκώς προσδιοριστεί (3). Η διακοπή του καπνίσματος μπορεί να οδηγήσει σε πλήρη αποκατάσταση των αεραγωγών, σε άτομα που δεν έχουν ακόμη αναπτύξει νόσο, γεγονός που επενεργεί θετικά στη συμπεριφορά των πρώην καπνιστών ώστε να διατηρήσουν την αποχή τους από το κάπνισμα.

Η φλεγμονή των αεραγωγών και το οξειδωτικό στρες εμπλέκονται στην παθογένεση ποικίλων πνευμονικών παθήσεων (4). Όλοι οι ιστοί είναι ευαίσθητοι σε οξειδωτική βλάβη, αλλά λόγω της εντόπισης του, το επιθήλιο των αεραγωγών είναι ιδιαίτερα ευαίσθητο (5). Ο καπνός του τσιγάρου περιλαμβάνει  $10^{20}$  οξειδωτικά μόρια ανά εισπνοή (6) και μέχρι 300 με 500 ppm NO και NO<sub>2</sub> (7). Τα στοιχεία αυτά, όπως και στοιχεία που απελευθερώνονται από φλεγμονώδη κύτταρα ενέχονται για την πνευμονική νόσο που προκαλείται από το κάπνισμα. Δεν έχει όμως ακόμη διασαφηνιστεί ποιο από τα δυο στοιχεία είναι πρωταρχικά υπεύθυνο για το οξειδωτικό στρες που δημιουργείται στους καπνιστές (7).

#### *Φλεγμονώδη κύτταρα*

Ο συνολικός αριθμός των φλεγμονωδών κυττάρων και ιδιαίτερα τα ουδετερόφιλα, τα μακροφάγα, καθώς και τα ηωσινόφιλα (3) αυξάνονται στους αεροχώρους των καπνιστών (9-11), και επιδεικνύουν αυξημένη οξειδωτική μεταβολική ανταπόκριση και αυξημένη κυτταροτοξικότητα (5). Η έκθεση στον καπνό του τσιγάρου οδηγεί σε μια φλεγμονώδη απάντηση που χαρακτηρίζεται από μετακίνηση των ουδετεροφίλων στην πνευμονική μικροκυκλοφορία, προσκόλληση τους στο ενδοθήλιο και ροή των πολυμορφοπύρηνων λευκοκυττάρων στον πνεύμονα (12-20). Η επιστράτευση των φλεγμονωδών κυττάρων στον πνεύμονα και η παραμονή τους μετά την έκθεση του καπνού του τσιγάρου μπορεί να οδηγήσει σε ιστική βλάβη μέσω της απελευθέρωσης χημειοτακτικών και τοξικών μεσολαβητών, περιλαμβάνοντας πρωτεολυτικά ένζυμα και αντιδρώντες ρίζες οξυγόνου (reactive oxygen species - ROS) (21-25). Οι μελέτες των Terashima και συνεργατών (27,27) δείχνουν ότι ο καπνός του τσιγάρου διεγείρει την απελευθέρωση πολυμορφοπυρήνων από τον μυελό των οστών, και αυτά τα πρόσφατα απελευθερωμένα πολυμορφοπύρηννα συσσωρεύονται κατά προτίμηση στα μικροαγγεία του πνεύμονα και προκαλούν ζημιά στα κυψελιδικά τοιχώματα. Προτείνεται επίσης ότι ο καπνός του τσιγάρου ίσως προετοιμάζει τα συστηματικά ουδετερόφιλα

και ακολούθως επέρχεται οξειδωτική βλάβη των ιστών και παθολογίες στον πνεύμονα στους παθητικούς καπνιστές (28). Αν και δεν είναι ξεκάθαρο ότι τα φλεγμονώδη κύτταρα μετά την ενεργοποίησή τους προκαλούν πνευμονική βλάβη και συνεισφέρουν στην παθογένεση διαταραχών στον πνεύμονα, οι υπεύθυνοι μηχανισμοί για την επιστράτευση των πολυμορφοπυρήνων και την ενεργοποίησή τους από τον καπνό του τσιγάρου παραμένουν άγνωστοι και αντιπροσωπεύουν παράγοντες σημαντικούς για την κατανόηση της διεργασίας της βλάβης. Η πρόκληση βλάβης και ανάπτυξη χρόνιων νόσων ακολουθεί μια πολύπλοκη διεργασία που εμπλέκει αλληλεπίδραση πολλαπλών παραγόντων. Η εικόνα 1 παρουσιάζει μια απλοποιημένη άποψη μερικών φλεγμονωδών μεσολαβητών και των μονοπατιών που οδηγούν σε πνευμονική βλάβη και όσο. Η εκτίμηση αυτής της πολυπλοκότητας, η συνεχής διερεύνηση του ρόλου των κυτταρικών μεσολαβητών, χημειοτακτικών παραγόντων, συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας και μορίων κυτταρικής προσκόλλησης στη φλεγμονή και πνευμονική βλάβη είναι ζωτικές για την κατανόηση των μηχανισμών της βλάβης.



Εικόνα 1. Διάγραμμα που δείχνει πιθανούς μηχανισμούς φλεγμονής και πνευμονικής βλάβης που προκαλείται από το κάπνισμα. Από τους Bhalla και

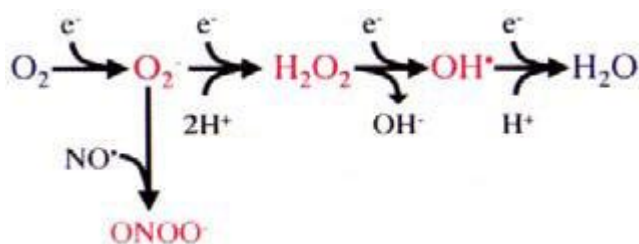
συνεργάτες. Cigarette Smoke, Inflammation, and Lung Injury: A Mechanistic Perspective. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B, Volume 12, Issue 1 January 2009 , pages 45 - 64

### Οξειδωτικό stress

Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, τα αντιοξειδωτικά και γενικότερα το οξειδωτικό stress αποκτούν κατά τελευταία χρόνια όλο και μεγαλύτερο ενδιαφέρον καθώς αυξάνει διαρκώς ο αριθμός των νοσημάτων στα οποία φαίνεται να ενέχονται. Η διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών είναι αυτή που κατά βάση χαρακτηρίζει το οξειδωτικό stress, μια τέτοια δε διαταραχή μπορεί να οδηγήσει σε κυτταρική βλάβη και παθοφυσιολογικές διαταραχές. Η παρουσία του οξειδωτικού stress μπορεί να διαπιστωθεί είτε μέσω ανίχνευσης των ελευθέρων ριζών οξυγόνου (EPO) είτε μέσω προσδιορισμού των αντιοξειδωτικών παραγόντων είτε τέλος μέσω ανίχνευσης προϊόντων βλάβης βασικών βιομορίων, όπως για παράδειγμα προϊόντων λιπιδικής υπεροξειδωσης, ως αποτέλεσμα δράσης των EPO στα λιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης. Αυξημένη παραγωγή EPO μπορεί να οδηγήσει σε μείωση ενός ή περισσότερων αντιοξειδωτικών και αυτό να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης οξειδωτικού stress (29).

Ο όρος «ελεύθερες ρίζες» αναφέρεται σε άτομα ή μόρια με αυτοτελή ύπαρξη, τα οποία περιέχουν ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια. Ο ευρύς αυτός ορισμός περιλαμβάνει μεγάλο αριθμό μορίων στη Χημεία και στη Βιολογία. Το ελεύθερο αυτό ηλεκτρόνιο μπορεί να δεσμεύσει ένα ηλεκτρόνιο από άλλο μόριο, να ενωθεί με άλλο μόριο ή να απεμπλακεί τελείως και να επανενωθεί με κάποιο άλλο μόριο. Είναι αυτή η τάση των ελευθέρων ριζών να δίνουν ή να παίρνουν ηλεκτρόνια από άλλα μόρια ή να ενώνονται με άλλα μόρια, που τις καθιστά τόσο ασταθείς, αλλά ταυτόχρονα και τόσο δραστικές. Μερικές ελεύθερες ρίζες περιέχουν οξυγόνο και γι' αυτό ονομάζονται ελεύθερες ρίζες οξυγόνου. Υπάρχουν όμως και ορισμένες ενώσεις του οξυγόνου, όπως για παράδειγμα το υπεροξειδίο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) και το μονήρες οξυγόνο ( $^1O_2$ ) που, ενώ δεν είναι ελεύθερες ρίζες, συμπεριλαμβάνονται σε αυτές, διότι είναι χημικά πολύ δραστικές και μπορούν να οδηγήσουν στον σχηματισμό ελευθέρων ριζών. Οι ενώσεις αυτές είναι γνωστές με τον όρο «Δραστικές Μορφές Οξυγόνου» (ΔΜΟ) (30). Οι EPO είναι

παραπροϊόντα του φυσιολογικού αερόβιου μεταβολισμού. Η σταδιακή πρόσληψη ηλεκτρονίων από το μοριακό οξυγόνο οδηγεί στο σχηματισμό τριών βασικών ειδών EPO. Με την πρόσληψη ενός ηλεκτρονίου σχηματίζεται το ανιόν του υπεροξειδίου ( $O_2^{\bullet-}$ ), με ένα δεύτερο ηλεκτρόνιο σχηματίζεται το υπεροξειδίο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ), ενώ ένα τρίτο ηλεκτρόνιο οδηγεί στο σχηματισμό της υδροξυλικής ρίζας ( $OH^{\bullet}$ ). Όταν το οξυγόνο προσλάβει και τέταρτο ηλεκτρόνιο ανάγεται πλήρως σε νερό (Εικόνα 2). Οι αρχικές αυτές EPO αντιδρούν με άλλα μόρια και σχηματίζουν και άλλες EPO όπως λιπιδικά υπεροξειδία ( $ROO^{\bullet}$ ), υποχλωριώδες οξύ ( $HOCl$ ), υπεροξυνιτρώδες ( $ONOO^-$ ) κ.α. (31).



**Εικόνα 2.** Παραγωγή EPO από σταδιακή αναγωγή του μοριακού οξυγόνου.

Η βασική άμυνα του οργανισμού έναντι των EPO συνίσταται σε ενδογενείς αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς που περιλαμβάνουν δύο κατηγορίες: ενζυμικούς και μη ενζυμικούς. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν ένζυμα όπως η υπεροξειδική δισμουτάση, η καταλάση, η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, η τρανσφεράση-S της γλουταθειόνης κ.α. Στη δεύτερη κατηγορία ανήκουν χαμηλού μοριακού βάρους ουσίες όπως η γλουταθειόνη, το ασκορβικό οξύ, το ουρικό οξύ, η α-τοκοφερόλη και υψηλού μοριακού βάρους όπως η αλβουμίνη, η τρανσφερίνη, η σερου-λοππασμίνη, η λακτοφερρίνη κ.α (32)

Η εισπνοή του καπνού εκτίθει τον πνευμονικό ιστό σε υψηλά επίπεδα ελεύθερων ριζών που υπάρχουν στον καπνό του τσιγάρου. Επιπρόσθετα, ενεργοποιούνται διάφορες ενδογενείς οξειδωτικές διεργασίες που φαίνεται να προάγουν τη χρόνια φλεγμονή στον πνεύμονα που χαρακτηρίζεται από αυξημένα επίπεδα λευκοκυττάρων στην κυκλοφορία και στους ιστούς (33,34). Τα ενεργοποιημένα λευκοκύτταρα εκκρίνουν μεγάλα ποσά ελεύθερων ριζών οξυγόνου, όπως υπεροξειδίο του υδρογόνου, που αυξάνουν το οξειδωτικό φορτίο στους καπνιστές. Αρκετές από τις συνθήκες αυτές προκαλούνται στα

τρωκτικά μετά από έκθεση στον καπνό του τσιγάρου. Παρουσία συγκεκριμένων μετάλλων, όπως ο σίδηρος, που συσσωρεύονται στους καπνιστές και στα ζώα που εκτίθενται στο κάπνισμα, το υπεροξειδίο του υδρογόνου μπορεί να μετατραπεί σε πολύ αντιδραστικές υδροξυλικές ρίζες, που περαιτέρω ενισχύουν το οξειδωτικό stress στους καπνιστές. Επιπλέον, τα ουδετερόφιλα από τους καπνιστές είναι γνωστό ότι χαρακτηρίζονται από υψηλότερη δραστηριότητα της μυελοπεροξειδάσης, ενός ενζύμου που καταλύει το σχηματισμό του υποχλωριώδους οξέος, ενός γνωστού ισχυρού οξειδωτικού παράγοντα των πρωτεϊνών και των λιπιδίων. Πράγματι, η παρουσία υψηλών επιπέδων ποικίλων οξειδωμένων προϊόντων DNA, πρωτεϊνών και λιπιδίων, όπως η 8-υδροξυλ-δεοξυγουανοσίνη, αδρανοποιημένης 1-αντιπρωτεάσης και τα F2-ισοπροστανίων, και μείωση των αντιοξειδωτικών του πλάσματος, π.χ. βιταμίνη C, σε ενεργούς και παθητικούς καπνιστές καθώς και σε ζώα εκτιθέμενα στον καπνό (35-39), αιτιολογούν την επαγωγή του αυξημένου οξειδωτικού stress από τον καπνό του τσιγάρου. Είναι σαφές ότι η παρατεταμένη φλεγμονή του πνεύμονα που προκαλείται από κάπνισμα προάγει το οξειδωτικό stress, το οποίο με τη σειρά του οδηγεί σε διάφορες παθολογίες του αναπνευστικού συστήματος που σχετίζονται με το κάπνισμα. Πιθανοί μηχανισμοί περιλαμβάνουν την ενεργοποίηση ή καταστολή γονιδιακής έκφρασης μέσω σύνδεσης σε μεταγραφικούς παράγοντες περιοχών ελέγχου γονιδίων, όπως το στοιχείο αντιοξειδωτικής απάντησης (38). Ενώ ο ρόλος των κλασσικών καρκινογόνων που σχετίζονται με το κάπνισμα παραμένει αντικείμενο έντονης έρευνας, γίνεται εμφανές ότι το αναπνευστικό οξειδωτικό stress που προκαλείται από το κάπνισμα διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη νόσου. Λόγω της έκθεσης σε υψηλές συγκεντρώσεις προ-οξειδωτικών και ελευθέρων ριζών που βρίσκονται στον καπνό του τσιγάρου, ο πνευμονικός ιστός ανταποκρίνεται με την ενεργοποίηση της μεταγραφής γονιδίων που είτε βοηθούν στην αποτοξίνωση των ΕΡΟ, είτε επάγουν την επιδιόρθωση της επακόλουθης ενδοκυττάριας οξειδωτικής βλάβης. Τα επίπεδα της αναγμένης γλουταθειόνης στο υγρό του επιθηλιακού τοιχώματος πέφτουν μέσα σε 2 ώρες από την οξεία έκθεση σε καπνό τσιγάρου και έπειτα επανέρχονται στο τριπλάσιο μετά από επαγωγή της γ-γλουταμυλκυστεΐνης συνθάσης, ενός ενζύμου περιορισμένης ποσότητας στη σύνθεση της γλουταθειόνης (39). Πιστεύεται ότι η γλουταθειόνη όχι μόνο

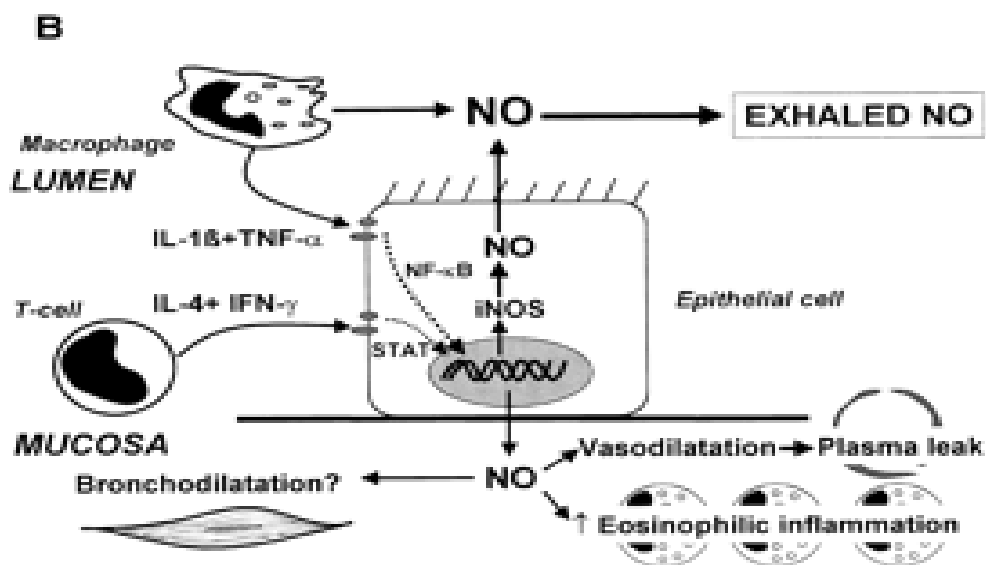
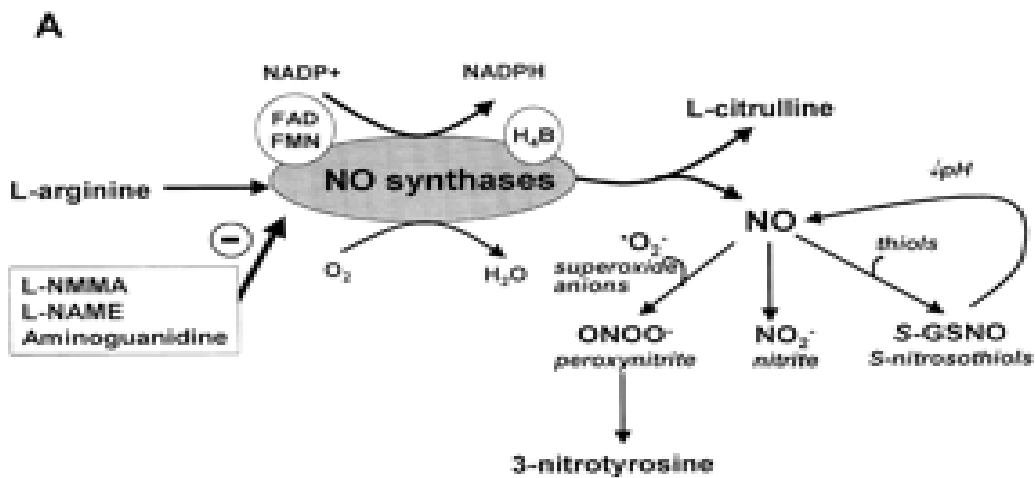
αποδυναμώνει τις EPO, αλλά επίσης χρησιμεύει ως ένας κυτταρικός αισθητήρας οξειδοαναγωγής για τον καταγραφικό μηχανισμό.

### *Nitrosative stress*

Όπως αναφέρθηκε, η μεγαλύτερη πηγή οξειδωτικού φορτίου στις φλεγμονώδεις παθήσεις του πνεύμονα είναι η απελευθέρωση αντιδρωσών ριζών οξυγόνου και αζώτου από τα λευκοκύτταρα της φλεγμονής και από τα επιθηλιακά κύτταρα των αεραγωγών (4). Στα κύτταρα αυτά παρατηρούνται μορφολογικές και λειτουργικές αλλαγές (11), καθώς και αύξηση α) στην εκλυόμενη συνθετάση του NO (inducible NO synthetase - iNOS) και β) στη νιτροτυροσίνη, ουσίες που θεωρούνται δείκτες φλεγμονής και γ) στην οξειδάση της αίμης (HO-1 και HO-2), που θεωρείται ότι έχει αντιοξειδωτική δραστηριότητα.

Η συνθετάση του NO (NOS) καταλύει την αντίδραση παραγωγής NO από το αμινοξύ L-αργινίνη. Τρεις ισομορφές υπάρχουν: οι νευρονικές και ενδοθηλιακές ισομορφές παράγουν μικρά ποσά NO για μικρά χρονικά διαστήματα, ενώ η επαγωγίμη ισομορφή (iNOS) παράγει μεγάλα ποσά NO για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα ύστερα από ανοσολογικής φύσεως ενεργοποίηση. Η αυξημένη παραγωγή NO, κατά τη φλεγμονώδη διεργασία στο αναπνευστικό σύστημα, πιστεύεται ότι αποτελεί φυσιολογικό αμυντικό μηχανισμό. Όμως η αύξηση και διατήρηση αυτής της διεργασίας προκαλεί βλάβη και πιθανώς συμμετέχει στην παθοφυσιολογία φλεγμονωδών νόσων των αεραγωγών. Έχει ήδη αναφερθεί αυξημένη παραγωγή NO στους αεραγωγούς των ασθματικών, στο σύνδρομο αναπνευστικής δυσχέρειας των ενηλίκων (ARDS) και στην ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση, ενώ η παρουσία του στους αεραγωγούς είναι αμφισβητήσιμη στη ΧΑΠ (40). Αφού παραχθεί το NO μπορεί να απομακρυνθεί με την εκπνοή, να μεταβολιστεί περαιτέρω σε νιτρώδες και νιτρικά άλατα ή να αλληλεπιδράσει με το ανιόν του υπεροξειδίου προς σχηματισμό υπεροξυνιτρώδους και άλλων ειδών αντιδρωσών ριζών αζώτου (reactive nitrogen species - RNS) με ισχυρή φλεγμονώδη δράση (40). Το υπεροξυνιτρώδες προσθέτει μια αζωτοομάδα στη θέση 3, δίπλα στο υδροξύλιο της τυροσίνης προς παραγωγή του σταθερού προϊόντος νιτροτυροσίνη (Εικόνα 3). Αν και η νίτρωση της τυροσίνης γενικά αποδίδεται στο υπεροξυνιτρώδες, εμπλέκεται επίσης και η οδός οξειδωσης του

νιτρώδους που εξαρτάται από την υπεροξειδάση. Επομένως, η νιτροτυροσίνη αποτελεί έναν αθροιστικό δείκτη της εμπλοκής των RNS στη συγκεκριμένη διεργασία (40).



**Εικόνα 3.** Σύνθεση του NO και σχετιζόμενων με το NO προϊόντων (Α). Πηγές NO στον εκπνεόμενο αέρα (Β). Από τους Kharitonov SA και BARNES PJ. Exhaled Markers of Pulmonary Disease Am. J. Respir. Crit. Care Med., 2001;163:1693-1722

Το NO παίζει σημαντικό ρόλο στην φλεγμονή και στην άμυνα του ξενιστή αφού έχει βρεθεί αυξημένη έκφραση της iNOS στα επιθηλιακά κύτταρα των βρόγχων (41). Επίσης σε μια μελέτη των Ichinose και συν. βρέθηκε ότι ο βαθμός της απόφραξης των αεραγωγών συσχετιζόταν με τα επίπεδα της νιτροτυροσίνης που ανιχνεύτηκαν (40). Πρόσφατα βρέθηκε μια φαινομενική ενζυμική δραστηριότητα μέσω της δινιτράσης της νιτροτυροσίνης σε ομογενοποιημένο εκχύλισμα σπλήνα και πνεύμονα στους αρουραίους, γεγονός που υποδεικνύει την πιθανή σπουδαιότητα της νίτρωσης (και δινίτρωσης) ως σηματοδότησης του φλεγμονώδους μηχανισμού (40). Πιθανώς το NO που παράγεται από την iNOS να παίζει ρόλο και στην έκφραση της HO-1 (42).

Η HO καταλύει το πρώτο και καθοριστικό βήμα για την οξειδωτική αποδόμηση της αίμης αποδίδοντας ίσες ποσότητες χολοπρασίνης IXa, CO και σιδήρου (43). Τρεις γενετικές ισομορφές της HO έχουν αναγνωρισθεί: η επαγωγίμη HO-1 και οι ιδιοσυστασιακές μορφές HO-2 και η HO-3 (44). Η HO-1 φαίνεται να επικρατεί στους κυψελιδικούς χώρους, ενώ η HO-2 κυριαρχεί στα κυψελιδικά τοιχώματα (44). Η HO-3, έχει μικρή ενζυματική δραστηριότητα, μοιάζει με την HO-2 στην αλληλουχία, αλλά μέχρι τώρα έχει εκφραστεί μόνο στους νευρώνες των αρουραίων (42). Έχει προταθεί από πολλές μελέτες ότι η HO-1 παίζει σημαντικό ρόλο στην προστασία των κυττάρων απέναντι στην οξειδωτική βλάβη (42-44), πιθανώς λόγω του ότι τα προϊόντα της αποδόμησης της αίμης έχουν αντιοξειδωτική δραστηριότητα (45). Αν και η αίμη αποτελεί το κύριο υπόστρωμα για την HO-1, ποικιλία μεσολαβητών της φλεγμονής και παραγόντων που προκαλούν οξειδωτικό στρες, όπως αντιδρώντα είδη οξυγόνου (reactive oxygen species – ROS), ενδοτοξίνες, φλεγμονώδεις κυτταροκίνες και NO επάγουν ισχυρά την έκφραση της HO-1 (4). Στους αρουραίους έχει βρεθεί ότι η επαγωγή της HO-1 παρέχει προστασία τόσο *in vivo* όσο και *in vitro* σε διάφορα μοντέλα οξειδωτικού στρες. Τόσο η επαγωγίμη HO-1 όσο και η ιδιοσυστασιακή HO-2 ανιχνεύονται στον ανθρώπινο πνευμονικό ιστό και η έκφρασή τους αυξάνεται στους καπνιστές, υποδηλώνοντας ότι το οξειδωτικό stress που οφείλεται στο κάπνισμα ίσως αυξάνει τα κύτταρα του πνεύμονα που εκφράζουν τις HO-1 και HO-2 (44). Αυξημένη HO-1 έχει βρεθεί σε μια μελέτη και σε πρώην καπνιστές, χωρίς όμως να έχει καθοριστεί η αιτία (45).



### *Υποπληθυσμοί των Τ-λεμφοκυττάρων*

Το κάπνισμα έχει βρεθεί ότι επηρεάζει τους υποπληθυσμούς των Τ-λεμφοκυττάρων. Ιδιαίτερα στους καπνιστές με μακρύ ιστορικό καπνίσματος, βρέθηκε αυξημένος αριθμός CD8<sup>+</sup> κυττάρων στο αίμα που επέστρεψαν όμως σε χαμηλότερες τιμές μετά τη διακοπή του καπνίσματος. Ομοίως το κάπνισμα θα μπορούσε να επηρεάσει και τους υποπληθυσμούς των Τ-λεμφοκυττάρων στο τοίχωμα των αεραγωγών και να προκαλέσει μια επικράτηση των CD8<sup>+</sup> κυττάρων (46). Θεωρείται, σύμφωνα με τους Chrysofakis και συν., ότι τα CD8<sup>+</sup> κύτταρα είναι σημαντικά στην πρόκληση οξείας ιστικής βλάβης μέσω της απελευθέρωσης λυτικών ουσιών όπως η περφορίνη και άλλα ένζυμα (γρανζύμες) (47). Στους καπνιστές με ήδη εγκατεστημένη ΧΑΠ φαίνεται ότι η φλεγμονώδη ανταπόκριση χαρακτηρίζεται από μια ανισορροπία στους υποτύπους των Τ-Λεμφοκυττάρων (48) με τα CD8<sup>+</sup> να έχουν αυξημένη κυτταροτοξική δραστηριότητα (47). Σε καπνιστές χωρίς αναπνευστική νόσο τα CD4<sup>+</sup> Τ-κύτταρα στο BALF έχουν αναφερθεί να μειώνονται (49,50) και τα CD8<sup>+</sup> Τ-κύτταρα να αυξάνονται, οδηγώντας σε ένα σημαντικά μειωμένο λόγο CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> σε σύγκριση με τους μη καπνιστές (51,52). Ομοίως, στο βλεννογόνο των μικρών αεραγωγών υπάρχει μία τάση προς μείωση στα CD4<sup>+</sup> Τ-κύτταρα, μια αύξηση στα CD8<sup>+</sup> Τ-κύτταρα και μια σημαντική μείωση στο λόγο CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> Τ-κυττάρων στους καπνιστές σε σύγκριση με τους μη καπνιστές (53).

### *Πρωτεϊνικοί δείκτες φλεγμονής*

Για την εκτίμηση της επίδραση του καπνού του τσιγάρου στον πνεύμονα και την αναγνώριση ευαίσθητων ατόμων στο κάπνισμα, χρήσιμοι θεωρούνται ειδικοί δείκτες-πρωτείνες από διάφορες περιοχές του αναπνευστικού συστήματος. Το αναπνευστικό επιθήλιο, ανάλογα με την ανατομική περιοχή (μύτη, τραχεία, βρόγχοι, άπω αεραγωγοί και κυψελίδες), εκκρίνει αρκετές ειδικές πρωτείνες στους αεροχώρους του αναπνευστικού συστήματος. Σε αυτές συμπεριλαμβάνονται ο αναστολέας της πρωτεάσης που εκκρίνεται από τα λευκοκύτταρα (Secretory Leukocyte Protease Inhibitor -SLPI), η 16-kDa πρωτεΐνη που εκκρίνουν τα κύτταρα Clara (CC16), η

ελαφίνη και η ανθρώπινη βήτα ντεφενσίνη - 2 (human beta  $\beta$ -defensin-2-hBD-2).

Ο SLPI και η ελαφίνη, δύο αναστολείς πρωτεασών της σερίνης, παράγονται από μεγάλο αριθμό κυττάρων στο αναπνευστικό σύστημα. Προστατεύουν τοπικά τον ιστό από τις επιπτώσεις της φλεγμονής, όχι μόνο ως αποτέλεσμα των αντιφλεμονοδών ιδιοτήτων, αλλά και λόγω των αντιπρωτεασικών και αντιμικροβιακών ιδιοτήτων τους (54). Πιο συγκεκριμένα ο SLPI αναστέλλει ένα φάσμα πρωτεασών (περιλαμβάνοντας την ανθρώπινη ελαστάση των ουδετεροφίλων-HNE, την καθεψίνη G, τη θριψίνη, χυμοθριψίνη και χυμάση), με κύρια δραστηριότητα την αναστολή της ελαστάσης. Αποτελεί μια μείζονα αντιπρωτεάση των ανωτέρων αεραγωγών και η παρεμπόδιση της αντιπρωτεασικής λειτουργίας της από διάσπαση ή οξειδωση λόγω καπνίσματος (55) μπορεί να συμβάλλει στην παθογένεση του εμφυσήματος (56). Η ελαφίνη αναστέλλει την παγκρεατική ελαστάση των χοίρων, την HNE και την πρωτεϊνάση-3 με χαμηλό βαθμό αναστρεψιμότητας, και επομένως έχει πιο περιορισμένο φάσμα αναστολής από τον SLPI (54).

Η CC-16 αποτελεί ίσως τον πιο ευαίσθητο δείκτη της έκθεσης στον καπνό του τσιγάρου και μία από τις κύριες εκκριτικές πρωτεΐνες στον πνεύμονα (57). Πιστεύεται ότι έχει αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση στους αεραγωγούς μέσω της αναστολής του προφλεγμωνώδους ενζύμου φωσφολιπάση  $A_2$  (58). Επακόλουθο είναι η μείωση της απελευθέρωσης του αραχιδονικού οξέος και των λισοφωσφολιπιδίων και επομένως η μικρότερη παραγωγή φλεγμονωδών μεσολαβητών. Η CC-16 παράγεται κυρίως από τα κύτταρα Clara, αλλά και από μη κροσσωτά κύτταρα κατά μήκος του τραχειοβρογχικού επιθηλίου, καθώς και από παρόμοιους τύπους κυττάρων στη ρινική κοιλότητα (59). Επιπρόσθετα, οι  $\beta$ -ντεφενσίνες εκφράζονται από τα επιθηλιακά κύτταρα στον πνεύμονα, έντερο και δέρμα, καθώς επίσης και μονοκύτταρα/μακροφάγα και δένδριτικά κύτταρα. Το αντιμικροβιακό πεπτίδιο human  $\beta$ -defensin (HBD)-1 εκφράζεται ιδιοσυστασιακά από τα επιθήλια σε χαμηλά επίπεδα ενώ το σχετιζόμενο πεπτίδιο HBD-2 επάγεται κυρίως σε περιοχές φλεγμονής (60,61). Η HBD-2, είναι κυρίως γνωστή για τις αντιμικροβιακές ιδιότητές της (60). Όμως φαίνεται τελευταία ότι έχει και αντιφλεγμονώδεις δράσεις (62)

## **Βιβλιογραφία**

1. MacNee, W. (2007) Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Clin. Chest Med.* 28 , pp. 479-513.
2. Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease: American Thoracic Society. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152(suppl):S77-S121
3. D'ippolito R., Foresi A., Chetta A., Castagnaro A., Malorgio R. Eosinophils in induced sputum from asymptomatic smokers with normal lung function. *Respiratory Medicine* 2001;95:969-974
4. Horvath I., Macnee W., Kelly F.J., Dekhuijzen P.N.R., Plillips M., Doring G. Haemoxygenase-1 induction and exhaled markers of oxidative stress in lung diseases, summary of the ERS Research Seminar in Budapest, Hungary, September, 1999. *Eur Respir J* 2001; 18: 420-430
5. MacNee W. Oxidant/antioxidant imbalance in smokers and chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 1996;51:348-350
6. Morrison D., Rahman R., Lannan S., MacNee W. Epithelial Permeability, Inflammation, and Oxidant Stress in the Air Spaces Of Smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159:473-479
7. Rahman I., Morrison D., Donaldson K., MacNee W. Systemic Oxidative Stress in Asthma, COPD, and Smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154:1055-1060
8. Cross C.E., van der Vliet A., Eiserich J.P. Cigarette smokers and oxidant stress: a continuing mystery. *Am J Clin Nutr* 1998;67:184-5
9. Takizawa H., Tanaka M., Takami K., Ohtoshi T., Ito K. Increased expression of inflammatory mediators in small-airway epithelium from tobacco smokers. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 200;278:L906-L913
10. Lensmar C., ElMBERGER G., Skold M., Eklund A. Smoking alters the phenotype of macrophages in induced sputum. *Respiratory Medicine* 1998;92:415-420
11. Schaberg T., Klein U., Ray M., Eller J., Lode H. Subpopulations of Alveolar Macrophages in Smokers and Nonsmokers: Relation to the expression of CD11/CD18 Molecules and Superoxide Anion Production. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151:1551-8

12. Ludwig, P. W., Schwartz, B. A., Hoidal, J. R. and Niewoehner, D. E. (1985) Cigarette smoking causes accumulation of polymorphonuclear leukocytes in alveolar septum. *Am. Rev. Respir. Dis.* 131 , pp. 828-830.
13. Gairola, C. G. (1986) Free lung cell response of mice and rats to mainstream cigarette smoke exposure. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 84 , pp. 567-575.
14. MacNee, W. B., Wiggs, A. S., Belzberg, A. S. and Hogg, J. C. (1989) The effect of cigarette smoking on neutrophil kinetics in human lungs. *N. Engl. J. Med.* 321 , pp. 924-92
15. Lehr, H. A. (1993) Adhesion-promoting effects of cigarette smoke on leukocytes and endothelial cells. *Ann. NY Acad. Sci.* 686 , pp. 112-119.
16. Lehr, H. A., Frei, B. and Arfors, K. E. (1994) Vitamin C prevents cigarette smoke-induced leukocyte aggregation and adhesion to endothelium in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 , pp. 7688-7692.
17. van der Vaart, H., Postma, D. S., Timens, W. and Ten Hacken, N. H (2004) Acute effects of cigarette smoking on inflammation and oxidative stress: A review. *Thorax* 59 , pp. 713-721
18. D'hulst, A. I., Vermaelen, K. Y., Brusselle, G. G., Joos, G. F. and Pauwels, R. A. (2005) Time course of cigarette smoke-induced pulmonary inflammation in mice. *Eur. Respir. J.* 26 , pp. 204-213.
19. Maes, T., Bracke, K. R., Vermaelen, K. Y., Demedts, I. K., Joos, G. F., Pauwels, R. A. and Brusselle, G. G. (2006) Murine TLR4 is implicated in cigarette smoke-induced pulmonary inflammation. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 141 , pp. 354-368.
20. Rous, R. L., Boudreaux, M. J. and Penn, A. L. (2007) In utero ETS exposure alters gene expression in lungs of adult BALB/c mice. *Environ. Health Perspect.* 115 , pp. 1757-1766.
21. Morrison, D., Rahman, I., Lannan, S. and MacNee, W. (1999) Epithelial permeability, inflammation, and oxidant stress in the air spaces of smokers. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 159 , pp. 473-479.
22. Dhimi, R., Gilks, B., Xie, C., Zay, K., Wright, J. L. and Churg, A. (2000) Acute cigarette smoke-induced connective tissue breakdown is mediated by neutrophils and prevented by 1-antitrypsin. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 22 , pp. 244-252.

23. Churg, A., Cosio, M. and Wright, J. L. (2008) Mechanisms of cigarette smoke-induced COPD: Insights from animal models. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 294 , pp. L612-L631.
24. Churg, A., Zay, K., Shay, S., Xie, C., Shapiro, S. D., Hendricks, R. and Wright, J. L. (2002a) Acute cigarette smoke-induced connective tissue breakdown requires both neutrophils and macrophages metalloelastase in mice. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 27 , pp. 368-374.
25. Takubo, Y., Guerassimov, A., Ghezzi, H., Triantafillopoulos, A., Bates, J. H. T., Hoidal, J. R. and Cosio, M. G. (2002) 1-Antitrypsin determines the pattern of emphysema and function in tobacco smoke-exposed mice. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 166 , pp. 1596-1603.
26. Terashima, T., Klut, M. E., English, D., Hards, J., Hogg, J. C. and Van Eeden, S. F. (1999) Cigarette smoking causes sequestration of polymorphonuclear leukocytes released from the bone marrow in lung microvessels. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 20 , pp. 171-177.
27. Terashima, T., Wiggs, B., English, D., Hogg, J. C. and van Eeden, S. F. (1997) The effect of cigarette smoking on the bone marrow. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 155 , pp. 1021-1026.
28. Anderson, R., Theron, A. J., Richards, G. A., Myer, M. S. and Van Rensburg, A. J. (1991) Passive smoking by humans sensitizes circulating neutrophils. *Am. Rev. Respir. Dis.* 144 , pp. 570-574.
29. Haliwell B, Gutteridge JMC. Oxygen toxicity and reactive oxygen species. In: Haliwell B, Gutteridge JMC *Free radicals in Biology and Medicine*, Oxford: Oxford University Press, 1999:24-27. Hilbert J., Mohsenin V. Adaptation of Lung Antioxidants to Cigarette Smoking in Humans. *Chest* 1996;110:916-20
30. Kerr ME, Bender CM, Monti EJ. An introduction to oxygen free radicals. *Heart Lung* 1996; 25:200-9.
31. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical chemistry. In: Cheeseman KH, Slater TF eds. *Free Radicals in Medicine*, British Medical Bulletin, Vol. 49, Longman Singapore Publishers, 1993:481-93. von Sontag C. *The Chemical Basis of Radiation Biology*. Taylor & Francis, London.

32. Bast A, Haenen GR, Delman CJ. Oxidants and antioxidants: state of the art. *Am J Med* 1991; 91(3C):3C-13S. Johnson, J. D., Houchens, D. P., Kluwe, W. M., Craig, D. K. and Fisher, G. L. (1990) Effects of mainstream and environmental tobacco smoke on the immune system in animals and humans: A review. *Crit. Rev. Toxicol.* 20 , pp. 369-395.
33. Loft, S., Vistisen, K., Ewertz, M., Tjonneland, A., Overvad, K. and Poulsen, H. E. (1992) Oxidative DNA damage estimated by 8-hydroxydeoxyguanosine excretion in humans—Influence of smoking, gender and body mass index. *Carcinogenesis* 13 , pp. 2241-2247.
34. Morrow, J. D., Frei, B., Longmire, A. W., Gaziano, J. M., Lynch, S. M., Shyr, Y., Strauss, W. E., Oates, J. A. and Roberts, L. J. (1995) Increase in circulating products of lipid peroxidation (F2-isoprostanes) in smokers. *N. Engl. J. Med.* 332 , pp. 1198-1203.
35. Howard, D. J., Ota, R. B., Briggs, L. A., Hampton, M. and Pritsos, C. A. (1998) Environmental tobacco smoke in the workplace induces oxidative stress in employees, including increased production of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 7 , pp. 141-146.
36. Weber, C., Erl, W., Weber, K. and Weber, P. C. (1996) Increased adhesiveness of isolated monocytes to endothelium is prevented by vitamin C intake in smokers. *Circulation* 93 , pp. 1488-1492.
37. Chow, C. K. (1993) Cigarette smoking and oxidative damage in the lung. *Ann. NY Acad. Sci.* 686 , pp. 289-298.
38. Jaiswal, A. K. (1994) Antioxidant response element. *Biochem. Pharmacol.* 48 , pp. 439-444.
39. Rahman, I. and MacNee, W. (2000) Regulation of redox glutathione levels and gene transcription in lung inflammation: Therapeutic approaches. *Free Radical Biol. Med.* 28 , pp. 1405-1420.
40. Ichinose M., Sugiura H., Yamagata S., Koarai A., Shirato K. Increase in Reactive Nitrogen Species Production in Chronic Obstructive Pulmonary Disease Airways. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:701-706
41. Rutgers S. R., van der Mark Th W., Coers W., Moshage H., Timers W. Markers of nitric oxide metabolism in sputum and exhaled air are not increased in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 1999;54:576-580

42. Donnelly L.E., Barnes P.J. Expression of Heme Oxygenase in Human Airway Epithelial Cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2001;24:295-303
43. Lim S., Groneberg D., Fischer A., Oates T., Caramori Gaetano. Expression of Heme Oxygenase Isoenzymes 1 and 2 in Normal and Asthmatic Airways. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162:1921-1918
44. Maestrelli P., Messleman A.H.E., Fina O. Nowicki Y., Saetta M. Increased Expression of Heme Oxygenase(OH)-1 on Alveolar Spaces and HO-2 in Alveolar Walls of smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:1508-1513
45. Horvath I., Donnelly L., Kiss A., Paredi P., Kharitonov S.A., Barnes P.J. Raised levels of exhaled carbon monoxide are associated with an increased expression of heme oxygenase-1 in airway macrophages in asthma: a new marker of oxidative stress. *Thorax* 1998;53:668-672
46. Lams B. E. A., Sousa A.R., Rees P.J., Lee T.H. Immunopathology of the small-airway Submucosa in Smokers with and without Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158:1518-1523
47. Chrysofakis G., Tzanakis N., Kyriakoy D., Tsiligianni i., Tsoumakidou M. Expression of perforin and cytotoxic activity of CD8+ cells in induced sputum from current smokers with COPD. *Pneumon* 2002; 15(1);88-95
48. Tzanakis N, Chrysofakis G., Tsoumakidou M., Kyriakou D. Induced sputum CD8+ T-lymphocyte subpopulations in chronic obstructive pulmonary disease.(abstract) *Respir. Med.* 2004;98(1):57-65
49. J.M. Wallace, J.S. Oishi, R.G. Barbers, M.S. Simmons, D.P. Tashkin., "Lymphocytic subpopulation profiles in bronchoalveolar lavage fluid and peripheral blood from tobacco and marijuana smokers", *Chest*, vol. 105, no. 3, pp. 847-852, 1994
50. U. Costabel, K.J. Bross, C. Reuter, K.H. Rühle, H. Matthys, "Alterations in immunoregulatory T-cell subsets in cigarette smokers. A phenotypic analysis of bronchoalveolar and blood lymphocytes", *Chest*, vol. 90, no. 1, pp. 39-44, 1986
51. A. Ekberg-Jansson, B. Andersson, E. Avrå, O. Nilsson, C.G. Löfdahl, "The expression of lymphocyte surface antigens in bronchial biopsies, bronchoalveolar lavage cells and blood cells in healthy smoking and

- never-smoking men, 60 years old”, *Respiratory Medicine*, vol. 94, no. 3, pp. 264-272, 2000
- 52.A. Gadgil, S.R. Duncan, “Role of T-lymphocytes and pro-inflammatory mediators in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease”, *International journal of chronic obstructive pulmonary disease*, vol. 3, no. 4, 531-541, 2008
- 53.B.E. Lams, A.R. Sousa, P.J. Rees, T.H. Lee, “Subepithelial immunopathology of the large airways in smokers with and without chronic obstructive pulmonary disease”, *The European respiratory journal*, vol. 15, no. 3, pp. 512-516, 2000;
- 54.Williams SE, Brown TI, Roghanian A, Sallenave JM.SLPI and elafin: one glove, many fingers. *lin Sci (Lond)*. 2006 Jan;110(1):21-35.
- 55.Cavarra, E., Lucattelli, M., Gambelli, F. et al. (2001) Human SLPI inactivation after cigarette smoke exposure in a new *in vivo* model of pulmonary oxidative stress. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 281, L412–L417
- 56.Ayad, M. S., Knight, K. R., Burdon, J. G. and Brenton, S. (2003) Secretory leukocyte proteinase inhibitor, a-1-antitrypsin deficiency and emphysema: preliminary study, speculation and an hypothesis. *Respirology* 8, 175–180
- 57.Bernard A, Roels H, Buchet JP, Lauwerys R. Decrease of serum Clara cell protein in smokers. *Lancet*. 1992 Jun 27;339(8809):1620.
- 58.Broeckaert F, Bernard A. Clara cell secretory protein (CC16): characteristics and perspectives as lung peripheral biomarker. *Clin Exp Allergy*. 2000 Apr;30(4):469-75.
- 59.Lindahl M, Svartz J, Tagesson C. Demonstration of different forms of the anti-inflammatory proteins lipocortin-1 and Clara cell protein-16 in human nasal and bronchoalveolar lavage fluids. *Electrophoresis*. 1999 Apr-May;20(4-5):881-90.
- 60.McCray PB Jr, Bentley L. Human airway epithelia express a beta-defensin. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1997 Mar;16(3):343-9.
- 61.Singh PK, Jia HP, Wiles K, Hesselberth J, Liu L, Conway BA, Greenberg EP, Valore EV, Welsh MJ, Ganz T, Tack BF, McCray PB Jr. Production of beta-defensins by human airway epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Dec 8;95(25):14961-6.



62. T. Tecle, S. Tripathi, K. L. Hartshorn. Review: Defensins and cathelicidins in lung immunity *Innate Immunity* 2010;16:151-159

# Κεφάλαιο 5

## ΠΑΘΗΤΙΚΟ ΚΑΠΝΙΣΜΑ

Είναι πλέον γνωστό ότι όχι μόνο οι καπνιστές και των δύο φύλων, αλλά και οι μη καπνιστές διατρέχουν κίνδυνο, λόγω της περιβαλλοντικής έκθεσης στον καπνό του τσιγάρου, ιδιαίτερα σε κλειστούς χώρους. Το παθητικό κάπνισμα είναι ήδη ένα μείζον πρόβλημα για τη δημόσια υγεία, αποτελώντας την τρίτη αντιστρέψιμη αιτία θανάτου στις ΗΠΑ, με περισσότερους από 53,000 θανάτους μη καπνιστών ετησίως. Για κάθε 8 καπνιστές που πεθαίνουν η βιομηχανία καπνού σκοτώνει και έναν μη καπνιστή (1). Το παθητικό κάπνισμα ολοένα αναγνωρίζεται ως άμεση αιτία πνευμονικής νόσου στους ενήλικες και στα παιδιά (2). Θεωρείται υπεύθυνο για σημαντική θνητότητα στους ενήλικες, προκαλώντας περίπου 3000 θανάτους ανά έτος από καρκίνο του πνεύμονα.

Και ενώ οι κίνδυνοι από το ενεργητικό κάπνισμα έχουν γίνει ευρέως γνωστοί, έχουν συσσωρευτεί τα τελευταία χρόνια στοιχεία που υποστηρίζουν τον κίνδυνο της ακούσιας έκθεσης στον περιβαλλοντικό καπνό του τσιγάρου (environmental tobacco smoke - ETS). Ο ETS αποτελείται κυρίως από τον εισπνεόμενο καπνό που προέρχεται από τον καπνό του άκρου του αναμμένου τσιγάρου (side stream) και τον εκπνεόμενο από τον καπνιστή καπνό (main stream). Η χημική σύσταση του sidestream καπνού του τσιγάρου είναι ποιοτικά όμοια με αυτή του κυρίως καπνού (mainstream smoke), αλλά διαφέρει ποσοτικά στα επίπεδα των συστατικών του. Επιπρόσθετα, το μέσο μέγεθος σωματιδίων του sidestream καπνού είναι μικρότερο από αυτό του mainstream καπνού, ενώ το pH του sidestream καπνού είναι υψηλότερο από του mainstream καπνού. Αυτές οι διαφορές στις φυσικοχημικές ιδιότητες ίσως επηρεάζουν την τοξικότητά τους. Πράγματι, πρόσφατα φάνηκε ότι η τοξικότητα του ώριμου sidestream καπνού μπορεί να είναι αρκετά μεγαλύτερη από την δόση αντίστοιχης μάζας mainstream καπνού (3)

Είναι γνωστό ότι το παθητικό κάπνισμα σχετίζεται με πολυάριθμες δυσμενείς επιπτώσεις στην υγεία. Βάση πρόσφατων επιδημιολογικών δεδομένων οι εκτιθέμενοι μη καπνιστές έχουν 30% περισσότερη πιθανότητα να εμφανίσουν καρκίνο του πνεύμονα, 68-120% για καρκίνο του μαστού, ιδιαίτερα σε νέες προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, καθώς και αυξημένο κίνδυνο

για αναπνευστικά και καρδιαγγειακά νοσήματα (4,5). Αξίζει να σημειωθούν οι σημαντικές επιδράσεις στο αναπνευστικό σύστημα ενηλίκων μη καπνιστών, όπως μειωμένη αναπνευστική λειτουργία, αυξημένη παραγωγή πτυέλων και βήχα και δυσφορία στο θώρακα. Όμως η ομάδα των μη καπνιστών που υποφέρουν περισσότερο από τις συνέπειες του παθητικού καπνίσματος είναι τα παιδιά με γονείς καπνιστές. Υπολογίζεται ότι 700 εκατομμύρια παιδιά παγκοσμίως εκτίθενται στο παθητικό κάπνισμα στο σπίτι (6). Υπάρχει αποδεδειγμένη δόσο-εξαρτώμενη συσχέτιση μεταξύ των τοξινών του παθητικού καπνίσματος και αρκετών από τις λοιμώξεις της παιδικής ηλικίας, όπως μηνιγγοκοκκικές λοιμώξεις, λοιμώξεις κατώτερου αναπνευστικού συστήματος, φυματίωση και μέση ωτίτιδα, καθώς επίσης και συσχέτιση με το άσθμα (7). Ενδείξεις, αλλά όχι αποδεδειγμένη συσχέτιση υπάρχουν για το παθητικό κάπνισμα και τον αυξημένο κίνδυνο κακοήθειας στα παιδιά (8). Εξάλλου, το παθητικό κάπνισμα πιθανότατα σχετίζεται και με το σύνδρομο αιφνίδιου θανάτου στα νεογνά, αν και τα δεδομένα από τη βιβλιογραφία είναι αντιφατικά (9,10).

Σημαντική όμως πτυχή του προβλήματος είναι και το κάπνισμα στην εγκυμοσύνη. Υπάρχουν δύο πλευρές του προβλήματος: οι έγκυες που είναι ενεργές καπνίστριες και οι μη καπνίστριες που εκτίθενται στο παθητικό κάπνισμα. Και στις δύο περιπτώσεις, τα έμβρυα είναι μη καπνιστές που εκτίθενται στις τοξίνες του παθητικού καπνού μέσω του πλακούντα. Υπάρχουν πολυάριθμες αποδεδειγμένες και πιθανές συσχετίσεις του καπνίσματος για τα έμβρυα και τις μητέρες τους, όπως αυξημένες επιπλοκές στην εγκυμοσύνη, αυξημένες περιγεννητικές επιπλοκές, υψηλή περιγεννητική θνησιμότητα, μειωμένη περίμετρος κεφαλής στη γέννηση, μειωμένη ενδομήτρια ανάπτυξη του πνεύμονα, χαμηλό βάρος γέννησης και υψηλό ποσοστό πρόωρου τοκετού (7).

### **Παθοφυσιολογία**

Η απευθείας έκθεση στο παθητικό κάπνισμα επιδρά στη φυσιολογία του αναπνευστικού συστήματος, με συμπτώματα νόσου εξαρτώμενης από το ποιος ειδικός μηχανισμός κυριαρχεί και ποια ανατομική περιοχή επηρεάζεται περισσότερο σε κάθε άτομο. Η φυσιολογική αντίδραση στο παθητικό καπνό είναι γενικά η ίδια όπως του καπνιστή, αλλά με μειωμένη επίδραση. Τέτοιες αλλαγές περιλαμβάνουν αυξημένη παραγωγή βλέννας (ως 7 φορές),

μειωμένη κινητικότητα των κροσσών, αυξημένη παραγωγή λευκών αιμοσφαιρίων αίματος και μετακίνηση στον αυλό των αεραγωγών, αυξημένη διαπερατότητα βλεννογόνου στα αλλεργιογόνα, που σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα ολικής και ειδικής ανασοδφαιρίνης E (IgE) και αυξημένα ηωσινόφιλα αίματος.

Το κάπνισμα σχετίζεται με δομικές αλλαγές στους αεραγωγούς και στο πνευμονικό παρέγχυμα, περιλαμβάνοντας υπερτροφία και υπερπλασία των βλεννοδών αδενών των άνω αεραγωγών. Μεταβολές έχουν περιγραφεί στην ενδοτικότητα και ελαστικότητα του πνεύμονα, όπως προδιάθεση για κεντρολοβιώδες εμφύσημα στους ενήλικες. Σε παιδιά 2 εβδομάδων μητέρων που καπνίζουν έχει παρατηρηθεί αυξημένη ενδοτικότητα πνεύμονα. Αυτό οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η έκθεση σε προϊόντα καπνού επηρεάζει αρνητικά τις ελαστικές ιδιότητες του εμβρυϊκού πνεύμονα, επειδή 2 εβδομάδες έκθεσης μετά τη γέννηση δεν θεωρήθηκαν αρκετές για να οδηγήσουν σε αυτό το αποτέλεσμα.

Σε ένα μοντέλο ζώου, η έκθεση στον καπνό προκάλεσε συστηματικές και τοπικές αντιδράσεις, όπως αύξηση των επιπέδων πλάσματος C5a και νευροτροφικού παράγοντα προερχόμενο από τον εγκέφαλο (brain-derived neurotrophic factor), καθώς και αυξήσεις στον παράγοντα νέκρωσης των όγκων (TNF)-άλφα του πνεύμονα, ιντερλευκίνης (IL)-5, monocyte chemoattractant protein (MCP)-1, και στην πυκνότητα των θετικών στην ουσία P νεύρων κατά μήκος του βρογχικού επιθηλίου (11). Η περιγεννητική έκθεση στο παθητικό κάπνισμα επίσης αύξησε σημαντικά τους αριθμούς των μαστοκυττάρων, ηωσινοφίλων, μονοκυττάρων και λεμφοκυττάρων στον πνεύμονα στα βρέφη πιθήκων. Επίσης η έκθεση στο παθητικό κάπνισμα σχετίστηκε με μειωμένη φαγοκυτταρική δραστηριότητα των κυψελιδικών μακροφάγων και με σημαντικά μειωμένα επίπεδα του νευρικού αυξητικού παράγοντα στο βρογχοκυψελιδικό έκκριμμα. Οι επιδράσεις του παθητικού καπνίσματος στο έμβρυο και βρέφος είναι ακόμη υπό μελέτη, και οι επιδράσεις φαίνονται αρκετές και επιβλαβείς.

## Βιβλιογραφία

1. Hofhuils W, de Jongste JC, Mercus PJFM. Adverse health effects of prenatal and postnatal tobacco smoke exposure on children. *Arch Dis Childh* 2003;1086-1090
2. Gajewska E, Malak R, Mojs E, Samborski W. [Cigarette smoking--threat from first days of life]. *Przegl Lek.* 2008;65(10):709-11.
3. Schick, S. and Glantz, S. A. (2006) Sidestream cigarette smoke toxicity increases with aging and exposure duration. *Tobacco Control* 15, pp. 424-429.
4. Boffeta P, Tredaniel J, Greco A. Risk of childhood cancer and adult lung cancer after childhood exposure to passive smoke: a meta-analysis. *Environ Health Perspect* 2000;108:73-82
5. Dybing E, Sanner T. Passive smoking, sudden infant death syndrome (SIDS) and childhood infections. *Hum Exp Toxicol* 1999;18:202-205
6. Sawنامi H, Jackson T, Murphy T, Beckerman R, Simakajornboon N. The effect of maternal smoking in respiratory and arousal patterns in preterm infants during sleep. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;169:733-738
7. Report on Carcinogens (RoC): Environmental Tobacco Smoke, 11<sup>th</sup> Edition, 2005
8. Wackenfield M, Cameron M, Inglis G, Letcher T, Durkin S. Second hand smoke exposure and respiratory symptoms among casino, club and office workers in Victoria, Australia. *J Occup Environ Med* 2005;47:698-703
9. Chapman S. Smoking in public places. *BMJ* 1996;312:1051-1052
10. Ong MK, Glantz SA. Cardiovascular health and economic effects of smoke free workplaces. *Am J Med* 2004;117;32-38
11. Yu M, Zheng X, Peake J, Joad JP, Pinkerton KE. Perinatal environmental tobacco smoke exposure alters the immune response and airway innervation in infant primates. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;122:640-7.

## Κεφάλαιο 6

### **ΕΚΘΕΣΗ ΣΤΟ ΠΑΘΗΤΙΚΟ ΚΑΠΝΙΣΜΑ ΚΑΙ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΕΠΙΠΡΟΣΘΕΤΗ ΘΝΗΤΟΤΗΤΑ ΑΠΟ ΚΑΡΔΙΑΚΗ ΝΟΣΟ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ ΣΤΟ ΠΡΟΣΩΠΙΚΟ ΕΝΟΣ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟΥ ΣΤΗΝ ΚΡΗΤΗ**

Το παθητικό κάπνισμα (second hand smoke- SHS), λοιπόν, αποτελεί μια γνωστή τοξίνη καθώς και καρκινογόνο για τον άνθρωπο. Περιέχει πάνω από 3000 χημικά, από τα οποία τουλάχιστον τα 50 είναι γνωστά ή ύποπτα για καρκινογένεση, ενώ πάνω από 200 θεωρούνται ως δηλητηριώδη (1, 2). Οι ανεπιθύμητες ενέργειες στην ανθρώπινη υγεία, όπως προαναφέρθηκαν, έχουν καλά τεκμηριωθεί και γενικά είναι αποδεκτό ότι δεν υπάρχει ασφαλές επίπεδο έκθεσης στον καπνό του τσιγάρου (3). Η ογκογένεση, οι καρδιαγγειακές και αναπνευστικές νόσοι ανάμεσα σε άλλες φαίνεται ότι αναπτύσσονται και επιδεινώνονται σε πληθυσμούς που εκτίθενται σε παθητικό καπνό (4-8). Είναι επίσης γνωστό ότι δεν υπάρχει κατώτερο όριο για την καρκινογένεση από τον καπνό, είτε όσον αφορά τον καρκίνο του πνεύμονα, είτε όγκους σε άλλους ιστούς που εκτίθενται άμεσα, αφού τα καρκινογόνα που απορροφούνται στον πνεύμονα κατανέμονται σε όλο το σώμα και έχει αποδειχτεί ότι προκαλούν ή επιδεινώνουν την καρκινογένεση (9,10)

Στην Ελλάδα εκτιμάται, όπως προαναφέρθηκε, ότι το 40% των ενηλίκων είναι καπνιστές και παρά τις ισχύουσες νομοθεσίες για τη χρήση καπνού, δεν τηρούνται επαρκώς. Μάλιστα σε ορισμένες περιπτώσεις αγνοούνται απερίφραστα από τον πληθυσμό (11-13). Ένας νόμος, που ορθά αποφασίστηκε, είναι η εφαρμογή της απαγόρευσης του καπνίσματος στα κέντρα παροχών υγειονομικής φροντίδας, όπως τα δημόσια και ιδιωτικά νοσοκομεία, τα κέντρα υγείας και να φαρμακεία (Νόμος Υγείας 76017)(14). Σύμφωνα με αυτή τη νομοθεσία (σε ισχύ από τον Αύγουστο του 2002) το κάπνισμα επιτρέπεται μόνο σε καθορισμένες περιοχές, στις οποίες θα πρέπει

να παρέχεται επαρκής κυκλοφορία αέρα για αυτούς που επιθυμούν να καπνίζουν. Η νομοθεσία αυτή επίσης καλύπτει δημόσιες υπηρεσίες, εκπαιδευτικά ιδρύματα και σταθμούς μαζικής μεταφοράς/δημόσια οχήματα. Μέχρι σήμερα, δεν υπάρχουν αρκετές πληροφορίες για την έκταση της έκθεσης του παθητικού καπνού στην Ελλάδα, ιδιαίτερα σε χώρους που παρέχονται υγειονομικές υπηρεσίες. Επομένως, διεξήγαμε μία μελέτη αφενός για να μετρήσουμε την έκθεση του παθητικού καπνού σε διάφορους χώρους σε ένα μεγάλο ελληνικό δημόσιο νοσοκομείο και αφετέρου για να εκτιμήσουμε τον επιπρόσθετο κίνδυνο θνητότητας καρκίνου του πνεύμονα και καρδιακής νόσου του προσωπικού του νοσοκομείου λόγω της επαγγελματικής τους έκθεσης στο παθητικό κάπνισμα.

## **Μέθοδος**

### *Μετρήσεις αερολύματος και μέθοδοι ερωτηματολογίων*

Ένα TSI SidePak AM510 Personal Aerosol Monitor (TSI, Inc., St. Paul, Minnesota, USA), χρησιμοποιήθηκε για τη δειγματοληψία και καταγραφή των επιπέδων των αναπνεόμενων αιωρούμενων σωματιδίων (respirable suspended particles - RSP) στον αέρα. Το SidePak χρησιμοποιεί μία ενσωματωμένη αντλία δειγματοληψίας για να αντλεί αέρα διαμέσου της συσκευής και το ειδικό υλικό στον αέρα σαρώνει το φως από ένα laser για την εκτίμηση την συγκέντρωση σε πραγματικό χρόνο σωματιδίων μικρότερων των 2,5μm σε μικρογραμμάρια ανά κυβικό μέτρο, ή PM<sub>2.5</sub>. Τα σωματίδια αυτού του μεγέθους απελευθερώνονται σε μεγάλα ποσά από τη καύση των τσιγάρων, εισπνέονται εύκολα βαθιά στον πνεύμονα και σχετίζονται με αναπνευστική και καρδιακή νόσο και θνητότητα (15). Το παθητικό κάπνισμα δεν είναι η μοναδική πηγή των εσωτερικών ειδικών υλικών αφού η σκόνη, το μαγείρεμα και οι αναθυμιάσεις από τα οχήματα είναι του ίδιου μεγέθους. Όμως, η καταγραφή PM<sub>2.5</sub> είναι αρκετά ευαίσθητη στον παθητικό καπνό και τα αυξημένα επίπεδα αυτών των σωματιδίων μπορούν να αποδοθούν σχεδόν αποκλειστικά στον παθητικό καπνό (16,17). Λαμβάνοντας υπόψη τα επίπεδα αεροζόλ του περιβάλλοντος του νοσοκομείου, κάποιος θα μπορούσε να υπολογίσει τα επίπεδα PM<sub>2.5</sub> που αποδίδονται στον παθητικό καπνό, ακολουθώντας τη φόρμουλα: παθητικός καπνός- επίπεδα RSP = μετρούμενα RSP – B, όπου B είναι τα επίπεδα αεροζόλ (background aerosol level). Το

SidePak καλιμπράρεται προς ένα όργανο σκεδασμού φωτός, το οποίο είχε προηγούμενα καλιμπραρισθεί και χρησιμοποιηθεί σε παρόμοιες μελέτες. Ο εξοπλισμός ρυθμίστηκε σε ένα μεσοδιάστημα δειγματοληψίας των 10 δευτερολέπτων, το οποίο υπολογίζει το μέσο όρο των μετρήσεων των προηγούμενων 10 δευτερολέπτων. Ο ρυθμός ροής του SidePak ρυθμίστηκε στα 1.7 λίτρα ανά λεπτό για τη διασφάλιση ορθής λειτουργίας του συνδεδεμένου του 2.5 micron impactor. Σε συμφωνία με το Global Air Monitoring Study Protocol, ένας παράγοντας καλιμπραρίσματος της τάξης του 0.32, ο οποίος είναι κατάλληλος για τον καπνό του τσιγάρου, εφαρμόστηκε σε όλα τα δεδομένα (18).

Πληροφορίες παρατήρησης επίσης καταγράφηκαν σχετικά με τεκμήρια τρέχοντος ή προηγούμενου καπνίσματος στην περιοχή, όγκο του αέρα και άλλους παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν τα δεδομένα (όπως η χρήση διαλυτικών και άλλων χημικών). Το μόνιτορ στερεώθηκε στον ώμο του παρατηρητή, ώστε ο αέρας που δειγματίζεται να είναι μέσα στη φυσιολογική αναπνευστική ζώνη των παρευρισκομένων και η δειγματοληψία να είναι διακριτική για να μην διαταραχτεί η φυσιολογική συμπεριφορά των ασθενών και του προσωπικού. Για κάθε κλινική ή θάλαμο, τα πρώτα και τελευταία 20 δευτερόλεπτα των καταχωρημένων δεδομένων αποσύρονταν επειδή υπολογίζονταν στο μέσο όρο του αέρα των αιθουσών αναμονής και των σκαλών. Ένα σύνολο 15 λεπτών αφιερώνονταν σε κάθε περιοχή ή θάλαμο μέσα στο νοσοκομείο, όπου στα εναπομείναντα δεδομένα σημείων υπολογίστηκε ο μέσος όρος για να έχουμε μία μέση συγκέντρωση PM<sub>2.5</sub>. Οι μετρήσεις έλαβαν μέρος τις καθημερινές μέρες, κατά τον Απρίλιο του 2006, κατά τη διάρκεια της πρωινής βάρδιας (9π.μ. – 3μ.μ.). Το πανεπιστημιακό Νοσοκομείο της Κρήτης, το οποίο βρίσκεται στο Ηράκλειο, παρέχει πρωτοβάθμια και δευτεροβάθμια φροντίδα στον πληθυσμό του Ηρακλείου και τριτοβάθμια σε όλο τον πληθυσμό της Κρήτης και των γειτονικών νησιών. Η μελέτη εγκρίθηκε και αναγνωρίστηκε από τη διοίκηση του Πανεπιστημιακού νοσοκομείου του Ηρακλείου, αλλά κρατήθηκε μυστική από το προσωπικό και τους ασθενείς, ώστε να μην τροποποιηθεί προσωρινά η καπνιστική τους συμπεριφορά.



*Μέτρηση της αερομεταφερόμενης νικοτίνης και κινδύνου θνητότητα από καρκίνο του πνεύμονα.*

Σύμφωνα με τις εξισώσεις που παρουσιάστηκαν από τον Repace και συν, επίπεδα ατμοσφαιρικής νικοτίνης αερολύματος (ambient aerosol nicotine levels - AANL) μπορούν να υπολογιστούν από τα επίπεδα SHS-RSP (SHS-RSP: nicotine λόγος = 10:1) και η συγκέντρωση της ατμοσφαιρικής νικοτίνης του χώρου εργασίας των 7.5 ug/m<sup>3</sup> δίνει πρόσθετο κίνδυνο καρδιακής νόσου και καρκίνου του πνεύμονα της τάξης των 10/1000 και 1/1000 αντίστοιχα σε μια γραμμική, συσχέτιση δόσης-αποτελέσματος για πάνω από τα 40 έτη εργάσιμης διάρκειας ζωής (19,20). Η εξίσωση που δημιουργείται έχει προβλέψει επιτυχώς τον ακριβή κίνδυνο θνητότητας σε πληθυσμιακές μελέτες και έχει χρησιμοποιηθεί προηγουμένως για την εκτίμηση επιπρόσθετου κινδύνου καρκίνου του πνεύμονα εργασιακής αιτιολογίας και καρδιακής νόσου σε εργαζόμενους φιλοξενίας (21-23)

### **Αποτελέσματα**

#### *Συγκέντρωση εσωτερικού χώρου SHS-RSP*

Ο πίνακας 1 παρουσιάζει την κατάσταση εργασιακής έκθεσης σε παθητικό καπνό μέσα στο νοσοκομείο. Τα ακριβή επίπεδα SHS-RSP διέφεραν σημαντικά σε κάθε περιοχή. Δεν μετρήθηκαν καθόλου επίπεδα SHS-RSP μόνο στη μονάδα εντατικής θεραπείας και στις αίθουσες των χειρουργείων με μέσο επίπεδο SHS-RSP των 11 ug/m<sup>3</sup>, που είναι ακόμη χαμηλότερα από τα επίπεδα του εξωτερικού περιβάλλοντος αναφοράς των 27 ug/m<sup>3</sup>. Από την άλλη μεριά, στις περισσότερες κλινικές το κάπνισμα είτε ήταν αντιληπτό, ή προφανές. Το μέσο επίπεδο SHS-RSP στις ανοικτές κλινικές εκτιμάται στα 84 ug/m<sup>3</sup>, με εύρος από 17 έως 141 ug/m<sup>3</sup>, με τις κατώτερες τιμές στις παιδιατρικές κλινικές (γενική παιδιατρική, παιδιατρική αιματολογία, κτλ.)

Τα οφίς του προσωπικού επίσης βρέθηκε στις μετρήσεις ότι έχουν αυξημένα επίπεδα SHS-RSP, ανάλογα με το αν το κάπνισμα ήταν προφανές κατά τη διάρκεια ή πριν τις μετρήσεις. Στα οφίς του προσωπικού, που το κάπνισμα ήταν προφανές, τα επίπεδα SHS-RSP ήταν κατά μέσο όρο 628 ug/m<sup>3</sup> και εκεί όπου το κάπνισμα δεν έγινε αντιληπτό 17 ug/m<sup>3</sup>. Οι σκάλες και οι χώροι αναμονής βρέθηκαν επίσης να έχουν αυξημένα επίπεδα SHS-RSP, της τάξης των 147 και 211 ug/m<sup>3</sup> αντίστοιχα. Μέσα στο χώρο του

νοσοκομείου το κάπνισμα επιτρέπεται μόνο στο καπνιστήριο, το οποίο έχει ανεπαρκή αερισμό. Εκεί, η έκθεση σε SHS-RSP ήταν αναπόφευκτα υψηλή, με μέσο όρο 1448  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ . Ακόμη υψηλότερα επίπεδα έκθεσης σε SHS-RSP, με μέσο όρο 1461  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ , βρέθηκαν σε ορισμένα αποδυτήρια παρά το γεγονός ότι το κάπνισμα απαγορεύεται.

**Πίνακας 1.** Συγκεντρώσεις ETS (SHS – RSP) από το εσωτερικό του νοσοκομείου

Χώρο Μέτρησης	Μέσο επίπεδο PM <sub>2.5</sub> ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )	Εύρος ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )
<b>Ανοιχτές Κλινικές</b>	96	29 - 153
<b>Κλειστές κλινικές</b>		
Μ.Ε.Θ	12	2 - 23
Χειρουργεία	11	8 - 21
<b>Όφισ</b>		
Κάπνισμα κατά την μέτρηση	640	465 - 1854
Κάπνισμα πριν την μέτρηση	181	23 - 931
Καθόλου κάπνισμα	29	22 - 54
<b>Πτέρυγα Διοίκησης</b>	176	41 - 913
<b>Χώροι αναμονής</b>	223	103 - 343
<b>Κύρια είσοδος νοσοκομείου</b>	69	37 - 096
<b>Σκάλες</b>	159	36 - 265
<b>Αποδυτήρια νοσηλευτών</b>		
Παρατηρήθηκε κάπνισμα	1473	1386 - 2135
Δεν παρατηρήθηκε κάπνισμα <sup>2</sup>	96	29 - 153
<b>Διαδρόμους</b>		
Κύρια	91	59 - 106
Δευτερεύουσα	71	31 - 110
Βοηθητικό προσωπικού	62	19 - 116
<b>Χώρος καπνιστών</b>	1460	1063 - 2096
<b>Εξωτερικό περιβάλλον</b>	27	-

*Μετρούμενα επίπεδα νικοτίνης και εκτιμήσεις της επιπρόσθετης θνητότητας καρδιακής νόσου και καρκίνου του πνεύμονα*

Λαμβάνοντας υπόψη τα μέσα επίπεδα του SHS που κάποιος εκτίθεται ενώ δουλεύει στο νοσοκομείο, μπορούμε να υπολογίσουμε τον επιπρόσθετο εργασιακό κίνδυνο καρδιακής νόσου και καρκίνου του πνεύμονα στη διάρκεια της ζωής λόγω της έκθεσης σε παθητικό καπνό στο νοσοκομείο.

Σύμφωνα με τις εξισώσεις μετατροπής επιπέδων περιβαλλοντικού αερολύματος προς περιβαλλοντικού αερολύματος νικοτίνης (ambient aerosol to ambient aerosol nicotine level -AANL) το μέσο AANL ήταν 8.4 ug/m<sup>3</sup> (εύρος από 1.7 έως 14.1 ug/m<sup>3</sup>) σε ανοικτές κλινικές και 16.4 ug/m<sup>3</sup> (εύρος από 2.9 έως 90.1 ug/m<sup>3</sup>) στην πτέρυγα διοίκησης. Ο πίνακας 2 δείχνει τον εκτιμώμενο επιπρόσθετο κίνδυνο θνητότητας καρδιακής νόσου και καρκίνου του πνεύμονα λόγω έκθεσης σε SHS στο νοσοκομείο. Κατά μέσο όρο 1.12 (0.23 με 1.88) εργάτες ανά 1000 στις ανοικτές κλινικές και 2.35 ανά 1000 (0.55-12.2) του προσωπικού διοίκησης θα πεθάνει από καρκίνο του πνεύμονα λόγω της έκθεσης στον SHS του νοσοκομείου. Ο επιπρόσθετος κίνδυνος θνητότητας καρκίνου του πνεύμονα στη ΜΕΘ ή στα χειρουργεία δεν υπολογίστηκε επειδή οι μετρήσεις περιβαλλοντικού αερολύματος ήταν ακόμη πιο μικρές από τα βασικές μετρήσεις του εξωτερικού περιβάλλοντος και επομένως δεν μπορεί να αποδοθεί στο SHS. Η επιπρόσθετη θνητότητα από καρδιακή νόσο υπολογίστηκε δεκαπλάσια από των περιπτώσεων επιπρόσθετου καρκίνου του πνεύμονα και η συνάθροιση και των δύο οδήγησε στις συνολικές επιπρόσθετες περιπτώσεις θνητότητας των 12.3 (2.5 to 20.7) και 25.9 ανά 1000 (6-134) των περιπτώσεων ανά 1000 ανά 40 έτη στις ανοικτές κλινικές και στην πτέρυγα διοίκησης αντίστοιχα.

## **Συζήτηση**

Τα επίπεδα της έκθεσης σε SHS που καταγράφηκαν στους περισσότερους χώρους του νοσοκομείου είναι ανησυχητικά. Είναι προφανές ότι η νομοθεσία για τον έλεγχο του καπνίσματος δεν ακολουθούνται αφού η έκθεση στο SHS ήταν εμφανής σε όλες σχεδόν τις περιοχές. Παρατηρήθηκε ότι οι ασθενείς, οι συγγενείς και οι φίλοι τους, αλλά επίσης και το προσωπικό κάπνιζαν στη διάρκεια των ημερών που έγιναν οι μετρήσεις. Αν και οι χώροι αναμονής και οι σκάλες δεν έχουν τασάκια και έχουν εμφανή σήματα μη καπνίσματος, το κάπνισμα ήταν εμφανές και η έκθεση στο SHS για αυτούς στους χώρους αναμονής ήταν αυξημένη. Το προσωπικό βρέθηκε να καπνίζει στις τουαλέτες και επίσης στα αποδυτήρια, ώστε να αποφύγουν να τους δουν και να τους επιπλήξουν. Οι επιδράσεις της έκθεσης σε SHS στην ανθρώπινη υγεία έχουν καλά τεκμηριωθεί και σε αυτή την περίπτωση δεν θα επηρεάσουν μόνο την κατάσταση της υγείας του προσωπικού αλλά επίσης και των

ασθενών υπό θεραπεία. Το παθητικό κάπνισμα έχει βρεθεί να επιδεινώνει τους παροξυσμούς του άσθματος, τη χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια, τον καρκίνο της παιδικής ηλικίας, τη θεραπεία του καρκίνου των ενηλίκων και την έκβαση και ακόμη και τη γονιμότητα γυναικών που έχουν υποβληθεί σε πρόσφατη εξωσωματική γονιμοποίηση (24-28).

**Πίνακας 2.** Εκτιμώμενοι επιπρόσθετοι θάνατοι από καρδιακή νόσο και καρκίνο του πνεύμονα ανά 1000 ανά 40 έτη λόγω της έκθεσης σε SHS στο νοσοκομείο.

	<i>Open wards</i>	<i>Closed wards</i>	<i>Management wards</i>
Mean nicotine concentrations <sup>3</sup> in (ug/m <sup>3</sup> )	8.4	N/a	17.6
Range in (ug/m <sup>3</sup> )	1.7 - 14.1	N/a	4.1 - 91.3
Excess lung cancer deaths	1.12	N/a	2.35
Range	0.23 - 1.88	N/a	0.55 - 12.2
Excess heart disease deaths	11.2	N/a	23.5
Range	2.3 - 18.8	N/a	5.5 - 122
Total excess mortality	12.3	N/a	25.9
Range	2.5 - 20.7	N/a	6 - 134

<sup>1</sup>Units of deaths per 1000 persons per 40 years

<sup>2</sup>Mean nicotine concentrations were calculated by using the data from Table 1 SHS-RSP: nicotine ratio of 10:1

<sup>3</sup>Total excess mortality = Lung cancer mortality + cardiovascular disease mortality

Το παθητικό κάπνισμα πλέον μπορεί να προστεθεί σε μια πληθώρα κινδύνων για την υγεία που αντιμετωπίζουν το ιατρικό και το νοσηλευτικό προσωπικό. Η οσφυαλγία, οι πολλές ώρες και η έκθεση στην ακτινοβολία, ο latex, το οξείδιο του αζώτου και βιολογικά παθογόνα είναι μόνο λίγοι από τους

κινδύνους που μπορούν να μειώσουν την αποδοτικότητα στη δουλειά και την υγεία των επαγγελματιών της υγείας (29-34). Σε αντίθεση όμως με τα προηγούμενα, η έκθεση σε SHS μπορεί να αποφευχθεί πλήρως αν τα νόμιμα μέτρα ελέγχου του καπνίσματος ακολουθούνται όπως σχεδιάστηκαν.

Η έκθεση στον παθητικό καπνό στο χώρο εργασίας θεωρείται σύνηθες, ειδικά σε εργαζόμενους χώρων αναψυχής, όπως μπαρ, καφετέριες και εστιατόρια. Όσον αφορά την επιπρόσθετη θνητότητα από καρκίνο του πνεύμονα, παρόμοια επίπεδα κινδύνου με αυτά που βρέθηκαν στη μελέτη μας έχουν σημειωθεί στους εργαζόμενους πρακτορείων τζόγου και μπόουλινγκ στις ΗΠΑ (1-1.4 ανά 1000) και στις καφετέριες και στα μπαρ στην Ισπανία (21-22). Σε σύγκριση με τα ευρήματά μας οι εργαζόμενοι των μπαρ στις ΗΠΑ διατρέχουν αρκετά αυξημένο κίνδυνο έως και 14 ανά 1000 (πριν την απαγόρευση του καπνίσματος), ενώ στο Χόνγκ Κόνγκ οι εργαζόμενοι σε χώρους αναψυχής έχει επίσης εκτιμηθεί ότι διατρέχουν περίπου τριπλάσιο κίνδυνο θνητότητας από καρκίνο του πνεύμονα και καρδιαγγειακή νόσο σε σύγκριση με το προσωπικό νοσοκομείου της δικιάς μας μελέτης, αλλά θα πρέπει να λάβουμε υπόψη μας το τελείως διαφορετικό περιβάλλον μεταξύ των υπηρεσιών των χώρων αναψυχής και των υπηρεσιών υγείας (23). Παγκοσμίως, ορισμένοι πληθυσμοί και ορισμένες εργατικές ομάδες (όπως εργαζόμενοι σε μπαρ, καφετέριες, καζίνο και εστιατόρια) εκτίθενται και επακόλουθα επηρεάζονται από τον παθητικό καπνό. Η εφαρμογή της απαγόρευσης του καπνίσματος έχει βρεθεί ότι μειώνει τόσο τα αναπνευστικά συμπτώματα εργασιακής αιτιολογίας, όσο και τον πληθυσμιακά βασιζόμενο κίνδυνο για οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου και άλλα καρδιαγγειακά νοσήματα και η αναγκαιότητα της εφαρμογής τους είναι επιστημονικά δικαιολογημένη (35-36). Από όσο γνωρίζουμε, αυτή είναι η πρώτη μελέτη που δείχνει καθαρά τη σύνδεση μεταξύ μη συμμόρφωσης στα μέτρα ελέγχου του καπνίσματος και κινδύνου θνητότητας στους εργαζόμενους στο χώρο του νοσοκομείου.

