

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΠΝΕΥΜΟΝΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: Καθηγητής Ν.Μ. ΣΙΑΦΑΚΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΕΠΙΚΤΗΤΕΣ ΣΩΜΑΤΙΚΕΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ
ΣΤΟ ΜΙΚΡΟΔΟΥΡΥΦΟΡΙΚΟ DNA
ΣΕ ΠΑΙΔΙΑ ΜΕ ΒΡΟΓΧΙΚΟ ΑΣΘΜΑ**

ΧΡΙΣΤΙΝΑ ΘΩΜΟΥ

Ειδικευόμενη Παιδιατρικής

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2010

Αφιερωμένο στο σύζυγό μου Μιχάλη,
για την υποστήριξη και την αγάπη του όλα αυτά τα χρόνια
και στο γιο μας Γιάννη,
για την υπομονή που επέδειξε κατά τη διάρκεια
συγγραφής αυτής της διδακτορικής διατριβής.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με την ευκαιρία της ολοκλήρωσης της παρούσας διδακτορικής διατριβής θα ήθελα πρώτα απ' όλα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στον Καθηγητή μου κ. Νικόλαο Σιαφάκα, στον οποίο οφείλω την ιδέα αυτής της διατριβής καθώς και την ευκαιρία να πραγματοποιήσω την ερευνητική αυτή εργασία. Όλο αυτό το διάστημα είχα την αμέριστη υποστήριξή του, τόσο σε επιστημονικό όσο και σε ανθρώπινο επίπεδο, ώστε να καταστεί δυνατή η πρόοδος και η ολοκλήρωσή της.

Ευχαριστίες επίσης θα ήθελα να απευθύνω στην Καθηγήτρια Παιδιατρικής κα. Μαρία Καλμαντή και τον Επίκουρο Καθηγητή Κλινικής Ιολογίας κ. Γεώργιο Σουρβίνο, που αποτέλεσαν μαζί με τον κ. Σιαφάκα την τριμελή συμβουλευτική επιτροπή για τη διατριβή αυτή.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον Επίκουρο Καθηγητή Παιδιατρικής κ. Μανώλη Παρασκάκη, με τον οποίο συνεργάστηκα στενά στα πλαίσια της διατριβής αυτής. Η καθοδήγησή του, τόσο σε εργαστηριακό όσο και σε κλινικό επίπεδο, ήταν πολύ σημαντική για την πρόοδο της ερευνητικής αυτής προσπάθειας ενώ οι συμβουλές και η εμπειρία του υπήρξαν στοιχεία πολύτιμα για τη συνεργασία μας αυτή.

Θερμά θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης την Επίκουρη Καθηγήτρια Πνευμονολογίας και υπεύθυνη του Εργαστηρίου Μοριακής και Κυτταρικής Πνευμονολογίας της Πνευμονολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου κα. Ελένη Τζωρτζάκη, της οποίας η συμβολή στην έρευνα αυτή υπήρξε πολύ σημαντική, ενώ η προσωπική της ενασχόληση, οι επισημάνσεις και οι διορθώσεις της υπήρξαν καθοριστικής σημασίας για την ολοκλήρωση της έρευνας αυτής.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τις βιολόγους Μαίρη Ζερβού και Ειρήνη Νεοφύτου για τη βοήθειά τους, τη Βαγγελιώ Σταματάκη για τη

βοήθεια και την υποστήριξη της και τις γραμματείς της Πνευμονολογικής Κλινικής Ειρήνη Ρογδάκη και Ρένα Μιχαλάκη.

Τέλος, πολλά ευχαριστώ στους γονείς μου, για τα όσα έως τώρα απλόχερα μου έχουν προσφέρει, και στο σύζυγό μου Μιχάλη, ο οποίος είναι πάντα δίπλα μου σε όλες τις δύσκολες ή ευτυχισμένες στιγμές της ζωής μας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Σύντομο Βιογραφικό Σημείωμα.....	9
Περίληψη.....	12
Περίληψη (Αγγλικά).....	14

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 1: Βρογχικό Άσθμα.....17

1.1. Ορισμός.....	18
1.2. Επιδημιολογία.....	19
1.3. Παθογένεια.....	21
1.3.1. Φλεγμονή.....	21
<i>Φλεγμονή Th2 Κυττάρων.....</i>	<i>23</i>
<i>Χυμοκίνες.....</i>	<i>27</i>
1.3.2. Λείες Μυϊκές Ίνες Αεραγωγών.....	28
1.3.3. Βρογχική Υπεραντιδραστικότητα.....	29
1.3.4. Επαναδιάταξη Αεραγωγών (Remodeling).....	31
1.3.5. Νέοι Παθογενετικοί Μηχανισμοί Άσθματος.....	32
Εικόνα 1.....	40

Κεφάλαιο 2: Γενετική Άσθματος.....42

<i>Μακρό Σκέλος Χρωμοσώματος 5 (5q).....</i>	<i>45</i>
<i>Βραχύ Σκέλος Χρωμοσώματος 6 (6p).....</i>	<i>46</i>
<i>Μακρό Σκέλος Χρωμοσώματος 11 (11q).....</i>	<i>47</i>

<i>Μακρό Σκέλος Χρωμοσώματος 12 (12q)</i>	47
<i>Μακρό Σκέλος Χρωμοσώματος 13 (13q)</i>	48
<i>Μακρό Σκέλος Χρωμοσώματος 14 (14q)</i>	48
<i>Μακρό Σκέλος Χρωμοσώματος 16 (16q)</i>	48
<i>Μακρό Σκέλος Χρωμοσώματος 17 (17q)</i>	49
<i>Βραχύ Σκέλος Χρωμοσώματος 20 (20p)</i>	49
Εικόνα 2.....	52
Κεφάλαιο 3: Περιβάλλον και Άσθμα.....	53
Κεφάλαιο 4: Αλληλεπίδραση Γονιδίων και Περιβάλλοντος.....	58
<i>Μικροβιακές Ενδοτοζίνες</i>	59
<i>Οξειδωτικό Στρες</i>	61
Εικόνα 3.....	65

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 1: Μικροδορυφορική Αστάθεια και Απώλεια της Ετεροζυγωτίας.....	67
1.1. Εισαγωγή.....	68
1.2. Μικροδορυφορική Αστάθεια και Απώλεια της Ετεροζυγωτίας.....	69

1.3. Μικροδορυφορική Αστάθεια και Καρκινογένεση.....	70
1.4. Μικροδορυφορική Αστάθεια και Απώλεια της Ετεροζυγωτίας σε Καλοήθεις Νόσους.....	71
1.5. Μικροδορυφορική Αστάθεια και Απώλεια της Ετεροζυγωτίας σε Καλοήθεις Πνευμονικές Παθήσεις.....	71
Κεφάλαιο 2: Πρόκληση Πτυέλου.....	75
2.1. Εισαγωγή.....	76
2.2. Μέθοδος.....	76
2.3. Ασφάλεια.....	79
2.4. Κλινικές Εφαρμογές.....	81
Κεφάλαιο 3: Ανίχνευση Σωματικών Μεταλλάξεων στο Μικροδορυφορικό DNA σε Παιδιά με Βρογχικό Άσθμα.....	83
3.1. Εισαγωγή.....	84
3.2. Υλικά και Μέθοδος.....	86
3.2.1. Ασθενείς.....	86
3.2.2. Σχεδιασμός Μελέτης.....	87
3.2.3. Λειτουργικές Μετρήσεις Πνευμόνων.....	88
3.2.4. Πρόκληση Πτυέλου.....	89
3.2.5. Επεξεργασία Πτυέλου.....	89

3.2.6. Κυτταροχημεία.....	90
3.2.7. Εκχύλιση DNA.....	91
3.2.8. Μικροδορυφορικοί Δείκτες, Ανάλυση Μικροδορυφορικής Αστάθειας και Απώλειας της Ετεροζυγωτίας.....	91
3.2.9. Στατιστική Ανάλυση.....	92
3.2.10. Δεοντολογία.....	93
3.3. Αποτελέσματα.....	93
Πίνακας 1.....	95
Πίνακας 2.....	96
Πίνακας 3.....	97
Εικόνα 1.....	98
3.4. Συζήτηση.....	100
<i>Κριτική των Μεθόδων</i>	103
3.5. Μελλοντικές εφαρμογές.....	104
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	105
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	137
Περιλήψεις σε Συνέδρια και Δημοσιευμένο Άρθρο σε Περιοδικό Αξιολογημένο στο Index Medicus (Pubmed).....	137

ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Γεννήθηκα στα Χανιά στις 19 Απριλίου 1977. Μεγάλωσα στο Ρέθυμνο όπου και αποφοίτησα από το Ενιαίο Πολυκλαδικό Λύκειο της πόλης τον Ιούνιο του 1995. Μέσω των Πανελλαδικών Εισαγωγικών Εξετάσεων εισήχθηκα δεύτερη στο Τμήμα Ιατρικής Ηρακλείου, όπου και αποφοίτησα τον Ιούλιο του 2002 με βαθμό πτυχίου λίαν καλώς (7,49). Το Φεβρουάριο του 2003 εργάστηκα στο Γενικό Νοσοκομείο Ρεθύμνου για 3 μήνες και στη συνέχεια στο Περιφερειακό Ιατρείο Πρασών του Κέντρου Υγείας Αγίας Φωτεινής για 6 μήνες, στα πλαίσια της υποχρεωτικής υπηρεσίας υπαίθρου. Το Νοέμβριο του 2003, ξεκίνησα την ειδίκευσή μου στην Παιδιατρική ειδικότητα στο Γενικό Νοσοκομείο Αγίου Νικολάου όπου και παρέμεινα για 9 μήνες. Από το Σεπτέμβριο του 2004 και για 2 χρόνια, εργάστηκα ως κλινικός ερευνητής στην Πνευμονολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου, συμμετέχοντας σε πολλές πολυκεντρικές μελέτες άσθματος και χρόνιας αποφρακτικής πνευμονοπάθειας σε ενήλικες. Παράλληλα, από το Μάιο του 2005, ξεκίνησα την ερευνητική μου δραστηριότητα σε παιδιά με άσθμα, στα πλαίσια της εκπόνησης της διδακτορικής μου διατριβής στο Πανεπιστήμιο Κρήτης, συμμετέχοντας στο Εξωτερικό Παιδοπνευμονολογικό Ιατρείο της Παιδιατρικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου. Από το Φεβρουάριο του 2007 και για 4 μήνες, συμμετείχα στα Εξωτερικά Ιατρεία του Παιδοπνευμονολογικού και Παιδοαλλεργιολογικού Τμήματος του Πανεπιστημιακού Παιδιατρικού Νοσοκομείου Reine Fabiola στις Βρυξέλλες. Στη συνέχεια, στα πλαίσια της συνέχισης της ειδίκευσής μου στην Παιδιατρική ειδικότητα, εργάστηκα διαδοχικά στις Βρυξέλλες στο Νοσοκομείο Sainte-Elisabeth από τον Ιούνιο του 2007 και για 4 μήνες και στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Saint-Luc από τον Οκτώβριο του 2007 και για 11 μήνες. Από το Νοέμβριο του 2008 έως και σήμερα,

εργάζομαι ως ειδικευόμενη Παιδιατρικής στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ηρακλείου.

Δημοσίευση σε Ξενογλωσσο Περιοδικό

Θώμου Χ., Παρασκάκης Ε., Νεοφύτου Ε., Καλμαντή Μ., Σιαφάκας Ν.Μ., Τζωρτζάκη Ε.Γ. Acquired somatic mutations in the microsatellite DNA, in children with bronchial asthma. *Pediatr Pulmonol.* 2009 Oct;44(10):1017-24.

Περιλήψεις σε Συνέδρια

1. Ε. Στειακάκη, **Χ. Θώμου**, Ε. Μαρκάκη, Ν. Κατζηλάκης, Χ. Περδικογιάννη, Μ. Καλμαντή. Ιδιοπαθής θρομβοπενική πορφύρα στα παιδιά. Εμπειρία 19 χρόνων. 20^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο 2009 (έγινε αποδεκτό σαν προφορική ανακοίνωση).
2. **Χ. Θώμου**, Ε. Στειακάκη, Ν. Κατζηλάκης, Ε-Α. Μαρκάκη, Μ. Δρακάκη, Χ. Περδικογιάννη, Μ. Καλμαντή. Ιδιοπαθής θρομβοπενική πορφύρα στα παιδιά. Εμπειρία 19 χρόνων. 47^ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο 2009 (έγινε αποδεκτό σαν παρουσίαση πόστερ).
3. **Θώμου Χ.**, Παρασκάκης Ε., Τζωρτζάκη Ε.Γ., Ζερβού Μ.Ι., Νεοφύτου Ε., Καλμαντή Μ., Σιαφάκας Ν.Μ. Genetic alterations at microsatellite DNA in children with bronchial asthma. *ATS international conference 2008* (έγινε αποδεκτό σαν παρουσίαση πόστερ).
4. **Θώμου Χ.**, Παρασκάκης Ε., Τζωρτζάκη Ε.Γ., Ζερβού Μ.Ι., Νεοφύτου Ε., Καλμαντή Μ., Σιαφάκας Ν.Μ. Genetic alterations at microsatellite DNA level in asthmatic children. *36^e Congres annuel de la Société Belge de Pédiatrie 2008* (έγινε αποδεκτό σαν παρουσίαση πόστερ).
5. Ε. Παρασκάκης, **Χ. Θώμου**, Ε. Τζωρτζάκη, Ε. Νεοφύτου, Μ. Καλμαντή, Ν. Σιαφάκας. Microsatellite DNA instability and loss of heterozygosity in asthmatic children. *ERS annual congress 2007*

(έγινε αποδεκτό σαν προφορική ανακοίνωση).

6. Ε. Παρασκάκης, **Χ. Θώμου**, Ε. Παπαδοπούλη, Ν. Τζανάκης, Μ. Καλμαντή, Ν.Μ. Σιαφάκας. Effect of bronchodilation and spirometry on exhaled nitric oxide of normal and asthmatic subjects. ATS international conference 2007 (έγινε αποδεκτό σαν παρουσίαση πόστερ).
7. Ε. Παρασκάκης, Ε. Παπαδοπούλη, **Χ. Θώμου**, Ν. Τζανάκης, Μ. Καλμαντή, Ν.Μ. Σιαφάκας. Sputum induction in asthmatic children: safety in children and feasibility of new methods of monitoring inflammation in sputum samples. ERS annual congress 2006 (έγινε αποδεκτό σαν παρουσίαση πόστερ).
8. **Θώμου Χ.**, Παρασκάκης Ε., Παπαδοπούλη Ε., Τζανάκης Ν., Σιαφάκας Ν., Καλμαντή Μ. Πρόκληση πτυέλων σε ασθματικά παιδιά: ασφάλεια και δυνατότητα εφαρμογής νέων μεθόδων παρακολούθησης της φλεγμονής σε δείγματα πτυέλων. 44^ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο 2006 (έγινε αποδεκτό σαν παρουσίαση πόστερ).

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός

Υψηλή επίπτωση γενετικών αλλαγών σε επίπεδο μικροδορυφορικού (ΜΔ) DNA έχει καταγραφεί σε ενήλικες με άσθμα.

Υπόθεση

Σκοπός αυτής της μελέτης ήταν να ερευνηθεί εάν η μικροδορυφορική αστάθεια (ΜΔΑ) και η απώλεια της ετεροζυγωτίας (ΑΤΕ) είναι ανιχνεύσιμα φαινόμενα σε παιδιά με άσθμα.

Μεθοδολογία

Έγινε εκχύλιση DNA από κύτταρα πτυέλων και αίματος σε 27 παιδιά ($10,8 \pm 2,5$ έτη) με ήπιο έως μέτριο άσθμα, και από 8 υγιείς, μη καπνιστές, νέους ενήλικες. Χρησιμοποιήθηκαν οι κάτωθι 14 πολυμορφικοί ΜΔ δείκτες: D5S207, D5S820, D5S637, D6S344, D6S2223, D6S263, SGC35231, D11S1253, D11S1337, D11S97, USAT24G1, D13S273, D14S258 και D14S292, οι οποίοι εντοπίζονται στα χρωμοσώματα (chr) 5q, 6p, 11q, 13q και 14q, με σκοπό να εκτιμηθεί η ΜΔΑ και η ΑΤΕ.