Ορισμένες υποθέσεις έχουν γίνει για τις μετρήσεις αερολυμάτων και τους υπολογισμούς επιπρόσθετης καρδιακής νόσου και καρκίνο του πνεύμονα. Είναι πιθανό ότι η έκθεση σε παθητικό καπνό στο νοσοκομείο διαφέρει λόγω του παραθύρου των μετρήσεων. Τα επίπεδα παθητικού καπνού πιθανά κατά τις απογευματινές και βραδινές βάρδιες να είναι χαμηλότερα λόγω του μειωμένου προσωπικού και των επισκεπτών. Όμως, ο

επιπρόσθετος κίνδυνος θνητότητας ίσως να μην είναι απαραίτητα χαμηλότερος αφού δεν έχουμε λάβει υπόψη την κίνηση μεταξύ των κλινικών και το χρόνο που αφιερώνεται στις τουαλέτες, που παρέχουν μία σύντομη αλλά πολύ υψηλή έκθεση σε παθητικό καπνό. Παρότι είναι δύσκολο να εξάγουμε γενικευμένα συμπεράσματα όσον αφορά άλλα νοσοκομεία στην Ελλάδα, η μελέτη αυτή δείχνει ότι οι μετρήσεις των PM2.5 αποτελούν ένα έγκυρο εργαλείο για τη μέτρηση και παρακολούθηση της έκθεσης σε παθητικό καπνό στα νοσοκομεία και ένα σημαντικό μέσο επαγρύπνησης για τη νομοθεσία ελέγχου του καπνίσματος.

Από τη μελέτη μας, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι ο παθητικός καπνός σε ένα τυπικό νοσοκομείο στην Ελλάδα είναι διαδεδομένος και θέτει σε κίνδυνο την υγεία των ασθενών και του προσωπικού του νοσοκομείου. Παρόλο που υπάρχει πολιτική που απαγορεύει το κάπνισμα στα νοσοκομεία, αγνοείται απερίφραστα. Όταν κάποιος σκεφτεί τον επιπρόσθετο κίνδυνο θνητότητας και τις άμεσες επιπτώσεις στην υγεία του παθητικού καπνού, είναι επιβεβλημένο ότι η νομοθεσία που απαγορεύει το κάπνισμα στα νοσοκομεία στην Ελλάδα να επιβληθεί για την προστασία όχι μόνο των ασθενών αλλά επίσης και του ιατρικού και νοσηλευτικού προσωπικού από την ακούσια έκθεση στον παθητικό καπνό και τις συνέπειές του.

## Βιβλιογραφία

1. IARC (International Agency for Research on Cancer): Tobacco smoking and involuntary smoking. ARCMonographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, vol. 83, Lyon, France, 2002.
2. NCI (National Cancer Institute). Fact sheet on environmental tobacco smoke. 2 February 2000. Available at: [http://cis.nci.nih.gov/fact/10\\_18.htm](http://cis.nci.nih.gov/fact/10_18.htm)
3. EHIS (Environmental Health Information Service) ninth report on Carcinogens. US department of Health and Human Services, Public Health Service, *National Toxicology Program*, 2000.
4. Zhu, B. Q.; Heeschen, C.; Sievers, R. E. et al.: Second hand smoke stimulates tumor angiogenesis and growth. *Cancer Cell*, 2003, 4(3):191-6.
5. Gammon, M. D.; Eng, S. M.; Teitelbaum, S. L. et al.: Environmental tobacco smoke and breast cancer incidence. *Environ Res.* 2004; 96(2):176-85.
6. Moffatt, R. J.; Chelland, S. A.; Pecott, D. L. et al.: Acute exposure to environmental tobacco smoke reduces HDL-C and HDL2-C. *Prev Med.* 2004; 38(5):637-41.
7. Eisner, M. D.; Balmes, J.; Katz, P. P. et al.: Lifetime environmental tobacco smoke exposure and the risk of chronic obstructive pulmonary disease. *Environ Health*, 2005; 4(1):7
8. Maziak, W.; Ward, K. D.; Rastam, S. et al.: Extent of exposure to environmental tobacco smoke (ETS) and its dose-response relation to respiratory health among adults. *Respir Res.* 2005; 6(1):13.
9. Alberg, A.; Samet, J.: Epidemiology of Lung Cancer. *J Am Col Chest Phy.* 2003; 123: 21s-49s.
10. Trimble, C. L.; Genkinger, J. M.; Burke, A. E. et al.: Active and passive cigarette smoking and the risk of cervical neoplasia. *Obstet Gynecol.* 2005; 105:174-181
12. Huisman, M.; Kunst, A. E.; Mackenbach, J. P.: Inequalities in the prevalence of smoking in the European Union: comparing education and income. *Prev Med*, 2005; 40:756-764
13. Vardavas, C. I.; Kafatos, A.: Greece's tobacco policy: another myth? *The Lancet*, 2006; 367(9521): 1485-1486

14. Vardavas, C. I.; Kafatos, A.: Tobacco policy and smoking prevalence in Greece. *Eur J Public Health*. 2007; 17(2):211-3.
15. Health Law 76017. Legislation Newspaper of the Government of the Hellenic Democracy. 2nd edition, page 1001, August 1, 2002.
16. US Environmental Protection Agency, Fine Particle (PM 2.5) Designations. Accessed 4/12/06 from <http://www.epa.gov/pmdesignations/>
17. Ott, W.; Switzer, P.; Robinson, J.: Particle concentrations inside a tavern before and after prohibition of smoking: evaluating the performance of an indoor air quality model. *J Air Waste Manag Assoc*. 1996; 46:1120-1134.
18. Repace, J. L.: Respirable particles and carcinogens in the air of Delaware hospitality venues before and after a smoking ban. *JOEM*. 2004; 46:887-905
19. Hyland, A.; Travers, M. J.; Dresler, C.; Higbee, C.; Carpenter, C.; Connolly, G.; Cummings, K. M.: A 24- Country Comparison of Levels of Indoor Air Pollution in Different Workplaces: Roswell Park Cancer Institute, International Agency for Research on Cancer, Harvard School of Public Health; September 2006. (<http://www.tobaccofreeair.org> /downloads/GAMS%20report.v7\_Sept\_06.pdf)
20. Repace, J. L.; Delaimy, W. K.; Bernert, J. T.: Correlating atmospheric and biological markers in studies of secondhand tobacco smoke exposure and dose in children and adults. *J Occup Environ Med*. 2006; 48(2):181-94
21. Repace, J.; Lowrey, A.: An enforceable indoor air quality standard for environmental tobacco smoke in the workplace. *Risk Analysis*. 1993; 13: 463-74
22. Lopez, M. J.; Nebot, M.; Juarez, O. et al.: Estimation of the excess of lung cancer mortality risk associated to environmental tobacco smoke exposure of hospitality workers. *Med Clin (Barc)*. 2006; 126(1):13-4
23. Siegel, M.; Skeer, M.: Exposure to secondhand smoke and excess lung cancer mortality risk among workers in the "5 B's": bars, bowling alleys, billiard halls, betting establishments, and bingo parlours. *Tob Control*, 2003; 12(3):333-8
24. Hedley, A.J.; McGhee, S.M.; Repace, J. L.; Wong, L-C.; Yu, Ysm; Wong, T. W.; Lam, T. W.: Risks for heartdisease and lung cancer from passive



- smoking by workers in the catering industry. *Toxicological Sciences* 2006; 90(2): 539-548
25. Eisner, M. D.; Balmes, J.; Yelin, E. H. et al.: Directly measured second-hand smoke exposure and COPD health outcomes. *BMC Pulm Med.* 2006; 6:12.
  26. Teach, S. J.; Crain, E. F.; Quint, D. M. et al.: Indoor environmental exposures among children with asthma seen in an urban emergency department. *Pediatrics*, 2006; 117: S152-8.
  27. Neal, M. S.; Hughes, E. G.; Holloway, A. C. et al.: Side stream smoking is equally as damaging as mainstream smoking on IVF outcomes. *Hum Reprod.* 2005; 20(9):2531-5.
  28. Tyc, V. L.; Throckmorton-Belzer, L.; Klosky, J. L. et al.: Smoking among parents of pediatric cancer patients and children's exposure to environmental tobacco smoke. *J Child Health Care.* 2004; 8(4):288-300.
  29. Gritz, E. R.; Dresler, C.; Sarna, L.: Smoking, the missing drug interaction in clinical trials: ignoring the obvious. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005, 14(10):2287-93.
  30. Mohseni-Bandpei, M. A.; Fakhri, M.; Bagheri- Nesami, M. et al.: Occupational back pain in Iranian nurses: an epidemiological study. *Br J Nurs.* 2006; 15(17):914-7.
  31. Tarantola, A.; Abiteboul, D.; Rachline, A.: Infection risks following accidental exposure to blood or body fluids in health care workers: a review of pathogens transmitted in published cases. *Am J Infect Control.* 2006; 34(6):367-75.
  32. Berney, B.; Needleman, J.: Impact of nursing overtime on nurse-sensitive patient outcomes in New York hospitals, 1995-2000. *Policy Polit Nurs Pract.* 2006; 7(2): 87-100.
  33. Pant, G. S.; Sharma, S. K.; Rath, G. K.: Finger doses for staff handling radiopharmaceuticals in nuclear medicine. *J Nucl Med Technol.* 2006; 34(3): 169-73.
  34. Marriott, C. J.; Webber, C. E.; Gulenchyn, K. Y.: Radiation exposure for 'Caregivers' during high-dose outpatient radioiodine therapy. *Radiat Prot Dosimetry.* 2007; 123(1):62-7

35. Amr, S.; Suk, W. A.: Latex allergy and occupational asthma in health care workers: adverse outcomes. *Environ Health Perspect.* 2004; 112(3):378-81.
36. Wakefield, M.; Cameron, M.; Inglis, G.; Letcher, T.; Durkin, S.: Secondhand smoke exposure and respiratory symptoms among casino, club, and office workers in Victoria, Australia. *J. Occup Environ Med.* 2005; 47(7):698-703.
37. Dinno, A.; Glantz, S.: Clean indoor air laws immediately reduce heart attacks. *Prev Med.* 2007; 45(1):9-11

# Κεφάλαιο 6

## ΚΑΠΝΙΣΜΑ ΚΑΙ ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ ΔΙΚΑΙΩΜΑΤΑ

Ο πολίτες του κόσμου έχουν ίσα δικαιώματα στην υγεία. Τα ανθρώπινα δικαιώματα έχουν καθιερωθεί για την προστασία του ατόμου απέναντι στην πολυεθνική οικονομική δύναμη των καπνοβιομηχανιών. Λόγω της διεθνούς διάστασης του προβλήματος της επιδημίας του καπνίσματος, υπάρχει ανάγκη για διεθνή δράση.

### *Απαγόρευση του καπνίσματος*

Μέτρα αντιμετώπισης σε αυτήν την καπνιστική επιδημία αποτελούν η αυξημένη φορολόγηση των τσιγάρων, ενημερωτικές και εκπαιδευτικές καμπάνιες και η απαγόρευση του καπνίσματος σε όλους τους δημόσιους χώρους. Η Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας διευκρινίζει ότι σημαντικές παράμετροι για να είναι τέτοια μέτρα επιτυχή, είναι η απαγόρευση του καπνίσματος να είναι υποχρεωτική και όχι προαιρετική, να είναι καθολική, χωρίς εξαιρέσεις, και να συνοδεύεται από ολοκληρωμένη ενημέρωση του κοινού και εμπλοκή της κοινωνίας των πολιτών.

Στην Ελλάδα, σύμφωνα με τη νέα ρύθμιση, η απαγόρευση του καπνίσματος σε δημόσιους χώρους άρχισε από την 1<sup>η</sup> Ιουλίου 2009 και όχι από την 1<sup>η</sup> Ιανουαρίου 2010 όπως είχε αρχικά ανακοινωθεί, διότι τους καλοκαιρινούς μήνες οι πολίτες μπορούν να προσαρμοστούν καλύτερα στο νέο νόμο.

Εκφράζονται, βέβαια, ανησυχίες για πρακτικές συνέπειες, όπως ότι η καθολική απαγόρευση του καπνίσματος θα βλάψει τις επιχειρήσεις αναψυχής, και ότι το μέτρο έχει αποτύχει ή έχει αντιμετωπίσει σοβαρά προβλήματα στο εξωτερικό όπου εφαρμόστηκε. Στην πραγματικότητα, τα στοιχεία που υπάρχουν μέχρι τώρα για την αποτελεσματικότητα της εφαρμογής πολιτικών για διασφάλιση χώρων ελεύθερων από καπνό, υποδεικνύουν όχι μόνο ότι η στρατηγική αυτή έχει λειτουργήσει και έχει συμβάλει στη μείωση του καπνίσματος, όχι μόνο ότι δεν έχει επηρεάσει τον τομέα της αναψυχής, αλλά ότι προκύπτουν και τεράστια οικονομικά οφέλη σε κρατικό επίπεδο, από τη βελτίωση που παρατηρείται σε επίπεδο πληθυσμού.

### *Καπνιστές εναντίων μη καπνιστών*

Οι καπνιστές υποστηρίζουν ότι το κάπνισμα είναι θέμα ανθρωπίνων δικαιωμάτων. Πιστεύουν ότι είναι ελεύθεροι να επιλέξουν τον καρκίνο των πνευμόνων, την αποφρακτική πνευμονοπάθεια ή το έμφραγμα - αλλά μόνο για τον εαυτό τους.

Ως σύμμαχος των καπνιστών, οι καπνοβιομηχανίες προσπαθούν να οργανώσουν τις ομάδες δικαιωμάτων των καπνιστών 'smokers rights groups,' (SRGs). Ο πρωταρχικός στόχος των οργανώσεων αυτών ήταν να γίνει το κάπνισμα κοινωνικά αποδεκτό (1-3), καθώς επίσης και ο εφησυχασμός των καπνιστών ότι οι 'αξιοσέβαστοι, υπεύθυνοι άνθρωποι' θα μπορούσαν να 'αποφασίσουν να καπνίσουν' και ότι 'οι καπνιστές είναι νόμιμα μέλη της κοινωνίας'(4).

Από τα τέλη του 1970 έως και το τέλος του 1990, οι οργανώσεις αυτές ήταν δραστήριες σε αρκετούς τομείς, ιδιαίτερα στην αναστολή των νόμων κατά του καπνίσματος. Οι στρατηγικές τους περιλάμβαναν την εξασφάλιση του δικαιώματος του καπνίσματος και την παρουσίαση των μελών τους ως τα αθώα θύματα των υποστηρικτών ελέγχου του καπνίσματος (5). Οι οργανώσεις αυτές ήλπιζαν να 'κινητοποιήσουν τους καπνιστές' να 'παλέψουν για τα δικαιώματά τους' (2,6), όμως οι περισσότερες από αυτές τις οργανώσεις δεν διήρκεσαν στο χρόνο και ουσιαστικά απέτυχαν να εμπνεύσουν μεγάλο αριθμό καπνιστών να συμμετάσχουν.

### *Τα δικαιώματα των μη καπνιστών*

Όσον αφορά τις διαμαρτυρίες που ακούγονται για την καταπάτηση των δικαιωμάτων των καπνιστών, προσεκτική εξέταση των διεθνώς κατοχυρωμένων συνθηκών και συμβάσεων για τα ανθρώπινα δικαιώματα, μας οδηγεί στη διαπίστωση ότι το δικαίωμα όλων των ατόμων να έχουν επαρκή ποιότητα ζωής και υγεία και το δικαίωμα όλων των ατόμων σε ασφαλείς και υγιείς συνθήκες εργασίας, είναι αδιαμφισβήτητα και αναφαίρετα. Δεδομένης της γνώσης που έχουμε σήμερα στη διάθεσή μας για τις επιπτώσεις του παθητικού καπνίσματος στην υγεία, δεν υπάρχει αμφιβολία ότι η διασφάλιση ενός υγιούς περιβάλλοντος προϋποθέτει ένα περιβάλλον ελεύθερο από καπνό και ότι η στέρησή του, με οποιοδήποτε δικαιολογητικό, καταπατά το δικαίωμα στην υγεία. Εκατομμύρια άτομα παγκοσμίως

στερούνται την πρόσβαση σε ασφαλή και υγιή εργασία και τόπο διαμονής από την έκθεση στο παθητικό κάπνισμα χωρίς τη θέλησή τους.

Ένα σημαντικό παράδειγμα καταπάτησης των δικαιωμάτων των μη καπνιστών είναι και η κατάσταση που επικρατεί στο χώρο εργασίας. Ο καπνός του τσιγάρου είναι σημαντικό αίτιο μόλυνσης του αέρα. Οι μη καπνιστές εξαναγκάζονται να θέτουν τον εαυτό τους σε κίνδυνο, όχι μόνο από τις δυσμενείς επιπτώσεις του παθητικού καπνίσματος στην υγεία, αλλά και από τον κίνδυνο πυρκαγιών που προκαλούνται από το κάπνισμα. Τα υψηλά επίπεδα παθητικού καπνού για τους εργαζομένους στα εστιατόρια και μπαρ είναι 1.6 με 6.1 φορές υψηλότερα σε σχέση με τους εργαζόμενους σε γραφεία (7). Είναι αυτονόητο ότι, λόγω και της συνεχώς αυξανόμενης ανεργίας, ο εργαζόμενος δε μπορεί ως άτομο να υπερασπιστεί το δικαίωμά του να εργάζεται σε περιβάλλον χωρίς καπνό. Η απαγόρευση του καπνίσματος στους χώρους εργασίας μπορεί να προλάβει όχι μόνο γενικά συμπτώματα, όπως κόπωση, ερεθισμό ματιών και ρινός, κεφαλαλγίες, ερεθισμένο λαιμό, ξηρό και εξέρυθρο δέρμα (8) αλλά και μεγάλο αριθμό επιπτώσεων καρκίνου του πνεύμονα (9) και εμφράγματος του μυοκαρδίου (10).

Η δημιουργία περιοχών ελεύθερων καπνίσματος δεν μπορεί να προστατεύσει τον μη καπνιστή από την έκθεση, διότι οι περιοχές αυτές μπορούν να μειώσουν τα επίπεδα του παθητικού καπνού, αλλά όχι να τα εξαφανίσουν. Όταν οι περιοχές όπου επιτρέπεται το κάπνισμα επικοινωνούν με τις περιοχές που απαγορεύεται, ο καπνός διαχέεται παντού. Οι καπνιστικές περιοχές βοηθούν στην προστασία του μη καπνιστή όταν είναι τελείως ξεχωριστές, έχουν ξεχωριστό σύστημα αερισμού που πηγαίνει κατευθείαν έξω, χωρίς να ανακυκλώνεται στο κτήριο, και οι εργαζόμενοι δεν χρειάζεται να περάσουν από αυτές.

Η απαγόρευση του καπνίσματος στους χώρους εργασίας, όχι μόνο θα ενθαρρύνει τους καπνιστές για διακοπή καπνίσματος, αλλά θα ελαττώσει και την κατανάλωση τσιγάρων ανά καπνιστή, αποδίδοντας συνολικά 29% μείωση την συνολική κατανάλωση του εργαζόμενου (11). Η απαγόρευση του καπνίσματος στους δημόσιους χώρους γενικότερα παρέχει μέγιστη προστασία στους μη καπνιστές και αποφεύγει το κόστος δημιουργίας ξεχωριστά αεριζόμενους περιοχών καπνίσματος. Αλλά για να επιτευχθεί

αυτός ο σκοπός πρέπει όλες οι στρατηγικές να πραγματοποιηθούν, όπως εκπαιδευτικές, και νομοθετικές ρυθμίσεις (12).

### *Αντιλήψεις των Ευρωπαίων σχετικά με το κάπνισμά (13)*

Οι αντιλήψεις των Ευρωπαίων για το κάπνισμα εκτιμήθηκαν από την έρευνα 'Attitudes of Europeans towards tobacco' που έγινε το διάστημα Σεπτεμβρίου-Δεκεμβρίου 2005. Σύμφωνα με αυτή την έρευνα, ο αριθμός των καπνιστών στην Ευρωπαϊκή Ένωση έχει μειωθεί σημαντικά τα τελευταία 3 έτη. Η έρευνα έγινε σε 30 χώρες και έδειξε ότι στις 15 χώρες μέλη της προηγούμενης Ευρωπαϊκής Ένωσης, το ποσοστό των καπνιστών έχει μειωθεί από την προηγούμενη έρευνα του 2002. Όμως η αλλαγή στη χρήση καπνού διαφέρει σημαντικά στις διάφορες χώρες μέλη.

### *Απαγόρευση του καπνίσματος σε δημόσιους χώρους*

Ως σύνολο, η πλειοψηφία των πολιτών της Ευρωπαϊκής Ένωσης φαίνεται ότι είναι υπέρ της απαγόρευσης του καπνίσματος στους δημόσιους χώρους. Περισσότεροι από 4 στους 5 υποστηρίζουν την απαγόρευση στους χώρους εργασίας (86%), καθώς επίσης και σε κλειστούς δημόσιους χώρους (84%). Η υποστήριξη της απαγόρευσης δεν είναι τόσο ξεκάθαρη στην περίπτωση των εστιατορίων και μπαρ, αν και στην περίπτωση των εστιατορίων η πλειοψηφία των ερωτηθέντων (56%) είναι πάλι υπέρ της απαγόρευσης, ενώ στα μπαρ το αντίστοιχο ποσοστό είναι 40%.

### *Έκθεση σε παθητικό κάπνισμα*

Η πλειοψηφία των πολιτών της Ευρωπαϊκής Ένωσης (57%) αναφέρει ότι σπάνια (30%) ή ποτέ (27%) δεν ενοχλούνται από την έκθεση στον καπνό του τσιγάρου. Υπάρχει όμως διχογνωμία από τη μία χώρα στην άλλη, με τους πολίτες της Μάλτας (64%), Κύπρου, Ιταλίας και Σλοβακίας (54%) να ενοχλούνται περισσότερο από την έκθεση στον καπνό. Από την άλλη πλευρά, οι Σκανδιναβικές χώρες δεν φαίνονται να ενοχλούνται από τον καπνό του τσιγάρου. Περίπου ένα τέταρτο των πολιτών της Φιλανδίας (25%) και Σουηδίας (24%) δηλώνουν ότι μερικές φορές ή πολύ συχνά ενοχλούνται από τέτοια έκθεση. Αξίζει να σημειωθεί επίσης ότι 4 από τους 10 πολίτες (39%) της Γαλλίας, Λουξεμβούργου και Ιρλανδίας δηλώνουν ότι δεν έχουν ποτέ ενοχληθεί από τον καπνό του τσιγάρου.

### *Ζητώντας από τους καπνιστές να μην καπνίζουν*

Οι πολίτες της Ευρωπαϊκής Ένωσης είναι διχασμένοι στην ερώτηση αν ζητάνε από τους καπνιστές να μην καπνίζουν μπροστά τους. Αν και 48% ποτέ δε ζητά από έναν καπνιστή να μην καπνίζει κοντά τους, 52% το κάνουν, τουλάχιστον μερικές φορές. Περίπου ένας στους 5 πολίτες της Ευρωπαϊκής Ένωσης (22%) συνήθως ή πάντα κάνει αυτή την παράκληση.

### **Συμπέρασμα**

Υπάρχει σαφής επιστημονική συναίνεση, ότι το κάπνισμα αποτελεί την πρώτη αιτία αποτρέψιμων θανάτων παγκοσμίως, καθώς και ότι το παθητικό κάπνισμα αποτελεί αιτία σοβαρών προβλημάτων υγείας (καρκίνου, καρδιαγγειακών, αναπνευστικών προβλημάτων κ.ά.), κάτι που εκφράζεται ξεκάθαρα μέσα από τις ανακοινώσεις πολλών επιστημονικών, ακαδημαϊκών και επαγγελματικών επιτροπών. Δεν υπάρχει, λοιπόν, αμφιβολία και πολλοί θα συμφωνούν με την τοποθέτηση ότι η αντιμετώπιση του καπνίσματος πρέπει να αποτελεί παγκόσμια προτεραιότητα. Ακούγονται όμως αρκετές εισηγήσεις που προτείνουν, ως έναν καλό συμβιβασμό, τη δημιουργία ξεχωριστών χώρων για μη καπνιστές. Τα επιστημονικά στοιχεία έχουν αποδείξει πέραν πάσης αμφιβολίας ότι δεν υπάρχουν ασφαλή επίπεδα έκθεσης σε καπνό στο περιβάλλον (παθητικό κάπνισμα) και ότι η καθιέρωση χώρων που να είναι εντελώς ελεύθεροι από καπνό είναι η μόνη ασφαλής στρατηγική για την προστασία του πληθυσμού από την έκθεση σε παθητικό κάπνισμα. Οποιαδήποτε ενδιάμεση λύση δεν μπορεί να προστατεύσει επαρκώς τον πληθυσμό από τις συνέπειες του παθητικού καπνίσματος.

## Βιβλιογραφία

1. Philip Morris International. Philip Morris EEC Region Three Year Plan 920000 940000. (1992) 1992. Philip Morris.
2. Thoma W. Remarks by Walter Thoma PMI Corporate Affairs Conference Boca Raton, Florida Wednesday, 881130. 30 Nov 1988. Philip Morris.
3. PM-EEMA. Philip Morris EFTA Eastern Europe Middle East Africa long range plan 900000-920000. Dec 1989. Philip Morris.
4. Burson-Marsteller. An accommodation strategy in EEMA a strategic brief. 7 May 1990. Philip Morris.
5. Smith EA, Malone RE. 'We will speak as the smoker': the tobacco industry's smokers' rights groups. *The European Journal of Public Health* 2007 17(3):306-313;
6. Philip Morris International. ETS plan, Nordic area. 1987. (1987) Philip Morris.
7. American Non-smokers' Right Foundation, 2006.
8. California Protection Environmental Agency (Cal-EPA). Proposed Identification of Environmental tobacco smoke as toxic air contaminant. California, 2005.
9. Alberg A, Samet G. Epidemiology of Lung Cancer. *Chest* 2003;123:21-49
10. World Health Organization (WHO). International Consultation on Environmental Tobacco Smoke (ETS) and Child Health. Consultation Report. Geneva, Switzerland, 1999.
11. Fichtenberg CM, Gliantz SA. Effect of smoke-free workplaces on smoking behaviour: systematic review. *BMJ* 2002;325:188
12. Ronald MD. Passive smoking: history repeats itself. *BMJ* 1997;315:961-962
13. Eurobarometer. Attitudes of Europeans towards tobacco. Directorate-General Health and Consumer protection of the European Commission, 2006



# Κεφάλαιο 7

## ΠΟΛΙΤΙΚΗ ΤΟΥ ΚΑΠΝΙΣΜΑΤΟΣ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ

Το κάπνισμα, όπως αναφέρθηκε, αποτελεί την κύρια αιτία θανάτου και αναπηρίας, καθώς και απειλή για την παγκόσμια δημόσια υγεία. Το 2005, τα προϊόντα καπνού εκτιμήθηκε να προκαλούν ένα θάνατο κάθε 6 δευτερόλεπτα και αυτός ο αριθμός προβλέπεται να αυξηθεί (1). Προγράμματα ελέγχου του καπνίσματος που περιλαμβάνουν δημόσιους χώρους που απαγορεύεται το κάπνισμα, υπηρεσίες διακοπής του καπνίσματος, αυξήσεις στις τιμές των τσιγάρων και καμπάνιες μέσω μαζικής ενημέρωσης μπορούν να κάνουν μεγάλη διαφορά ως δράση για τον περιορισμό του καπνίσματος.

### *Ο ρόλος της κυβερνητικής πολιτικής*

Αρκετές κυβερνήσεις έχουν θεσπίσει αλλαγές στην πολιτική ελέγχου του καπνίσματος, ώστε να δημιουργήσουν ένα υποστηρικτικό περιβάλλον για τους καπνιστές που επιθυμούν να το διακόψουν. Οι αποτελεσματικές τεχνικές περιλαμβάνουν την απαγόρευση της διαφήμισης και της χορηγίας από τις καπνοβιομηχανίες, την αύξηση της τιμής των τσιγάρων, τις προειδοποιήσεις ως προς τους κινδύνους για τη δημόσια υγεία, και την απαγόρευση του καπνίσματος σε όλους τους δημόσιους χώρους (γραφεία, εστιατόρια, μπαρ και νυχτερινά κέντρα) (9). Όταν εισάγονται πολιτικές που αποσκοπούν σε μια κοινωνία χωρίς καπνό, αυτές βρίσκουν υποστήριξη τόσο από τους καπνιστές όσο και από τους μη καπνιστές (9).

Από τον Αύγουστο του 2002, σε συμφωνία με τους κανόνες της Ευρωπαϊκής Ένωσης, η Ελλάδα έχει θεσπίσει νόμο που απαγορεύει το κάπνισμα σε όλα τα υγειονομικά κέντρα όπως δημόσια και ιδιωτικά νοσοκομεία, κέντρα υγείας και φαρμακεία (Νόμος Υγείας 76017), αλλά όπως με την πλειοψηφία των σχετικών νόμων στην Ελλάδα απερίφραστα αγνοείται από πολλούς (2). Οι επαγγελματίες υγείας μπορούν να επηρεάσουν την κατανάλωση καπνού καθώς και να προσφέρουν πληροφορίες ζωτικής αξίας για τις αρνητικές του επιδράσεις. Όμως οι καπνιστικές τους συνήθειες και τα πιστεύω τους για τα μέτρα ελέγχου του καπνίσματος αποτελούν δείκτη του

ρόλου που μπορούν να διαδραματίσουν στη δημιουργία μιας μη φυσιολογικής εικόνας της χρήσης καπνού.

*Νοσοκομεία χωρίς κάπνισμα στην Ελλάδα: Στάσεις, συμμόρφωση και καπνιστικές συνήθειες του προσωπικού*

Με βάση τα παραπάνω, διεξήγαμε μια μελέτη για τη διερεύνηση του προσωπικού νοσοκομείου (σε ένα τυπικό μεγάλο περιφερειακό νοσοκομείο της Ελλάδος) σχετικά με τις αντιλήψεις τους και τη συμμόρφωσή τους προς τους κανονισμούς καπνίσματος στα νοσοκομεία καθώς και τις τρέχοντες καπνιστικές τους συνήθειες. Ο υπό μελέτη πληθυσμός επιλέχτηκε από το Πανεπιστημιακό νοσοκομείο Ηρακλείου Κρήτης, το οποίο παρέχει πρωτοβάθμια και δευτεροβάθμια φροντίδα στον πληθυσμό του Ηρακλείου και τριτοβάθμια στον πληθυσμό της Κρήτης και των γειτονικών νησιών. Το νοσοκομείο απασχολεί μόνιμα 561 ιατρούς και 480 νοσηλευτές (1041 σύνολο), από τους οποίους το 10% επιλέχτηκε τυχαία (χρησιμοποιώντας τη βάση δεδομένων του προσωπικού του νοσοκομείου και σταθμίστηκε με βάση την αναλογία ιατρού νοσηλευτή) και έγινε συνέντευξη. Προηγούμενη έρευνα στην Ελλάδα σημείωσε ότι ο επιπολασμός στο προσωπικό του νοσοκομείου εκτιμήθηκε στο 50% περίπου και παρόλο που θα προτιμούσαμε μεγαλύτερο αριθμό συμμετεχόντων, ο στόχος μας είναι ήταν η επαφή κατά συχνά διαστήματα όλων των επιλεγμένων συμμετεχόντων ώστε να ελαχιστοποιήσουμε το ποσοστό αυτών που δε θα ανταποκρίνονταν στην έρευνά μας, όπως προηγούμενες μελέτες βασιζόμενες σε νοσοκομεία στην Ελλάδα δεν επέδειξαν πολύ υψηλά ποσοστά συμμετοχής (3,4). Από τους 104 συμμετέχοντες που επιλέχτηκαν τυχαία, πήραμε συνέντευξη από 100 (96% ποσοστό ανταπόκρισης), με αναλογία ανδρών :γυναικών 1:2 και μέσο όρο ηλικίας  $39.2 \pm 7.4$  έτη. Τα ερωτηματολόγια συμπληρώθηκαν από έναν έμπειρο ερευνητή. Λόγω του μικρού αριθμού των πρώην καπνιστών στη μελέτη, οι μη καπνιστές και οι πρώην καπνιστές κατηγοριοποιήθηκαν μαζί ως μη καπνιστές.

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 1, ένα μεγαλύτερο ποσοστό του νοσηλευτικού προσωπικού ήταν νυν καπνιστές, σε σύγκριση με το ποσοστό του ιατρικού/ερευνητικού προσωπικού (57.8% vs. 34.5%,  $p < 0.05$ ), ενώ το

νοσηλευτικό προσωπικό βρέθηκε επίσης να καπνίζει περισσότερα τσιγάρα ημερησίως ( $12 \pm 11$  vs.  $6 \pm 9$ ,  $p < 0.05$ ). Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές με βάση το φύλο, εκτός από τον αριθμό των ετών που κάπνιζε το προσωπικό (άνδρες:  $17.4$  vs. γυναίκες  $13.5$ ,  $p < 0.05$ ).

**Πίνακας 1.** Καπνιστικές συνήθειες σε ένα αντιπροσωπευτικό δείγμα προσωπικού νοσοκομείου σε ένα μεγάλο αντιπροσωπευτικό νοσοκομείο της Ελλάδας.

	Medical-research staff	Nursing staff	Total
	% (n)	% (n)	% (n)
Males	34.5 (19) ‡	31.1 (14)	33.0 (33)
Females	65.5 (36)	68.9 (31)	67.0 (67)
Age (years)	$39.2 \pm 7.1$ †	$39.1 \pm 7.8$	$39.2 \pm 7.4$
<b>Smoking habit</b>			
Smokers *	34.5 (19)	57.8 (26)	45.0 (45)
Ex-Non smokers**	65.5 (36)	42.2 (19)	55.0 (55)
Years of smoking	$7.3 \pm 9.1$	$9.4 \pm 8.0$	$8.0 \pm 9.0$
<b>Cigarettes per day</b>			
1-9 cigs/day	15.8 (3)	3.8 (1)	8.9 (4)
10-20 cigs/day	63.2 (12)	73.1 (19)	68.9 (31)
>20 cigs/day	21.1 (4)	23.1 (6)	22.2 (10)
Mean cigarettes per day *	$6 \pm 9$	$12 \pm 11$	$8 \pm 11$

‡ Values are N (%). Chi-square test ( $\chi^2$ ).

† Values are mean  $\pm$  standard deviation. Student t test.

\*p-value < 0.05

Ο πίνακας 2 κυρίως παρουσιάζει κυρίως τις τοποθετήσεις του προσωπικού απέναντι στην απαγόρευση του καπνίσματος και την αναφερόμενη έκθεση σε παθητικό κάπνισμα. Αν και 70.9% του ιατρικού προσωπικού και 60% του νοσηλευτικού εγκρίνουν την πλήρη απαγόρευση του καπνίσματος στο νοσοκομείο, όλοι οι νυν καπνιστές (100%) ανέφεραν καθημερινά ότι κάπνιζαν στη δουλειά, κατά συνέπεια αποκάλυπτα αγνοώντας την ειδική νομοθεσία που απαγορεύει το κάπνισμα μέσα στο νοσοκομείο, παρόλο που οι μισοί από τους καπνιστές υποστήριξαν την ιδέα της πλήρους απαγόρευσης του καπνίσματος. Επιπρόσθετα, λιγότερες γυναίκες μη-καπνίστριες επιδοκίμασαν το κάπνισμα στο χώρο εργασίας σε σύγκριση με τους άνδρες (42.4% vs. 58.3%, αντίστοιχα). Ανεξαρτήτως φύλου, αυτοί που έκριναν το παθητικό κάπνισμα ενοχλητικό στο νοσοκομείο ήταν επίσης περισσότερο πιθανό να αποδοκιμάσουν το κάπνισμα στο νοσοκομείο ( $p < 0.001$ ) και όταν

ερωτήθηκαν αν η πλήρης απαγόρευση θα πρέπει να αλλάξει σε μερική (με καθορισμένες περιοχές καπνιστών και μη καπνιστών μέσα στο νοσοκομείο) 93.3% των καπνιστών και 96.4% των μη καπνιστών ανταποκρίθηκε θετικά σε αυτή τη νομοθεσία.

**Πίνακας 2.** Τοποθετήσεις του προσωπικού του νοσοκομείου στην πολιτική του ελευθέρου καπνίσματος νοσοκομείου

Variable		Medical-research staff	Nursing staff	Total
		% (n)	% (n)	% (n)
<b>Smoke at work</b>				
% of total personnel		34.5 (19)	57.8 (26)	<b>45 (45)</b>
% of smokers		100 (19)	100 (26)	<b>100 (45)</b>
<b>Your attitude towards smoke-free hospitals?</b>				
Total personnel	<i>Approve</i>	70.9 (39)	60.0 (27)	<b>66 (66)</b>
	<i>Disapprove</i>	29.1 (16)	40.0 (18)	<b>34 (34)</b>
Smokers	<i>Approve</i>	52.6 (10)	42.3 (11)	<b>46.7 (21)</b>
	<i>Disapprove</i>	47.4 (9)	57.7 (15)	<b>53.3 (24)</b>
Non smokers **	<i>Approve</i>	80.6 (29)	84.2 (16)	<b>81.8 (45)</b>
	<i>Disapprove</i>	19.4 (7)	15.8 (3)	<b>18.2 (10)</b>
<b>How often are you exposed to SHS at work?</b>				
Non smokers **	<i>Daily-Almost daily</i>	66.7 (24)	73.7 (14)	<b>69.1 (38)</b>
	<i>Half of the days</i>	22.2 (8)	10.5 (2)	<b>18.2 (10)</b>
	<i>Almost never</i>	11.1 (4)	15.8 (3)	<b>12.7 (7)</b>
<b>Does cigarette smoke during work annoy you?</b>				
Non smokers **	<i>Yes</i>	80.6 (29)	84.2 (16)	<b>81.8 (45)</b>
	<i>No</i>	19.4 (7)	15.8 (3)	<b>18.2 (10)</b>

\*p-value < 0.05

Τα αποτελέσματά μας, όσον αφορά τις καπνιστικές συνήθειες είναι πολύ όμοια με αυτά προηγούμενων μελετών προσωπικών νοσοκομείων στην Ελλάδα, τα οποία χαρακτηρίζονται κυρίως από τα αυξημένα ποσοστά καπνίσματος τόσο του ιατρικού, όσο και του νοσηλευτικού προσωπικού, με τον υψηλότερο επιπολασμό στο νοσηλευτικό προσωπικό. Τα ευρήματα αυτά δείχνουν την απροθυμία των επαγγελματιών του συστήματος υγείας της Ελλάδας να εκπληρώσουν το ρόλο τους ως παράδειγμα προς τους ασθενείς και την κοινωνία, καθώς και την αδυναμία τους να υποστηρίξουν αποτελεσματικά τα μέτρα ελέγχου του καπνίσματος και της διακοπής του καπνίσματος για τη μείωση και πρόληψη της πληθώρας ασθενειών που προέρχονται από το κάπνισμα. (3,4).

Η επίτευξη νοσοκομείων απουσία καπνίσματος φαίνεται αρκετά δύσκολη. Έρευνα που έγινε σε νοσοκομεία της Μεγάλης Βρετανίας επίσης αποκάλυψε ότι το κάπνισμα γίνεται αντιληπτό παρά τη σχετική ρύθμιση και

την πολιτική εφαρμογή που είναι ανεπαρκείς (5), ενώ άλλες μελέτες έχουν επίσης αποκαλύψει όμοια προτίμηση του προσωπικού για μερική απαγόρευση του καπνίσματος και την απροθυμία του προσωπικού να ζητήσει από το προσωπικό, επισκέπτες και ασθενείς να μην καπνίσουν στο χώρο του νοσοκομείου (6-8). Αν και καθορισμένοι χώροι που επιτρέπεται το κάπνισμα ίσως μειώσουν την έκθεση των μη καπνιστών στον παθητικό καπνό, αφού οι καπνιστές μπορούν να κινητοποιηθούν να χρησιμοποιούν τους καπνιστικούς χώρους, υπάρχει ο κίνδυνος της υποτροπής με την παράβλεψη ακόμη και αυτού του μερικού μέτρου και να αυξηθούν δραματικά τα ήδη ανεβασμένα επίπεδα παθητικού καπνού στα ελληνικά νοσοκομεία (9).

Όπως η πλήρη απαγόρευση του καπνίσματος, μπορεί και έχει φανεί να επηρεάζει και να αυξάνει τις προσπάθειες διακοπής του καπνίσματος στο προσωπικό (7,10), να ενθαρρύνει τους ασθενείς να διακόψουν το κάπνισμα (11) και να μειώσει της έκθεση σε παθητικό καπνό, είναι επιβεβλημένο ότι οι επαγγελματίες της υγείας, οι δημιουργοί των νόμων και τα επιτελεία διοίκησης του νοσοκομείου να επιμεληθούν και να ενισχύσουν τις προσπάθειες που έχουν ως στόχο τη μείωση του καπνίσματος στους επαγγελματίες της υγείας και την υποστήριξη περιβάλλοντος χωρίς καπνό. Όπως το κάπνισμα διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στις δαπάνες της υγείας και στη χρήση υπηρεσιών υγείας, αποτελεί επιδίωξη των επαγγελματιών υγείας να έχουν καθοριστική θέση στην ανάπτυξη μιας συνολικής δημόσιας πολιτικής υγείας (12).

Λαμβάνοντας υπόψη τις αθροιστικές ιδιότητες της νικοτίνης και τα υψηλά επίπεδα τόσο των νοσηλευτών όσο και των ιατρών στην Ελλάδα, εκπαιδευτικά προγράμματα για τους επαγγελματίες της υγείας προσανατολισμένα στη θεραπεία της εξάρτησης από τη νικοτίνη, η δημιουργία και στήριξη νοσοκομειακών κέντρων διακοπής του καπνίσματος και η συνεχής παρακολούθηση της συμμόρφωσης στις ισχύοντες νομοθεσίες θα πρέπει να είναι πρωτεύων στις προσπάθειες ενίσχυσης της ζωτικότητας ενός συστήματος υγείας ελεύθερου καπνίσματος. Περαιτέρω έρευνα απαιτείται στους παράγοντες που επηρεάζουν τις καπνιστικές συνήθειες και τα πιστεύω των επαγγελματιών της υγείας σε θέματα που σχετίζονται με το κάπνισμα

## **Βιβλιογραφία:**

1. WHO, Tobacco Free Initiative: Ten facts about tobacco and second-hand smoke. Viewed 25.3.08.  
[[http://www.who.int/features/factfiles/tobacco/tobacco\\_facts/en/index.html](http://www.who.int/features/factfiles/tobacco/tobacco_facts/en/index.html)].
2. Vardavas CI, Kafatos A: Bans on smoking in public places. Policy enforcement needed? *Lancet* 2007, 370:133-3.
3. Vagropoulos I, Tsilchorozidou T, Tsinopoulos G, Salonikidou Z, Mouratova M, Giavropoulou M, Grigoriadis N: Smoking habits among the hospital staff of a general hospital in Northern Greece: a long way for smoke free hospitals. *Monaldi Arch Chest Dis* 2006, 65(3):160-164.
4. Beletsioti-Stika P, Scriven A: Smoking among Greek nurses and their readiness to quit. *Int Nurs Rev* 2006, 53:150-156.
5. Ratschen E, Britton J, McNeil A: Smoke free hospitals-the English experience. Results from a survey, interviews, and site visits. *BMC Health Serv Res* 2008, 8:41.
6. Shipley M, Allcock R: Achieving a smoke free hospital: reported enforcement of smoke free regulations by NHS health care staff. *J Public Health* 2008, 30(1):2-7.
7. Etter M, Khan A, Etter JF: Acceptability and impact of a partial smoking ban followed by a total smoking ban in a psychiatric hospital. *Prev Med* 2008, 46(6):572-8.
8. McNally L, Oyefeso A, Annan J, Perryman K, Bloor R, Freeman S, Wain B, Andrews H, Grimmer M, Crisp A, Oyebode D, Ghodse A: A survey of staff attitudes to smoking related policy and intervention in psychiatric and general health care settings. *J Pub Health* 2006, 28(3):192-196.

9. Vardavas C, Mpouloukaki I, Linardakis M, Tzilepi P, Tzanakis N, Kafatos A: Second hand smoke exposure and excess heart disease and lung cancer mortality among hospital staff in Crete, Greece: a case study. *Int J Environ Res Public Health* 2008;3.
10. Wheeler G, Pulley L, Felix H, Bursac Z, Siddiqui N, Stewart K, Mays G, Gauss H: Impact of a smoke free hospital campus policy on employee and consumer behaviour. *Public Health Rep* 2007, 122:744-752.
11. Schultz AS, Bottorff JL, Johnson JL: An ethnographic study of tobacco control in hospital settings. *Tob Control* 2006, 15(4):317-22.
12. Editorial: Want employees to quit smoking? *Lancet* 2007, 369:1491.

# **ΕΝΟΤΗΤΑ ΙΙ**

## **ΔΙΑΚΟΠΗ ΚΑΠΝΙΣΜΑΤΟΣ**



# Κεφάλαιο 1

## ΤΑ ΟΦΕΛΗ ΤΗΣ ΔΙΑΚΟΠΗΣ

Ποτέ δεν είναι αργά για να διακόψει κανείς το κάπνισμα. Όσο νωρίτερα γίνει, τόσο μειώνονται οι πιθανότητες για καρκίνο και άλλα νοσήματα. Η διακοπή του καπνίσματος συνεπάγεται σημαντικά οφέλη για την υγεία του ανθρώπου. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 1, μερικά από τα οφέλη επέρχονται εντός ωρών (επιστροφή των επιπέδων οξυγόνου στις φυσιολογικές τιμές και εξάλειψη του μονοξειδίου του άνθρακα) (1). Άλλα πλεονεκτήματα χρειάζονται λίγους μήνες (επαναφορά της γεύσης, μείωση του βήχα και του συριγμού), ενώ άλλα κέρδη για την υγεία εμφανίζονται μετά από χρόνια (μείωση του κινδύνου εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου και του κινδύνου ανάπτυξης καρκίνου). Η προσπάθεια πρόληψης που απευθύνεται στους νέους μπορεί να αποτρέψει την εμφάνιση κάποιας νόσου σε 30-50 χρόνια, ενώ η διακοπή του καπνίσματος στους τωρινούς ενήλικες καπνιστές αποφέρει οφέλη για την υγεία το συντομότερο σε 20-30 χρόνια (2).

**Πίνακας 1.** Ευεργετικές αλλαγές υγείας που πραγματοποιούνται με την διακοπή του καπνίσματος. Πηγή: Action on Smoking and Health. Factsheet Number 11 Stopping Smoking ASH 2007. <http://www.ash.org.uk/>

Χρόνος από την διακοπή	Ευεργετικές αλλαγές υγείας που πραγματοποιούνται με την διακοπή του καπνίσματος
8 ώρες	Τα επίπεδα μονοξειδίου του άνθρακα και της νικοτίνης στο αίμα μειώνονται στο μισό, τα επίπεδα οξυγόνου επιστρέφουν σε κανονικά επίπεδα
24 ώρες	Το μονοξείδιο του άνθρακα εξαφανίζεται από το σώμα
48 ώρες	Η νικοτίνη εξαφανίζεται από το σώμα . Η γεύση επανέρχεται στα φυσιολογικά επίπεδα.
1 μήνας	Η εμφάνιση βελτιώνεται - το δέρμα χάνει την γκριζωπή ωχρότητά του και γίνεται λιγότερο ζαρωμένο. Ξεκινά η αναγέννηση των αναπνευστικών κροσσωτών κυττάρων. Τα συμπτώματα στέρησης έχουν σταματήσει.
3 - 9 μήνες	Υπάρχει μείωση του βήχα και του αναπνευστικού συριγμού.
5 χρόνια	Ο υπερβολικός κίνδυνος καρδιακών συμβαμάτων μειώνεται κατά το ήμισυ σε σύγκριση με αυτόν ενός καπνιστή.
10 χρόνια	Ο κίνδυνος καρκίνου πνευμόνων μειώνεται στις μισές πιθανότητες έναντι του κινδύνου ενός συνεχούς καπνιστή.

Επιπρόσθετα:

- Η διακοπή του καπνίσματος βοηθά στην πρόληψη της ανικανότητας και βελτιώνει τις πιθανότητες μιας γυναίκας να έχει υγιή εγκυμοσύνη και να γεννήσει ένα υγιές μωρό.
- Ένας πρώην καπνιστής θα αισθανθεί το δέρμα και τη γενική εικόνα του να βελτιώνονται.
- Πιο δροσερή αναπνοή, καλύτερη ποιότητα μαλλιών και ρούχα χωρίς οσμές αποτελούν επιπρόσθετο όφελος.

## **Βιβλιογραφία**

1. Action on Smoking and Health (ASH) *Factsheet Number 11: Stopping Smoking* ASH 2007. <http://www.ash.org.uk>
2. WHO European Partnership Project to Reduce Tobacco Dependence. *WHO Evidence Based Recommendations on the Treatment of Tobacco Dependence* Copenhagen .WHO.2001. <http://www.euro.who.int/document/e73285.pdf>

## Κεφάλαιο 2

### **ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΔΙΑΚΟΠΗΣ ΤΟΥ ΚΑΠΝΙΣΜΑΤΟΣ ΣΤΑ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΑ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ, ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΚΑΙ ΦΛΕΓΜΟΝΗ ΤΩΝ ΑΕΡΑΓΩΓΩΝ**

Το κάπνισμα, όπως προαναφέρθηκε, αποτελεί τον σημαντικότερο παράγοντα κινδύνου ανάπτυξης χρόνιας αποφρακτικής πνευμονοπάθειας (ΧΑΠ) (1), και η διακοπή του καπνίσματος είναι η μόνη αποτελεσματική θεραπεία για την αποφυγή ή τη μείωση της προόδου της νόσου (2, 3). Παθολογοανατομικές μεταβολές στους αεραγωγούς ασθενών με ΧΑΠ αφορούν τον αριθμό και το μέγεθος των αδένων, φλεγμονή, ίνωση και καταστροφή των κυψελιδικών συνδέσεων. Σε αντίθεση, περίπου 50% των καπνιστών αναπτύσσουν χρόνια βρογχίτιδα, δηλαδή χρόνια αναπνευστικά συμπτώματα χωρίς απόφραξη των αεραγωγών (1). Περίπου 30% των καπνιστών δεν παρουσιάζουν χρόνια συμπτώματα ή παθολογική αναπνευστική λειτουργία. Παρόλα αυτά, ακόμη και αυτοί που αποκαλούνται ‘υγιείς καπνιστές’ παρουσιάζουν ανεπαίσθητες μεταβολές στη μορφολογία, φλεγμονή και λειτουργία του πνεύμονα (4-9). Το κάπνισμα, προφανώς, πάντα επηρεάζει τον πνεύμονα, αν και η έκταση και η βαρύτητα αυτών των αλλαγών διαφέρουν μεταξύ των ατόμων. Αν και η διακοπή καπνίσματος αποτελεί πολύ σημαντικό θέμα υγείας, οι πληροφορίες για τους υποκείμενους μηχανισμούς της επίδρασης της διακοπής του καπνίσματος στους πνεύμονες είναι ελάχιστες. Παρακάτω θα αναφερθούν οι επιδράσεις της διακοπής του καπνίσματος στα αναπνευστικά συμπτώματα, στην αναπνευστική λειτουργία, βρογχική υπεραντιδραστικότητα, καθώς και στις παθολογοανατομικές και φλεγμονώδεις μεταβολές στον πνεύμονα στους καπνιστές χωρίς χρόνια συμπτώματα ή παθολογική αναπνευστική λειτουργία.

## *Αναπνευστικά συμπτώματα*

Τα αναφερόμενα διαλείποντα συμπτώματα βήχα, απόχρεμψης και συριγμού βρέθηκαν να είναι 5–21, 5–30 and 1–19%, αντίστοιχα στους πρώην καπνιστές και 10-40% για το βήχα και την απόχρεμψη μαζί και 7-32% για το συριγμό στους καπνιστές (10-18). Σε αντίθεση, ο επιπολασμός της δύσπνοιας είναι όμοιος μεταξύ πρώην καπνιστών και καπνιστών (εύρος 2-41%), υποδεικνύοντας ότι η αίσθηση της δύσπνοιας είτε είναι η αναστρέψιμη μετά τη διακοπή του καπνίσματος, είτε προέρχεται από παράγοντες διαφορετικούς από πνευμονική νόσο. Αυτές οι cross-sectional μελέτες δείχνουν ότι τα αναπνευστικά συμπτώματα βελτιώνονται μετά τη διακοπή του καπνίσματος. Όμως, τα συμπτώματα φαίνεται ότι δεν εξαφανίζονται, αφού ο επιπολασμός των αναπνευστικών συμπτωμάτων στους πρώην καπνιστές αναφέρονται ως υψηλότερα ή και όμοια από αυτά των μη καπνιστών (10-14, 18,19).

Μακροχρόνιες μελέτες συμφωνούν με τις παραπάνω μελέτες, δείχνοντας ότι τα πιο διαλείποντα συμπτώματα (βήχας, απόχρεμψη και συριγμός) μειώνονται μέσα σε 1-2 μήνες από τη διακοπή του καπνίσματος (20-26). Ο επιπολασμός του βήχα και του συριγμού μειώνεται σε αυτόν των μη καπνιστών, ενώ ο επιπολασμός της απόχρεμψης παραμένει ελαφρώς υψηλότερος (20,24). Επιπρόσθετα, τα συμπτώματα είναι επίσης λιγότερο πιθανό να αναπτυχθούν αργότερα στη ζωή αν οι καπνιστές χωρίς χρόνια συμπτώματα διακόψουν το κάπνισμα (27,28). Για παράδειγμα, ο Krzyzanowski και οι συνεργάτες του (27) έδειξαν ότι μόνο 12% αυτών που διέκοψαν το κάπνισμα έναντι 29% αυτών που συνέχιζαν να καπνίζουν ανέπτυξαν βήχα ή απόχρεμψη. Η επίδραση της διακοπής του καπνίσματος στη δύσπνοια στους καπνιστές δεν ήταν ίδια σε διαφορετικές μελέτες. Τρεις μελέτες, στις οποίες η διάρκεια της διακοπής καπνίσματος ήταν από 2-6 εβδομάδες έως 1-12 έτη, δεν έδειξαν διαφορά στον επιπολασμό της δύσπνοιας μετά τη διακοπή του καπνίσματος. Σε αυτές τις μελέτες, η δύσπνοια ορίστηκε ως αίσθημα 'δυσφορίας της αναπνοής' ή 'ανάγκη για διακοπή της αναπνοής για λίγο βαδίζοντας σε ένα μικρό λόφο' ή 'βαδίζοντας με άλλα άτομα της ίδιας ηλικίας στο επίπεδο του εδάφους' (24,26,27). Μια άλλη μελέτη έδειξε ότι 5 έτη διακοπής καπνίσματος οδήγησε σε μια μικρή αύξηση της δύσπνοιας στην επιτάχυνση στο έδαφος ή στη βάρδιση ενός

μικρού λόφου (41 με 52%) (20). Η αύξηση στο σωματικό βάρος, όπως συμβαίνει συχνά μετά τη διακοπή του καπνίσματος, ίσως εξηγεί την αύξηση στη δύσπνοια, αλλά δε διερευνήθηκε στη μελέτη αυτή. Χρησιμοποιώντας έναν άλλο ορισμό, 'δυσχέρειας της αναπνοής', ο Peterson κι συνεργάτες (29) έδειξαν ότι η δύσπνοια βελτιώθηκε σε 12 καπνιστές μετά από 1 και 18 μήνες διακοπής καπνίσματος, παρά την αύξηση του σωματικού βάρους.

Η μεγάλη ποικιλία των επιπολασμών στις διάφορες μελέτες ίσως οφείλεται σε διαφορές στον ορισμό των συμπτωμάτων, ερωτηματολογίων που χρησιμοποιήθηκαν και στον πληθυσμό που μελετάται, όσον αφορά την ηλικία, φύλο και γεωγραφικές διαφορές. Με τον ίδιο τρόπο μπορεί να εξηγηθούν οι διαφορές της επίδρασης της διακοπής του καπνίσματος στη δύσπνοια. Όπως προαναφέρθηκε, η δύσπνοια σε υγιείς καπνιστές πιθανώς οφείλεται σε παράγοντες που δεν αφορούν τον πνεύμονα. Επιπρόσθετα, είναι μάλλον απίθανο άτομα χωρίς χρόνια αναπνευστικά συμπτώματα να αισθάνονται τον ίδιο βαθμό δύσπνοιας με τους ασθενείς με ΧΑΠ. Επομένως η βαρύτητα της δύσπνοιας ίσως να είναι μικρή στην αρχή των μελετών, και κατά συνέπεια να μη υπάρχει δυνατότητα βελτίωσης μετά τη διακοπή του καπνίσματος. Επιπλέον, η αθροιστική ή καθημερινή κατανάλωση τσιγάρων δεν αναφέρεται πάντα, και αν είναι έτσι, ποικίλει μεταξύ των μελετών. Παρόλα αυτά, δεν μπορούν να εξηγηθούν οι διαφορές που παρατηρούνται.

*Αναπνευστική λειτουργία (Βίαιος εκπνεόμενος όγκος σε 1 δευτερόλεπτο - forced expiratory volume in one second)*

Μελέτες επιπολασμού έχουν δείξει ότι ο FEV<sub>1</sub> είναι χαμηλότερος σε άτομα χωρίς αναπνευστικά συμπτώματα που καπνίζουν, υψηλότερος σε άτομα που δεν έχουν καπνίσει ποτέ και ενδιάμεσος στους πρώην καπνιστές (19, 30-37). Εξαιρέση αποτελούν οι καπνιστές >70 ετών που τείνουν να έχουν χαμηλότερη αναπνευστική λειτουργία από τους καπνιστές της ίδιας ηλικίας. Αυτό μπορεί να αποδοθεί στη επίδραση του 'υγιούς καπνιστού' (38), δηλαδή καπνιστές που δεν ενοχλούνται από τη συνήθειά τους συνεχίζουν να καπνίζουν (για αυτό αποκαλούνται υγιείς καπνιστές), ενώ οι καπνιστές που ενοχλούνται είναι πιο πιθανό να διακόψουν το κάπνισμα.

Οι περισσότερες μελέτες δείχνουν μια σημαντική επιπρόσθετη μείωση του FEV<sub>1</sub> στους καπνιστές έναντι των μη καπνιστών και πρώην καπνιστών (6,8, 24, 34, 39-51). Δεδομένα από μακροχρόνιες μελέτες παρουσιάζονται στον Πίνακα 1. Υπάρχει σημαντική επικάλυψη μεταξύ των μελετών στον αναφερόμενη μείωση του FEV<sub>1</sub> στους καπνιστές χωρίς αναπνευστικά συμπτώματα, πρώην καπνιστές και μη καπνιστές. Αυτή η μεγάλη επικάλυψη δεν μπορεί να εξηγηθεί από διαφορές στην ηλικία, το baseline FEV<sub>1</sub> ή το φύλο. Όμως, θα μπορούσε να αποδοθεί σε διαφορές στον επιπολασμό των αναπνευστικών συμπτωμάτων και στη βαρύτητα της βρογχικής υπεραντιδραστικότητας (14,16, 41,42, 51-53)

**Πίνακας 1.** Δεδομένα μείωσης αναπνευστικής λειτουργίας σε καπνιστές, πρώην καπνιστές, αυτούς που το διέκοψαν και μη καπνιστές χωρίς αναπνευστικά συμπτώματα.

First author [ref.]	Subjects n	Sex	Age <sup>§</sup> yrs	Cumulative cigarette consumption pack-yrs			Follow-up yrs	Decline in FEV <sub>1</sub> mL·yr <sup>-1</sup>			
				Sm	Exsm	Quitter		Sm	Exsm	Quitter	Nonsm
BURCHFIEL [45]	4451 <sup>¶¶</sup>	M	54				6	34*	22	23 <sup>#</sup> , 30 <sup>ff</sup>	22
SHERRILL [44]	477 <sup>¶¶</sup>	M	46 (45-47)	49	41		7	17	27		16
		F	46 (41-52)	43	19		7	14	15		12
BOSSE [46]	850 <sup>¶¶</sup>	M	42 (39-44)	21		22	5	85		57 <sup>#</sup>	53
CAMILLI [47]	1705 <sup>¶¶</sup>	M	49	32	32	32	9.4	19 <sup>+</sup>	4	6	6
		F	49	28	17	18	9.4	7 <sup>+</sup>	-0.7	-4	0.4
TASHKIN [25]	2401 <sup>¶¶</sup>	M	45	41	27	39	5	70 <sup>+</sup>	52	62	56
		F	45	31	16	27	5	54 <sup>+</sup>	38	38	42
SHERMAN [16]	3948 <sup>¶¶</sup>	M	48	32	24		12	44 <sup>+</sup>	35		33
		F	49	22	12		12	34 <sup>+</sup>	27		28
XU [49]	4554 <sup>¶¶</sup>	M	15-54				24	19*, 26*, 33* <sup>+++</sup>	20	6 <sup>#</sup>	6
		F	15-54				24	15*, 20*, 30* <sup>+++</sup>	19	3 <sup>#</sup>	15
XU [39]	5572 <sup>¶¶</sup>	M	25-78				6	53 <sup>+</sup>	34	41 <sup>#</sup>	38
		F	25-78				6	38 <sup>+</sup>	30	29 <sup>#</sup>	29
LANGE [8]	7764 <sup>¶¶</sup>	M	<55				5	22, 42 <sup>§§</sup>	27	17, 36 <sup>§§</sup>	21
			>55				5	52, 56 <sup>§§</sup>	36	11, 43 <sup>§§</sup>	34
		F	<55				5	17, 30 <sup>§§</sup>	18	15, 9 <sup>§§</sup>	13
			>55				5	39, 48 <sup>§§</sup>	32	28, <sup>§§</sup>	32
TOWNSEND [55]	4926	M	47			6-7	59 <sup>+</sup>	44	50	51	
PELKONEN [51] <sup>f</sup>	411 <sup>¶¶</sup>	M	47				30	52 <sup>+</sup>	36	40	35
		M	49	27	18	25	15	66 <sup>+</sup>	49	56	46
KRZYANOWSKI [52]	1824 <sup>¶¶</sup>	M	40 (19-70)				13	60* <sup>¶¶</sup>	50	68	47
		F	40 (19-70)				13	42	38	37	38
KRZYANOWSKI [56] <sup>###</sup>	640 <sup>¶¶</sup>	M	45				12	11.7		6.8	6.3
		F	48				12	10.5		1.6	7.6
	1738 <sup>¶¶</sup>	M	40				12	14		16.5	8.7
		F	40				12	6.6		1.4	6.1
TAYLOR [53]	227 <sup>¶¶</sup>	M	51-61				7.5	11 <sup>+</sup>	8		6.6

FEV<sub>1</sub>: forced expiratory volume in one second; Sm: smokers without chronic respiratory symptoms; Exsm: exsmokers who quit smoking before the start of the study; Quitter: healthy smoker at start of study, exsmoker at end of study; Nonsm: nonsmoker; M: male; F: female. <sup>§</sup>: mean, range or mean (range); <sup>f</sup>: part of population followed for 30 yrs (n=411), duration of smoking rather than cumulative cigarette consumption described and FEV<sub>0.75</sub> rather than FEV<sub>1</sub> measured; <sup>###</sup>: two populations studied; Tucson, AZ, USA (n=640), and Cracow, Poland (n=1,738); <sup>¶¶</sup>: general population study; <sup>++</sup>: light (<15 cigarettes·day<sup>-1</sup>), moderate (15-24 cigarettes·day<sup>-1</sup>), heavy (>24 cigarettes·day<sup>-1</sup>) smokers; <sup>§§</sup>: light (<15 cigarettes·day<sup>-1</sup>), heavy (>15 cigarettes·day<sup>-1</sup>) smokers; <sup>ff</sup>: >2 yrs, <2 yrs. \*: p<0.05 versus nonsmokers; #: p<0.05 versus smokers; ¶: p<0.05 versus exsmokers; +: p<0.05 versus all other groups.

Προοπτικές μελέτες επιπολασμού έχουν δείξει ότι η διακοπή του καπνίσματος σε καπνιστές χωρίς χρόνια αναπνευστικά συμπτώματα επιβραδύνει την επιταχυνόμενη μείωση της αναπνευστικής λειτουργίας προς την κατεύθυνση που παρατηρείται στους μη καπνιστές (Πίνακας 1) (8, 24, 40-42, 46,47, 50,51). Η μείωση στον FEV<sub>1</sub> γίνεται φυσιολογική στα 2 έτη μετά τη διακοπή του καπνίσματος (40, 50). Όμως σε μία μελέτη μια πιο γρήγορη μείωση στον FEV<sub>1</sub> βρέθηκε στους πρώην καπνιστές σε σύγκριση με τους μη καπνιστές (20 και 6 mL·yr<sup>-1</sup>, αντίστοιχα). Η μείωση στον FEV<sub>1</sub> σε αυτούς που διέκοψαν το κάπνισμα ήταν όμοια με αυτή των μη καπνιστών στην ίδια μελέτη (44). Μόνο μία μακροχρόνια μελέτη, που χρησιμοποίησε μικρό αριθμό ατόμων, έδειξε ότι ο FEV<sub>1</sub> βελτιώθηκε μετά από τη διακοπή του καπνίσματος (44), αλλά οι περισσότερες μελέτες δεν το παρουσιάζουν αυτό (8, 23,25, 29, 34, 40, 42, 44, 46, 50, 54,55). Μια πιθανή εξήγηση είναι η ήδη φυσιολογική αναπνευστική λειτουργία σε αυτούς τους συμμετέχοντες πριν τη διακοπή του καπνίσματος. Αρκετές μελέτες σε μικρότερους αριθμούς ατόμων (n=10–50) μελέτησαν τις επιδράσεις της διακοπής του καπνίσματος στο μη φυσιολογικό αερισμό και στη σύγκλιση των μικρών αεραγωγών χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία έκπλυσης αζώτου με την αναπνοή.

#### *Υπεραντιδραστικότητα των αεραγωγών*

Ο επιπολασμός της υπεραντιδραστικότητας των αεραγωγών στην ισταμίνη έχει αναφερθεί να είναι όμοια σε καπνιστές και πρώην καπνιστές χωρίς αναπνευστικά συμπτώματα (14, 48, 56), ενώ ο επιπολασμός στη μεταχολίνη είναι υψηλότερος στους καπνιστές σε σύγκριση με τους πρώην καπνιστές (Πίνακας 2) (49, 57-59). Αυτό σημαίνει ότι η υπεραντιδραστικότητα των αεραγωγών στην ισταμίνη είναι λιγότερο αντιστρεπτή μετά τη διακοπή του καπνίσματος από ότι στη μεταχολίνη. Αυτό όμως, δεν έχει διαλευκανθεί ακόμη, αφού ο Rijcken και συνεργάτες (14) δε βρήκε διαφορές στον επιπολασμό της υπεραντιδραστικότητας των αεραγωγών στην ισταμίνη στους καπνιστές, πρώην καπνιστές και μη καπνιστές, ενώ ο Taylor και συνεργάτες (48) βρήκαν υψηλότερο επιπολασμό στην ισταμίνη στους πρώην καπνιστές σε σχέση με τους μη καπνιστές. Ο επιπολασμός της υπεραντιδραστικότητας



των αεραγωγών στη μεταχολίνη έχει αναφερθεί να είναι όμοιος στους πρώην καπνιστές και στους μη καπνιστές (49, 57-60), υποδεικνύοντας τουλάχιστον μια πραγματική βελτίωση στην υπεραντιδραστικότητα των αεραγωγών μετά τη διακοπή του καπνίσματος.

**Πίνακας 2.** Δεδομένα στην υπεραντιδραστικότητα των αεραγωγών σε καπνιστές, πρώην καπνιστές και μη καπνιστές χωρίς αναπνευστικά συμπτώματα

First author [ref.]	Subjects n	Sex	Age yrs	Method	AHR response <sup>#</sup> %	Results	Comments
KABIRAJ [54]	18 Nsm	M	48	FEV1 fall after 10 mg·mL <sup>-1</sup> MCh	9.8	Sm>Exsm=Nsm	Atopy unk; symptoms in both Sm and Exsm, but not in all
	20 Exsm	M	48		9.5		
CERVERI [74] <sup>¶</sup>	22 Sm	M	48		19.5		
	295 Nsm	M/F	39 (15-64)	PD15 <7.9 mg MCh	11	Sm>Exsm=Nsm	All asymptomatic and NA
PAOLETTI [75] <sup>¶</sup>	50 Exsm	M/F			15		
	70 Sm	M/F			43 <sup>+</sup>		
	693 Nsm	M/F	8-73	PD20 <4.8 mg MCh	34, 23 <sup>§</sup>	Sm>Exsm=Nsm (F)	NI
SUNYER [76] <sup>¶</sup>	369 Exsm	M/F			31, 21 <sup>§</sup>	Sm=Exsm=Nsm (M)	
	496 Sm	M/F			40, 25 <sup>§</sup>		
	387 Nsm	M/F	32 (20-44)	PC20 <100 mg·mL <sup>-1</sup> MCh	13, 5, 25, 21 <sup>###</sup>	Sm>Exsm=Nsm (NA)	
SPARROW [77] <sup>¶</sup>	163 Exsm	M/F			14, 8, 14, 31 <sup>###</sup>	Sm=Exsm=Nsm (A)	
	619 Sm <sup>f</sup>	M/F			24, 18, 20, 18 <sup>###</sup>		
	129 Nsm	M	50-59	PD20 <8.6 μmol MCh	9.3	Sm>Exsm=Nsm	Age range selected (n=914 in study)
BURNEY [78] <sup>¶</sup>	172 Exsm				8.7		
	66 Sm				22.7		
TAYLOR [53] <sup>¶</sup>	259 Nsm	M/F	41	PD20 <8 μmol HA	10	Sm>Exsm=Nsm	
	116 Exsm	M/F			12		
	136 Sm	M/F			24		
LIM [73]	39 Nsm	M	51-61	PC20 <16 mg·mL <sup>-1</sup> HA	5	Sm=Exsm>Nsm	NI
	71 Exsm	M			24	Sm=Exsm <sup>¶¶</sup>	
XU [79] <sup>¶</sup>	117 Sm	M			29		
	16 Exsm	M	53	PC20 HA mg·mL <sup>-1</sup>	6.7	Sm=Exsm	NI
RUCKEN [15] <sup>¶</sup>	27 Sm	M	59		7.1		
	Nsm	M/F	>8	PC10 <8 mg·mL <sup>-1</sup> HA	16	Sm=Nsm	NI
RUCKEN [15] <sup>¶</sup>	Exsm				18		
	Sm (2684)				20, 33 <sup>++</sup>		
	574 Nsm	M/F	32.7	PC10 <16 mg·mL <sup>-1</sup> HA	24	Sm=Exsm=Nsm	NI
	252 Exsm	M/F			18		
	1013 Sm	M/F			28		

Nsm: nonsmoker; Sm: smokers without chronic respiratory symptoms; Exsm: exsmoker; M: male; F: female; FEV1: forced expiratory volume in one second; MCh: methacholine; unk: unknown; PD15: provocative dose of drug causing a 15% fall in FEV1; NA: nonatopic; PD20: provocative dose of drug causing a 20% fall in FEV1; NI: no information about atopy or symptoms; PC20: provocative concentration of drug causing a 20% fall in FEV1; A: atopic; HA: histamine; PC10: provocative concentration of drug causing a 10% fall in FEV1. <sup>#</sup>: severity or prevalence (see *Method* column); <sup>¶</sup>: general population study; <sup>+</sup>: 27% heavy plus 16% moderate (<18 pack-yrs) smokers; <sup>§</sup>: F, M; <sup>f</sup>: cumulative cigarette consumption 15 pack-yrs; <sup>###</sup>: NA-F, NA-M, A-F, A-M; <sup>¶¶</sup>: subjects aged <35 yrs (n=30); <sup>++</sup>: <24 cigarettes·day<sup>-1</sup>, >25 cigarettes·day<sup>-1</sup>.

Μόνο 3 μελέτες έχουν διερευνήσει τις μακροχρόνιες επιδράσεις της διακοπής του καπνίσματος στην υπεραντιδραστικότητα των αεραγωγών στους καπνιστές χωρίς αναπνευστικά συμπτώματα (Πίνακας 3), δείχνοντας κυρίως ότι η υπεραντιδραστικότητα των αεραγωγών στη μεταχολίνη ή καρβαχόλη δεν αλλάζει μετά τη διακοπή του καπνίσματος (22, 26, 55). Όμως, ο αριθμός των ατόμων που διερευνήθηκαν ήταν μικρός (n=10-17), και τα περισσότερα άτομα δεν είχαν υπεραντιδραστικότητα των αεραγωγών στην αρχή της μελέτης, επομένως ήταν αδύνατο να βρεθεί

σημαντική βελτίωση μετά τη διακοπή του καπνίσματος.

**Πίνακας 3.** Επίδραση της διακοπής καπνίσματος στην υπεραντιδραστικότητα των αεραγωγών στους καπνιστές χωρίς αναπνευστικά συμπτώματα.

First author [ref.]	Subjects n	Sex	Age yrs	Cumulative cigarette consumption pack-yrs	Sympt	SC period	Method	AHR <sup>#</sup>		
								Before SC %	After SC %	SC effect
BUCZKO [23]	17	M/F	35	20	14/17	99±43 days <sup>¶</sup>	MCh TC	1.0 mg·mL <sup>-1</sup>	1.6 mg·mL <sup>-1</sup>	None
SIMONSSON [61]	10	M/F	42	25	Some	1 week; 1, 6, 12 months	>15% FEV1 fall (MCh <sup>+</sup> )	30	20 <sup>§</sup>	None
ISRAEL [27]	10	M/F	36	20	Some	2, 6 months	PD35 PD20	20 60	40, 50 <sup>f</sup> 60, 70 <sup>f</sup>	None

Sympt: symptoms (occasional cough or sputum production); M: male; F: female; MCh: methacholine; TC: threshold concentration (baseline volume 40% vital capacity above residual volume minus 2.8 SD); FEV1: forced expiratory volume in one second; PD35: provocative dose of carbachol (various doses used) causing a 35% fall in specific airway conductance; PD20: provocative dose of carbachol (various doses used) causing a 20% fall in FEV1. #: severity or prevalence (see Method column); ¶: mean±SD; +: various concentrations used; §: at 12 months; f: at 2 months, 6 months.

Ο Lim και συνεργάτες (56) έδειξαν ότι η βαρύτητα της υπεραντιδραστικότητας των αεραγωγών στην ισταμίνη επιδεινώθηκε στους καπνιστές χωρίς αναπνευστικά συμπτώματα που συνέχιζαν να καπνίζουν: η συγκέντρωση για την πρόκληση της ισταμίνης που προκαλούσε 20% πτώση στον FEV<sub>1</sub> άλλαξε σημαντικά από 7.1 σε 3.3 mg·mL<sup>-1</sup> σε πάνω από 4 έτη. Σε αντίθεση, η υπεραντιδραστικότητα των αεραγωγών δεν άλλαξε (από 6.7 σε 6.0 mg·mL<sup>-1</sup>) στα άτομα που απείχαν από το κάπνισμα. Όλα μαζί δείχνουν ότι η διακοπή του καπνίσματος θα μπορούσε να προλάβει μελλοντική επιδείνωση της υπεραντιδραστικότητας των αεραγωγών, αν και δεν οδηγεί σε βελτίωση.

#### *Παθολογοανατομικές και φλεγμονώδεις αλλαγές στον πνεύμονα*

Η επίδραση της διακοπής του καπνίσματος σε παθολογοανατομικές αλλαγές και στη φλεγμονή στους καπνιστές χωρίς αναπνευστικά συμπτώματα δεν έχει μελετηθεί επαρκώς. Μόνο 2 μελέτες έχουν εκτιμήσει τις παθολογοανατομικές μεταβολές στους καπνιστές και πρώην καπνιστές χωρίς αναπνευστικά συμπτώματα που υπεβλήθησαν σε χειρουργική εκτομή όγκου του πνεύμονα (61,62). Υπερπλασία των καλυκοειδών κυττάρων παρατηρείται σημαντικά μειωμένη σε αυτούς τους πρώην καπνιστές. Η μεταπλασία των πλακωδών κυττάρων δεν διέφερε στους κεντρικούς αεραγωγούς, αλλά είχε μία τάση να είναι λιγότερο πλούσια στους περιφερικούς αγωγούς των πρώην

καπνιστών σε σύγκριση με τους καπνιστές. Το μέγεθος των αδενών και η μάζα των λείων μυών στους περιφερικούς και κεντρικούς αεραγωγούς ήταν όμοια και στις δύο ομάδες. Δε βρέθηκαν διαφορές στο ποσό της ίνωσης στους περιφερικούς αεραγωγούς ή στην εναπόθεση χρωστικής στα τοιχώματα των αεραγωγών και τον αριθμό των καταστραμμένων κυψελίδων. Προφανώς, τέτοιες παθολογοανατομικές μεταβολές δεν είναι ή είναι λιγότερο αντιστρεπτές μετά τη διακοπή του καπνίσματος, σε σύγκριση με την υπερπλασία των καλυκοειδών κυττάρων.

Οι προαναφερθείσες μελέτες (61,62) επίσης εκτίμησαν φλεγμονή, αλλά δε βρήκαν διαφορές στην ένταση της φλεγμονής στους κεντρικούς και περιφερικούς αεραγωγούς. Άλλες μελέτες επιπολασμού, χρησιμοποιώντας έμμεσες και άμεσες μετρήσεις της φλεγμονής των αεραγωγών ή πιο ειδικά αναστολογικές τεχνικές, έδειξαν διαφορετικά αποτελέσματα. Στο αίμα, οι αριθμοί των λευκοκυττάρων βρέθηκαν χαμηλότεροι στους πρώην καπνιστές σε σύγκριση με τους καπνιστές, υποδεικνύοντας βελτίωση (63 – 67), αλλά όχι αποκατάσταση στα φυσιολογικά επίπεδα (64) μετά τη διακοπή του καπνίσματος. Στους πρώην καπνιστές, το ποσοστό των CD4+ λεμφοκυττάρων ήταν χαμηλότερο από τους καπνιστές και επανέρχεται στο φυσιολογικό μετά από 2 έτη από τη διακοπή του καπνίσματος (65,68). Επιπρόσθετα, το ποσοστό των κυττάρων φυσικών φονέων είναι υψηλότερο στους πρώην καπνιστές από τους καπνιστές (68, 69). Στον εκπνεόμενο αέρα, οι πρώην καπνιστές παρουσιάζουν όμοια επίπεδα επιπέδων νιτρικού οξειδίου με των μη καπνιστών, σε σύγκριση με τα χαμηλότερα επίπεδα που καταγράφονται στους καπνιστές (70-75). Στα πτύελα, τα επίπεδα ιντερλευκίνης-8 (IL-8) είναι όμοια στους πρώην καπνιστές και καπνιστές (76), αλλά παραμένουν υψηλότερα από τους μη καπνιστές (77,78), υποδηλώνοντας ότι η προφλεγμονώδης δραστηριότητα ίσως δεν επηρεάζεται με τη διακοπή του καπνίσματος. Μόνο μία μελέτη με βρογχοκυψελιδικό έκκριμα [bronchoalveolar lavage fluid (BALF)] σύγκρινε πρώην καπνιστές (ηλικίας 62 ετών, n=6), καπνιστές (ηλικίας 49 ετών, n=14) και μη καπνιστές (ηλικίας 48 έτη, n=15). Το ποσοστό όλων των κυττάρων στο BALF ήταν όμοιος μεταξύ καπνιστών και πρώην καπνιστών. Ο αριθμός των ουδετεροφίλων, όμως, είχε την τάση να είναι χαμηλότερος στους πρώην καπνιστές από τους καπνιστές, αλλά παρέμεινε υψηλότερος από τους μη

καπνιστές. Επιπρόσθετα, ο αριθμός των μακροφάγων ήταν χαμηλότερος στους πρώην καπνιστές, και όμοιος με τον αριθμό των μακροφάγων των μη καπνιστών. Η ίδια μελέτη ανέφερε ότι η συγκέντρωση της μονοκυτταρικής χημειοτακτικής πρωτεΐνης-1 [monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1)], ενός σημαντικού χημειοτακτικού για τα μακροφάγα, ήταν υψηλότερη στους καπνιστές από ότι στους πρώην καπνιστές και στους μη καπνιστές, χωρίς διαφορά στις τελευταίες ομάδες. Η συγκέντρωση ανασταλτικής πρωτεΐνης των μακροφάγων-1b, ενός άλλου χημειοτακτικού των μονοκυττάρων, στο BALF, ήταν όμοια μεταξύ των ομάδων. Επομένως μετά τη διακοπή του καπνίσματος, ο υψηλότερος αριθμός των μακροφάγων και των επιπέδων της MCP-1 φαίνεται να επανέρχονται στα φυσιολογικά, ενώ δε συμβαίνει το ίδιο με τον αριθμό των ουδετεροφίλων (79).