Αποτελέσματα

Κανένας από τους υγιείς ενήλικες δεν παρουσίασε κάποια γενετική αλλαγή. Πέντε από τα 27 παιδιά (18,5%) παρουσίασαν ΜΔΑ ή ΑΤΕ στα κύτταρα πτυέλου έναντι των δειγμάτων αίματος εκ των οποίων 3 στο δείκτη USAT24G1 (χρ 13q14.1), 1 στο δείκτη D14S258 (χρ 14q23-q24.3) και 1 στο δείκτη D5S637 (χρ 5q12-q13). Συγκριτικά με προηγούμενη μελέτη σε ασθματικούς ενήλικες, όπου ΜΔΑ και/ή ΑΤΕ παρουσιάστηκε στο 60% περίπου των περιστατικών, στην παρούσα μελέτη καταγράφηκαν γενετικές αλλαγές στο ΜΔ DNA σε <20% των ασθματικών παιδιών.

Συμπεράσματα

Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι η γενετική αστάθεια στο ΜΔ DNA είναι παρούσα σε ασθματικά παιδιά, αν και σε μικρότερο βαθμό συγκριτικά με παλαιότερες μελέτες σε ασθματικούς ενήλικες. Τα ευρήματα αυτά θα μπορούσαν να υποστηρίξουν την υπόθεση ότι οι επίκτητες σωματικές αλλαγές εμφανίζονται πρώιμα στη φυσική πορεία του άσθματος και θα μπορούσαν να αντιπροσωπεύουν έναν επιπλέον παράγοντα που συμβάλλει στην παθογένεια της νόσου σε μοριακό επίπεδο. Παρ' όλα αυτά, επιπλέον μελέτες είναι απαραίτητες για να υποστηριχθεί η υπόθεση αυτή.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ (Αγγλικά)

Objectives

High incidence of genetic alterations at the microsatellite (MS) DNA level has been reported in asthmatic adults.

Working Hypothesis

The aim of this study was to investigate whether microsatellite instability (MSI) and loss of heterozygosity (LOH) were detectable phenomena in children with asthma.

Methodology

DNA was extracted from sputum and blood cells of 27 children (10.8 ± 2.5 years) with mild to moderate asthma, and from 8 healthy, never-smoked young adults. Fourteen polymorphic MS markers, namely D5S207, D5S820, D5S637, D6S344, D6S2223, D6S263, SGC35231, D11S1253, D11S1337, D11S97, USAT24G1, D13S273, D14S258, and D14S292, located on chromosomes (chr) 5q, 6p, 11q, 13q, and 14q were used to assess MSI and LOH.

Results

None of the healthy subjects exhibited any genetic alteration. Five out of 27 children (18.5%) exhibited MSI or LOH in sputum cells versus blood samples from which 3 in the marker USAT24G1 (chr 13q14.1), 1 in the marker D14S258 (chr 14q23-q24.3), and 1 in the marker D5S637 (chr 5q12-q13). Compared to a previous study, with asthmatic adults, whereas MSI and/or LOH was exhibited in approximately 60% of the cases, the current study reported <20% of genetic alterations, at the MS DNA, in asthmatic children.

Conclusions

Our results showed that genetic instability in the MS DNA, is present in asthmatic children, but to less extent than in adult asthmatics from previous studies. These findings may support the hypothesis that somatic mutations may be early acquired in the natural course of asthma and could represent another contributor to the molecular pathogenesis of the disease. However, further studies are needed to clarify this hypothesis.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΒΡΟΓΧΙΚΟ ΑΣΘΜΑ

1.1. Ορισμός

Οι πρώτες συστηματικές προσπάθειες για τον ορισμό του άσθματος έγιναν τη δεκαετία του 1970, παρ' όλα αυτά ακόμα και σήμερα δεν υπάρχει ειδικός ορισμός για το άσθμα, ούτε κάποιος έγκυρος διαγνωστικός αλγόριθμος ώστε να είναι δυνατή η τυποποιημένη (standardized) διάγνωση της νόσου για κλινικούς, επιδημιολογικούς ή γενετικούς σκοπούς. Αντ' αυτού, το άσθμα ορίζεται λειτουργικά ως μία φλεγμονώδης νόσος, η οποία συνδυάζεται με υπεραντιδραστικότητα στους βρόγχους, η οποία προκαλεί συμπτώματα.

Σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες του Global Initiative for Asthma (Global Initiative for Asthma Guidelines)¹: "Το άσθμα είναι μία χρόνια φλεγμονώδης νόσος των αεραγωγών όπου πολλά είδη κυττάρων και κυτταρικών στοιχείων παίζουν ρόλο. Η χρόνια φλεγμονή σχετίζεται με υπεραντιδραστικότητα στους βρόγχους, η οποία οδηγεί σε υποτροπιάζοντα επεισόδια συριγμού, δύσπνοιας, δυσφορίας στο θώρακα και βήχα, ιδίως τη νύχτα ή τις πρώτες πρωινές ώρες. Τα επεισόδια αυτά συνήθως σχετίζονται με διάχυτη αλλά ποικίλη απόφραξη των αεραγωγών, η οποία συνήθως είναι αναστρέψιμη, είτε αυθόρμητα είτε μετά από χορήγηση αγωγής."

Ομοίως, καμία από τις τρέχουσες μεθόδους δεν μπορεί να ορίσει με αντικειμενικό τρόπο τη βαρύτητα της νόσου, πέραν των υπαρχόντων λειτουργικών κριτηρίων:¹

- συμπτώματα κατά τη διάρκεια της ημέρας,
- περιορισμός της φυσικής δραστηριότητας,
- νυχτερινά συμπτώματα και αφύπνιση κατά τη διάρκεια της νύχτας,
- ανάγκη για φάρμακα "διάσωσης"/ανακούφισης,
- λειτουργικότητα πνευμόνων ως ποσοστό επί της προβλεπόμενης τιμής,
- συχνότητα παροξύνσεων,

- ανταπόκριση στην αγωγή (επιτυχία ή αποτυχία στο να βελτιώσει ή να ελέγξει τους προαναφερθέντες παράγοντες).

Οι παιδίατροι έχουν ορίσει τρεις μεγάλες κατηγορίες συρίττουσας αναπνοής στα βρέφη, οι οποίες έχουν επίσης εκτιμηθεί για την επίδρασή τους στο επακόλουθο εμφάνισμα άσθμα στην ενήλικη ζωή και είναι: τα παροδικά επεισόδια συρίττουσας αναπνοής βρεφικής ηλικίας, ο μη ατοπικός συριγμός νηπιακής ηλικίας και ο IgE μεσολαβούμενος συριγμός ή άσθμα. Μία τέταρτη κατηγορία η οποία έχει επίσης εισαχθεί είναι το παιδικό άσθμα όψιμης έναρξης.²

1.2. Επιδημιολογία

Το άσθμα αποτελεί την πιο συχνή σοβαρή πάθηση των πνευμόνων προσβάλλοντας 150 εκατομμύρια άτομα παγκοσμίως, χωρίς να είναι δυνατή ούτε η πρόληψη ούτε η θεραπεία του.³ Στις Η.Π.Α. αποτελεί την πιο συχνή νόσο της παιδικής ηλικίας προσβάλλοντας 6,5 εκατομμύρια παιδιά.⁴

Αν και δεν υπάρχει συγκεκριμένος ορισμός για το άσθμα, η κλινική διάγνωσή του βασίζεται, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, στην παρουσία συμπτωμάτων συρίττουσας αναπνοής, δύσπνοιας και βήχα καθώς και σε υποκειμενικές ενδείξεις ποικίλης απόφραξης των αεραγωγών. Σε χώρες με ανεπτυγμένες υπηρεσίες υγείας η διάγνωση άσθματος τίθεται σε περισσότερο από το 10% των παιδιών⁵ και το 5% των ατόμων ηλικίας 20-44 ετών.⁶ Το άσθμα κατά την παιδική ηλικία εμφανίζεται συχνότερα σε αγόρια παρά κορίτσια αλλά αργότερα προσβάλλει συχνότερα τις γυναίκες.⁷ Τα στοιχεία δείχνουν σταθερά σημαντική αύξηση μέσα στο χρόνο του επιπολασμού της συρίττουσας αναπνοής και της διάγνωσης του άσθματος σε πολλούς πληθυσμούς.⁸ Ανάμεσα στο 1980 και 2002, οι σχετιζόμενες με το άσθμα νοσηλείες στις ΗΠΑ αυξήθηκαν κατά 28% στα άτομα ηλικίας <25 ετών, ενώ το 2002