Λίγες μελέτες έχουν εκτιμήσει την επίδραση της διακοπής του καπνίσματος στη φλεγμονή στους καπνιστές χωρίς χρόνια αναπνευστικά συμπτώματα σε μακροχρόνια βάση (Πίνακας 4). Ενδοβρογχικά ευρήματα έδειξαν ότι τα μακροσκοπικά σημεία της χρόνιας βρογχίτιδας (οίδημα, ερυθρότητα και βλέννα) μειώνονται μέσα σε 3 μήνες από τη διακοπή του καπνίσματος, και εξαφανίζονται τελείως μετά από 6 μήνες (80). Τα επίπεδα εκπνεόμενου NO αυξήθηκαν σχεδόν στις φυσιολογικές τιμές μέσα σε 1 εβδομάδα από τη διακοπή του καπνίσματος, υποδηλώνοντας ότι η προκαλούμενη από τον καπνό αναστολή της επαγωγίσιμης συνθάσης της παραγωγής του NO από τα επιθηλιακά κύτταρα είναι αναστρέψιμη (81).

Ο αριθμός των λευκοκυττάρων στο αίμα έπεσε σχεδόν αμέσως μετά τη διακοπή του καπνίσματος, με το μεγαλύτερο αποτέλεσμα μέσα στους πρώτους 9 μήνες (64, 82,83). Επιπρόσθετα, μία πτώση στον αριθμό των μακροφάγων στα πτύελα και το BALF ήταν ήδη εμφανής 1-2 μήνες από τη διακοπή του καπνίσματος, προσεγγίζοντας τα φυσιολογικά επίπεδα στο BALF στους 6 μήνες (80, 82, 84). Τα ουδετερόφιλα και τα λεμφοκύτταρα στο BALF επανήλθαν στα φυσιολογικά επίπεδα στους 9 και 15 μήνες, αντίστοιχα, μετά η διακοπή του καπνίσματος (82). Όχι μόνο ο αριθμός των φλεγμονοδών κυττάρων στο αίμα και στο BALF μειώνονται μετά τη διακοπή του καπνίσματος, αλλά και τα κύτταρα αυτά φαίνεται να είναι λιγότερο ενεργοποιημένα (80, 85). Επιπρόσθετα, μια μείωση στα επίπεδα του προ-φλεγμονώδους μεσολαβητή (soluble intercellular adhesion molecules and

soluble CD44) έχουν αναφερθεί (86,87). Η μείωση του καπνίσματος, όπως και η διακοπή του καπνίσματος, επίσης μειώνει τη φλεγμονή των αεραγωγών.

**Πίνακας 4.** Επίδραση της διακοπής του καπνίσματος στη φλεγμονή στο αίμα, πτύελο και (BALF) στους καπνιστές χωρίς χρόνια αναπνευστικά συμπτώματα.

First author [ref.]	Subjects n	Age yrs	Cumulative cigarette consumption pack-yrs	Specimen	Validation of quitters	Follow-up months	Effects of SC
ROBBINS [105]	10 Q	38	30*	eNO	Exhaled CO	1, 8 weeks	Increase in eNO (5.7 to 10.3 ppb) at 1/8 weeks
MILLER [91]	20 Q	22–71		Blood		6 weeks	No change in % lym, CD3, CD4 or CD8 or CD4/CD8 ratio in lSm/mSm Decr in % CD8, CD4/CD8 ratio norm in hSm
	5 lSm		10–19				
	6 mSm		19–49				
	9 hSm		50–120				
SKOLD [106]#	18 Q	41	23	Blood		1, 3, 6, 9, 15	Decr in leuc and [Hb] at 9 months Inc in IgG (trend)
JENSEN [107]	160 Q	43	25	Blood	Exhaled CO	6, 12	Decr in leuc, neut, lym; No change in baso
	92 Q						
JENSEN [108]	92 Q	44	23	Blood	Exhaled CO	6, 12	Inc in sIgE at 6 months, esp. in Q <40 yrs; Decr in sIgE at 12 months
MELISKA [109]	28 Q (M)	21–35	21*	Blood (lym)	Cotinine	31 days	Inc in NK cytotoxic activity; No change in T-cell activation; Decr in serum cortisol
SCOTT [110]	30 Q	43	25*	Plasma	Exhaled CO, cotinine	12	Decr in sICAMs (307 to 241 ng·mL <sup>-1</sup> ) towards normal
SCOTT [111]	30 Q	43	25*	Plasma	Exhaled CO, cotinine	12	No change in sCD44; Decr in sCD44v5 and sCD44v6
JENSEN [112]	50 Q	39	30	Blood	Exhaled CO	3, 6, 12	Decr in sECP at 6/12 months (-13.1 μg·L <sup>-1</sup> ); Decr in sLF at 6/12 months (-230.7 μg·L <sup>-1</sup> )
HERSEY [113]	35 Q	38		Blood		3	Decr in lym; Trend Decr in neut, plat Inc in NK activity; Inc in IgG, IgM
SWAN [114]	46 Q	49	49	Sputum (spont)	Cotinine in sputum	12	Decr in neut (-7.9%), MP (-14%), pigm MP (-4%); No change in columnar cells, mucus, metaplasia, dysplasia
SKOLD [115]#	18 Q	41	23	BALF		1, 3, 6, 9, 15	Decr in [cells] at 1 month; Decr in oedema, erythema, mucus <sup>+</sup> , norm at 6 months; Inc in MP Fl at 1 month; Decr in MP Fl at 6 months
SKOLD [116]#	18 Q	41	23	BALF		1, 3, 6	Decr in [cells] at 1 month; Decr in MP (91 to 83%) at 6 months; Inc in MP activity at 6 months; Inc in lym (6.6 to 14.5%) at 6 months; No change in % neut, eos, baso at 6 months
SKOLD [106]#	18 Q	41	23	BALF		1, 3, 6, 9, 15	Decr in neut, MP, lym, eos (total cells) at 9 months; No changes in L-fibronectin, L-hyaluronan Inc after SC, norm at 12 months; L-albumin Inc at 6 months SC, norm at 12 months
ANDERSSON [117]#	8 Q	37	20	BALF		1, 3, 6, 9, 15	CCSP levels lower in Sm, Inc till 9 months, norm at 15 months

Q: quitters; lSm: light smokers (Sm); mSm: moderate smokers; hSm: heavy smokers; eNO: exhaled nitric oxide; Inc: increase; Decr: decrease; ppb: parts per billion; lym: lymphocytes; norm: normalised; leuc: leukocytes; Hb: haemoglobin; Ig: immunoglobulin; neut: neutrophils; baso: basophils; sIg: serum Ig; esp.: especially; NK: natural killer [cell]; sICAM: soluble intercellular adhesion molecule; sCD44: soluble CD44; sECP: serum eosinophil cationic protein; sLF: serum lactoferrin; Plat: platelets; spont: spontaneous; MP: macrophages; pigm: pigmented; Fl: fluorescence; eos: eosinophils; CCSP: Clara cell secretory protein. #: same population (subpopulation used in [117]); \*: cigarettes·day<sup>-1</sup> (pack-yrs not given); †: macroscopic endobronchial findings.

Ο Rennard (88) και συνεργάτες διερεύνησαν το BALF 15 βαρέων καπνιστών που μείωσαν την κατανάλωση τσιγάρων από 50 κατά μέσο όρο σε 18 τσιγάρα την ημέρα. Μετά από 2 μήνες μείωσης του καπνίσματος, ο αριθμός των ουδετεροφίλων και των μακροφάγων και τα επίπεδα της ελαστάσης μειώθηκαν σημαντικά.

Μακροχρόνια δεδομένα στο αίμα, BALF και πτύελο δείχνουν ότι οι μεταβολές που προκαλούνται από το κάπνισμα είναι αντιστρεπτές μετά τη διακοπή του καπνίσματος στους καπνιστές χωρίς χρόνια αναπνευστικά συμπτώματα' όμως, μελέτες επιπολασμού στο BALF και στα πτύελα δείχνουν ότι είναι μόνο μερικώς αντιστρεπτές. Αν και μακροχρόνια δεδομένα διακοπής καπνίσματος σε πνευμονικό ιστό δεν υπάρχουν, τα διαθέσιμα δεδομένα δείχνουν ότι οι φλεγμονώδεις μεταβολές σε αυτή την ομάδα των καπνιστών είναι (τουλάχιστον μερικώς) αναστρέψιμες μετά τη διακοπή του καπνίσματος.

### **Συμπεράσματα**

Η διακοπή του καπνίσματος μειώνει τα επεισοδικά αναπνευστικά συμπτώματα και ομαλοποιεί την υπερβολική μείωση στον FEV<sub>1</sub>. Δεν βελτιώνει την υπεραντιδραστικότητα των αεραγωγών στα άμεσα ερεθίσματα, αλλά προλαμβάνει μελλοντική επιδείνωση. Η διακοπή του καπνίσματος μειώνει τον αριθμό των καλυκοειδών κυττάρων στους περιφερικούς αεραγωγούς, γεγονός που μπορεί να εξηγήσει γιατί τα αναπνευστικά συμπτώματα, όπως ο βήχας και η παραγωγή πτυέλων μειώνονται σε αυτή την ομάδα. Η διακοπή του καπνίσματος δεν αλλάζει την μάζα λείων μυών και την ίνωση στους περιφερικούς αεραγωγούς. όμως, βελτιώνει τη σύγκλειση των περιφερικών αεραγωγών στη δοκιμασία έκπλυσης με άζωτο. Δεν έχουν αναφερθεί ιστολογικές μελέτες που να δείχνουν αν η διακοπή του καπνίσματος μειώνει την τοπική διήθηση φλεγμονωδών κυττάρων στο τοίχωμα των αεραγωγών και το παρέγχυμα. Παρόλα αυτά, τα επίπεδα των φλεγμονωδών κυττάρων και των φλεγμονωδών μεσολαβητών στο αίμα, πτύελο και BALF μειώνονται προς τις φυσιολογικές τιμές μέσα σε 1 έτος από τη διακοπή του καπνίσματος. Επομένως οι περισσότερες μελέτες στους καπνιστές χωρίς χρόνια αναπνευστικά συμπτώματα δείχνουν ότι οι ανεπαίσθητες μεταβολές που προκαλούνται από το κάπνισμα στον πνεύμονα (ιδιαίτερα στους περιφερικούς αεραγωγούς) είναι τουλάχιστον μερικώς αναστρέψιμες.

## Βιβλιογραφία:

1. Siafakas NM, Vermeire P, Pride NB, *et al.* Optimal assessment and management of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Eur Respir J* 1995;8:1398–1420.
2. Kanner RE, Connett JE, Williams DE, Buist AS. Effects of randomized assignment to a smoking cessation intervention and changes in smoking habits on respiratory symptoms in smokers with early chronic obstructive pulmonary disease: the Lung Health Study. *Am J Med* 1999;106:410–416.
3. Anthonisen NR. Epidemiology and the Lung Health Study. *Eur Respir Rev* 1997;7:45, 202–205.
4. Rijcken B, Britton J. Epidemiology of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir Mon* 1998;3:7, 41–73.
5. Niewoehner DE, Kleinerman J, Rice DB. Pathologic changes in the peripheral airways of young cigarette smokers. *N Engl J Med* 1974;291:755–758.
6. Samet JM, Lange P. Longitudinal studies of active and passive smoking. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154:S257–S265.
7. Lange P, Groth S, Nyboe J, *et al.* Decline of the lung function related to the type of tobacco smoked and inhalation. *Thorax* 1990;45:22–26.
8. Lange P, Groth S, Nyboe GJ, *et al.* Effects of smoking and changes in smoking habits on the decline of FEV<sub>1</sub>. *Eur Respir J* 1989;2:811–816.
9. Sobonya RE, Kleinerman J. Morphometric studies of bronchi in young smokers. *Am Rev Respir Dis* 1972;105:768–775.
10. Bjornsson E, Plaschke P, Norrman E, *et al.* Symptoms related to asthma and chronic bronchitis in three areas of Sweden. *Eur Respir J* 1994;7:2146–2153.
11. Brown CA, Crombie IK, Smith WC, Tunstall-Pedoe H. The impact of quitting smoking on symptoms of chronic bronchitis: results of the Scottish Heart Health Study. *Thorax* 1991;46:112–116.
12. Enright PL, Kronmal RA, Higgins MW, Schenker MB, Haponik EF. Prevalence and correlates of respiratory symptoms and disease in the elderly. Cardiovascular Health Study. *Chest* 1994;106:827–834.

13. Lundback B, Nystrom L, Rosenhall L, Stjernberg N. Obstructive lung disease in northern Sweden: respiratory symptoms assessed in a postal survey. *Eur Respir J* 1991;4:257–266.
14. Rijcken B, Schouten JP, Weiss ST, Speizer FE, van der Lende R. The relationship of nonspecific bronchial responsiveness to respiratory symptoms in a random population sample. *Am Rev Respir Dis* 1987;136:62–68.
15. Sherman CB, Xu X, Speizer FE, Ferris BG Jr, Weiss ST, Dockery DW. Longitudinal lung function decline in subjects with respiratory symptoms. *Am Rev Respir Dis* 1992;146:855–859.
16. Sherrill DL, Lebowitz MD, Knudson RJ, Burrows B. Longitudinal methods for describing the relationship between pulmonary function, respiratory symptoms and smoking in elderly subjects: the Tucson Study. *Eur Respir J* 1993;6:342–348.
17. Sparrow D, O'Connor G, Colton T, Barry CL, Weiss ST. The relationship of nonspecific bronchial responsiveness to the occurrence of respiratory symptoms and decreased levels of pulmonary function. The Normative Aging Study. *Am Rev Respir Dis* 1987;135:1255–1260.
18. Viegi G, Paoletti P, Prediletto R, *et al.* Prevalence of respiratory symptoms in an unpolluted area of northern Italy. *Eur Respir J* 1988;1:311–318
19. Higenbottam T, Clark TJ, Shipley MJ, Rose G. Lung function and symptoms of cigarette smokers related to tar yield and number of cigarettes smoked. *Lancet* 1980;1:409–411
20. Comstock GW, Brownlow WJ, Stone RW, Sartwell PE. Cigarette smoking and changes in respiratory findings. *Arch Environ Health* 1970;21:50–57.
21. Barbee RA, Halonen M, Kaltenborn WT, Burrows B. A longitudinal study of respiratory symptoms in a community population sample. Correlations with smoking, allergen skin-test reactivity, and serum IgE. *Chest* 1991;99:20–26.
22. Buczko GB, Day A, Vanderdoelen JL, Boucher R, Zamel N. Effects of cigarette smoking and short-term smoking cessation on airway responsiveness to inhaled methacholine. *Am Rev Respir Dis* 1984;129:12–14.



23. Buist AS, Sexton GJ, Nagy JM, Ross BB. The effect of smoking cessation and modification on lung function. *Am Rev Respir Dis* 1976;114:115–122.
24. Tashkin DP, Clark VA, Coulson AH, *et al.* The UCLA population studies of chronic obstructive respiratory disease. VIII. Effects of smoking cessation on lung function: a prospective study of a free-living population. *Am Rev Respir Dis* 1984;130:707–715.
25. Wilhelmsen L. Effects on bronchopulmonary symptoms, ventilation, and lung mechanics of abstinence from tobacco smoking. *Scand J Respir Dis* 1967;48:407–414.
26. Israel RH, Ossip-Klein DJ, Poe RH, *et al.* Bronchial provocation tests before and after cessation of smoking. *Respiration* 1988;54:247–254.
27. Krzyzanowski M, Robbins DR, Lebowitz MD. Smoking cessation and changes in respiratory symptoms in two populations followed for 13 years. *Int J Epidemiol* 1993;22:666–673.
28. Lange P, Groth S, Nyboe J, *et al.* Phlegm production in plain cigarette smokers who changed to filter cigarettes or quit smoking. *J Intern Med* 1990;228:115–120.
29. Peterson DI, Lonergan LH, Hardinge MG. Smoking and pulmonary function. *Arch Environ Health* 1968;16:215–218
30. Lebowitz MD, Holberg CJ, Knudson RJ, Burrows B. Longitudinal study of pulmonary function development in childhood, adolescence, and early adulthood. Development of pulmonary function. *Am Rev Respir Dis* 1987;136:69–75.
31. Enjeti S, Hazelwood B, Permutt S, Menkes H, Terry P. Pulmonary function in young smokers: male-female differences. *Am Rev Respir Dis* 1978;118:667–676.
32. Nemery B, Moavero NE, Brasseur L, Stanescu DC. Changes in lung function after smoking cessation: an assessment from a cross-sectional survey. *Am Rev Respir Dis* 1982;125:122–124.
33. Ekberg-Jansson A, Bake B, Andersson B, Skoogh BE, Lofdahl CG. Respiratory symptoms relate to physiological changes and inflammatory markers reflecting central but not peripheral airways. A study in 60-year-old ‘healthy’ smokers and never-smokers. *Respir Med* 2001;95:40–47.

34. Xu X, Dockery DW, Ware JH, Speizer FE, Ferris BG Jr. Effects of cigarette smoking on rate of loss of pulmonary function in adults: a longitudinal assessment. *Am Rev Respir Dis* 1992;146:1345–1348.
35. Dockery DW, Speizer FE, Ferris BG Jr, Ware JH, Louis TA, Spiro A III. Cumulative and reversible effects of lifetime smoking on simple tests of lung function in adults. *Am Rev Respir Dis* 1988;137:286–292.
36. Chen Y, Horne SL, Dosman JA. Increased susceptibility to lung dysfunction in female smokers. *Am Rev Respir Dis* 1991;143:1224–1230.
37. Sorlie P, Lakatos E, Kannel WB, Celli B. Influence of cigarette smoking on lung function at baseline and at follow-up in 14 years: the Framingham Study. *J Chronic Dis* 1987;40:849–856
38. Burr ML, Phillips KM, Hurst DN. Lung function in the elderly. *Thorax* 1985;40:54–59.
39. Sherrill DL, Enright P, Cline M, Burrows B, Lebowitz MD. Rates of decline in lung function among subjects who restart cigarette smoking. *Chest* 1996;109:1001–1005.
40. Burchfiel CM, Marcus EB, Curb JD, *et al.* Effects of smoking and smoking cessation on longitudinal decline in pulmonary function. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151:1778–1785.
41. Bosse R, Sparrow D, Rose CL, Weiss ST. Longitudinal effect of age and smoking cessation on pulmonary function. *Am Rev Respir Dis* 1981;123:378–381
42. Camilli AE, Burrows B, Knudson RJ, Lyle SK, Lebowitz MD. Longitudinal changes in forced expiratory volume in one second in adults. Effects of smoking and smoking cessation. *Am Rev Respir Dis* 1987;135:794–799
43. Tager IB, Segal MR, Speizer FE, Weiss ST. The natural history of forced expiratory volumes. Effect of cigarette smoking and respiratory symptoms. *Am Rev Respir Dis* 1988;138:837–849.
44. Xu X, Weiss ST, Rijcken B, Schouten JP. Smoking, changes in smoking habits, and rate of decline in FEV<sub>1</sub>: new insight into gender differences. *Eur Respir J* 1994;7:1056–1061.
45. Beaty TH, Menkes HA, Cohen BH, Newill CA. Risk factors associated with longitudinal change in pulmonary function. *Am Rev Respir Dis* 1984;129:660–667.

46. Pelkonen M, Notkola IL, Tukiainen H, Tervahauta M, Tuomilehto J, Nissinen A. Smoking cessation, decline in pulmonary function and total mortality: a 30 year follow up study among the Finnish cohorts of the Seven Countries Study. *Thorax* 2001;56:703–707.
47. Krzyzanowski M, Jedrychowski W, Wysocki M. Factors associated with the change in ventilatory function and the development of chronic obstructive pulmonary disease in a 13-year follow-up of the Cracow Study. Risk of chronic obstructive pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis* 1986;134:1011–1019.
48. Taylor RG, Joyce H, Gross E, Holland F, Pride NB. Bronchial reactivity to inhaled histamine and annual rate of decline in FEV<sub>1</sub> in male smokers and ex-smokers. *Thorax* 1985;40:9–16
49. Kabiraj MU, Simonsson BG, Groth S, Bjorklund A, Bulow K, Lindell SE. Bronchial reactivity, smoking, and  $\alpha_1$ -antitrypsin. A population-based study of middle-aged men. *Am Rev Respir Dis* 1982;126:864–869.
50. Townsend MC, DuChene AG, Morgan J, Browner WS. Pulmonary function in relation to cigarette smoking and smoking cessation. MRFIT Research Group. *Prev Med* 1991;20:621–637.
51. Krzyzanowski M, Camilli AE, Lebowitz MD. Relationships between pulmonary function and changes in chronic respiratory symptoms. Comparison of Tucson and Cracow longitudinal studies. *Chest* 1990;98:62–70
52. Sherrill DL, Lebowitz MD, Knudson RJ, Burrows B. Smoking and symptom effects on the curves of lung function growth and decline. *Am Rev Respir Dis* 1991;144:17–22.
53. 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;23:391–394
54. Bode FR, Dosman J, Martin RR, Macklem PT. Reversibility of pulmonary function abnormalities in smokers. A prospective study of early diagnostic tests of small airways disease. *Am J Med* 1975;59:43–52.

55. Simonsson BG, Rolf C. Bronchial reactivity to methacholine in ten non-obstructive heavy smokers before and up to one year after cessation of smoking. *Eur J Respir Dis* 1982;63:526–534.
56. Lim TK, Taylor RG, Watson A, Joyce H, Pride NB. Changes in bronchial responsiveness to inhaled histamine over four years in middle aged male smokers and ex-smokers. *Thorax* 1988;43:599–604
57. Cerveri I, Bruschi C, Zoia MC, *et al.* Smoking habit and bronchial reactivity in normal subjects. A population-based study. *Am Rev Respir Dis* 1989;140:191–196.
58. Paoletti P, Carrozzi L, Viegi G, *et al.* Distribution of bronchial responsiveness in a general population: effect of sex, age, smoking, and level of pulmonary function. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151:1770–1777
59. Sparrow D, O'Connor GT, Rosner B, Segal MR, Weiss ST. The influence of age and level of pulmonary function on nonspecific airway responsiveness. The Normative Aging Study. *Am Rev Respir Dis* 1991;143:978–982
60. Sunyer J, Anto JM, Kogevinas M, Soriano JB, Tobias A, Munoz A. Smoking and bronchial responsiveness in nonatopic and atopic young adults. Spanish Group of the European Study of Asthma. *Thorax* 1997;52:235–238
61. Wright JL, Hobson JE, Wiggs B, Pare PD, Hogg JC. Airway inflammation and peribronchiolar attachments in the lungs of nonsmokers, current and ex-smokers. *Lung* 1988;166:277–286.
62. Mullen JB, Wright JL, Wiggs BR, Pare PD, Hogg JC. Structure of central airways in current smokers and ex-smokers with and without mucus hypersecretion: relationship to lung function. *Thorax* 1987;42:843–848
63. Friedman GD, Siegelau AB. Changes after quitting cigarette smoking. *Circulation* 1980;61:716–723.
64. Sunyer J, Munoz A, Peng Y, *et al.* Longitudinal relation between smoking and white blood cells. *Am J Epidemiol* 1996;144:734–741.
65. Tollerud DJ, Clark JW, Brown LM, *et al.* The effects of cigarette smoking on T cell subsets. A population-based survey of healthy Caucasians. *Am Rev Respir Dis* 1989;139:1446–1451.

66. Miller LG, Goldstein G, Murphy M, Ginns LC. Reversible alterations in immunoregulatory T cells in smoking. Analysis by monoclonal antibodies and flow cytometry. *Chest* 1982;82:526–529.
67. Holt PG. Immune and inflammatory function in cigarette smokers. *Thorax* 1987;42:241–249.
68. de Jong JW, Belt-Gritter B, Koeter GH, Postma DS. Peripheral blood lymphocyte cell subsets in subjects with chronic obstructive pulmonary disease: association with smoking, IgE and lung function. *Respir Med* 1997;91:67–76.
69. Tollerud DJ, Clark JW, Brown LM, *et al.* Association of cigarette smoking with decreased numbers of circulating natural killer cells. *Am Rev Respir Dis* 1989;139:194–198.
70. Persson MG, Zetterstrom O, Agrenius V, Ihre E, Gustafsson LE. Single-breath nitric oxide measurements in asthmatic patients and smokers. *Lancet* 1994;343:146–147.
71. Schilling J, Holzer P, Guggenbach M, Gyurech D, Marathia K, Geroulanos S. Reduced endogenous nitric oxide in the exhaled air of smokers and hypertensives. *Eur Respir J* 1994;7:467–471.
72. Delen FM, Sippel JM, Osborne ML, Law S, Thukkani N, Holden WE. Increased exhaled nitric oxide in chronic bronchitis: comparison with asthma and COPD. *Chest* 2000;117:695–701.
73. Rutgers SR, van der Mark TW, Coers W, *et al.* Markers of nitric oxide metabolism in sputum and exhaled air are not increased in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 1999;54:576–580.
74. Balint B, Donnelly LE, Hanazawa T, Kharitonov SA, Barnes PJ. Increased nitric oxide metabolites in exhaled breath condensate after exposure to tobacco smoke. *Thorax* 2001;56:456–461.
75. Montuschi P, Kharitonov SA, Barnes PJ. Exhaled carbon monoxide and nitric oxide in COPD. *Chest* 2001;120:496–501.
76. Vernooij JH, Kucukaycan M, Jacobs JA, *et al.* Local and systemic inflammation in patients with chronic obstructive pulmonary disease: soluble tumor necrosis factor receptors are increased in sputum. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166:1218–1224.

77. Keatings VM, Collins PD, Scott DM, Barnes PJ. Differences in interleukin-8 and tumor necrosis factor- $\alpha$  in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153:530–534.
78. Chalmers GW, MacLeod KJ, Thomson L, Little SA, McSharry C, Thomson NC. Smoking and airway inflammation in patients with mild asthma. *Chest* 2001;120:1917–1922
79. Capelli A, Di Stefano A, Gnemmi I, *et al.* Increased MCP-1 and MIP-1 $\beta$  in bronchoalveolar lavage fluid of chronic bronchitics. *Eur Respir J* 1999;14:160–165
80. Skold CM, Hed J, Eklund A. Smoking cessation rapidly reduces cell recovery in bronchoalveolar lavage fluid, while alveolar macrophage fluorescence remains high. *Chest* 1992;101:989–995.
81. Robbins RA, Millatmal T, Lassi K, Rennard S, Daughton D. Smoking cessation is associated with an increase in exhaled nitric oxide. *Chest* 1997;112:313–318
82. Skold CM, Blaschke E, Eklund A. Transient increases in albumin and hyaluronan in bronchoalveolar lavage fluid after quitting smoking: possible signs of reparative mechanisms. *Respir Med* 1996;90:523–529.
83. Jensen EJ, Pedersen B, Frederiksen R, Dahl R. Prospective study on the effect of smoking and nicotine substitution on leucocyte blood counts and relation between blood leucocytes and lung function. *Thorax* 1998;53:784–789.
84. Skold CM, Forslid J, Eklund A, Hed J. Metabolic activity in human alveolar macrophages increases after cessation of smoking. *Inflammation* 1993;17:345–352.
85. Jensen EJ, Pedersen B, Schmidt E, Venge P, Dahl R. Serum eosinophilic cationic protein and lactoferrin related to smoking history and lung function. *Eur Respir J* 1994;7:927–933
86. Scott DA, Stapleton JA, Wilson RF, *et al.* Dramatic decline in circulating intercellular adhesion molecule-1 concentration on quitting tobacco smoking. *Blood Cells Mol Dis* 2000;26:255–258.
87. Scott DA, Stapleton JA, Palmer RM, *et al.* Plasma concentrations of reputed tumor-associated soluble CD44 isoforms (v5 and v6) in smokers

are dose related and decline on smoking cessation. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000;9:1211–1214

88. Rennard SI, Daughton D, Fujita J, *et al.* Short-term smoking reduction is associated with reduction in measures of lower respiratory tract inflammation in heavy smokers. *Eur Respir J* 1990;3:752–759

## Κεφάλαιο 3

### ΦΡΑΓΜΟΙ ΣΤΗ ΔΙΑΚΟΠΗ ΚΑΠΝΙΣΜΑΤΟΣ

Η διακοπή του καπνίσματος είναι δύσκολη και υπάρχει πληθώρα εμποδίων για τους ασθενείς που επιθυμούν να το διακόψουν, όπως το γεγονός ότι η νικοτίνη είναι εξαιρετικά εθιστική (1). Η εξάρτηση από τη νικοτίνη έχει νευροβιολογική βάση. Το τμήμα του εγκεφάλου που παίζει σημαντικό ρόλο στη διαδικασία εθισμού αντιδρά στη νικοτίνη με τον ίδιο τρόπο που αντιδρά σε άλλες εθιστικές ουσίες (Εικόνα 1). Ως αποτέλεσμα, οι καπνιστές εθίζονται στη νικοτίνη, καθιστώντας τη διακοπή του καπνίσματος μια δύσκολη υπόθεση.

Εικόνα 1. Οδοί του ΚΝΣ που εμπλέκονται στην εξάρτηση από τη νικοτίνη



Αξίζει να σημειωθεί ότι στους μισούς από τους καπνιστές που προσπαθούν να το διακόψουν παρατηρούνται, όπως φαίνεται στον Πίνακα 1 σοβαρά συμπτώματα στέρησης (2). Τα στερητικά συμπτώματα ξεκινούν μέσα σε μερικές ώρες από το τελευταίο τσιγάρο και φτάνουν στη μέγιστη έντασή τους την πρώτη εβδομάδα. Τα περισσότερα συμπτώματα υποχωρούν σε 3 με 4 εβδομάδες, αλλά η επιθυμία μπορεί να παραμείνει αρκετούς μήνες. Επιπλέον, οι καπνιστές είναι δύσκολο να φανταστούν τη ζωή τους χωρίς



τσιγάρο. Αρκετοί καπνιστές πιστεύουν πως είναι σε θέση να το κόψουν χωρίς βοήθεια, ενώ η επιτυχής μακράς διάρκειας διακοπή ίσως να απαιτεί πολλές προσπάθειες διακοπής, και οι υποτροπές να ωθήσουν τους ασθενείς να αναβάλλουν στην επόμενη προσπάθεια. Βέβαια υπάρχουν και κάποιοι καπνιστές που δεν έχουν πλήρως συνειδητοποιήσει τους κινδύνους για την υγεία τους από το κάπνισμα ή απλά τους αποδέχονται, κάποιοι που δεν είναι τόσο «πολυμήχανοι», ώστε να αντιμετωπίσουν τα ενοχλητικά συμπτώματα από τη διακοπή (3). Άλλωστε υπάρχουν και πολλοί καπνιστές που θεωρούν λανθασμένα πως η διακοπή είναι εύκολη, κι έτσι δεν χρειάζεται να αντιμετωπίσουν το πρόβλημα τώρα (4).

Από την πλευρά των γιατρών, διάφορες δυσκολίες μπορεί να αποτελέσουν τροχοπέδη στην προσπάθεια της συμβουλευτικής υποστήριξης για τη διακοπή του καπνίσματος. Αυτές περιλαμβάνουν την πεποίθηση ότι μια σύντομη συμβουλή είναι αναποτελεσματική και απίθανο να φέρει αποτελέσματα, την επιφύλαξη μήπως ενοχλήσουν τους ασθενείς λόγω της ευαισθησίας του θέματος του καπνίσματος, την απροθυμία να διακινδυνεύσουν τη σχέση γιατρού – ασθενούς (5), τη διαίσθηση του γιατρού ότι ο ασθενής δεν έχει κίνητρα και την έλλειψη χρόνου. Επίσης η έλλειψη εκπαίδευσης, ικανοτήτων και πόρων (6,7) μπορεί να οδηγήσει σε αναποτελεσματικές πρακτικές και στην υποβάθμιση των παρεμβάσεων που μπορεί εν τέλει να είναι αποτελεσματικές (8-10).

**Πίνακας 1.** Συμπτώματα έλλειψης από τη στέρηση νικοτίνης. Από το Action on Smoking and Health (ASH) Factsheet Number 11: Stopping Smoking ASH 2007. <http://www.ash.org.uk>

Διάρκεια	Σύμπτωμα	Επίπτωση (%)
< 48 ώρες	Ζαλάδα	10
< 1 εβδομάδα	Διαταραχές ύπνου	25
< 2 εβδομάδες	Διαταραχές συγκέντρωσης Πόθος για τη νικοτίνη	60 70
< 4 εβδομάδες	Οξυθυμία ή επιθετικότητα Κατάθλιψη Ανησυχία	50 60 60
< 10 εβδομάδες	Αυξανόμενη όρεξη	70

## Βιβλιογραφία:

1. Jarvis MJ. Why people smoke. *BMJ* 2004; 328: 277-9
2. Hughes JR. Effects of abstinence from tobacco: etiology, animal models, epidemiology, and significance: a subjective review. *Nicotine Tob Res.* 2007; 9: 329-39
3. Brown RA, Lejuez CW, Kahler CW, Strong DR, Zvolensky MJ. Distress tolerance and early smoking lapse. *Clin Psychol Rev.* 2005; 25: 713-33
4. Weinstein ND, Slovic P, Gibson G. Accuracy and optimism in smokers' beliefs about quitting. *Nicotine Tob Res.* 2004; 6 Suppl 3: S375-80
5. Coleman T, Wilson A. Anti-smoking advice in general practice consultations: general practitioners' attitudes, reported practice and preconceived problems. *Br J Gen Pract* 1996; 46: 87-91
6. Edwards D, Freeman T, Litt J, Roche A. GPs' confidence in and barriers to implementing smoking cessation activities: Compared to dentists, dental hygienists and pharmacists. *Aust J Primary Health* 2006; 12: 117-25
7. Twardella D, Brenner H. Lack of training as a central barrier to the promotion of smoking cessation: a survey among general practitioners in Germany. *Eur J Public Health.* 2005; 15: 140-30.
8. Lucan SC, Katz DL. Factors associated with smoking cessation counseling at clinical encounters: the Behavioral Risk Factor Surveillance System (BRFSS) 2000. *Am J Health Promot.* 2006; 21: 16-2
9. Vogt F, Hall S, Marteau TM. General practitioners' and family physicians' negative beliefs and attitudes towards discussing smoking cessation with patients: a systematic review. *Addiction.* 2005; 100: 1423-31
10. Young J, Ward J. Implementing guidelines for smoking cessation: advice in Australian general practice: opinions, current practices, readiness to change and perceived barriers. *Fam Pract.* 2001; 18: 14-20

## Κεφάλαιο 4

### ΚΑΤΕΥΘΥΝΤΗΡΙΕΣ ΟΔΗΓΙΕΣ ΔΙΑΚΟΠΗΣ ΤΟΥ ΚΑΠΝΙΣΜΑΤΟΣ

Περίπου τα τρία τέταρτα των καπνιστών, όταν ερωτώνται κατά τη διάρκεια μελετών, αναφέρουν πως επιθυμούν να διακόψουν το κάπνισμα (1,2). Οι προσπάθειες διακοπής χωρίς κάποια βοήθεια είναι συχνές, αλλά το ποσοστό επιτυχίας αναδεικνύεται χαμηλό. Η νικοτίνη είναι εξαιρετικά εθιστική. Το κάπνισμα είναι μια χρόνια υποτροπιάζουσα κατάσταση, και στον γενικό πληθυσμό των καπνιστών που προσπαθούν να το διακόψουν το ποσοστό υποτροπής είναι υψηλό. Σε μια χώρα η οποία έχει εγκαταστήσει στρατηγικές για τον περιορισμό του καπνίσματος, το ποσοστό διακοπής ανάμεσα σε αυτούς που προσπαθούν να το διακόψουν χωρίς βοήθεια είναι μικρότερο από 2% κάθε χρόνο (3). Υψηλότερα ποσοστά επιτυχίας επιτυγχάνονται όταν οι καπνιστές ζητούν βοήθεια για τη διακοπή του καπνίσματος από τους ειδικούς. Όμως, ακόμη και τότε, η σταθερή αποχή από το κάπνισμα είναι δύσκολη και συχνά απαιτούνται πολλές προσπάθειες πριν επιτευχθεί η μακροπρόθεσμη αποχή (4,5).

Έχει παρατηρηθεί, ότι ο οι καπνιστές που δεν καταφέρνουν να διακόψουν το κάπνισμα συνήθως έχουν ορισμένα κοινά χαρακτηριστικά, όπως για παράδειγμα χαμηλό επίπεδο μόρφωσης, μικρό ενδιαφέρον για τις θεραπείες συμπεριφοράς που υποβοηθούν την προσπάθεια διακοπής, κατάχρηση αλκοόλ ή άλλων εθιστικών ουσιών, ψυχιατρικά νοσήματα (6). Επιπλέον, σήμερα καπνίζει μεγαλύτερο ποσοστό γυναικών σε σχέση με το παρελθόν και οι γυναίκες συνήθως εκδηλώνουν εντονότερα συμπτώματα στέρησης νικοτίνης και μεγαλύτερη καταθλιπτική διάθεση, κατά τη διάρκεια των προσπαθειών διακοπής καπνίσματος (7), με αποτέλεσμα να ανταποκρίνονται λιγότερο στις θεραπείες με υποκατάστατα νικοτίνη. Οι καπνιστές που είχαν αποτύχει αρχικά στην προσπάθειά τους να διακόψουν το κάπνισμα, χρησιμοποιούν ευκολότερα φαρμακευτικές θεραπείες για τη διακοπή του καπνίσματος. Όμως, συνήθως επιζητούν νέες προσεγγίσεις από αυτές που ήδη έχουν δοκιμάσει, γεγονός που υπαγορεύει την αναγκαιότητα

για δημιουργία νέων και πιο αποτελεσματικών θεραπειών για τη διακοπή του καπνίσματος. Η καλύτερη κατανόηση των δράσεων της νικοτίνης στα νευροδιαβιβαστικά μονοπάτια του Κ.Ν.Σ. έχει κατευθύνει τη βασική και κλινική έρευνα στη δημιουργία νέων φαρμάκων, που στοχεύουν στη θεραπεία της εξάρτησης από τη νικοτίνη.

Η διακοπή του καπνίσματος, καθώς και οι στρατηγικές πρόληψης της έναρξης αλλά και της υποτροπής του καπνίσματος μετά από επιτυχή διακοπή του, παρέχουν τεράστια δυνατότητα για τη βελτίωση της δημόσιας υγείας. Ήδη, η Παγκόσμια Πρωτοβουλία για τη Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια (GOLD), συστήνει τη διακοπή του καπνίσματος ως την πιο σημαντική θεραπευτική παρέμβαση στη θεραπεία της Χ.Α.Π. (8).

Δεδομένου ότι τα οφέλη από τη διακοπή του καπνίσματος είναι τεράστια και ότι σημαντικό ποσοστό θνητότητας, θνησιμότητας και οικονομικής επιβάρυνσης οφείλονται στο κάπνισμα, έχουν δημοσιευθεί κατά καιρούς κατευθυντήριες οδηγίες για την κλινική πράξη που παρέχουν προτάσεις για παρεμβάσεις, καθώς και στρατηγικές για την προώθηση της θεραπείας από την εξάρτηση από τον καπνό. Σε όλες αυτές τις προτάσεις υπάρχει μια γενική ομοφωνία για το τι συνιστά την επιτυχημένη θεραπεία. Οι τελευταίες αναθεωρημένες κατευθυντήριες οδηγίες του 2000, βασίσθηκαν κυρίως σε μετα-αναλύσεις ενός συνόλου 6000 άρθρων και τυχαιοποιημένων κλινικών μελετών, και είχαν σα στόχο τη θεραπεία της χρήσης καπνού σε ειδικές ομάδες, όπως έγκυες γυναίκες, νοσηλευόμενους καπνιστές, παιδιά και έφηβους και πιο ηλικιωμένους καπνιστές (9). Με βάση αυτές τις κατευθυντήριες γραμμές δημοσιεύθηκε στο περιοδικό «Chest» το 2002, ένα άρθρο τοποθέτησης του ACCP με τίτλο: «Η Θεραπεία της Χρήσης και Εξάρτησης από τον Καπνό: Κατευθυντήριες Οδηγίες που βασίζονται σε δεδομένα της Κλινικής Πράξης για τη Διακοπή του Καπνίσματος» (10), με σκοπό να τονιστούν οι πιο σημαντικές στρατηγικές και προτάσεις των κλινικών γιατρών για την παροχή αποτελεσματικών παρεμβάσεων για τη διακοπή του καπνίσματος. Έτσι, αυτό που τονίζεται αρχικά, είναι οι γιατροί να εντοπίζουν τους καπνιστές, να τους κινητοποιούν να κάνουν μια προσπάθεια να διακόψουν το κάπνισμα και να τους στηρίζουν στο να πετύχουν τη διακοπή μέσω συμβουλευτικής παραίνεσης, φαρμακοθεραπείας και μετέπειτα παρακολούθησης. Οι γιατροί θα πρέπει λοιπόν ως ρουτίνα, να αξιολογούν και

να καταγράφουν την καπνιστική συνήθεια, να συμβουλεύουν τους καπνιστές να διακόψουν το κάπνισμα, να αξιολογούν την κινητοποίησή τους να το πετύχουν και να τους βοηθούν προσφέροντάς τους υποστήριξη (10,11).

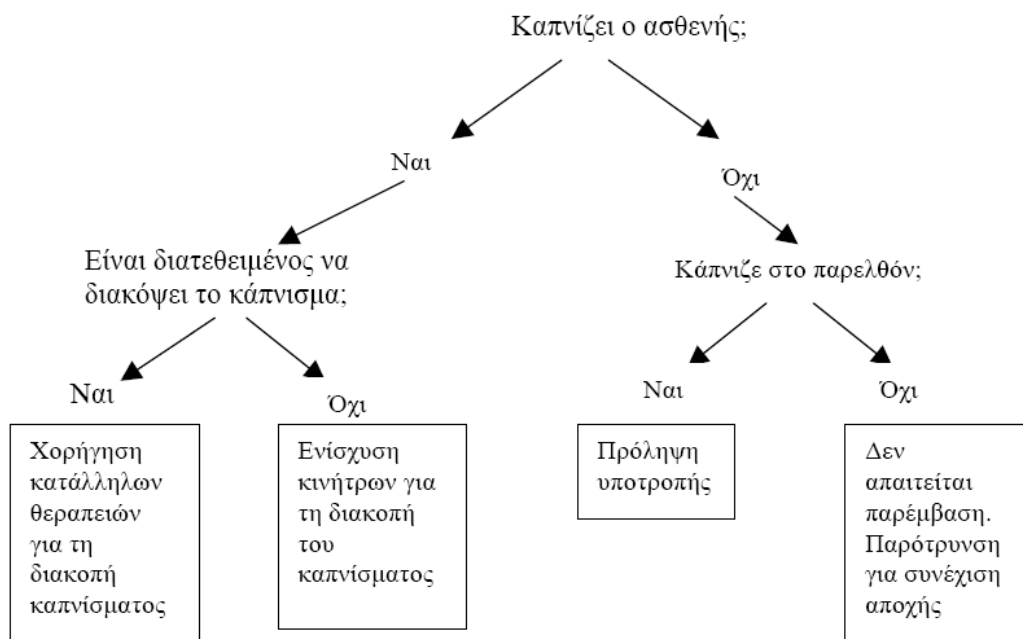
Οι θεραπευτικές παρεμβάσεις διαφέρουν ανάλογα με τον τύπο των καπνιστών. Οι καπνιστές ταξινομούνται σε μια από τις ακόλουθες ομάδες ανάλογα με την κινητοποίηση και την προθυμία τους να διακόψουν το κάπνισμα:

- α) Καπνιστές που επιθυμούν να προσπαθήσουν να διακόψουν το κάπνισμα
- β) Καπνιστές που αυτή τη στιγμή δεν είναι πρόθυμοι να προσπαθήσουν να διακόψουντο κάπνισμα και
- γ) Πρώην καπνιστές που διέκοψαν το κάπνισμα πρόσφατα.

Σύμφωνα λοιπόν, με αυτή την κατάταξη υπαγορεύεται και η θεραπευτική παρέμβαση (Σχήμα 1). Στους καπνιστές που είναι διατεθειμένοι να προσπαθήσουν να διακόψουν είναι σημαντική η ενίσχυση των κινήτρων για να το πετύχουν (Πίνακας 1), ενώ στους καπνιστές που έχουν διακόψει το κάπνισμα σημαντική είναι η πρόληψη της υποτροπής (Πίνακας 2). Δύο προσεγγίσεις έχουν ένδειξη ισχυρής αποτελεσματικότητας για τη διακοπή του καπνίσματος: η φαρμακευτική αγωγή και η συμβουλευτική παραίτηση (9-14). Κάθε μια μέθοδος είναι αποτελεσματική από μόνη της, αλλά ο συνδυασμός και των δυο επιτυγχάνει τα υψηλότερα ποσοστά στη διακοπή του καπνίσματος. Η αποτελεσματικότητα μιας θεραπείας σχετίζεται με την έντασή της, αλλά ακόμη και βραχείες παρεμβάσεις γιατρών στις επισκέψεις στο γραφείο τους προάγουν το κίνητρο για τη διακοπή καπνίσματος. Η παροχή μιας μικρής διάρκειας συμβουλευτικής παραίτησης (τρία λεπτά ή λιγότερο) είναι πιο αποτελεσματική από την απλή συμβουλή στον ασθενή να διακόψει το κάπνισμα και διπλασιάζει το ποσοστό διακοπής συγκριτικά με τη μη παρέμβαση. Όλες οι ιατρικές υπηρεσίες (π.χ. Κ.Υ., νοσοκομεία) πρέπει να καταγράφουν την καπνιστική συνήθεια των ασθενών, να προσφέρουν βοήθεια για τη διακοπή του καπνίσματος και να αρχειοθετούν αυτές τις ενέργειες. Οι κατευθυντήριες οδηγίες υπαγορεύουν στους ασφαλιστικούς φορείς την αναγκαιότητα, να καλύπτουν όλες τις προτεινόμενες θεραπείες, συμπεριλαμβανομένων της συμβουλευτικής παραίτησης και της φαρμακευτικής θεραπείας (9-11).

Η σωστή αξιολόγηση, λοιπόν, από τους γιατρούς των καπνιστών (καπνιστική συνήθεια, ιατρικό ιστορικό, άλλη φαρμακευτική αγωγή, προηγούμενες προσπάθειες), που επιθυμούν να προσπαθήσουν να διακόψουν το κάπνισμα λαμβάνοντας φαρμακευτική αγωγή, είναι σημαντική και μπορεί να υπαγορεύσει και το είδος της θεραπείας που θα δοθεί στον εκάστοτε καπνιστή, ώστε να διασφαλιστεί η καλύτερη αποτελεσματικότητα με τις λιγότερες παρενέργειες από την αγωγή (Σχήμα 2) (10,11, 14, 15-18).

Σχήμα 1. Αξιολόγηση καπνιστικής συνήθειας



## Πίνακας 1. Ενίσχυση κινήτρων για τη διακοπή του καπνίσματος

1. Ατομική κινητοποίηση
  - Παρότρυνση του ασθενούς, δείχνοντάς του γιατί η διακοπή του καπνίσματος τον αφορά προσωπικά
  - Ο γιατρός πρέπει να είναι πολύ συγκεκριμένος
  - Ψυχολογική υποστήριξη με γνώμονα τις ιδιαιτερότητες του συγκεκριμένου καπνιστή (π.χ. πρόβλημα υγείας που υπαγορεύει τη διακοπή του καπνίσματος, οικογενειακή ή κοινωνική κατάσταση του καπνιστή, ηλικία, φύλο, προηγούμενες εμπειρίες από προσπάθειες για διακοπή του καπνίσματος, προσωπικά εμπόδια για τη διακοπή του καπνίσματος)
2. Επισήμανση κινδύνων
  - Ασθένειες που σχετίζονται με την καπνιστική συνήθεια (άσθμα, προβλήματα στην εγκυμοσύνη, στειρότητα, ανικανότητα κ.λ.π.)
  - Μακροπρόθεσμοι κίνδυνοι (π.χ. έμφραγμα μυοκαρδίου, καρκίνος του πνεύμονα, εγκεφαλικά επεισόδια, άλλοι καρκίνοι, όπως λάρυγγα, στοματικής κοιλότητας, οισοφάγου, παγκρέατος, ουροδόχου κύστης, τραχήλου μήτρας)
  - Χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια
  - Μακροχρόνια αναπηρία και ανάγκη παρατεταμένης φροντίδας
3. Αναφορά στα οφέλη από τη διακοπή του καπνίσματος (π.χ. βελτίωση της υγείας, βελτίωση όσφρησης, εξοικονόμηση χρημάτων, καλύτερη εμφάνιση, θετικό πρότυπο για τα παιδιά του, πιο υγιή παιδιά στο οικογενειακό του περιβάλλον, καλύτερη φυσική κατάσταση, μείωση ρυτίδων/γήρανσης της επιδερμίδας)
4. Συζήτηση προβλημάτων (τα συμπτώματα στέρησης, ο φόβος της αποτυχίας, η αύξηση του βάρους, η έλλειψη υποστήριξης, η κατάθλιψη, η απόλαυση από το κάπνισμα)
5. Πρόληψη υποτροπής

## **Πίνακας 2. Πρόληψη υποτροπής**

### *1. Έλλειψη υποστήριξης για τη διακοπή*

- Προγραμματισμός επισκέψεων παρακολούθησης ή τηλεφωνική επικοινωνία με τον ασθενή.
- Παροχή βοήθειας στον ασθενή με σκοπό τον προσδιορισμό μέσων υποστήριξης στο περιβάλλον του
- Παραπομπή του ασθενή σε αρμόδιο φορέα που παρέχει συμβουλευτική αγωγή ή ψυχολογική υποστήριξη για τη διακοπή του καπνίσματος.

### *2. Αρνητική διάθεση ή κατάθλιψη*

- Αν είναι σημαντική, παρέχετε ψυχολογική υποστήριξη, χορηγήστε κατάλληλη φαρμακευτική αγωγή ή παραπέμψτε τον ασθενή σε κάποιον ειδικό.

### *3. Έντονα ή παρατεταμένα συμπτώματα στέρησης*

- Αν ο ασθενής αναφέρει παρατεταμένη επιθυμία ή άλλα συμπτώματα στέρησης, πρέπει να εξετασθεί το ενδεχόμενο αύξησης της χρήσης μιας εγκεκριμένης φαρμακευτικής αγωγής ή προσθήκης/χορήγησης συνδυασμού φαρμάκων, για να μειώσετε τα έντονα συμπτώματα στέρησης.

### *4. Αύξηση βάρους*

- Συστήστε έναρξη ή αύξηση της σωματικής άσκησης, αποθαρρύνετε τις εξαντλητικές δίαιτες.
- Διαβεβαιώστε τον ασθενή ότι μια μικρή αύξηση σωματικού βάρους μετά τη διακοπή του καπνίσματος είναι αναμενόμενη και σιγά-σιγά περιορίζεται από μόνη της.
- Δώστε έμφαση στη σημασία που έχει η υγιεινή διατροφή.
- Συνέχιση της χορήγησης στον ασθενή φαρμάκων, που είναι γνωστό ότι καθυστερούν την αύξηση του βάρους (π.χ. βουπροπιόνη βραδείας αποδέσμευσης, υποκατάστατα νικοτίνης, ιδιαίτερα τσίγλα νικοτίνης).
- Παραπέμψτε τον ασθενή σε κάποιον ειδικό ή σε κάποιο πρόγραμμα.

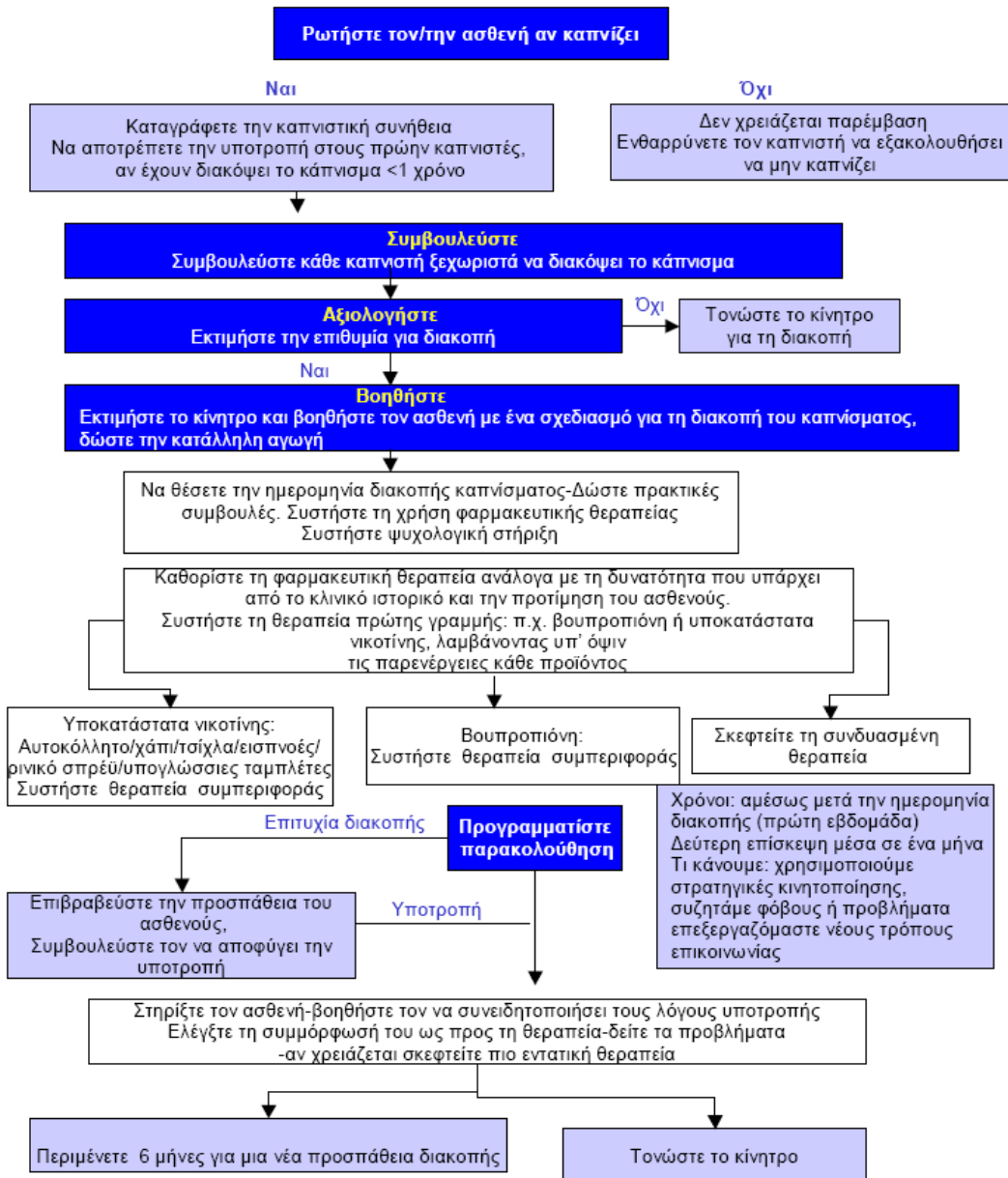
### *5. Μείωση των κινήτρων/συμπτώματα στέρησης*

- Διαβεβαιώστε τον ασθενή ότι αυτά τα συναισθήματα είναι συνηθισμένα.
- Υποδείξτε δραστηριότητες επιβράβευσης.
- Διασφαλίστε ότι ο ασθενής δεν καπνίζει περιστασιακά.
- Δώστε έμφαση στο γεγονός ότι αρχίζοντας το κάπνισμα ξανά (ακόμη και μια ρουφηξιά) θα αυξηθεί η επιθυμία για κάπνισμα και η προσπάθεια διακοπής του καπνίσματος θα γίνει πιο δύσκολη.



## Σχήμα 2

Αλγόριθμος προτεινόμενων βημάτων για τη διακοπή του καπνίσματος και για τις παρεμβάσεις πρώτης γραμμής



## Βιβλιογραφία

1. Taylor T, Lader D, Bryant A, Keysee L, McDuff TJ, et al. Smoking-related behaviour and attitudes, 2005. London, ONS, 2006  
[www.statistics.gov.uk](http://www.statistics.gov.uk)
2. Owen N, Wakefield M, Roberts L, Esterman A. Stages of readiness to quit smoking: population prevalence and correlates. *Health Psychol* 1992; 11: 413-417
3. Tobacco Advisory Group, Royal College of Physicians. *Nicotine Addiction in Britain*. London, Royal College of Physicians, 2000
4. Department of Health and Human Services. The health benefits of smoking cessation: a report of the Surgeon General. Washington, D.C: Government Printing Office, 1990. (DHHS publication no. (CDC) 90-8416.)
5. Royal College of Physicians. *Nicotine addiction in Britain*. London: Royal College of Physicians, 2000
6. Hughes JR. The future of smoking cessation therapy in the United States. *Addiction* 1996; 91:1797-1802
7. Gritz ER, Nielsen IR, Brooks LA. Smoking cessation and gender: the influence of physiological, psychological and behavioural factors. *J Am Med Women's assoc* 1996; 51: 35-42
8. GOLD. Global Strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease NHLBI/WHO workshop report. National Institutes of Health. National Heart, Lung, and Blood Institute. 2000
9. A clinical practice guideline for treating tobacco use and dependence: A US Public Health Service report. *JAMA* 2000;283:3244-54.
10. Treating tobacco use and dependence: clinical practice guideline. Rockville (MD):US Department of Health and Human Services. Public Health Service, 2000 Jun
11. Anderson JE, Jorneby DE, Scott WJ and Fiore MC. Treating tobacco use and dependence: an evidence-based clinical practice guideline for tobacco cessation. *Chest* 2002;121 (3):932-941
12. The American Psychiatric Association Practice guidelines for the treatment of patients with nicotine dependence. *Am. J. Psychiatry* 1996;153 (suppl) S1-S31.

13. Raw M, McNeill A, West R. Smoking cessation guidelines for health professionals: a guide to effective smoking cessation interventions for the healthcare system. *Thorax* 1998; 53 Suppl 5 (Pt 1): S1-19.
14. West R, McNeill A, West R. Smoking cessation guidelines for health professionals: an update. Health Education authority. *Thorax* 2000; 55: 987-99
15. The smoking cessation clinical practice guideline. Panel and staff. The Agency for Health Care Policy and Research. *JAMA* 1996;275:1270-1280.
16. World Health Organisation (WHO). European partnership to reduce tobacco dependence: WHO evidence based recommendations on the treatment of tobacco dependence. Geneva: WHO, 2001 Jun
17. National Institute for Clinical Excellence (NICE). Guidance on the use of nicotine replacement therapy (NRT) and bupropion for smoking cessation. National Institute for Clinical Excellence Technology Appraisal Guidance No. 39, 2002 Apr. Available from URL: [www.nice.org.uk](http://www.nice.org.uk)
18. Silagy C, Lancaster T, Stead L, Mant D, Fowler G. Nicotine replacement therapy for smoking cessation (Cochrane Review). Available in the Cochrane Library [database on disk and CD ROM]. Updated quarterly. The Cochrane Collaboration; Issue 1. Oxford: Update Software, 2002

# Κεφάλαιο 5

## ΤΡΕΧΟΥΣΕΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΕΣ ΘΕΡΑΠΕΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗ ΔΙΑΚΟΠΗ ΤΟΥ ΚΑΠΝΙΣΜΑΤΟΣ

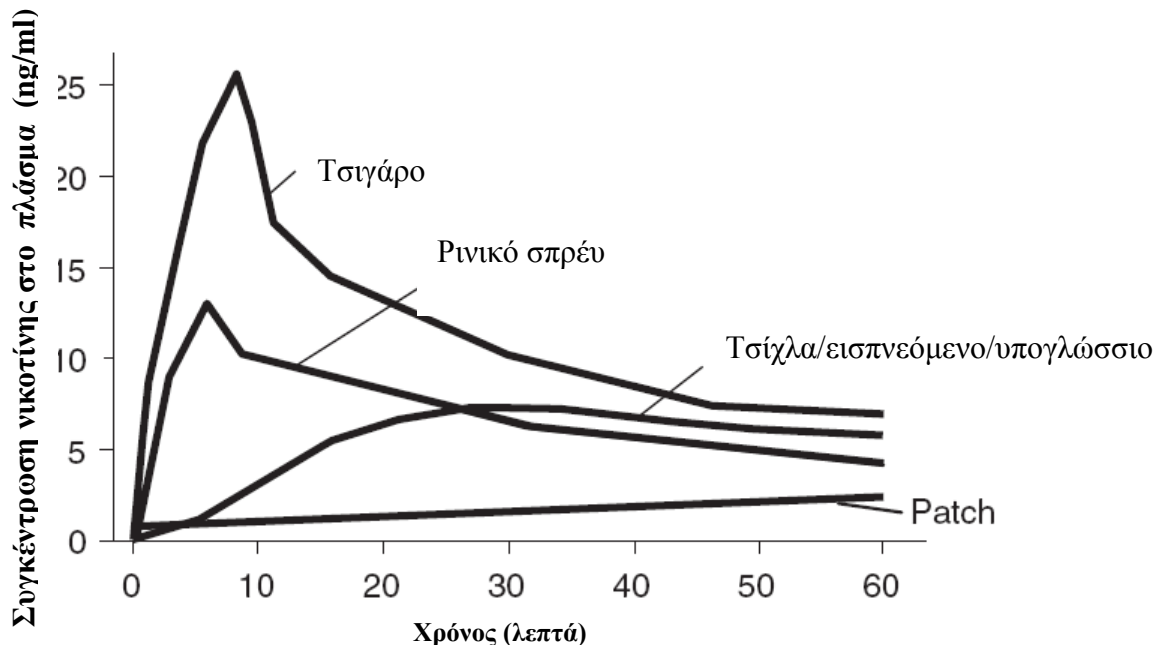
Η φαρμακευτική θεραπεία, όπως αναφέρθηκε, ιδιαίτερα όταν υποστηρίζεται και από συμβουλευτική της συμπεριφοράς, βελτιώνει τα μακροπρόθεσμα ποσοστά διακοπής, συγκρινόμενη με τη μη χορήγηση αγωγής ή με placebo (1-5). Ωστόσο, η πρόσβαση στη φαρμακευτική αγωγή ποικίλει στις διάφορες χώρες και, όπου είναι διαθέσιμη, μπορεί να αποτελέσει ένα σημαντικό συμπλήρωμα στην παρότρυνση για τη διακοπή του καπνίσματος και στην υποστήριξη των εξαρτημένων από τη νικοτίνη χρηστών. Οι καπνιστές 10 ή και περισσότερων τσιγάρων την ημέρα που είναι έτοιμοι να το διακόψουν, πρέπει να ενθαρρύνονται να χρησιμοποιήσουν τη φαρμακευτική αγωγή ως επιπλέον βοήθημα (6,7)

Έχουν εγκριθεί τρεις τύποι φαρμακοθεραπείας για να βοηθήσουν στη διακοπή του καπνίσματος: υποκατάστατα νικοτίνης, βουπροπιόνη, και βαρενικλίνη.

### Υποκατάστατα νικοτίνης

Τα υποκατάστατα νικοτίνης (NRT) δρουν μειώνοντας τη σοβαρότητα των συμπτωμάτων στέρησης, υποκαθιστώντας τη νικοτίνη στο αίμα. Παρέχουν στον καπνιστή μια μικρότερη, σχετικά ασφαλέστερη δόση νικοτίνης, που έχει αναφερθεί ότι αμβλύνει τα συμπτώματα στέρησης (Εικόνα 1). Αυτή η μείωση των συμπτωμάτων στέρησης, τα οποία προκαλούνται από τη διακοπή του καπνίσματος, βοηθά τους καπνιστές να αντισταθούν στην ανάγκη να καπνίσουν. Ευνοϊκά χαρακτηριστικά αυτών των φαρμάκων είναι το ότι είναι άμεσα διαθέσιμα, αποτελεσματικά, εύκολα στη χρήση και σχετικά φτηνά.

Όταν οι καπνιστές χρησιμοποιούν αυτά τα προϊόντα, πρέπει να σταματήσουν τελείως οποιαδήποτε χρήση καπνού, λόγω της πιθανής τοξικότητας από τη νικοτίνη. Τα υποκατάστατα νικοτίνης είναι διαθέσιμα σε πολλές μορφές, όπως τσίχλες, επιδερμικά αυτοκόλλητα (σε διάφορες δόσεις), ρινικά spray, εισπνεόμενα, και δισκία, αν και δεν είναι εγκεκριμένοι σε όλες τις χώρες όλοι οι τύποι υποκαταστάτων. Τα υποκατάστατα νικοτίνης αυξάνουν τις πιθανότητες διακοπής 1,5 με 2 φορές (2).



Εικόνα 1. Συγκέντρωση της νικοτίνης στο πλάσμα μετά από κάπνισμα ενός τσιγάρου, και μετά από τη χρήση διαφόρων υποκατάστατων νικοτίνης

### Γενικές αρχές χρήσης των υποκατάστατων νικοτίνης

Έναρξη των υποκατάστατων νικοτίνης την προκαθορισμένη ημέρα διακοπής, αν και το διαδερμικό αυτοκόλλητο πρέπει να τοποθετηθεί την προηγούμενη νύχτα, καθώς απαιτούνται κάποιες ώρες, για να επιτευχθούν σταθερά επίπεδα νικοτίνης. Οι ασθενείς που λαμβάνουν υποκατάστατα νικοτίνης έχουν χαμηλότερα επίπεδα νικοτίνης στον οργανισμό τους από αυτά που επιτυγχάνονται με το κάπνισμα. Χρησιμοποίηση μιας αρκετά υψηλής δόσης για την αντιμετώπιση των συμπτωμάτων στέρησης. Συνταγογράφηση δοσολογίας για δύο εβδομάδες θεραπεία, ώστε να υπάρχει η δυνατότητα παροχής υποστήριξης στο επόμενο προκαθορισμένο ραντεβού παρακολούθησης και επανασυνταγογράφησης. Συνταγογράφηση πλήρους δόσης για 6-8 εβδομάδες και κατόπιν διακοπή ή σταδιακή μείωση της δόσης μέσα σε 4 εβδομάδες. Δεν υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι κάποια μορφή είναι καλύτερη από την άλλη, επομένως η επιλογή μπορεί να καθορισθεί από την προτίμηση του ασθενούς.

### *Τσίχλες νικοτίνης*

Περίπου το 17% των καπνιστών που χρησιμοποιούν τσίχλες νικοτίνης παραμένουν σε αποχή 12 μήνες αργότερα. Οι ανεπιθύμητες ενέργειες από την τσίχλα νικοτίνης περιλαμβάνουν τις γαστρεντερικές διαταραχές και το άλγος οδόντων. Οι ασθενείς με τεχνητές οδοντοστοιχίες ίσως δεν μπορούν να χρησιμοποιήσουν τις τσίχλες νικοτίνης. Εκπαίδευση των ασθενών στο «μάσα και σταμάτα». (Μάσηση της τσίχλας ώσπου η γεύση να γίνει δυνατή, κατόπιν σταμάτημα και κράτημα της τσίχλας και τέλος μάσηση και πάλι όταν η γεύση εξασθενήσει. Η απορρόφηση της νικοτίνης από την τσίχλα ίσως είναι ανεπαρκής όταν λαμβάνεται ταυτόχρονα με καφέ ή όξινα ποτά.

### *Διαδερμικά αυτοκόλλητα*

Τα διαδερμικά αυτοκόλλητα είναι διαθέσιμα σε ποικίλες μορφές και μεγέθη, μπορούν να τοποθετηθούν για 16 ή 24 ώρες και χορηγούν στον οργανισμό 7-22mg νικοτίνης, ανάλογα με το αυτοκόλλητο που τοποθετείται. Τα αυτοκόλλητα υψηλής δόσης (44mg) είναι περισσότερο αποτελεσματικά στους βαρείς καπνιστές. Τα αυτοκόλλητα είναι σχεδιασμένα ώστε να παρέχουν μια αργή, σταθερή αποδέσμευση της νικοτίνης κατά τη διάρκεια της μέρας. Οι συνήθεις ανεπιθύμητες ενέργειες περιλαμβάνουν τον ερεθισμό και την αλλεργική αντίδραση του δέρματος.

### *Ρινικό εκνέφωμα νικοτίνης*

Η χρήση των ρινικών spray και των εισπνεόμενων νικοτίνης σχεδόν διπλασιάζουν τις πιθανότητες διακοπής του καπνίσματος (2). Το ρινικό spray νικοτίνης πιθανόν μιμείται περισσότερο τη φαρμακοκινητική της νικοτίνης που λαμβάνεται μέσω του τσιγάρου, από ότι οι άλλοι τύποι υποκατάστατων νικοτίνης. Οι ανεπιθύμητες ενέργειες περιλαμβάνουν το ρινικό και φαρυγγικό ερεθισμό, τον βήχα και το αίσθημα καύσου του στοματικού βλεννογόνου.

### *Υπογλώσσια δισκία και ταμπλέτες νικοτίνης*

Με τα δισκία νικοτίνης τα ποσοστά διακοπής κυμαίνονται στο 17% μετά από 12 μήνες (2). Τα δισκία νικοτίνης παρέχουν στον οργανισμό δόση 2 ή 4mg νικοτίνης σε διάστημα 30 λεπτών. Οι ανεπιθύμητες ενέργειες περιλαμβάνουν: αίσθημα καύσου στο στόμα, φαρυγγαλγία, βήχα, ξηρά χείλη και έλκη του στοματικού βλεννογόνου.

## **Βουπροπιόνη**

Η βουπροπιόνη είναι ένα άτυπο αντικαταθλιπτικό, το οποίο μειώνει την ανάγκη καπνίσματος και τη σοβαρότητα των συμπτωμάτων στέρησης από τον καπνό. Η προσπάθεια διακοπής ξεκινά μία εβδομάδα μετά την έναρξη της φαρμακευτικής αγωγής (9). Η βουπροπιόνη διπλασιάζει τις πιθανότητες διακοπής του καπνίσματος (το μέσο ποσοστό διακοπής αγγίζει το 19% έναντι του 10% της ομάδας ελέγχου) (9). Η βουπροπιόνη έχει φανεί αποτελεσματική σε ευρύ φάσμα πληθυσμού, συμπεριλαμβανομένων και των καπνιστών με χρόνιες νόσους, όπως καρδιαγγειακή νόσος και χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (10). Παρόλο που υπάρχουν ανεπαρκείς ενδείξεις ότι η βουπροπιόνη προστιθέμενη στα υποκατάστατα νικοτίνης παρέχει συμπληρωματικά μακροπρόθεσμο όφελος, είναι λογικό να συνδυάζονται αυτά τα δύο, εάν η μεγαλύτερη επιτρεπόμενη δόση ενός εκ των δύο δεν είναι αποτελεσματική (11).

Η βουπροπιόνη συνταγογραφείται ως βουπροπιόνη SR 150mg δύο φορές την ημέρα (χρησιμοποιείται μειωμένη δόση 150mg ημερησίως σε ηλικιωμένους και σε ασθενείς με ηπατική ή νεφρική ανεπάρκεια). Η βουπροπιόνη σχεδόν διπλασιάζει τα ποσοστά διακοπής συγκρινόμενη με το placebo στους 6 ή 12 μήνες παρακολούθησης των ασθενών (9). Το 7-12% των καπνιστών δεν ανέχονται τις ανεπιθύμητες ενέργειες και σταματούν την αγωγή. Οι συνήθεις ανεπιθύμητες ενέργειες είναι η αϋπνία (>30%), η ξηροστομία (10-15%), η κεφαλαλγία (10%), η ναυτία (10%), η δυσκοιλιότητα (10%) και η ευερεθιστότητα (5-10%). Περίπου 1/1000 ασθενείς εμφανίζουν ένα επεισόδιο σπασμών με τη βουπροπιόνη, συνεπώς αντενδείκνυται σε ασθενείς με επιληψία, με ιστορικό επιληψίας, ή σε άτομα υψηλού κινδύνου για επιληψία (10). Η βουπροπιόνη αντενδείκνυται επίσης σε άτομα με νευρογενή ανορεξία, με βουλιμία, με διπολική διαταραχή ή με σοβαρή ηπατική νόσο (10). Η βουπροπιόνη αλληλ επιδρά με πολλά ευρείας χρήσης φάρμακα, όπως αντικαταθλιπτικά, αντιψυχωσικά και αντιαρρυθμικά (10).

## **Νορτριπτυλίνη**

Η νορτριπτυλίνη είναι ένα τρικυκλικό αντικαταθλιπτικό, το οποίο χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της κατάθλιψης από το 1960. Δεν είναι

εγκεκριμένο για να χρησιμοποιείται στη θεραπεία διακοπής του καπνίσματος. Όμως, σε δόσεις 75mg ημερησίως (μικρότερη δόση σε ηλικιωμένους ή εφήβους) έχει αναδειχθεί ότι αυξάνει τα ποσοστά διακοπής 7 έως 17% συγκρινόμενη με το placebo (NNT=10),(9) και μπορεί να αποτελέσει μια λύση στις χώρες όπου το κόστος των εγκεκριμένων φαρμάκων για τη διακοπή του καπνίσματος είναι απαγορευτικό. Οι αναγνωρισμένες ανεπιθύμητες ενέργειες περιλαμβάνουν: υπνηλία, ξηροστομία, ζάλη και κίνδυνο καρδιακής αρρυθμίας. Το πρόσφατο οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου αποτελεί αντένδειξη. Η ημερομηνία διακοπής θα πρέπει να συμφωνηθεί κατά τη διάρκεια της 2ης εβδομάδας θεραπείας, συνήθως θεραπεία 7 έως 12 εβδομάδων, χωρίς να απαιτείται μείωση της δόσης (10,12).

### **Βαρενικλίνη**

Η βαρενικλίνη είναι ένας εκλεκτικός μερικός αγωνιστής των άλφα-4-βητα-2 νικοτινικών υποδοχέων της ακετυλοχολίνης, η οποία δρα μειώνοντας την επιθυμία του ασθενούς να καπνίσει, αλλά και ανακουφίζοντας πολλά από τα συμπτώματα στέρησης της νικοτίνης. Εάν κάποιος καπνίσει, ενώ λαμβάνει αγωγή, το φάρμακο έχει τη δύναμη να μειώσει την αίσθηση ικανοποίησης που συνδυάζεται με το κάπνισμα. Η βαρενικλίνη έχει αποδειχθεί σημαντικά πιο δραστική σε σχέση με το placebo στην μακροπρόθεσμη αποχή από το κάπνισμα, με μέσο ποσοστό διακοπής 21,4% συγκρινόμενο με το 8% της ομάδας ελέγχου.(13-17). Τα ποσοστά διακοπής για τη βαρενικλίνη και τα υποκατάστατα νικοτίνης είναι παρόμοια μετά από ένα χρόνο. Αλλά σε συγκριτικές μελέτες η βαρενικλίνη σχετίζεται με υψηλότερα ποσοστά διακοπής από τη βουπροπιόνη (5).

Οι συνήθεις ανεπιθύμητες ενέργειες περιλαμβάνουν: ναυτία (>30%), αϋπνία (14%), εφιάλτες (13%), κεφαλαλγία (13%), δυσκοιλιότητα (9%), φύσες (έξοδος αερίων από το ορθό) (6%), και έμετοι (5%). Η βαρενικλίνη δεν πρέπει να χρησιμοποιείται στην εγκυμοσύνη. Δοσολογία: Μία εβδομάδα πριν την ημερομηνία διακοπής λαμβάνουν 0,5mg ημερησίως για τρεις ημέρες, 0,5mg δύο φορές την ημέρα για τέσσερις ημέρες και κατόπιν μετά από την ημερομηνία διακοπής λαμβάνουν 1mg δύο φορές την ημέρα για δώδεκα εβδομάδες.



Η βαρενικλίνη είναι καινούργιο φάρμακο και συνεπώς είναι πολύ νωρίς για να αξιολογηθούν οι ανεπιθύμητες ενέργειες. Οι ασθενείς που λαμβάνουν αυτό το φάρμακο θα πρέπει να παρακολουθούνται προσεκτικά.

## Βιβλιογραφία:

1. Fiore MC, Bailey WC, Cohen SJ, et al. *Treating tobacco use and dependence*. Rockville: US Department of Health and Human Services, Public Health Service;2000
2. Silagy C, Lancaster T, Stead L, et al. Nicotine replacement therapy for smoking cessation. *Cochrane Database Systematic Reviews* 2004; 3:CD000146
3. Lancaster T, Stead LF. Individual behavioural counselling for smoking cessation *Cochrane Database Systematic Reviews* 2005; 2:CD001292
4. Ranney L, Melvin C, Lux L, et al. Systematic review: smoking cessation intervention strategies for adults and adults in special populations. *Ann Intern Med* 2006; 145: 845-856
5. Wu P, Wilson K, Dimoulas P, et al. Effectiveness of smoking cessation therapies: a systematic review and meta-analysis. *BMC Public Health* 2006; 6: 300
6. WHO European Partnership Project to Reduce Tobacco Dependence. *WHO Evidence Based Recommendations on the Treatment of Tobacco Dependence*. Copenhagen. WHO.2001.  
<http://www.euro.who.int/document/e73285.pdf>
7. Aveyard P, West R. Managing smoking cessation. *BMJ* 2007;335;37-41
8. Molyneux A. Nicotine replacement therapy. *BMJ* 2004; 328; 454-4
9. Hughes J, Stead L, Lancaster T. Antidepressants for smoking cessation. *Cochrane Database Systematic Reviews* 2007; 1:CD000031
10. Roddy E. Bupropion and other non-nicotine pharmacotherapies. *BMJ* 2004; 328:509-511
11. Foulds J, Steinberg MB, Williams JM, Ziedonis DM. Developments in pharmacotherapy for tobacco dependence: past, present and future. *Drug Alcohol Rev.* 2006; 25: 59-71
12. Henrichsen SH. *Helping patients quit smoking: brief interventions for healthcare professionals*. IPCRG Opinion 3. [www.theipcrq.org](http://www.theipcrq.org)
13. Cahill K, Stead L, Lancaster T. Nicotine receptor partial agonists for smoking cessation. *Cochrane Database Syst Rev* 2007; Issue 1. Art. No.: CD006103. DOI: **10.1002/14651858.CD006103.pub2**

14. Oncken C, Gonzales D, Nides M, et al. Efficacy and safety of the novel selective nicotinic acetylcholine receptor partial agonist, varenicline, for smoking cessation. *Arch Intern Med* 2006; 166: 1571-1577
15. Nides M, Oncken C, Gonzales D, et al. Smoking cessation with varenicline, a selective alpha4beta2 nicotinic receptor partial agonist: results from a 7-week, randomized, placebo- and bupropion-controlled trial with 1-year follow-up. *Arch Intern Med* 2006; 166: 1561-1568
16. Jorenby DE, Hays JT, Rigotti NA, et al. Efficacy of varenicline, an alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptor partial agonist, vs placebo or sustained release bupropion for smoking cessation: a randomized controlled trial. *JAMA* 2006; 296:56- 63.
17. Gonzales D, Rennard SI, Nides M, et al. Varenicline, an alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptor partial agonist, vs sustained-release bupropion and placebo for smoking cessation: a randomized controlled trial. *JAMA* 2006; 296:47-55

## Κεφάλαιο 6

### ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ ΣΤΗ ΔΙΑΚΟΠΗ ΤΟΥ ΚΑΠΝΙΣΜΑΤΟΣ

Ο βελονισμός και η υπνοθεραπεία είναι συχνά διαφημιζόμενα σαν επιτυχή βοηθήματα στην διακοπή του καπνίσματος. Αμφισβητούμενα, κάποιοι ιατροί είναι ενθουσιώδεις υποστηρικτές μιας ή και των δυο εναλλακτικών θεραπειών, αν και τρεχόντως δεν υπάρχει απόδειξη που να υποστηρίζει μια από τις δύο προσεγγίσεις. Ο βελονισμός είναι μια παραδοσιακή Κινέζικη θεραπεία στηριζόμενη στην χρήση βελόνων που διεγείρουν ειδικά σημεία του σώματος. Έχει γίνει αντικείμενο ενός αριθμού μελετών ομάδα ελέγχου, και δυο μετααναλύσεις έχουν σαν απολογισμό αυτά τα συμπεράσματα (1,2). Αυτές οι ανασκοπήσεις βρήκαν ότι δεν υπάρχει λογικά σύμφωνη ένδειξη ότι ο βελονισμός ή οι σχετικές τεχνικές αύξησαν τον αριθμό των ατόμων που θα μπορούσαν επιτυχώς να διακόψουν το κάπνισμα. Ειδικά δεν υπήρξε διαφορά στην διακοπή, σε μελέτες που συγκρίνανε τον ενεργό βελονισμό με τον ανενεργό. Οι κριτικοί είπαν ότι σίγουρα αποτελέσματα δε θα μπορούσαν να εξαχθούν από τις μελέτες τους λόγω μεθοδολογικών προβλημάτων και ότι χρειαζόνταν περισσότερη έρευνα σε αυτό το πεδίο. Η συνολική ποιότητα των αναλυόμενων μελετών θεωρήθηκε φτωχή από τους αναλυτές. Οι συνδυασμένοι λόγοι πιθανοφάνειας για την διακοπή του καπνίσματος μετά από 6 μήνες ήταν 1,29 και μετά 12 μήνες ήταν 1,03 (2).

Υπάρχουν πολλοί διαφορετικοί τύποι υπνοθεραπείας; Μερικοί προσπαθούν να αποδυναμώσουν την επιθυμία των ανθρώπων για κάπνισμα, να ενδυναμώσουν την θέληση τους στην διακοπή ή να βοηθήσουν αυτούς να συγκεντρωθούν σε ένα πρόγραμμα διακοπής. Αν και μερικές uncontrolled μελέτες έχουν ισχυριστεί όφελος, μια συστηματική ανασκόπηση στην Cochrane κατέληξε ότι σε ελεγχόμενες μελέτες η υπνοθεραπεία δεν δείχνει ένα καλύτερο αποτέλεσμα στα ποσοστά διακοπής στους 6 μήνες από το αποτέλεσμα που προκύπτει χωρίς θεραπεία (3).

### **Βιβλιογραφία:**

1. White A, Resch KL, Ernst E. A meta-analysis of acupuncture techniques for smoking cessation. *Tob Control* 1999; 8: 393-397
2. White AR, Rampes H, Campbell JL. Acupuncture and related interventions for smoking cessation. *Cochrane Database of Systematic Reviews Art. No.:*CD000009.DOI: **10.1002/14651858.CD000009.pub2**
3. Abbot, Stead LF, White AR, Barnes J. Hypnotherapy for smoking cessation. Art. No.:CD001008. DOI: **10.1002/14651858.CD001008**

**ΕΝΟΤΗΤΑ ΙΙΙ**  
**Η ΤΕΧΝΗΤΗ ΠΡΟΚΛΗΣΗ**  
**ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΠΤΥΕΛΩΝ ΚΑΙ**  
**ΛΗΨΗ ΡΙΝΙΚΟΥ**  
**ΕΚΠΛΥΜΑΤΟΣ**

## ΠΡΟΚΛΗΣΗ ΠΤΥΕΛΩΝ

### *Εισαγωγή*

Η δυνατότητα μελέτης της φλεγμονής των αεραγωγών άλλαξε σημαντικά με την ανάπτυξη της τεχνικής της πρόκλησης πτυέλων ως ένα ερευνητικό και ολοένα αυξανόμενο κλινικό εργαλείο. Αν και ήταν γνωστό από δεκαετίες ότι τα πτύελα που παράγονταν αυθόρμητα από ασθματικά άτομα περιλαμβάνουν πολυάριθμα ηωσινόφιλα, μόλις πρόσφατα έγιναν προσπάθειες εγκυρότητας και τυποποίησης για τη χρήση του προκλητού πτυέλου με τη χρήση υπέρτονου φυσιολογικού ορού ως εργαλείο μελέτης φλεγμονοδών συμβαμάτων στον πνεύμονα. 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 (1). Αργότερα τα προκληθέντα πτύελα χρησιμοποιήθηκαν κλινικά για την ανίχνευση διάφορων παθογόνων μικροοργανισμών (2-4). Από την πρώτη περιγραφή μιας τυποποιημένης μεθόδου το 1992 από τους Pin et al (5) έχει σημειωθεί μια εντυπωσιακή αύξηση στον αριθμό εργασιών, στις οποίες οι ερευνητές έχουν χρησιμοποιήσει προκλητά πτύελα για να μελετήσουν τη φλεγμονή των αεραγωγών, με επίκεντρο αρχικά στο βρογχικό άσθμα και με επέκταση πιο πρόσφατα στη χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ).

Η μέτρηση φλεγμονωδών μεσολαβητών στα προκλητά πτύελα παρέχει μια άμεση μέθοδο για τη διερεύνηση της φλεγμονής των αεραγωγών σε διάφορες αναπνευστικές παθήσεις. Η πρόκληση για την παραγωγή πτυέλων επιτρέπει τη συλλογή επαρκών δειγμάτων των εκκρίσεων από τους αεραγωγούς για την εκτίμηση της φλεγμονής των αεραγωγών σε άτομα που δεν μπορούν να παράγουν πτύελα αυτόματα. Μάλιστα φαίνεται ότι τα προκλητά πτύελα περιέχουν μεγαλύτερη αναλογία ζωντανών κυττάρων από ότι τα αυτόματα πτύελα (6).

Οι μέθοδοι εξέτασης των πτυέλων ποικίλουν και εξελίσσονται. Υπάρχει ανάγκη για βελτίωση και τυποποίηση τους, ώστε τα αποτελέσματα από διαφορετικές μελέτες να μπορούν να εκτιμηθούν και να συγκριθούν ορθά.

## Μεθοδολογία

Η διαδικασία της πρόκλησης πτυέλων επιτυγχάνεται με την εισπνοή υπέρτονου διαλύματος χλωριούχου νατρίου. Το υπέρτονο διάλυμα έχει αναφερθεί ότι είναι πιο αποτελεσματικό από το ισότονο (7). Νεφελοποιητές υπερήχων συνιστώνται για τη πρόκληση πτυέλων, αφού οι άλλοι νεφελοποιητές συνήθως δεν παράγουν αρκετό εναιώρημα φυσιολογικού ορού. Ο συγκεκριμένος μηχανισμός με τον οποίο η εισπνοή του υπέρτονου εναιωρήματος προκαλεί παραγωγή πτυέλων δεν έχει διευκρινιστεί. Πιθανές ερμηνείες που προτείνονται είναι οι οσμωτικές ιδιότητες του νεφελώματος, η αύξηση της βλεννοκροσσωτής κάθαρσης, καθώς και μία αύξηση στη διέγερση των αδενικών κυττάρων (8-11). Απαραίτητη θεωρείται η σπιρομέτρηση για την εκτίμηση για την εκτίμηση ενός λειτουργικού ελέγχου αναπνευστικού αναφοράς (baseline) και αποφυγή υπερβολικού βρογχόσπασμου κατά την εισπνοή φυσιολογικού ορού. Η πρόκληση πτυέλων απαιτεί ικανοποιητική συνεργασία από τον ασθενή. Λόγω της σχετικής επεμβατικότητας της μεθόδου είναι αναγκαίος ο εξοπλισμός του εργαστηρίου με βρογχοδιασταλτικά, με συσκευές χορήγησης οξυγόνου καθώς και με εξοπλισμό ανάνηψης. Η διαδικασία θα πρέπει να διεξάγεται από ένα έμπειρο τεχνικό υπό την επίβλεψη ενός έμπειρου κλινικού (12).

Υπάρχει μια διαφωνία 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 (13,14). 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 οι συνεργάτες προτείνουν την ισόχρονη εισπνοή διαδοχικά αυξανόμενων συγκεντρώσεων υπέρτονου εναιωρήματος (3%, 4%, 5%) (5,15). 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%) (16). 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 (17).

Πριν την έναρξη της διαδικασίας πραγματοποιείται λειτουργικός έλεγχος του αναπνευστικού με καταγραφή του δυναμικά εκπνεόμενου όγκου αέρα στο πρώτο δευτερόλεπτο (FEV<sub>1</sub>). Επειδή το υπέρτονο διάλυμα NaCl προκαλεί βρογχόσπασμο σε ασθματικά άτομα (17), συνιστάται εισπνοή β<sub>2</sub>-διεγέρτη βραχείας δράσης (σαλβουταμόλη) με δοσιμετρική συσκευή εισπνοών (200μg) ως προτυποποιημένη διαδικασία (5,12,19). Έχει αποδειχθεί ότι η χορήγηση β<sub>2</sub> αγωνιστή πριν την έναρξη της διαδικασίας δεν επηρεάζει τους παράγοντες της φλεγμονής στο δείγμα του πτυέλου (16). Στη συνέχεια ακολουθεί η διαδικασία της πρόκλησης. Ο ασθενής εισπνέει αρχικά φυσιολογικό διάλυμα NaCl για περιόδους διάρκειας μέχρι 10 λεπτά. Η συγκέντρωση του εισπνεόμενου διαλύματος αυξάνεται σε κάθε συνεδρία από 3% σε 4% και σε 5%. Πάντα ανάμεσα στις συνεδρίες η διαδικασία διακόπτεται και τα άτομα παρακαλούνται να φυσήξουν τη μύτη τους, να ξεπλύνουν το στόμα τους και να προσπαθήσουν να αποβάλουν τα πτύελα σε αποστειρωμένο δοχείο. Με την απόχρεμψη, γίνεται ανάμιξη με σίελο που αποτελείται κυρίως από υγρό, πλακώδη επιθηλιακά κύτταρα και βακτήρια του στοματοφάρυγγα. Για την ελαχιστοποίηση της πρόσμιξης με σίελο, προτείνεται το ξέπλυμα του στόματος με νερό πριν από κάθε απόχρεμψη. Επειδή μη πλακώδη κύτταρα μπορούν επίσης να προέλθουν από οπισθορινική έκκριση, η πιθανότητα αυτή ελαχιστοποιείται με το να ζητηθεί στα άτομα να φυσήξουν τη μύτη τους πριν από κάθε απόχρεμψη (20). 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. Μεταξύ των συνεδριών επίσης εκτελείται σπιρομέτρηση για την ανίχνευση αξιοσημείωτης πτώσης στην FEV<sub>1</sub>. Η διαδικασία σταματάει όταν συλλέγεται επαρκής ποσότητα πτυέλων (περίπου 1g βύσματος) ή αν επιβαρυντικά συμπτώματα παρουσιαστούν ή αν

η FEV<sub>1</sub> πέσει κάτω από 20% από τη βασική τιμή που καταγράφηκε στην αρχή.

Αξίζει να σημειωθεί ότι η δειγματοληψία γίνεται από διαφορετικά τμήματα του αναπνευστικού συστήματος σε διάφορα χρονικά σημεία κατά τη διάρκεια της πρόκλησης, π.χ. η δειγματοληψία από τους κεντρικούς αεραγωγούς γίνεται νωρίς, ενώ από τους περιφερικούς αεραγωγούς και τις κυψελίδες αργότερα. Μικρότερη διάρκεια εισπνοής του διαλύματος (15-20 λεπτά) φαίνεται να είναι πραγματοποιήσιμη και να έχει ποσοστά επιτυχίας όμοια με αυτά μεγαλύτερων χρόνων εισπνοής (30 λεπτά). Υπάρχει ομοφωνία για τη διάρκεια της χρήσης του νεφελοποιητή στα 15-20 λεπτά (12).

### *Επεξεργασία των πτυέλων*

Τα πτύελα θα πρέπει να επεξεργαστούν μέσα στα επόμενα 30 λεπτά αλλά όχι περισσότερο από 2 ώρες, και το δείγμα διατηρείται στο ψυγείο. Ο όγκος του δείγματος υπολογίζεται και δείγματα πτυέλων με όγκο τουλάχιστον 2 mL θεωρούνται επαρκή. Σε κάποια εργαστήρια πραγματοποιείται επεξεργασία ολόκληρου του δείγματος του πτυέλου, τεχνική που χρησιμοποιείται από τον Fahy και τους συνεργάτες του (21). Άλλοι ερευνητές προτιμούν να συλλέγουν και να αναλύουν τα βύσματα των πτυέλων όπως περιγράφεται από τους Pin και συν (5). 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 (22,23).

Μετά τη διαλογή και το ζύγισμα των βυσμάτων, προστίθεται διθειοθρεϊτόλη (DTT) και ρυθμιστικό διάλυμα Dulbecco's phosphate(D-PBS). Το DDT είναι αναγωγικό μέσο με δυνατότητα επηρεασμού της κυτταρικής βιωσιμότητας, των φλεγμονωδών παραγόντων και διαλυτών μεσολαβητών (16), γεγονός που πρέπει να λαμβάνεται υπόψη. Έπειτα το μείγμα φιλτράρεται και φυγοκεντρείται. Το υπερκείμενο αναρροφάται και καταψύχεται στους -80°C για να αναλυθεί αργότερα. Το κυτταρικό ίζημα ξαναδιαλύεται με D-PBS και με 10% HAS (Human serum albumin - αλβουμίνη ανθρώπινου ορού). Ο ολικός κυτταρικός πληθυσμός του διηθούμενου δείγματος

υπολογίζεται πάντα και συνήθως πριν τη φυγοκέντρωση και η βιωσιμότητα ελέγχεται μέσω μεθόδου αποκλεισμού του trypan blue (24). Αν η κυτταρική βιωσιμότητα είναι χαμηλότερη από 50% και/ή η επιμόλυνση με πλακώδη κύτταρα είναι πάνω από 20%, το δείγμα δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί, λόγω της μη αναπαραγωσιμότητας των αποτελεσμάτων (25). Τα εναιωρήματα των κυττάρων φυλάσσονται σε errendorf κύπελλα. Τα κυτταρικά πλακάκια επίσης ετοιμάζονται. Και τα δύο διατηρούνται στους  $-80^{\circ}\text{C}$  για να γίνει η επεξεργασία αργότερα. Ο διαχωρισμός των κυττάρων συνήθως εκτελείται σε κυτταρικά δείγματα χρωσμένα με May-Grunwald Giemsa, αποκλείοντας τα πλακώδη επιθηλιακά κύτταρα.

#### *Επαναληψιμότητα*

Τα πτύελα, που ορίζονται ως οι εκκρίσεις του κατώτερου αναπνευστικού που παράγονται με την απόχρεμψη, αποτελούνται από υγρό και κυτταρικά συστατικά, περιλαμβάνοντας μακροφάγα, επιθηλιακά κύτταρα των βρόγχων και φλεγμονώδη κύτταρα (26). Οι μετρήσεις των κυττάρων αυτών μας δίνουν πολλές πληροφορίες, ιδιαίτερα όταν η βιωσιμότητα των κυττάρων είναι υψηλή και η επιμόλυνση με επιθηλιακά κύτταρα διατηρείται σε χαμηλά επίπεδα (27,28). Η επαναληψιμότητα της μεθόδου έχει αναφερθεί σε δείγματα πτυέλων που πάρθηκαν από τον ίδιο ασθενή σε διαφορετικές μέρες (29-31). Όμως κάποιοι ερευνητές υποστηρίζουν ότι τα διαδοχικά δείγματα προκλητών πτυέλων διαφέρουν στην κυτταρική τους σύνθεση (31,32). Σύμφωνα με τον Nightingale και συν. (32) παρατηρείται μια αύξηση του αριθμού και των ποσοστών των ουδετερόφιλων σε διαδοχικά δείγματα προκλητών πτυέλων που πάρθηκαν από υγιείς εθελοντές μέσα σε 8 ή 24 ώρες, η οποία πιθανά οφείλεται στην φλεγμονώδη αντίδραση των αεραγωγών που προκαλείται από την διαδικασία της πρόκλησης των πτυέλων. Επίσης υπάρχουν αποδείξεις από μελέτες τόσο σε υγιείς όσο και σε ασθματικούς, ότι η υψηλή συγκέντρωση σιέλου προκαλεί αύξηση των ουδετεροφίλων στους αεραγωγούς (33,34). Αξίζει βέβαια να σημειωθεί ότι, όπως προαναφέρθηκε, τα αρχικά δείγματα των προκλητών πτυέλων αντιπροσωπεύουν υλικό που λαμβάνεται από τους κεντρικούς αεραγωγούς, ενώ υπόλοιπα δείγματα αντιπροσωπεύουν συστατικά των περιφερικών αεραγωγών.

### *Ασφάλεια*

Η πρόκληση πτυέλων με νεφελοποιητή υπέρτονου διαλύματος έχει βρεθεί να είναι ασφαλής και καλά ανεκτή και αξιόπιστη μέθοδος ανίχνευσης μεταβολών στη φλεγμονή των αεραγωγών, εφόσον εκτελείται ανά 48 ώρες για να είναι και αναπαραγώγιμη (36). Όμως η υπερτονικότητα του διαλύματος, το ποσό του εισπνεόμενου αέρα και ο ρυθμός μεταφοράς του επηρεάζουν την πιθανότητα πρόκλησης σύσπασης των λείων μυϊκών ινών βρόγχων (16, 36), τεκμηριώνεται βέβαια από λίγες μελέτες (37,38). 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 (39-41). Λόγω των παραπάνω επιβάλλεται η πραγματοποίηση της 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 (17).

### *Σύγκριση με άλλες τεχνικές*

Κύριες πηγές πληροφοριών σχετικά με την φλεγμονή των αεραγωγών αποτελούν τα πτύελα (αυτόματα ή προκλητά παραγόμενα), το βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (BALF) και οι βρογχικές βιοψίες. 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. Μια άλλη μέθοδος που χρησιμοποιείται για συλλογή εκκρίσεων του αναπνευστικού, το BAL, επιτρέπει συλλογή από τους περιφερικούς αεραγωγούς, αλλά είναι πιο επίπονη μέθοδος και ακατάλληλη για συχνές μελέτες στο ίδιο άτομο (42). Φαίνεται να υπάρχει ποιοτική διαφορά μεταξύ των προκλητών πτυέλων και του BAL στο ότι τα πτύελα είναι ένα μέσο

πλουσιότερο σε ηωσινόφιλα και ουδετερόφιλα, και φτωχότερο σε λεμφοκύτταρα και μακροφάγα από ότι στην BAL (43). Προηγηθείσες προσπάθειες μέτρησης φλεγμονωδών παραγόντων με βρογχιολιδικό έκπλυμα είχαν αποτύχει λόγω του μεγάλου όγκου ορού που χρειαζόταν για τη δειγματοληψία. Μάλιστα μελέτη έδειξε ότι το κάπνισμα δρα ως συγχυτικός παράγοντας στην ερμηνεία των δεδομένων του BAL. Ο αυξημένος όγκος υγρού της επιθηλιακής επιφάνειας στους καπνιστές επηρεάζει σημαντικά τις συγκεντρώσεις κυττάρων και πρωτεϊνών του υπό μελέτη πληθυσμού (44). Με την πρόκληση πτυέλων αυτό το πρόβλημα αποφεύγεται, τουλάχιστον όταν χρησιμοποιείται μικρός όγκος νεφελοποιημένου ορού (35). Ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι τα πτύελα έχουν μεγαλύτερη πυκνότητα, περισσότερα φλεγμονώδη κύτταρα και αυξημένους δείκτες φλεγμονής συγκριτικά με το βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (45).

## **ΛΗΨΗ ΡΙΝΙΚΟΥ ΕΚΠΛΥΜΑΤΟΣ**

Εκτός όμως από την πρόκληση πτυέλων, η μεταβολή της φλεγμονής των αεραγωγών μπορεί να εκτιμηθεί και από τη σύσταση του ρινικού εκπλύματος, λόγω ιστολογικής ομοιότητας του ρινικού βλεννογόνου με αυτό των βρόγχων (46), όπως φαίνεται σε κάποιες μελέτες συσχέτισης των πτυέλων με το ρινικό έκπλυμα σε αλλεργικές και φλεγμονώδεις διεργασίες. Οι μελέτες που υπάρχουν είναι περιορισμένες αλλά υποστηρίζουν ότι οι ρινικές και βρογχικές εκκρίσεις έχουν πολλές ομοιότητες στη σύστασή τους (47). Πρόσφατα βρέθηκε ότι συνυπάρχει φλεγμονή βρογχικού και ρινικού επιθηλίου στους καπνιστές (48). Το ρινικό έκκριμα περιέχει μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών, που θα μπορούσαν να αποτελέσουν ένα ισχυρό εργαλείο για την ανίχνευση και χαρακτηρισμό βιοχημικών μεταβολών που σχετίζονται με νόσους των αεραγωγών (49).

Σε αντίθεση με τις βρογχικές εκκρίσεις, οι ρινικές εκκρίσεις μπορούν να συγκεντρωθούν εύκολα και να παρέχουν ένα χρήσιμο θεμέλιο για τη εκτίμηση των εκκρίσεων των αεραγωγών (47). Το ρινικό έκπλυμα έχει χρησιμοποιηθεί για την μελέτη της φλεγμονώδους ανταπόκρισης του ανώτερων αεραγωγών. Είναι μια ασφαλής, καλά ανεκτή, χαμηλού κόστους τεχνική και μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μεγάλο αριθμό ατόμων (50).

Εν συντομία, δίνεται οδηγία στον ασθενή, που είναι σε καθιστή θέση να φέρει το πηγούνι του προς το στήθος του κατά 30<sup>0</sup> περίπου και να μην αναπνεύει από τη μύτη. Γίνεται ενστάλλαξη 5ml αλατούχου διαλύματος μέσω σύριγγας σε κάθε θαλάμη της μύτης, διάρκειας περίπου 10 δευτερολέπτων. Κατόπιν το έκπλυμα συλλέγεται με επαναλαμβανόμενες αναρροφήσεις και από τις δύο ρινικές κοιλότητες, διατηρείται σε πάγο, ζυγίζεται και επεξεργάζεται μέσα σε 1 ώρα (φυγοκέντρωση για 10 λεπτά στις 400 g και φύλαξη των υπερκειμένων στους -80<sup>0</sup>C μέχρι την ανάλυσή τους).

## Βιβλιογραφία:

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. Pin I, Gibson PG, Kolendowicz R, *et al.* Use of induced sputum cell counts to investigate airway inflammation in asthma. *Thorax* 1992;47:25–29.
6. Bhowmik A., Seemungal TA., Sapsford RJ., Devalia JL., Wedzicha JA. *Comparison of spontaneous and induced sputum for investigation of airway inflammation in chronic pulmonary disease.* *Thorax* 1998;53(11):953-6
7. Bartoli ML, Bacci E, Carnevali S, *et al.* Quality evaluation of samples obtained by spontaneous or induced sputum: comparison between two methods of processing and relationship with clinical and functional findings. *J Asthma* 2002;39(6):479-86.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. Paggiaro PL, Chanz P, Holtz O, et al. Sputum induction. *Eur Respir J* 2002;20(Suppl 37):3s-8s.
  13. Djukanovic R, Sterk PJ, Fahy JV, Hargreave FE. Standardised methodology of sputum induction and processing. *Eur Respir J Suppl* 2002;37:1s-2s.
  14. 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.
  15. redale 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.
  16. 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.
  17. Tsoumakidou M, Tzanakis N, Siafakas NM. Induced sputum in the investigation of airway inflammation of COPD. *Respiratory Journal* 2003;97:863-71
  18. Smith CM, Anderson SD. Inhalation provocation tests using nonisotonic aerosols. *J Allergy Clin Immunol* 1989;84(5 Pt 1):781-90.
  19. Wong HH, Fahy JV. Safety of one method of sputum induction in asthmatic subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156(1):299-303.
  20. 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
  21. 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
  22. 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.



23. 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.
24. Efthimiadis A, Hussack, P., Weston, S., et al. Induced sputum:effect of centrifugation on the total and differential cell counts. *Eur Respir* 2000;Abstract.
25. 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
26. Jayaram L., Parameswaran K., Sears M.R., Hargreave F.E. *Induced sputum cell counts: their usefulness in clinical practice*. *Eur Respir J* 2000;16:150-158
27. 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.
28. 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
29. 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.
30. 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.
31. Nightingale JA, Rogers DF, Barnes PJ. Effect of repeated sputum induction on cell counts in normal volunteers. *Thorax* 1998;53(2):87-90.
32. Pavord ID. Sputum induction to assess airway inflammation: is it an inflammatory stimulus? *Thorax* 1998;53(2):79-80.
33. 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.
34. 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.
35. Purokivi M., Randell J., Hirvonen M-R., Tukiainen H. *Reproducibility of measurements of exhaled NO, cell count and cytokine concentrations in induced sputum.* *Eur Respir J* 2000; 16: 242-246
36. 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
37. 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.
38. 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.
39. 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.
40. Ryttila PH, Lindqvist AE, Laitinen LA. Safety of sputum induction in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2000;15(6):1116-9.
41. 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
42. Lensmar C., Elmberger G., Skold M., Eklund A. *Smoking alters the phenotype of macrophages in induced sputum.* *Respiratory Medicine* 1998;92:415-420

43. Keatings V.M., Collins P.D., Scott D.M., Barnes P.J. *Differences in Interleukin-8 and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  in Induced Sputum from Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease or Asthma.* Am J Respir Crit Care Med 1996;153:530-534
44. Burke W.M.J., Roberts C.M., Bryant D.H., Cairns D., Yeates M. *Smoking-induced changes in epithelial lining fluid volume, cell density and protein.* Eur Respir J 1992;5:780-784
45. 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.
46. Purokivi M., Hirvonen M.R., Roponen M., Randell J., Vahteristo M. *Comparison of inflammatory elements in nasal lavage and induced sputum following occupational exposure to moldy-building microbes.* Inhalation Toxicology 2002;14:653-662
47. Cole A., Dewan P., Ganz T. *Innate Antimicrobial Activity of Nasal Secretions.* Infection and Immunity 1999;67:3267-3275
48. Vachier I., Vignola AM., Chiappara G., Bruno A., Meziane H. *Inflammatory features of nasal mucosa in smokers with and without COPD. (abstract).* Thorax 2004;59(4):303-7
49. Ghafouri B., Stahlborn B., Tagesson C., Lindahl M. *Newly identified proteins in human nasal lavage fluid from non-smokers and smokers using two-dimensional gel electrophoresis and peptide mass fingerprinting.* Proteomics 2002;2:112-120
50. Blaski C.A., Watt J.L., Quinn T.J., Thorne P.S., Scincarts D.A. *Nasal lavage Cellularity, Grain Dust, and Airflow Obstruction.* Chest 1996;109:1086-92

# **ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

**ΕΝΟΤΗΤΑ Ι**  
**ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΗ ΚΥΤΤΑΡΑ**  
**ΠΤΥΕΛΩΝ ΠΡΙΝ ΚΑΙ ΜΕΤΑ**  
**ΑΠΟ ΤΗ ΔΙΑΚΟΠΗ ΤΟΥ**  
**ΚΑΠΝΙΣΜΑΤΟΣ ΣΕ ΥΓΙΕΙΣ**  
**ΚΑΠΝΙΣΤΕΣ**

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Δεν υπάρχουν πολλά δεδομένα για τις μακροπρόθεσμες επιδράσεις της διακοπής του καπνίσματος στα φλεγμονώδη κύτταρα των πτυέλων. Ο σκοπός της μελέτης μας ήταν η διερεύνηση τυχόν αλλαγών στα φλεγμονώδη κύτταρα και στους υποπληθυσμούς των T-λεμφοκυττάρων των πτυέλων μετά από 6 και 12 μήνες από τη διακοπή του καπνίσματος. Πρόκληση πτυέλων έγινε σε 68 υγιείς καπνιστές ηλικίας  $49 \pm 8$  yrs (mean  $\pm$  SD), με ιστορικό καπνίσματος  $57 \pm 18$  pack years, και χωρίς προϋπάρχουσα αναπνευστική διαταραχή ή τρέχουσα αναπνευστική νόσο. Σε αυτούς που κατάφεραν να διακόψουν το κάπνισμα, επαναλήφθηκε η πρόκληση πτυέλων μετά από 6 μήνες (n=18/21) και μετά από 1 έτος (n=9/14). Δέκα υγιείς μη καπνιστές χρησίμευσαν ως μάρτυρες (controls).. Τα φλεγμονώδη κύτταρα αναγνωρίστηκαν βάση μορφολογίας και οι υποπληθυσμοί των T-λεμφοκυττάρων με την κυτταρομετρία ροής. Τα μακροφάγα των πτυέλων, εκφρασμένα ως % των συνολικών μη πλακωδών κυττάρων, βρέθηκαν μειωμένα μετά από 12 μήνες διακοπής του καπνίσματος σε σύγκριση με πριν τη διακοπή (baseline) (34.5 % vs. 49.1%,  $p=0.05$ ), ενώ τα ουδετερόφιλα αυξήθηκαν (61.0% vs. 48.8%,  $p=0.04$ ). Επιπλέον, τα CD8<sup>+</sup> T-κύτταρα (εκφρασμένα ως % των λεμφοκυττάρων των πτυέλων) βρέθηκαν μειωμένα στους καπνιστές πριν τη διακοπή του καπνίσματος σε σύγκριση με τους μη καπνιστές (13.6 vs. 22.3,  $p=0.04$ ) και αυξημένα στους καπνιστές 6 μήνες μετά τη διακοπή του καπνίσματος συγκριτικά με τις baseline μετρήσεις (24 vs. 13.6,  $p=0.04$ ), ένα στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα που διατηρήθηκε 1 έτος μετά τη διακοπή του καπνίσματος (25.3 vs. 13.6,  $p=0.036$ ). Δεν ανιχνεύτηκε καμία διαφορά στο ποσοστό των CD4<sup>+</sup> T-κυττάρων μεταξύ καπνιστών και μη καπνιστών. Αυτά τα νέα ευρήματα δείχνουν ότι η διακοπή του καπνίσματος μπορεί να εξισορροπήσει ορισμένα φλεγμονώδη κύτταρα στους καπνιστές με αυτά των μη καπνιστών, μέσα σε 6 μήνες από τη διακοπή του καπνίσματος. Παρόλα αυτά, περαιτέρω μελέτες απαιτούνται για τη διερεύνηση του ακριβούς μηχανισμού.

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το κάπνισμα, όπως αναφέρθηκε, αποτελεί το κύριο παράγοντα για την ανάπτυξη αρκετών χρόνιων παθήσεων του πνεύμονα, όπως η χρόνια

αποφρακτική πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ) και ο καρκίνος του πνεύμονα και υπάρχει επιστημονική τεκμηρίωση για το ρόλο του στην προδιάθεση και έκβαση αρκετών άλλων νοσημάτων (1). Και ενώ το ενεργό κάπνισμα αποτελεί την κύρια αιτία για καρκίνο του πνεύμονα, η διακοπή του καπνίσματος για 10 έτη μειώνει σημαντικά τον κίνδυνο για καρκίνο του πνεύμονα κατά 2-3 φορές (2). Επιπλέον, η διατήρηση της αποχής από το κάπνισμα μειώνει τον κίνδυνο μείωσης αναπνευστικής λειτουργίας στα επίπεδα των μη καπνιστών και μειώνει τον κίνδυνο ανάπτυξης κλινικά σημαντικής ΧΑΠ (2). Αυτά τα ευρήματα δείχνουν ότι οι επιδράσεις του καπνίσματος στον πνεύμονα είναι μερικώς αναστρέψιμες μετά τη διακοπή του καπνίσματος.

Οι μηχανισμοί της πνευμονικής βλάβης που προκαλείται από το κάπνισμα δεν έχουν πλήρως διευκρινιστεί ακόμη. Όμως, έχει προταθεί ότι οι πρώιμες φλεγμονώδεις αντιδράσεις στον καπνό του τσιγάρου είναι κρίσιμες για την ανάπτυξη επακόλουθης βλάβης στον ιστό και νόσο σε ευαίσθητα άτομα. Επιπλέον, η έρευνα έχει δείξει ότι το κάπνισμα μπορεί να οδηγήσει σε μια τοπική αντίδραση και συσσώρευση ουδετεροφίλων στην πνευμονική μικροκυκλοφορία και να προκαλέσει βλάβη στον ιστό μέσω της απελευθέρωσης τοξικών και χημειοτακτικών μεσολαβητών, και έτσι να προδιαθέσει περαιτέρω σε πνευμονική νόσο και φλεγμονή (1-4). Ανάμεσα στα λεμφοκύτταρα, τα κυκλοφορούντα CD4<sup>+</sup> T λεμφοκύτταρα έχουν προταθεί ως κύτταρα στόχοι του καπνίσματος. Πιο συγκεκριμένα τα CD4<sup>+</sup> T-λεμφοκύτταρα έχουν βρεθεί να αυξάνονται εκλεκτικά και δοσοεξαρτώμενα από το ενεργό κάπνισμα, που προκαλείται μέσω της χρόνιας διεργασίας του συστηματικού καπνίσματος (5). Επιβεβαίωση στο παραπάνω είναι το γεγονός ότι ο αριθμός των φλεγμονωδών κυττάρων που συλλεγονται από το βρογχοκυψελιδικό έκκριμα (BALF) αυξάνεται στους καπνιστές σε σύγκριση με τους μη καπνιστές, πρωτίστως λόγω της αύξησης των μακροφάγων του BALF (6-8). Ομοίως με το BALF, παρατηρείται μια σημαντική αύξηση στα μακροφάγα στο πτύελο και τους μικρούς αεραγωγούς των καπνιστών (9-12). Επιπρόσθετα, αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι τα ουδετερόφιλα και τα λεμφοκύτταρα αυξάνονται στους καπνιστές (6-9, 12-16). Τα CD4<sup>+</sup> T-κύτταρα στο BALF των καπνιστών έχουν αναφερθεί να μειώνονται (15,17) και τα CD8<sup>+</sup> T-κύτταρα να αυξάνονται, οδηγώντας σε ένα σημαντικά μειωμένο λόγο CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> σε σύγκριση με τους μη καπνιστές (18,19). Ομοίως, στο βλεννογόνο των μικρών

αεραγωγών υπάρχει μία τάση προς μείωση στα CD4<sup>+</sup> T-κύτταρα, μια αύξηση στα CD8<sup>+</sup> T-κύτταρα και μια σημαντική μείωση στο λόγο CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T-κυττάρων στους καπνιστές σε σύγκριση με τους μη καπνιστές (13).

Λιγότερα είναι γνωστά για τις επιδράσεις της διακοπής του καπνίσματος. Δύο σχετικά παλαιότερες μελέτες επιπολασμού δε βρήκαν διαφορές στα φλεγμονώδη κύτταρα μεταξύ καπνιστών και πρώην καπνιστών (20-21), ενώ άλλες έδειξαν ότι τα ο αριθμός των μακροφάγων του BALF, αλλά όχι των ουδετερόφιλων μειώνονται στους πρώην καπνιστές σε σχέση με τους καπνιστές (22). Επιπλέον, αξίζει να σημειωθεί ότι, σε ασθενείς με ΧΑΠ, μία cross-sectional μελέτη στα προκλητά πτύελα, δε βρήκε διαφορές στο κυτταρικό προφίλ και στο φαινότυπο των μακροφάγων όταν συγκρίνονται καπνιστές με πρώην καπνιστές (23), πιθανά υποδηλώνοντας εμμένουσες φλεγμονώδεις αλλαγές στους αεραγωγούς των ασθενών που έχουν προδιάθεση για ΧΑΠ. Μακροχρόνιες μελέτες έχουν δείξει ότι τα μακροφάγα, ουδετερόφιλα λεμφοκύτταρα του BALF και τα μακροφάγα του πτυέλου μειώνονται στα επίπεδα των μη καπνιστών μετά τη διακοπή του καπνίσματος (7, 24-26). Μελέτες στα ουδετερόφιλα των καπνιστών είναι αμφιλεγόμενες, δείχνοντας είτε μείωση (25), ή αύξηση (26). Υπάρχει μόνο μια μακροχρόνια μελέτη σε 'υγιείς' καπνιστές που εκτιμά υποπληθυσμούς T-λεμφοκυττάρων στις βρογχικές βιοψίες και αυτή η μελέτη δε βρήκε διαφορές στα CD8<sup>+</sup> και CD4<sup>+</sup> T-λεμφοκύτταρα μετά τη διακοπή του καπνίσματος (26). Δεν έχουν αναφερθεί μακροχρόνιες μελέτες επίδρασης της διακοπής του καπνίσματος στους υποπληθυσμούς των T-λεμφοκυττάρων στα πτύελα 'υγιών' καπνιστών. Διεξήγαμε μια μακροχρόνια μελέτη για να εξετάσουμε αν οι μεταβολές στους υποπληθυσμούς των T-λεμφοκυττάρων και των φλεγμονωδών κυττάρων των αεραγωγών αναστρέφονται μετά από μία περίοδο 6 και 12 μηνών από τη διακοπή του καπνίσματος σε 'υγιείς' καπνιστές'.

## **Υλικά με και μέθοδος**

### *Ασθενείς*

Στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο του Ηρακλείου, στην Κρήτη, έγινε πρόκληση πτυέλων σε 68 άτομα από το ιατρείο διακοπής καπνίσματος, πριν την έναρξη του πρωτοκόλλου διακοπής του καπνίσματος. Όλα τα άτομα ενημερώθηκαν και έδωσαν γραπτή συγκατάθεση και η Επιτροπή Ηθικής του



Πανεπιστημιακού νοσοκομείου έδωσε επίσημη έγκριση. Όλοι οι καπνιστές συμμετείχαν στο ίδιο συμπεριφορικό πρόγραμμα και ανάλογα με το βαθμό εξάρτησης (Fagerstrom test) έλαβαν θεραπεία υποκατάστασης με νικοτίνη και/ή βουπροπιόνη για τη θεραπεία διακοπής καπνίσματος. Δέκα μη καπνιστές (που δεν είχαν καπνίσει ποτέ) στρατολογήθηκαν μέσω διαφήμισης και αποτέλεσαν την ομάδα των μαρτύρων (controls). Όλα τα άτομα ήταν ελεύθερα λοιμώξεων αναπνευστικού κατά τη μελέτη ή κατά το μήνα που προηγήθηκε της μελέτης και στον επανέλεγχο μετά από 6 και 12 μήνες. Τα άτομα δεν έπασχαν από κάποια νόσο και δεν ελάμβαναν φαρμακευτική αγωγή στην πρώτη επίσκεψη, ενώ κανείς δεν παρουσίασε συμπτώματα χρόνιας βρογχίτιδας. Επιπλέον, ο έλεγχος λειτουργικών δοκιμασιών του πνεύμονα ήταν μέσα στα φυσιολογικά όρια και η ακτινογραφία θώρακά τους ήταν φυσιολογική. Τα χαρακτηριστικά των συμμετεχόντων ατόμων φαίνονται στον πίνακα 1.

### **Πρόκληση πτυέλων και κυτταρομετρία ροής**

Τα δείγματα των πτυέλων συλλέχτηκαν επιτυχώς στην 1<sup>η</sup> επίσκεψη στους 68 καπνιστές και στους 10 controls, ενώ επαρκές πτύελο καλής ποιότητας ελήφθει από τους 16 από τους 21 που κατάφεραν επιτυχώς να διακόψουν το κάπνισμα στην 1<sup>η</sup> επίσκεψη, μετά από 6 μήνες στον επανέλεγχο στους 18 από τους 21 που δεν είχαν υποτροπιάσει (86% ποσοστό συλλογής) και μετά από 12 μήνες διακοπής καπνίσματος στους 9 από τους 14 που είχαν διακόψει το κάπνισμα (65% ποσοστό συλλογής). Σε κάθε επανέλεγχο, η επιβεβαίωση της κατάστασης καπνίσματος γινόταν από το εκπνεόμενο CO. Η πρόοδος της διακοπής του καπνίσματος και της συλλογής των πτυέλων απεικονίζεται στο σχεδιάγραμμα 1.

Η πρόκληση και επεξεργασία των πτυέλων έγιναν με βάση με τη μέθοδο του Pin, όπως έχουμε ήδη περιγράψει (27). Δύο πλακάκια βάφτηκαν με May-Grunwald-Giemsa για να υπολογιστεί ο τύπος των φλεγμονωδών κυττάρων στο πτύελο και η καταμέτρησή τους έγινε από έναν ερευνητή (IB), που δε γνώριζε την προέλευση των δειγμάτων. Τουλάχιστον 400 κύτταρα μετρήθηκαν. Πλακάκια με <50% πλακωδών κυττάρων και >400 μη πλακώδη κύτταρα χαρακτηρίστηκαν καλής ποιότητας. Η διαφορική καταμέτρηση των κυττάρων εκφράστηκε ως % των συνολικών μη πλακωδών κυττάρων του πτυέλου.

Περίπου  $10^6$  λευκοκύτταρα πτυέλου σημάνθηκαν για την κυτταρομετρία ροής με μονοκλωνικά αντισώματα ποντικού έναντι ανθρώπου (όλα από την Immunotech; Marseille, France): phycoerythrin-cyanine (PECy-5) conjugated anti-CD8, fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugated anti-CD4 and phycoerythrin (PE) conjugated anti-CD45 για 30 λεπτά στους  $4-8^{\circ}\text{C}$  ή με το isotype matched controls για 30 λεπτά στους  $4-8^{\circ}\text{C}$ . Ένας ELITE COULTER κυτταρομετρητής χρησιμοποιήθηκε. Τα δεδομένα καταγράφηκαν σε ένα list mode και αναλύθηκαν με τη χρήση του Erics Elite. Η ακόλουθη στρατηγική gating εφαρμόστηκε: πρώτα τα νεκρά κύτταρα, θραύσματα και επιθηλιακά κύτταρα αποκλείστηκαν σε ένα SS-CD45 scatter plot, έπειτα τα λεμφοκύτταρα gated σε ένα FS-SS scatter plot με βάση το μέγεθος και την κοκκίωσή τους. Τέλος τα CD4 και CD8 θετικά κύτταρα απαριθμήστηκαν και εκφράστηκαν ως % των λεμφοκυττάρων του πτυέλου σε ένα CD4/CD8 scatter plot (Σχεδιάγραμμα 2). Μερικά δείγματα δεν ήταν επαρκή αρκετά ( $<10^6$  λευκά κύτταρα πτυέλου) για να σημανθούν για την κυτταρομετρία ροής και για αυτό σποραδικά λείπουν κάποιες μετρήσεις κυττάρων (Εικόνα 1).

#### *Στατιστική ανάλυση*

Η κανονικότητα ελέγχθηκε με το Shapiro-Wilk test. Οι μεταβλητές δεν είχαν κανονική κατανομή. Στην ομάδα των ατόμων που επιτυχώς κατάφεραν να διακόψουν το κάπνισμα, διαφορές μεταξύ καπνιστών πριν και μετά από 6 και 12 μήνες από τη διακοπή του καπνίσματος ελέχθησαν χρησιμοποιώντας το Friedman test ακολοθούμενο από το Wilcoxon signed-rank test για pairwise διαφορές. Διαφορές μεταξύ καπνιστών και της ομάδας των control ελέχθησαν με το Mann-Whitney U test. Το software StatsDirect (Camcode·Cambridge, UK) χρησιμοποιήθηκε. Το  $p < 0.05$  θεωρήθηκε στατιστικά σημαντικό.

#### **Αποτελέσματα**

Τα χαρακτηριστικά των πτυέλων στους καπνιστές τόσο πριν όσο και μετά τη διακοπή του καπνίσματος καθώς επίσης και στον πληθυσμό των control παρουσιάζονται στον Πίνακα 2. Όπως φαίνεται τα γενικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων (π.χ. βάρος, συνολικός αριθμός κυττάρων, συνολικός αριθμός κυττάρων ανά γραμμάριο και ζωτικότητα δείγματος) παρέμειναν τα ίδια κατά τη διάρκεια όλης της μελέτης, ανεξάρτητα από το

χρόνο δειγματοληψίας και την υποομάδα. Επιπλέον συγκρίνοντας τα δείγματα καπνιστών πριν τη διακοπή του καπνίσματος (baseline) με αυτά των μη καπνιστών, οι τελευταίοι βρέθηκε να έχουν υψηλότερο ποσοστό υποπληθυσμών CD8<sup>+</sup> λεμφοκυττάρων και επακόλουθα χαμηλότερο λόγο CD4<sup>+</sup> /CD8<sup>+</sup> (22.3 vs. 13.9,  $p<0.05$  and 2.3 vs. 3.8,  $p<0.05$  αντίστοιχα). Τα ποσοστά των φλεγμονωδών κυττάρων (ουδετερόφιλα, μακροφάγα) στα πτύελα δε βρέθηκαν να διαφέρουν μεταξύ καπνιστών και μη καπνιστών στο baseline, και δε βρέθηκαν να μεταβάλλονται στους καπνιστές 6 μήνες μετά τη διακοπή του καπνίσματος. Όμως, μετά από 12 μήνες διακοπής του καπνίσματος, το ποσοστό των ουδετεροφίλων ήταν υψηλότερο (61 vs. 55,  $p<0.05$ ) και το ποσοστό των μακροφάγων χαμηλότερο (34.5 vs. 40.6,  $p<0.05$ ) σε σύγκριση με τις μετρήσεις αναφοράς (baseline).

Επιπλέον, όπως απεικονίζεται στο σχεδιάγραμμα 3, το ποσοστό των CD4<sup>+</sup> T-λεμφοκυττάρων δε βρέθηκε να διαφέρει μεταξύ των καπνιστών και των controls. Όμως ο αριθμός των CD4<sup>+</sup> T-κυττάρων (εκφραζόμενων ως % των λεμφοκυττάρων πτυέλου) δε βρέθηκε να μεταβάλλεται μετά τη διακοπή τόσο μετά από 6, όσο και μετά από 12 μήνες στον επανέλεγχο. Όπως σημειώθηκε παραπάνω, ένα στατιστικά σημαντικό χαμηλότερο ποσοστό CD8<sup>+</sup> T-κυττάρων παρατηρήθηκε στους καπνιστές σε σύγκριση με τους controls. Επιπρόσθετα, το ποσοστό των CD8<sup>+</sup> T-κυττάρων αυξήθηκε μετά από 6 μήνες σε αυτούς που διέκοψαν το κάπνισμα και έφτασε τα επίπεδα των controls (Σχεδιάγραμμα 4). Από τον 6 έως και το 12 μήνα του επανελέγχου, το ποσοστό των CD8<sup>+</sup> T-κυττάρων δεν διέφερε σημαντικά. Όταν υπολογίστηκε ο λόγος CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>, βρέθηκε πιο αυξημένος στους καπνιστές στο baseline από ότι στους controls (Σχεδιάγραμμα 5). Άλλωστε, μειώθηκε μέσα σε 6 μήνες από τη διακοπή του καπνίσματος, ενώ, όπως και με το ποσοστό των CD8<sup>+</sup> κυττάρων, ο λόγος CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> δεν άλλαξε μετά από τους 6 μήνες της διακοπής.

## Συζήτηση

Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι οι καπνιστές παρουσιάζουν χαμηλότερο ποσοστό CD8<sup>+</sup> T-κυττάρων και αυξημένο λόγο CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> σε σύγκριση με τους μη καπνιστές στο baseline. Αυτό που έχει ενδιαφέρον είναι η σημαντική αύξηση των CD8<sup>+</sup> T-λεμφοκυττάρων και η μείωση του λόγου

CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> που παρατηρήθηκε μέσα σε 6 μήνες από τη διακοπή του καπνίσματος που έφτασε στα επίπεδα των controls. Όπως, παραδοσιακά, η κύρια δραστηριότητα των CD8<sup>+</sup> T λεμφοκυττάρων θεωρείται η διευκόλυνση της ταχείας υποχώρησης των οξέων ιογενών λοιμώξεων, το χαμηλότερο ποσοστό των CD8<sup>+</sup> T κυττάρων υποδηλώνει ότι οι καπνιστές έχουν ένα έλλειμμα στην κυτταρική ανοσία στον πνεύμονα, ένα σημείο σημαντικό για την άμυνα πρώτης γραμμής κατά των λοιμώξεων και ίσως εξηγεί την αυξημένη ευαισθησία των καπνιστών στις ιογενείς λοιμώξεις. Επιπλέον, προηγουμένως η ομάδα μας έδειξε ότι η έκφραση των δεικτών ωρίμανσης των δενδριτικών κυττάρων των πτυέλων στους καπνιστές μειώνεται, πιθανά επηρεάζοντας έτσι την ικανότητα των δενδριτικών κυττάρων να προκαλέσουν αποτελεσματικές ανοσολογικές αντιδράσεις, και έτσι να μεταβάλλεται ο υποπληθυσμός των λεμφοκυττάρων και επομένως να καθιστά τους καπνιστές πιο ευαίσθητους στις λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος (28). Επιπρόσθετα, μετά από 12 μήνες από τη διακοπή του καπνίσματος τα μακροφάγα των πτυέλων μειώθηκαν και τα ουδετερόφιλα αυξήθηκαν σημαντικά στα άτομα που διέκοψαν το κάπνισμα.

Από τα δεδομένα που γνωρίζουμε υπάρχουν περιορισμένα στοιχεία που να έχουν εκτιμήσει τις μεταβολές των υποπληθυσμών των T-λεμφοκυττάρων μετά τη διακοπή του καπνίσματος. Η παρούσα μελέτη είναι μία από τις πρώτες μακροχρόνιες μελέτες που διερευνά την επίδραση της διακοπής του καπνίσματος στον υποπληθυσμό των T-λεμφοκυττάρων στα προκλητά πτύελα καπνιστών χωρίς υποκείμενη νόσο ή διαταραχή αναπνευστικής λειτουργίας.

Τα ευρήματά μας φαίνεται να αντικρούουν προηγούμενα που αναφέρουν αύξηση στα CD8<sup>+</sup> T-κύτταρα και μείωση του λόγου CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> στους καπνιστές σε σύγκριση με τους μη καπνιστές στο BALF και τις βρογχικές βιοψίες (13,17-19). Επιπλέον, μια προηγούμενη μελέτη στις βρογχικές βιοψίες δεν έδειξε διαφορά στα CD8<sup>+</sup> και CD4<sup>+</sup> T-λεμφοκύτταρα πριν και μετά τη διακοπή του καπνίσματος (26). Αυτές οι ασυμφωνίες πιθανά αντιπροσωπεύουν το διαφορετικό φλεγμονώδες μικροπεριβάλλον μεταξύ του αυλού των αεραγωγών που δειγματίζεται από το πτύελο και του επιθηλίου και βλεννογόνου των αεραγωγών που δειγματίζεται στις βρογχικές βιοψίες (29). Μια άλλη πιθανή εξήγηση είναι ότι το κάπνισμα καταστέλλει την δια μέσου

του επιθηλίου μετακίνηση των CD8<sup>+</sup> λεμφοκυττάρων, αυξάνοντας τον αριθμό τους στο τοίχωμα των μεγάλων αεραγωγών, ενώ παράλληλα μειώνεται ο αριθμός τους στον αυλό των αεραγωγών (30). Επομένως, πιθανά στους καπνιστές, λόγω του μηχανισμού μη φυσιολογικής διαμέσου του επιθηλίου μετακίνησης, τα CD8<sup>+</sup> T-κύτταρα να αυξάνονται στις βρογχικές βιοψίες και να μειώνονται στον αυλό των αεραγωγών, που δειγματίζεται από τα προκλητά πτύελα. Μετά τη διακοπή του καπνίσματος, η διαμέσου του επιθηλίου μετακίνηση των CD8<sup>+</sup> T αποκαθίσταται και επομένως μεγαλύτεροι αριθμοί ανιχνεύονται στα προκλητά πτύελα (30).

Στην παρούσα μελέτη δεν βρήκαμε διαφορές στους αριθμούς των CD4<sup>+</sup> T-κυττάρων των πτυέλων μεταξύ καπνιστών και μη καπνιστών, όπως έχει φανεί και από προηγούμενες μελέτες (8,16,19,26,31). Επιπλέον, δε βρέθηκαν σημαντικές αλλαγές στο ποσοστό των φλεγμονωδών κυττάρων (ουδετερόφιλα, μακροφάγα) στα πτύελα στους καπνιστές σε σύγκριση με τους μη καπνιστές. Όμως, σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες, το ποσοστό των μακροφάγων στα πτύελα μειώνεται μετά τη διακοπή του καπνίσματος (7,22,24-27). Επιπρόσθετα, το ποσοστό των ουδετεροφίλων μειώθηκε σημαντικά στους 12 μήνες από τη διακοπή του καπνίσματος, που είναι σε συμφωνία με μια προηγούμενη μελέτη στα πτύελα (26). Πιθανά η αύξηση που σημειώνεται στο ποσοστό των ουδετεροφίλων των πτυέλων να οφείλεται στην αυξημένη απόπτωση και διαμέσου του επιθηλίου μετακίνηση και πιθανά να αντιπροσωπεύει όντως ένα προστατευτικό μηχανισμό απομάκρυνσης ενεργοποιημένων ουδετεροφίλων από το τοίχωμα των αεραγωγών στον αυλό των αεραγωγών (29). Όμως, επιστημονικές αποδείξεις δεν έχουν καταλήξει σε συμπέρασμα, αφού άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι τα ουδετερόφιλα του BALF μειώνονται στο επίπεδο των μη καπνιστών σε 6, 9 και 15 μήνες από τη διακοπή του καπνίσματος (7), ενώ τα ουδετερόφιλα των πτυέλων μειώνονται στους 12 μήνες από τη διακοπή του καπνίσματος (25).

Η παρούσα μελέτη αν και καινούρια και μακροχρόνια και επομένως σε θέση να διερευνήσει πάνω στην αιτία και το αποτέλεσμα είχε κάποιους περιορισμούς που αξίζουν να σχολιαστούν. Πρώτα, τα κύτταρα από τα δείγματα πτυέλων προέρχονται κυρίως από τον αυλό των κεντρικών αεραγωγών και οι μεταβολές στα φλεγμονώδη κύτταρα και στα T-κύτταρα του πτυέλου δεν αντιπροσωπεύουν απαραίτητα μεταβολές στο τοίχωμα των

αεραγωγών. Όμως, συνήθεις μέθοδοι μελέτης ιστού, όπως η εξέταση βρογχικών βιοψιών ή χειρουργικών δειγμάτων δεν μπορεί να εφαρμοστεί εύκολα σε μακροχρόνιες μελέτες. Έπειτα, εφόσον το πτύελο πρέπει να ομογενοποιηθεί πριν την κυτταρομετρία ροής, μια πιθανή επίδραση της επεξεργασίας με διθειοτριτόλη (DTT) στα αντιγόνα των λεμφοκυττάρων θα πρέπει να ληφθεί υπόψη. Το αναγωγικό μέσο DTT θα μπορούσε να μεταβάλλει το CD8 αντιγόνο και να παρέμβει στην αναγνώριση του αντισώματος. Στην παρούσα μελέτη δεν έγινε λεπτομερής ανάλυση των επιδράσεων της DTT στους κατάλληλους δείκτες επιφανείας. Παρόλα αυτά ο Lorrrow και συνεργάτες διερεύνησαν τα λευκοκύτταρα του περιφερικού αίματος ως μοντέλο για τα κύτταρα προκλυτού πτυέλου και έδειξαν ότι ένταση του φθορισμού του CD8 δεν μεταβλήθηκε από το DTT, ενώ παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές ( $p < 0.001$ ), αν και μικρές, αλλαγές στα ποσοστά των CD8 θετικών λεμφοκυττάρων. Οι συγγραφείς κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η συγκρισιμότητα μεταξύ των δειγμάτων όσον αφορά τους δείκτες επιφανείας των λεμφοκυττάρων διατηρείται, δείχνοντας έτσι ότι η επεξεργασία των δειγμάτων των πτυέλων με διθειοθρεϊτόλη δεν καθιστά μη έγκυρη την ανοσοκυτταροχημική ανάλυση των λεμφοκυττάρων (32). Επιπρόσθετα, ο μέσος όρος ηλικίας της ομάδας των καπνιστών ήταν μεγαλύτερος από την ομάδα των control και θα μπορούσε κανείς να αποδώσει τις διαφορές στους υποπληθυσμούς των λεμφοκυττάρων μεταξύ καπνιστών και μη καπνιστών στη διαφορά ηλικίας. Όμως, προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η ηλικία μειώνει κυρίως τον αριθμό των CD4<sup>+</sup> T-κυττάρων, ενώ εμείς βρήκαμε διαφορές μόνο στα CD8<sup>+</sup> T-κύτταρα (33,34). Επιπλέον, όλοι οι ασθενείς μας ήταν κάτω των 65 ετών και οι μεταβολές στα T-κύτταρα έχουν κυρίως αναφερθεί σε άτομα πάνω από αυτή την ηλικία. Αξίζει να σημειωθεί και ο πιθανός ρόλος των παραγόντων του φύλου, αφού τα δεδομένα που παρουσιάζονται εδώ βασίζονται κυρίως σε άρρενα άτομα. Ένας άλλος περιορισμός της μελέτης μας είναι ο σχετικά μικρός αριθμός των ατόμων, ιδιαίτερα οι αυτοί που κατάφεραν να διακόψουν το κάπνισμα μετά από 1 έτος. Αυτό οφείλεται στο συζητημένο ποσοστό υποτροπής του καπνίσματος μέσα σε ένα έτος. Λαμβάνοντας υπόψη το παραπάνω, περαιτέρω μελέτες, χρησιμοποιώντας μεγαλύτερο αριθμό καπνιστών, απαιτούνται για τη διερεύνηση του ακριβούς μηχανισμού.

## **Συμπεράσματα**

Ανακεφαλαιώνοντας, τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι η διακοπή του καπνίσματος αυξάνει το ποσοστό των CD8<sup>+</sup> T-κυττάρων και μειώνει το λόγο CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> μέσα σε 6 μήνες από τη διακοπή του καπνίσματος στα επίπεδα των μη καπνιστών, και τα αποτελέσματα αυτά διατηρούνται στα επίπεδα αυτά σε αυτούς που διατήρησαν την αποχή τους από το κάπνισμα στους 12 μήνες. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι κάποιοι παράγοντες της φλεγμονής και των ανοσολογικών διεργασιών που λαμβάνουν χώρα στους αεραγωγούς των καπνιστών χωρίς προϋπάρχουσα αναπνευστική διαταραχή ή τρέχουσα λοίμωξη αναπνευστικού μπορούν να αναστραφούν στα άτομα αυτά που καταφέρνουν επιτυχώς να διακόψουν το κάπνισμα.

## Βιβλιογραφία:

1. J.M. Sethi, C.L. Rochester, "Smoking and Chronic Obstructive Pulmonary Disease", *Clinics in Chest Medicine*, vol. 21, no. 1, pp. 67–86, 2000
2. The Health Benefits of Smoking Cessation: a report of the Surgeon General. Rockville: US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control, Centers for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Office on Smoking and Health, DHHS Publ No (CDC) 90-8416, 1990.
3. N.M. Siafakas, "In the Beginning of COPD: is evolution important?", *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 175, no.5, pp. 423-424, 2007
4. D. K. Bhalla, F. Hirata, A. K. Rishi, Gairola CG, "Cigarette smoke, inflammation, and lung injury: A mechanistic perspective", *Journal of toxicology and environmental health. Part B, Critical reviews*, vol. 12, no. 1, pp. 45-69, 2009
5. A.Nakata, M. Takahashi, M. Irie, Y. Fujioka, T. Haratani, S. Araki, "Relationship between cumulative effects of smoking and memory CD4+ T lymphocyte subpopulations", *Addictive behaviors*, vol. 32, no.7, pp. 1526-1531, 2007
6. E. Roos-Engstrand, B. Ekstrand-Hammarström, J. Pourazar, A.F. Behndig, A. Bucht, A. Blomberg, "Influence of smoking cessation on airway T lymphocyte subsets in COPD", *COPD*, vol. 6, no. 2, pp.112-20, 2009.
7. C.M. Skold, E. Blanche, A. Eklund, "Transient increases in albumin and hyaluronan in bronchoalveolar lavage fluid after quitting smoking: possible signs of reparative mechanisms", *Respiratory Medicine*, vol. 90, no. 9, pp. 523-529, 1996
8. D. Edwards, "Immunological effects of tobacco smoking in "healthy" smoker", *COPD*, vol. 6, no. 1, pp. 48-58, 2009
9. A.W. Boots, G.R. Haenen, A. Bast, "Oxidant metabolism in chronic obstructive pulmonary disease", *The European respiratory journal*, vol. 46, pp. 14s-27s, 2003



10. C. Lensmar, G. Elmberger, M. Skold, A. Eklund, "Smoking alters the phenotype of macrophages in induced sputum", *Respiratory Medicine*, vol. 92, no. 3, pp. 415-420, 1998
11. R. Dippolito, A. Foresi, A. Chetta, et al., "Eosinophils in induced sputum from asymptomatic smokers with normal lung function", *Respiratory Medicine*, vol. 95, no. 12, pp. 969-974, 2001
12. K. Amin, A. Ekberg-Jansson, C.G. Löfdahl, P. Venge, "Relationship between inflammatory cells and structural changes in the lungs of asymptomatic and never smokers: a biopsy study", *Thorax*, vol. 58, no. 2, pp. 135-142, 2003
13. B.E. Lams, A.R. Sousa, P.J. Rees, T.H. Lee, "Subepithelial immunopathology of the large airways in smokers with and without chronic obstructive pulmonary disease", *The European respiratory journal*, vol. 15, no. 3, pp. 512-516, 2000;
14. A. Babusyte, K. Stravinskaite, J. Jerock, J. Lötvall, R. Sakalauskas, B. Sitkauskienė, "Patterns of airway inflammation and MMP-12 expression in smokers and ex-smokers with COPD", *Respiratory research*, vol. 8, pp. 81, 2007
15. J.M. Wallace, J.S. Oishi, R.G. Barbers, M.S. Simmons, D.P. Tashkin., "Lymphocytic subpopulation profiles in bronchoalveolar lavage fluid and peripheral blood from tobacco and marijuana smokers", *Chest*, vol. 105, no. 3, pp. 847-852, 1994
16. G. Chrysofakis, N. Tzanakis, D. Kyriakoy, et al., "Perforin Expression and Cytotoxic Activity of Sputum CD8+ Lymphocytes in Patients With COPD", *Chest*, vol. 125, no. 1, pp. 71-76, 2004
17. U. Costabel, K.J. Bross, C. Reuter, K.H. Rühle, H. Matthys, "Alterations in immunoregulatory T-cell subsets in cigarette smokers. A phenotypic analysis of bronchoalveolar and blood lymphocytes", *Chest*, vol. 90, no. 1, pp. 39-44, 1986
18. A. Ekberg-Jansson, B. Andersson, E. Avrå, O. Nilsson, C.G. Löfdahl, "The expression of lymphocyte surface antigens in bronchial biopsies, bronchoalveolar lavage cells and blood cells in healthy smoking and never-smoking men, 60 years old", *Respiratory Medicine*, vol. 94, no. 3, pp. 264-272, 2000

19. A. Gadgil, S.R. Duncan, "Role of T-lymphocytes and pro-inflammatory mediators in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease", *International journal of chronic obstructive pulmonary disease*, vol. 3, no. 4, 531-541, 2008
20. J.L. Wright, J.E. Hobson, B. Wiggs, P.D. Pare, J.C. Hogg, "Airway inflammation and peribronchiolar attachments in the lungs of nonsmokers, current and ex-smokers", *Lung*, vol.166, no. 5, pp. 277–286, 1988
21. J.B. Mullen, J.L. Wright, B.R. Wiggs, P.D. Pare, J.C. Hogg, "Structure of central airways in current smokers and ex-smokers with and without mucus hypersecretion: relationship to lung function", *Thorax*, vol. 42, no. 11, pp. 843–848, 1987
22. A. Capelli, A. Di Stefano, I. Gnemmi, et al., "Increased MCP-1 and MIP-1beta in bronchoalveolar lavage fluid of chronic bronchitics", *The European respiratory journal*, vol. 14, no. 1, pp 160–165, 1999
23. J. Domagała-Kulawik, M. Maskey-Warzechowska, I. Kraszewska, R. Chazan, "The cellular composition and macrophage phenotype in induced sputum in smokers and ex- smokers with COPD", *Chest*, vol. 123, no. 4, pp 1054- 1059, 2003
24. C.M. Skold, J. Hed, A. Eklund, "Smoking cessation rapidly reduces cell recovery in bronchoalveolar lavage fluid, while alveolar macrophage fluorescence remains high", *Chest*, vol. 101, no. 4, pp. 989-995, 1992
25. G.E. Swan, J.E. Hodgkin, T. Roby, C. Mittman, N. Jacobo, J. Peters, "Reversibility of airways injury over a 12-month period following smoking cessation", *Chest*, vol. 101, no. 3, pp. 607-612, 1992
26. B.W. Willemse, N.H. ten Hacken, B. Rutgers, I.G. Lesman-Leegte, D.S. Postma, W. Timens, "Effect of 1-year smoking cessation on airway inflammation in COPD and asymptomatic smokers" *The European respiratory journal*, vol. 26, no. 5, pp. 835-845, 2005
27. M. Tsoumakidou, N. Tzanakis, N.M. Siafakas, "Induced sputum in the investigation of airway inflammation of COPD", *Respiratory Medicine*, vol. 97, no. 8, pp. 863-871, 2003
28. M. Tsoumakidou, I. Bouloukaki, H. Koutala, et al, "Decreased Sputum Mature Dendritic Cells in Healthy Smokers and Patients with Chronic

- Obstructive Pulmonary Disease”, *International archives of allergy and immunology*, vol. 150, no. 4, pp. 389-397, 2009
29. S.R. Rutgers, W. Timens, H.F. Kaufmann, T.W. van der Mark, G.H. Koeter, D.S. Postma, “Comparison of induced sputum with bronchial wash, bronchoalveolar lavage and bronchial biopsies in COPD”, *The European respiratory journal*, vol. 15, no. 1, pp. 109-115, 2000
30. J.S. Erjefalt, L. Uller, M. Malm-Erjefalt, C.G. Persson, “Rapid and efficient clearance of airway tissue granulocytes through transepithelial migration”, *Thorax*, vol. 59, no. 2, pp. 136-143, 2004
31. G. Chrysofakis, N. Tzanakis, D. Kyriakou, et al., “Expression of perforin and cytotoxic activity of CD8+ cells in induced sputum from current smokers with COPD”, *Pneumon*, vol. 15, no. 1, pp. 88-95, 2002
32. D. Loppow, M. Böttcher, G. Gercken, H. Magnussen, R.A. Jörres, “Flow cytometric analysis of the effect of dithiothreitol on leukocyte surface markers” *The European respiratory journal* vol. 16, no. 2, pp. 324-329, 2000
33. K.C. Meyer, W. Ershler, N.S. Rosenthal, X.G. Lu, K. Peterson, “Immune dysregulation in the aging human lung”, *American journal of respiratory and critical care medicine*, vol. 153, no. 3, pp. 1072-1079, 1996
34. K.C. Meyer, P. Soergel, “Variation of bronchoalveolar lymphocyte phenotypes with age in the physiologically normal human lung”, *Thorax*, vol. 54, no. 8, pp. 697-700, 1999

Πίνακας 1. Χαρακτηριστικά των ατόμων

	Καπνιστές			Μη καπνιστές (Controls)	P value*
	Σύνολο	Επιτυγχόντες στους 6 μήνες	Μη επιτυγχόντες		
<b>N</b>	68	21	47	10	N/A
<b>Φύλο, Α/Γ</b>	59/9	19/2	40/7	8/2	$p = 0.6$
<b>Ηλικία, (έτη)</b>	49±8	49±7	49±9	33±9	$p = 0.002$
<b>Κάπνισμα (pack-years)</b>	57±18	53±15	59±19	N/A	N/A
<b>FEV<sub>1</sub>, %pred post-bronchod.</b>	105±12	109±13	104±11	116±13	$p = 0.2$
<b>ΔFEV1 % pred</b>	2.1±1.8	2.4±2.3	1.9±2.2	1.9±1.4	$p = 0.16$
<b>Fagerstrom Score</b>	8±1	7±1	8±1	N/A	N/A

Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως mean ±SD, ή σε απόλυτους αριθμούς, N/A: δεν εφαρμόζεται, FEV<sub>1</sub>: forced expiratory volume in one second; ΔFEV<sub>1</sub>: αλλαγή στον FEV<sub>1</sub> μετά βρογχοδιαστολή

\*p value μεταξύ controls και επιτυχόντων που διέκοψαν το κάπνισμα

Πίνακας 2. Διαφορική καταμέτρηση κυττάρων των πτυέλων και υποπληθυσμοί λεμφοκυττάρων

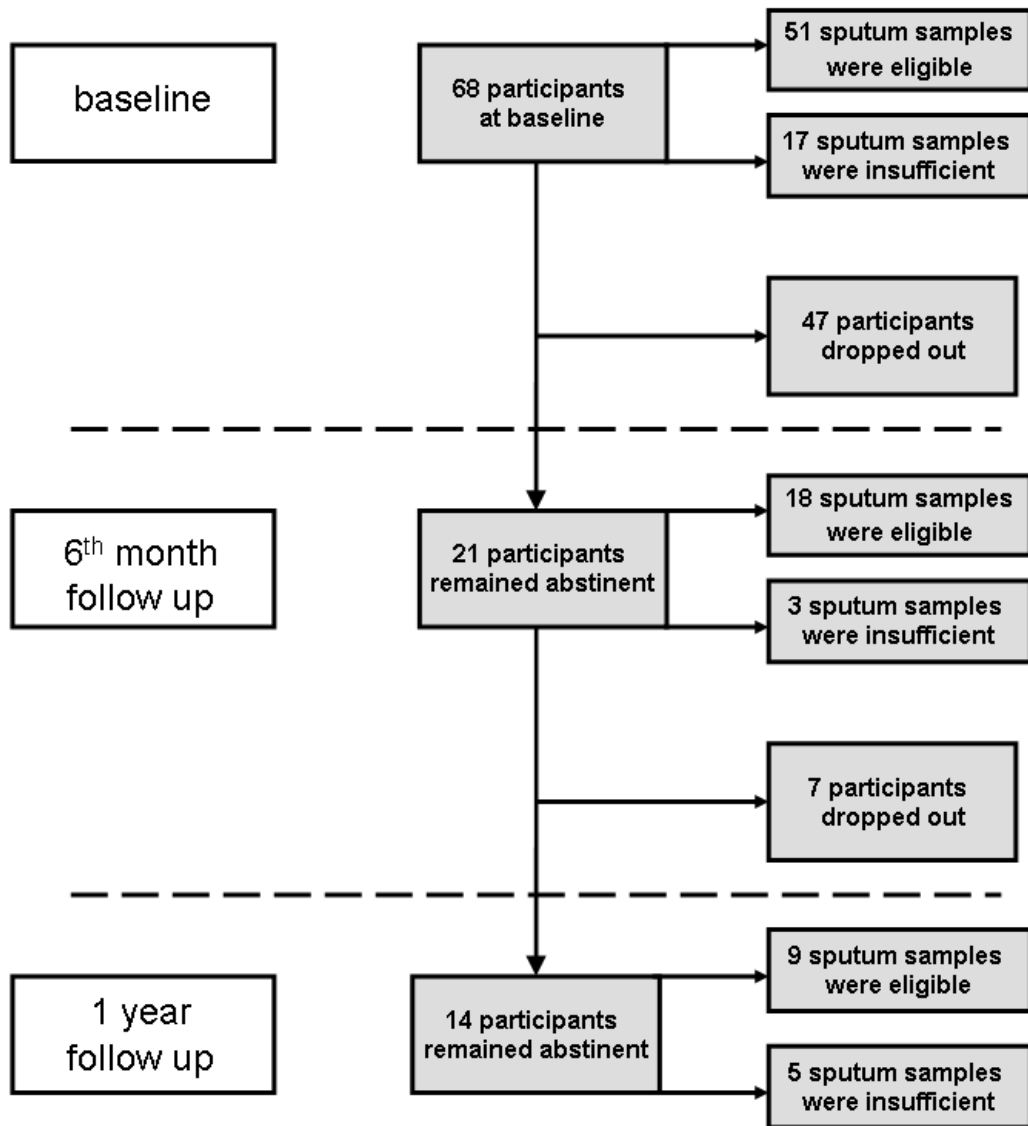
	Καπνιστές				Controls (n=10)
	Σύνολο (n=51)	Επιτυχόντες πριν τη διακοπή (n=16)	Επιτυχόντες 6 μήνες από τη διακοπή (n=18)	Επιτυχόντες 12 μήνες από τη διακοπή (n=9)	
<b>Βάρος, gr</b>	1.2 (0.08-4.3)	1.4 (0.3-3.5)	0.89(0.05-3.45)	1.08(0.31-3.18)	1.41 (0.35-5.04)
<b>TCC,x10<sup>6</sup>κύτταρα</b>	2.78 (0.06-13.2)	2.5 (0.1-11.2)	4.02 (0.59-11.8)	3.85 (0.47-19.6)	5.29 (1.16-7.00)
<b>TCC/gr</b>	2.27 (0.03-13.4)	1.6 (0.03-11.6)	4.78 (0.49-11.8)	2.86 (0.51-46.67)	2.18 (0.68-6.71)
<b>Ζωτικότητα %</b>	80.42 (50-98.6)	80.4(50.6-96.9)	92.62 (50-99.37)	89.16 (70.37-98.53)	84.71 (67.01-98.79)
<b>Επιθηλιακά</b>	10 (0.01-49.9)	10.6 (0.01-43.7)	6.4 (0-20)	5 (0.49-39)	10.78 (2.31-48.5)
<b>Ουδετερόφιλα %</b>	55.6 (3.3-87.3)	48.8 (17.7-80)	55.3 (17-88)	<b>61 (3.6-84.8) *</b>	40.5 (3.6-94)
<b>Μακροφάγα %</b>	40.6 (12.3-94)	49.1 (20-80.3)	41.8 (11.2-82.2)	34.5 (14.5-57.3)	55 (5.4-94)
<b>Λεμφοκύτταρα %</b>	0.12 (0-6.2)	0.1 (0-6.2.7)	0.25 (0-1.5)	0.5 (0-1.6)	0.55 (0-4.1)
<b>Ηωσινόφιλα %</b>	0 (0-3.6)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-7)	0 (0-0.5)
<b>CD4<sup>+</sup> %</b>	59 (20-84)	58.5 (24-78.4)	54.7 (32.5-71)	40.2 (30.6-62)	53 (32-63)
<b>CD8<sup>+</sup> %</b>	13.9 (4-56)	13.6 (5-56)	<b>24 (15-42) *</b>	<b>25.3 (12.5-46.6) *</b>	<b>22.3 (16-49) †</b>
<b>CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> λόγος</b>	3.8 (0.4-16.2)	3.7 (0.4-12.9)	<b>2.3 (1.1-4.7) *</b>	<b>1.9 (0.9-4.8) *</b>	<b>2.3 (0.9-3.2) †</b>

TCC:ολικός αριθμός κυττάρων (total cell count)

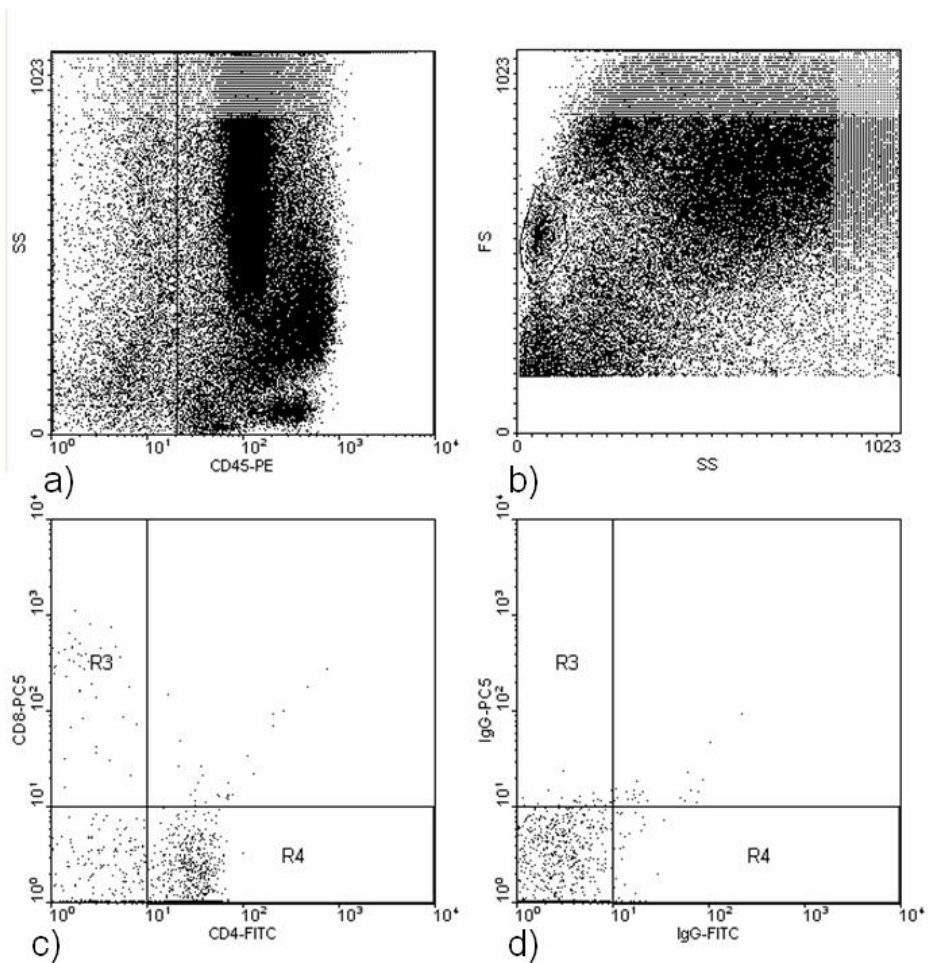
Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως median (range). Τα επιθηλιακά κύτταρα εκφράζονται ως ποσοστό όλων των κυττάρων, η διαφορική καταμέτρηση κυττάρων απρουσιάζεται ως % όλων των μη επιθηλιακών κυττάρων του πτυέλου, οι υποπληθυσμοί των λεμφοκυττάρων παρουσιάζονται ως % όλων των λεμφοκυττάρων του πτυέλου

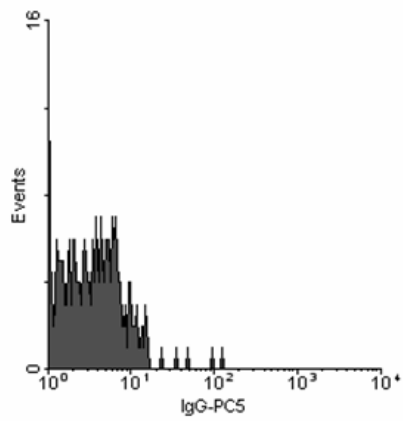
\* p<0.05 versus επιτυχόντων πριν τη διακοπή του καπνίσματος, † p<0.05 μεταξύ controls και επιτυχόντων πριν τη διακοπή του καπνίσματος.

Σχεδιάγραμμα 1. Σχεδιάγραμμα συμμετοχής, διακοπής του καπνίσματος και ποιότητας των πτυέλων

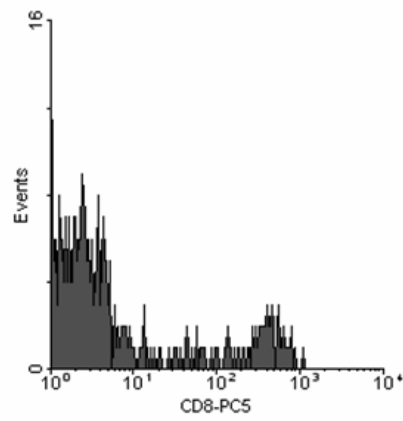


**Σχεδιάγραμμα 2.** Παράδειγμα ανάλυσης κυτταρομετρητή ροής με dot plots & ιστογράμματα από ένα αντιπροσωπευτικό δείγμα(από ένα άτομο). Πρώτα, τα επιθηλιακά κύτταρα αποκλείστηκαν από την ανάλυση με gating σε όλα τα  $CD45^+$  λευκοκύτταρα (plot a). Έπειτα τα λεμφοκύτταρα επιλέχτηκαν βάση μορφολογίας σε ένα FS/SS plot (plot b). Τέλος, τα  $CD8^+$  και  $CD4^+$  lymphocytes λεμφοκύτταρα επιλέχτηκαν(plot c). Φαίνεται επίσης η χρώση με isotype control αντισώματα (plot d). PE: phycoerythrin, PC-5: phycoerythrin-cyanine, FITC: fluorescein isothiocyanate.