αντιστοιχούσαν στο 7% όλων των νοσηλειών στα παιδιά 0-14 ετών.⁹ Οι τιμές επιπολασμού τείνουν να είναι υψηλότερες σε οικονομικά ανεπτυγμένες χώρες με ήπιο κλίμα^{5,10} και χαμηλές σε οικονομικά αναπτυσσόμενες χώρες, αγροτικής διαβίωσης και αυξάνουν με την υιοθέτηση ενός πιο καταναλωτικού τρόπου ζωής.^{11,12} Όσον αφορά τη θνησιμότητα του άσθματος, διπλασιάστηκε από το 1980 στα άτομα ηλικίας 5-24 ετών.¹³

Ο αυξημένος επιπολασμός του άσθματος με το χρόνο στον ανεπτυγμένο κόσμο φαίνεται να αποτελεί μέρος μίας γενικής τάσης αυξανόμενου επιπολασμού της αλλεργικής ευαισθητοποίησης και των αλλεργικών παθήσεων. Στις ανεπτυγμένες χώρες, το άσθμα σχετίζεται ισχυρά, αν και όχι αποκλειστικά, με την αλλεργική ευαισθητοποίηση στο *Dermatophagoides pteronyssinus* καθώς και σε άλλα περιβαλλοντικά αλλεργιογόνα. Το αλλεργικό άσθμα μπορεί να παρουσιαστεί για πρώτη φορά σε οποιαδήποτε ηλικία, αν και η επίπτωσή του είναι μεγαλύτερη στην παιδική ηλικία.¹⁴ Το άσθμα που εμφανίζεται στα πρώτα χρόνια ζωής και το οποίο δεν συνδυάζεται με αλλεργική ευαισθητοποίηση συνήθως υποχωρεί στην εφηβεία (μέχρι τα 13 έτη), αν και μπορεί να επανεμφανιστεί στην ενήλικη ζωή, ενώ η αλλεργική ευαισθητοποίηση, ιδίως πριν την ηλικία των 3 ετών, σχετίζεται με πολύ μεγαλύτερη πιθανότητα μειωμένης λειτουργικότητας πνευμόνων και επιδεινούμενης βρογχικής υπεραντιδραστικότητας.^{15,16} Επιπλέον, μελέτες μακροπρόθεσμης παρακολούθησης δείχνουν ότι έως και το 50% των περιπτώσεων άσθματος στην εφηβεία ή πρώιμα στην ενήλικη ζωή, αντιπροσωπεύει στην πραγματικότητα υποτροπή της νόσου η οποία ήταν έως τότε σιωπηλή.¹⁷ Το άσθμα των ενηλίκων συνήθως επιμένει δια βίου και πιθανά σχετίζεται με προοδευτική πτώση της λειτουργικότητας των πνευμόνων.¹⁸

Αν και τα ευρήματα αυτά παρέχουν ξεκάθαρες ενδείξεις ότι περιβαλλοντικοί παράγοντες παίζουν σημαντικό ρόλο στην πρόκληση άσθματος και αλλεργίας,

μελέτες σε οικογένειες δείχνουν ότι ένα σημαντικό κομμάτι του κινδύνου εμφάνισης άσθματος καθορίζεται γενετικά. Αυτή η παράδοξη αντίφαση θα μπορούσε να οφείλεται, τουλάχιστον στον ανεπτυγμένο κόσμο, στην εκτεταμένη έκθεση σε σημαντικούς περιβαλλοντικούς παράγοντες καθοριστικούς για την εμφάνιση άσθματος, αφήνοντας τους γενετικούς παράγοντες ως σημαντικούς παράγοντες εξατομικευμένου κινδύνου καθοριστικούς για τη νόσο. Στον αναπτυσσόμενο κόσμο παρ' όλα αυτά η εμφάνιση του άσθματος πιθανά αντανακλά την ισχυρή επίδραση της έκθεσης σε περιβαλλοντικούς παράγοντες οι οποίοι σχετίζονται με την οικονομική ανάπτυξη.⁸

1.3. Παθογένεια

Το άσθμα είναι μια ετερογενής και γενετικά σύνθετη νόσος με περισσότερα από 100 γονίδια να έχουν ήδη αναγνωρισθεί ως υπεύθυνα για τις διάφορες κλινικές εκδηλώσεις της. Χαρακτηρίζεται από απόφραξη των αεραγωγών από βλέννη, απόπτωση των επιθηλιακών κυττάρων, πάχυνση της βασικής μεμβράνης, διόγκωση των αγγείων και αυξημένη αγγειογένεση, φλεγμονώδη διήθηση και υπερτροφία και υπερπλασία των λείων μυϊκών ινών.¹⁹

1.3.1. Φλεγμονή

Η ετερογένεια της φλεγμονής στο άσθμα είναι καλά τεκμηριωμένη και περιλαμβάνει διάφορα είδη κυττάρων με κυρίαρχα τα ηωσινόφιλα, τα μαστοκύτταρα και τα CD4+ T helper λεμφοκύτταρα (Εικόνα 1).¹⁹ Ο Golash ήδη από το 1890 υποστήριξε ότι η αύξηση των ηωσινόφιλων στα πτύελα αποτελεί το πλέον χαρακτηριστικό γνώρισμα της νόσου. Οι Woolcock και Peat²⁰ παρατήρησαν ότι η

βρογχική υπεραντιδραστικότητα δεν συνυπάρχει πάντα με την ατοπία, αποκλείοντας την ατοπία ως την αιτία όλων των περιπτώσεων βρογχικής υπεραντιδραστικότητας. O Wardlaw και συνεργάτες²¹ κατέγραψαν την απουσία ξεκάθαρης συσχέτισης της έντασης της (ηωσινοφιλικής) φλεγμονής και της βαρύτητας του άσθματος. Παρατήρησαν επίσης ότι μόνο η διήθηση των λείων μυϊκών ινών των αεραγωγών από μαστοκύτταρα μπορεί να διαφοροποιήσει την ηωσινοφιλική βρογχίτιδα από το άσθμα^{21,22} και ότι αυτό το χαρακτηριστικό, και όχι η επαναδιάταξη των αεραγωγών (remodeling), σχετίζεται με τη βρογχική υπεραντιδραστικότητα.²³

Πιο πρόσφατα, ο Simpson και συνάδελφοι²⁴ αναγνώρισαν τέσσερεις διαφορετικούς φλεγμονώδεις ενδότυπους σε δείγματα πτυέλου ασθενών με κλινικό άσθμα, σχηματίζοντας τη βάση ενός απλού σχήματος ταξινόμησης: 1) ηωσινοφιλικό, 2) πολυμορφοπυρηνικό, 3) μικτό (δηλ. παρουσία πολυμορφοπύρηνων και ηωσινοφίλων) και 4) "μη κοκκιωματώδες" άσθμα.

Από τότε που οι ερευνητές αυτοί παρατήρησαν αύξηση των toll-like υποδοχέων, των υποδοχέων δηλαδή που αναγνωρίζουν μικροβιακά αντιγόνα και ενεργοποιούν στη συνέχεια την εγγενή ή φυσική ανοσία, συνέδεσαν το πολυμορφοπυρηνικό άσθμα με την εγγενή ανοσία.²⁵ Οι Haldar και Pavord²⁶ αναπαρήγαγαν πειραματικά την αναγνώριση του πολυμορφοπυρηνικού άσθματος. Αυτά τα ετερογενή φλεγμονώδη πρότυπα έρχονται σε πλήρη συμφωνία με την αναγνώριση ενός ξεχωριστού προφίλ κυτταροκινών σε ασθματικούς ασθενείς.²⁷ Ομοίως, η εφαρμογή της πολυπαραγοντικής ανάλυσης σε μοριακές γενετικές μελέτες τείνει να διαχωρίσει, παρά να συνενώσει, τα χαρακτηριστικά της ατοπικής και της ασθματικής νόσου.²⁸

Η βιολογία του πολύ σοβαρού άσθματος είναι σχεδόν βέβαιο ότι είναι διαφορετική από τις ηπιότερες μορφές της νόσου και εμφανίζει στοιχεία

ετερογένειας.²⁹ Τα αποτελέσματα από μακροπρόθεσμες επιδημιολογικές μελέτες άσθματος έχουν δείξει ότι ο βαθμός βαρύτητας του άσθματος τείνει να εδραιωθεί τα πρώτα χρόνια ζωής ενώ η νόσος σπάνια εξελίσσεται αργότερα σε πιο βαριά μορφή.³⁰ Δύο μεγάλες υποκατηγορίες σοβαρού άσθματος έχουν προταθεί με βάση δύο διαφορετικά φλεγμονώδη πρότυπα, το ηωσινοφιλικό και το μη ηωσινοφιλικό άσθμα.^{31,32} Επιπρόσθετα, ο Ranoird και συνεργάτες³³ αναφέρουν την ύπαρξη σοβαρού άσθματος απουσία ηωσινοφιλικής φλεγμονής και κατ' επέκταση Th2 ανοσίας. Ο Brasier και συνεργάτες²⁷ εφάρμοσαν μαθηματικά πρότυπα αναγνώρισης για να συγκρίνουν τα πρότυπα κυτταροκινών στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα 43 ασθενών με ήπιο ή μέτριο άσθμα με 43 ασθενείς με βαρύ άσθμα και κατέγραψαν τέσσερα ξεχωριστά προφίλ για να προβλέψουν την ανταπόκριση στη χορήγηση μεταχολίνης. Παρ' όλα αυτά, υπάρχουν λίγοι μοριακοί μηχανισμοί που ξεκάθαρα διακρίνουν το βαρύ άσθμα, όπως είναι η δεσμευτική πρωτεΐνη CREB-1 (Cyclic AMP response element binding protein 1), η οποία ελέγχει τη γονιδιακή έκφραση ως απάντηση στην αύξηση του κυκλικού AMP,³⁴ η κινάση RIP-2 (Receptor-interacting protein serine-threonine kinase 2),³⁵ ένας μεσολαβητής στη σηματοδότηση του toll-like υποδοχέα, η μειωμένη παραγωγή της προ-επουλωτικής λιποξίνης A4 (pro-healing lipoxin A4)³⁶ και η αντιφλεγμονώδης ιντερλευκίνη 10.³⁷

Φλεγμονή Th2 Κυττάρων

Τα T λεμφοκύτταρα διαφοροποιούνται σε 2 βασικούς φαινότυπους, τα T helper 1 (Th1) και T helper 2 (Th2), τα οποία παράγουν διαφορετικές κυτταροκίνες και χυμοκίνες. Από τα μέσα της δεκαετίας του 1990, η έρευνα πάνω στο άσθμα είχε προχωρήσει σε νέες πληροφορίες που προέρχονταν από την υπόθεση για την φλεγμονή από τα Th2 κύτταρα, παρέχοντας με αυτόν τον τρόπο ένα μοριακό πλαίσιο

για την κατανόηση της καλά εδραιωμένης συσχέτισης του άσθματος με την ατοπία ή τις IgE ανοσοσφαιρίνες και την ηωσινοφιλική φλεγμονή στους πνεύμονες (Εικόνα 1). Ένας πληθυσμός T-helper κυττάρων προωθούμενος μέσω της ιντερλευκίνης 4 μπορεί να παράγει ένα σύνολο κυτταροκινών, όπως η ιντερλευκίνη 4 ή 13 (προάγουν την παραγωγή των ανοσοσφαιρινών IgE μέσω των B κυττάρων, την έκκριση βλέννης και την ίωση), η ιντερλευκίνη 5 (προάγει την ηωσινοφιλική φλεγμονή και την ιστική βλάβη) και η ιντερλευκίνη 9 (προάγει την αύξηση των μαστοκυττάρων), οι οποίες προάγουν διάφορα χαρακτηριστικά τα οποία σχετίζονται με το τυπικό άσθμα. Η υπόθεση της φλεγμονής μέσω των Th2 κυττάρων στους πνεύμονες^{38,39} είναι πλέον κατανοητή σε όλα τα μοριακά επίπεδα: από τη φύση του αντιγόνου έως την ταυτόχρονη διέγερση των αντιγονοπαρουσιαστικών δενδριτικών κυττάρων, τη γλώσσα των μεταγραφικών παραγόντων και την αναδιαμόρφωση των χρωματινών, η οποία ελέγχει γονιδιακά προγράμματα, τα οποία με τη σειρά τους ελέγχουν την εμφάνιση και παραμονή των Th2 λεμφοκυττάρων και τις οδούς διακίνησης τους *in vivo*.⁴⁰⁻⁴²

Η ανοσία μέσω των Th2 κυττάρων είναι αναμφισβήτητα σημαντική σε κάποιους ασθματικούς ενδότυπους. Αλλά ακόμα και εξ' αρχής εκφράστηκαν αμφιβολίες για το εάν η υπόθεση της Th2 φλεγμονής θα μπορούσε να οδηγήσει σε βελτιωμένες μορφές θεραπείας.^{38,39} Αυτές οι αμφιβολίες έχουν πλέον γίνει πιο ισχυρές. Οι πιο σημαντικοί λόγοι αμφισβήτησης της υπόθεσης της Th2 φλεγμονής είναι: α) η βρογχική υπεραντιδραστικότητα και η επαναδιάταξη των ιστών (remodeling) δε σχετίζονται ξεκάθαρα με τη βρογχική φλεγμονή, β) τα υπάρχοντα ανοσοκατασταλτικά των T κυττάρων και τα νέα κατασταλτικά φάρμακα των Th2 κυττάρων (τα οποία έδωσαν καλά αποτελέσματα σε μοντέλα Th2 παθήσεων) δεν έχουν καμία ή έχουν μικρή αποτελεσματικότητα σε κλινικό επίπεδο, γ) πολλοί

ασθενείς εμφανίζουν υποτροπιάζουσες παροξύνσεις, δ) η παραμονή σημαντικής υπολειπόμενης νόσου υπό βέλτιστη αντιφλεγμονώδη αγωγή, ε) ορισμένοι κοινοί γενετικοί παράγοντες κινδύνου του άσθματος με τη χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ) και στ) η εμφάνιση σοβαρού άσθματος σε κάποιους ασθενείς.⁴³ Επιπρόσθετα, το μοντέλο της Th2 φλεγμονής δε μπορεί να εξηγήσει τη σημαντική κλινική και μοριακή ετερογένεια του άσθματος, η οποία έχει πια αναμφισβήτητα καταγραφεί.⁴³ Επομένως, το πλαίσιο αυτό θα πρέπει να αναθεωρηθεί. Πράγματι, είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι τα κριτήρια εισαγωγής των ασθενών σε όλες σχεδόν τις κλινικές μελέτες άσθματος δεν αντανακλούν το πραγματικό πρότυπο του άσθματος της κοινότητας.⁴⁴

Πολλαπλά προβλήματα έχουν ανακύψει. Εάν η συμβολή των T κυττάρων ήταν θεμελιώδης, τότε οι αναστολές των T κυττάρων θα αποτελούσαν πολύ αποτελεσματική θεραπεία. Τουναντίον, οι θεραπείες έναντι των T κυττάρων έχουν αποτύχει σε επίπεδο κλινικών δοκιμών.²⁹ Η Th2 ανοσία είναι θεμελιώδης στην ατοπία, αλλά αν και η ατοπία είναι παράγοντας κινδύνου για το άσθμα, έχει χαμηλή ευαισθησία και ειδικότητα ως προγνωστικός παράγοντας της νόσου. Η Th2 εξαρτώμενη ηωσινοφιλική φλεγμονή σταθερά συσχετίζεται με την ενεργότητα της νόσου, την ευαισθησία σε παροξύνσεις και την ανταπόκριση στην αγωγή, ενώ αποτελεί ένα χρήσιμο βιολογικό δείκτη καθορισμού της θεραπείας.^{45,46} Παρ' όλα αυτά, η φλεγμονή των αεραγωγών είναι περίπου η ίδια ανάμεσα σε μη ασθματικά ατοπικά άτομα, άτομα με αλλεργική ρινίτιδα και ατοπικά ασθματικά άτομα.⁴⁷ Ένα σχεδόν όμοιο πρότυπο ανταπόκρισης έχει καταγραφεί μετά από πρόκληση αλλεργίας σε άτομα αλλεργικά στα ακάρεα της οικιακής σκόνης με ή χωρίς άσθμα.⁴⁸⁻⁵⁰