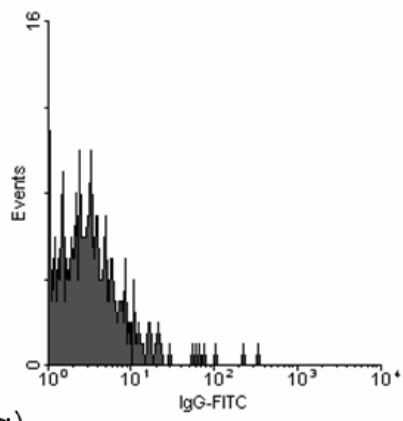




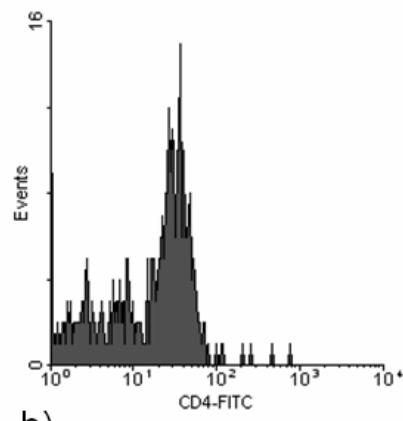
e)



f)



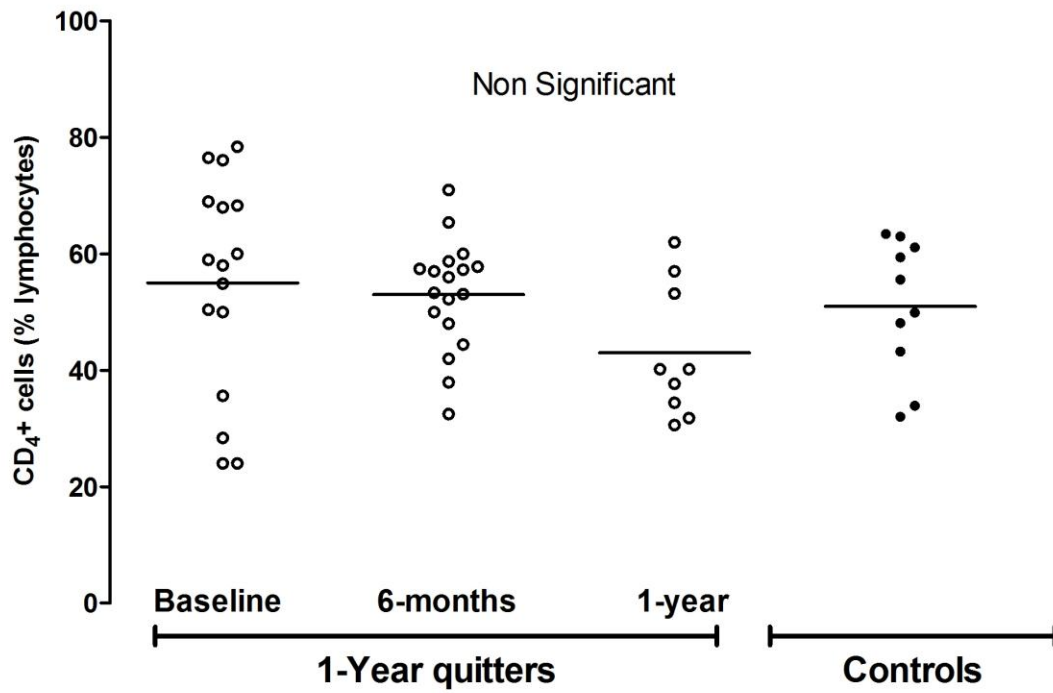
g)



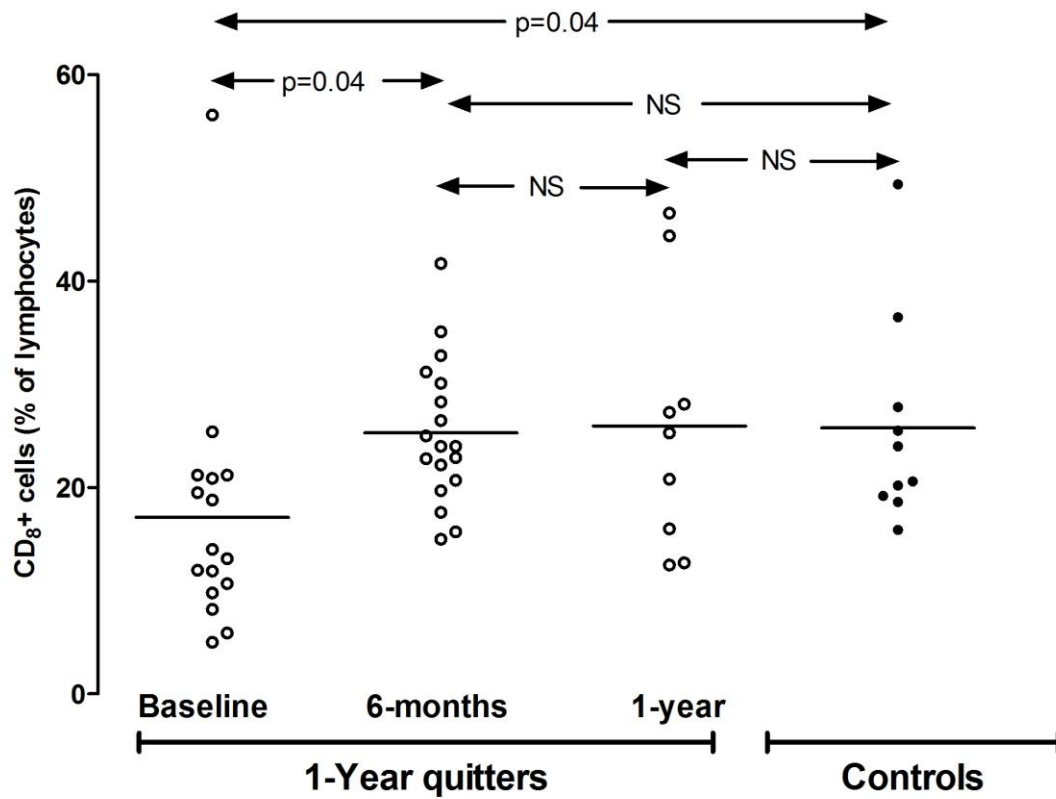
h)



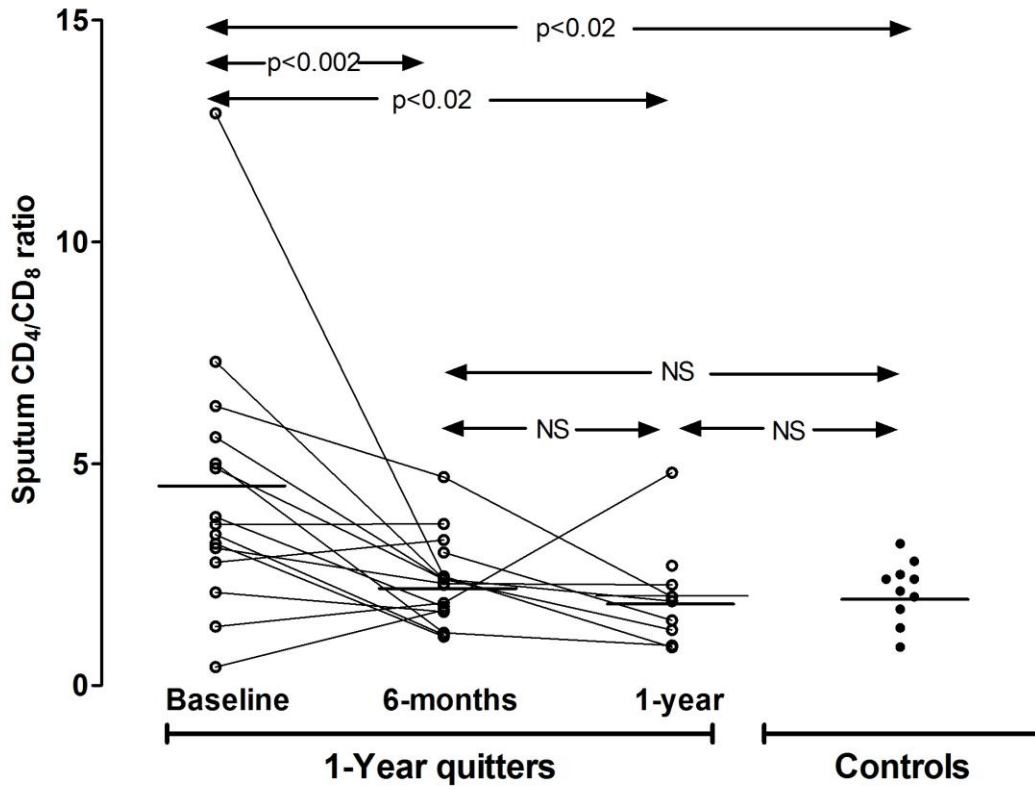
**Σχεδιάγραμμα 3.** Ποσοστό των CD4<sup>+</sup> T-κυττάρων πτυέλων (% λεμφοκυττάρων πτυέλου) στους “υγιείς” καπνιστές πριν τη διακοπή του καπνίσματος (n=16), μεά από 6 μήνες από τη διακοπή του καπνίσματος (n=18) και μετά από ένα έτος από τη διακοπή του καπνίσματος (n=9). Παρουσιάζονται επίσης τα αποτελέσματα από 10 μη καπνιστές (controls).



**Σχεδιάγραμμα 4.** Ποσοστό των CD8<sup>+</sup> T-κυττάρων πτυέλων (% λεμφοκυττάρων πτυέλου) στους “υγιείς” καπνιστές πριν τη διακοπή του καπνίσματος (n=16), μεά από 6 μήνες από τη διακοπή του καπνίσματος (n=18) και μετά από ένα έτος από τη διακοπή του καπνίσματος (n=9). Παρουσιάζονται επίσης τα αποτελέσματα από 10 μη καπνιστές (controls).



**Figure 5.** Ποσοστό των CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T-κυττάρων πτυέλων (% λεμφοκυττάρων πτυέλου) στους “υγιείς” καπνιστές πριν τη διακοπή του καπνίσματος (n=16), μεά από 6 μήνες από τη διακοπή του καπνίσματος (n=18) και μετά από ένα έτος από τη διακοπή του καπνίσματος (n=9). Παρουσιάζονται επίσης τα αποτελέσματα από 10 μη καπνιστές (controls).



**ΕΝΟΤΗΤΑ ΙΙ**  
**ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ**  
**ΠΤΥΕΛΩΝ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ**  
**STRESS ΠΡΙΝ ΚΑΙ ΜΕΤΑ ΤΗ**  
**ΔΙΑΚΟΠΗ ΤΟΥ**  
**ΚΑΠΝΙΣΜΑΤΟΣ**

## Περίληψη

**Σκοπός:** Το κάπνισμα σχετίζεται με αυξημένο οξειδωτικό/ nitrosative stress. Το οξειδωτικό stress επάγει την έκφραση της συνθετάσης του NO (iNOS) και τη νίτρωση της τυροσίνης. Σκοπός της μελέτης μας ήταν να διερευνήσουμε τη μακροχρόνια επίδραση της διακοπής του καπνίσματος στην iNOS και έκφραση της νιτροτυροσίνης.

**Μέθοδος:** Έγινε πρόκληση πτυέλων σε υγιείς καπνιστές πριν (n=67), μετά από 6 μήνες (n=20) και μετά από 1 έτος από τη διακοπή του καπνίσματος (n=13). Εφαρμόστηκε ανοσοκυτταροχημεία για τη μελέτη της iNOS και της έκφρασης της νιτροτυροσίνης στα φλεγμονώδη κύτταρα του πτυέλου των ίδιων ατόμων πριν και μετά τη διακοπή του καπνίσματος.

**Αποτελέσματα:** Τα iNOS<sup>+</sup> φλεγμονώδη κύτταρα (μακροφάγα και πολυμορφοπύρρηνα) εκφραζόμενα ως % των συνολικών φλεγμονοδών κυττάρων ήταν αυξημένα στους καπνιστές (median, range) 57 (17-78) σε σύγκριση με τους μη καπνιστές 18 (9-31) (p<0.0001) και μειώθηκαν στους καπνιστές μετά από 6 μήνες 16 (4-24) και 1 έτος 17 (7-58) από τη διακοπή του καπνίσματος (p<0.0001 και p=0.002, αντίστοιχα). Τα ποσοστά των νιτροτυροσίνη<sup>+</sup> φλεγμονοδών κυττάρων ήταν αυξημένα στους καπνιστές 62 (2-86) σε σύγκριση με τους μη καπνιστές (11-52) (p=0.001) και μειώθηκαν στους καπνιστές μετά από 6 μήνες 18 (4-73) και μετά από 1 έτος 19 (2-26) από τη διακοπή του καπνίσματος (p=0.001 και p=0.004, αντίστοιχα). Δεν ανιχνεύτηκε διαφορά στα % iNOS και νιτροτυροσίνη<sup>+</sup> φλεγμονώδη κύτταρα μεταξύ μη καπνιστών και αυτών που διέκοψαν επιτυχώς το κάπνισμα μετά από 6 μήνες και 1 έτος.

**Συμπεράσματα:** Μετά από 6 μήνες διακοπής καπνίσματος οι κυτταρικοί δείκτες nitrosative stress των αεραγωγών μειώθηκαν στα επίπεδα των μη καπνιστών. Αυτή η μείωση παραμένει μετά από 1 έτος από τη διακοπή του καπνίσματος.

## Εισαγωγή

Το κάπνισμα αποτελεί τον κυριότερο παράγοντα κινδύνου για χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ) και καρκίνο του πνεύμονα (1). Αν και έχει πλήρως διευκρινιστεί, η προκαλούμενη από το κάπνισμα πνευμονική βλάβη επάγει μια διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών στοιχείων που εμπλέκονται στην παθογένεση ορισμένων νόσων του πνεύμονα. Ο καπνός του τσιγάρου περιέχει περίπου  $10^{14}$  ελεύθερες ρίζες/εισπνοή και έως 300 με 500ppm μοοξειδίου του αζώτου (NO) και διοξειδίου του αζώτου (2,3). Αυτό το οξειδωτικό/ nitrosative φορτίο ενισχύεται περαιτέρω από την απελευθέρωση οξειδωτικών από μόνιμα και φλεγμονώδη κύτταρα στα πλαίσια της φλεγμονής που προκαλείται από τον καπνό του τσιγάρου (4-6).

Το οξειδωτικό stress αυξάνει την παραγωγή του NO με την επαγωγή της έκφρασης της επαγωγίσιμης συνθετάσης του μονοξειδίου του αζώτου (inducible Nitric Oxide Synthase -iNOS). Αν και το NO είναι ένα μόριο με σημαντικές αντιφλεγμονώδεις και άλλες ωφέλιμες λειτουργίες (7), κάτω από συνθήκες αυξημένου οξειδωτικού φορτίου αλληλεπιδρά με το οξυγόνο και το υπεροξειδίο, αποδίδοντας οξειδωμένες αντιδρώσες ρίζες αζώτου (reactive nitrogen species -RNS), όπως το υπεροξεινιτρώδες (8). Το υπεροξεινιτρώδες και/ή η εξαρτώμενη από την υπεροξειδάση οξείδωση του νιτρώδους οδηγεί στη νίτρωση της τυροσίνης, η οποία παράγει το σταθερό προϊόν νιτροτυροσίνη (9). Επομένως, η νιτροτυροσίνη αποτελεί δείκτη της κατανάλωσης του NO σε μη αναστρέψιμες οξειδωτικές αντιδράσεις. Η νίτρωση της τυροσίνης δεν αποτελεί μόνο ίχνος αυξημένου οξειδωτικού stress στον πνεύμονα, αλλά μπορεί να διαταράξει τις φυσιολογικές κυτταρικές λειτουργίες και να μειώσει τη βιωσιμότητα των κυττάρων (10). Πρώτα, αναστέλλει τη φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών από τις κινάσες της τυροσίνης, αλληλεπιδρώντας έτσι με το μηχανισμό μετάδοσης του σήματος (9). Έπειτα, συνεισφέρει στο σχηματισμό  $H_2O_2$ , βλάβης στο DNA και καρκινογένεση που σχετίζεται με τη φλεγμονή (11,12).

Η έκφραση της νιτροτυροσίνης στο πλάσμα (13), φλεγμονώδη κύτταρα του πτυέλου και των βρογχικών επιθηλιακών κυττάρων αυξάνεται στους καπνιστές με φυσιολογική αναπνευστική λειτουργία (14-16). Επιπλέον, η έκφραση της iNOS αυξάνεται στα πτύελα (15), καθώς επίσης και στο

βλεννογόνο των βρόγχων σε 'υγιείς' καπνιστές (17). Αυτές οι αλλαγές φαίνονται να σχετίζονται με την παθογένεση πνευμονικών νόσων που σχετίζονται με το κάπνισμα, επειδή η ομάδα μας και άλλοι έχουμε βρει περαιτέρω αύξηση της έκφρασης της iNOS και της νιτροτυροσίνης στη ΧΑΠ και της παροξύνσεις της (8,18).

Παραμένει ασαφές αν η έκφραση της iNOS και/ή νίτρωση της τυροσίνης μειώνονται μετά τη διακοπή του καπνίσματος. Μία cross-sectional μελέτη δε βρήκε διαφορές στην έκφραση της iNOS μεταξύ καπνιστών και πρώην καπνιστών (19). Όμως, μακροχρόνιες μελέτες θεωρούνται πιο κατάλληλες για τη διερεύνηση των επιδράσεων παρεμβάσεων, όπως η διακοπή του καπνίσματος. Υπάρχει μία τέτοια μακροχρόνια μελέτη που απέτυχε να αναγνωρίσει σημαντικές μεταβολές σε δείκτες nitrosative/οξειδωτικού stress στους αεραγωγούς, περιλαμβάνοντας νιτροτυροσίνη πτυέλων, μετά από 3 μήνες από τη διακοπή του καπνίσματος (20). Διεξάγαμε, λοιπόν, μια μεγαλύτερη μακροχρόνια μελέτη για τη διερεύνηση αν η έκφραση της iNOS και της νιτροτυροσίνης στα φλεγμονώδη κύτταρα των πτυέλων θα μεταβληθεί μετά από 6 μήνες και/η 1 έτος από τη διακοπή του καπνίσματος.

### **Υλικά με και μέθοδος**

#### *Ασθενείς*

Στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο του Ηρακλείου, στην Κρήτη, έγινε πρόκληση πτυέλων σε 68 άτομα από το ιατρείο διακοπής καπνίσματος, πριν την έναρξη του πρωτοκόλλου διακοπής του καπνίσματος. Όλα τα άτομα ενημερώθηκαν και έδωσαν γραπτή συγκατάθεση και η Επιτροπή Ηθικής του Πανεπιστημιακού νοσοκομείου έδωσε επίσημη έγκριση. Όλοι οι καπνιστές συμμετείχαν στο ίδιο συμπεριφορικό πρόγραμμα και ανάλογα με το βαθμό εξάρτησης (Fagerstrom test) έλαβαν θεραπεία υποκατάστασης με νικοτίνη και/ή βουπροπιόνη για τη θεραπεία διακοπής καπνίσματος, κατά τη διάρκεια των 3 πρώτων μηνών. Δέκα μη καπνιστές (που δεν είχαν καπνίσει ποτέ) στρατολογήθηκαν μέσω διαφήμισης και αποτέλεσαν την ομάδα των μαρτύρων (controls). Όλα τα άτομα ήταν ελεύθερα λοιμώξεων αναπνευστικού κατά τη μελέτη ή κατά το μήνα που προηγήθηκε της μελέτης και στον επανέλεγχο μετά από 6 και 12 μήνες. Τα άτομα δεν έπασχαν από κάποια νόσο και δεν ελάμβαναν φαρμακευτική αγωγή στην πρώτη επίσκεψη, ενώ

κανείς δεν παρουσίασε συμπτώματα χρόνιας βρογχίτιδας. Επιπλέον, ο έλεγχος λειτουργικών δοκιμασιών του πνεύμονα ήταν μέσα στα φυσιολογικά όρια και η ακτινογραφία θώρακά τους ήταν φυσιολογική. Τα χαρακτηριστικά των συμμετεχόντων ατόμων φαίνονται στον πίνακα 1. Ο υπό μελέτη πληθυσμός συμμετείχε στην πρηγούμενη μελέτη που αναφέρθηκε για τη διερεύνηση των επιδράσεων της διακοπής του καπνίσματος στους υποπληθυσμούς των T-λεμφοκυττάρων στα πτύελα (21).

### **Πρόκληση πτυέλων, επεξεργασία και ανοσοκυτταροχημεία**

Η πρόκληση και επεξεργασία των πτυέλων έγινε όπως περιγράφηκε προηγουμένως (22). Δύο πλακάκια βάφτηκαν με May-Grunwald-Giemsa για να υπολογιστεί ο τύπος των φλεγμονωδών κυττάρων στο πτύελο και τα υπόλοιπα φυλάχτηκαν στους  $-80^{\circ}\text{C}$  μέχρι να γίνει η ανοσοκυτταροχημική ανάλυση. Η καταμέτρησή των κυττάρων έγινε από έναν ερευνητή (IB), που δε γνώριζε την προέλευση των δειγμάτων. Τουλάχιστον 400 κύτταρα μετρήθηκαν. Η διαφορική καταμέτρηση των κυττάρων εκφράστηκε ως % των συνολικών μη πλακωδών κυττάρων του πτυέλου.

Η ανοσοκυτταροχημεία εφαρμόστηκε για τη μελέτη της έκφρασης της iNOS και της νιτροτυροσίνης στα κύτταρα των πτυέλων. Οι ανοσοκυτταροχημικές χρώσεις εφαρμόστηκαν μόνο σε δείγματα καλής ποιότητας από τα άτομα που κατάφεραν επιτυχώς να διακόψουν το κάπνισμα. Τα δείγματα των κυττάρων των πτυέλων μονιμοποιήθηκαν στην ακετόνη για 5 λεπτά και εμβαπτίστηκαν στο Tris-maleate buffer (Trizma, T3128; Sigma) που περιείχε saponin (S4521; Sigma) σε pH 7.6. Οι διαδικασίες της χρώσης εφαρμόστηκαν με τη χρήση του antimouse, antirabbit immunostaining system (UltraVision LP Detection System; LabVision Corporation; Thermo Fisher Scientific; Fremont, CA, USA). Η μη ειδική αναγνώριση εμποδίστηκε με την επικάλυψη με Ultra V Block (TA-125-UB; LabVision Corporation) για 7 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τα ακόλουθα πρωτογενή αντισώματα χρησιμοποιήθηκαν: για την χρώση της iNOS, το anti-iNOS rabbit antihuman antibody (sc651 [διαλυμένο 1:200]; Santa Cruz Biotechnology, Inc) για 1h σε θερμοκρασία δωματίου, και για τη χρώση της νιτροτυροσίνης, το antinitrotyrosine rabbit antihuman antibody (διαλυμένο 1:100) [Upstate; Lake Placid, NY] για 1 h σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά



από την επώαση με το πρωτογενές αντίσωμα, τα πλακάκια πλύθηκαν και βάφτηκαν με το δευτερογενές αντίσωμα για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά από περαιτέρω πλύσιμο, το AP polymer εφαρμόστηκε για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τα πλακάκια πλύθηκαν ξανά και βάφτηκαν με το Fast Red για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Οι διαλύσεις και το πλύσιμο έγιναν με το preincubation solution. Τα πλακάκια έπειτα βάφτηκαν με hematoxylin για 5 min και μονιμοποιήθηκαν (Glycergel, C0563; DAKO). Πειράματα με αρνητικό control για μη ειδική σύνθεση έγιναν με παρόμοιο τρόπο αλλά απουσία πρωτογενούς αντισώματος. Το πρωτογενές αντίσωμα αντικαταστάθηκε με μη ειδικό Ig του ίδιου είδους όπως το πρωτογενές αντίσωμα ή το preincubation solution. Στα πλακάκια με χρώση, τα πολυμορφοπύρρηνα κύτταρα και τα μακροφάγα αναγνωρίστηκαν από τη μορφολογική ανάλυση, και τα θετικά χρωσμένα κύτταρα μέσα σε 500 φλεγμονώση κύτταρα μετρήθηκαν με τη χρήση μικροσκοπίου φωτός. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως % των θετικών κυττάρων εντός κάθε υποπληθυσμού λευκοκυττάρων και ως % των θετικών φλεγμονωδών κυττάρων στα συνολικά λευκοκύτταρα, δηλαδή πολυμορφοπύρρηνα κύτταρα και μακροφάγα. Εντός του πληθυσμού των πολυμορφοπυρήνων, υπήρχαν κυρίως ουδετερόφιλα και πολύ σπάσια ηωσινόφιλα, όπως φαίνεται στα πλακάκια χρωσμένα με May-Grunwald-Giemsa (Πίνακας 2). Όλες οι αναλύσεις έγιναν από ένα ερευνητή (IB). Τρεις πανομοιότυπες μετρήσεις έγιναν σε 10 τυχαία επιλεγμένα πλακάκια και ο intra-observer coefficient of variation (CV) ήταν < 10%. Για την εκτίμηση του inter-observer CV, δύο ερευνητές (MT and IB) έκαναν μετρήσεις στα ίδια 10 τυχαία επιλεγμένα πλακάκια. Ο inter-observer CV ήταν < 10%.

#### *Στατιστική ανάλυση*

Η κανονικότητα ελέγχθηκε με το Shapiro-Wilk test. Οι μεταβλητές ήταν μη-κανονικά κατανεμημένες. Μόνο τα άτομα που κατάφεραν επιτυχώς να διακόψουν το κάπνισμα στους 6 μήνες (n=20) και 1 έτος (n=13) συμπεριλήφθηκαν στην ανάλυση των επαναλαμβανόμενων μετρήσεων με τη χρήση του Friedman test ακολουθούμενο από το Wilcoxon Signed Ranks test για αν δούμε pair-wise differences. Οι διαφορές μεταξύ καπνιστών και του control group ελέγχθηκαν με το Mann-Whitney U test. Το software StatsDirect (SPSS Statistics 17.0.0 CHICAGO IL, USA) χρησιμοποιήθηκε. Τιμές <0.05

θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές.

### **Αποτελέσματα**

Συνολικά 68 καπνιστές 10 controls συμμετείχαν στη μελέτη. Καλής ποιότητας δείγματα πτυέλων αποκτήθηκαν a) στο baseline από 67 “υγείς” καπνιστές, b) μετά από 6 μήνες από τη διακοπή του καπνίσματος από 20 άτομα, c) και μετά από 1 έτος από τη διακοπή του καπνίσματος από 13 άτομα, και d) από όλους τους 10 controls.

Σε ένα άτομο ο αριθμός των κυττάρων του πτυέλου ήταν ανεπαρκής για την εκτίμηση iNOS θετικών κυττάρων μετά από 6 μήνες από τη διακοπή του καπνίσματος. Σε 2 άτομα ο αριθμός των κυττάρων των πτυέλων κρίθηκε ανεπαρκής για την εκτίμηση των θετικών σε νιτροτυροσίνη κυττάρων 1 έτος μετά τη διακοπή του καπνίσματος. Τριάντα πέντε από όλους τους συμμετέχοντες έλαβαν βουπροπιόνη (52%), 5 θεραπεία υποκατάστασης με νικοτίνη (7%), 23 και τα δύο φάρμακα (34%) και 5 αρνήθηκαν να λάβουν θεραπεία (7%). Η διάρκεια της θεραπείας ήταν median (range), 3.5 (0-10) εβδομάδες. Από αυτούς που κατάφεραν να διακόψουν το κάπνισμα στους 6 μήνες (n=20), 13 έλαβαν βουπροπιόνη (65%), 1 θεραπεία υποκατάστασης με νικοτίνη (5%), 5 και τα δύο φάρμακα (25%) και 1 αρνήθηκε να λάβει θεραπεία (5%), ενώ από αυτούς που διέκοψαν το κάπνισμα στο 1 έτος (n=13), 10 (77%) έλαβαν βουπροπιόνη, 1 θεραπεία υποκατάστασης με νικοτίνη (8%) και 2 και τα δύο φάρμακα (15%). Η διάρκεια της θεραπείας ήταν 5 (0-8) εβδομάδες για τους επιτυγχόντες στους 6 μήνες και 5 (3-8) εβδομάδες για τους επιτυγχόντες στο 1 έτος.

Τα χαρακτηριστικά των πτυέλων των καπνιστών και των control παρουσιάζονται στον πίνακα 2. Όπως έχουμε ήδη περιγράψει, οι επιτυγχόντες ήταν 20/68 (29.4%) στους 6 μήνες και 13/68 (19%) στο 1 έτος. Τα γενικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων (βάρος, συνολικός αριθμός κυττάρων, συνολικός αριθμός κυττάρων ανά γραμμάριο και ζωτικότητα δείγματος) δε διέφεραν μεταξύ των διαφορετικών ομάδων ή σε διαφορετικά σημεία στο χρόνο. Τα ποσοστά των ουδετεροφίλων και των μακροφάγων ήταν όμοια μεταξύ καπνιστών και μη καπνιστών και δε μεταβλήθηκαν μετά από 6 μήνες από τη διακοπή του καπνίσματος. Μετά από 1 έτος από τη διακοπή του καπνίσματος, το ποσοστό των ουδετεροφίλων αυξήθηκε ( $p=0.01$ ) και το

ποσοστό των μακροφάγων μειώθηκε ( $p=0.007$ ) σε σύγκριση με τις μετρήσεις αναφοράς στους επιυχόντες.

Τα αποτελέσματα για τα ποσοστά της iNOS και νιτροτυροσίνης θετικών πολυμορφοκυττάρων, μικροφάγων και συνολικών φλεγμονοδών κυττάρων για κάθε άτομο φαίνεται στις εικόνες 1-3. Τα ποσοστά των iNOS<sup>+</sup> φλεγμονοδών κυττάρων και τα ποσοστά των νιτροτυροσίνης<sup>+</sup> φλεγμονοδών κυττάρων βρέθηκαν αυξημένα στους καπνιστές (baseline) σε σύγκριση με τους μη καπνιστές ( $p<0.0001$  και  $p=0.001$ , αντίστοιχα). Επιπλέον, τα % iNOS<sup>+</sup> φλεγμονώδη κύτταρα μειώθηκαν μετά από 6 μήνες από τη διακοπή του καπνίσματος ( $p<0.0001$ ) και μετά από 1 έτος από τη διακοπή του καπνίσματος ( $p=0.002$ ), φτάνοντας τα επίπεδα των μη καπνιστών. Ομοίως, τα % νιτροτυροσίνη<sup>+</sup> φλεγμονώδη κύτταρα μειώθηκαν μετά από 6 μήνες από τη διακοπή του καπνίσματος ( $p=0.001$ ) και μετά από 1 έτος από τη διακοπή του καπνίσματος ( $p=0.004$ ) στα επίπεδα των μη καπνιστών.

## Συζήτηση

Η παρούσα μελέτη έγινε για τη διερεύνηση των επιδράσεων της διακοπής του καπνίσματος στο nitrosative stress των αεραγωγών. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι 6 μήνες διακοπής καπνίσματος μειώνουν την έκφραση των φλεγμονοδών κυττάρων των πτυέλων σε iNOS και νιτροτυροσίνη στα επίπεδα των μη καπνιστών. Η έκφραση της iNOS και νιτροτυροσίνης παρέμεινε σε χαμηλά επίπεδα 1 έτος μετά τη διακοπή του καπνίσματος, υποδηλώνοντας ότι οι παρατηρούμενες αλλαγές παραμένουν για αρκετό χρονικό διάστημα.

Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η νίτρωση της τυροσίνης, εκτιμώμενη με την έκφραση της νιτροτυροσίνης, αυξάνεται στα φλεγμονώδη κύτταρα του πτυέλου (14,15,20) και στα επιθηλιακά κύτταρα των βρόγχων, (16) καπνιστών με φυσιολογική αναπνευστική λειτουργία. Ομοίως, η έκφραση της iNOS αυξάνεται στα πτύελα καθώς και στο βλεννογόνο των βρόγχων υγιών καπνιστών (15,17). Οι 'υγιείς' καπνιστές που συμμετείχαν στην παρούσα μελέτη παρουσίασαν αυξημένο ποσοστό iNOS<sup>+</sup> και νιτροτυροσίνης<sup>+</sup> φλεγμονοδών κυττάρων των πτυέλων σε σύγκριση με τους μη καπνιστές. Ο πρωταρχικός μας σκοπός ήταν η διερεύνηση του αν η έκφραση της iNOS και νιτροτυροσίνης θα μειωνόταν μετά τη διακοπή του καπνίσματος. Πράγματι,

παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στην έκφραση και της iNOS και της νιτροτυροσίνης στα φλεγμονώση κύτταρα μετά τη διακοπή του καπνίσματος. Αυτή η μείωση ήταν ήδη εμφανής από τους πρώτους 6 μήνες από τη διακοπή του καπνίσματος και παρέμεινε για τουλάχιστον 1 έτος. Μάλιστα, η κυτταρική έκφραση της iNOS και νιτροτυροσίνης έφτασε τα επίπεδα των μη καπνιστών και στους 6 μήνες και στο 1 έτος από τη διακοπή του καπνίσματος.

Μια προηγούμενη μακροχρόνια μελέτη που εκτίμησε την επίδραση 1 και 3 μηνών διακοπής καπνίσματος σε ένα μεικτό πληθυσμό καπνιστών με φυσιολογική αναπνευστική λειτουργία, ασθματικών και ασθενών με ΧΑΠ, έδειξε ελάχιστες ή καθόλου μεταβολές στους δείκτες nitrosative και οξειδωτικού stress μετά τη διακοπή του καπνίσματος (20). Αυτό μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι ο υπο μελέτη πληθυσμός ήταν μικτός (ΧΑΠ και ασθματικοί). Σε αυτές τις νόσους, ειδικά στη ΧΑΠ, το οξειδωτικό stress είναι επίσης συνέπεια της ίδιας της νόσου. Μία άλλη εξήγηση είναι ότι πάνω από 3 μήνες διακοπής καπνίσματος απαιτούνται για να δούμε αλλαγές στο οξειδωτικό /nitrosative stress που να σχετίζεται με το κάπνισμα.

Θεωρώντας ότι το κάπνισμα από μόνο του είναι μία πλούσια πηγή οξειδωτικών, μια εμφανής εξήγηση για την παρατηρούμενη μείωση του nitrosative stress μετά τη διακοπή του καπνίσματος είναι η διατάραξη της έκθεσης στον καπνό του τσιγάρου. Αν αυτό θεωρείται η κύρια και μοναδική εξήγηση, τότε αυτή η μείωση θα έπρεπε να παρουσιαστεί σύντομα μετά τη διακοπή του καπνίσματος. Σε αντίθεση, υπάρχει ελάχιστη έως καθόλου μεταβολή στο nitrosative/οξειδωτικό stress μετά από 1 και 3 μήνες από τη διακοπή του καπνίσματος (20). Μία εναλλακτική εξήγηση θα μπορούσε να είναι ότι η μείωση στον αριθμό και/ή δραστηριότητα των φλεγμονοδών κυττάρων των αεραγωγών μετά τη διακοπή του καπνίσματος συνοδεύεται από μία μείωση της απελευθέρωσης των αντιδρωσών ριζών οξυγόνου (reactive oxygen species -ROS) από αυτά τα κύτταρα. Σε υποστήριξη αυτής της υπόθεσης, οι αριθμοί των μακροφάγων και των ουδετεροφίλων μειώνονται προς φυσιολογικές τιμές μετά τη διακοπή του καπνίσματος (23-27). Το εύρημα αυτής της μελέτης έδειξε μία μείωση στα μακροφάγα των πτυέλων μετά τη διακοπή του καπνίσματος. Όμως, οι αριθμοί των ουδετεροφίλων των πτυέλων αυξήθηκαν. Αν και αυτό φαίνεται να είναι αντιφατικό, παρόμοιες παρατηρήσεις έχουν γίνει και από άλλους συγγραφείς

(28,29) και έχει προταθεί ότι οι αυξημένοι αριθμοί των ουδετεροφίλων στα πτύελα μετά τη διακοπή του καπνίσματος πιθανώς παίζει προστατευτικό ρόλο στο βρογχικό βλεννογόνο (30). Τα ευρήματά μας υποστηρίζουν περαιτέρω αυτή την υπόθεση αφού τα ουδετερόφιλα των πτυέλων, αν και αυξημένα στον αριθμό μετά τη διακοπή του καπνίσματος, επιδεικνύουν χαμηλή έκφραση iNOS και νιτροτυροσίνης (Πίνακας 2), που πιθανώς σημαίνει μειωμένη κατάσταση ενεργοποίησης.

Η μελέτη μας έχει κάποιους περιορισμούς που πρέπει να σχολιαστούν. Πρώτον, τα δεδομένα μας πιθανά να δεχτούν κριτική λόγω του γεγονότος ότι 20 και 13 άτομα (επιτυχόντες στους 6 μήνες και 1 έτος, αντίστοιχα) ολοκλήρωσαν τη μελέτη. Παρόλα αυτά, αυτό είναι συχνό σε κλινικές διακοπής καπνίσματος, όπου οι υποτροπές είναι συχνές. Επίσης περιορίσαμε την επαναλαμβανόμενη ανάλυση μόνο στους επιτυχόντες. Δεύτερον, μελετήσαμε την έκφραση της iNOS στα φλεγμονώση κύτταρα του πτυέλου, δηλαδή κύτταρα που έχουν μεταναστεύσει από το τοίχωμα των αεραγωγών στον αυλό των αεραγωγών. Επομένως, η πιθανότητα η πιθανότητα μειωμένης έκφρασης της iNOS μετά την έξοδο από τα κύτταρα από το τοίχωμα των αεραγωγών να μη μπορεί να αποκλειστεί. Δυστυχώς, μέθοδοι μελέτης άμεσα των φλεγμονοδών κυττάρων του τοιχώματος των αεραγωγών, όπως η εξέταση βρογχικών βιοψιών, ή δειγμάτων από χειρουργεία εκτομής του πνεύμονα, δεν μπορούν να εφαρμοστούν εύκολα σε μακροχρόνιες μελέτες και σε υγιή άτομα. Επίσης ο σχηματισμός της νιτροτυροσίνης είναι μη αντιστρεπτός και επομένως η έκφραση της νιτροτυροσίνης δεν μπορεί να μειωθεί μετά τη μετανάστευση των κυττάρων από το τοίχωμα των αεραγωγών στον αυλό. Τέλος, η μέση ηλικία της ομάδας των καπνιστών ήταν μεγαλύτερη από αυτή των control και θα μπορούσε κάποιος να αποδώσει τις διαφορές μεταξύ καπνιστών και μη καπνιστών στη διαφορά ηλικίας. Αν και αυτό δεν μπορεί να αποκλειστεί, μια ανάλυση των υποομάδων των διαφορετικών ηλικιών δεν έδειξε διαφορές (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται). Επιπλέον, τα ευρήματά μας του nitrosative stress στους καπνιστές επιβεβαιώνονται και από άλλες μελέτες (14-17, 20).

Συμπερασματικά, δείξαμε ότι μετά από 6 μήνες διακοπής καπνίσματος, οι δείκτες nitrosative stress στα προκλητά πτύελα καπνιστών με φυσιολογική αναπνευστική λειτουργία μειώνονται στα επίπεδα ατόμων που δεν έχουν

καπνίσει ποτέ. Αυτά τα ευρήματα δείχνουν ότι οι σχετιζόμενοι με το κάπνισμα οξειδωτικοί μηχανισμοί που επάγουν την έκφραση της iNOS και της νίτρωσης της τυροσίνης εξασθενούν με τη διακοπή του καπνίσματος.

## Βιβλιογραφία:

1. Sethi JM, Rochester CL. Smoking and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Clin Chest Med*. 2000;21(1):67–86.
2. Pryor WA, Stone K. Oxidants in cigarette smoke. Radicals, hydrogen peroxide, peroxyxynitrate, and peroxyxynitrite. *Ann N Y Acad Sci*. 1993;686:12-27.
3. Rahman I, MacNee W. Role of oxidants/antioxidants in smoking-induced lung diseases. *Free Radic Biol Med*. 1996;21(5):669-681.
4. Cross CE., van der Vliet A., Eiserich JP. Cigarette smokers and oxidant stress: a continuing mystery. *Am J Clin Nutr*. 1998;67(2):184-185.
5. Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, et al. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*. 2004;350(26):2645–2653.
6. Saetta M, Turato G, Maestrelli P, et al. Cellular and structural bases of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;163(6):1304–1309.
7. Barnes PJ, Belsivi MG. Nitric oxide and lung disease. *Thorax*. 1993;48(10):1034–1043.
8. Ricciardolo FL, Di Stefano A, Sabatini F, et al. Reactive nitrogen species in the respiratory tract. *Eur J Pharmacol*. 2006;533(1-3):240-252.
9. van der Vliet A, Eiserich JP, Shigenaga MK, et al. Reactive nitrogen species and tyrosine nitration in the respiratory tract: epiphenomena or a pathobiologic mechanism of disease? *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;160(1):1-9.
10. Andreadis AA, Hazen SL, Comhair SA, et al. Oxidative and nitrosative events in asthma. *Free Radic Biol Med*. 2003;35(3):213–225.
11. Murata M, Kawanishi S. Oxidative DNA damage induced by nitrotyrosine, a biomarker of inflammation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;316(1):123-128.
12. Siafakas NM. "In the Beginning" of COPD: is evolution important? *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;175(5):423-4.
13. Petruzzelli S, Puntoni R, Mimotti P, et al. Plasma 3-nitrotyrosine in cigarette smokers. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997;156(6):1902-1907.

14. Brindicci C, Ito K, Torre O, et al. Effects of aminoguanidine, an inhibitor of inducible nitric oxide synthase, on nitric oxide production and its metabolites in healthy control subjects, healthy smokers, and COPD patients. *Chest*. 2009;135(2):353-367.
15. Rytild P, Rehn T, Ilumets H, et al. Increased oxidative stress in asymptomatic current chronic smokers and GOLD stage 0 COPD. *Respir Res*. 2006;7:69.
16. Puhakka A, Harju T, Pöðkkø P, et al. Nitric oxide synthases are associated with bronchial dysplasia. *Lung Cancer* 2006;51(3):275-282
17. Ricciardolo FL, Caramori G, Ito K, et al. Nitrosative stress in the bronchial mucosa of severe chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;116(5):1028-1035.
18. Tsoumakidou M, Tzanakis N, Chrysofakis G, et al. Nitrosative stress, heme oxygenase-1 expression and airway inflammation during severe exacerbations of COPD. *Chest*. 2005;127(6):1911-1918.
19. Rutgers SR, van der Mark TW, Coers W, et al. Markers of nitric oxide metabolism in sputum and exhaled air are not increased in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*. 1999;54(7):576-580.
20. Louhelainen N, Rytild P, Haahtela T, et al. Persistence of oxidant and protease burden in the airways after smoking cessation. *BMC Pulm Med*. 2009;9:25.
21. Bouloukaki I, Tsoumakidou M, Vardavas C, et al. Maintained Smoking Cessation for 6 Months Equilibrates the Percentage of Sputum CD8+ Lymphocyte Cells with that of Non Smokers. *Mediators of Inflammation*. 2009;2009:812102.
22. Tsoumakidou M, Tzanakis N, Siafakas NM. Induced sputum in the investigation of airway inflammation of COPD. *Respiratory Journal*. 2003;97(8):863-871.
23. Skold CM, Forslid J, Eklund A, Hed J. Metabolic activity in human alveolar macrophages increases after cessation of smoking. *Inflammation* 1993;17:345–352
24. Skold CM, Blasche E, Eklund A. Transient increases in albumin and hyaluronan in bronchoalveolar lavage fluid after quitting smoking: possible signs of reparative mechanisms. *Respir Med*. 1996;90(9):523-529.



25. Capelli A, Di Stefano A, Gnemmi I, et al. Increased MCP-1 and MIP-1beta in bronchoalveolar lavage fluid of chronic bronchitics. *Eur Respir J.* 1999;14(1):160–165.
26. Skold CM, Hed J, Eklund A. Smoking cessation rapidly reduces cell recovery in bronchoalveolar lavage fluid, while alveolar macrophage fluorescence remains high. *Chest.* 1992;101(4):989-995.
27. Swan GE, Hodgkin JE, Roby T, et al. Reversibility of airways injury over a 12-month period following smoking cessation. *Chest.* 1992;101(3):607-612.
28. Willemse BW, ten Hacken NH, Rutgers B, et al. Effect of 1-year smoking cessation on airway inflammation in COPD and asymptomatic smokers. *Eur Respir J.* 2005;26(5):835-845
29. Willemse BW, ten Hacken NH, Rutgers B, et al. Smoking cessation improves both direct and indirect airway hyperresponsiveness in COPD. *Eur Respir J.* 2004;24(3):391-396.
30. Uller L, Persson CG, Erjefält JS. Resolution of airway disease: removal of inflammatory cells through apoptosis, egression or both? *Trends Pharmacol Sci.* 2006;27(9):461-466.

## ΠΙΝΑΚΕΣ

Πίνακας 1. Χαρακτηριστικά των ατόμων

Χρόνος	Καπνιστές			Μη-καπνιστές
	Πριν τη διακοπή 0	Μετά τη διακοπή 6m	Μετά τη διακοπή 12m	0
<b>N</b>	67	20	13	10
<b>Φύλο, Α/Γ</b>	58/9	19/1	13/0	8/2
<b>Ηλικία, (έτη)</b>	48±9	49±8	49 ± 6	33±9*
<b>Κάπνισμα (p-yr)</b>	57±18	54±15	57 ± 14	N/A
<b>FEV<sub>1</sub>,%pred</b>	104±11	105±13	108 ± 9	114±14
<b>FEV<sub>1</sub>/FVC%</b>	80 ± 6	81 ± 5	80 ± 6	87 ± 6
<b>Fagerstrom</b>	8±1	7±1	7 ± 1	N/A

Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως mean ±SD, ή σε απόλυτους αριθμούς, N/A: δεν εφαρμόζεται, N: αριθμός, Α: άνδρες, Γ: γυναίκες, FEV<sub>1</sub>: forced expiratory volume in one second; FVC: forced vital capacity

\*p value μεταξύ controls και επιτυχόντων που διέκοψαν το κάπνισμα

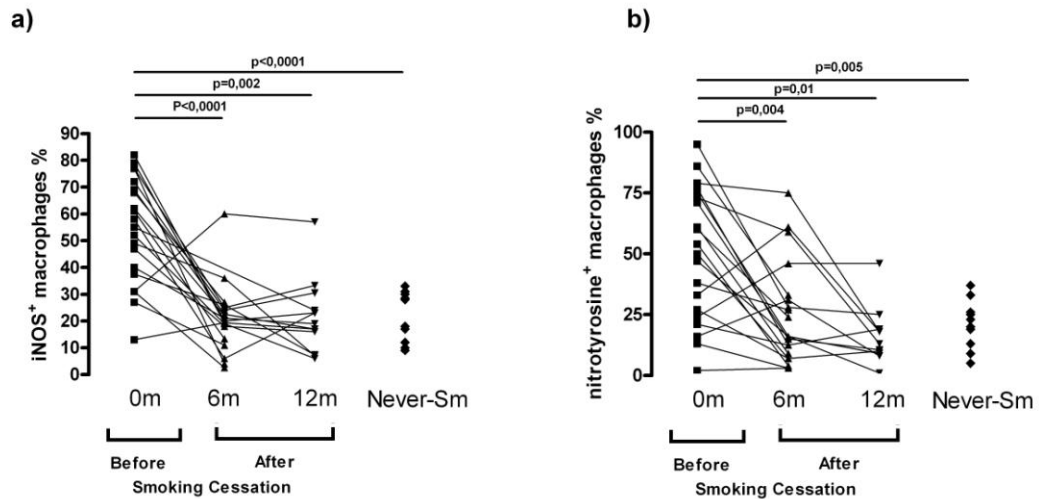
**Πίνακας 2.** Χαρακτηριστικά των πτυέλων και διαφορική καταμέτρηση κυττάρων

<b>Χρόνος</b>	<b>Καπνιστές</b>			<b>Μη καπνιστές</b>
	<i>Πριν τη διακοπή 0</i>	<i>Μετά τη διακοπή 6m</i>	<i>Μετά τη διακοπή 12m</i>	0
<b>Βάρος,gr</b>	1.4 (0.3-3.7)	1 (0.5-3.5)	1.1(0.3-3.2)	1.41 (0.35-5.04)
<b>TCC, x10<sup>6</sup></b>	2.3 (0.5-11.2)	4.3 (0.6-11.8)	3.6 (0.5-19.6)	5.29 (1.2-7)
<b>TCC, x10<sup>6</sup>/gr</b>	1.6 (0.2-11.6)	5 (0.5-11.8)	2.6 (0.5-46.7)	2.18 (0.7-6.7)
<b>Ζωτικότητα %</b>	76.7 (50.6-96.9)	92.5 (50-99.4)	88.5 (70.4-98.5)	84.71 (67-98.8)
<b>Επιθηλιακά %</b>	10.6 (0.01-43.7)	7.2 (0-20)	5 (0.5-39)	10.8 (2.31-48.5)
<b>Πολυμορφοπύρηνα %</b>	48.6 (17.7-79.8)	57.4 (16.9-87.9)	61 (36-84.8) *	40.5 (3.6-94)
<b>Μακροφάγα %</b>	49.7 (20.1-80.3)	41 (11.2-82.2)	34.5 (14.5-57.3) *	55 (5.4-94)
<b>Λεμφοκύτταρα %</b>	0.1 (0-1.6)	0.25 (0-1.5)	0.5 (0-1.6)	0.55 (0-4.1)
<b>Ηωσινόφιλα %</b>	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0.5)

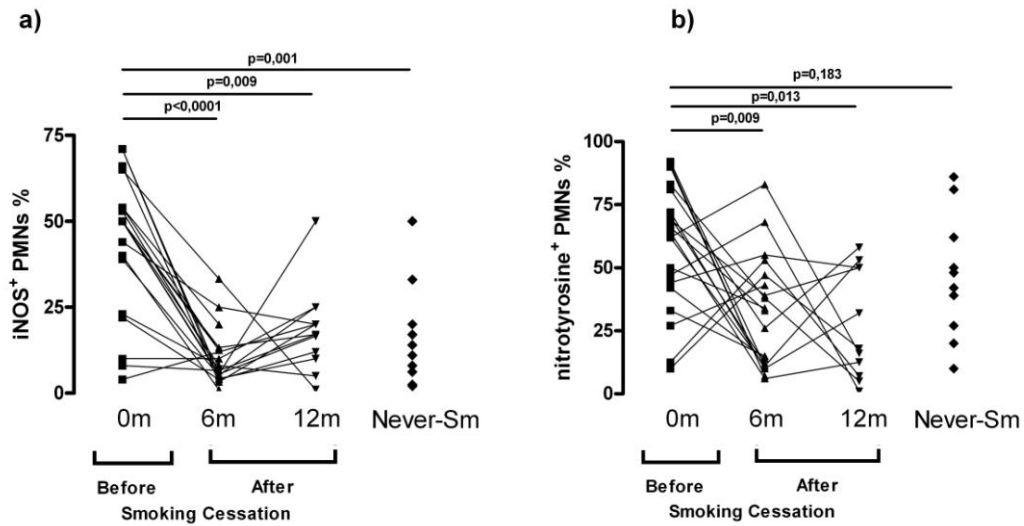
Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως median (range). TCC: ολικός αριθμός κυττάρων (total cell count). Τα επιθηλιακά κύτταρα εκφράζονται ως ποσοστό όλων των κυττάρων, οι διάφοροι κυτταρικοί πληθυσμοί παρουσιάζονται ως % όλων των μη επιθηλιακών κυττάρων του πτυέλου, η ζωτικότητα παρουσιάζεται ως % των ζωντανών μη-επιθηλιακών κυττάρων προς τα συνολικά μη-επιθηλιακά κύτταρα.

\*  $p < 0.05$  versus επιτυχόντων πριν τη διακοπή του καπνίσματος,

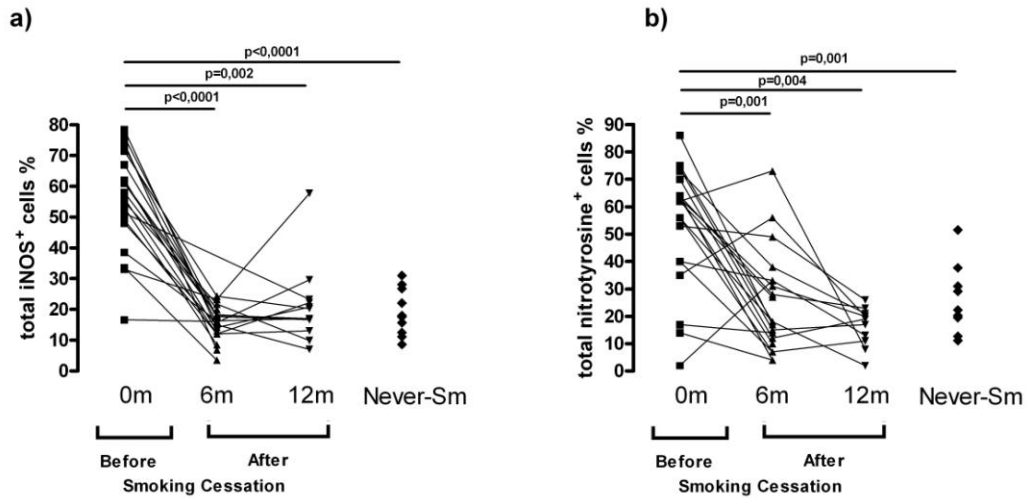
**Σχεδιάγραμμα 1.** Ποσοστά των iNOS και νιτροτυροσίνη θετικών μακροφάγων στους ίδιους καπνιστές στο baseline, μετά από 6 μήνες από τη διακοπή του καπνίσματος και μετά από 1 έτος από τη διακοπή του καπνίσματος. Τα αποτελέσματα από 10 μη-καπνιστές (controls) παρουσιάζονται επίσης.



**Σχεδιάγραμμα 2.** Ποσοστά των iNOS και νιτροτυροσίνη θετικών πολυμορφοπυρήνων κυττάρων στους ίδιους καπνιστές στο baseline, μετά από 6 μήνες από τη διακοπή του καπνίσματος και μετά από 1 έτος από τη διακοπή του καπνίσματος. Τα αποτελέσματα από 10 μη-καπνιστές (controls) παρουσιάζονται επίσης.



**Σχεδιάγραμμα 3.** Ποσοστά των iNOS και νιτροτυροσίνη θετικών συνολικών φλεγμονωδών κυττάρων στους ίδιους καπνιστές στο baseline, μετά από 6 μήνες από τη διακοπή του καπνίσματος και μετά από 1 έτος από τη διακοπή του καπνίσματος. Τα αποτελέσματα από 10 μη-καπνιστές (controls) παρουσιάζονται επίσης.



**ΕΝΟΤΗΤΑ ΙΙΙ**  
**ΔΕΙΚΤΕΣ ΦΛΕΓΜΟΝΗΣ**  
**ΠΤΥΕΛΩΝ ΚΑΙ ΡΙΝΙΚΟΥ**  
**ΕΚΠΛΥΜΑΤΟΣ ΠΡΙΝ ΚΑΙ**  
**ΜΕΤΑ ΤΗ ΔΙΑΚΟΠΗ ΤΟΥ**  
**ΚΑΠΝΙΣΜΑΤΟΣ**

## Περίληψη

**Σκοπός:** Λίγα είναι γνωστά για την επίδραση της διακοπής του καπνίσματος στη φλεγμονή των αεραγωγών. Ο αναστολέας της πρωτεάσης που εκκρίνεται από τα λευκοκύτταρα (Secretory Leukocyte Protease Inhibitor -SLPI), η πρωτεΐνη Clara 16 (CC16), η ελαφίνη και η ανθρώπινη ντεφενσίνη β-2 (human defensin beta-2 -HBD-2) προστατεύουν τους αεραγωγούς έναντι λοιμώξεων, φλεγμονής, και οξειδωτικού stress. Σε αυτή τη μακροχρόνια μελέτη ο σκοπός μας ήταν να διερευνήσουμε αλλαγές στα πτύελα και ρινικό έκπλυμα των επιπέδων των SLPI, CC16, ελαφίνης και HBD-2 σε υγιείς καπνιστές μετά από 6 και 12 μήνες διακοπής καπνίσματος.

**Υλικό και Μέθοδος:** Ελήφθησαν προκλητά πύελα και ρινικό έκπλυμα από υγιείς καπνιστές (n=76) πριν τη διακοπή του καπνίσματος, 6 μήνες μετά τη διακοπή του καπνίσματος (n=29), και 1 έτος μετά τη διακοπή του καπνίσματος (n=22) και από 10 υγιείς μη καπνιστές. Τα επίπεδα των SLPI, CC16, ελαφίνης και HBD-2 μετρήθηκαν στα υπερκείμενα πτυέλων και ρινικού εκπλύματος από εμπορικά διαθέσιμα ELISA kits.

**Αποτελέσματα:** Τα επίπεδα των SLPI και CC-16 των πτυέλων ήταν αυξημένα στους υγιείς καπνιστές πριν τη διακοπή του καπνίσματος σε σύγκριση με τους μη καπνιστές ( $p=0.005$  και  $p=0.08$  αντίστοιχα). Τα επίπεδα των SLPI και CC16 δε διέφεραν πριν και 6 μήνες από τη διακοπή του καπνίσματος ( $p=0.118$  και  $p=0.543$  αντίστοιχα), ούτε πριν και 1 έτος μετά τη διακοπή καπνίσματος ( $p=0.363$  και  $p=0.470$  αντίστοιχα). Ο SLPI του ρινικού εκπλύματος μειώθηκε 12 μήνες μετά τη διακοπή του καπνίσματος ( $p=0.033$ ). Τα επίπεδα της ελαφίνης του ρινικού εκπλύματος βρέθηκαν αυξημένα στους υγιείς καπνιστές πριν τη διακοπή του καπνίσματος σε σύγκριση με τους μη καπνιστές ( $p=0.007$ ), αλλά δε μεταβλήθηκαν 6 και 12 μήνες από τη διακοπή του καπνίσματος.

**Συμπεράσματα:** Μόνο τα επίπεδα του SLPI του ρινικού εκπλύματος μειώνονται 1 έτος μετά τη διακοπή του καπνίσματος. Υποθέτουμε ότι υπάρχει μια συνεχιζόμενη φλεγμονώδη διεργασία που διεγείρει την παραγωγή αντισταθμιστικών πρωτεϊνών στους αεραγωγούς των υγιών πρώην καπνιστών.



## Εισαγωγή

Το κάπνισμα, όπως έχει αναφερθεί επιδρά πρωταρχικά στο αναπνευστικό σύστημα και σχετίζεται με την ανάπτυξη αρκετών νοσημάτων, όπως ο καρκίνος και η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ) (1). Στη ΧΑΠ εμπλέκονται η φλεγμονή των αεραγωγών και πιθανά μια διαταραχή της ισορροπίας πρωτεασών-αντιπρωτεασών. Όμως, λίγα είναι γνωστά για τους υποκείμενους μηχανισμούς και πως αυτοί συνδέονται με την ευαιεθσία σε νόσο, και ιδιαίτερα γιατί μόνο 10-15% των καπνιστών αναπτύσσουν ΧΑΠ (2). Έως σήμερα, δεν υπάρχουν βιολογικοί δείκτες επαρκώς ευαίσθητοι για να εκτιμήσουν το πνευμονικό παρέγχυμα προτού να γίνουν εμφανείς οι λειτουργικές ανωμαλίες.

Επομένως, δείκτες ειδικοί για τον πνεύμονα, που παράγονται από ορισμένες περιοχές του αναπνευστικού συστήματος, είναι επιθυμητοί για την εκτίμηση της έκθεσης στο κάπνισμα, τις επιδράσεις καθώς και την αναγνώριση ευαίσθητων ατόμων στο κάπνισμα. Το αναπνευστικό επιθήλιο, ανάλογα με την ανατομική περιοχή (μύτη, τραχεία, βρόγχοι, άπω αεραγωγοί και κυψελίδες), εκκρίνει αρκετές ειδικές πρωτείνες στους αεροχώρους του αναπνευστικού συστήματος. Αυτές περιλαμβάνουν τον αναστολέα της πρωτεάσης που εκκρίνεται από τα λευκοκύτταρα (Secretory Leukocyte Protease Inhibitor -SLPI), την 16-kDa πρωτεΐνη Clara (Clara cell protein - CC16), την ελαφίνη και την ανθρώπινη βητα-ντεφενσίνη-2 (human beta β-defensins-2 -hBD-2).

Ο SLPI και η ελαφίνη, δύο αναστολείς πρωτεασών σερίνης, παράγονται από μεγάλο αριθμό κυττάρων στο αναπνευστικό σύστημα. Προστατεύουν τοπικά τον ιστό έναντι των σοβαρών επιδράσεων της φλεγμονής, όχι μόνο ως αποτέλεσμα των αντιφλεγμονωδών δραστηριοτήτων τους, αλλά επίσης και λόγω των ιαντιπρωτεασικών και αντιμικροβιακών ιδιοτήτων τους (3,4). Η CC-16 αποτελεί ίσως τον πιο ευαίσθητο δείκτη έκθεσης στον καπνό του τσιγάρου και μία από τις κυριότερες εκκριτικές πρωτείνες στον πνεύμονα (5). Η CC-16 παράγεται κυρίως από τα κύτταρα Clara στον πνεύμονα καθώς επίσης και από μη κροσσωτά κύτταρα κατά μήκος του τραχειοβρογχικού επιθηλίου και από όμοια κύτταρα στη ρινική κοιλότητα (6). Παίζει σημαντικό ρόλο στο αναπνευστικό σύστημα κατά του οξειδωτικού stress και της φλεγμονής (7). Η HBD-2, ευρέως εκφραζόμενη στα επιθηλιακά

κύττατα του αναπνευστικού συστήματος, είναι κυρίως γνωστή για τις αντιμικροβιακές της ιδιότητες (8). Όμως, φαίνεται, με βάση νεότερες μελέτες ότι έχει και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες (9).

Η έκφραση της CC-16 στον ορό, πτύελα, βρογχιολοκυψελιδικό έκκριμα (BALF), ρινικό έκπλυμα και στα βρογχικά επιθηλιακά κύτταρα, αναφέρεται μειωμένη στους καπνιστές με φυσιολογική αναπνευστική λειτουργία στις περισσότερες μελέτες (5, 10-18). Αυτές οι αλλαγές φαίνεται να σχετίζονται με την παθογένεση νόσων του πνεύμονα που σχετίζονται με το κάπνισμα, επειδή αναφέρεται περαιτέρω μείωση στην CC-16 στη ΧΑΠ και τις παροξύνσεις της (11, 14, 19). Όμως, σε μία μελέτη, υγιείς καπνιστές εμφάνισαν σχετικά υψηλά επίπεδα CC-16 στους αερωγούς, με παρόμοια επίπεδα στις βρογχικές εκκρίσεις μεταξύ καπνιστών και μη καπνιστών (20). Επιπλέον, ο Lindahl και συνεργάτες βρήκαν υψηλότερα επίπεδα CC-16 στο BALF και ρινικό έκπλυμα στους καπνιστές σε σύγκριση με τους μη καπνιστές, το οποίο έρχεται σε αντίθεση με τις προηγούμενες μελέτες (6).

Από τις μέχρι τώρα μελέτες, λίγα είναι γνωστά για την επίδραση του καπνίσματος στους υπόλοιπους δείκτες. Η οξεία έκθεση στον καπνό του τσιγάρου στον πνεύμονα ποντικού προκαλεί μείωση της δραστηριότητας του SLPI (21), ενώ η χρόνια έκθεση στον καπνό αύξησε την έκφραση του SLPI (22). Επιπρόσθετα, η έκθεση στον καπνό του τσιγάρου έχει συσχετιστεί με σημαντικά μειωμένα επίπεδα της HBD-2 στα πτύελα και φαρυγγικό έκπλυμα ασθενών με οξεία πνευμονία, υποδηλώνοντας αυξημένη ευαισθησία στη λοίμωξη (23). Αυτός ο μηχανισμός μπορεί να είναι σημαντικός στην παθογένεση της ΧΑΠ, αφού αυξημένα επίπεδα HBD-2 παρατηρήθηκαν σε φλεγμονώδεις νόσους του πνεύμονα (24). Δεν υπάρχουν μελέτες για την επίδραση του καπνίσματος στα επίπεδα της ελαφίνης.

Παραμένει ασαφές αν η έκφραση αυτών των δεικτών μεταβάλλεται μετά τη διακοπή του καπνίσματος. Υπάρχει μόνο μία μακροχρόνια μελέτη στο BALF, όπου έδειξε σημαντικά υψηλότερα επίπεδα της CC-16 μετά τη διακοπή του καπνίσματος, τα οποία δεν παρέμειναν μετά από 15 μήνες διακοπής καπνίσματος (25). Δεν έχουν αναφερθεί άλλες μακροχρόνιες μελέτες για την επίδραση της διακοπής του καπνίσματος στους SLPI, ελαφίνη και HBD-2 στους υγιείς καπνιστές. Διεξήγαμε λοιπόν μία μακροχρόνια μελέτη για να διερευνήσουμε να οι αλλαγές στα πτύελα και ρινικό έκκριμα των SLPI, CC-16,

ελαφίνης και HBD-2 αναστρέφονται μετά από μία περίοδο 6 και 12 μηνών από τη διακοπή του καπνίσματος σε 'υγιείς' καπνιστές.

## 2. Υλικό και μέθοδος

### *Ασθενείς*

Στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο του Ηρακλείου, στην Κρήτη, έγινε πρόκληση πτυέλων και λήψη ρινικού εκπλύματος σε 76 άτομα από το ιατρείο διακοπής καπνίσματος, πριν την έναρξη του πρωτοκόλλου διακοπής του καπνίσματος. Όλα τα άτομα ενημερώθηκαν και έδωσαν γραπτή συγκατάθεση και η Επιτροπή Ηθικής του Πανεπιστημιακού νοσοκομείου έδωσε επίσημη έγκριση. Όλοι οι καπνιστές συμμετείχαν στο ίδιο συμπεριφορικό πρόγραμμα και ανάλογα με το βαθμό εξάρτησης (Fagerstrom test) έλαβαν θεραπεία υποκατάστασης με νικοτίνη και/ή βουπροπιόνη για τη θεραπεία διακοπής καπνίσματος. Δέκα μη καπνιστές (που δεν είχαν καπνίσει ποτέ) στρατολογήθηκαν μέσω διαφήμισης και αποτέλεσαν την ομάδα των μαρτύρων (controls). Όλα τα άτομα ήταν ελεύθερα λοιμώξεων αναπνευστικού κατά τη μελέτη ή κατά το μήνα που προηγήθηκε της μελέτης και στον επανέλεγχο μετά από 6 και 12 μήνες. Τα άτομα δεν έπασχαν από κάποια νόσο και δεν ελάμβαναν φαρμακευτική αγωγή στην πρώτη επίσκεψη, ενώ κανείς δεν παρουσίασε συμπτώματα χρόνιας βρογχίτιδας. Επιπλέον, ο έλεγχος λειτουργικών δοκιμασιών του πνεύμονα ήταν μέσα στα φυσιολογικά όρια και η ακτινογραφία θώρακά τους ήταν φυσιολογική. Τα χαρακτηριστικά των συμμετεχόντων ατόμων φαίνονται στον πίνακα 1.

### *Πρόκληση πτυέλων, λήψη ρινικού εκπλύματος, μέτρηση δεικτών*

Η πρόκληση και επεξεργασία των πτυέλων έγιναν με βάση με τη μέθοδο του Pin, όπως έχουμε ήδη περιγράψει (27). Η λήψη ρινικού εκκρίματος έχει περιγραφεί προηγουμένως. Χρησιμοποιήθηκαν εμπορικά διαθέσιμα ELISA kits για τη μέτρηση SLPI (R&D Systems Europe Ltd, Abingdon, UK), CC16 (Biovendor GmbH, Heidelberg, Germany), ελαφίνης (R&D Systems Europe Ltd, Abingdon, UK), και HBD-2 (EMELCA Bioscience, Breda, The Netherlands), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Οι αναλύσεις έγιναν δύο φορές για κάθε δείγμα. Στις τιμές κάθε standard και δείγματος υπολογίστηκε ο μέσος όρος και από το μέσο όρο αφαιρέθηκε ο μέσος όρος

του zerostandard. Τα όρια ανίχνευσης των SLPI, CC16, ελαφίνης και HBD-2 ήταν 62.5 pg/ml, 20 pg/ml, 31.25 pg/ml και 8 pg/ml αντίστοιχα.

#### *Στατιστική ανάλυση*

Η κανονικότητα ελέγχθηκε με το Shapiro-Wilk test. Οι μεταβλητές ήταν μη-κανονικά κατανοημένες. Μόνο τα άτομα που κατάφεραν επιτυχώς να διακόψουν το κάπνισμα στους 6 μήνες (n=29) και 1 έτος (n=22) συμπεριλήφθηκαν στην ανάλυση των επαναλαμβανόμενων μετρήσεων με τη χρήση του Friedman test ακολουθούμενο από το Wilcoxon Signed Ranks test για αν δούμε pair-wise differences. Οι διαφορές μεταξύ καπνιστών και του control group ελέγχθηκαν με το Mann-Whitney U test. Το software StatsDirect (SPSS Statistics 17.0.0 CHICAGO IL, USA) χρησιμοποιήθηκε. Τιμές <0.05 θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές.

#### **Αποτελέσματα**

Συνολικά 76 καπνιστές και 10 controls συμμετείχαν στη μελέτη. Αυτοί που διέκοχαν το κάπνισμα ήταν 29/76 (38.2%) στους 6 μήνες και 22/76 (29%) στο 1 έτος. Καλής ποιότητας δείγματα πτυέλων αποκτήθηκαν a) στο baseline από 68 “υγιείς” καπνιστές (8 άτομα αρνήθηκαν να υποβληθούν σε πρόκληση πτυέλων, b) μετά από 6 μήνες διακοπής καπνίσματος σε 21 από 29 που κατάφεραν να διακόψουν το κάπνισμα, c) μετά από 1έτος διακοπής καπνίσματος από 14 από 22 που δεν υποτροπίασαν, και d) από όλους τους 10 controls. Ρινικό έκπλυμα αποκτήθηκε a) στο baseline από 69 “υγιείς” καπνιστές (7 άτομα αρνήθηκαν), b) μετά από 6 μήνες διακοπής καπνίσματος από 22/29 άτομα, c) μετά από 1 έτος διακοπής από 12 of 22 που δεν είχαν υποτροπιάσει d) και από τους 10 controls.

Οι συγκεντρώσεις των SLPI, CC16, ελαφίνης και HBD-2 στα πτύελα και ρινικό έκκριμα φαίνονται στον Πίνακα 2. Η συγκέντρωση του SLPI και της ελαφίνης ήταν σημαντικά υψηλότερες στο ρινικό έκπλυμα σε σύγκριση με τα πτύελα ( $p=0.0001$  και  $p=0.022$ , αντίστοιχα). Η συγκέντρωση της CC-16 ήταν υψηλότερη στα πτύελα σε σύγκριση με το ρινικό έκπλυμα ( $p=0.001$ ). Όμως, τα επίπεδα των περισσότερων δειγμάτων ρινικού εκπλύματος της HBD-2 ήταν χαμηλότερα από το όριο ανίχνευσης και δεν τα αναφέρουμε αυτά τα αποτελέσματα.

Στα πτύελα, τα επίπεδα των SLPI και CC16 ήταν αυξημένα στους

υγιείς καπνιστές σε σύγκριση με οτους μη καπνιστές ( $p=0.005$  και  $p=0.08$  αντίστοιχα). Όμως, τα επίπεδα των SLPI και CC16 δεν διέφεραν πριν και μετά από 6 μήνες διακοπής καπνίσματος ( $p=0.118$  και  $p=0.543$  αντίστοιχα), ούτε πριν και 1 έτος από τη διακοπή καπνίσματος ( $p=0.363$  και  $p=0.470$  αντίστοιχα). Επιπλέον, τα επίπεδα των HBD-2 και ελαφίνης δε διέφεραμ στους καπνιστές πριν τη διακοπή του καπνίσματος σε σύγκριση με τους μη καπνιστές. Η HBD-2 δε διέφερε ούτε μετά από 6 και 12 μήνες από τη διακοπή του καπνίσματος. Αν και η ελαφίνη ήταν μειωμένη 6 μήνες από τη διακοπή του καπνίσματος ( $p=0.025$ ), 12 μήνες μετά τη διακοπή, τα επίπεδα ήταν τα ίδια όπως πριν τη διακοπή του καπνίσματος. Επιπρόσθετα, δεν ανιχνεύτηκαν αλλαγές στους, SLPI, CC16 ρινικού εκπλύματος μεταξύ καπνιστών και μη καπνιστών. Ο SLPI ήταν χαμηλότερος 12 μήνες μετά τη διακοπή του καπνίσματος ( $p=0.033$ ). Τα επίπεδα της ελαφίνης του ρινικού εκπλύματος ήταν αυξημένα στους καπνιστές πριν τη διακοπή σε σύγκριση με τους μη καπνιστές,  $p=0.007$ . Όμως δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές στην ελαφίνη και CC16 του ρινικού εκπλύματος 6 και 12 μήνες από τη διακοπή του καπνίσματος.

## Συζήτηση

Στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η εξέταση αναπνευστικών εκκριμάτων από τη μύτη και ως πτύελα για ειδικούς για τον πνεύμονα δείκτες. Ο πρωταρχικός μας σκοπός ήταν να ανιχνεύσουμε επιδράσεις του καπνού του τσιγάρου στο αναπνευστικό επιθήλιο και να μελετήσουμε σημεία πιθανής επιδιόρθωσης μετά τη διακοπή του καπνίσματος. Επιλέξαμε το ρινικό έκπλυμα και τα πτύελα επειδή είναι μη επεμβατικές τεχνικές και περιλαμβάνουν μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών, που αποτελούν σημαντική πηγή ανίχνευσης και χαρακτηρισμού των βιοχημικών μεταβολών που σχετίζονται με τις νόσους των αεραγωγών. Επίσης, ίσως είναι δυνατό να παρακολουθήσουμε αλλαγές στις πρωτεΐνες και να συλλέξουμε πληροφορίες για τους κατώτερους αεραγωγούς (26,27). Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι τα επίπεδα των SLPI CC16, ελαφίνη HBD-2 των πτυέλων δεν μειώνονται έως 1 έτος από τη διακοπή του καπνίσματος. Δώδεκα μήνες διακοπής μειώνουν μόνο τον SLPI του ρινικού εκπλύματος, υποδηλώνοντας ότι υπάρχει μία

συνεχιζόμενη φλεγμονώδης διεργασία που διεγείρει την παραγωγή αντισταθμιστικών πρωτεϊνών στους αεραγωγότα των πρώην καπνιστών.

Μελέτες που αφορούν τα επίπεδα της CC-16 στον ορό, πτύελα, ρινικό έκπλυμα, BALF και βρογχικό επιθήλιο είναι αντιφατικές, δείχνοντας είτε μείωση (5, 10-18), καμία μεταβολή (20) είτε αύξηση (6) στους καπνιστές με φυσιολογική αναπνευστική λειτουργία σε σύγκριση με τους μη καπνιστές. Αυτές οι διαφωνίες ίσως αντανακλούν τη δυσκολία σύγκρισης στην εκίμηση της CC16 σε διάφοτα υγρά δείγματα αναπνευστικού, κυρίως για λόγους μεθοδολογίας. Επίσης είναι δύσκολο να συγκρίνει κανείς δεδομένα ορού, πτυέλων και ρινικού εκπλύματος επειδή το πρώτο αντιπροσωπεύει. Βρήκαμε υψηλότερα επίπεδα CC-16 στα πτύελα καπνιστών σε σύγκριση με τους μη καπνιστές, το οποίο συμφωνεί με τη μελέτη των Lindahl και συνεργατών. Φαίνεται πιθανό ότι η αύξηση στα επίπεδα της CC-16 που παρατηρείται στους καπνιστές αντοπροσωπεύει μια διαδικασία ανανέωσης που εμπλέκει τα κύτταρα Clara. Τα υψηλότερα επίπεδα επίσης μπορούν να εξηγηθούν από το γεγονός ότι αυτά τα άτομα δεν εμφάνισαν ΧΑΠ.

Επιπλέον, η αύξηση του SLPI στα πτύελα και της ελαφίνης στο ρινικό έκπλυμα στους καπνιστές μπορεί να αποτελεί μέρος μιας τοπικής άμυνας έναντι των φλεγμονωδών διεργασιών, για την ελαχιστοποίηση της ιστικής βλάβης που προκαλείται από το κάπνισμα. Ο SLPI και η ελαφίνη χαρακτηρίζονται ως μόρια συναγερμού που εμπλέκονται στη ρύθμιση των πρώιμων γεγονότων της φλεγμονώδους διεργασίας (28), επομένως η υπερέκφραση αυτών των αναστολέων θα μπορούσε να είναι ωφέλιμη στην αντιμετώπιση των φλεγμονωδών συνεπειών του καπνίσματος. Δε βρήκαμε μεταβολές στην HBD-2 των πτυέλων μεταξύ καπνιστών και μη καπνιστών και δεν υπάρχουν δεδομένα στη βιβλιογραφία για την επίδραση του καπνίσματος στην HBD-2 σε υγιείς καπνιστές. Υπάρχει μόνο μία μελέτη σε ασθενείς με οξεία πνευμονία, που αναφέρει μειωμένα επίπεδα HBD-2 στα πτύελα και φαρυγγικά εκπλύματα σε νυν και πρώην καπνιστές (23).

Με βάση την βιβλιογραφία υπάρχουν πολύ περιορισμένα στοιχεία που έχουν εκτιμήσει τις μεταβολές συτών των δεικτών μετά τη διακοπή του καπνίσματος. Η παρούσα μελέτη είναι μία από τις πρώτες που διερευνά την επίδραση της διακοπής του καπνίσματος στους SLPI, CC-16, ελαφίνη και

HBD-2 στα προκλητά πτύελα και ρινικό έκπλυμα καπνιστών χωρίς υποκείμενη νόσο ή διαταραχή της αναπνευστικής λειτουργίας.

Μία προηγούμενη μακροχρόνια μελέτη που εκτίμησε την επίδραση 1, 3,6, 9 και 12 από τη διακοπή καπνίσματος σε καπνιστές με φυσιολογική αναπνευστική λειτουργία, έδειξε σημαντικά ( $p < 0.05$ ) υψηλότερα επίπεδα της CC-16 στο BAL στους 3,6 και 9 μήνες από τη διακοπή του καπνίσματος. Όμως, 15 μήνες μετά τη διακοπή καπνίσματος τα επίπεδα της CC-16 ήταν τα ίδια όπως πριν τη διακοπή του καπνίσματος (25). Σε συμφωνία με αυτή τη μελέτη βρήκαμε ότι τα επίπεδα της CC-16 στα πτύελα και ρινικό έκπλυμα δεν αλλάζουν στο 1 έτος από τη διακοπή καπνίσματος. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί ως μία μη αναστρέψιμη βλάβη στο βρογχικό επιθήλιο από τον καπνό του τσιγάρου, υποδηλώνοντας μία νανγεννητική διεργασία που δεν είναι πλήρης. Μία άλλη εξήγηση είναι ότι πάνω από 12 μήνες διακοπής καπνίσματος απαιτούνται για να παρατηρήσουμε μόνιμες μεταβολές στους δείκτες αυτούς που σχετίζονται με το κάπνισμα. Επιπλέον αν το κάπνισμα ευθύνεται για την αύξηση του SLPI στα πτύελα και της ελαφίνης στο ρινικό έκπλυμα, μία μεγαλύτερη περίοδος επιδιόρθωσης πιθανώς να απαιτείται προτού οι συγκεντρώσεις των πρωτεϊνών αυτών επιστρέψουν στο φυσιολογικό.

Η κατανόηση της επίδρασης του καπνίσματος καθώς και της διακοπής του καπνίσματος στην HBD-2 και ελαφίνη είναι περιορισμένη στην παρούσα φάση και αυτή θα μπορούσε να αποτελέσει μία περιοχική έρευνας τα επόμενα έτη. Στην τελευταία δεκαετία πολλά έχουν γίνει γνωστά για τη δραστηριότητα των ντεφενσίνων και υπάρχουν αρκετές πληροφορίες για την παρουσία τους στη φλεγμονώση νόσο του πνεύμονα. Περαιτέρω μελέτες απαιτούνται για τη διευκρίνιση του ρόλου τους στην παθογένεση αυτών των νοσημάτων (24).

Η μελέτη μας έχει κάποιους περιορισμούς που πρέπει να αναφερθούν. Πρώτον, τα δεδομένα μας πιθανά να δεχτούν κριτική λόγω του γεγονότος ότι 29 και 22 άτομα (επιτυχόντες στους 6 μήνες και 1 έτος, αντίστοιχα) ολοκλήρωσαν τη μελέτη. Παρόλα αυτά, αυτό είναι συχνό σε κλινικές διακοπής καπνίσματος, όπου οι υποτροπές είναι συχνές. Επίσης περιορίσαμε την επαναλαμβανόμενη ανάλυση μόνο στους επιτυχόντες. Δεύτερον, η μέση ηλικία της ομάδας των καπνιστών ήταν μεγαλύτερη από αυτή των control και θα μπορούσε κάποιος να αποδώσει τις διαφορές μεταξύ καπνιστών και μη καπνιστών στη διαφορά ηλικίας. Αν και αυτό δεν μπορεί να αποκλειστεί, μια

ανάλυση των υποομάδων των διαφορετικών ηλικιών δεν έδειξε διαφορές (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται). Επιπλέον, η επεξεργασία του πτυέλου με το βλεννολυτικό παράγοντα dithiothreitol (DTT), εγείρει το ερώτημα πιθανής επίδρασης του DTT στην ανίχνευση των διαλυτών δεικτών. Το αναγωγικό μέσο DTT θα μπορούσε να αλληλεπιδράσει με την ανίχνευση των γλεφμονωδών μεσολαβητών στο πτύελο, είτε με τον επηρεασμό της τρισδιάστατης δομής των πρωτεϊνών, είτε αλληλεπιδρώντας απευθείας με την μέθοδο ανίχνευσης. Στην παρούσα μελέτη δεν έγινε λεπτομερής ανάλυση της επίδρασης του In DTT στην ανίχνευση των μεσολαβητών. όμως, ο Woolhouse και συνεργάτες, διερεύνησαν την επίδραση της επεξεργασίας των πτυέλων με DTT στην ανίχνευση των φλεγμονωδών μεσολαβητών και έδειξε ότι η αραίωση των δειγμάτων που απαιτούνταν για της μετρήσεις (για τον SLPI) ήταν επαρκής για την απαλαγή από οποιαδήποτε αλληλεπίδραση του DTT. Μάλιστα οι συγγραφείς κατέληξαν ότι η θεραπεία με DTT δεν επηρεάζει σημαντικά τα επίπεδα του SLPI (29).

Συμπερασματικά, δείξαμε ότι δείκτες των πτυέλων δεν μειώνονται μετά από 1 έτος από τη διακοπή του καπνίσματος. Δώδεκα μήνες από τη διακοπή του καπνίσματος μειώνουν σημαντικά μόνο τον SLPI του ρινικού εκπλύματος, υποδηλώνοντας ότι υπάρχει μια συνεχιζόμενη φλεγμονώδης διεργασία που διεγείρει την παραγωγή αντισταθμιστικών πρωτεϊνών στους αεραγωγούς των πρώην καπνιστών. Περαιτέρω μελέτες απαιτούνται για να δούμε αν αυτές οι πρωτεΐνες θα μπορούσαν να αποτελέσουν έγκυρους δείκτες για την παρακολούθηση περιφερικής βλάβης των αεραγωγών.



## Βιβλιογραφία:

1. J.M. Sethi, C.L. Rochester, "Smoking and Chronic Obstructive Pulmonary Disease", *Clinics in Chest Medicine*, vol. 21, no. 1, pp. 67–86, 2000
2. Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease: American Thoracic Society. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152 (suppl):S77-S121
3. Weldon S, McGarry N, Taggart CC, McElvaney NG. The role of secretory leucoprotease inhibitor in the resolution of inflammatory responses. *Biochem Soc Trans.* 2007 Apr;35(Pt 2):273-6
4. Williams SE, Brown TI, Roghanian A, Sallenave JM. SLPI and elafin: one glove, many fingers. *Clin Sci (Lond).* 2006 Jan;110(1):21-35.
5. Bernard A, Roels H, Buchet JP, Lauwerys R. Decrease of serum Clara cell protein in smokers. *Lancet.* 1992 Jun 27;339(8809):1620.
6. Lindahl M, Svartz J, Tagesson C. Demonstration of different forms of the anti-inflammatory proteins lipocortin-1 and Clara cell protein-16 in human nasal and bronchoalveolar lavage fluids. *Electrophoresis.* 1999 Apr-May;20(4-5):881-90.
7. Broeckaert F, Bernard A. Clara cell secretory protein (CC16): characteristics and perspectives as lung peripheral biomarker. *Clin Exp Allergy.* 2000 Apr;30(4):469-75.
8. McCray PB Jr, Bentley L. Human airway epithelia express a beta-defensin. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1997 Mar;16(3):343-9.
9. T. Teclé, S. Tripathi, K. L. Hartshorn. Review: Defensins and cathelicidins in lung immunity *Innate Immunity* 2010;16:151-159
10. Lund J, Anderson O, Ripe E. Characterization of a binding protein for the PCB metabolite 4,4'-bis(methylsulfonyl)-2,2',5,5'-tetrachlorobiphenyl present in bronchoalveolar lavage from healthy smokers and non-smokers. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1986 May;83(3):486-93.
11. Bernard A, Marchandise FX, Depelchin S, Lauwerys R, Sibille Y. Clara cell protein in serum and bronchoalveolar lavage. *Eur Respir J.* 1992 Nov;5(10):1231-8.
12. Shijubo N, Itoh Y, Yamaguchi T, Shibuya Y, Morita Y, Hirasawa M, Okutani R, Kawai T, Abe S. Serum and BAL Clara cell 10 kDa protein

- (CC10) levels and CC10-positive bronchiolar cells are decreased in smokers. *Eur Respir J.* 1997 May;10(5):1108-14.
13. Shijubo N, Honda Y, Itoh Y, *et al.* BAL surfactant protein A and Clara cell 10-kDa protein levels in healthy subjects. *Lung* 1998;176:257–265
  14. Pilette C, Godding V, Kiss R, Delos M, Verbeken E, Decaestecker C, De Paepe K, Vaerman JP, Decramer M, Sibille Y. Reduced epithelial expression of secretory component in small airways correlates with airflow obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001 Jan;163(1):185-94.
  15. Robin M, Dong P, Hermans C, Bernard A, Bersten AD, Doyle IR. Serum levels of CC16, SP-A and SP-B reflect tobacco-smoke exposure in asymptomatic subjects. *Eur Respir J.* 2002 Nov;20(5):1152-61.
  16. Bernard AM, Roels HA, Buchet JP, Lauwerys RR. Serum Clara cell protein: an indicator of bronchial cell dysfunction caused by tobacco smoking. *Environ Res.* 1994 Jul;66(1):96-104.
  17. Bernard AM, Gonzalez-Lorenzo JM, Siles E, Trujillano G, Lauwerys R. Early decrease of serum Clara cell protein in silica-exposed workers. *Eur Respir J.* 1994 Nov;7(11):1932-7.
  18. Ghafouri B, Ståhlbom B, Tagesson C, Lindahl M. Newly identified proteins in human nasal lavage fluid from non-smokers and smokers using two-dimensional gel electrophoresis and peptide mass fingerprinting. *Proteomics.* 2002 Jan;2(1):112-20.
  19. Braido F, Riccio AM, Guerra L, Gamalero C, Zolezzi A, Tarantini F, De Giovanni B, Folli C, Descalzi D, Canonica GW. Clara cell 16 protein in COPD sputum: a marker of small airways damage? *Respir Med.* 2007 Oct;101(10):2119-24. Epub 2007 Jul 10.
  20. Ekberg-Jansson A, Andersson B, Bake B, Boijesen M, Enander I, Rosengren A, Skoogh BE, Tylén U, Venge P, Löfdahl CG. Neutrophil-associated activation markers in healthy smokers relates to a fall in DL(CO) and to emphysematous changes on high resolution CT. *Respir Med.* 2001 May;95(5):363-73.
  21. Cavarra E, Lucattelli M, Gambelli F, Bartalesi B, Fineschi S, Szarka A, Giannerini F, Martorana PA, Lungarella G. Human SLPI inactivation after

- cigarette smoke exposure in a new in vivo model of pulmonary oxidative stress. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2001 Aug;281(2):L412-7.
22. Shibata Y, Abe S, Inoue S, Takabatake N, Igarashi A, Takeishi Y, Sata M, Kubota I. Altered expression of antimicrobial molecules in cigarette smoke-exposed emphysematous mice lungs. *Respirology*. 2008 Nov;13(7):1061-5. Epub 2008 Aug 10.
23. Herr C, Beisswenger C, Hess C, Kandler K, Suttorp N, Welte T, Schroeder JM, Vogelmeier C; R Bals for the CAPNETZ Study Group. Suppression of pulmonary innate host defence in smokers. *Thorax*. 2009 Feb;64(2):144-9. Epub 2008 Oct 13.
24. Aarbiou J, Rabe KF, Hiemstra PS. Role of defensins in inflammatory lung disease. *Ann Med*. 2002;34(2):96-101.
25. Andersson O, Cassel TN, Sköld CM, Eklund A, Lund J, Nord M. Clara cell secretory protein. Levels in BAL fluid after smoking cessation. *Chest*. 2000 Jul;118(1):180-2.
26. Persson CG, Svensson C, Greiff L, Anderson M, Wollmer P, Alkner U, Erjefält I. The use of the nose to study the inflammatory response of the respiratory tract. *Thorax*. 1992 Dec;47(12):993-1000. No abstract available.
27. Lipworth BJ, White PS. Allergic inflammation in the unified airway: start with the nose. *Thorax*. 2000 Oct;55(10):878-81.
28. Sallenave JM. The role of secretory leukocyte proteinase inhibitor and elafin (elastase-specific inhibitor/skin-derived antileukoprotease) as alarm antiproteinases in inflammatory lung disease. *Respir Res*. 2000;1(2):87-92. Epub 2000 Aug 23.
29. 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 Aug;57(8):667-71.

## ΠΙΝΑΚΕΣ

Πίνακας 1. Χαρακτηριστικά των ατόμων

Χρόνος	Καπνιστές			Μη καπνιστές
	Πριν διακοπής 0	Μετά διακοπής 6m	Μετά διακοπή 12m	0
<b>N</b>	76	29	22	10
<b>Φύλο, Α/Γ</b>	65/11	26/3	20/2	8/2
<b>Ηλικία, (έτη)</b>	48±9	48±8	47 ± 7	33±9*
<b>Κάπνισμα (p-yr)</b>	57±18	53±157	56 ± 18	N/A
<b>FEV<sub>1</sub>,%pred</b>	104±11	105±13	108 ± 9	114±14
<b>FEV<sub>1</sub>/FVC%</b>	80 ± 6	81 ± 5	80 ± 6	87 ± 6
<b>Fagerstrom score</b>	8±2	7±1	7 ± 1	N/A

Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως mean ±SD, ή σε απόλυτους αριθμούς., N: αριθμός, Α: άνδρας, Γ: γυναίκες, p-yr: pack years, FEV<sub>1</sub>: forced expiratory volume in one second, FVC: forced vital capacity, N/A: non applicable

\* p<0.05 προς επιτυχόντες στο baseline,

Πίνακας 2. Συγκεντρώσεις των μετρούμενων μεταβλητών στα πτύελα

	Καπνιστές			Controls (n=10)
	Πριν (n=21)	6m διακοπή καπνίσματος (n=21)	12m διακοπή καπνίσματος (n=14)	
<b>SLPI (μg/ml)</b>	1.11 (0.3-4.9)	0.8 (0.2-2.6)	1.36 (0.3-3.3)	0.1 (0.05-0.6)*
<b>CC16 (μg/ml)</b>	1.7 (0.3-13)	1.8 (0.1-21)	1.9 (0.06-5.5)	0.5 (0.001-4.8)*
<b>b-defensin(pg/ml)</b>	74.26 (8 – 534,91)	98.1 (10.2 – 729.9)	83.1 (8 – 256)	73.5 (34.6 – 409.9)
<b>elafin(pg/ml)</b>	252.9 (92.8 – 2146.7)	171.9 (71.2 – 472.9)*	236.4 (44.6 – 714.1)	194.6 (128.8 – 276.8)

Πίνακας 3. Συγκεντρώσεις των μετρούμενων μεταβλητών στο ρινικό έκπλυμα

	Καπνιστές			Controls (n=10)
	Πριν (n=22)	6m διακοπή καπνίσματος (n=22)	12m διακοπή καπνίσματος (n=11)	
<b>SLPI (μg/ml)</b>	3.2 (0.1-37.5)	1.96 (0.2-25.8)	1.9 (0.05-13.4)*	2.7 (0.2-7)
<b>CC16 (μg/ml)</b>	0.0263 (0.0015-0.2)	0.034 (0.0008-0.1694)	0.0389 (0.0008-0.08)	0.0256 (0.0013-0.2)
<b>b-defensin(pg/ml)</b>	-	-	-	-
<b>elafin(pg/ml)</b>	6701.5 (1195.8- 17360.5)	5927.8 (339.5-13298.4)	3284 (328.9-7398)	1665.5 (484.9-5894.2)*

Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως median (range). \* p<0.05 προς επιτυχόντες στο baseline

**ΕΝΟΤΗΤΑ IV**

**ΜΕΙΩΣΗ ΤΩΝ ΩΡΙΜΩΝ**

**ΔΕΝΔΡΙΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΑ**

**ΠΤΥΕΛΑ ΣΕ ΥΓΙΕΙΣ ΚΑΠΝΙΣΤΕΣ ΚΑΙ**

**ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΧΡΟΝΙΑ**

**ΑΠΟΦΡΑΚΤΙΚΗ**

**ΠΝΕΥΜΟΝΟΠΑΘΕΙΑ**

## Περίληψη

**Σκοπός:** Οι ασθματικοί που καπνίζουν έχουν μειωμένα ώριμα δενδριτικά κύτταρα στον πνεύμονα (dendritic cells -DCs). Οι ασθενείς με χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ) παρουσιάζουν αυξημένο αριθμό ανώριμων DCs στον πνεύμονα. Υποθέσαμε ότι οι υγιείς καπνιστές και οι ασθενείς με ΧΑΠ που καπνίζουν έχουν μειωμένα ώριμα DCs στον πνεύμονα.

**Μέθοδος:** Έγινε αναγνώριση των DCs στα πτύλα που έκφραζαν τους δείκτες ωρίμανσης CD83 και DC-lysosome associated membrane protein (DC-LAMP) και των υποπληθυσμών των DC ( μυελοειδών και πλασμακυτοειδών DCs) με κυτταρομετρία ροής σε υγιείς καπνιστές πριν την είσοδο τους σε πρόγραμμα διακοπής καπνίσματος (n = 30), στους ίδιους καπνιστές 6 μήνες μετά τη διακοπή του καπνίσματος (n = 11) και σε ασθενείς με ΧΑΠ (n = 28, 14 νυν και 14 πρώην καπνιστές). Δώδεκα υγιείς μη καπνιστές χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες. Οι αριθμοί των DC εκφράστηκαν ως ποσοστό των συνολικών CD45 + λευκοκυττάρων των πτυέλων.

**Αποτελέσματα:** Τα CD83 + και DC-LAMP + ώριμα DCs μειώθηκαν στους υγιείς καπνιστές πριν τη διακοπή του καπνίσματος σε σύγκριση με μετά τη διακοπή του καπνίσματος ( $p = 0.003$  and  $p = 0.049$ , αντίστοιχα) και στους καπνιστές πριν τη διακοπή του καπνίσματος σε σύγκριση με τους μη καπνιστές ( $p = 0.027$  και  $p = 0.028$  αντίστοιχα). Οι ασθενείς με ΧΑΠ, τόσο οι νυν, όσο και οι πρώην καπνιστές, παρουσίασαν μειωμένα CD83 + ώριμα DCs σε σύγκριση με τους μη καπνιστές και τους καπνιστές μετά τη διακοπή του καπνίσματος ( $p = 0.042$  και  $p = 0.004$ , αντίστοιχα).

**Συμπεράσματα:** Το κάπνισμα και η ΧΑΠ σχετίζονται με μείωση των ώριμων DCs στον πνεύμονα. Υποθέτουμε ότι αυτή η μείωση εμπλέκεται στην ανοσοπαθογένεση των νόσων που σχετίζονται με το κάπνισμα, όπως η ΧΑΠ.

## Εισαγωγή

Το κάπνισμα, όπως προαναφέρθηκε αποτελεί μια κύρια αιτία νοσηρότητας και θνητότητας παγκοσμίως καθώς και την κύρια αιτία της χρόνιας αποφρακτικής πνευμονοπάθειας (ΧΑΠ). Παρά την εκτενή έρευνα, η παθογένεση των νόσων που σχετίζονται με το κάπνισμα παραμένει αρκετά απροσδιόριστη. Στους πνεύμονες υγιών καπνιστών και ασθενών με ΧΑΠ παρατηρείται μια χαρακτηριστική φλεγμονώδης απάντηση, που αποτελείται κυρίως από ουδετερόφιλα, μακροφάγα και Τ λεμφοκύτταρα, ιδιαίτερα του υποτύπου των Τ κυτταροτοξικών (1-3). Τα Τ λεμφοκύτταρα του πνεύμονα στους ασθενείς με ΧΑΠ εκκρίνουν περισσότερο ιντερφερόνη- $\gamma$ , που σχετίζεται με την ανοσολογική απάντηση τύπου 1 (4-6). Όμως, οι ανοσολογικοί μηχανισμοί που οδηγούν σε αυτήν την χαρακτηριστική ενισχυμένη ανοσολογική απάντηση δεν είναι ακόμη γνωστοί.

Τα δενδριτικά κύτταρα (Dendritic cells -DCs) έχουν πολλαπλές λειτουργίες στην ανοσολογική απάντηση των πνευμόνων (7). Υπάρχουν 2 κύριοι υποτύποι DC: τα μυελοειδή DCs (MDCs), που εμπλέκονται πρωταρχικά στην έναρξη και έλεγχο των επίκτητων ανοσολογικών απαντήσεων και τα πλασματοειδή DCs (PDCs), που εμπλέκονται κυρίως στην ενδογενή ανοσία, στις αντιικές απαντήσεις και στην ανοχή (8,9). Ένα μείζων γεγονός στην ζωή των DCs είναι η ωρίμανσής τους. Κατά τη διεργασία αυτή τα DCs οδηγούν σε αύξηση των homing υποδοχέων των λεμφοκυττάρων και τα μόρια διέγερσης των λεμφοκυττάρων και τα ώριμα DCs έπειτα μεταναστεύουν στους λεμφαδένες που παροχετεύονται για να παρουσιάσουν τα αντιγόνα που έχουν δεσμεύσει στα Τ κύτταρα και να προκαλέσουν την επίκτητη ανοσία ή ανοχή (7). Πρόσφατα, υποθέσαμε ότι τα DCs στον πνεύμονα ίσως συνεισφέρουν στην παθογένεση των νόσων που σχετίζονται με το κάπνισμα, όπως η ΧΑΠ(10).

Σε υποστήριξη του προηγούμενου, βρέθηκε ότι εκχυλίσματα καπνού του τσιγάρου και νικοτίνης καταστέλουν την ωρίμανση των DC in vitro (11,12). Δεδομένα από μελέτες σε ζώα είναι αντικρουόμενες, με άλλες να δείχνουν αύξηση και άλλες να δείχνουν μείωση του αριθμού των MDC καθώς και της ωρίμανσής τους μετά την έκθεση στον καπνό του τσιγάρου (13-16). Στον άνθρωπο λίγα είναι γνωστά για την επίδραση του καπνίσματος στην ωρίμανση των DC, Μια μελέτη έδειξε ότι τα DCs βρογχοκυψελιδικού



εκκρίματος από υγιείς καπνιστές εκφράζουν χαμηλά επίπεδα homing υποδοχέων των λεμφαδένων, αλλά υψηλά επίπεδα των συν-διεγερτικών μορίων (17). Στους ασθματικούς, το κάπνισμα φαίνεται να μειώνει τους αριθμούς των CD83 + ώριμωνDCs στους μεάλους αεραγωγούς (18), ενώ στους ασθενείς με ΧΑΠ το ενεργό κάπνισμα σχετίζεται με μειωμένα συνολικά DCs, όπως αναγνωρίζονται από τη μορφολογία κάτω από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (19).

Λίγα είναι γνωστά για τη δυνατότητα των DCs στον πνεύμονα να διαδραματίζουν ένα ρόλο στην παθογένεση της ΧΑΠ. Οι ασθενείς με ΧΑΠ παρουσιάζουν langerin + DCs των μικρών αεραγωγών και η langerin εκφράζεται κυρίως από τα ανώριμα DCs (20,21). Επιπρόσθετα, υπερκείμενα πτυέλων από ασθενείς με ΧΑΠ καταστέλλουν την ωρίμανση των DC (22). Δεν είναι γνωστό αν οι ασθενείς με ΧΑΠ έχουν μειωμένους αριθμούς ώριμων DCs στον πνεύμονα.

Σε αυτή τη μελέτη υποθέσαμε ότι : (1) το ενεργό κάπνισμα στους υγιείς καπνιστές και (2) στη ΧΑΠ σχετίζεται με μειωμένα ώριμα DCs στον πνεύμονα. Για αυτό το λόγο αναγνωρίσαμε στα πτύελα DCs που εκφράζουν 2 δείκτες ωρίμανσης (CD83 και DC-lysosome associated membrane protein, DC-LAMP), στους νιν καπνιστές πριν και μετά τη διακοπή του καπνίσματος και σε ασθενείς με ΧΑΠ. Υγιείς μη καπνιστές χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες. Επιπρόσθετα αναγνωρίσαμε στα δείγματα των πτυέλων μας υποπληθυσμούς DC που είχαν προηγουμένα αναγνωριστεί σε πνευμονικό ιστό (CD1c και blood dendritic cell antigen 3, BDCA3) που εκφράζουν μυελοειδή DCs και BDCA2 που εκφράζουν πλασμακυτοειδή DCs (23). Δεν αναγνωρίσαμε ανώριμα DCs, αφού αυτά έχουν ήδη προσδιοριστεί σε ασθενείς με ΧΑΠ (20).

## **Υλικό και Μέθοδος**

### *Άτομα*

Η πρόκληση πτυέλων έγινε συνολικά σε 30 υγιείς νυν καπνιστές κατά την έναρξη ενός προγράμματος διακοπής καπνίσματος και σε 28 ασθενείς με ΧΑΠ (14 νυν και 14 πρώην καπνιστές). Η επιστράτευση των ατόμων έγινε από το ιατρείο διακοπής καπνίσματος του τμήματος εξωτερικών ιατρείων του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου. Οι καπνιστές που κατάφεραν

να διακόψουν το κάπνισμα παρακολουθήθηκαν για 6 μήνες. Έγινε ξανά πρόκληση πτυέλου στα 11 άτομα που κατάφεραν να επιτύχουν συνεχή αποχή από το κάπνισμα για 6 μήνες, όπως είχε διευκρινηστεί από τους ίδιους, τις μετρήσεις εκπνεόμενου CO και τα επίπεδα κοτινίνης στα ούρα. Πρόκληση έγινε επίσης και σε 12 μη καπνιστές, που προσήλθαν μέσω διαφήμισης, οι οποίοι και χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες. Μελετήσαμε μόνο μη αλλεργικά και μη ατοπικά άτομα (η ατοπία εκτιμήθηκε με δερματικές δοκιμασίες νυγμού). Τα άτομα που ανέφεραν λοίμωξη αναπνευστικού ή επιδείνωση κατά τις προηγούμενες 6 εβδομάδες αποκλείστηκαν. Τα χαρακτηριστικά των ατόμων παρουσιάζονται στον πίνακα 1.

Λάβαμε γραπτή ενήμερη συγκατάθεση σύμφωνα με τα πρωτόκολλα που εγρίνονται από την επιτροπή ιατρικής ηθικής του νοσοκομείου.

#### *Πρόκληση πτυέλων και κυτταρομετρία ροής*

Η πρόκληση πτυέλων και επεξεργασία έγινε όπως έχει περιγραφεί προηγουμένως (24). Για το σταντάρισμα του μεσοδιαστήματος μεταξύ πρόκλησης πτυέλων και τελευταίου τσιγάρου που καπνίστηκε στους νυν καπνιστές, δόθηκαν οδηγίες να καπνίσουν το τελευταίο τους τσιγάρο 15 λεπτά πριν την πρόκληση πτυέλων. Για την αναγνώριση του κάθε υποτύπου των DC με την κυτταρομετρία ροής, περίπου  $10^6$  κύτταρα πτυέλου (τουλάχιστον  $3 \times 10^5$ , με αποκλεισμό των πλακωδών και νεκρών κυττάρων) σημάνθηκαν με μονοκλωνικά αντισώματα. Για τον προσδιορισμό των CD14, CD19, CD45, CD83, CD1c, BDCA2 και BDCA3, έγιναν εξωκυττάρια χρώσεις. Για τον προσδιορισμό του DC-LAMP έγιναν ενδοκυττάρια χρώσεις. Σε 4 δείγματα (1 από ένα υγιή καπνιστή πριν τη διακοπή του καπνίσματος, 2 από ασθενείς με ΧΑΠ και 1 από ένα μη καπνιστή) η χρώση για DCLAMP+ mature DCs δεν έγινε, αφού δεν υπήρχε επαρκής αριθμός των κυττάρων στα πτύελα. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον Πίνακα 2. Οι εξωκυτταρικές χρώσεις έγιναν με επώαση των κυττάρων με κατάλληλα αντισώματα για 30 λεπτά στους 4–8 ° C. Η ενδοκυττάρια χρώση του DCLAMP έγινε μετά από 10 λεπτά προθεραπείας των κυττάρων με 0.5% σαπωνίνη και με επώαση των κυττάρων με anti-DC-LAMP παρουσία 0.5% σαπωνίνης για 30 λεπτά στους 4–8 ° C.

Χρησιμοποιήθηκε ένας Elite Coulter κυτταρομετρητής για κυτταρομετρία ροής τριών χρωμάτων. Τα δεδομένα αποθηκεύτηκαν στο list mode και αναλύθηκαν με τη χρήση Epics Elite. Το CD1c που εκφράζει τα MDCs αναγνωρίστηκαν ως CD45 pos-CD14 low/neg CD19 neg CD1c pos , PDCs αναγνωρίστηκαν ως CD45 pos -CD14 low/neg BDCA2 pos , BDCA3 που εκφράζουν ταMDCs αναγνωρίστηκαν ως CD45 pos CD14 neg BDCA3 high , τα ώριμα DCs αναγνωρίστηκαν ως CD45 pos CD14 neg CD83 pos και ως CD45 pos CD14 neg DC-LAMP pos (Σχεδιάγραμμα 1). Το gating έγινε στα CD45-positive κύτταρα με σχετικά χαμηλό side scatter (SS), που αντανakλά τη σχετικά χαμηλή κοκκίωση των DCs στον πνεύμονα (23). Τα CD14<sup>high</sup> high αυτυψηλού αυτοφθορισμού μακροφάγα και μονοκύτταρα αποκλείστηκαν. Τα CD14<sup>low</sup> κύτταρα συμπεριλήφθηκαν στην ανάλυση των CD1c που εκφράζουν τα MDCs και PDCs επειδή η χαμηλή έκφραση του CD14 έχει παρατηρηθεί στα DCs στον πνεύμονα (23). Τα B κύτταρα είναι γνωστό ότι εκφράζουν το CD1c. Για αυτό το λόγο τα CD19<sup>pos</sup> B κύτταρα αποκλείστηκαν από την ανάλυση των CD1c που εκφράζουν τα MDCs. Λόγω της αναφερόμενης έκφρασης του BDCA3 από τα μονοκύτταρα, καθώς και από τα CD1c + MDCs και PDCs, τα CD14<sup>low</sup> κύτταρα αποκλείστηκαν και μόνο τα BDCA3<sup>high</sup> κύτταρα συμπεριλήφθηκαν στη ανάλυση των BDCA3 που εκφράζουν τα MDCs (25, 26). Τα CD14<sup>low</sup> κύτταρα επίσης αποκλείστηκαν από την ανάλυση των ώριμων DCs, για να υπερνικηθεί το πρόβλημα πιθανής επαγωγής της έκφρασης των CD83 και DC-LAMP στα μονοκύτταρα/μακροφάγα μετά τους χειρισμούς επεξεργασίας των πτυέλων. Η χρώση με ισότοπα controls σχεδιάστηκε ώστε η ίδια στρατηγική που χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση του DC-specific marker να εφαρμόζεται στο δείμα του αρνητικού control. Οι αριθμοί των DC εκφράστηκαν ως ποσοστό των CD45 + λευκοκυττάρων των πτυέλων.

#### *Στατιστική ανάλυση*

Η κανονικότητα ελέγχθηκε με το Shapiro-Wilk test. Οι μεταβλητές κατανεμήθηκαν μη κανονικά. Οι διαφορές μεταξύ των ίδιων καπνιστών πριν και μετά τη διακοπή του καπνίσματος (n = 11) εξετάστηκαν με το Wilcoxon signed ranks test. Οι διαφορές μεταξύ των ασθενών με ΧΑΠ (n = 28), της συνολικής ομάδας των καπνιστών πριν τη διακοπή του καπνίσματος (n = 30), των καπνιστών μετά τη διακοπή του καπνίσματος (n = 11) και των μη

καπνιστών (n = 12) ελέχθηκαν με την Kruskal-Wallis ανάλυση της ποικιλότητας ακολουθούμενο από το Mann-Whitney U test, όποτε ήταν κατάλληλο. Το software SPSS 16.0 για windows (SPSS Inc., Chicago, Ill., USA) χρησιμοποιήθηκε. Πιθανότητες μεταβλητών <0.05 θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές.

## **Αποτελέσματα**

### *Καπνιστές πριν και μετά τη διακοπή του καπνίσματος*

Τα CD83 + και DC-LAMP + DCs μειώθηκαν στους καπνιστές πριν τη διακοπή του καπνίσματος σε σύγκριση με μετά (n = 11, p = 0.003 and p = 0.049, αντίστοιχα; Wilcoxon signed ranks; Σχεδιάγραμμα 2, πίνακας 3). Οι λόγοι του CD83 + και DC-LAMP + DCs προς τα συνολικά DCs επίσης μειώθηκαν. Τα CD1c + MDCs, BDCA3<sup>high</sup> MDCs και BDCA2 + PDCs, καθώς επίσης και τα συνολικά DCs (δηλαδή, CD1c + MDCs + BDCA3<sup>high</sup> MDCs + PDCs), δεν μεταβλήθηκαν σημαντικά στους καπνιστές μετά τη διακοπή του καπνίσματος (Πίνακας 3).

Σύγκριση μεταξύ ασθενών με ΧΑΠ, καπνιστών πριν και μετά τη διακοπή, και μη καπνιστών. Τα CD83 + ώριμα DCs και DC-LAMP + ώριμα DCs ήταν διαφορετικά μεταξύ των ομάδων (p = 0.003 και p = 0.02, Kruskal-Wallis ακολουθούμενο από το Mann Whitney U). Τα CD83 + και DC-LAMP + ώριμα DCs μειώθηκαν στους υγιείς καπνιστές πριν τη διακοπή του καπνίσματος (n = 30) σε σύγκριση με τους μη καπνιστές (n = 12; p = 0.027 και p = 0.028, αντίστοιχα, σχεδ. 2, πίνακας 3). Ο λόγος του CD83 + mature προς τα συνολικά DCs επίσης μειώθηκε στους υγιείς καπνιστές πριν τη διακοπή του καπνίσματος σε σύγκριση με τους μη καπνιστές. Τα CD83 + DCs μειώθηκαν στους ασθενείς με ΧΑΠ (n = 28) σε σύγκριση με τους καπνιστές μετά τη διακοπή του καπνίσματος (n = 11) και τους μη καπνιστές (πίνακας 3). Αυτό θα μπορούσε να αποδωθεί στη θεραπεία με στεροειδή ή στο τάρεχων κάπνισμα, επειδή οι υποομάδες των των ασθενών με ΧΑΠ που δεν ήταν ποτέ υπό θεραπεία με στεροειδή και οι πρώην καπνιστές με ΧΑΠ επίσης παρουσίασαν μειωμένα CD83 + mature DCs σε σύγκριση με τους καπνιστές μετά τη διακοπή του καπνίσματος και τους μη καπνιστές (ασθενείς πρωτόγνωροι στα στεροειδή vs. υγιών καπνιστών μετά τη διακοπή του καπνίσματος, p = 0.019, ασθενείς πρωτόγνωροι στα στεροειδή vs. Μη

καπνιστών,  $p = 0.036$ , πρώην καπνιστές ασθενείς vs. Υγιείς καπνιστές μετά τη διακοπή του καπνίσματος,  $p = 0.016$ , πρώην καπνιστές ασθενείς vs. Μη καπνιστές,  $p = 0.049$ , δεδομένα δεν παρουσιάζονται). Επιπρόσθετα, τα CD83 +DCs δεν διέφεραν μεταξύ των νυν και πρώην καπνιστών με ΧΑΠ και δε διέφεραν μεταξύ ασθενών με ΧΑΠ υπο θεραπεία εναντίως ασθενών χωρίς θεραπεία με στεροειδή ( $p = 0.427$  και  $p = 0.817$ , αντίστοιχα; Δεδομένα δεν παρουσιάζονται). Τα CD1c + MDCs, BDCA3<sup>high</sup> MDCs, BDCA2 + PDCs και συνολικά DCs, δεν διέφεραν μεταξύ των ομάδων ( $p = 0.141-0.603$ , Kruskal-Wallis; πίνακας 3 ). Επίσης δε διέφεραν μεταξύ των υποομάδων των στεροειδοθεραπευόμενων εναντίων των μη θεραπευόμενων ασθενών με ΧΑΠ ( $p = 0.643-0.926$ ; τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται). Όμως, όταν οι υποομάδες των νυν και πρώην καπνιστών με ΧΑΠ συγκρίθηκαν, τα CD1c + MDCs, BDCA3<sup>high</sup> MDCs και συνολικά DCs αυξήθηκαν στους νυν καπνιστές με ΧΑΠ έναντιών πρώην καπνιστών με ΧΑΠ ( $p = 0.005$ ,  $p = 0.004$  και  $p = 0.009$ , αντίστοιχα; σχεδ. 4 ).

## Συζήτηση

Η παρούσα μελέτη έδειξε ότι το ενεργητικό κάπνισμα σε υγιή άτομα και σε ασθενείς με ΧΑΠ σχετίζεται με μείωση των ώριμων DCs των αεραγωγών. Μάλιστα, οι αριθμοί των ώριμων DC στους υγιείς καπνιστές επανέρχονται στο επίπεδο των μη καπνιστών μετά από 6 μήνες από τη διακοπή του καπνίσματος.

Σε προηγούμενη μελέτη δείξαμε ότι τα CD83 + ώριμα DCs των βρόγχων μειώνονται στους ασθματικούς καπνιστές σε σύγκριση με ασθματικούς που δεν καπνίζουν ή με τους υγιείς μη καπνιστές (18). Επιπρόσθετα με το ενεργό κάπνισμα στους ασθματικούς, το κάπνισμα σε υγιή άτομα και σε ασθενείς με ΧΑΠ φαίνεται να σχετίζεται με μειωμένα CD83 + ώριμα DCs των πνευμόνων. Τα αποτελέσματά μας συμφωνούν με αυτά που αναφέρθηκαν πρόσφατα από τον Demedts και συνεργάτες (20), για τα αυξημένα ανώριμα DCs των αεραγωγών στη ΧΑΠ. Όμως, υπάρχουν αντίθετα ευρήματα από άλλους συγγραφείς. Ειδικότερα, ο Bratke και συνεργάτες (17) έδειξαν ότι τα μυελοειδή DCs του BALF των καπνιστών σε σύγκριση με αυτά των μη καπνιστών παρουσίασαν αυξημένη έκφραση των δεικτών ωρίμανσης

CD80 και CD86, όμοια έκφραση του CD83 και μειωμένη έκφραση του υποδοχέα των λεμφοκυττάρων CCR7. Η έκφραση του CCR7 ρυθμίζεται προς τα πάνω στα ώριμα DCs. Είναι πιθανό ότι το κάπνισμα επηρεάζει διαφορετικά την έκφραση διαφόρων μορίων, ειδικότερα αφού κάποια μόρια, όπως τα CD83 και CCR7, εκφράζονται αργότερα κατά την ωρίμανση των DC. Μάλιστα, η έκφραση του CCR7 στα DCs σχετίζεται αρνητικά με τη βαρύτητα του περιορισμού της ροής των αεραγωγών στους καπνιστές (17), που ταιριάζει αρκετά με τα ευρήματά μας των DCs που εκφράζουν το δείκτη ωρίμανσης CD83 στους ασθενείς με ΧΑΠ. Αν και η παρούσα μελέτη είναι αρκετά περιγραφική και οι μηχανισμοί της αναφερόμενης μείωσης στην ωρίμανση των DC δεν έχουν διερευνηθεί, βασιζόμενοι στην υπάρχουσα βιβλιογραφία μπορούμε να υποθέσουμε ότι το κάπνισμα αυξάνει τα επίπεδα της ουδετεροφιλικής ελαστάσης (neutrophil elastase -NE), που καταστέλλει την ωρίμανση των DC, ενώ αναστέλλει τον αναστολέα της προτεάσης που εκκρίνεται από τα λευκοκύτταρα, το οποίο θα μπορούσε να αναστρέψει την προκαλούμενη από τη NE καταστολή στην ωρίμανση των DC (22, 27, 28). Το κάπνισμα μπορεί επίσης να αναστείλει την έκκριση από τα επιθηλιακά κύτταρα των κυτταροκινών που είναι κρίσιμα για την ωρίμανση των DC (29, 30). Τέλος, το κάπνισμα μπορεί άμεσα να καταστείλει την πνευμονική ωρίμανση των DC μέσω των συστατικών του (11, 12).

Κάποιος θα μπορούσε να διαφωνήσει ότι η αναφερόμενη μείωση στα CD83 + ώριμα DCs σε ασθενείς με ΧΑΠ οφείλεται επίσης στην επίδραση του ενεργητικού καπνίσματος και όχι από την εξέλιξη της νόσου καθ'αυτής. Όμως, δε βρήκαμε διαφορές στα CD83 + ώριμα DCs μεταξύ νυν και πρώην καπνιστών με ΧΑΠ, ενώ οι πρώην καπνιστές με ΧΑΠ είχαν επίσης σημαντικά λιγότερα CD83 + DCs σε σύγκριση με τους υγιείς καπνιστές μετά τη διακοπή του καπνίσματος και τους μη καπνιστές. Μια λογική εξήγηση είναι ότι τα υψηλά επίπεδα της NE ή TGF- $\beta$  στους πνεύμονες των ασθενών με ΧΑΠ, ακόμη και σε αυτούς που διέκοψαν το κάπνισμα, καταστέλλουν την έκφραση του CD83 στα DCs (22, 31, 32). Ή η έκφραση του CD83 στα DCs θα μπορούσε να κατασταλλεί με την αλληλεπίδραση των DCs με τα επιθηλιακά κύτταρα και τα κυψελιδικά μακροφάγα (29, 33).

Οι μειωμένοι αριθμοί των πνευμονικών ώριμων DCs στους υγιείς καπνιστές και ασθενείς με ΧΑΠ μπορεί να διαταράξει την ανοσολογική τους



απόκριση προς λοιμώξεις του αναπνευστικού (34). Ειδικότερα, η μειωμένη έκφραση του CD83 στα DCs μπορεί να καταστείλει την ικανότητα τους να διαγείρουν την ανταπόκριση των T κυττάρων (35). Ομοίως, μετά τη διακοπή του καπνίσματος στους υγιείς καπνιστές η παρατηρούμενη επάνοδος των αριθμών των ώριμων DC στα επίπεδα των μη καπνιστών ίσως ενισχύσει την ικανότητα των DCs να ανταποκριθούν επαρκώς στις λοιμώξεις και ίσως να αποδυναμώσει τη φλεγμονή (36).

Οι συνολικοί αριθμοί των DC και των υποπληθυσμών τους (MDCs και PDCs), δεν μεταβλήθηκαν σημαντικά μετά τη διακοπή του καπνίσματος και δε διέφεραν μεταξύ ασθενών με ΧΑΠ και υγιών ατόμων. Όμως, τα συνολικά DCs αυξήθηκαν στους νυν καπνιστές με ΧΑΠ σε σύγκριση με τους πρώην καπνιστές με ΧΑΠ, λόγω της αύξησης του CD1c και BDCA3 που εκφράζουν τα MDCs. Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε μια μη σημαντική τάση προς αύξηση των CD1c + MDCs στους υγιείς καπνιστές πριν σε σχέση με μετά τη διακοπή του καπνίσματος ( $p = 0.131$ ; πίνακας 3 ). Αυτά τα ευρήματα δείχνουν ότι το κάπνισμα αυξάνει τους αριθμούς των πνευμονικών MDCs. Άλλες μελέτες έχουν δείξει επίσης ότι το κάπνισμα ρυθμίζει προς τα πάνω τη σύνθεση και απελευθέρωση μια ποικιλίας χημειοκινών που προσελκύουν τα DC (15, 16, 29, 30). Τα αυξημένα MDCs θα μπορούσαν να εμπλέκονται στην παθογένεση νόσων που προκαλούνται από το κάπνισμα μέσω της απελευθέρωσης μεταλλοπρωτεϊνών (37). Επίσης μπορούν να διαιωνίζουν τις φλεγμονώδεις διεργασίες με τη στρατολόγηση T κυττάρων, τη διέγερση ήδη προετοιμασμένων T κυττάρων και/ή με τη διατήρηση των αντιγόνων – ξένων ή δικών τους- για την παρουσίαση στα Τ κύτταρα για αρκετούς μήνες (7,10).

#### *Περιορισμοί*

*Μεθοδολογία.* Θεωρούμε ότι τα αποτελέσματά μας είναι έγκυρα επειδή τα ώριμα DCs αναγνωρίστηκαν στα πτύελα χρησιμοποιώντας 2 διαφορετικούς δείκτες (CD83 και DC-LAMP), και τα αποτελέσματα και για τους 2 αυτούς δείκτες συμφωνούν ότι τα ώριμα DCs μειώνονται στους καπνιστές. Αν και κάποιος μπορεί να διαφωνήσει ότι κάποια από τα CD14<sup>low</sup> κύτταρα συμπεριλήφθηκαν στην ανάλυση των CD1c και BDCA2 που εκφράζουν DCs ήταν μονοκύτταρα , τα πνευμονικά DCs πράγματι εκφράζουν CD14 σε χαμηλά επίπεδα, ανώ οι ειδικοί των DC δείκτες CD1c και BDCA2 δεν εκφράζονται in

νίνο από τα μονοκύτταρα (23) . Δεν αποκλείσαμε τα T κύτταρα και τα κύτταρα φυσικούς φονείς από την ανάλυσή μας, επειδή κανένα από αυτά τα κύτταρα δεν έχει παρατηρηθεί in vivo να εκφράζουν CD1c, CD83 ή BDCA3 2/3 στη επιφάνειά τους, ή DC-LAMP ενδοκυττάρια. Επιπρόσθετα, τα πτωκαταρκτικά μας πειράματα επιβεβαίωσαν ότι τα T κύτταρα των πτυέλων και τα κύτταρα φυσικοί φονείς δεν εκφράζουν κανένα από αυτούς τους δείκτες. Επίσης, αν και υπάρχουν αναφορές για την πιθανή έκφραση του BDCA3 από CD1c + MDCs και PDCs (10, 26), ο Demedts και συνεργάτες, καθώς επίσης και η δικιά μας ομάδα, δεν έχουν ανιχνεύσει BDCA3/CD1c ή BDCA2/CD1c Συνέκφραση από τα πνευμονικά DCs (9, 23, 38). Έχουμε μόνο συμπεριλάβει BDCA3<sup>high</sup> κύτταρα στην παρούσα ανάλυση του BDCA3 που εκφράζουν τα MDCs. Τέλος, εκφράσαμε τα DCs των πτυέλων σε ποσοστά και όχι σε απόλυτους αριθμούς. in percentages and not in absolute numbers. Ομολογουμένως, μια αύξηση ή μείωση στα ποσοστά των κυττάρων δε σημαίνει απαραίτητα μια αύξηση ή μείωση στους απόλυτους αριθμούς και αν είχαμε δείξει διαφορές στους απόλυτους αριθμούς των DC θα ισχυροποιούσε τα αποτελέσματά μας. Όμως, οι απόλυτοι αριθμοί των DC μερικώς αντανakλούν διαφορές στους συνολικά απόλυτους αριθμούς κυττάρων, το οποίο μπορεί να ποικίλει σημαντικά μεταξύ διαδόρων δειγμάτων ατόμων, Για αυτό το λόγο πιστεύουμε ότι οι διαφορές στα ποσοστά των DC παρέχουν ουσιαστική πληροφορία για τις αληθείς διαφορές στους αριθμούς των DC.

Εξήγηση. Επίσης αναγνωρίζουμε ότι υπάρχουν πιθανοί περιορισμοί στην εξήγηση των αποτελεσμάτων μας. Πρώτα, ένα ποσοστό των ασθενών με ΧΑΠ ήταν υπό θεραπεία με εισπνεόμενα στεροειδή, το οποίο θα μπορούσε να επηρεάσει τον αριθμό των DC και την ωρίμανσή τους (39). Όμως, δε βρήκαμε διαφορές μεταξύ ασθενών με ΧΑΠ υπό ή χωρίς θεραπεία με στεροειδή. Επιπρόσθετα, η υποομάδα των ασθενών με ΧΑΠ χωρίς θεραπεία με στεροειδή επίσης έδειξε μειωμένα ώριμα DCs. Δεύτερον, αν και δεν υπήρχε διαφορά στο ιστορικό καπνίσματος (pack-years) μεταξύ ασθενών με ΧΑΠ και υγιών καπνιστών, οι ασθενείς με ΧΑΠ ήταν σημαντικά μεγαλύτεροι. Όμως, η βιβλιογραφία για τις πιθανές μεταβολές των DCs με την ηλικία είναι σπάνιες (40). Από τη μέχρι τώρα γνώση μας δεν υπάρχουν δημοσιευμένα δεδομένα για μείωση της έκφρασης των CD83 και DC-LAMP στα DCs



Με την ηλικία. Μάλιστα, η διαφορά ηλικίας μεταξύ των ασθενών με ΧΑΠ και των μη ακπνιστών δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Τρίτον, ο αριθμός των ατόμων μαρτύρων που συμπεριλήφθηκε στη μελέτη ήταν σχετικά μικρός σε σύγκριση με τους ασθενείς με ΧΑΠ. Αυτό φείλεται κυρίως στις σημαντικές δυσκολίες στη στρατολόγηση υγιών ατόμων μαρτύρων. Δυστυχώς, δεν μπορούσαμε να κάνουμε power analysis πριν την έναρξη της μελέτης, επειδή δεν υπήρχαν προηγούμενα δεδομένα για τους αριθμούς DCs στα δείγματα πτυέλων από ασθενείς με ΧΑΠ. Όμως, ακόμη μπορούμε να ανιχνεύσουμε διαφορές μεταξύ της ομάδας των μαρτύρων και της ομάδας των ασθενών. Τέταρτον, τα πτύελα δειγματίζουν κυρίως τους μεγάλους αεραγωγούς και επομένως τα ευρήματά μας δεν μπορούν να επεκταθούν στους μικρούς αεραγωγούς και τις κυψελίδες. Όμως, τα προκλητά πτύελα αποτελούν ένα σημαντικό εργαλείο στη μελέτη των πνευμονικών DCs, αφού παρέχουν ένα επαρκές κυτταρικό δείγμα για τη μελέτη των DCs, ενώ παράλληλα είναι λιγότερο επεμβατικό σε σύγκριση με τη βρογχοκυψελιδική έκπλυση. Πέμπτον, περιλαμβάνοντας τα επίπεδα των TGF-β και NE των πτυέλων ισχυροποιούσε τα αποτελέσματά μας στη μελέτη. Όμως, μία συσχέτιση δεν υποδηλώνει πάντα σχέση αιτίας και αποτελέσματος. Επιπρόσθετα, ακόμη θεωρούμε τα δεδομένα της παρατήρησής μας να είναι σημαντικά εξαιτίας του γεγονότος ότι είναι καινούργια και πιθανώς να υποστηρίξουν μελλοντικές λειτουργικές μελέτες που να διευκρινήσουν αν οι TGF-β και NE εμπλέκονται στις παρατηρούμενες μεταβολές στην ωρίμανση DC στους ασθενείς με ΧΑΠ και στους υγιείς καπνιστές. Τέλος, θα μπορούσε κάποιος να διαφωνήσει ότι η παρατηρούμενη μείωση στους αριθμούς των ώριμων DC οφείλονται αποκλειστικά στην αύξηση των αριθμών των ανώριμων DC και όχι σε αληθείς μεταβολές στη διαδικασία ωρίμανσης DC. Όμως, αυτό δεν είναι αληθές αφού εκφράσαμε τους αριθμούς των ώριμων DC ως ποσοστό των συνολικών κυττάρων των πτυέλων και όχι ως ποσοστό των DCs.

## **Συμπεράσματα**

Δείξαμε ότι η ΧΑΠ και το ενεργό κάπνισμα σε υγιή άτομα σχετίζεται με μειωμένα ώριμα DCs των αεραγωγών. Μπορούμε να υποθέσουμε ότι αυτή η μείωση εμπλεκείται σε ανοσοπαθολογοανατομικές διεργασίες που λαμβάνουν χώρα στον πνεύμονα των ασθενών με ΧΑΠ και υγιών ατόμων που καπνίζουν.

Μάλιστα, τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι παράμετροι της ανοσολογίας των αεραγωγών που μεταβάλλονται με το κάπνισμα μπορεί να αποκαθίστανται μερικώς σε υγιείς καπνιστές 6 μήνες μετά τη διακοπή του καπνίσματος.

## Βιβλιογραφία

1. 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: 1518–1523.
2. Amin K, Ekberg-Jansson A, Lofdahl CG, Venge P: Relationship between inflammatory cells and structural changes in the lungs of asymptomatic and never smokers: a biopsy study. *Thorax* 2003; 58: 135–142.
3. 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 FEV<sub>1</sub>. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155: 852–857.
4. Grumelli S, Corry DB, Song LZ, Song L, Green L, Huh J, Hacken J, Espada R, Bag R, Lewis DE, Kheradmand F: An immune basis for lung parenchymal destruction in chronic obstructive pulmonary disease and emphysema. *PLoS Med* 2004; 1:e8.
5. Tzanakis N, Chrysafakis G, Tsoumakidou M, Kyriakou D, Tsiligianni J, Bouros D, Siafakas NM: Induced sputum CD8+ T-lymphocyte subpopulations in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med* 2004; 98:57–65.
6. Saetta M, Mariani M, Panina-Bordignon P, Turato G, Buonsanti C, Baraldo S, Bellettato CM, Papi A, Corbetta L, Zuin R, Sinigaglia F, Fabbri L: 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: 1404–1409.
7. Vermaelen K, Pauwels R: Pulmonary dendritic cells. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172: 530–551.
8. Masten BJ, Olson GK, Tarleton CA, Rund C, Schuyler M, Mehran R, Archibeque T, Lipscomb MF: Characterization of myeloid and plasmacytoid dendritic cells in human lung. *J Immunol* 2006; 177: 7784–7793.
9. Demedts IK, Bracke KR, Maes T, Joos GF, Brusselle GG: Different roles for human lung dendritic cell subsets in pulmonary immune defense mechanisms. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006; 35: 387–393.
10. Tsoumakidou M, Demedts IK, Brusselle GG, Jeffery PK: Dendritic cells in chronic obstructive pulmonary disease: new players in an old game. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 177: 1180–1186.

11. Nouri-Shirazi M, Guinet E: A possible mechanism linking cigarette smoke to higher incidence of respiratory infection and asthma. *Immunol Lett* 2006; 103: 167–176.
12. Vassallo R, Tamada K, Lau JS, Kroening PR, Chen L: Cigarette smoke extract suppresses human dendritic cell function leading to preferential induction of Th-2 priming. *J Immunol* 2005; 175: 2684–2691.
13. Robbins CS, Dawe DE, Goncharova SI, Pouladi MA, Drannik AG, Swirski FK, Cox G, Stampfli MR: Cigarette smoke decreases pulmonary dendritic cells and impacts antiviral immune responsiveness. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004; 30: 202–211.
14. Robbins CS, Franco F, Mouded M, Cernadas M, Shapiro SD: Cigarette smoke exposure impairs dendritic cell maturation and T cell proliferation in thoracic lymph nodes of mice. *J Immunol* 2008; 180: 6623–6628.
15. Bracke KR, D’Hulst AI, Maes T, Moerloose KB, Demedts IK, Lebecque S, Joos GF, Brusselle GG: Cigarette smoke-induced pulmonary inflammation and emphysema are attenuated in CCR6-deficient mice. *J Immunol* 2006; 177: 4350–4359.
16. D’Hulst AI, Vermaelen KY, Brusselle GG, Joos GF, Pauwels RA: Time course of cigarette smoke-induced pulmonary inflammation in mice. *Eur Respir J* 2005; 26: 204–213.
17. Bratke K, Klug M, Bier A, Julius P, Kuepper M, Virchow JC, Lommatzsch M: Function-associated surface molecules on airway dendritic cells in cigarette smokers. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2008;38:655–660.
18. Tsoumakidou M, Elston W, Zhu J, Wang Z, Gamble E, Siafakas NM, Barnes NC, Jeffery PK: Cigarette smoking alters bronchial mucosal immunity in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 175: 919–925.
19. Rogers AV, Adelroth E, Hattotuwa K, Dewar A, Jeffery PK: Bronchial mucosal dendritic cells in smokers and ex-smokers with COPD: an electron microscopic study. *Thorax* 2008;63: 108–114.
20. Demedts IK, Bracke KR, Van Pottelberge G, Testelmans D, Verleden GM, Vermassen FE, Joos GF, Brusselle GG: Accumulation of dendritic cells and increased CCL20 levels in the airways of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 175: 998–1005.

21. Geissmann F, Dieu-Nosjean MC, Dezutter C, Valladeau J, Kayal S, Leborgne M, Lai J: Accumulation of immature Langerhans cells in human lymph nodes draining chronically inflamed skin. *J Exp Med* 2002; 196: 417–430.
22. Roghanian A, Drost EM, MacNee W, Howie SE, Sallenave JM: Inflammatory lung secretions inhibit dendritic cell maturation and function via neutrophil elastase. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 174: 1189–1198.
23. Demedts IK, Brusselle GG, Vermaelen KY, Pauwels RA: Identification and characterization of human pulmonary dendritic cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005; 32: 177–184.
24. Tsoumakidou M, Tzanakis N, Siafakas NM: Induced sputum in the investigation of airway inflammation of COPD. *Respiratory Medicine* 2003; 97: 863–871.
25. McCachren SS, Diggs J, Weinberg JB, Dittman WA: Thrombomodulin expression by human blood monocytes and by human synovial tissue lining macrophages. *Blood* 1991; 78: 3128–3132.
26. Lommatzsch M, Bratke K, Bier A, Julius P, Kuepper M, Luttmann W, Virchow JC: Airway dendritic cell phenotypes in inflammatory diseases of the human lung. *Eur Respir J* 2007; 30: 878–886.
27. Betsuyaku T, Nishimura M, Yoshioka A, Takeyabu K, Miyamoto K, Kawakami Y: Elastin-derived peptides and neutrophil elastase in bronchoalveolar lavage fluid. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154: 720–724.
28. Cavarra E, Lucattelli M, Gambelli F, Bartalesi B, Fineschi S, Szarka A, Giannerini F, Martorana PA, Lungarella G: Human SLPI inactivation after cigarette smoke exposure in a new in vivo model of pulmonary oxidative stress. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001; 281:L412–L417.
29. Witherden IR, Vanden Bon EJ, Goldstraw P, Ratcliffe C, Pastorino U, Tetley TD: Primary human alveolar type II epithelial cell chemokine release: effects of cigarette smoke and neutrophil elastase. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004; 30: 500–509.
30. Thorley AJ, Goldstraw P, Young A, Tetley TD: Primary human alveolar type II epithelial cell CCL20 (macrophage inflammatory protein-3 $\alpha$ )-induced dendritic cell migration. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005; 32: 262–267.

31. de Boer WI, van Schadewijk A, Sont JK, Sharma HS, Stolk J, Hiemstra PS, Adelroth E: Transforming growth factor beta1 and recruitment of macrophages and mast cells in airways in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158: 1951–1957.
32. Fogel-Petrovic M, Long JA, Misso NL, Foster PS, Bhoola KD, Thompson PJ: Physiological concentrations of transforming growth factor beta1 selectively inhibit human dendritic cell function. *Int Immunopharmacol* 2007; 7: 1924–1933.
33. Holt PG, Oliver J, Bilyk N, McMEnamin C, McMEnamin PG, Kraal G, Thepen T: Downregulation of the antigen presenting cell function(s) of pulmonary dendritic cells in vivo by resident alveolar macrophages. *J Exp Med* 1993; 177: 397–407.
34. Lambrecht BN, Prins JB, Hoogsteden HC: Lung dendritic cells and host immunity to infection. *Eur Respir J* 2001; 18: 692–704.
35. Aerts-Toegaert C, Heirman C, Tuybaerts S, Corthals J, Aerts JL, Bonehill A, Thielemans K, Breckpot K: CD83 expression on dendritic cells and T cells: correlation with effective immune responses. *Eur J Immunol* 2007; 37: 686–695.
36. Willemse BW, ten Hacken NH, Rutgers B, Lesman-Leegte IG, Postma DS, Timens W: Effect of 1-year smoking cessation on airway inflammation in COPD and asymptomatic smokers. *Eur Respir J* 2005; 26: 835–845.
37. Bracke K, Cataldo D, Maes T, Gueders M, Noel A, Foidart JM, Brusselle G, Pauwels RA: Matrix metalloproteinase-12 and cathepsin D expression in pulmonary macrophages and dendritic cells of cigarette smoke-exposed mice. *Int Arch Allergy Immunol* 2005;138: 169–179.
38. Tsoumakidou M, Tzanakis N, Papadaki HA, Koutala H, Siafakas NM: Isolation of myeloid and plasmacytoid dendritic cells from human bronchoalveolar lavage fluid. *Immunol Cell Biol* 2006; 84: 267–273.
39. Georas SN: Inhaled glucocorticoids, lymphocytes, and dendritic cells in asthma and obstructive lung diseases: *Proc Am Thorac Soc* 2004; 1: 215–221.
40. Shurin MR, Shurin GV, Chatta GS: Aging and the dendritic cell system: implications for cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2007; 64: 90–105. IAA078.

**Πίνακας 1.** Χαρακτηριστικά των ατόμων

	Smokers	COPD patients	Never-smokers
n	30 (11)	28	12
Sex (M/F)	24/6 (7/4)	26/2	11/1
Age, years	51 ± 9 (49 ± 8)	60 ± 7 <sup>a</sup>	54 ± 11
Smoking history, pack-years	62 ± 31 (47 ± 15)	62 ± 26	–
FEV <sub>1</sub> , % predicted	101 ± 12 (101 ± 10)	64 ± 12 <sup>b</sup>	103 ± 12
FEV <sub>1</sub> /FVC, %	80 ± 5 (79 ± 4)	61 ± 6 <sup>b</sup>	80 ± 4
Inhaled steroids (yes/no)	0/30 (0/11)	17/11	0/12

Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως mean ±SD, ή σε απόλυτους αριθμούς. Για τους καπνιστές οι αριθμοί εκτός παρενθέσεων αντιπροσωπεύουν αποτελέσματα από όλους τους καπνιστές πριν τη διακοπή του καπνίσματος, αυτοί εντός παρενθέσεων αποτελέσματα μετά τη διακοπή του καπνίσματος (για αυτούς που διέκοψαν το κάπνισμα).

a.  $p < 0.05$  ασθενείς με ΧΑΠ vs. καπνιστών

b.  $p < 0.05$  ασθενείς με ΧΑΠ vs. καπνιστών και η καπνιστών

**Πίνακας 2.** Μονοκλωνικά αντισώματα για την κυτταρομετρία ροής

Specificity	Clone	Conjugate	Source
CD45	J.33	PE-Cy5	Beckman Coulter
CD14	RMO52	FITC	Beckman Coulter Immuno- notech, Marseille, France
CD19	J4.119	FITC	Beckman Coulter
CD1c (BDCA1)	AD5-8E7	PE	Miltenyi Biotech, Bergish Gladbach, Germany
BDCA2	AC144	PE	Miltenyi
BDCA3	AD5-14412	PE	Miltenyi
CD83	HB15a	PE	Beckman Coulter
DC-LAMP	104.G4	PE	Beckman Coulter
Control	679.1Mc7	FITC	Beckman Coulter
Control	679.1Mc7	PE	Beckman Coulter
Control	679.1Mc7	PE-Cy5	Beckman Coulter

PE-Cy5 = Phycoerythrin-Cy5, FITC = fluorescein isothiocyanate, PE = phycoerythrin.



**Πίνακας 3.** Αποτελέσματα από την ανάλυση της κυτταρομετρίας ροής για τα δενδριτικά κύτταρα των πτυέλων

	Smokers		COPD patients (n = 28)	Never-smokers (n = 12)
	total before SC (n = 30)	before SC/after SC (n = 11)		
Total DCs	1.15 (0.04–4.49)	1.45 (0.04–4.48)/1.11 (0.37–3.07)	0.94 (0.08–4.08)	0.79 (0.24–2.9)
CD1c <sup>+</sup> MDCs	0.95 (0.03–3.95)	0.97 (0.03–2.3)/0.48 (0.12–1.50)	0.71 (0.02–3.67)	0.60 (0.20–1.35)
BDCA3 <sup>high</sup> MDCs	0.03 (0–2.01)	0.03 (0–2.01)/0.02 (0–1.80)	0.06 (0–0.33)	0.04 (0.00–0.32)
PDCs	0.14 (0.01–1.11)	0.09 (0.01–1.11)/0.23 (0.07–0.84)	0.14 (0.01–0.39)	0.08 (0.03–1.89)
CD83 <sup>+</sup> DCs	0.25 (0–1.38) <sup>a</sup>	0.21 (0–0.78)/0.69 (0.06–1.87) <sup>b</sup>	0.29 (0.04–0.89) <sup>c, d</sup>	0.48 (0.11–1.39)
CD83 <sup>+</sup> DCs/total DCs	0.22 (0–1.14) <sup>a</sup>	0.21 (0–1.14)/0.60 (0.16–1.78) <sup>b</sup>	0.33 (0.05–0.81) <sup>c, d</sup>	0.54 (0.14–4.19)
DC-LAMP <sup>+</sup> DCs	0.07 (0–0.56) <sup>a</sup>	0.04 (0–0.41)/0.16 (0.03–0.70) <sup>b</sup>	0.12 (0.01–0.9)	0.23 (0.01–1.48)
DC-LAMP <sup>+</sup> DCs/total DCs	0.05 (0–1.14) <sup>a</sup>	0.05 (0–1.14)/0.20 (0.03–0.49)	0.11 (0.01–1.73)	0.18 (0.04–2.03)

Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως median (range). Όλοι οι αριθμοί των DC εκφράζονται ως ποσοστό των λευκοκυττάρων CD45<sup>+</sup> των πτυέλων.

SC = διακοπή καπνίσματος (Smoking cessation).

Total DCs = CD1c<sup>+</sup> myeloid DCs (MDCs) + BDCA3<sup>high</sup> MDCs + PDCs.

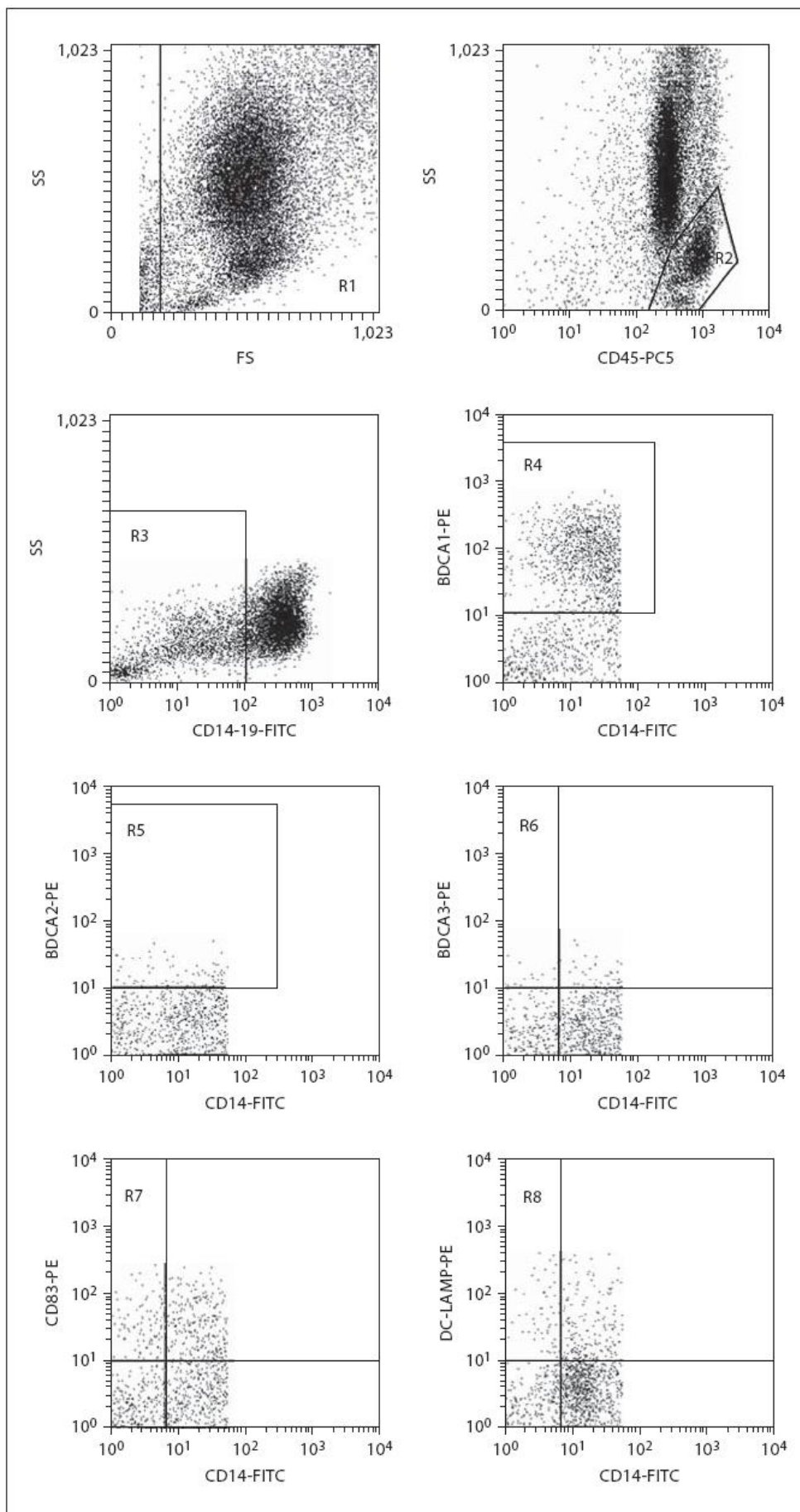
a.  $p < 0.05$ , καπνιστές πριν SC vs. μη καπνιστές

b.  $p < 0.05$ , καπνιστές πριν vs. μετά SC

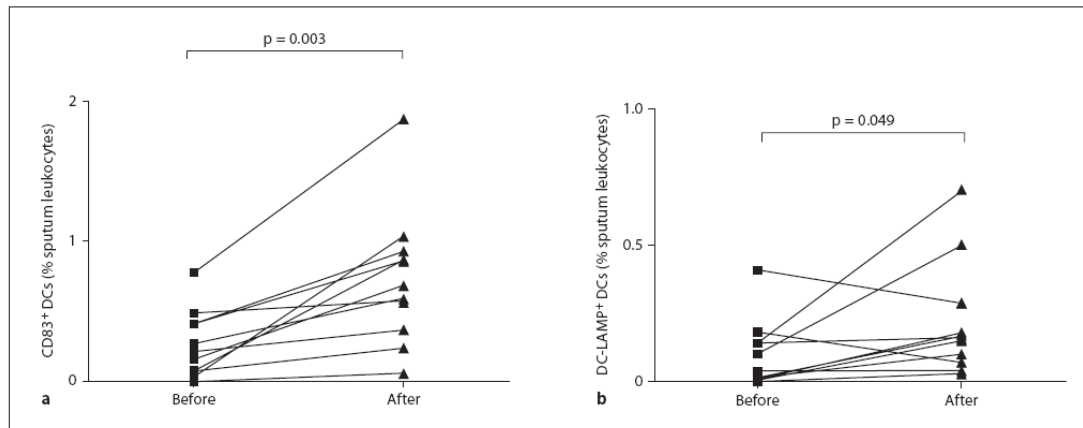
c.  $p < 0.05$ , ασθενείς με ΧΑΠ vs. μη καπνιστές

d.  $p < 0.05$  ασθενείς με ΧΑΠ vs. καπνιστές μετά SC.

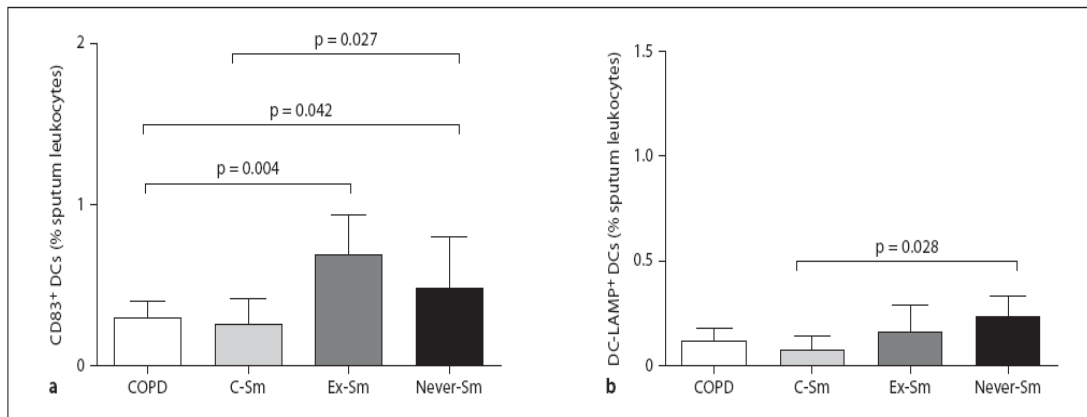
**Σχεδιάγραμμα 1.** R1: gating του forward scatter (FS) και side scatter (SS) modes. R2: gating του CD45<sup>pos</sup> leukocytes με σχετικά χαμηλό SS. R3: gating για αποκλεισμό CD14<sup>high</sup> μονοκύτταρα/ μακροφάγα και CD19<sup>high</sup> B κύτταρα. R4: gating του CD14<sup>low/neg</sup> BDCA1(CD1c)<sup>pos</sup> MDCs. R5: gating του CD14<sup>low/neg</sup> BDCA2<sup>pos</sup> πλασμακυτοειδών DCs. R6: gating του CD14<sup>neg</sup> - BDCA3<sup>high</sup> MDCs. R7: gating του CD-14<sup>neg</sup> CD83<sup>pos</sup> ώριμων DCs. R8: gating του CD14<sup>neg</sup> DC-LAMP<sup>pos</sup> ώριμων DCs.



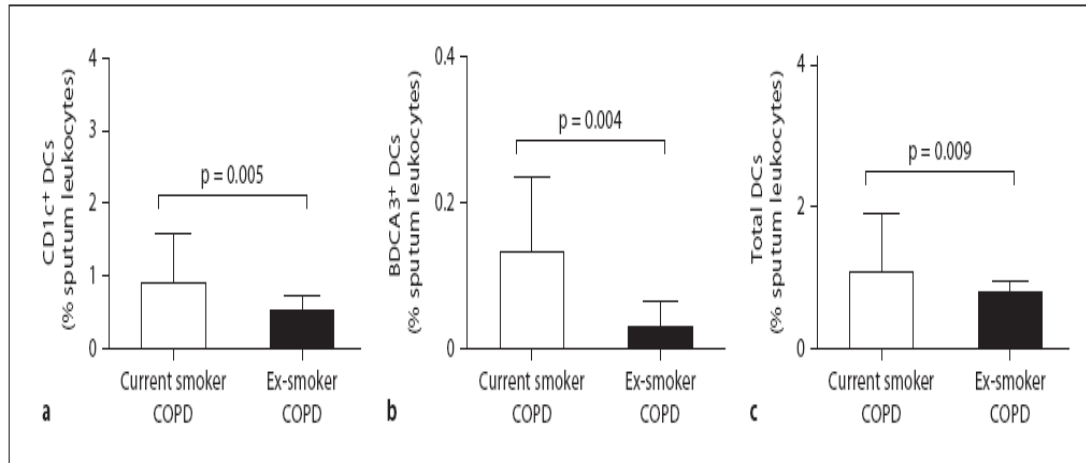
**Σχεδιάγραμμα 2.** CD83 + ώριμα DCs ( **a** ) και DC-LAMP + ώριμα DCs ( **b** ), εκφραζόμενα ως ποσοστά των λευκοκυττάρων CD45 + των πτυέλων σε καπνιστές πριν και μετά τη διακοπή του καπνίσματος (n = 11).



**Σχεδιάγραμμα 3.** CD83 + ώριμα DCs ( **a** ) και DC-LAMP + ώριμα DCs ( **b** ), εκφραζόμενα ως ποσοστά των CD45 + λευκοκυττάρων των πτυέλων σε ασθενείς με ΧΑΠ (n = 28), σε όλους τους καπνιστές πριν τη διακοπή του καπνίσματος (C-Sm; n = 30), στους καπνιστές μετά τη διακοπή του καπνίσματος (Ex-Sm; n = 11) και στους μη καπνιστές (Never-Sm; n = 12). Οι στήλες αντιπροσωπεύουν median values και interquartile range.



**Σχεδιάγραμμα 4.** CD1c + MDCs ( **a** ), BDCA3<sup>high</sup> MDCs ( **b** ) και total DCs (CD1c + MDCs + BDCA3<sup>high</sup> MDCs + PDCs; **c** ), εκφραζόμενα ως ποσοστό των CD45 + λευκοκυττάρων των πτυέλων σε νυν καπνιστές με ΧΑΠ (n = 14), και πρώην καπνιστές με ΧΑΠ (n = 14). Οι στήλες αντιπροσωπεύουν median values και interquartile range



# **ΤΕΛΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**

Ανακεφαλαιώνοντας, τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι η διακοπή του καπνίσματος αυξάνει το ποσοστό των CD8<sup>+</sup> T-κυττάρων και μειώνει το λόγο CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>, καθώς επίσης και τους δείκτες nitrosative/οξειδωτικού stress στα προκλητά πτύελα μέσα σε 6 μήνες από τη διακοπή του καπνίσματος στο επίπεδο των μη καπνιστών. Οι δείκτες αυτοί διατηρούνται στο επίπεδο αυτό σε αυτούς που διατήρησαν την αποχή τους από το κάπνισμα στους 12 μήνες. Οι πρωτεϊνικοί δείκτες στα υπερκείμενα των πτυέλων δεν μειώνονται μετά από 1 έτος από τη διακοπή του καπνίσματος. Δώδεκα μήνες από τη διακοπή του καπνίσματος μειώνουν σημαντικά μόνο τον SLPI του ρινικού εκπλύματος. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι κάποιοι παράγοντες της φλεγμονής και των ανοσολογικών διεργασιών που λαμβάνουν χώρα στους αεραγωγούς των καπνιστών χωρίς προϋπάρχουσα αναπνευστική διαταραχή ή τρέχουσα λοίμωξη αναπνευστικού μπορούν να αναστραφούν στα άτομα αυτά που καταφέρνουν επιτυχώς να διακόψουν το κάπνισμα.

Το κάπνισμα προκαλεί κυτταρομορφολογικές μεταβολές στα πτύελα πριν από την ανίχνευση αλλαγών με τις συνήθεις δοκιμασίες της πνευμονικής λειτουργίας. Η βλάβη στον πνεύμονα μέσω του οξειδωτικού stress θεωρείται σημαντική στην παθογένεση των νόσων του πνεύμονα. Η καλύτερη κατανόηση των νόσων των αεραγωγών και της θεραπείας τους απαιτεί εξέταση των δεικτών φλεγμονής που θεωρούνται ότι συνδέονται αιτιολογικά με τις νόσους αυτές. Για την επίτευξη αυτού του σκοπού η πρόκληση πτυέλων αποτελεί μια αξιόπιστη μη επεμβατική μέθοδο και ένα ισχυρό εργαλείο κατανόησης των νόσων των αεραγωγών και την θεραπεία τους. Το κάπνισμα μπορεί να προκαλέσει φλεγμονώδη αντίδραση στους αεραγωγούς ενωρίς αλλά δεν εξελίσσεται σε όλους τους καπνιστές με παρόμοιο τρόπο. Οι μέχρι τώρα υπάρχουσες δοκιμασίες για την ανίχνευση των πρώιμων φυσιολογικών ανωμαλιών στους μικρούς αεραγωγούς δεν προβλέπουν το 15-20% των καπνιστών που θα εξελιχθούν σε χρόνια περιορισμό των αεραγωγών. Οι ασθενείς με ΧΑΠ, κατά την παρουσίαν τους έχουν ήδη προχωρημένη απόφραξη των αεραγωγών, λόγω των ποικίλων συμπτωμάτων που εσφαλμένα αποδίδονται στην αυξημένη ηλικία. Πιθανώς η απόφραξη των αεραγωγών να είναι μη αντιστρεπτή με τη διακοπή του καπνίσματος, γεγονός που θα μπορούσε να αποφευχθεί γνωρίζοντας τις πρώιμες αλλαγές στους αεραγωγούς. Επομένως η πρόκληση πτυέλων μπορεί να αποτελέσει ένα



ισχυρό εργαλείο για τον καθορισμό πρώιμων κυτταρολογικών μεταβολών στους ασυμπτωματικούς καπνιστές.

Επιπλέον το ρινικό έκκριμα, που είναι λιγότερο επεμβατική τεχνική από την πρόκληση πτυέλων, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μοντέλο για την ανάλυση των εκκρίσεων των κατώτερων αεραγωγών. Τα επίπεδα των υπό μελέτη πρωτεϊνών μπορούν να χρησιμεύσουν ως πρώιμοι δείκτες επιθηλιακής βλάβης του πνεύμονα. Η αναγνώριση αυτών των πρωτεϊνών διασαφηνίζει πιο λεπτομερώς το ρόλο αυτών των πρωτεϊνών στη φλεγμονώδη νόσο του πνεύμονα και ανοίγει το δρόμο για πιθανή αντιφλεγμονώδη θεραπεία.

Βασιζόμενοι στις ενδείξεις της βιβλιογραφίας ότι τα οξειδωτικά/ελεύθερες ρίζες παίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεση πνευμονικών παθήσεων, ενισχύοντας την αντιοξειδωτική ικανότητα θα μπορούσε να είναι ενδεχόμενο θεραπευτικό πλεονέκτημα για αυτές τις καταστάσεις. Επιπλέον μπορεί να γίνει αναγνώριση και παρακολούθηση της αποκατάστασης των αεραγωγών με το χρόνο. Η νιτροτυροσίνη και η iNOS παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον για την έρευνα νέων διαγνωστικών εργαλείων, λόγω του κεντρικού τους ρόλου στη φλεγμονή των αεραγωγών. Οι μεταβολές στις πρωτεΐνες SLPI, CC 16 και ελαφίνης και HBD-2 που ανιχνεύονται στα πτύελα και ρινικό έκπλυμα πριν και μετά τη διακοπή του καπνίσματος πιθανώς να είναι αρκετά σημαντικές στη φλεγμονή των αεραγωγών και στην ενδεχόμενη θεραπεία τους.

Αξίζει τέλος να σημειωθεί ότι η συμμετοχή των ασθενών σε τέτοιους είδους δοκιμασίες πιθανά μπορεί να κινητοποιήσει θετική αλλαγή της συμπεριφοράς με το να επιδεικνύεται η επουλωτική ανταπόκριση σε αυτούς που επιτυχώς διακόπτουν το κάπνισμα.

**ΕΝΟΤΗΤΑ V:  
ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ  
ΣΥΝΕΔΡΙΑ ΚΑΙ  
ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ**

Αποτελέσματα της παρούσας ερευνητικής προσπάθειας έχουν δημοσιευτεί με τη μορφή αναρτημένων ανακοινώσεων (posters) στα παρακάτω διεθνή επιστημονικά συνέδρια:

1. **Bouloukaki I.**, Tsoumakidou M., Mitrouska I., Siafakas N.M. and, Tzanakis N. (2008). Sputum Leucocyte Inhibitor and Clara Cell Protein 16 levels are not altered after 6 month and 1 year smoking cessation. ERS Annual Congress 2008, October , Berlin, Germany.
  2. **Bouloukaki I.**, Tsoumakidou M., Mitrouska I., Siafakas N.M. and, Tzanakis N. (2008). Six month and 1 year smoking cessation decrease sputum inducible Nitric Oxide synthase and nitrotyrosine expression at the never-smokers' level. ERS Annual Congress 2008, October , Berlin, Germany.
  3. M. Tsoumakidou, **I. Bouloukaki**, K. Koubidou, H. Koutala, N. Tzanakis, P. Jeffery, N. Siafakas (2007). Decreased pulmonary mature dendritic cells in healthy smokers and smoking COPD patients. ERS Annual Congress 2007, 1311, 212s
  4. **Bouloukaki I.**, Tsoumakidou M., Mitrouska I., Oikonomidou F., Siafakas N.M. and, Tzanakis N. (2007). Effects of 6 and 12 months smoking cessation on airway inflammation. ATS International Conference, May 18-23, San Francisco, California
  5. C.I. Vardavas, **I. Bouloukaki**, M. Linardakis, N.M. Siafakas, N. Kafatos, N. Tzanakis (2007). Environmental Tobacco Smoke Exposure (ETS) and Excess Lung Cancer Risk among Hospital Staff in Greece. ATS congress 2007, Publication Page: A824
  6. **Bouloukaki I.**, Mitrouska I., Koutala E., Siafakas N.M., and Tzanakis N, (2006). Short term effect of smoking cessation on airway inflammation: Preliminary results. ERS Annual Congress 2006, September 2-6, Munich, Germany.
- Αποτελέσματα της παρούσας ερευνητικής προσπάθειας δημοσιευτεί σε διεθνή επιστημονικά περιοδικά
    1. **Bouloukaki I**, Tsoumakidou M, Vardavas CI, Mitrouska I, Koutala E, Siafakas NM, Schiza SE, Tzanakis N. Maintained

smoking cessation for 6 months equilibrates the percentage of sputum CD8+ lymphocyte cells with that of nonsmokers.