Επιπρόσθετα, το μοντέλο της Th2 φλεγμονής προβλέπει ότι η ηωσινοφιλική φλεγμονή καθοδηγεί τη βρογχική υπεραντιδραστικότητα, αν και δεν υπάρχει

ξεκάθαρη συσχέτιση,^{51,52} ενώ επιπρόσθετα, μελέτες πληθυσμών έχουν δείξει ότι η ατοπία και η βρογχική υπεραντιδραστικότητα δεν συνδυάζονται πάντα.²⁰ Τα πολυμορφοπύρηνα, η διήθηση των λείων μυϊκών ινών των αεραγωγών από τα μαστοκύτταρα, η ένταση της φλεγμονής καθώς και η φλεγμονή των λείων μυϊκών ινών των αεραγωγών θα μπορούσαν να διαχωρίσουν τη φλεγμονή στην ατοπία έναντι αυτής στο άσθμα.^{21,22} Οι Th2 κυτταροκίνες στους πνεύμονες ανευρίσκονται εξίσου συχνά τόσο στην ατοπία όσο και στο άσθμα, ενώ η ιντερφερόνη γ (μία Th1 κυτταροκίνη) στην πραγματικότητα ανευρίσκεται σε υψηλότερα επίπεδα στα πτύελα ασθματικών ασθενών, μαζί με τις ιντερλευκίνες 4 και 5, όχι όμως και στο αίμα των ασθενών αυτών.⁵³

Τα ανοσοκατασταλτικά φάρμακα των T κυττάρων (π.χ. κυκλοσπορίνη, μεθοτρεξάτη), έχουν μετρήσιμη αλλά πολύ ασθενή επίδραση στο άσθμα, ενώ η ανοσοκατασταλτική αγωγή μετά από ετερόλογη μεταμόσχευση δεν προφυλάσσει από το άσθμα ή από την αλλεργία σε παιδιά και εφήβους.⁵⁴ Επιπρόσθετα, τα γλυκοκορτικοστεροειδή (και οι β₂ αγωνιστές), τα οποία είναι πολύ αποτελεσματικά στο ατοπικό άσθμα με ηωσινοφιλική φλεγμονή, παραδόξως σταθεροποιούν και ισχυροποιούν την Th2 ανοσία και αυξάνουν τις IgE.⁵⁵ Σε μοριακό επίπεδο, τα κορτικοστεροειδή επιλεκτικά καταστέλλουν την ιντερλευκίνη 12 και το μεταγραφικό παράγοντα T-bet, οι οποίοι είναι αρνητικοί ρυθμιστές της Th2 ανοσίας, και όχι τη μεταγραφική πρωτεΐνη STAT6 (Signal transducer and activator of transcription protein 6), η οποία προάγει τα Th2 γονίδια.^{56,57} Επίσης τα στεροειδή μειώνουν την έκφραση του T-bet, του μεταγραφικού παράγοντα που ελέγχει την Th1 (αλλά όχι και την Th2) ανοσία.⁵⁸ Στα παιδιά, τα στεροειδή επιδεινώνουν την Th2 ανοσία και αυξάνουν τις IgE, κάτι το οποίο συσχετίστηκε με τη γενετική σύνδεση του χαμηλής συγγένειας IgE υποδοχέα (FCER2) με τον κίνδυνο εμφάνισης σοβαρών

παροξύνσεων.⁵⁹ Σε συνδυασμό με τη μέτρια δράση της θεραπείας με τις αντι-ιντερλευκίνες 4, 13 και 5, οι οποίες βρίσκονται σε επίπεδο κλινικών δοκιμών,^{60,61} λογικά θα μπορούσε να ισχυριστεί κάποιος ότι τα στεροειδή ασκούν τις ευεργετικές τους δράσεις στο άσθμα σε περιοχές άλλες από την Th2 ανοσία. Φαίνεται λοιπόν ότι τα στεροειδή, αν και καταστέλλουν τα τελικά σημεία δράσης της Th2 ανοσίας, παρ' όλα αυτά ισχυροποιούν την υποκείμενη εκτροπή.

Παρά τους περιορισμούς αυτούς, η Th2 ανοσία είναι κλινικά σημαντική, ιδιαίτερα για το παιδικό ατοπικό άσθμα και το ήπιο αλλεργικό άσθμα των ενηλίκων, και η θεραπεία η οποία θα στοχεύει στην Th2 ανοσία θα είναι αποτελεσματική σε κάποιους ασθματικούς ενδότυπους.⁶¹ Παρ' όλα αυτά, οι τρέχουσες θεραπείες είναι αποτελεσματικές στο ήπιο ατοπικό άσθμα ενώ οι θεραπείες οι οποίες θα στοχεύουν στην Th2 ανοσία είναι μάλλον απίθανο να βελτιώσουν το πρόβλημα της υπολειπόμενης νόσου στο σοβαρό άσθμα.

Χυμοκίνες

Οι χυμοκίνες προσελκύουν επιλεκτικά τα φλεγμονώδη κύτταρα στους αεραγωγούς. Για τα ηωσινόφιλα οι αντίστοιχες χυμοκίνες περιλαμβάνουν την εοταξίνη, την ιντερλευκίνη 5, τη RANTES (Regulated by activation, normal T-cell expressed and secreted) και τις πρωτεΐνες 3 και 4 (χυμοκίνες των μονοπύρηνων), ενώ τα πολυμορφοπύρηννα προσελκύονται κυρίως από την ιντερλευκίνη 8.⁶² Οι χυμοκίνες αυτές παράγονται από φλεγμονώδη και δομικά κύτταρα, όπως τα λεία μυϊκά κύτταρα και τα επιθηλιακά κύτταρα των αεραγωγών.⁶²⁻⁶⁴ Τα φλεγμονώδη κύτταρα προσκολλώνται σε μόρια πρόσδεσης στο αγγειακό ενδοθήλιο των βρόγχων και στη συνέχεια μεταναστεύουν στο διάμεσο χώρο των αεραγωγών.⁶⁵ Τα μόρια πρόσδεσης τα οποία είναι σημαντικά στη διεργασία αυτή είναι τα ICAM-1 (Intracellular

adhesion molecule 1), VCAM-1 (Vascular cell adhesion molecule 1) και E-σελεκτίνη. Τα κύτταρα των αεραγωγών απελευθερώνουν επίσης παράγοντες, όπως τον GM-CSF (Granulocyte macrophage colony stimulating factor), οι οποίοι παρατείνουν τη διάρκεια ζωής των φλεγμονωδών κυττάρων στο σημείο της φλεγμονής.⁶⁶

1.3.2. Λείες Μυϊκές Ίνες Αεραγωγών

Η στένωση των αεραγωγών, η οποία σε μεγάλο βαθμό προκαλείται από τη σύσπαση των λείων μυϊκών ινών των αεραγωγών, αποτελεί το μηχανισμό ο οποίος ξεκάθαρα συσχετίζεται με τα συμπτώματα του άσθματος, κάτι το οποίο φαίνεται και από το επιπρόσθετο όφελος που παρατηρείται μετά από τη συνδυασμένη αγωγή μακράς διάρκειας δράσης βρογχοδιασταλτικών με κορτικοστεροειδή.⁶⁷ Αν και έχει καταγραφεί η παρουσία περισσότερων λείων μυϊκών ινών στους αεραγωγούς ασθματικών ασθενών, αυτό από μόνο του δεν αποτελεί την αιτία της επαναδιάταξης (remodeling) των αεραγωγών.²³ Οι λείες μυϊκές ίνες των αεραγωγών των ασθματικών ασθενών εκκρίνουν επίσης φλεγμονώδεις κυτταροκίνες, συμπεριλαμβανομένου του παράγοντα των βλαστικών κυττάρων (Stem cell factor, SCF), ο οποίος αποτελεί αυξητικό παράγοντα και πρωτεΐνη ενεργοποίησης των μαστοκυττάρων, ενώ εμπλέκεται και στην ενεργοποίηση των δενδριτικών κυττάρων.⁶⁸ Ο αυξημένος αριθμός μαστοκυττάρων και η αποκοκκιοποίησή τους έχουν προταθεί ως παθολογικοί δείκτες παραλλαγμένης λειτουργικότητας τους.^{21,23}