Mediators Inflamm. 2009;2009:812102. Epub 2010 Feb 23.

2. Tsoumakidou M, **Bouloukaki I**, Koutala H, Kouvidi K, Mitrouska I, Zakyntinos S, Tzanakis N, Jeffery PK, Siafakas NM. Decreased Sputum Mature Dendritic Cells in Healthy Smokers and Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Int Arch Allergy Immunol. 2009;150(4):389-97. Epub 2009 Jul 1.
3. Vardavas CI, **Mpouloukaki I**, Linardakis M, Ntzilepi P, Tzanakis N, Kafatos A. Second hand smoke exposure and excess heart disease and lung cancer mortality among hospital staff in Crete, Greece: a case study. Int J Environ Res Public Health. 2008 Sep;5(3):125-9.

SUNDAY, OCTOBER 5TH 2008

fluence some aspects of smoking habit. This knowledge may be helpful for both preventive measures and treatment of smoking.

**P1217****Sputum secretory leukocyte inhibitor and Clara cell protein 16 levels are not altered after 6 month and 1 year smoking cessation**

Izolda Bouloukaki, Maria Tsounakidou, Ioanna Mitrouska, Nikolaos Sifakas, Nikolaos Tzanakis. *Thoracic Medicine, University of crete, Heraklion, Greece*

**Introduction:** Little is known about the effect of smoking cessation on airway inflammation. Secretory Leukocyte Protease Inhibitor (SLPI) and Clara Cell protein 16 (CC16) protect human airways against infection, inflammation and oxidative stress. In this longitudinal study we aimed to investigate changes in sputum SLPI and CC16 levels in healthy smokers after 6 and 12 months of smoking cessation.

**Materials and Methods:** Induced sputum was obtained from healthy current smokers (n=68) aged (mean± SD) 49±9 years, smoking history 57±18 pack years, FEV1 (% pred) 103±19, Fagerstrom score 7.8±1.4, before smoking cessation, after 6 months of smoking cessation (n=21), after 1 year of smoking cessation (n=14) and from 10 healthy never smokers aged 33±9 years, FEV1 (% pred) 114±14. SLPI and CC16 levels were measured in sputum supernatants by commercially available ELISA kits.

**Results:** SLPI levels per gram of sputum were increased in healthy smokers before smoking cessation versus never-smokers median (range) 8.88 (2.4-39.4) vs 0.8 (0.4-4.8) µg/g, p=0.005. CC16 levels were also increased in healthy smokers before smoking cessation versus never-smokers 13.4 (2.2-104.7) vs 3.6 (0-38.4) µg/g, p=0.08. SLPI and CC16 levels did not differ before and 6 months after smoking cessation (p=0.118 and p=0.543 respectively), neither before and 1 year after smoking cessation (p=0.363 and p=0.470 respectively).

**Conclusion:** SLPI and CC16 levels do not decrease up to 1 year after smoking cessation. We may speculate that there is an ongoing inflammatory process stimulating the production of counter-regulating proteins in the airways of healthy ex-smokers.

**P1218****Six month cigarette smoke effect on the selected BAL inflammatory parameters and lung tissue in experiment**

Marta Hurbankova<sup>1</sup>, Milan Beno<sup>1</sup>, Silvia Cerna<sup>1</sup>, Elizabeth Tatrat<sup>2</sup>. <sup>1</sup>Respiratory Toxicology, Slovak Medical University, Bratislava, Slovakia; <sup>2</sup>Histology, National Institute of Environmental Health, Budapest, Hungary

Wistar male rats inhaled Standard research cigarettes of the IRI type from Tobacco and Health Research Institute – THRI, Lexington, KY. A whole-body actively ventilated exposure chamber was built applying a smoking machine and pumps allowing the animals to breathe diluted main-stream tobacco smoke at the target concentration 85 mg of total particulate matter/m<sup>3</sup> air for two hours daily requiring to burn eight cigarettes. The period of smoking lasted 6 months. After this period animals were sacrificed, bronchoalveolar lavage (BAL) was performed and selected inflammatory BAL parameters were examined and compared with the control group. The aim of present work was to find out the subchronic effect of cigarette smoke on the selected BAL inflammatory parameters and lung tissue in rats. Following BAL parameters were investigated: The total cell count, the total count of alveolar macrophages (AM), the differential cell count (% of AM, % of polymorphonuclears – PMN, % of lymphocytes – LY), proportion of immature AM, the percentage of binucleate cells –BNC, the viability and the phagocytic activity of AM. These results of BAL parameters were observed: statistically significant increase of proportion of LY, PMN and immature AM and statistically significant decrease of viability, phagocytic activity of AM and proportion of AM. The results of this study indicated that 6 month smoking of eight cigarettes daily very significantly changed the majority of examined BAL inflammatory parameters. Inflammation may play a significant role in the induction of genotoxicity and carcinogenesis by smoking.

This work was supported by MZ SR project, No.19-10-07.

**P1219****Alveolar changes in a chronic tobacco smoke inhalation COPD mouse model**

Nirmal Parajuli<sup>1</sup>, Michael Seimetz<sup>1</sup>, Markus Roth<sup>1</sup>, Beate Fuchs<sup>1</sup>, Ralph Theo Schermuly<sup>1</sup>, Hossein Ardeschir Ghofrani<sup>1</sup>, Christian Schudt<sup>2</sup>, Christian Hesslinger<sup>2</sup>, Werner Seeger<sup>1</sup>, Friedrich Grimminger<sup>1</sup>, Norbert Weissmann<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Department of Internal Medicine, University of Giessen Lung Center, Giessen, Germany; <sup>2</sup>Department of Human Resource, Nycomed GmbH, Konstanz, Germany

**Introduction:** COPD is a progressive disease having non-fully reversible airflow limitation associated with chronic obstructive bronchitis and emphysema. Genetic factors, environmental pollution and tobacco smoke inhalation are the major factors for induction of this disease. The aim of this study was to establish and to identify the pathogenesis of lung emphysema development in chronic tobacco-smoke inhalation COPD mouse model.

**Material and Methods:** Wild type mice (C57/B16J) were exposed to cigarette smoke for 6 hours/day, 5 days per week up to 8 months. Exposure of smoke was maintained at a particle concentration of 140mg/m<sup>3</sup>. In parallel, wild type control mice were exposed to room air. After exposure, mice were anesthetized for

histological fixations of the lung to analyze alveolar air space, septal wall thickness, and mean linear intercept. Weight changes of all animals were examined weekly. **Results:** Tobacco smoke exposure resulted in an increase in mean linear intercept, alveolar airspace and a decrease in septal wall thickness of all lobes in lung (P<0.05) within 8 months but the diseases progression started even earlier to upper extremities (P<0.05). Body weight was also decreased simultaneously in smoke exposed mice (P<0.05).

**Conclusion:** Thus, emphysema is induced by chronic tobacco smoke inhalation in C57/B16 mice with a higher susceptibility to the proximal regions of the lung. This model now allows studying mechanisms of emphysema in mice by investigation of transgenic animals.

**P1220****Local and systemic inflammation in healthy smokers**

Juan M. Diez, S. Mayorals, D. Alvaro, A. Florez, P. Rodriguez, R. Perez, T. Bilbao, L. Comeche. *Pneumology, Hospital de Mostoles, Mostoles, Madrid, Spain*

**Introduction:** Smoking causes systemic inflammation and increased inflammatory cytokines in smokers' airways.

**Aims:** To know whether there are differences between smokers and non smokers in Tumor Necrosis Factor (TNF) and ultrasensitive-C Reactive Protein (CRP) values in plasma and exhaled breath condensate (EBC). To evaluate the influence of sex, age and weight on those values. To study if smoking increases inflammatory parameters and has a relationship with lung function.

**Methods:** Study (current smokers) and control volunteers (non smokers) had no chronic nor acute (8 weeks) disease/treatment. Abnormal lung function parameters or hyperresponsiveness were excluded with an spirometry with bronchodilator test. A blood test to determine TNF (TNFp) and CRP in plasma was obtained as well as EBC for TNF (TNFc) before quitting smoking. Statistical analysis with SPSS 11.0.

**Results:** 18 volunteers, 8 smokers (44.44%), 50% female. Mean age 42.64. Smoked 27.96 cigarettes/day; started smoking 16.63. There were significant differences for the markers studied between sex, but none for age and weight. We found statistically significant differences between the groups for CRP (p=0.006) and TNFc (p=0.049), but no difference for TNFp (p=0.46). In the study group, CRP had a relationship with the number of cigarettes (p=0.024), but no relation with TNFp nor TNFc. Lung function showed no relation with TNFp (p=0.87); was close to it with TNFc (p=0.057) and had clear relationship with CRP (p=0.008, FVE<sub>1</sub>).

**Conclusions:** Male sex may have an influence in raised inflammatory markers. Smokers show higher values of systemic and local inflammation. Smoking more cigarettes per day makes systemic inflammation raise. Lower lung function, local and systemic inflammation are seen.

**P1221****Effects of smoking on lymphocyte subsets of peripheral blood in patients with chronic renal failure**

Sule Akcay<sup>1</sup>, Sevin Sarinc Ulasli<sup>1</sup>, Ilgaz Dogrul<sup>1</sup>, Gaye Ulubay<sup>1</sup>, Siren Sezer<sup>2</sup>. <sup>1</sup>Pulmonary Diseases, <sup>2</sup>Nephrology, Baskent University, Ankara, Turkey

**Introduction:** It's well known that immune system has been affected in patients with chronic renal failure (CRF). Effects of smoking on immune system have been showed in various studies. However enough data has not been found about changes of lymphocyte subsets in patients with smoking history and CRF.

**Methods:** 15 male active smoker CRF patients on at least one year hemodialysis programme and 15 male CRF patients with no smoking history or cessation of smoking 10 years ago were enrolled to the study. Patients with a history of at least 10 packet-year smoking were selected. Blood samples were taken for complete blood count and lymphocyte subset analysis.

**Results:** The mean age in the group of active smokers and non smokers were 48.8±9 and 57.6±17 years respectively. There was no significant statistical difference between the groups in terms of hemoglobin level, neutrophile, lymphocyte, platelet, eosinophile and basophile counts. There were statistically significant difference on CD19 levels between two groups (p=0.028) and no statistically significant differences on the other parameters of lymphocyte subset. Statistically significant correlations between cigarette packet-year and basophile count (r=0.696; p<0.005), neutrophile count (r=-0.60; p=0.003) and CD3 level (r=-0.429; p=0.042) were found.

**Conclusion:** Humoral immunity was more intensively suppressed in smoker CRF patients than non smoker CRF patients in our study. The relative role of these two conditions in suppression of immunity should be determined and this may contribute to the development of new treatment strategies in future.

**P1222****Plasma homocysteine, folic acid levels and 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism in male patients with chronic obstructive pulmonary disease**

Birgul Isik, Mahmut Batur, Recep Isik, Murat Yurt, Mutlu Dasdag. *Biochemistry, Medicine, Diyarbakir, Turkey; Chest Disease, Medicine, Diyarbakir, Turkey; Biostatistic, Medicine, Diyarbakir, Turkey*

In the present study, we aimed to investigate the plasma homocysteine, folic

SUNDAY, OCTOBER 5TH 2008

## E436

**Effect of smoking cessation on sputum HNP levels in COPD patients and asymptomatic smokers**

Gregorino Paone<sup>2</sup>, Manuela Serpelli<sup>2</sup>, Vittoria Conti<sup>1</sup>, Giovanni Puglisi<sup>3</sup>, Salvatore D'Antonio<sup>3</sup>, Gabriele Lucantoni<sup>1</sup>, Maria Gioconda Zotti<sup>1</sup>, Ilio Cammarella<sup>1</sup>, Enrico Li Bianchi<sup>1</sup>, Giovanni Schmid<sup>2</sup>. <sup>1</sup>Department of Cardiovascular and Respiratory Sciences, University "La Sapienza", Rome, Italy; <sup>2</sup>"La Sapienza", Don Gnocchi Foundation, Rome, Italy; <sup>3</sup>Respiratory Department, Forlanini Hospital, Rome, Italy

**Introduction:** Human Neutrophil Peptides (HNP) are small antimicrobial cationic peptides which are increased in the lower respiratory tract of many neutrophil related inflammatory lung diseases. Recently it has been demonstrated that they may be a marker of obstruction and inflammation in COPD smokers.

**Aim:** We designed our study to analyze the effect of smoking cessation on airway inflammation, with the hypothesis that stop smoking decreasing airway inflammation may lead to a reduction of HNP in respiratory tract.

**Patients and Methods:** We enrolled 70 smokers and 30 ex-smokers who had quit smoking for at least 3 years (53 men and 47 women; mean age 54±5; pack/years 34±10). All subjects underwent physical examination and Pulmonary Function Test. Sputum samples were obtained from all participants at enrolment, and from 30 subjects after a 3 months period of smoking cessation. HNP sputum levels were measured by an ELISA immunoassay.

**Results:** Sputum HNP levels were higher in advanced COPD stages (III to IV) as compared to individuals with stages I-II (21 µg/ml ± 8 vs 10 µg/ml ± 5, p < 0.05). No significant decrease was observed after three months smoking cessation. HAD sputum levels from ex-smokers were significantly lower as compared to smokers (7 µg/ml ± 3 vs 15 µg/ml ± 7, p < 0.05).

**Conclusion:** HNP may be useful in monitoring COPD severity, sputum HNP levels observed after 3 months may reflect the persistent respiratory inflammation, whereas the decreased HNP sputum levels observed in ex-smokers may mirror the reduced inflammatory burden in the lung.

## E437

**Six month and 1 year smoking cessation decrease sputum inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine expression at the never-smokers' levels**

Izolda Bouloukaki, Maria Tsoumakidou, Ioanna Mitrouska, Nikolaos Sifafakis, Nikolaos Tzanakis. *Thoracic Medicine, University of Crete, Heraklion, Greece*

**Introduction:** Smoking increases airway nitrosative stress, but it remains uncertain whether this is reversed after smoking cessation. In this study we aimed to investigate the effect of 6 month and 1 year smoking cessation on induced sputum (IS) Nitric Oxide synthase (iNOS) and nitrotyrosine expression.

**Materials and Methods:** IS was obtained from 68 healthy current smokers aged (mean±SD) 49±9 years, smoking history 57±18 pack years, FEV1 103±19% predicted, before smoking cessation, after 6 months (n=21), after 1 year of smoking cessation (n=14) and from 10 healthy never smokers aged 33±9 years, FEV1 114±14% predicted. Immunocytochemistry was applied to study iNOS and nitrotyrosine.

**Results:** % iNOS+ inflammatory cells and % nitrotyrosine+ inflammatory cells were increased in smokers before smoking cessation (baseline) median (range) 57(17-78) and 62 (2-86) respectively, compared to never smokers 18 (9-31) and 27 (11-52) p=0.005 and p=0.001, respectively. % iNOS+ inflammatory cells decreased after 6 months of smoking cessation 16 (4-73) and after 1 year of smoking cessation 18 (7-58) compared to baseline p=0.0005 and p=0.002 respectively. % nitrotyrosine+ inflammatory cells decreased after 6 months of smoking cessation 26 (4-73) and after 1 year of smoking cessation 19(2-26) compared to baseline p=0.001 and p=0.004 respectively. No difference was detected in % iNOS+ inflammatory cells and nitrotyrosine+ inflammatory cells between never-smokers and smokers after 6 months and 1 year of smoking cessation.

**Conclusion:** After 6 and 12 months of smoking cessation airway nitrosative stress is reduced at the never smoker's levels.

## E438

**Is a percentage a percentage? Systematic review of the effectiveness of Scandinavian smoking cessation courses and quitlines**

Peter Bo Poulsen<sup>1</sup>, Jens Dollerup<sup>1</sup>, Ann Møller<sup>2</sup>. <sup>1</sup>Medical and External Affairs, Pfizer Denmark Aps., Ballerup, Denmark; <sup>2</sup>Department of Anaesthesiology, Herlev University Hospital, Herlev, Denmark

**Background:** Smoking is the primary cause of mortality and morbidity. 50% of smoking-related diseases and deaths are due to COPD with a major impact upon costs and quality of life. Awareness of tobacco controlling policies and smoking cessation is increased. Effectiveness data are important, when deciding cessation strategy.

**Aims and objectives:** Review how the effectiveness of public smoking cessation courses and quitlines are evaluated in Denmark, Sweden and Norway (Scandinavia).

**Methods:** A systematic review was carried out in Medline and gray literature. Following the Russell Standards studies were reviewed according to design, analysis of data (intention-to-treat (ITT) or per protocol (PP)), measurement of smoking status, and follow-up length. Data were benchmarked with pharmacological studies and Cochrane reviews.

**Results:** Although ITT is the scientifically advocated approach, 8 out of 10 studies of public smoking cessation courses are analysed using the PP approach and based on self-reported point prevalence estimates. This results in one year quit rates between 25-48% versus 10-23% with ITT. In contrast pharmacological studies are conservative as being randomized, and relying on ITT, biochemical verification and continuous measurement of smoking status.

**Conclusion:** This review documents that quit rates of smoking cessation interventions are not always comparable, and that Scandinavian courses and quitlines are evaluated using methods that results in too optimistic quit rates. Benchmarking with Cochrane reviews confirms this. This may not lead to the implementation of the most effective and rational smoking cessation interventions in Scandinavia.

## E439

**Smoking cessation and the characters of human intelligence**

Angelo Di Marzo<sup>1</sup>, Anna Maria Santini<sup>2</sup>, Eliano Pio Navarese<sup>3</sup>, Giovanna Scittarelli<sup>4</sup>. <sup>1</sup>Clinical Respiratory Physiology, Policlinico Universitario "A. Gemelli", Roma, Italy; <sup>2</sup>School of Nursing, Policlinico Universitario "A. Gemelli", Roma, Italy; <sup>3</sup>Cardiology, Policlinico Universitario "A. Gemelli", Roma, Italy; <sup>4</sup>Clinical Psychology, Centro Medico Parioli, Roma, Italy

**Aim of the Work:** Smoking cessation (s.c.) can be adequately supported by a psychological approach. To identify the best features of the human intelligence for s.c., we investigated the relations between the decrease of the cigarettes smoked and some parameters of the Wechsler Adult Intelligence Scale (WAIS).

**Methods:** 26 subjects adhered to a program comprising Nicotine replacement therapy and Counselling, with results varying from a total s.c. to no reduction. The study was approved by the ethical Committee. WAIS was administered by a clinical psychologist, and its 11 subtests were grouped to extrapolate 3 parameters (1): verbal knowledge (VK), perceptual organization (PO), capacity of concentration (CC). After an assessment of the normal distribution of the data, a statistical analysis was performed with a Two-way repeated measures ANOVA.

**Results:** For VK, the difference between the initial and final numbers of the cigarettes smoked wasn't significant in the group of subjects under the mean score (11.36±2.62), but it was statistically very important above that mean (respectively, p = 0.53, p = 0.00); the homologous differences, for the parameter PO, were expressed by p = 0.83 and p = 0.00 (mean score = 10.25±2.36); for the factor CC, p = 0.88, and p = 0.00, for scores lower and higher than 12.18±11.39.

**Conclusions:** Smokers who more easily quit smoking or strongly reduced the cigarettes were characterized by a middle-high verbal knowledge, a good visuo-spatial organization, and a sufficient capacity of concentration. In consequence we can argue that the counselling has to be modulated following the different traits of the intelligence of the subjects.

**References:**

1. Allen, S.R., Thorndike, R.M. J. Clin. Psychol. 1995; 51:648-57.

## E440

**Differences in management of smoking cessation program between an urban and rural health center**

Alvaro Perez<sup>1</sup>, Jose Ramon Lopez<sup>1</sup>, Alfredo Avellaneda<sup>2</sup>, Maravillas Izquierdo<sup>3</sup>, Fernando Martin<sup>1</sup>, Trinidad Dierssen<sup>1</sup>. <sup>1</sup>CS Los Valles, Servicio Cantabro Salud, Cantabria, Spain; <sup>2</sup>CS Los Carmenes, Servicio Madrileño Salud, Madrid, Spain; <sup>3</sup>Comunidad Madrid, Servicio Madrileño Salud, Madrid, Spain

**Objectives:** To compare the characteristics of the smoking cessation program conducted at an urban health center and other one rural health center, looking for differences in patients, management and results.

**Methodology:** A cross-sectional descriptive study of patients entered in the smoking cessation program in Zapadón health center (urban) and Los Valles (rural) until February 2007.

**Results:** We have 42 subjects in the urban and 30 in the rural program with an average age of 43.73±12.13 years and 41.67±9.13 respectively; the 52.4% were male in the urban center and 66.7% female in the rural center; smoked an average of 17.66±9.71 cigarettes/day vs 26.73±11.5 cigarettes/day (p=0.107); the age of onset was 15.98±3.47 years vs 14.93±2.8 years (p=0.84); the average time without smoke was 14.78±38.76 months vs 4.72±5 (p<0.05); causes for new start of smoking were smoked colleagues (50%vs34.6%), personal problems (27.8%vs15.3%) and need of nicotine (19.4%vs26.1%); the average of test Fragerström was 4.33±2.46 vs 6.46±1.87 (p=0.08); they have high dependence 38.1% vs 57.7%, treatment 95.2% vs 100% (p=0.25), bupropion (69% vs 66.7%) (p=0.83), nicotine gum (26.2%vs88.9%) (p<0.05) and nicotine patches (19% vs 81.5%) (p<0.05); there were a posterior relapsing in the 26.2% vs 50% (p=0.143).

**Conclusions:** There was a little use of the smoking cessation program; rural program is more used. There are significant differences in the average number of previous attempts to cessation, time without smoking and use of gum and patches of nicotine. There are more use of pharmacological therapy in rural areas (gums and patches of nicotine). We have more success in the rural program.

## 140. Cell biology of asthma and COPD

1308

### Systemic effects of bronchial colonization in early COPD patients enrolled in the PAC-COPD cohort

A. Marin-Tapia<sup>1</sup>, J. Garcia-Aymerich<sup>2</sup>, E. Monsó<sup>1</sup>, J. Sauleda<sup>3</sup>, F. Gómez<sup>4</sup>, J. Belda<sup>5</sup>, J.M. Antó<sup>2</sup>, PAC-COPD Study Group. <sup>1</sup>Servei de Pneumologia, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Barcelona, Spain; <sup>2</sup>Respir & Environm Health, IMIM, Barcelona, Spain; <sup>3</sup>Servei de Pneumologia, Hospital Son Dureta, Palma de Mallorca, Spain; <sup>4</sup>Servei de Pneumologia, Hospital Clínic, Barcelona, Spain; <sup>5</sup>Servei de Pneumologia, Hospital General Universitario de Valencia, Valencia, Spain

**Aim:** To evaluate systemic inflammatory effects of bronchial colonization in a sample of 213 stable COPD patients (94% male; 68 SD 9 years; 38% current smokers; postbronchodilator FEV1% predicted 52 SD 16) identified during their first COPD admission for an exacerbation and enrolled in the PAC-COPD cohort.

**Methods:** Spontaneous or induced sputum was obtained and bacterial cultures were performed. Inflammatory systemic effects were evaluated by C reactive protein (CRP) levels, exercise capacity through 6WMT and nutritional status by body mass index (BMI).

**Results:** The analysis of sputum showed potentially pathogenic microorganisms (PPMs) in 64 (29%) samples (*Haemophilus sp.* 40, 19%; *S.pneumoniae* 6, 3%; *Paeruginosa* 8, 4%; and enterobacteria 5, 2%). Analyzed systemic characteristics for the present study were CRP median 0.7 (IQR 0.4–3.1)mg/dL, BMI mean 28 SD 5 kg/m<sup>2</sup>; and 6MWT mean 425 SD 97 m. Colonized patients showed similar BMI and 6WMT that non colonized patients (BMI 27 SD 5 versus 28 SD 5; 6MWT 395 SD 108 versus 423 SD 91; ns, Student t test), but the levels of CRP in colonized patients were significantly higher than the levels in patients with sterile sputum culture (median 1.5, IQR 0.6–6.6; versus 0.6; 0.4–1.7; p < 0.01, Mann-Whitney U test).

**Conclusions:** After a hospital admission, bronchial secretions are colonized by PPMs in 30% of stable COPD patients, and this colonization seems to be associated with a systemic inflammatory response.

Funded by FIS 060684.

1309

### Application of omics technologies to the identification of biomarkers for COPD

I. Kilty<sup>1</sup>, R. Walsh<sup>1</sup>, J. Bandow<sup>1</sup>, R. Hidi<sup>1</sup>, G. Johnston<sup>1</sup>, P. Phillips<sup>1</sup>, S. Ward<sup>1</sup>, L. Nagy<sup>2</sup>. <sup>1</sup>Pfizer Global Research and Development, Pfizer Limited, Sandwich, United Kingdom; <sup>2</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Debrecen, Debrecen, Hungary

COPD is a major global health problem and is projected to become the 3<sup>rd</sup> most common cause of death worldwide by 2020. Clinical analysis of novel COPD therapies is hampered by the lack of biomarkers for patient stratification and early assessment of drug efficacy, making clinical trials costly and difficult to interpret. We have applied genomic, proteomic and metabolomic technologies to biofluids and cells from COPD patients and “healthy” smoking controls with the aim of identifying markers that are differentially expressed between these populations. mRNA was collected from bronchoalveolar macrophages, peripheral monocytes, and monocyte derived macrophages, protein expression analysed in plasma and metabolomic profiling carried out on both plasma and urine. Integration of these data sets has resulted in identification of approximately 50 candidate biomarkers that are differentially expressed (p < 0.05) between these two populations at either mRNA or plasma protein levels. Encouragingly, some of these markers have been suggested as putative biomarkers from previous publications, such as interleukin 1 receptor antagonist and interleukin 8. However this non-biased top down approach to identification of biomarkers has also suggested that a range of other proteins, including proteins previously associated with cardiovascular disease (apolipoproteins) and cancer (gelsolin), may represent biomarkers for COPD. Interestingly, metabolomic analysis of both plasma and urine did not identify specific markers of disease, but suggest separation of diseased and healthy populations when data is analysed via multivariate methods.

1310

### Interleukin-17 enhances epithelial IL-6 production solely by stabilizing IL-6 mRNA, which is reversed by microRNA16

A. van den Berg, P. Gupta, M. Snoek, R. Lutter. *Departments of Pulmonology and Experimental Immunology, Academic Medical Center, University of Amsterdam, Amsterdam, Netherlands*

**Aim:** Interleukin(IL)-17, implicated in severe asthma, synergizes with inflammatory stimuli like TNF- $\alpha$  to enhance production of IL-6, IL-8 and related inflammatory mediators. In airway epithelial cells this synergy is controlled post-transcriptionally by reducing IL-6 and IL-8 mRNA degradation and not transcriptionally. MicroRNAs direct post-transcriptional processes like mRNA degradation and translation. We studied whether microRNA16 (miR16) attenuated IL-17-enhanced IL-6 and IL-8 production and whether IL-17 affects translational efficiency (for IL-6) besides mRNA degradation.

**Approach:** Doxycyclin-inducible miR16-expressing NCI-H292 lung epithelial-like cells were generated and exposed to TNF- $\alpha$  with and without IL-17 for 16 hours, after which culture supernatant was collected to measure IL-8 and IL-6. Translational control was assessed by polysome profiling. Cleared lysates from NCI-H292 cells exposed to TNF- $\alpha$  with and without IL-17 for 2 and 4 hours were separated on isokinetic sucrose gradients followed by IL-6 mRNA detection in conjunction with 280nm absorbance.

**Results:** miR16 expression down-regulated the IL-17-enhanced IL-6 and IL-8 production for >90%, restoring post-transcriptional control. IL-17 did not increase the ribosomal load on IL-6 mRNA and thus did not increase translational efficiency.

**Conclusion:** These findings indicate that IL-17 potentiates the IL-6 response by reducing IL-6 mRNA degradation, probably by attenuation of relevant miRs. Applying miRs like miR16 may provide an effective means to dampen inflammatory mediator responses.

\*Authors contributed equally. Supported in part by the Dutch Asthma Foundation (NAF 99.27).

1311

### Decreased pulmonary mature dendritic cells in healthy smokers and smoking COPD patients

M. Tsoumakidou<sup>1</sup>, I. Bouloukaki<sup>1</sup>, K. Koubidou<sup>1</sup>, H. Koutala<sup>1</sup>, N. Tzanakis<sup>1</sup>, P. Jeffery<sup>1</sup>, N. Sifakas<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Thoracic Medicine, University Hospital of Heraklion, Crete, Greece

**Rationale:** Cigarette smoke suppresses dendritic cell(DC) maturation *in vitro*. We showed that asthmatic smokers have reduced bronchial mature DCs. We hypothesize that cigarette smoking reduces pulmonary mature DCs in healthy subjects and COPD patients.

**Materials and Methods:** We obtained sputum from 15 male COPD patients (7 current, 8 ex-smokers, 69 $\pm$ 32pack-yr), age 60 $\pm$ 6yrs, FEV<sub>1</sub>/FVC 62 $\pm$ 7%, FEV<sub>1</sub> 67 $\pm$ 12%pred, and 12 male/1 female healthy subjects (9 current, 4 ex-smokers, 69 $\pm$ 36pack-yr), age 53 $\pm$ 10yrs, FEV<sub>1</sub>/FVC 80 $\pm$ 4%, FEV<sub>1</sub> 103 $\pm$ 14%pred. DCs were measured by flow cytometry as low-autofluorescent CD45<sup>pos</sup>CD14<sup>int/low</sup> and 1) CD11c<sup>pos</sup>/CD119<sup>neg</sup> for myeloid DCs type1(MDCs1) 2) BDCA3<sup>hi</sup> for MDCs type2(MDCs2) 3) BDCA2<sup>pos</sup> for plasmacytoid DCs(PDCs) 4) CD83<sup>pos</sup> or DC-LAMP<sup>pos</sup> for mature DCs.

212s



SUNDAY, SEPTEMBER 16TH 2007

**Results:** MDCs1, MDCs2, PDCs, mature DCs did not differ between current and ex-smokers. The ratio CD83<sup>pos</sup> mature DCs to MDCs1+MDCs2+PDCs was reduced in healthy smokers versus ex-smokers (median (range) 0.515 (0.084–0.834) vs 0.891 (0.68–2.135)  $p=0.034$ ), in COPD smokers versus ex-smokers [0.441 (0.267–0.827) vs 0.777 (0.575–1.997)  $p=0.009$ ], in total smokers versus ex-smokers [0.463 (0.084–0.834) vs 0.83 (0.575–2.135)  $p=0.001$ ]. The ratio DC-LAMP<sup>pos</sup> mature DCs to MDCs1+MDCs2+PDCs was reduced in healthy smokers versus ex-smokers [0.176 (0.042–0.889) vs 0.351 (0–0.689)  $p=0.6$ ], in COPD smokers versus ex-smokers [0.099 (0–0.209) vs 0.275 (0–1.21)  $p=0.021$ ], in total smokers versus ex-smokers [0.123 (0–0.889) vs 0.326 (0–1.216)  $p=0.074$ ]. **Conclusion:** Healthy smokers and smoking COPD patients show decreased mature DCs among pulmonary DCs. Cigarette-smoking may suppress DC maturation, which could be related to impaired pulmonary immunity in smokers.

**1312****Treg alterations lead to systemic and local immune deregulation in idiopathic pulmonary fibrosis and collagen vascular disease-associated interstitial pneumonia**

E. Nakou<sup>1</sup>, A. Tzouveleki<sup>2</sup>, I. Bouchliou<sup>1</sup>, G. Kouliasis<sup>2</sup>, M. Froudarakis<sup>2</sup>, P. Steiropoulos<sup>2</sup>, I. Kotsianidis<sup>1</sup>, D. Bouros<sup>2</sup>. <sup>1</sup>Hematology and Flow Cytometry, Democritus Thrace University Hospital, Alexandroupolis, Greece; <sup>2</sup>Pneumology, Democritus Thrace University Hospital, Alexandroupolis, Greece

**Background:** CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T regulatory cells (Treg) maintain the immunological tolerance and prevent autoimmunity by actively suppressing immune responses primarily via cell contact through CTLA-4 ligation. A plethora of evidence suggest immune system involvement in the pathophysiology of interstitial lung diseases (ILD); however, a possible role of Treg has not yet been addressed.

**Methods:** Treg frequency and CTLA-4 expression were assessed by 4-color flow cytometry in the peripheral blood (PB) and bronchoalveolar lavage (BAL) of healthy volunteers normal donors (n=24), patients with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF, n=5), collagen vascular disease-associated interstitial pneumonia (CVD-IP, n=10) and non-idiopathic lung diseases (non-ILD, n=6). All samples were taken prior to any treatment. Treg suppressor activity was assessed by proliferation and suppression assays of MACS-isolated PB and BAL CD4<sup>+</sup>CD25<sup>or-</sup> cells after polyclonal stimulation.

**Results:** We observed significantly higher frequencies of BAL Treg in IPF (22±2.9% of CD4<sup>+</sup> cells) and CVD-IP (18.6±3%) compared to non-ILD (7±1.3%,  $p=0.01$  and  $p<0.03$ , respectively) patients, whereas the Treg percentage and absolute number in PB and CTLA-4 expression in both BAL and PB were similar in all groups. However, both IPF and CVD-IP PB Treg were twofold less suppressive than normal ones, while their BAL counterparts exerted comparable suppression with the non-ILD BAL Treg.

**Conclusions:** In both IPF and CVD-IP Treg are locally expanded, whereas, at the same time their function is compromised in the periphery indicating immune system involvement in the pathophysiology of ILD.

**1313****Altered expression of TLR4 and of beta defensin 2 in chronic obstructive pulmonary disease**

E. Pace<sup>1</sup>, M. Ferraro<sup>1</sup>, M.I. Minervini<sup>2</sup>, P. Vitulo<sup>2</sup>, G. Chiapparà<sup>1</sup>, A.M. Montalbano<sup>1,3</sup>, L. Pipitone<sup>2</sup>, M. Johnson<sup>4</sup>, F. Caronia<sup>2</sup>, G. Bonsignore<sup>1</sup>, B. Gridelli<sup>2</sup>, M. Gjorarkaj<sup>1</sup>. <sup>1</sup>IBIM, CNR, Palermo, Italy; <sup>2</sup>ISMETT, UPMC, Palermo, Italy; <sup>3</sup>Dipartimento di Biopatologia e Metodologie Biomediche, Università degli Studi di Palermo, Palermo, Italy; <sup>4</sup>GlaxoSmithKline Research and Development Ltd, GlaxoSmithKline, Greenford, Middlesex, United Kingdom

Stable chronic obstructive pulmonary disease (COPD) patients have a high prevalence of bacterial colonization of distal airways. A key component of the innate defence mechanisms against bacterial infections is represented by the toll like receptor (TLR) family. In airway epithelium TLRs stimulation leads to the production of beta defensin 2 (HBD2), an important component of innate host defence mechanisms. We explored whether the expression of TLR4, TLR2 and of HBD2 was altered in the epithelium of central and distal airways of COPD. We assessed the expression of TLR4, TLR2 and of HBD2 by immunohistochemistry using surgical specimens from COPD (n=12), healthy smoker (n=7) and from non smoker subjects (n=5). The expression of TLR4 in the epithelium of central airways was higher in healthy smoker subjects than in the other study groups while, in the distal airways, the TLR4 expression was higher in both healthy smokers and COPDs in comparison to controls. No significant differences were observed for TLR2 expression. The expression of HBD2 in the epithelium of central airways was lower in COPDs than in other study groups. Differently, the expression of HBD2 was higher in the epithelium of distal airways in COPDs than in the other study groups. Consequently, in COPD patients the expression of HBD2 in distal airways was higher than in central airways. In conclusion, COPD patients show an increased expression of TLR4 and HBD2 in distal airways but a decreased expression of HBD2 in central airways. A different alteration of innate immunity at different level of the bronchial tree may be relevant in the pathogenesis of COPD.

Supported by GlaxoSmithKline.

**1314****Adenosine receptor expression in sputum of COPD and asymptomatic smokers, before and one year after smoking cessation**

M. Versluis<sup>1,2</sup>, B. Willemse<sup>1,2</sup>, D. Postma<sup>2</sup>, M. Geerlings<sup>1</sup>, B. Rutgers<sup>1</sup>, N. Ten Hacken<sup>2</sup>, W. Timens<sup>1</sup>, M. Hylkema<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Pathology and Laboratory Medicine, University Medical Center Groningen, University of Groningen, Groningen, Netherlands; <sup>2</sup>Pulmonology, University Medical Center Groningen, University of Groningen, Groningen, Netherlands

**Background:** The role of adenosine in the pathogenesis of COPD is complex because adenosine receptors (A<sub>1</sub>R, A<sub>2A</sub>R, A<sub>2B</sub>R, and A<sub>3</sub>R) have pro- and anti-inflammatory effects and therefore are involved in both tissue injury and repair. We showed earlier that one year smoking cessation (SC) did not change airway inflammation in asymptomatic smokers (AS), whereas several aspects of airway inflammation persisted or even increased, e.g. numbers of neutrophils, in COPD. Knowledge on adenosine receptor expression could shed more light on the relation with persistent inflammation in COPD.

**Aim:** To study the adenosine receptor expression on macrophages and neutrophils in sputum of COPD patients and AS, before and 1 year after SC.

**Methods:** Sputum cytopspins of 11 COPD patients and 15 AS were immunohistochemically stained and evaluated for expression of AR, before and 1 year after SC.

**Results:** In COPD patients, numbers of neutrophils and macrophages expressing A<sub>1</sub>R, A<sub>2A</sub>R, A<sub>2B</sub>R, and A<sub>3</sub>R were increased ( $p<0.05$ ) vs. AS, irrespective of SC, as were macrophages expressing A<sub>1</sub>R, A<sub>2A</sub>R, or A<sub>2B</sub>R after 1 year SC ( $P<0.05$ ). In AS, numbers of AR positive macrophages were decreased ( $P<0.05$ ) after 1 year SC. Neutrophils expressing A<sub>2B</sub>R were increased in COPD vs. AS at baseline ( $P<0.05$ ).

**Conclusion:** Since both A<sub>2</sub>Rs and the A<sub>3</sub>R are involved in inhibition of activation of macrophages and neutrophils, increased expression of these receptors in COPD, also after SC, could indicate a compensatory feedback mechanism meant to down regulate the inflammatory response. Increased numbers of neutrophils in COPD after SC could be explained by adenosine binding to A<sub>3</sub>R, this initiates chemotaxis of these cells.

**1315****Vasoactive intestinal peptide-receptor regulation in monocytes derived from COPD patients**

B. Burian<sup>1</sup>, B. Marzluft<sup>1</sup>, A. Storka<sup>1</sup>, Y.-C. Yen<sup>2</sup>, V. Petkov<sup>1</sup>, W. Mosgoeller<sup>2</sup>. <sup>1</sup>Internal Medicine II, Division of Pneumology, Vienna, Austria; <sup>2</sup>Internal Medicine I, Department for Cancer Research, Vienna, Austria

**Introduction:** Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is characterized by an abnormal inflammatory response in lung parenchyma orchestrated by alveolar macrophages. In animal models it has been shown that VIP downregulates proinflammatory cytokines mainly via VIP receptor 1 (VPAC1)

**Aims and objectives:** Since preliminary data show beneficial effects in COPD patients treated with VIP inhalations, we intended to show the receptor expression and regulation in alveolar macrophages and differentiated monocytes from stable COPD patients.

**Methods:** Blood samples were taken from 12 COPD patients. Monocytes were isolated by Ficoll density gradient method, differentiated to macrophages and stimulated with 20ng LPS. VPAC receptors were visualized via immunohistochemistry and western blot. To evaluate receptor expression in alveolar macrophages we used lung tissue sections from COPD patients subjected to lobectomy.

**Results:** The blinded morphometric quantitation revealed low immuno-reactivity for both, VPAC1 and VPAC2 receptors under basal conditions. Stimulation with LPS resulted in a significant upregulation of VPAC1 ( $p<0.001$ ), but not VPAC2, which only showed a minor insignificant increase. The predominant expression of VPAC1 in activated macrophages was confirmed via western blot. Alveolar macrophages show an increased expression of VPAC1 comparable to activated macrophages.

**Conclusion:** Active regulation of VPAC receptors is part of the inflammatory response in macrophages, making the VPAC1 receptor a potential target for anti-inflammatory treatment in COPD. The increased expression of VPAC1 in alveolar macrophages may reflect the chronic inflammatory state in COPD.



**[Poster Board #416] Environmental Tobacco Smoke Exposure (ETS) and Excess Lung Cancer Risk among Hospital Staff in Greece, [Publication Page: A824]**

*C.I. Vardavas, M.D., I. Bouloukaki, M.D., M. Linardakis, M.D., N.M. Siafakas, Prof., N. Kafatos, Prof., N. Tzanakis, Asist. P, Heraklion, Greece*

**Rationale:** Greece has the highest adult smoking prevalence amongst all E.U countries, with 40% of the adult population current smokers. Although legislation prohibiting tobacco use in hospitals does exist it is improperly enforced and in certain cases bluntly ignored. The purpose of our study was to estimate ETS exposure throughout a large Greek university hospital and to estimate the staff's excess lung cancer mortality risk

**Methods:** Airborne Particulate Matter (PM 2.5 $\mu$ m) was measured using a TSI SidePak AM510 Aerosol Monitor (TSI, Inc., St. Paul, Minnesota, USA). Excess lung cancer risk was indirectly calculated using the equations relating PM<sub>2.5</sub> measurements with airborne nicotine levels (Repace et al, 2006).

**Results:** ETS exposure was evident in all areas of the hospital PM<sub>2.5</sub> levels ranging between 0.001 and 1.9mg/m<sup>3</sup> depending on the ward. The managing ward, waiting rooms and staff rest rooms were found to have the highest levels of ETS. PM<sub>2.5</sub> levels in wards were found to average 0.1mg/m<sup>3</sup>. It has been estimated that a workplace airborne nicotine concentration of 6.7  $\mu$ g/m<sup>3</sup> gives an excess lung cancer risk of 1/1000 in a linear dose-response relationship. Therefore, by translating PM<sub>2.5</sub> to nicotine levels it can be calculated that on average 1.4 (0.4 to 2.6 per 1000) workers will die of lung cancer due to hospital based ETS exposure in Greece, a level of risk similar to that found amongst workers in betting parlors in the U.S (1.4 per 1000).

**Conclusions:** Our findings document the fact that hospitals in Greece are not smoke-free. Such high levels of measured ETS exposure pose a serious threat not only to the patients but also to the medical and nursing staff's health, by raising their risk of lung cancer.

**Session Info:** [\*\*] Poster Discussion Session, [D21] SMOKING RELATED HEALTH EFFECTS: MECHANISMS TO EPIDEMIOLOGY

**Session Time:** 8:15 AM - 11:00 AM

**Presentation Time:** 8:15 AM

**Poster Viewing:** 8:15 AM - 9:15 AM

**Poster Discussion:** 9:15 AM - 11:00 AM

**Room:** Room 270-276 (West Mezzanine), Moscone Center

**[Poster Board #707] Effects of 6 and 12 Months Smoking Cessation on Airway Inflammation, [Publication Page: A599]**

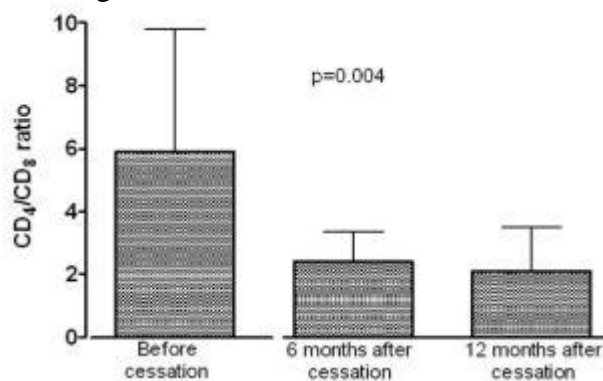
*I.E. Bouloukaki, M.D., M. Tsoumakidou, M.D., I. Mitrouska, M.D., F. Oikonomidou, M.D., N.M. Siafakas, M.D., Ph, N. Tzanakis, M.D., Heraklion, Crete, Greece*

**PURPOSE:** The aim of this study was to investigate inflammation changes in induced sputum in smokers, 6 and 12 months after cessation.

**MATERIAL-METHODS:** Induced sputum (IS) was performed in 55, otherwise healthy, heavy smokers (59 py) (M/F: 49/6), mean age of 49 yrs., mean Fagerstrom score 7.7 and, mean FEV1 (% pred.):103, before a smoking cessation trial. After 6 and 12 months IS was repeated in 10 and 7 subjects respectively who had quit smoking. Differential cell count, T-lymphocyte subpopulations and Secretory Leukocyte Protease Inhibitor (SLPI) was measured in IS.

**RESULTS:** Statistically significant changes in CD4/CD8 ratio was observed (figure). Higher SLPI ( $\mu\text{g/ml}$ ) (mean  $\pm$ SD) levels in sputum 12 months after smoking cessation was observed [ $0.9 \pm 0.6$  vs  $1.2 \pm 0.7$  ( $p = 0.04$ )].

**CONCLUSION:** Our preliminary results support a significant reduction in airway inflammation markers shown after a 6 and 12 months continuous abstinence from smoking.



**Session Info:** [\*\*] Poster Discussion Session, [C29] COPD: PREVENTION THROUGH MANAGEMENT

**Session Time:** 8:15 AM - 11:00 AM

**Presentation Time:** 8:15 AM

**Poster Viewing:** 8:15 AM - 9:15 AM

**Poster Discussion:** 9:15 AM - 11:00 AM

**Room:** Golden Gate Hall A1-3 (B2 Level), San Francisco Marriott Hotel

MONDAY, SEPTEMBER 4TH 2006

2. The results are directly interchangeable  
 3. The analytical CV of all parameters studied observe the appropriate decision criteria of the Quality Commission of IFCC in High values but it is not acceptable for Low values in Bedfont Micro III Smokerlyzer; and that is the reason for the use of the new Bedfont Mini 2 Smokerlyzer.

**P2307****Short term effect of smoking cessation on airway inflammation: preliminary results**

Izolda Bouloukaki<sup>1</sup>, Ioanna Mitrouka<sup>1</sup>, Eleni Koutala<sup>2</sup>, Nikos M. Sifakas<sup>1</sup>, Nikos Tzanakis<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Dept. of Thoracic Medicine, University General Hospital, Heraklion, Greece; <sup>2</sup>Dept. of Haematology, University General Hospital, Heraklion, Greece

**Purpose:** The aim of this study was to investigate inflammation changes in induced sputum of smokers, six months after cessation.

**Material and Methods:** Induced sputum (IS) was performed in 45, otherwise healthy, heavy smokers (59 p.y) (M/F: 40/5), with a mean age of 48 yrs., mean Fagerstrom score 7.8 and, mean FEV<sub>1</sub>:103 (% pred.). After six months IS was repeated in 10 subjects who had quit smoking. Differential cell count, T-lymphocyte subpopulations and Secretory Leucocyte Protease Inhibitor (SLPI) was measured in IS.

**Results:** Statistically significant changes in SLPI ( $\mu\text{g/ml}$ ) (mean  $\pm$  SD) levels, before and 6 months after smoking cessation, were observed [ $1.3 \pm 0.5$  vs  $0.5 \pm 0.3$  ( $p = 0.05$ ) and in CD4/CD8 ratio (mean  $\pm$  SD)  $3.6 \pm 1.7$  vs  $2 \pm 0.6$  ( $p = 0.05$ )].

**Conclusion:** Our preliminary results support a significant reduction in airway inflammation markers shown even after a short-term abstinence from smoking.

**P2308****Effect of duration of smoking cessation on the absorption of inhaled human insulin (Exubera<sup>®</sup>)**

Robert Fountaine<sup>1</sup>, Ashley Milton<sup>1</sup>, Greg Wei<sup>1</sup>, Susan Willavize<sup>1</sup>, John G. Teeter<sup>1</sup>, Sue Sha<sup>2</sup>, David A. Fryburg<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Pfizer, Global Research and Development, Groton, CT, United States; <sup>2</sup>Johnson and Johnson Pharmaceutical, Research and Development, Raritan, NJ, United States

Inhaled human insulin (INH; Exubera<sup>®</sup>) bioavailability is increased in chronic smokers vs nonsmokers. This open-label, randomized, crossover study, investigated the effects of smoking cessation for 3 and 13 weeks on INH pharmacokinetics. 38 nondiabetic smokers (Sm)(21 cigarettes/d) and 30 nonsmokers (NSm) received INH (2 mg) or subcutaneous insulin (6U). Sm received their second (INH2) and third (INH3) doses 3 and 13 weeks after smoking cessation. Smoking status was verified by plasma carboxyhemoglobin and serum cotinine concentrations.

At baseline, Sm had significantly higher maximum insulin concentration ( $C_{\text{max}}$ ) and area under the curve ( $\text{AUC}_{0-360}$ ) (344% and 458% greater, respectively;  $P$ -value  $<0.05$ ), and a significantly shorter time to maximum concentration ( $T_{\text{max}}$ )(22 min;  $P$ -value  $<0.05$ ) than NSm. After 3 weeks cessation,  $C_{\text{max}}$  and  $\text{AUC}_{0-360}$  were significantly reduced to 49% ( $P$ -value  $<0.05$ ) and 59% ( $P$ -value  $<0.05$ ), respectively, vs smokers. No further reductions were observed after 13 weeks cessation (Table). Hypoglycemia was increased in Sm vs NSm, but most events were mild.

	AUC <sub>0-360</sub> ( $\mu\text{U}\cdot\text{min/mL}$ )*	C <sub>max</sub> ( $\mu\text{U/mL}$ )*	T <sub>max</sub> (min)†
NSm	1410	15.8	53
INH1	4850	72.3	31
INH2	2850	35.7	41
INH3	3260	43.1	40

Data for INH-treated subjects: INH1 = prior to smoking cessation, INH2 = 3 weeks after cessation, INH3 = 13 weeks after cessation; NSm = Nonsmoker, \*Adjusted geometric mean, †Arithmetic mean

Smoking cessation for 3 weeks reduced INH absorption by almost 50%. This reduction was maintained at 13 weeks cessation, and remained greater than that of NSm. These results are consistent with previous reports that absorption of INH and other small molecules is increased in Sm compared with NSm.

**P2309****Factors associated with abstinence and effectiveness of a smoking cessation program**

Maria V. Lopez Varela, Turquesa Anido, Mabel Rovira. Pulmonary Division, Centro de Asistencia del Sindicato Medico del Uruguay, Montevideo, Uruguay

Cigarette smoking is the single biggest avoidable cause of death and disability in developed countries.

Smoking cessation programs are imperative in health care settings, quit rates ranging from 20 to 30%.

**Objectives:** To assess effectiveness and factors associated with outcomes of the smoking cessation program, running at the Pulmonary Department of our Hospital, 2000-2004.

**Methods:** Sex, age, referral, smoking history, previous attempts to quit, smoking among family members, education level, marital status, heart or respiratory

diseases, psychological background, other addictions and nicotine dependence through Fagerstrom (FTND) were evaluated as predictors of abstinence in an univariate analysis.

An 8 weeks multicomponent Program, conducted by a pulmonologist included: individual counselling on behavioural modification, written information, advice about quit aids, support and group sessions by psychologist. Therapy with bupropion provided by Hospital, but not NRT. Abstinence confirmed by exhaled carbon monoxide measurement.

**Results:** 1400 smokers referred, due to saturation of staff resources 517 entered the program, 357 completed at least 2 sessions; age  $50.58 \pm 11.24$ , 61.1% females, previous aids to quit in 82.1%, pack/years  $44.22 \pm 26.2$ , reported age of starting  $17.93 \pm 5.6$ , cigarettes/day  $28.39 \pm 13.44$ , FTND  $5.99 \pm 2.11$ , 84.3% received medication. 113 (31.6%) subjects were in abstinence at one year. Reduced abstinence was associated with female gender (OR= 0.61;IC 95%, 0.39-0.97;  $p=0.03$ ) and higher FTND (OR=0.48; IC95%, 0.26-0.95;  $p=0.02$ )

**Conclusions:** Our program proved as effective as others: one of every three smokers quitted. Abstinence was related to gender and nicotine dependence.

**P2310****Projecting long term effects of tobacco control. The RIVM chronic disease model**

Pieter H.M. van Baal, Talitha L. Feenstra, Rudolf T. Hoogenveen, Hendrick C. Boshuizen. Centre for Prevention and Health Services Research, National Institute for Public Health and the Environment, Bilthoven, The Netherlands

To support policy makers in setting priorities and allocating health care resources, it is useful to quantify the potential effects of tobacco control on the burden of disease. To prevent unrealistic expectations, quantification should account for relapse of former smokers and slowly decreasing risks after cessation. The RIVM Chronic Disease Model is a dynamic population model that relates smoking to the incidence of 14 chronic diseases. The restart rates of former smokers as well as their relative risk for incidence of smoking related diseases decrease with time since cessation. The model projects the life years gained from smoking cessation or a reduction of smoking initiation. Based on data from the Dutch Burden of Disease Study, the model estimates the reduction of the burden of disease, combining gains in morbidity and mortality. Adding data from the Dutch Cost of Illness Study, the effects on the costs of disease were projected, both for smoking related diseases and for total health care costs.

The effects of prevention of smoking in young people were largest after about 60 years. The gain in life expectancy was about 7 years. The largest health gains from smoking cessation in the adult population were obtained in about 20 years from the start of the program. Gains in life expectancy per quitter varied from 0.30 to 1.3 life years, depending on cessation age. For both policies, health care costs dropped initially, but rose later, due to increasing costs of care for diseases not related to smoking. Projections with the model thus clarified the timing of health effects and changes in health care costs after different tobacco control policies.

**P2311****Urinary cotinine concentrations in children with asthma in a parental smoking cessation program**

Stefan L.E. Willers<sup>1</sup>, Gunnar Skarping<sup>2</sup>. <sup>1</sup>Unit of Preventive Medicine and Dept of Respiratory Medicine & Allergy, Heart and Lung Center, Lund University Hospital, Lund, Skane, Sweden; <sup>2</sup>Work Environment Chemistry, Stockholm University, Håssleholm, Skane, Sweden

Environmental tobacco smoke (ETS) exposure (i.e. parental smoking) is a major risk factor for development of childhood asthma. In experimental and epidemiological studies, we found the urinary cotinine concentration (U-cotinine) to be an excellent biomarker of ETS exposure. Further, U-cotinine was associated with an increased relative risk of childhood asthma. In the treatment program of childhood asthma, therefore parental smoking cessation is important. U-cotinine is useful for monitoring the intensity of smoking in active smokers during and after smoking cessation. In addition, for several years, by use of U-cotinine, we have assessed the ETS exposure in cases of childhood asthma of smoking parents. In the present report, we evaluated the possibility to use U-cotinine in children with asthma, as a mean of encouragement in a parental smoking cessation program. A group consisting of 12 non-smoking asthmatic children together with their still smoking parents were included. Earlier, the parents all had got the usual quit smoking advice from paediatricians. At the start of the program the parents were informed about the U-cotinine of their children. During the first week, we found that U-cotinine decreased in nine of the children indicating that parents had quit smoking. Further, still one year after the start of the program, U-cotinine in the study group were still significantly lower (medians 13 vs. 8  $\mu\text{g/L}$ ;  $p<0.03$ ). Thus, U-cotinine in children may be useful in parental smoking cessation programs. It adds information on the smoking intensity of the parents, who are made aware of the child's exposure to harmful tobacco smoke.

## Clinical Study

# Maintained Smoking Cessation for 6 Months Equilibrates the Percentage of Sputum CD8<sup>+</sup> Lymphocyte Cells with That of Nonsmokers

Izolda Bouloukaki,<sup>1</sup> Maria Tsoumakidou,<sup>1</sup> Constantine I. Vardavas,<sup>2</sup> Ioanna Mitrouska,<sup>1</sup> Eleni Koutala,<sup>1</sup> Nikolaos M. Siafakas,<sup>1</sup> Sophia E. Schiza,<sup>1</sup> and Nikos Tzanakis<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Thoracic Medicine, University General Hospital, Medical School of the University of Crete, 71110 Heraklion, Greece

<sup>2</sup>Department of Epidemiology, Social Medicine, Medical School of the University of Crete, 71110 Heraklion, Greece

Correspondence should be addressed to Izolda Bouloukaki, izolthi@yahoo.com

Received 31 July 2009; Revised 5 November 2009; Accepted 30 November 2009

Recommended by Alex Kleinjan

Little is known about the longitudinal effects of smoking cessation on sputum inflammatory cells. We aimed to investigate into changes in sputum inflammatory cells and T-lymphocyte subpopulations after 6 and 12 months smoking cessation. Induced sputum was obtained from 68 healthy smokers before and after 6 months ( $n = 21$ ) and 1 year ( $n = 14$ ) smoking cessation and from ten healthy never-smokers. Inflammatory cells were identified by morphology and T-lymphocyte subpopulations by flow cytometry. Sputum macrophages were decreased after 12 months of smoking cessation in comparison to baseline, while neutrophils increased. Moreover, CD8<sup>+</sup> T-cells were decreased in smokers before smoking cessation compared to never-smokers and increased in smokers after 6 months of smoking cessation in comparison to baseline, result that was maintained after 1 year of smoking cessation. These novel findings indicate that smoking cessation can equilibrate certain inflammatory cells of smokers with those of non smokers, within 6 months of smoking cessation.

Copyright © 2009 Izolda Bouloukaki et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

## 1. Introduction

Smoking is the main risk factor for the development of a number of chronic lung diseases, such as chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and lung cancer, and scientific evidence is conclusive of its role in the predisposition and outcome of several others [1]. While as stated above, active smoking is the main cause of lung cancer, smoking cessation significantly reduces the risk of lung cancer by 2-3 times at 10 years [2]. Moreover, sustained abstinence from smoking decreases the rate of decline in lung function to the levels of never-smokers and reduces the risk of developing clinically significant COPD [2]. These findings suggest that the adverse effects of smoking in the lungs are partly reversed after cessation.

The mechanisms of cigarette smoke-induced lung injury have not been fully elucidated yet. However, it has been suggested that the early inflammatory responses to cigarette

smoke are crucial to the development of subsequent tissue damage and disease in susceptible individuals. Furthermore, research has indicated that it may lead to a localised reaction and sequestration of neutrophils in pulmonary microvasculature and cause tissue damage through the release of toxic and chemotactic mediators, and thus further predispose to lung disease and inflammation [1-4]. Among lymphocytes, circulating CD4<sup>+</sup> T-cell lymphocytes have been suggested as target cells for smoking. In particular memory CD4<sup>+</sup> T-cell lymphocytes have been found to be selectively and dose dependently increased by active smoking, which is stimulated through the chronic procedure of habitual smoking [5]. In support of this, the number of inflammatory cells recovered by bronchoalveolar lavage fluid (BALF) is increased in smokers compared to never-smokers, primarily due to an increase in BALF macrophages [6-8]. Similarly to BALF, there is a significant increase in sputum and small airway macrophages in smokers [9-12]. Moreover, several

reports have showed that neutrophils and lymphocytes are increased in smokers [6–9, 12–16]. CD4<sup>+</sup>T-cells in BALF of smokers have been reported to be decreased [15, 17] and CD8<sup>+</sup> T-cells to be increased, resulting in a markedly decreased CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> ratio compared to never-smokers [18, 19]. Similarly, in the small airway submucosa, there is a trend toward a decrease in CD4<sup>+</sup> T-cells, an increase in CD8<sup>+</sup> T-cells and a significant decrease in the CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T-cell ratio in smokers as compared to non-smokers [13].

Much less is known about the effects of smoking cessation. Two relatively old cross-sectional studies found no differences in inflammatory cells between smokers and exsmokers [20, 21], while others showed that BALF macrophage, but not neutrophil numbers are decreased in exsmokers compared to smokers [22]. In addition, it is worth noting that, in patients with COPD, one cross-sectional study in induced sputum found no differences in the cellular profiles and macrophage phenotypes when comparing smokers with ex-smokers [23], possibly indicating persistent inflammatory changes in the airways in patients who are predisposed to COPD. Longitudinal studies showed that BALF macrophages, neutrophils, lymphocytes and sputum macrophages decrease to the levels of never-smokers after smoking cessation [7, 24–26]. Reports on sputum neutrophils are controversial, showing either a decrease [25] or an increase [26]. There is only one longitudinal study in “healthy” smokers assessing T-lymphocyte subpopulations in bronchial biopsies and this study found no difference in CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T-lymphocytes after smoking cessation [26]. No longitudinal studies have been reported the effect of smoking cessation on sputum T-lymphocyte subpopulations in “healthy” smokers. We have conducted a longitudinal study to examine whether changes in T lymphocyte subpopulations and airway inflammatory cells are reversed after a period of 6 months and 12 months smoking cessation in “healthy” smokers.

## 2. Materials and Methods

**2.1. Subjects.** In the University Hospital of Heraklion, Crete, induced sputum was obtained from 68 smokers recruited from the smoking cessation clinic, before their entrance into the smoking cessation protocol. All subjects provided written informed consent and ethical approval was provided by the University Hospitals Ethics Committee. Following enrollment, all smokers participated in the same behavioural therapy program and according to their degree of dependence (Fagerstrom test) they received nicotine replacement therapy and/or bupropion as part of their smoking cessation treatment. Ten never-smokers were recruited by advertisement and were the control subjects. All subjects were free of any respiratory tract infections at the time of the study or during the month preceding the study and at the follow-up at 6 and 12 months. Subjects did not suffer from any disease and did not receive any medication at the time of the first visit, while none had symptoms of chronic bronchitis. Furthermore, baseline lung functional tests were within the normal range and their chest radiograph was normal.

The participating subjects’ characteristics are depicted in Table 1.

**2.2. Sputum Collection, Induction and Flow Cytometry.** Sputum specimens were successfully collected at baseline in all 10 controls and 68 smokers, while sufficient sputum of good quality was produced by 16 of the 21 successful quitters at baseline after 6 months of follow-up, in 18 out of 21 who had not relapsed (86% collection rate) and after 12 months of smoking cessation in 9 out of 14 quitters (65% collection rate). During each follow-up, confirmation of smoking status was assessed both by exhaled CO and urine cotinine levels. The progress of smoking cessation and sputum collection is depicted in Figure 1.

Sputum was induced and processed as previously described in [27]. Subjects inhaled hypertonic saline for three ten-minute sessions. The concentration of the inhaled saline was consecutively increased in each session from 3% to 4% and to 5%. Always between sessions the inhalation procedure was interrupted and the subjects were asked to blow their nose, rinse their mouth, and try to expectorate sputum into a sterilized box. By this way saliva contamination of the sample was minimized and the percentage of squamous cells in the sample was decreased. Sputum was processed within the next 30 minutes or no more than two hours, with the sample always kept in ice. The volume of the sputum was measured and sputum samples with a volume of at least 2 mL are reputed to be sufficient. The more viscid proportions of the sputum (plugs) were selected and weighed. Dithiothreitol (Calbiochem, Darmstadt, Germany) was added, followed by phosphate buffer saline (PBS). Then, the mixture was filtered and centrifuged. The cell pellet was resuspended with PBS, a total cell count of the sample was performed, and viability was tested by means of trypan blue exclusion method. If cell viability was less than 50% and/or squamous cell contamination more than 20%, the sample was not processed further. Sputum cytopsin slides were stained using May-Grunwald Giemsa for differential cell count. Cell counting was performed by one investigator (IB), blind to the origin of the samples. At least 400 cells were counted. Cytopsin with <50% of squamous cells and >400 nonsquamous cells were qualified as of good quality. Cell differential counts were expressed as % of total sputum nonsquamous cells.

Approximately 10<sup>6</sup> sputum white cells were labelled for flow cytometry with monoclonal antibodies raised in mice against human (all from Immunotech; Marseille, France): phycoerythrin-cyanine (PECy-5) conjugated anti-CD8, fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugated anti-CD4, and phycoerythrin (PE) conjugated anti-CD45 for 30 minutes at 4–8°C or with isotype matched controls for 30 minutes at 4–8°C. An ELITE COULTER cytometer was used. Data were acquired in list mode and analyzed using Epics Elite. The following gating strategy was applied: first dead cells, debris and epithelial cells were excluded on an SS-CD45 scatter plot, then lymphocytes were gated on an FS-SS scatter plot based on their size and granularity properties. Finally CD4 and CD8 positive cells were enumerated and expressed as percentage of % sputum lymphocytes on a CD4/CD8 scatter plot (Figure 2). Some samples were not sufficient enough



TABLE 1: Subject characteristics.

	Total	Smokers		Nonsmokers (controls)	P-value*
		Successful quitters at 6 months	Nonquitters		
N	68	21	47	10	N/A
Sex, M/F	59/9	19/2	40/7	8/2	$P = .6$
Age, (in years)	$49 \pm 8$	$49 \pm 7$	$49 \pm 9$	$33 \pm 9$	$P = .002$
Smoking (pack-years)	$57 \pm 18$	$53 \pm 15$	$59 \pm 19$	N/A	N/A
FEV1, %pred Postbronchod.	$105 \pm 12$	$109 \pm 13$	$104 \pm 11$	$116 \pm 13$	$P = .2$
$\Delta$ FEV1 % pred	$2.1 \pm 1.8$	$2.4 \pm 2.3$	$1.9 \pm 2.2$	$1.9 \pm 1.4$	$P = .16$
Fagerstrom Score	$8 \pm 1$	$7 \pm 1$	$8 \pm 1$	N/A	N/A

Data are presented as mean  $\pm$  SD, or in absolute numbers, N/A: non applicable, FEV1: forced expiratory volume in one second;  $\Delta$ FEV1: change in FEV1 after bronchodilation.

\*P-value between controls and successful quitters.

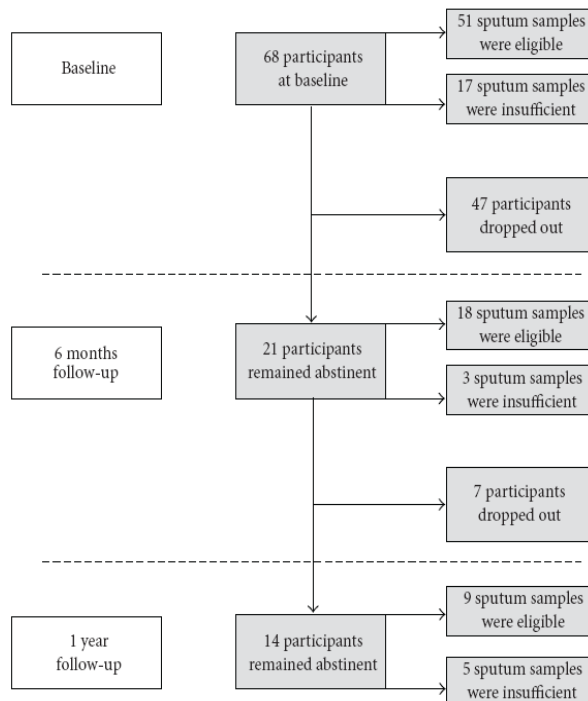


FIGURE 1: Flowchart of participation, smoking cessation and sputum quality.

(<math>10^6</math> sputum white cells) to be labelled for flow cytometry and this accounts for the occasional missed cases in some cell counts (Figure 1).

**2.3. Statistical Analysis.** Normality was tested by the Shapiro-Wilk test. Variables were nonnormally distributed. In the group of subjects who successfully managed to quit smoking, differences in smokers before and after 6 and 12 months of smoking cessation were tested using the Friedman test followed by the Wilcoxon Signed Ranks test to see pairwise

differences. Differences between smokers and the control group were tested using the Mann-Whitney  $U$  test. The software StatsDirect (Camcode Cambridge, UK) was used. Probability values of <math><.05</math> were considered as statistically significant.

### 3. Results

Sputum characteristics in smokers both before and after smoking cessation as also in the control population are

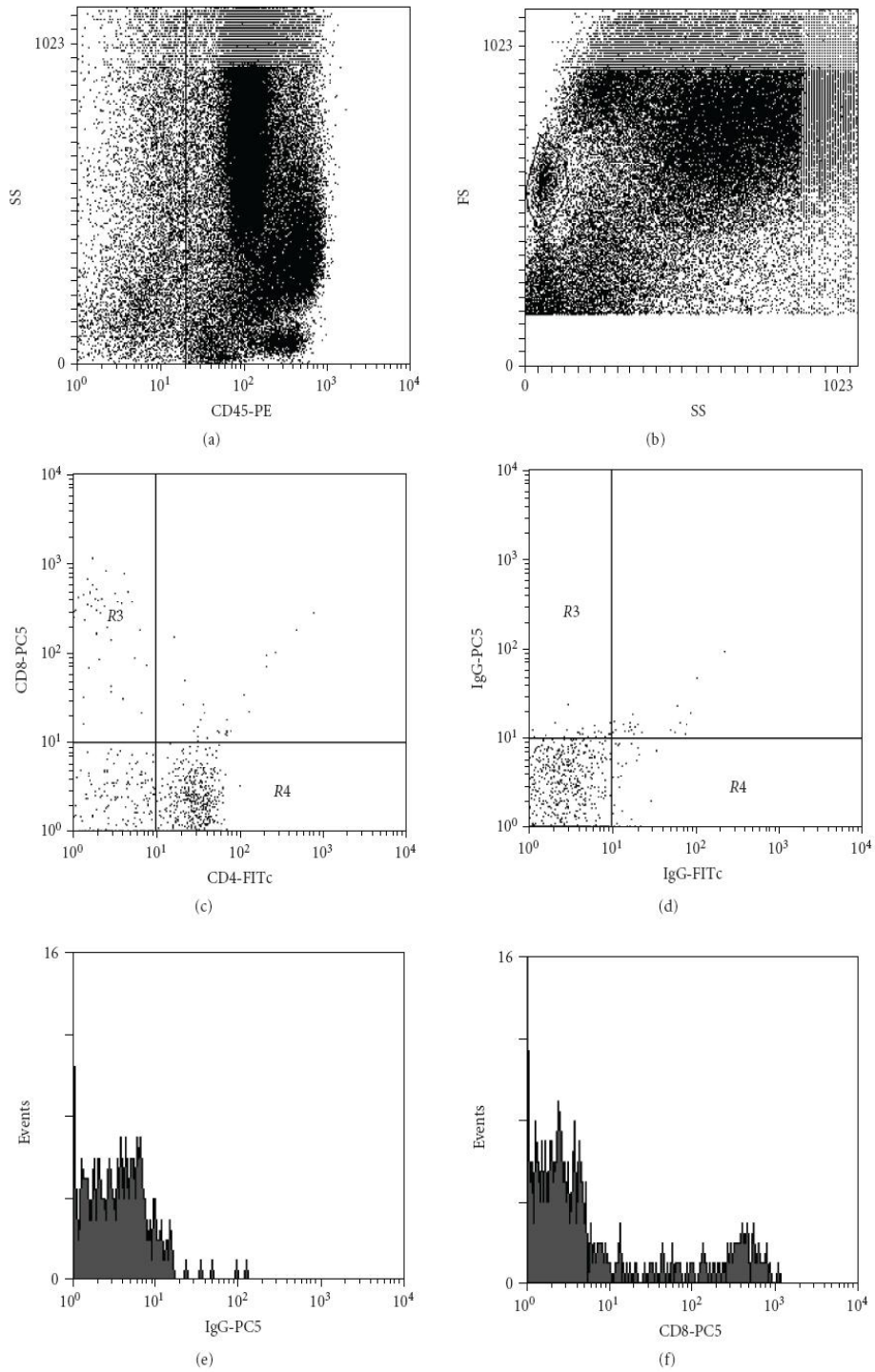


FIGURE 2: Continued.

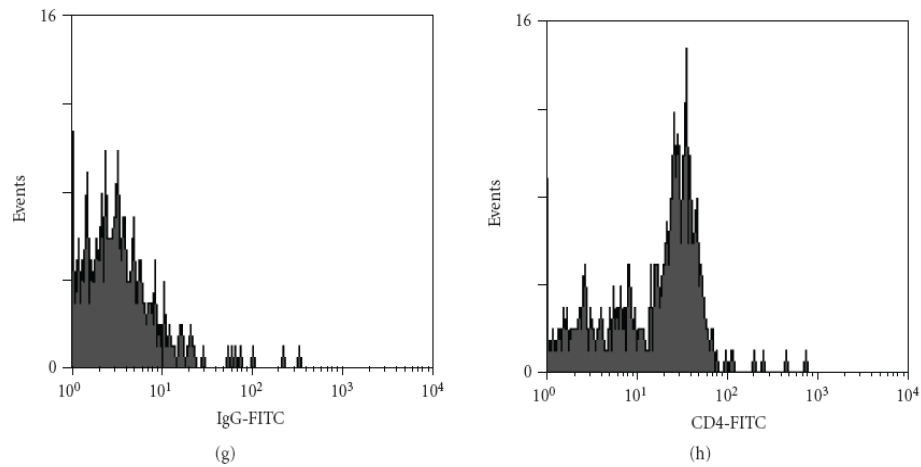


FIGURE 2: Example of a flow cytometric analysis with dot plots and histograms from a representative sample (from one subject). First, epithelial cells were excluded from the analysis by gating on all CD45<sup>+</sup> Leukocytes (plot (a)). Then lymphocytes were gated by morphology on an FS/SS plot (plot (b)). Finally, CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> lymphocytes were gated (plot (c)). Staining of isotype control antibodies is also shown (plot (d)). PE: phycoerythrin, PC-5: phycoerythrin-cyanine, FITC: fluorescein isothiocyanate.

TABLE 2: Sputum differential cell counts and lymphocyte subpopulations.

	Total baseline ( <i>n</i> = 51)	Successful quitters baseline ( <i>n</i> = 16)	Smokers Successful quitters 6 months ( <i>n</i> = 18)	Successful quitters 12 months ( <i>n</i> = 9)	Controls ( <i>n</i> = 10)
Weight, gr	1.2 (0.08–4.3)	1.4 (0.3–3.5)	0.89 (0.05–3.45)	1.08 (0.31–3.18)	1.41 (0.35–5.04)
TCC, ×10 <sup>6</sup> cells	2.78 (0.06–13.2)	2.5 (0.1–11.2)	4.02 (0.59–11.8)	3.85 (0.47–19.6)	5.29 (1.16–7.00)
TCC/gr	2.27 (0.03–13.4)	1.6 (0.03–11.6)	4.78 (0.49–11.8)	2.86 (0.51–46.67)	2.18 (0.68–6.71)
Viability %	80.42 (50–98.6)	80.4 (50.6–96.9)	92.62 (50–99.37)	89.16 (70.37–98.53)	84.71 (67.01–98.79)
SQUAM	10 (0.01–49.9)	10.6 (0.01–43.7)	6.4 (0–20)	5 (0.49–39)	10.78 (2.31–48.5)
NEUTR %	55.6 (3.3–87.3)	48.8 (17.7–80)	55.3 (17–88)	61 (3.6–84.8)*	40.5 (3.6–94)
MACRO %	40.6 (12.3–94)	49.1 (20–80.3)	41.8 (11.2–82.2)	34.5 (14.5–57.3)	55 (5.4–94)
LYMPHO %	0.12 (0–6.2)	0.1 (0–6.27)	0.25 (0–1.5)	0.5 (0–1.6)	0.55 (0–4.1)
EOS %	0 (0–3.6)	0 (0–0)	0 (0–0)	0 (0–7)	0 (0–0.5)
CD4 <sup>+</sup> %	59 (20–84)	58.5 (24–78.4)	54.7 (32.5–71)	40.2 (30.6–62)	53 (32–63)
CD8 <sup>+</sup> %	13.9 (4–56)	13.6 (5–56)	24 (15–42)*	25.3 (12.5–46.6)*	22.3 (16–49) †
CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> ratio	3.8 (0.4–16.2)	3.7 (0.4–12.9)	2.3 (1.1–4.7)*	1.9 (0.9–4.8)*	2.3 (0.9–3.2) †

TCC: total cell count, SQUAM: squamous cells, NEUTR: neutrophils, MACRO: macrophages, LYMPHO: lymphocytes, EOS: eosinophils.

Data are presented as median (range). Squamous cells are expressed as the percentage of all cells, differential cell counts are presented % of total sputum nonsquamous cells, lymphocyte subpopulations are presented % of total sputum lymphocytes.

\**P* < .05 versus successful quitters at baseline, †*P* < .05 between controls and successful quitters at baseline.

presented in Table 2. As depicted the general characteristics of the samples (i.e., weight, total cell count, total cell count per gram, and sample viability) remained the same during the whole study, regardless of sampling time and subgroup. Moreover when comparing the samples of smokers at baseline with those of nonsmokers, the latter were found to have a higher percentage of sputum CD8<sup>+</sup> lymphocyte subpopulations and subsequently a lower CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> ratio (22.3 versus 13.9, *P* < .05 and 2.3 versus 3.8, *P* < .05, resp.). The percentages of inflammatory cells (neutrophils,

macrophages) in the sputum was not found to differ between smokers and nonsmokers at baseline, and was not found to be altered in smokers after 6 months of smoking cessation. However, after 12 months of smoking cessation, the percentage of neutrophils was higher (61 versus 55, *P* < .05) and the percentage of macrophages was lower (34.5 versus 40.6, *P* < .05) when compared to baseline measurements.

Furthermore, as depicted in Figure 3, the percentage of CD4<sup>+</sup> T-lymphocytes did not differ between smokers and



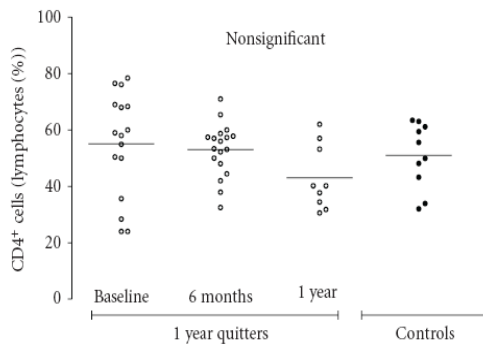


FIGURE 3: Percentage of sputum CD4<sup>+</sup> T-cells (% sputum lymphocytes) in “healthy” smokers before smoking cessation ( $n = 16$ ), after 6 months of smoking cessation ( $n = 18$ ), and after 1 year of smoking cessation ( $n = 9$ ). Results from 10 never-smokers (controls) are also presented.

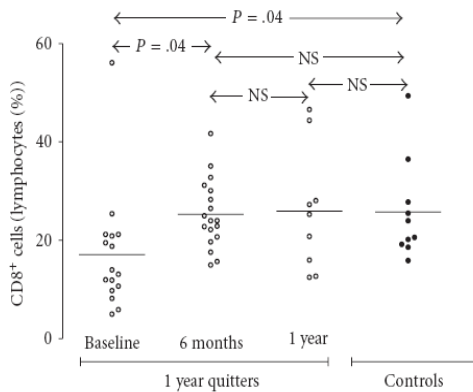


FIGURE 4: Percentage of sputum CD8<sup>+</sup> T-cells (% sputum lymphocytes) in “healthy” smokers before smoking cessation ( $n = 16$ ), after 6 months of smoking cessation ( $n = 18$ ), and after 1 year of smoking cessation ( $n = 9$ ). Results from 10 never-smokers (controls) are also presented.

controls. However, the number of CD4<sup>+</sup> T-cells (expressed as a % of sputum lymphocytes) was not found to alter after cessation both after 6-month and 1-year follow-up. As noted above, a statistically significant lower percentage of CD8<sup>+</sup> T-cells was observed in smokers in comparison to controls. Moreover, the percentage of CD8<sup>+</sup> T-cells increased after 6 months of smoking cessation in quitters, and reached the controls’ levels (Figure 4). During the months between month 6 and year 1 of follow-up, the percentage of CD8<sup>+</sup> T-cells did not significantly differ. When the CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> ratio was calculated, it was found to be more increased in smokers than in controls at baseline (Figure 5). Furthermore, it significantly decreased within 6 months of smoking, while as with the percentage of CD8<sup>+</sup> cells, the CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> ratio was not found to change after month 6 of cessation.

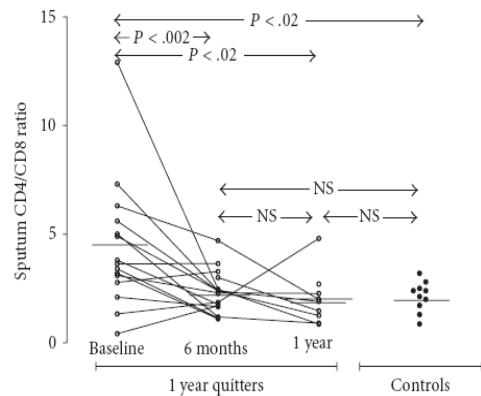


FIGURE 5: Percentage of sputum CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T-cells (% sputum lymphocytes) in “healthy” smokers before smoking cessation ( $n = 16$ ), after 6 months of smoking cessation ( $n = 18$ ), and after 1 year of smoking cessation ( $n = 9$ ). Results from 10 controls are also presented.