Οι ειδικές μοριακές αλλαγές οι οποίες επηρεάζουν τη συσταλτικότητα, όπως για παράδειγμα οι αλλαγές της ελαφράς αλύσου της μυοσίνης των ισομορφών της κινάσης, παραμένουν αμφιλεγόμενες ενώ οι γενετικές μελέτες δεν έχουν προτείνει έως τώρα ισχυρά υποψήφια γονίδια για τις παραλλαγές αυτές.⁶⁹ Παρ' όλα αυτά, έχει καταγραφεί αύξηση της συχνότητα εμφάνισης βράχυνσης των λείων μυϊκών ινών σε

ασθματικούς ασθενείς και, αν και ο ακριβής μηχανισμός αυτής της επίδρασης δεν είναι ακόμα ξεκάθαρος, η ταχύτερη ή εκσεσημασμένη βράχυνση είναι το μείζον λειτουργικό έλλειμμα που προκαλεί στένωση των αεραγωγών και συμπτώματα άσθματος.⁷⁰ Φαίνεται επομένως ότι η συμμετοχή των λείων μυϊκών ινών των αεραγωγών είναι σημαντική σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις κλινικού άσθματος. Όλα τα έως τώρα βρογχοδιασταλτικά, αποτελούν λειτουργικούς ανταγωνιστές ή άμεσους φαρμακολογικούς ανταγωνιστές των μεσολαβητών σύσπασης και δε μπορούν να αποτρέψουν το βρογχόσπασμο μετά από έντονα ερεθίσματα.

1.3.3. Βρογχική Υπεραντιδραστικότητα

Οι Alexander και Paddock περιέγραψαν πρώτοι, ήδη από το 1921, τη βρογχική υπεραντιδραστικότητα μετά από τη συστηματική χορήγηση πιλοκαρπίνης.⁷¹ Οι ασθματικοί ασθενείς συχνά εμφανίζουν έντονη βρογχική υπεραντιδραστικότητα μεγαλύτερης έντασης συγκριτικά με υγιή άτομα. Οι λείες μυϊκές ίνες των αεραγωγών αντιδρούν διαφορετικά στη φλεγμονή σε ασθενείς με άσθμα, με σημαντική διακύμανση του βαθμού και της εντόπισης του βρογχόσπασμου κατά την όψιμη φάση της αύξησης της φλεγμονής, η οποία ακολουθεί την πρόκληση με αντιγόνο.^{72,73} Αυτή η ετερογένεια του βρογχόσπασμου έχει συνδεθεί άμεσα με την απώλεια της προστατευτικής επίδρασης στους βρόγχους μετά από βαθιά εισπνοή,⁷⁴ η οποία πιθανά να αντανάκλα την ελαττωματική ανταπόκριση των λείων μυϊκών ινών των αεραγωγών στην κυκλική διαστολή τους, με αποτέλεσμα τον αυξημένο κίνδυνο καταστροφικού βρογχόσπασμου.⁷⁵ Ο δυναμικός υπεραερισμός που προκαλείται από τον ανομοιογενή βρογχόσπασμο των μεγάλων αεραγωγών πιστεύεται επίσης ότι συμβάλλει σημαντικά στην βρογχική υπεραντιδραστικότητα.⁷⁶

Τα κορτικοστεροειδή μπορούν να αντιστρέψουν αυτήν την "ελαττωματική" αντίδραση μόνο σε ήπιες μορφές της νόσου.⁷⁷ Η βρογχική υπεραντιδραστικότητα μπορεί να επιδεινωθεί με τη φλεγμονή αν και ο βασικός αιτιολογικός παράγοντάς της κληρονομείται ξεχωριστά.⁵⁴ Ο Palmer και συνεργάτες⁷⁸ παρατήρησαν ότι οι συγκέντρωση των IgE ορού, ο απόλυτος αριθμός ηωσινοφίλων αίματος και η βρογχική αντιδραστικότητα στα εισπνεόμενα βρογχοδιασταλτικά κληρονομούνταν ξεχωριστά στον άνθρωπο. Στην πραγματικότητα, η φλεγμονή συσχετίζεται ελάχιστα με τη βρογχική υπεραντιδραστικότητα. Ίσως η μεγαλύτερη παρανόηση στη βασική (ποντίκια) και εφαρμοσμένη έρευνα πάνω στο άσθμα είναι ότι η εγγενής (κληρονομούμενη) και η μέσω αντιγόνου/φλεγμονής προκαλούμενη βρογχική υπεραντιδραστικότητα προκύπτουν μέσω διαφορετικών μηχανισμών.⁷⁹

Μακροπρόθεσμες μελέτες έχουν δείξει ότι η βασική τιμή του δυναμικά εκπνεόμενου όγκου σε 1 δευτερόλεπτο (Forced expiratory volume in 1 sec, FEV₁) είναι ήδη καθορισμένη από τα πρώτα χρόνια ζωής και λίγοι είναι αυτοί οι ασθματικοί ασθενείς που παρουσιάζουν σημαντική μείωση των τιμών της.^{30,80,81} Παρ' όλα αυτά, κάποιοι ασθενείς, ιδιαίτερα εκείνοι με άσθμα έναρξης στην ενήλικη ζωή, οι καπνιστές και οι ασθματικοί με εμμένουσα, μη ελεγχόμενη, ηωσινοφιλική φλεγμονή, με βρογχική υπεραντιδραστικότητα ή επίκτητους πολυμορφισμούς του γονιδίου ADAM33, μπορεί να εμφανίσουν γρήγορη πτώση του FEV₁ και εξέλιξη σε σταθερή απόφραξη.⁸² Φαίνεται ότι τα εισπνεόμενα κορτικοστεροειδή μπορούν να μειώσουν μία εκσεσημασμένη πτώση του FEV₁, αν και κάτι τέτοιο είναι ακόμα αμφιλεγόμενο.⁸¹ Γενετικές μελέτες έχουν δείξει ότι η γενετική μεταβίβαση του FEV₁ δεν έχει κοινή γενετική βάση με τη βαρύτητα του άσθματος ή την ένταση των συμπτωμάτων.⁸³ Ο Bisgaard και συνεργάτες⁸⁴ παρατήρησαν ότι ο ρυθμός μείωσης της πνευμονικής λειτουργικότητας και η βρογχική υπεραντιδραστικότητα στα παιδιά σχετίζονται με

χαμηλότερη πνευμονική λειτουργικότητα, καθυστερημένη χρησιμοποίηση κορτικοστεροειδών για ανακούφιση των συμπτωμάτων, καπνιστική συνήθεια και θετικές δερματικές αλλεργικές δοκιμασίες, κάτι που έρχεται σε συμφωνία με την προηγηθείσα εργασία των Grol και συνεργατών.⁸¹ Στα παιδιά, η χαμηλότερη πνευμονική λειτουργικότητα και η μικρότερη αύξηση του FEV₁, σχετίζονται με μεγαλύτερη βρογχική υπεραντιδραστικότητα στην ενήλικη ζωή,⁸⁵ αν και η μοριακή βάση του ευρήματος αυτού παραμένει άγνωστη.