#### 4. Discussion

Our results indicated that smokers showed a lower percentage of CD8<sup>+</sup> T-cells and an increase in the CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> ratio compared to never-smokers at baseline. What is of interest though is that a significant increase in CD8<sup>+</sup> T-lymphocytes and a decrease in the CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> ratio were observed within 6 months of smoking cessation which reached the levels of controls. As, traditionally, the major activity of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes has been considered the facilitation of the rapid resolution of acute viral infections, the lower percentage of CD8<sup>+</sup> T-cells suggests that smokers have a deficit in cell-mediated immunity in the lung, a site critical in the first-line defence against infection, and may explain the increased susceptibility of smokers for viral infections. Furthermore, previously our group has demonstrated that the expression of sputum dendritic cells maturation markers in smokers is decreased, which may significantly affect the ability of dendritic cells to induce effective immune responses, altering the lymphocyte subset population and therefore render smokers more susceptible to respiratory tract infections [28]. Moreover, after 12 months smoking cessation sputum macrophages decreased and neutrophils significantly increased among those who had quit.

To the best of our knowledge there is very limited evidence that has assessed the alteration of T-lymphocyte subpopulations after smoking cessation. The present study is one of the first longitudinal studies that investigate the effect of smoking cessation on T-lymphocyte subpopulations in induced sputum of smokers with no concurrent disease or lung function impairment.

Our findings seem to contradict the previously reported increase of CD8<sup>+</sup> T-cells and the decrease in CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> ratio in smokers compared with never-smokers in BALF and bronchial biopsies [13, 17–19]. Furthermore, a previous study on bronchial biopsies showed no difference in CD8<sup>+</sup>

and CD4<sup>+</sup> T-lymphocytes before and after smoking cessation [26]. These discrepancies could reflect the different inflammatory microenvironment between airway lumen sampled by sputum and airway epithelium and mucosa sampled by bronchial biopsies [29]. Another possible explanation is that smoking suppresses the trans-epithelial migration of CD8<sup>+</sup> lymphocytes, increasing their number in the large airway wall, while reducing their number in the airway lumen [30]. Therefore, it may be that in smokers, due to the abnormal trans-epithelial migration mechanism, CD8<sup>+</sup> T-cells are increased in bronchial biopsies and decreased in the airway lumen, sampled by induced sputum. After smoking cessation, the trans-epithelial migration of CD8<sup>+</sup> T-cells is restored and therefore higher numbers are detected in induced sputum [30].

The present study did not show any difference in sputum CD4<sup>+</sup> T-cell numbers between smokers and never-smokers, as previously shown in [8, 16, 19, 26, 31]. Furthermore, no significant changes in the percentages of inflammatory cells (neutrophils, macrophages) in sputum were found in smokers compared to never-smokers. However, in agreement to the previous studies, the percentage of macrophages in sputum decreased after smoking cessation [7, 22, 24–27]. Additionally, the percentage of neutrophils significantly increased at 12 months smoking cessation, which is in agreement with a previous study in sputum [26]. It is possible that this noted increase in the percentages of sputum neutrophils could be due to increased apoptosis and transepithelial migration and may actually represent a protective mechanism to remove activated neutrophils from airway wall into the airway lumen [29]. However, the scientific evidence is inconclusive as other studies have shown that BALF neutrophils decrease to the levels of never-smokers at 6, 9 and 15 months after smoking cessation [7], while sputum neutrophils decrease at 12 months of smoking cessation [25].

The present study although novel and longitudinal, and therefore in a position to investigate into cause and effect did have some limitations that deserve comment. First, sputum samples cells primarily come from the lumen of the central airways and sputum changes in inflammatory cells and T-cells do not necessarily reflect changes in airway wall. However, common methods to study tissue, such as the examination of bronchial biopsies or surgical specimens cannot be easily applied on longitudinal studies. Second, as sputum has to be homogenized before flow cytometry, a possible effect of dithiothreitol (DTT) treatment on lymphocyte antigens has to be considered. The reducing agent DTT could have altered the CD8 antigen and interfered with the recognition of the antibody. In the present study a detailed analysis of the effects of DTT on the appropriate surface markers was not performed. However, Loppow et al. investigated peripheral blood leukocytes as a model for induced sputum cells and showed that the fluorescence intensity of CD8 was not altered by DTT, while there was statistically significant ( $P < .001$ ), although small, changes in the percentages of CD8 positive lymphocytes. The authors concluded that comparability between samples concerning lymphocyte surface markers is preserved, suggesting that

treatment of sputum samples with dithiothreitol does not invalidate the immunocytochemical analysis of lymphocytes [32]. Moreover, the mean age in the smokers' group was greater than in the control group and it could be argued that differences in lymphocyte subpopulations between smokers and never-smokers are due to age difference. However, it has been shown that age predominately reduces the numbers of CD4<sup>+</sup> T-cells, while we found only a difference in CD8<sup>+</sup> T-cells [33, 34]. Moreover, all our subjects were below 65 years and changes in T-cells have been mostly reported in subjects above that age. Furthermore, it is possible that gender factors could play a role, as the data presented were mainly based on that of male subjects. Another limitation of the study was the relatively small number of subjects, especially successful quitters after one year of smoking cessation. This is due to the increased relapse rate of smoking within 1 year. Taking the above into account, further studies, using a larger number of smokers, are needed to investigate the exact mechanism.

## 5. Conclusions

Conclusively, our results indicate that smoking cessation increases the percentage of CD8<sup>+</sup> T-cells and decreases the CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> ratio within 6 months of smoking cessation to that of the level of never-smokers, and is retained at that level among those abstinent at 12 months. These results indicate that some aspects of inflammation and immunological processes taking place in the airways of smokers with no existing lung impairment or concurrent respiratory disease can be reversed in those subjects who successfully quit smoking.

## Acknowledgment

C. I. Vardavas is currently funded by a Flight Attendant Medical Research Institute (FAMRI) grant (Clinical Investigator Award 072058).

## References

- [1] J. M. Sethi and C. L. Rochester, "Smoking and chronic obstructive pulmonary disease," *Clinics in Chest Medicine*, vol. 21, no. 1, pp. 67–86, 2000.
- [2] *The Health Benefits of Smoking Cessation. A Report of the Surgeon General*, DHHS Publication, no. (CDC) 90-8416, US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control, Centers for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Office on Smoking and Health, Rockville, Md, USA, 1990.
- [3] N. M. Siafakas, "In the beginning of COPD: is evolution important?" *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 175, no. 5, pp. 423–424, 2007.
- [4] D. K. Bhalla, F. Hirata, A. K. Rishi, and C. G. Gairola, "Cigarette smoke, inflammation, and lung injury: a mechanistic perspective," *Journal of Toxicology and Environmental Health B*, vol. 12, no. 1, pp. 45–64, 2009.
- [5] A. Nakata, M. Takahashi, M. Irie, Y. Fujioka, T. Haratani, and S. Araki, "Relationship between cumulative effects of smoking and memory CD4<sup>+</sup> T lymphocyte subpopulations," *Addictive Behaviors*, vol. 32, no. 7, pp. 1526–1531, 2007.

- [6] E. Roos-Engstrand, B. Ekstrand-Hammarström, J. Pourazar, A. F. Behndig, A. Bucht, and A. Blomberg, "Influence of smoking cessation on airway T lymphocyte subsets in COPD," *Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, vol. 6, no. 2, pp. 112–120, 2009.
- [7] C. M. Skold, E. Blaschke, and A. Eklund, "Transient increases in albumin and hyaluronan in bronchoalveolar lavage fluid after quitting smoking: possible signs of reparative mechanisms," *Respiratory Medicine*, vol. 90, no. 9, pp. 523–529, 1996.
- [8] D. Edwards, "Immunological effects of tobacco smoking in 'healthy' smokers," *Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, vol. 6, no. 1, pp. 48–58, 2009.
- [9] A. W. Boots, G. R. M. M. Haenen, and A. Bast, "Oxidant metabolism in chronic obstructive pulmonary disease," *European Respiratory Journal*, vol. 22, supplement 46, pp. 14s–27s, 2003.
- [10] C. Lensmar, G. Elmberger, M. Skold, and A. Eklund, "Smoking alters the phenotype of macrophages in induced sputum," *Respiratory Medicine*, vol. 92, no. 3, pp. 415–420, 1998.
- [11] R. Dippolito, A. Foresi, A. Chetta, et al., "Eosinophils in induced sputum from asymptomatic smokers with normal lung function," *Respiratory Medicine*, vol. 95, no. 12, pp. 969–974, 2001.
- [12] K. Amin, A. Ekberg-Jansson, C.-G. Lofdahl, and P. Venge, "Relationship between inflammatory cells and structural changes in the lungs of asymptomatic and never smokers: a biopsy study," *Thorax*, vol. 58, no. 2, pp. 135–142, 2003.
- [13] B. E. A. Lams, A. R. Sousa, P. J. Rees, and T. H. Lee, "Subepithelial immunopathology of the large airways in smokers with and without chronic obstructive pulmonary disease," *European Respiratory Journal*, vol. 15, no. 3, pp. 512–516, 2000.
- [14] A. Babusyte, K. Stravinskaite, J. Jeroch, J. Lötval, R. Sakalauskas, and B. Sitkauskiene, "Patterns of airway inflammation and MMP-12 expression in smokers and ex-smokers with COPD," *Respiratory Research*, vol. 8, p. 81, 2007.
- [15] J. M. Wallace, J. S. Oishi, R. G. Barbers, M. S. Simmons, and D. P. Tashkin, "Lymphocytic subpopulation profiles in bronchoalveolar lavage fluid and peripheral blood from tobacco and marijuana smokers," *Chest*, vol. 105, no. 3, pp. 847–852, 1994.
- [16] G. Chrysofakis, N. Tzanakis, D. Kyriakoy, et al., "Perforin expression and cytotoxic activity of sputum CD8+ lymphocytes in patients with COPD," *Chest*, vol. 125, no. 1, pp. 71–76, 2004.
- [17] U. Costabel, K. J. Bross, C. Reuter, K. H. Rühle, and H. Matthys, "Alterations in immunoregulatory T-cell subsets in cigarette smokers. A phenotypic analysis of bronchoalveolar and blood lymphocytes," *Chest*, vol. 90, no. 1, pp. 39–44, 1986.
- [18] A. Ekberg-Jansson, B. Andersson, E. Avrå, O. Nilsson, and C. G. Löfdahl, "The expression of lymphocyte surface antigens in bronchial biopsies, bronchoalveolar lavage cells and blood cells in healthy smoking and never-smoking men, 60 years old," *Respiratory Medicine*, vol. 94, no. 3, pp. 264–272, 2000.
- [19] A. Gadgil and S. R. Duncan, "Role of T-lymphocytes and pro-inflammatory mediators in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease," *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, vol. 3, no. 4, pp. 531–541, 2008.
- [20] J. L. Wright, J. E. Hobson, B. Wiggs, P. D. Pare, and J. C. Hogg, "Airway inflammation and peribronchiolar attachments in the lungs of nonsmokers, current and ex-smokers," *Lung*, vol. 166, no. 5, pp. 277–286, 1988.
- [21] J. B. M. Mullen, J. L. Wright, B. R. Wiggs, P. D. Pare, and J. C. Hogg, "Structure of central airways in current smokers and ex-smokers with and without mucus hypersecretion: relationship to lung function," *Thorax*, vol. 42, no. 11, pp. 843–848, 1987.
- [22] A. Capelli, A. Di Stefano, I. Gnemmi, et al., "Increased MCP-1 and MIP-1 $\beta$  in bronchoalveolar lavage fluid of chronic bronchitis," *European Respiratory Journal*, vol. 14, no. 1, pp. 160–165, 1999.
- [23] J. Domagała-Kulawik, M. Maskey-Warzechowska, I. Kraszewska, and R. Chazan, "The cellular composition and macrophage phenotype in induced sputum in smokers and ex-smokers with COPD," *Chest*, vol. 123, no. 4, pp. 1054–1059, 2003.
- [24] C. M. Skold, J. Hed, and A. Eklund, "Smoking cessation rapidly reduces cell recovery in bronchoalveolar lavage fluid, while alveolar macrophage fluorescence remains high," *Chest*, vol. 101, no. 4, pp. 989–995, 1992.
- [25] G. E. Swan, J. E. Hodgkin, T. Roby, C. Mittman, N. Jacobo, and J. Peters, "Reversibility of airways injury over a 12-month period following smoking cessation," *Chest*, vol. 101, no. 3, pp. 607–612, 1992.
- [26] B. W. M. Willemsse, N. H. T. ten Hacken, B. Rutgers, I. G. Lesman-Leegte, D. S. Postma, and W. Timens, "Effect of 1-year smoking cessation on airway inflammation in COPD and asymptomatic smokers," *European Respiratory Journal*, vol. 26, no. 5, pp. 835–845, 2005.
- [27] M. Tsoumakidou, N. Tzanakis, and N. M. Sifakas, "Induced sputum in the investigation of airway inflammation of COPD," *Respiratory Medicine*, vol. 97, no. 8, pp. 863–871, 2003.
- [28] M. Tsoumakidou, I. Bouloukaki, H. Koutala, et al., "Decreased sputum mature dendritic cells in healthy smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease," *International Archives of Allergy and Immunology*, vol. 150, no. 4, pp. 389–397, 2009.
- [29] S. R. Rutgers, W. Timens, H. F. Kaufmann, Th. W. van der Mark, G. H. Koeter, and D. S. Postma, "Comparison of induced sputum with bronchial wash, bronchoalveolar lavage and bronchial biopsies in COPD," *European Respiratory Journal*, vol. 15, no. 1, pp. 109–115, 2000.
- [30] J. S. Erjefalt, L. Uller, M. Malm-Erjefalt, and C. G. Persson, "Rapid and efficient clearance of airway tissue granulocytes through transepithelial migration," *Thorax*, vol. 59, no. 2, pp. 136–143, 2004.
- [31] G. Chrysofakis, N. Tzanakis, D. Kyriakoy, et al., "Expression of perforin and cytotoxic activity of CD8+ cells in induced sputum from current smokers with COPD," *Pneumon*, vol. 15, no. 1, pp. 88–95, 2002.
- [32] D. Loppow, M. Böttcher, G. Gercken, H. Magnussen, and R. A. Jörres, "Flow cytometric analysis of the effect of dithiothreitol on leukocytized surface markers," *European Respiratory Journal*, vol. 16, no. 2, pp. 324–329, 2000.
- [33] K. C. Meyer, W. Ershler, N. S. Rosenthal, X.-G. Lu, and K. Peterson, "Immune dysregulation in the aging human lung," *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 153, no. 3, pp. 1072–1079, 1996.
- [34] K. C. Meyer and P. Soergel, "Variation of bronchoalveolar lymphocyte phenotypes with age in the physiologically normal human lung," *Thorax*, vol. 54, no. 8, pp. 697–700, 1999.



## Decreased Sputum Mature Dendritic Cells in Healthy Smokers and Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease

Maria Tsoumakidou<sup>a, b</sup> Izolde Bouloukaki<sup>a</sup> Heleni Koutala<sup>a</sup> Katerina Kouvidi<sup>a</sup>  
Ioanna Mitrouska<sup>a</sup> Spyros Zakynthinos<sup>b</sup> Nikolaos Tzanakis<sup>a</sup> Peter K. Jeffery<sup>c</sup>  
Nikolaos M. Siafakas<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Thoracic Medicine, University Hospital of Heraklion, Heraklion, and <sup>b</sup>Department of Critical Care Medicine and Pulmonary Services, Evangelismos Hospital, Athens, Greece; <sup>c</sup>Department of Gene Therapy, Lung Pathology, Imperial College London, London, UK

### Key Words

Chronic obstructive pulmonary disease · Dendritic cells · Immunophenotype · Smoking · Sputum

### Abstract

**Background:** Asthmatics who smoke have decreased pulmonary mature dendritic cells (DCs). Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) patients have an increased amount of pulmonary immature DCs. We hypothesized that healthy smokers and patients with COPD have decreased pulmonary mature DCs. **Methods:** We identified sputum DCs expressing the maturation markers CD83 and DC-lysosome associated membrane protein (DC-LAMP) and DC subpopulations (i.e. myeloid and plasmacytoid DCs) by flow cytometry in healthy smokers before they entered a smoking cessation trial (n = 30), in the same smokers after 6 months of smoking cessation (n = 11) and in COPD patients (n = 28, 14 current and 14 ex-smokers). 12 healthy never-smokers served as controls. DC numbers were expressed as percentage of total sputum CD45<sup>+</sup> leukocytes. **Results:** CD83<sup>+</sup> and DC-LAMP<sup>+</sup> mature DCs were decreased in healthy smokers before they ceased smoking compared to after (p = 0.003 and p = 0.049, respectively) and in smokers before smoking

cessation compared to never-smokers (p = 0.027 and p = 0.028, respectively). COPD patients, both current and ex-smokers, showed decreased CD83<sup>+</sup> mature DCs compared to never-smokers and smokers after cessation (p = 0.042 and p = 0.004, respectively). **Conclusions:** Cigarette smoking and COPD per se are associated with a decrease in pulmonary mature DCs. We speculate that this reduction is involved in the immunopathogenesis of smoking-related respiratory disorders, such as COPD.

Copyright © 2009 S. Karger AG, Basel

### Introduction

Cigarette smoking is a major cause of morbidity and mortality worldwide and the main cause of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). Despite extensive research, the pathogenesis of cigarette smoke-induced disorders remain largely undetermined. In the lungs of healthy smokers and COPD patients a characteristic inflammatory response is observed, which mainly consists of neutrophils, macrophages and T lymphocytes, specifically of the T cytotoxic subtype [1–3]. Lung T lymphocytes in patients with COPD secrete more interferon- $\gamma$ ,

### KARGER

Fax +41 61 306 12 34  
E-Mail [karger@karger.ch](mailto:karger@karger.ch)  
[www.karger.com](http://www.karger.com)

© 2009 S. Karger AG, Basel  
1018–2438/09/1504–0389\$26.00/0

Accessible online at:  
[www.karger.com/iaa](http://www.karger.com/iaa)

Correspondence to: Dr. Maria Tsoumakidou  
Department of Thoracic Medicine  
University Hospital of Heraklion  
PO Box 1352, GR–71110 Heraklion, Crete (Greece)  
Tel. +30 2810 392 433, Fax +30 2810 542 650, E-Mail [tsoumak@yahoo.gr](mailto:tsoumak@yahoo.gr)

which is associated with the type 1 immune response [4–6]. However, the immunological mechanism(s) driving this characteristic amplified inflammatory response are not known.

Dendritic cells (DCs) have multiple functions in the immune responses of the lungs [7]. There are 2 major DC subtypes: myeloid DCs (MDCs), which are primarily involved in the initiation and control of adaptive immune responses and plasmacytoid DCs (PDCs), which are particularly involved in innate immunity, anti-viral responses and tolerance [8, 9]. A major event in the lifespan of DCs is their maturation. During this process DCs up-regulate lymph node homing receptors and lymphocyte stimulatory molecules and mature DCs subsequently migrate to draining lymph nodes to present the sequestered antigen(s) to T cells and induce adaptive immunity or tolerance [7]. Recently, we have hypothesized that pulmonary DCs may contribute to the pathogenesis of cigarette smoke-induced diseases, including COPD [10].

In support of this, cigarette smoke extract and nicotine suppress DC maturation in vitro [11, 12]. Data from animal studies are conflicting, with other studies showing increased and other studies showing decreased pulmonary MDC numbers and maturation after cigarette smoke exposure [13–16]. In humans little is known about the effects of smoking on DC maturation. One study showed that bronchoalveolar lavage fluid DCs from healthy smokers express low levels of lymph node homing receptors, but high levels of co-stimulatory molecules [17]. In asthmatics, smoking seems to decrease numbers of large airway CD83<sup>+</sup> mature DCs [18], while in COPD patients active smoking is associated with decreased total DCs, as identified by morphology under electron microscopy [19].

Few things are known about the potential of pulmonary DCs to play a role in COPD pathogenesis. COPD patients show increased small airway langerin<sup>+</sup> DCs and langerin is expressed predominately by immature DCs [20, 21]. Moreover, sputum supernatant from COPD patients suppresses DC maturation [22]. It is not known whether COPD patients have reduced numbers of pulmonary mature DCs.

In this paper we have hypothesized that: (1) active smoking in healthy smokers and (2) COPD per se are associated with reduced pulmonary mature DCs. For this reason we identified sputum DCs expressing 2 markers of maturation (CD83 and DC-lysosome associated membrane protein, DC-LAMP), in current smokers before and after smoking cessation and in COPD patients. Healthy never-smokers were used as controls. Furthermore, we have identified in our sputum samples DC sub-

**Table 1.** Subject characteristics

	Smokers	COPD patients	Never-smokers
n	30 (11)	28	12
Sex (M/F)	24/6 (7/4)	26/2	11/1
Age, years	51 ± 9 (49 ± 8)	60 ± 7 <sup>a</sup>	54 ± 11
Smoking history, pack-years	62 ± 31 (47 ± 15)	62 ± 26	–
FEV <sub>1</sub> , % predicted	101 ± 12 (101 ± 10)	64 ± 12 <sup>b</sup>	103 ± 12
FEV <sub>1</sub> /FVC, %	80 ± 5 (79 ± 4)	61 ± 6 <sup>b</sup>	80 ± 4
Inhaled steroids (yes/no)	0/30 (0/11)	17/11	0/12

Data are presented as mean ± SD or in absolute numbers. For smokers the figures not in parentheses represent results for all smokers before smoking cessation, those in parentheses represent results after smoking cessation (for those who stopped smoking).

<sup>a</sup> p < 0.05 COPD patients vs. smokers; <sup>b</sup> p < 0.05 COPD patients vs. smokers and never-smokers.

populations that were previously identified in lung tissue, i.e. CD1c and blood dendritic cell antigen 3 (BDCA3) expressing myeloid DCs and BDCA2 expressing plasmacytoid DCs [23]. We did not identify immature DCs as these had already been quantified in healthy smokers and in COPD patients [20].

## Materials and Methods

### Subjects

Sputum was induced in a total of 30 healthy current smokers at the beginning of a smoking cessation trial and in 28 COPD patients (14 current and 14 ex-smokers). Recruitment of subjects was performed from those attending the smoking cessation clinic and the outpatient clinic of the University Hospital of Heraklion. Smokers who successfully quit smoking were longitudinally followed for 6 months. Sputum was again induced in those 11 subjects who succeeded 6 months of continuous smoking abstinence, as suggested by declaration, exhaled CO measurement and urine cotinine levels. Sputum was also induced in 12 healthy never-smokers, recruited by advertisement, who served as controls. We studied only non-allergic and non-atopic subjects (atopy assessed by skin prick tests). Subjects reporting a respiratory infection or an exacerbation during the previous 6 weeks were excluded. Subject characteristics are shown in table 1.

Written informed consent was obtained according to protocols approved by the hospital's medical ethics committee.

### Sputum Induction and Flow Cytometry

Sputum was induced and processed, as previously described [24]. To standardize the time interval between sputum induction and last cigarette smoked in current smoking subjects, they were

**Table 2.** Monoclonal antibodies for flow cytometry

Specificity	Clone	Conjugate	Source
CD45	J.33	PE-Cy5	Beckman Coulter
CD14	RMO52	FITC	Beckman Coulter Immunotech, Marseille, France
CD19	J4.119	FITC	Beckman Coulter
CD1c	AD5-8E7	PE	Miltenyi Biotech, Bergish Gladbach, Germany
BDCA2	AC144	PE	Miltenyi
BDCA3	AD5-14412	PE	Miltenyi
CD83	HB15a	PE	Beckman Coulter
DC-LAMP	104.G4	PE	Beckman Coulter
Control	679.1Mc7	FITC	Beckman Coulter
Control	679.1Mc7	PE	Beckman Coulter
Control	679.1Mc7	PE-Cy5	Beckman Coulter

PE-Cy5 = Phycoerythrin-Cy5, FITC = fluorescein isothiocyanate, PE = phycoerythrin.

instructed to smoke the last cigarette 15 minutes before sputum induction. For identification of each DC subset by flow cytometry, approximately  $10^6$  sputum cells (at least  $3 \times 10^5$  excluding squamous and dead cells) were stained with monoclonal antibodies. For labeling of CD14, CD19, CD45, CD83, CD1c, BDCA2 and BDCA3, extracellular stainings were performed. For DC-LAMP labeling, intracellular staining was performed. In 4 samples (1 obtained from a healthy smoker before smoking cessation, 2 from COPD patients and 1 from a never-smoker) staining for DC-LAMP<sup>+</sup> mature DCs was not performed as there were an insufficient number of sputum cells. The antibodies used are listed in table 2. Extracellular stainings were performed by incubation of the cells with the appropriate antibodies for 30 min at 4–8°C. DC-LAMP intracellular staining was performed after 10 min pretreatment of the cells with 0.5% saponin and by incubation of the cells with anti-DC-LAMP in the presence of 0.5% saponin for 30 min at 4–8°C.

An Elite Coulter cytometer was used for 3-color flow cytometry. Data were acquired in list mode and analyzed using Epcics Elite. CD1c expressing MDCs were identified as CD45<sup>pos</sup>-CD14<sup>low/neg</sup>CD19<sup>neg</sup>CD1c<sup>pos</sup>, PDCs were identified as CD45<sup>pos</sup>-CD14<sup>low/neg</sup>BDCA2<sup>pos</sup>, BDCA3 expressing MDCs were identified as CD45<sup>pos</sup>CD14<sup>neg</sup>BDCA3<sup>high</sup>, mature DCs were identified as CD45<sup>pos</sup>CD14<sup>neg</sup>CD83<sup>pos</sup> and as CD45<sup>pos</sup>CD14<sup>neg</sup>DC-LAMP<sup>pos</sup> (fig. 1). Gating was performed on CD45-positive cells with relatively low side scatter (SS), which reflects the relatively low granularity of pulmonary DCs [23]. CD14<sup>high</sup> high auto-fluorescent macrophages and monocytes were excluded. CD14<sup>low</sup> cells were included in the analysis of CD1c expressing MDCs and PDCs because low CD14 expression has been observed in pulmonary DCs [23]. B cells are known to express CD1c. For this reason, CD19<sup>pos</sup> B cells were excluded from the analysis of CD1c expressing MDCs. Due to the reported expression of BDCA3 by monocytes, as well as by CD1c<sup>+</sup> MDCs and PDCs, CD14<sup>low</sup> cells were excluded and only BDCA3<sup>high</sup> cells were included in the analysis of BDCA3 ex-

pressing MDCs [25, 26]. CD14<sup>low</sup> cells were also excluded from the analysis of mature DCs, to overcome the problem of possible induction of CD83 and DC-LAMP expression in monocytes/macrophages after our sputum processing manipulations. Staining with isotype controls was designed so that the same strategy used to detect the DC-specific marker was applied to the negative control sample. DC numbers were expressed as percent of CD45<sup>+</sup> sputum leukocytes.

#### Statistical Analysis

Normality was tested by the Shapiro-Wilk test. Variables were non-normally distributed. Differences between the same smokers before and after smoking cessation (n = 11) were tested using the Wilcoxon signed ranks test. Differences between COPD patients (n = 28), the whole group of smokers before smoking cessation (n = 30), smokers after smoking cessation (n = 11) and never-smokers (n = 12) were tested using the Kruskal-Wallis analysis of variance followed by the Mann-Whitney U test where appropriate. The software SPSS 16.0 for windows (SPSS Inc., Chicago, Ill, USA) was used. Probability values <0.05 were considered as statistically significant.

## Results

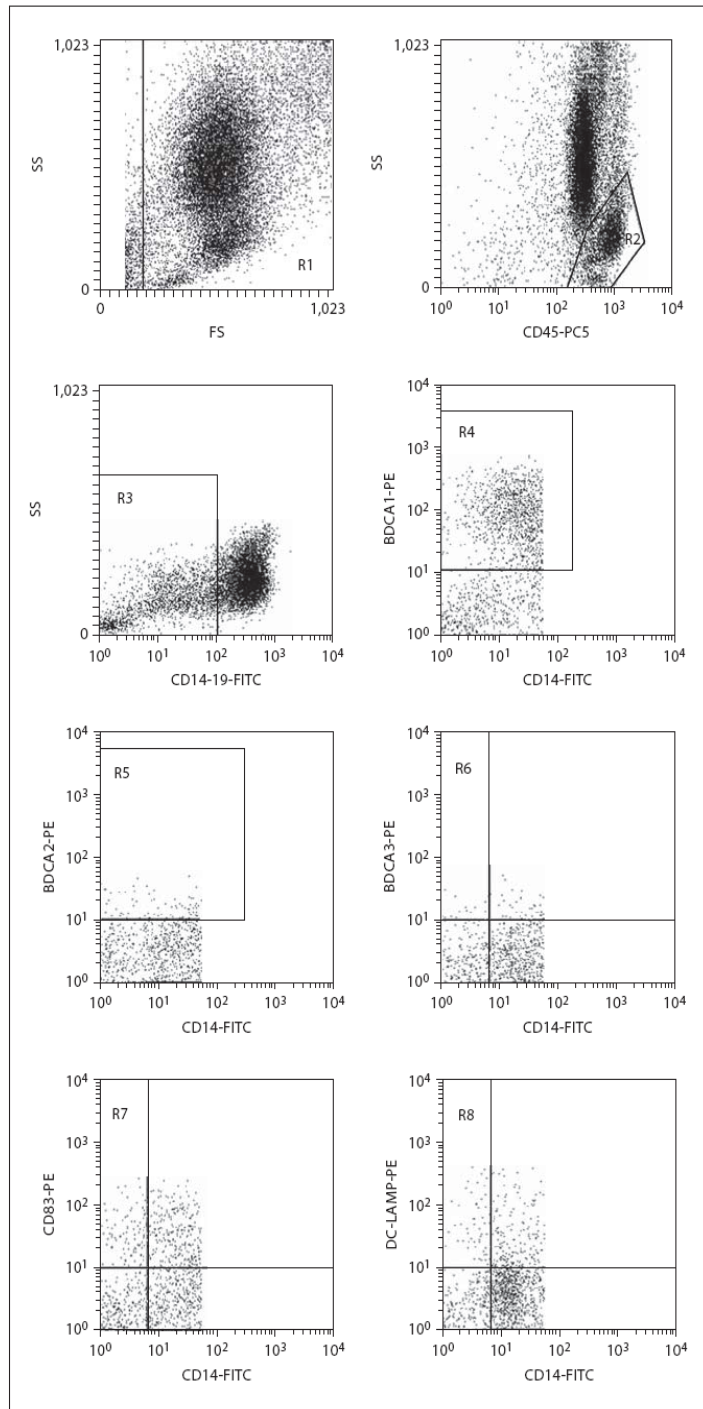
### Smokers before versus after Smoking Cessation

CD83<sup>+</sup> and DC-LAMP<sup>+</sup> DCs were decreased in smokers before smoking cessation compared to after (n = 11; p = 0.003 and p = 0.049, respectively; Wilcoxon signed ranks; fig. 2, table 3). The ratios of CD83<sup>+</sup> and DC-LAMP<sup>+</sup> DCs to total DCs were also decreased.

CD1c<sup>+</sup> MDCs, BDCA3<sup>high</sup> MDCs and BDCA2<sup>+</sup> PDCs, as well as total DCs (i.e. CD1c<sup>+</sup> MDCs + BDCA3<sup>high</sup> MDCs + PDCs), were not significantly altered in smokers after smoking cessation (table 3).

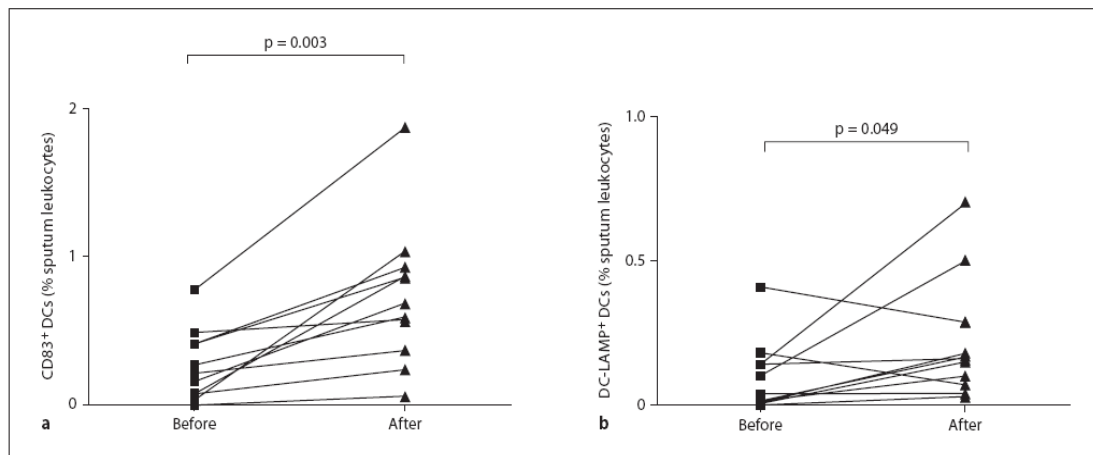
### Comparison between COPD Patients, Smokers before and after Smoking Cessation, and Never-Smokers

CD83<sup>+</sup> mature DCs and DC-LAMP<sup>+</sup> mature DCs were different between groups (p = 0.003 and p = 0.02, Kruskal-Wallis followed by Mann Whitney U). CD83<sup>+</sup> and DC-LAMP<sup>+</sup> mature DCs were decreased in healthy smokers before smoking cessation (n = 30) compared to never-smokers (n = 12; p = 0.027 and p = 0.028, respectively, fig. 2, table 3). The ratio of CD83<sup>+</sup> mature to total DCs was also decreased in healthy smokers before smoking cessation compared to never-smokers. CD83<sup>+</sup> DCs were decreased in COPD patients (n = 28) compared to smokers after smoking cessation (n = 11) and never-smokers (table 3). This could not be due to steroid treatment or current smoking because the subgroups of steroid naïve COPD patients and ex-smoker COPD patients also showed decreased CD83<sup>+</sup> mature DCs compared to



**Fig. 1.** R1: gating in forward scatter (FS) and side scatter (SS) modes. R2: gating of CD45<sup>pos</sup> leukocytes with relatively low SS. R3: gating to exclude CD14<sup>high</sup> monocytes/macrophages and CD19<sup>high</sup> B cells. R4: gating of CD14<sup>low/neg</sup>BDCA1(CD1c)<sup>pos</sup> MDCs. R5: gating of CD14<sup>low/neg</sup>BDCA2<sup>pos</sup> plasmacytoid DCs. R6: gating of CD14<sup>neg</sup>.BDCA3<sup>high</sup> MDCs. R7: gating of CD14<sup>neg</sup>CD83<sup>pos</sup> mature DCs. R8: gating of CD14<sup>neg</sup>DC-LAMP<sup>pos</sup> mature DCs.





**Fig. 2.** CD83<sup>+</sup> mature DCs (a) and DC-LAMP<sup>+</sup> mature DCs (b), expressed as percent sputum CD45<sup>+</sup> leukocytes in smokers before and after smoking cessation (n = 11).

**Table 3.** Results of flow cytometric analysis of sputum DCs

	Smokers		COPD patients (n = 28)	Never-smokers (n = 12)
	total before SC (n = 30)	before SC/after SC (n = 11)		
Total DCs	1.15 (0.04–4.49)	1.45 (0.04–4.48)/1.11 (0.37–3.07)	0.94 (0.08–4.08)	0.79 (0.24–2.9)
CD1c <sup>+</sup> MDCs	0.95 (0.03–3.95)	0.97 (0.03–2.3)/0.48 (0.12–1.50)	0.71 (0.02–3.67)	0.60 (0.20–1.35)
BDCA3 <sup>high</sup> MDCs	0.03 (0–2.01)	0.03 (0–2.01)/0.02 (0–1.80)	0.06 (0–0.33)	0.04 (0.00–0.32)
PDCs	0.14 (0.01–1.11)	0.09 (0.01–1.11)/0.23 (0.07–0.84)	0.14 (0.01–0.39)	0.08 (0.03–1.89)
CD83 <sup>+</sup> DCs	0.25 (0–1.38) <sup>a</sup>	0.21 (0–0.78)/0.69 (0.06–1.87) <sup>b</sup>	0.29 (0.04–0.89) <sup>c, d</sup>	0.48 (0.11–1.39)
CD83 <sup>+</sup> DCs/total DCs	0.22 (0–1.14) <sup>a</sup>	0.21 (0–1.14)/0.60 (0.16–1.78) <sup>b</sup>	0.33 (0.05–0.81) <sup>c, d</sup>	0.54 (0.14–4.19)
DC-LAMP <sup>+</sup> DCs	0.07 (0–0.56) <sup>a</sup>	0.04 (0–0.41)/0.16 (0.03–0.70) <sup>b</sup>	0.12 (0.01–0.9)	0.23 (0.01–1.48)
DC-LAMP <sup>+</sup> DCs/total DCs	0.05 (0–1.14) <sup>a</sup>	0.05 (0–1.14)/0.20 (0.03–0.49)	0.11 (0.01–1.73)	0.18 (0.04–2.03)

Data are presented as median (range). All DC numbers are expressed as percent sputum CD45<sup>+</sup> leukocytes. SC = Smoking cessation. Total DCs = CD1c<sup>+</sup> myeloid DCs (MDCs) + BDCA3<sup>high</sup> MDCs + PDCs.

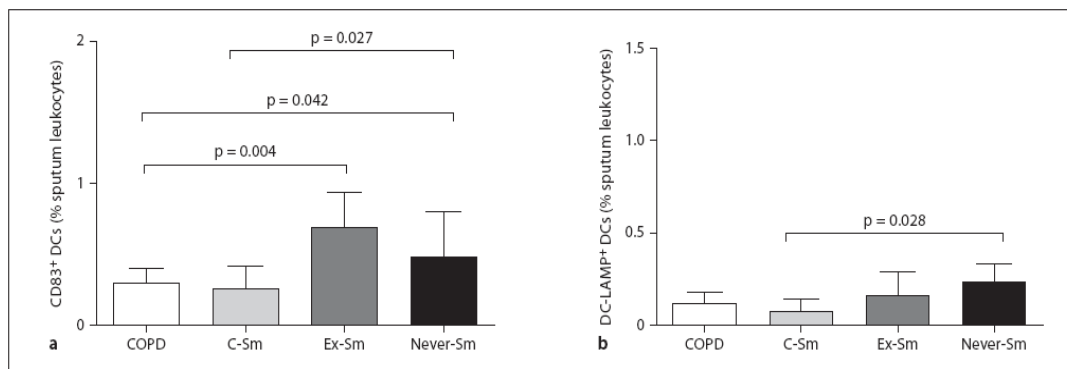
<sup>a</sup> p < 0.05, smokers before SC vs. never-smokers; <sup>b</sup> p < 0.05, smokers before vs. after SC; <sup>c</sup> p < 0.05, COPD patients vs. never-smokers; <sup>d</sup> p < 0.05 COPD patients vs. smokers after SC.

smokers after smoking cessation and never-smokers (steroid naïve patients vs. healthy smokers after smoking cessation p = 0.019, steroid naïve patients vs. never-smokers p = 0.036, ex-smoker patients vs. healthy smokers after smoking cessation p = 0.016, ex-smoker patients vs. never-smokers p = 0.049, data not shown). Moreover, CD83<sup>+</sup> DCs were not different between current and ex-smoker COPD patients and they were not different between ste-

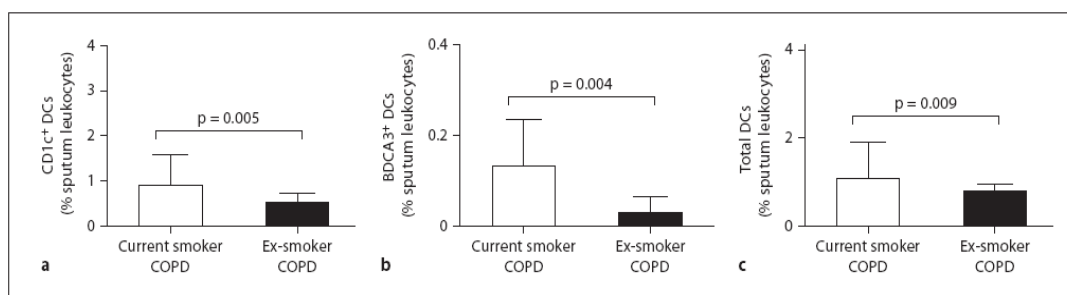
roid-treated versus steroid-naïve COPD patients (p = 0.427 and p = 0.817, respectively; data not shown).

CD1c<sup>+</sup> MDCs, BDCA3<sup>high</sup> MDCs, BDCA2<sup>+</sup> PDCs and total DCs, were not different between groups (p = 0.141–0.603, Kruskal-Wallis; table 3). They were also not different between the subgroups of steroid-treated versus steroid-naïve COPD patients (p = 0.643–0.926; data not shown). However, when the subgroups of current and ex-





**Fig. 3.** CD83<sup>+</sup> mature DCs (a) and DC-LAMP<sup>+</sup> mature DCs (b), expressed as percent sputum CD45<sup>+</sup> leukocytes in COPD patients (n = 28), all smokers before smoking cessation (C-Sm; n = 30), smokers after smoking cessation (Ex-Sm; n = 11) and never-smokers (Never-Sm; n = 12). Columns correspond to median values and interquartile range.



**Fig. 4.** CD1c<sup>+</sup> MDCs (a), BDCA3<sup>high</sup> MDCs (b) and total DCs (CD1c<sup>+</sup> MDCs + BDCA3<sup>high</sup> MDCs + PDCs; c), expressed as percent sputum CD45<sup>+</sup> leukocytes in current smoker COPD patients (n = 14), and ex-smoker COPD patients (n = 14). Columns correspond to median values and interquartile range.

smokers with COPD were compared, CD1c<sup>+</sup> MDCs, BDCA3<sup>high</sup> MDCs and total DCs were increased in current smokers with COPD versus ex-smokers with COPD (p = 0.005, p = 0.004 and p = 0.009, respectively; fig. 4).

### Discussion

The present study showed that active cigarette smoking in healthy subjects and COPD *per se* are associated with a decrease in airway mature DCs. Importantly, airway mature DC numbers in healthy smokers return at the never-smokers' levels after 6 months of smoking cessation.

In a previous study we showed that bronchial CD83<sup>+</sup> mature DCs are decreased in asthmatic smokers compared to asthmatics who do not smoke or to healthy never-smokers [18]. Further to active smoking in asthmatics, smoking in healthy subjects and COPD *per se* seem to be associated with reduced pulmonary CD83<sup>+</sup> mature DCs. Our results come in agreement with those recently reported by Demedts et al. [20] about increased airway immature DCs in COPD. However, there have been opposing findings from other authors. Specifically, Bratke et al. [17] showed that bronchoalveolar lavage fluid myeloid DCs from smokers compared to those from never-smokers show increased expression of the maturation markers CD80 and CD86, similar expression of CD83 and lower

expression of the lymph node homing receptor CCR7. CCR7 expression is up-regulated on mature DCs. It is possible that smoking differentially affects the expression of different molecules, specifically since some molecules, like CD83 and CCR7, are expressed later during DC maturation. Importantly, CCR7 expression on DCs negatively correlated with severity of airflow limitation in smokers [17], which fits well with our finding of decreased DCs expressing the maturation marker CD83 in patients with obstructive airway disease.

Although the present study is largely descriptive and the mechanism(s) of the reported reduction in DC maturation were not investigated, based on existing literature we may speculate that smoking increases levels of neutrophil elastase (NE), which suppresses DC maturation, while it inhibits secretory leukocyte protein inhibitor, which could reverse the NE-induced suppression on DC maturation [22, 27, 28]. Smoking may also inhibit epithelial cell excretion of cytokines critical to DC maturation [29, 30]. Finally, smoking may directly suppress pulmonary DC maturation through its components [11, 12].

It could be argued that the reported reduction in CD83<sup>+</sup> mature DCs in COPD patients is also due to the effect of active smoking and not to the disease process itself. However, we found no difference in CD83<sup>+</sup> mature DCs between current and ex-smokers with COPD, while ex-smokers with COPD had also significantly fewer CD83<sup>+</sup> DCs compared to healthy smokers after smoking cessation and never-smokers. A plausible explanation is that high levels of NE or TGF- $\beta$  in the lungs of COPD patients, even in those who have ceased smoking, suppress expression of CD83 on DCs [22, 31, 32]. Or CD83 expression on DCs could be down-regulated by interaction of DCs with epithelial cells and alveolar macrophages [29, 33].

Reduced numbers of pulmonary mature DCs in healthy smokers and COPD patients may impair their immune responses towards respiratory tract infections [34]. Specifically, reduced CD83 expression on DCs may suppress their ability to induce T cell responses [35]. Likewise, after smoking cessation in healthy smokers the observed return of mature DC numbers to the never-smoker levels may enhance the ability of pulmonary DCs to respond efficiently to infections and may attenuate airway inflammation [36].

Total DC numbers and their subpopulations (i.e., MDCs and PDCs), were not significantly altered after smoking cessation and were not different between COPD patients and healthy subjects. However, total DCs were increased in current smokers with COPD compared to

ex-smokers with COPD, due to an increase in CD1c and BDCA3 expressing MDCs. Moreover, there was a non-significant trend towards increased CD1c<sup>+</sup> MDCs in healthy smokers before versus after smoking cessation ( $p = 0.131$ ; table 3). These findings may suggest that smoking increases numbers of pulmonary MDCs. Other studies have also shown that smoking up-regulates synthesis and release of a variety of DC-attracting chemokines [15, 16, 29, 30]. The increased MDCs could be involved in the pathogenesis of cigarette smoke-induced diseases through the release of metalloproteinases [37]. They may also perpetuate inflammatory processes by recruiting T cells, by stimulating already primed T cells or/and by preserving antigens – foreign or self – for presentation to T cells for several months [7, 10].

#### Limitations

*Methodology.* We consider our results to be robust because mature DCs were identified in sputum using 2 different markers (CD83 and DC-LAMP), and results for both of these markers agreed that mature DCs are decreased in smokers. Although one may argue that some of the CD14<sup>low</sup> cells included in the analysis of CD1c and BDCA2 expressing DCs were monocytes, pulmonary DCs do express CD14 at low levels, while the DC-specific markers CD1c and BDCA2 are not expressed *in vivo* by monocytes [23]. We did not exclude T cells and natural killer cells from our analysis, because none of these cells has been shown *in vivo* to express CD1c, CD83 or BDCA2/3 on their surface, or DC-LAMP intracellularly. Moreover, our preliminary experiments confirmed that sputum T cells and natural killer cells do not express any of these markers. Furthermore, although there are reports about possible expression of BDCA3 by CD1c<sup>+</sup> MDCs and PDCs [10, 26], Demedts et al., as well as our own group have not detected BDCA3/CD1c or BDCA2/CD1c co-expression by pulmonary DCs [9, 23, 38]. Whatsoever, we have only included BDCA3<sup>high</sup> cells in the present analysis of BDCA3 expressing MDCs. Finally, we expressed sputum DCs in percentages and not in absolute numbers. Admittedly, an increase or decrease in cell percentages does not necessarily mean an increase or decrease in absolute numbers and had we shown differences in absolute DC numbers this would strengthen our results. However, absolute DC numbers partly reflect differences in absolute total cell numbers, which may greatly vary among different subject samples. For this reason we believe that differences in DC percentages supply essential information about true differences in DC numbers.

*Interpretation.* We also acknowledge that there are potential limitations to the interpretation of our results. First, a proportion of COPD patients were on inhaled steroid treatment, which could affect DC numbers and maturation [39]. However, we found no differences between steroid-treated and steroid-naïve COPD patients. Moreover, the subgroup of steroid-naïve COPD patients also showed decreased mature DCs. Second, although there was no difference in smoking history (pack-years) between COPD patients and healthy smokers, COPD patients were significantly older. However, the literature on potential alterations of DCs with aging is scarce [40]. To the best of our knowledge there are no published data about reduced CD83 and DC-LAMP expression on DCs with aging. Importantly, the age difference between COPD patients and never-smokers was not statistically significant. Third, the number of control subjects included in the study is relatively small compared to the patients with COPD. This is mainly due to significant difficulties in the recruitment of healthy control subjects. Unfortunately, we could not do power analysis prior to the initiation of the study, because there were no previous data about numbers of DCs in sputum samples from patients with COPD. However, we were still able to detect differences between the control group and the patient group. Fourth, sputum samples mainly the large airways, and therefore our findings cannot be extrapolated to the small airways and alveoli. However, induced sputum is an important tool in the study of pulmonary DCs, as it may provide an adequate cellular specimen for the study of DCs, while being less invasive compared to bronchoalveolar lavage. Fifth, including TGF- $\beta$  and NE sputum levels would strengthen the results of the study. However,

a correlation does not always imply a cause and effect relationship. Moreover, we still consider our observational data to be important because they are novel and may support future functional studies which will clarify whether TGF- $\beta$  and NE are implicated in the observed alterations of DC maturation in COPD patients and healthy smokers. Finally, it may be argued that the observed decreases in mature DC numbers are merely due to increases in immature DC numbers and not to true alterations in the DC maturation process. However, this could not be our case because we expressed mature DC numbers as a proportion of total sputum cells and not as a proportion of DCs.

### Conclusion

We have shown that COPD and active smoking in healthy subjects are associated with decreased airway mature DCs. We may speculate that this reduction is involved in the immunopathological processes that take place in the lungs of COPD patients and healthy subjects who smoke. Importantly, our results suggest that parameters of airway immunity which are altered by smoking can be partly restored in healthy smokers after 6 months of smoking cessation.

### Acknowledgment

This work was supported by a research grant from Glaxo-SmithKline Greece.

### References

- ▶ 1 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;158:1518–1523.
- ▶ 2 Amin K, Ekberg-Jansson A, Lofdahl CG, Venge P: Relationship between inflammatory cells and structural changes in the lungs of asymptomatic and never smokers: a biopsy study. *Thorax* 2003;58:135–142.
- ▶ 3 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 FEV<sub>1</sub>. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155:852–857.
- ▶ 4 Grumelli S, Corry DB, Song LZ, Song L, Green L, Huh J, Hacken J, Espada R, Bag R, Lewis DE, Kheradmand F: An immune basis for lung parenchymal destruction in chronic obstructive pulmonary disease and emphysema. *PLoS Med* 2004;1:e8.
- ▶ 5 Tzanakis N, Chrysofakis G, Tsoumakidou M, Kyriakou D, Tsiligianni J, Bouros D, Siafakas NM: Induced sputum CD8+ T-lymphocyte subpopulations in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med* 2004;98:57–65.
- ▶ 6 Saetta M, Mariani M, Panina-Bordignon P, Turato G, Buonsanti C, Baraldo S, Bellettato CM, Papi A, Corbetta L, Zuin R, Sinigaglia F, Fabbri L: 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;165:1404–1409.
- ▶ 7 Vermaelen K, Pauwels R: Pulmonary dendritic cells. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;172:530–551.
- ▶ 8 Masten BJ, Olson GK, Tarleton CA, Rund C, Schuyler M, Mehran R, Archibeque T, Lipscomb MF: Characterization of myeloid and plasmacytoid dendritic cells in human lung. *J Immunol* 2006;177:7784–7793.

- 9 Demedts IK, Bracke KR, Maes T, Joos GF, Brusselle GG: Different roles for human lung dendritic cell subsets in pulmonary immune defense mechanisms. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006;35:387–393.
- 10 Tsoumakidou M, Demedts IK, Brusselle GG, Jeffery PK: Dendritic cells in chronic obstructive pulmonary disease: new players in an old game. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;177:1180–1186.
- 11 Nouri-Shirazi M, Guinet E: A possible mechanism linking cigarette smoke to higher incidence of respiratory infection and asthma. *Immunol Lett* 2006;103:167–176.
- 12 Vassallo R, Tamada K, Lau JS, Kroening PR, Chen L: Cigarette smoke extract suppresses human dendritic cell function leading to preferential induction of Th-2 priming. *J Immunol* 2005;175:2684–2691.
- 13 Robbins CS, Dawe DE, Goncharova SI, Pouladi MA, Drannik AG, Swirski FK, Cox G, Stampfli MR: Cigarette smoke decreases pulmonary dendritic cells and impacts antiviral immune responsiveness. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004;30:202–211.
- 14 Robbins CS, Franco F, Mouded M, Cernadas M, Shapiro SD: Cigarette smoke exposure impairs dendritic cell maturation and T cell proliferation in thoracic lymph nodes of mice. *J Immunol* 2008;180:6623–6628.
- 15 Bracke KR, D'Hulst AI, Maes T, Moerloose KB, Demedts IK, Lebecque S, Joos GF, Brusselle GG: Cigarette smoke-induced pulmonary inflammation and emphysema are attenuated in CCR6-deficient mice. *J Immunol* 2006;177:4350–4359.
- 16 D'Hulst AI, Vermaelen KY, Brusselle GG, Joos GF, Pauwels RA: Time course of cigarette smoke-induced pulmonary inflammation in mice. *Eur Respir J* 2005;26:204–213.
- 17 Bratke K, Klug M, Bier A, Julius P, Kuepper M, Virchow JC, Lommatzsch M: Function-associated surface molecules on airway dendritic cells in cigarette smokers. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2008;38:655–660.
- 18 Tsoumakidou M, Elston W, Zhu J, Wang Z, Gamble E, Siafakas NM, Barnes NC, Jeffery PK: Cigarette smoking alters bronchial mucosal immunity in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;175:919–925.
- 19 Rogers AV, Adelroth E, Hattotuwa K, Dewar A, Jeffery PK: Bronchial mucosal dendritic cells in smokers and ex-smokers with COPD: an electron microscopic study. *Thorax* 2008;63:108–114.
- 20 Demedts IK, Bracke KR, Van Pottelberge G, Testelmans D, Verleden GM, Vermassen FE, Joos GF, Brusselle GG: Accumulation of dendritic cells and increased CCL20 levels in the airways of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;175:998–1005.
- 21 Geissmann F, Dieu-Nosjean MC, Dezutter C, Valladeau J, Kayal S, Leborgne M, Lai J: Accumulation of immature Langerhans cells in human lymph nodes draining chronically inflamed skin. *J Exp Med* 2002;196:417–430.
- 22 Roghanian A, Drost EM, MacNee W, Howie SE, Sallenave JM: Inflammatory lung secretions inhibit dendritic cell maturation and function via neutrophil elastase. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;174:1189–1198.
- 23 Demedts IK, Brusselle GG, Vermaelen KY, Pauwels RA: Identification and characterization of human pulmonary dendritic cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005;32:177–184.
- 24 Tsoumakidou M, Tzanakis N, Siafakas NM: Induced sputum in the investigation of airway inflammation of COPD. *Respiratory Medicine* 2003;97:863–871.
- 25 McCachren SS, Diggs J, Weinberg JB, Dittman WA: Thrombomodulin expression by human blood monocytes and by human synovial tissue lining macrophages. *Blood* 1991;78:3128–3132.
- 26 Lommatzsch M, Bratke K, Bier A, Julius P, Kuepper M, Luttmann W, Virchow JC: Airway dendritic cell phenotypes in inflammatory diseases of the human lung. *Eur Respir J* 2007;30:878–886.
- 27 Betsuyaku T, Nishimura M, Yoshioka A, Takeyabu K, Miyamoto K, Kawakami Y: Elastin-derived peptides and neutrophil elastase in bronchoalveolar lavage fluid. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154:720–724.
- 28 Cavarra E, Lucattelli M, Gambelli F, Bartalesi B, Fineschi S, Szarka A, Giannerini F, Martorana PA, Lungarella G: Human SLPI inactivation after cigarette smoke exposure in a new in vivo model of pulmonary oxidative stress. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001;281:L412–L417.
- 29 Witherden IR, Vanden Bon EJ, Goldstraw P, Ratcliffe C, Pastorino U, Tetley TD: Primary human alveolar type II epithelial cell chemokine release: effects of cigarette smoke and neutrophil elastase. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004;30:500–509.
- 30 Thorley AJ, Goldstraw P, Young A, Tetley TD: Primary human alveolar type II epithelial cell CCL20 (macrophage inflammatory protein-3alpha)-induced dendritic cell migration. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005;32:262–267.
- 31 de Boer WI, van Schadewijk A, Sont JK, Sharma HS, Stolk J, Hiemstra PS, Adelroth E: Transforming growth factor beta1 and recruitment of macrophages and mast cells in airways in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158:1951–1957.
- 32 Fogel-Petrovic M, Long JA, Misso NL, Foster PS, Bhoola KD, Thompson PJ: Physiological concentrations of transforming growth factor beta1 selectively inhibit human dendritic cell function. *Int Immunopharmacol* 2007;7:1924–1933.
- 33 Holt PG, Oliver J, Bilyk N, McMenamin C, McMenamin PG, Kraal G, Thepen T: Down-regulation of the antigen presenting cell function(s) of pulmonary dendritic cells in vivo by resident alveolar macrophages. *J Exp Med* 1993;177:397–407.
- 34 Lambrecht BN, Prins JB, Hoogsteden HC: Lung dendritic cells and host immunity to infection. *Eur Respir J* 2001;18:692–704.
- 35 Aerts-Toegaert C, Heirman C, Tuyaerts S, Corthals J, Aerts JL, Bonehill A, Thielemans K, Breckpot K: CD83 expression on dendritic cells and T cells: correlation with effective immune responses. *Eur J Immunol* 2007;37:686–695.
- 36 Willemse BW, ten Hacken NH, Rutgers B, Lesman-Leegte IG, Postma DS, Timens W: Effect of 1-year smoking cessation on airway inflammation in COPD and asymptomatic smokers. *Eur Respir J* 2005;26:835–845.
- 37 Bracke K, Cataldo D, Maes T, Gueders M, Noel A, Foidart JM, Brusselle G, Pauwels RA: Matrix metalloproteinase-12 and cathepsin D expression in pulmonary macrophages and dendritic cells of cigarette smoke-exposed mice. *Int Arch Allergy Immunol* 2005;138:169–179.
- 38 Tsoumakidou M, Tzanakis N, Papadaki HA, Koutala H, Siafakas NM: Isolation of myeloid and plasmacytoid dendritic cells from human bronchoalveolar lavage fluid. *Immunol Cell Biol* 2006;84:267–273.
- 39 Georas SN: Inhaled glucocorticoids, lymphocytes, and dendritic cells in asthma and obstructive lung diseases. *Proc Am Thorac Soc* 2004;1:215–221.
- 40 Shurin MR, Shurin GV, Chatta GS: Aging and the dendritic cell system: implications for cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2007;64:90–105.



## Second Hand Smoke Exposure and Excess Heart Disease and Lung Cancer Mortality among Hospital Staff in Crete, Greece: A Case Study

Constantine I. Vardavas<sup>1\*</sup>, Izolde Mpouloukaki<sup>2</sup>, Manolis Linardakis<sup>1</sup>, Penelope Ntzilepi<sup>3</sup>, Nikos Tzanakis<sup>1,2</sup> and Anthony Kafatos<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Social Medicine, School of Medicine, University of Crete, Greece

<sup>2</sup>Department of Thoracic Medicine, University Hospital of Heraklion, Crete, Greece

<sup>3</sup>Management, University Hospital of Heraklion, Crete, Greece

\*Correspondence to Mr. Constantine I. Vardavas. E-mail: vardavas@edu.med.uoc.gr

Received: 13 February 2008 / Accepted: 26 June 2008 / Published: 30 September 2008

**Abstract:** Exposure to secondhand smoke (SHS) is a serious threat to public health, and a significant cause of lung cancer and heart disease among non-smokers. Even though Greek hospitals have been declared smoke free since 2002, smoking is still evident. Keeping the above into account, the aim of this study was to quantify the levels of exposure to environmental tobacco smoke and to estimate the attributed lifetime excess heart disease and lung cancer deaths per 1000 of the hospital staff, in a large Greek public hospital. Environmental airborne respirable suspended particles (RSP) of PM<sub>2.5</sub> were performed and the personnel's excess mortality risk was estimated using risk prediction formulas. Excluding the intensive care unit and the operating theatres, all wards and clinics were polluted with environmental tobacco smoke. Mean SHS-RSP measurements ranged from 11 to 1461 µg/m<sup>3</sup> depending on the area. Open wards averaged 84 µg/m<sup>3</sup> and the managing wards averaged 164 µg/m<sup>3</sup> thus giving an excess lung cancer and heart disease of 1.12 (range 0.23-1.88) and 11.2 (range 2.3-18.8) personnel in wards and 2.35 (range 0.55-12.2) and 23.5 (range 5.5-122) of the managing staff per 1000 over a 40-year lifespan, respectively. Conclusively, SHS exposure in hospitals in Greece is prevalent and taking into account the excess heart disease and lung cancer mortality risk as also the immediate adverse health effects of SHS exposure, it is clear that proper implementation and enforcement of the legislation that bans smoking in hospitals is imperative to protect the health of patients and staff alike.

**Keywords:** tobacco smoke pollution, lung cancer, hospital, ETS, occupational exposure, risk analysis, air pollution

### Introduction

Second Hand Smoke (SHS), emitted from cigarettes is a known human toxin and carcinogen. It contains over 3000 chemicals out of which at least 50 are known or suspected to be carcinogenic, whilst over 200 are regarded as poisonous [1-2]. Its adverse effects on human health have been well documented and it is generally accepted that there is no safe level of exposure to cigarette smoke [3]. Tumor genesis, cardiovascular and respiratory diseases amongst others have been shown to develop and worsen in populations exposed to SHS [4-8]. It is also common knowledge that there is no lower threshold for tobacco carcinogenesis, either regarding lung cancer or tumors in other tissues that are indirectly exposed, since carcinogens absorbed in the lung are distributed

throughout the body and have been proven to create or aggravate tumor genesis [9-10].

In Greece it is estimated that 40% of the adult population are smokers and as stated in previous articles, and even though legislation regarding tobacco use exists, it is inadequately enforced and in certain cases bluntly ignored by the population [11-13]. One law, which is perceived to be correctly enforced, is the implementation of a smoking ban in health-care service centers such as public and private hospitals, health centers and pharmacies (Health Law 76017) [14]. According to the legislation (in force since August 2002) smoking is allowed only in designated areas, which should be provided with adequate air circulation for those who wish to smoke. The legislation also covered public services, educational institutions and public transport stations / public vehicles.

To date, there is little information regarding the exact extent of exposure to SHS in Greece, especially in areas where health services are provided. Therefore, the purpose of our study was firstly to measure SHS exposure in different areas throughout a large Greek public hospital and furtherly to estimate the excess lung-cancer and heart disease mortality risk of the hospital personnel due to their occupational exposure to SHS.

## Methods

### *Aerosol Measurements and Questionnaire Procedures*

A TSI SidePak AM510 Personal Aerosol Monitor (TSI, Inc., St. Paul, Minnesota, USA) was used to sample and record the levels of respirable suspended particles (RSP) in the air. The SidePak uses a built-in sampling pump to draw air through the device and the particulate matter in the air scatters the light from a laser to assess the real-time concentration of particles less than 2.5  $\mu\text{m}$  in micrograms per cubic meter, or  $\text{PM}_{2.5}$ . Particles of this size are released in significant amounts from burning cigarettes, are easily inhaled deep into the lungs, and are associated with pulmonary and cardiovascular disease and mortality [15]. SHS is not the only source of indoor particulate matter since dust, cooking and vehicle fumes also of this size. However,  $\text{PM}_{2.5}$  monitoring is highly sensitive to SHS and elevated levels of such particles can be attributed almost solely to SHS [16,17]. Taking into account the background hospital ambient aerosol levels one can calculate the  $\text{PM}_{2.5}$  levels which are attributed to SHS, following the formula:  $\text{SHS-RSP levels} = \text{measured RSP} - \text{B}$ , where B is the background aerosol level.

The SidePak was calibrated against a light scattering instrument, which had been previously calibrated and used in similar studies. The equipment was set to a ten-second sampling interval, which averages the measurements of the previous 10 seconds. The SidePak's flow rate was set to 1.7 litres per minute to ensure proper operation of the attached 2.5-micron impactor. In accordance with the Global Air Monitoring Study Protocol, a calibration factor of 0.32, which is suitable for tobacco smoke, was applied to all data [18].

Observational information was also recorded regarding evidence of current or previous smoking in the area, air volume and other factors that might affect the data (such as the use of solvents, and other chemicals). The monitor was strapped on the observer's shoulder, so that the air being sampled was within the occupants' normal breathing zone and sampling was discreet in order not to disturb the patients' and personnel normal behavior. For each clinic or ward, the first and last twenty seconds of logged data were removed because they were averaged with waiting room and stairway air. A total of fifteen minutes were spent in each area or ward inside the hospital throughout which the remaining data points were averaged to provide a mean  $\text{PM}_{2.5}$  concentration. Measurements took place on weekdays during April 2006, during the morning shift (9 am-3 pm). The University Hospital of Crete, which is located in

Heraklion Greece, provides primary and secondary care to the population of Heraklion and tertiary care to the population of Crete and the nearby islands. The study was approved and acknowledged by the management of the Heraklion University Hospital but kept unknown from the staff and patients so as not to temporarily modify their smoking behavior.

### *Calculating Airborne Nicotine and Excess Lung Cancer Mortality Risk*

According to the equations introduced by Repace et al., ambient aerosol nicotine levels (AANL) can be calculated from SHS-RSP levels (SHS-RSP: nicotine ratio = 10:1) and a workplace airborne nicotine concentration of 7.5  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  gives an excess heart disease and lung cancer risk of 10/1000 and 1/1000 respectively in a linear dose-response relationship over the 40-year working lifetime [19-20]. The developed formula successfully has predicted actual mortality risk in population based studies and has been used previously to estimate excess occupational lung cancer risk and heart disease among hospitality workers [21-23].

## Results

### *Indoor Air Concentrations of SHS-RSP*

Table 1 depicts the state of occupational exposure to SHS inside the hospital. The exact SHS-RSP levels differed drastically between each area. No levels of SHS-RSP were

**Table 1:** Hospital indoor air concentrations of ETS (SHS-RSP)

<i>Area</i>	<i>Mean levels (<math>\mu\text{g}/\text{m}^3</math>)</i>	<i>Range (<math>\mu\text{g}/\text{m}^3</math>)</i>
Open wards	84	17 - 141
Closed wards		
Intensive Care Unit	12	2 - 23
Operating theatres	11	8 - 21
Staff rest rooms		
Smoking during measurements	628	453 - 1842
Smoking prior to measurements	169	11 - 919
Smoking not noticed	17	10 - 42
Management wards	164	29 - 901
Waiting Rooms	211	91 - 331
Main Lobby	57	25 - 84
Stairwells	147	24 - 253
Changing rooms		
Smoking noticed	1461	1374 - 2123
Smoking not noticed <sup>2</sup>	84	17 - 141
Corridors		
Main	79	47 - 94
Secondary	59	19 - 98
Personnel only	50	7 - 104
Smoking room	1448	1051 - 2084
Outdoor reference	27	-

measured in only the intensive care unit and in operating theatres with mean SHS-RSP levels of 11  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ , even lower than the outdoor reference level of 27  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ . On the other hand, in most wards smoking was either noticed or evident. The mean SHS-RSP level of open wards was estimated at 84  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  and ranged between 17 and 141  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  with the lower readings found in children's wards (general paediatrics, paediatric haematology etc).

Staff rest rooms also were measured to have elevated SHS-RSP levels, depending on whether smoking was evident during or before the measurements were taken. In staff rest rooms, in which smoking was evident, SHS-RSP levels averaged 628  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  and in those where smoking was not noticed 17  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ . Stairwells and waiting rooms also were found to have elevated SHS-RSP levels of 147 and 211  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ , respectively. Inside the hospital premises smoking is permitted only in the smoking room, which has inadequate air ventilation. There, exposure to SHS-RSP was inevitably high, averaging 1448  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ . Even higher levels of SHS-RSP exposure, averaging 1461  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ , were found in certain changing rooms in which smoking, although prohibited, was observed.

#### *Calculated Nicotine Levels and Estimates of Excess Heart Disease and Lung Cancer Mortality*

Taking into account the average levels of SHS one is exposed to while working in the hospital one can calculate the excess occupational lifetime risk of heart disease and lung cancer due to passive smoke exposure in the hospital.

**Table 2:** Estimated excess heart disease and lung cancer deaths per 1000 per 40 years due to hospital based SHS exposure<sup>1</sup>

	<i>Open wards</i>	<i>Closed wards</i>	<i>Management wards</i>
Mean nicotine concentrations <sup>3</sup> in ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )	8.4	N/a	17.6
Range in ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )	1.7 - 14.1	N/a	4.1 - 91.3
Excess lung cancer deaths	1.12	N/a	2.35
Range	0.23 - 1.88	N/a	0.55 - 12.2
Excess heart disease deaths	11.2	N/a	23.5
Range	2.3 - 18.8	N/a	5.5 - 122
Total excess mortality	12.3	N/a	25.9
Range	2.5 - 20.7	N/a	6 - 134

<sup>1</sup>Units of deaths per 1000 persons per 40 years

<sup>2</sup>Mean nicotine concentrations were calculated by using the data from Table 1 SHS-RSP: nicotine ratio of 10:1

<sup>3</sup>Total excess mortality = Lung cancer mortality + cardiovascular disease mortality

According to the ambient aerosol to ambient aerosol nicotine level (AANL) transformation formulas, the mean AANL was 8.4  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  (range 1.7 to 14.1  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ) in open wards and 16.4  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  (range 2.9 to 90.1  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ) in the hospital management wards. Table 2 depicts the estimated excess heart disease and lung cancer mortality risk due to SHS exposure in the hospital. On average 1.12 (0.23 to 1.88) workers per 1000 in open wards and 2.35 per 1000 (0.55-12.2) of management staff will die of lung cancer due to hospital SHS exposure. The excess lung cancer mortality risk in the ICU or operating theatres was not calculated because ambient aerosol measurements were even lower than outdoor baseline measurements and therefore could not be attributed to SHS. Excess heart disease mortality was calculated as tenfold that of the excess lung cancer cases and the accumulation of both led to the total excess mortality cases of 12.3 (2.5 to 20.7) and 25.9 per 1000 (6 - 134) of cases per 1000 per 40 years in open and management wards respectively.

## **Discussion**

The levels of SHS exposure recorded in most areas of the hospital are alarming. It is evident that regulations for tobacco control are not being followed since exposure to SHS was evident in almost all areas. Patients, their relatives and friends, but also personnel were observed smoking during the days the measurements took place. Although waiting rooms and stairways do not have ashtrays and have prominent no-smoking signs, smoking was evident and exposure to SHS for those in waiting rooms was elevated. Personnel were found smoking in their rest rooms and also in their changing rooms so as to avoid being seen and reprimanded. The effects of SHS exposure on human health have been well documented and in this instance would not only affect the state of personnel health but also patients under treatment. Second-hand smoke has been found to worsen asthma attacks, chronic obstructive pulmonary disease, childhood cancer, adult cancer treatment and outcome, and even fertility among women who have undergone recent IVF [24-28].

SHS can now be added to the plethora of health hazards that doctors and nursing staff face. Back pain, long hours and exposure to radiation, latex, nitrous oxide and biological pathogens are just a few dangers that can reduce work efficiency and the health of the practitioners themselves [29-34]. In contrary to the above though, exposure to SHS can be completely avoided if legislated tobacco control measures are followed as designed.

Exposure to SHS in the workplace is not uncommon, especially for workers in hospitality venues, such as bars, cafes and restaurants. Regarding excess lung cancer mortality, similar levels of risk to those found in our study have been noted among workers in betting parlours and bowling alleys in the U.S (1-1.4 per 1000) and in cafes and bars in Spain [21-22]. In comparison to our findings workers in US bars ran a much higher excess risk of up to 14 per 1000 (before the smoking ban), while Hong Kong

hospitality workers have also been estimated at running an almost three times higher lung cancer and cardiovascular disease mortality risk in comparison to hospital personnel of our study but one should take into account the completely different setting between hospitality services and health provision services [23]. Globally, certain populations and specific working groups (as are employees in bars, cafes, casinos, pubs and restaurants) are exposed and subsequently affected by SHS. Implementing smoking bans has been found to reduce both occupational respiratory symptoms and population based risk of acute myocardial infarction and other cardiovascular events and the necessity of their implementation is scientifically warranted [35-36]. To our knowledge this is the first study that clearly demonstrates the connection between non-compliance to tobacco control measures for SHS exposure and mortality risk among workers in a hospital setting.

Certain assumptions were made during aerosol measurements and excess heart disease and lung cancer calculations. It is possible that lifetime exposure to SHS in the hospital differs due to our short window of measurements. It is possible that SHS levels during the afternoon and night shifts might be lower due to the reduction in personnel and visitors. However, the excess mortality risk might not necessarily be lower as we have not taken into account movement between wards and the time spent in staff rest rooms that provide a brief but extremely high exposure to SHS. Although it is difficult to extract generalizable conclusions in regards to other hospitals in Greece this study shows that PM<sub>2.5</sub> measurements are a valid tool for measuring and monitoring SHS exposure in hospitals and an important means of surveillance of tobacco control legislations.

From our study, we are able to conclude that SHS in a typical hospital in Greece is prevalent and poses a threat to the health of patients and hospital personnel. Even though a policy that bans smoking in hospitals does exist, it is flagrantly ignored. When one considers the excess mortality risk and the immediate adverse health effects of SHS, it is imperative that the legislation that bans smoking within hospitals in Greece be enforced to protect not only patients but also medical and nursing staff from involuntary exposure to SHS and its ramifications.

#### Acknowledgement

We would like to thank the staff of the University Hospital of Crete, Greece for their cooperation and Prof Manolis Kogevinas, from the Department of Social Medicine for his constant support. CIV is currently funded by a Flight Attendant Medical Research Institute Award Grant, (FAMRI) for research on secondhand smoke. We have no conflict of interest to declare.

#### References

1. IARC (International Agency for Research on Cancer): Tobacco smoking and involuntary smoking. ARC

Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, vol. 83, Lyon, France, 2002.

2. NCI (National Cancer Institute). Fact sheet on environmental tobacco smoke. 2 February 2000. Available at: [http://cis.nci.nih.gov/fact/10\\_18.htm](http://cis.nci.nih.gov/fact/10_18.htm)
3. EHIS (Environmental Health Information Service) ninth report on Carcinogens. US department of Health and Human Services, Public Health Service, *National Toxicology Program*, 2000.
4. Zhu, B. Q.; Heesch, C.; Sievers, R. E. et al.: Second hand smoke stimulates tumor angiogenesis and growth. *Cancer Cell*, 2003, 4(3):191-6.
5. Gammon, M. D.; Eng, S. M.; Teitelbaum, S. L. et al.: Environmental tobacco smoke and breast cancer incidence. *Environ Res.* 2004; 96(2):176-85.
6. Moffatt, R. J.; Chelland, S. A.; Pecott, D. L. et al.: Acute exposure to environmental tobacco smoke reduces HDL-C and HDL2-C. *Prev Med.* 2004; 38(5):637-41.
7. Eisner, M. D.; Balmes, J.; Katz, P. P. et al.: Lifetime environmental tobacco smoke exposure and the risk of chronic obstructive pulmonary disease. *Environ Health*, 2005; 4(1):7
8. Maziak, W.; Ward, K. D.; Rastam, S. et al.: Extent of exposure to environmental tobacco smoke (ETS) and its dose-response relation to respiratory health among adults. *Respir Res.* 2005; 6(1):13.
9. Alberg, A.; Samet, J.: Epidemiology of Lung Cancer. *J Am Col Chest Phy.* 2003; 123: 21s-49s.
10. Trimble, C. L.; Genkinger, J. M.; Burke, A. E. et al.: Active and passive cigarette smoking and the risk of cervical neoplasia. *Obstet Gynecol.* 2005; 105:174-181
11. Huisman, M.; Kunst, A. E.; Mackenbach, J. P.: Inequalities in the prevalence of smoking in the European Union: comparing education and income. *Prev Med*, 2005; 40:756-764
12. Vardavas, C. I.; Kafatos, A.: Greece's tobacco policy: another myth? *The Lancet*, 2006; 367(9521): 1485-1486
13. Vardavas, C. I.; Kafatos, A.: Tobacco policy and smoking prevalence in Greece. *Eur J Public Health.* 2007; 17(2):211-3.
14. Health Law 76017. Legislation Newspaper of the Government of the Hellenic Democracy. 2nd edition, page 1001, August 1, 2002.
15. US Environmental Protection Agency, Fine Particle (PM 2.5) Designations. Accessed 4/12/06 from <http://www.epa.gov/pmdesignations/>
16. Ott, W.; Switzer, P.; Robinson, J.: Particle concentrations inside a tavern before and after prohibition of smoking: evaluating the performance of an indoor air quality model. *J Air Waste Manag Assoc.* 1996; 46:1120-1134.
17. Repace, J. L.: Respirable particles and carcinogens in the air of Delaware hospitality venues before and after a smoking ban. *JOEM.* 2004; 46:887-905
18. Hyland, A.; Travers, M. J.; Dresler, C.; Higbee, C.; Carpenter, C.; Connolly, G.; Cummings, K. M.: A 24-Country Comparison of Levels of Indoor Air



- Pollution in Different Workplaces: Roswell Park Cancer Institute, International Agency for Research on Cancer, Harvard School of Public Health; September 2006. ([http://www.tobaccofreeair.org/downloads/GAMS%20report.v7\\_Sept\\_06.pdf](http://www.tobaccofreeair.org/downloads/GAMS%20report.v7_Sept_06.pdf))
19. Repace, J. Al-Delaimy, W. K.; Bernert, J. T.: Correlating atmospheric and biological markers in studies of secondhand tobacco smoke exposure and dose in children and adults. *J Occup Environ Med.* **2006**; *48*(2):181-94
  20. Repace, J.; Lowrey, A.: An enforceable indoor air quality standard for environmental tobacco smoke in the workplace. *Risk Analysis.* **1993**; *13*: 463-74
  21. Lopez, M. J.; Nebot, M.; Juarez, O. et al.: Estimation of the excess of lung cancer mortality risk associated to environmental tobacco smoke exposure of hospitality workers. *Med Clin (Barc).* **2006**; *126*(1):13-4
  22. Siegel, M.; Skeer, M.: Exposure to secondhand smoke and excess lung cancer mortality risk among workers in the "5 B's": bars, bowling alleys, billiard halls, betting establishments, and bingo parlours. *Tob Control*, **2003**; *12*(3):333-8
  23. Hedley, A.; McGhee, S.; Repace, J. L.; Wong, L-C.; Yu, Ysm; Wong, T. W.; Lam, T. W.: Risks for heart disease and lung cancer from passive smoking by workers in the catering industry. *Toxicological Sciences* **2006**; *90*(2): 539-548
  24. Eisner, M. D.; Balmes, J.; Yelin, E. H. et al.: Directly measured second-hand smoke exposure and COPD health outcomes. *BMC Pulm Med.* **2006**; *6*:12.
  25. Teach, S. J.; Crain, E. F.; Quint, D. M. et al.: Indoor environmental exposures among children with asthma seen in an urban emergency department. *Pediatrics*, **2006**; *117*: S152-8.
  26. Neal, M. S.; Hughes, E. G.; Holloway, A. C. et al.: Side stream smoking is equally as damaging as mainstream smoking on IVF outcomes. *Hum Reprod.* **2005**; *20*(9):2531-5.
  27. Tyc, V. L.; Throckmorton-Belzer, L.; Klosky, J. L. et al.: Smoking among parents of pediatric cancer patients and children's exposure to environmental tobacco smoke. *J Child Health Care.* **2004**; *8*(4):288-300.
  28. Gritz, E. R.; Dresler, C.; Sama, L.: Smoking, the missing drug interaction in clinical trials: ignoring the obvious. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* **2005**; *14*(10):2287-93.
  29. Mohseni-Bandpei, M. A.; Fakhri, M.; Bagheri-Nesami, M. et al.: Occupational back pain in Iranian nurses: an epidemiological study. *Br J Nurs.* **2006**; *15*(17):914-7.
  30. Tarantola, A.; Abiteboul, D.; Rachline, A.: Infection risks following accidental exposure to blood or body fluids in health care workers: a review of pathogens transmitted in published cases. *Am J Infect Control.* **2006**; *34*(6):367-75.
  31. Berney, B.; Needleman, J.: Impact of nursing overtime on nurse-sensitive patient outcomes in New York hospitals, 1995-2000. *Policy Polit Nurs Pract.* **2006**; *7*(2): 87-100.
  32. Pant, G. S.; Sharma, S. K.; Rath, G. K.: Finger doses for staff handling radiopharmaceuticals in nuclear medicine. *J Nucl Med Technol.* **2006**; *34*(3): 169-73.
  33. Marriott, C. J.; Webber, C. E.; Gulenchyn, K. Y.: Radiation exposure for 'Caregivers' during high-dose outpatient radioiodine therapy. *Radiat Prot Dosimetry.* **2007**; *123*(1):62-7
  34. Amr, S.; Suk, W. A.: Latex allergy and occupational asthma in health care workers: adverse outcomes. *Environ Health Perspect.* **2004**; *112*(3):378-81.
  35. Wakefield, M.; Cameron, M.; Inglis, G.; Letcher, T.; Durkin, S.: Secondhand smoke exposure and respiratory symptoms among casino, club, and office workers in Victoria, Australia. *J. Occup Environ Med.* **2005**; *47*(7):698-703.
  36. Dinno, A.; Glantz, S.: Clean indoor air laws immediately reduce heart attacks. *Prev Med.* **2007**; *45*(1):9-11.