1.3.4. Επαναδιάταξη Αεραγωγών (Remodeling)

Οι οξείες φλεγμονώδεις νόσοι συνήθως υποχωρούν με επανορθωτικές διαδικασίες αποκατάστασης της φυσιολογικής δομής και λειτουργίας. Στο χρόνια άσθμα, η διαδικασία αυτή διαταράσσεται και η μη αποτελεσματική επανόρθωση οδηγεί στην επαναδιάταξη (remodeling) διαφόρων δομών.⁸⁶⁻⁸⁸ Η βλάβη του επιθηλιακού ιστού και η απώλεια του προστατευτικού του φραγμού, εκθέτει τις βαθύτερες δομές των αεραγωγών σε περιβαλλοντικές επιθέσεις και τόσο τα φλεγμονώδη, όσο και τα δομικά κύτταρα, παράγουν διάφορους αυξητικούς παράγοντες οι οποίοι οδηγούν σε αύξηση της αγγειογένεσης, πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών ινών, πάχυνση της βασικής μεμβράνης και ίνωση των αεραγωγών (Εικόνα 1).⁸⁶ Η αύξηση της μάζας των λείων μυϊκών ινών των αεραγωγών αυξάνει τη βρογχική υπεραντιδραστικότητα αυξάνοντας την ένταση της αντίδρασης σε ερεθίσματα που προκαλούν βρογχόσπασμο και μειώνοντας τη διάμετρο των αεραγωγών.⁸⁹ Οι παθολογικές αυτές αλλαγές στους αεραγωγούς εγκαθίστανται πρώιμα και είναι εμφανείς ήδη από την παιδική ηλικία (τόσο σε παιδιά με άσθμα καθώς και σε ατοπικά παιδιά χωρίς άσθμα).⁹⁰ Ομοίως, πιθανά αξιοσημείωτες αλλαγές επισυμβαίνουν πρώιμα και στα πνευμονικά νεύρα οι οποίες πιθανά σχετίζονται με τον

αυξημένο βήχα που παρατηρείται στο άσθμα. Ανάμεσα στις κυτταροκίνες και τα ένζυμα που παίζουν σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της επαναδιάταξης (remodeling) των αεραγωγών περιλαμβάνονται ο μετατρεπτικός αυξητικός παράγοντας β (Transforming growth factor β, TGF-β), ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (Epidermal growth factor, EGF) και οι μεταλλοπρωτεΐνες μεσοκυττάριας ουσίας.⁸⁶

Συμπερασματικά, η αλληλεπίδραση της ανοσίας, της φλεγμονής και της επαναδιάταξης των αεραγωγών (remodeling) έχει αποτελέσει κεντρικό θέμα στην έρευνα του άσθματος εδώ και δεκαετίες. Η ηωσινοφιλική φλεγμονή είναι το χαρακτηριστικό αυτό το οποίο έχει συσχετιστεί καλύτερα από οποιοδήποτε άλλο με τα συμπτώματα και την ανταπόκριση στην αγωγή, αλλά δε μπορεί από μόνη της να προκαλέσει άσθμα, το οποίο απουσιάζει στην ατοπία, την ηωσινοφιλική βρογχίτιδα και τη νόσο Crohn (στην οποία επίσης εμφανίζεται φλεγμονή των αεραγωγών).⁹¹ Ομοίως, η αλλεργική ρινίτιδα με έκθεση σε αλλεργιογόνα προκαλεί παθολογικές αλλαγές στους αεραγωγούς παρόμοιες με αυτές του άσθματος και την απελευθέρωση κυτταροκινών χωρίς την εμφάνιση άσθματος,⁵⁰ ενώ τα αντισώματα αντι-ιντερλευκίνης 5 φαίνεται να είναι αποτελεσματικά αλλά μόνο σε μία υποομάδα ασθενών με υψηλό ηωσινοφιλικό φορτίο. Η ηωσινοφιλία των πνευμόνων αποτελεί ένα χρήσιμο βιολογικό δείκτη για την εκτίμηση της ανταπόκρισης στα κορτικοστεροειδή ενώ μειωμένος αριθμός ηωσινοφίλων μειώνει τον κίνδυνο παροξύνσεων. Η φλεγμονή στο άσθμα είναι ετερογενής. Τα κορτικοστεροειδή έχουν μικρή δράση στο πολυμορφοπυρηνικό άσθμα ενώ η βασική ηωσινοφιλία προβλέπει τη δράση των κορτικοστεροειδών.⁹²

1.3.5. Νέοι Παθογενετικοί Μηχανισμοί Άσθματος

Το άσθμα έχει ένα κληρονομούμενο κομμάτι το οποίο υπολογίζεται στο 36% με 94%. Περισσότερα από 100 υποψήφια γονίδια έχουν προταθεί, αλλά το καθένα έχει πολύ χαμηλό αποδοτέο κίνδυνο (<5%) με συχνά χαμηλή επαναληψιμότητα⁹³ ή έλλειψη σαφούς βιολογίας ή ενός λειτουργικού νουκλεοτιδικού πολυμορφισμού. Έχουν προκύψει επομένως δύο νέες θεωρίες: η αυτό-εγγενής ανοσία ως αποτέλεσμα ιστικής βλάβης και η τύπου Th2 ανταπόκριση χωρίς τη συμμετοχή T κυττάρων.

Μέχρι πρόσφατα, η εγγενής ανοσία θεωρούνταν ως μία άμεση και γρήγορη πρώτη γραμμή άμυνα ενάντια στις λοιμώξεις. Συγκεκριμένα, μετά την αναγνώριση μοριακών προτύπων σχετιζόμενων με το παθογόνο (Pathogen associated molecular patterns, PAMPs), ενεργοποιείται η άμυνα του ξενιστή. Παρ' όλα αυτά, ενδογενείς μεσολαβητές οι οποίοι απελευθερώνονται από μοριακά πρότυπα σχετιζόμενα με την περιοχή της βλάβης (Damage associated molecular patterns, DAMPs) αποτελούν πολύ σημαντικούς ενεργοποιητές της εγγενούς ανοσίας. Όπως οι PAMPs, έτσι και οι DAMPs συχνά χρησιμοποιούν το σύστημα των toll-like υποδοχέων ώστε να προάγουν άμεσα τη φλεγμονή. Η εγγενής ανοσία είναι ανθεκτική στα κορτικοστεροειδή,⁹⁴ το οποίο θα μπορούσε να εξηγήσει το γεγονός ότι όσο επιδεινώνεται η βαρύτητα του άσθματος τόσο μειώνεται η ευαισθησία στα κορτικοστεροειδή. Οπότε, σύμφωνα με τη θεωρία αυτή, όποτε τα DAMPs και η εγγενής ανοσία συμβάλλουν στη νόσο, η διαδικασία θα είναι εγγενώς ανθεκτική στα κορτικοστεροειδή, το οποίο θα μπορούσε να εξηγήσει το γεγονός ότι οι ενδότυποι του πιο σοβαρού άσθματος με εγκατεστημένη την ιστική βλάβη είναι ανθεκτικοί στα κορτικοστεροειδή. Επιπλέον, η κύρια πηγή μεσολαβητών για αυτήν την αυτο-εγγενή ανοσία είναι οι τραυματισμένοι ιστοί, οι οποίοι απομακρύνονται συνήθως από τα μακροφάγα. Παρ' όλα αυτά, όσο επιδεινώνεται το οξειδωτικό στρες (με τη βαρύτητα

της νόσου ή το κάπνισμα), τόσο μειώνεται η ικανότητα των μακροφάγων να αναγνωρίσουν και να απομακρύνουν τα εξασθενημένα κύτταρα, οδηγώντας έτσι σε πολύ μεγαλύτερη διασπορά των DAMPs.⁹⁵

Μία δεύτερη σημαντική θεωρία που έχει προκύψει είναι ότι υπάρχουν μηχανισμοί που προάγουν τύπου Th2 επιδράσεις ενώ απουσιάζουν τα Th2 κύτταρα, κάτι το οποίο πιθανά εξηγεί το γεγονός ότι η ιντερλευκίνη 13 σχετίζεται ισχυρά με πολλούς διαφορετικούς ενδότυπους άσθματος. Και στις δύο περιπτώσεις, η παρουσία αυτών των οδών είναι πιθανά μία ένδειξη φυλογενετικής εξέλιξης στην αργέγονη εγγενή ανοσία, ενώ πολλές από τις δρώσες κυτταροκίνες είναι προγενέστερες των λεμφοκυττάρων και των κορτικοστεροειδών κατά εκατομμύρια χρόνια.

Η ιντερλευκίνη 17 αποτελεί έναν έμμεσο μεσολαβητή παρατεταμένης πολυμορφοποιητικής φλεγμονής.^{96,97} Από πρόσφατα στοιχεία φαίνεται ότι η ιντερλευκίνη 17 αποτελεί μεσολαβητή στο πολυμορφοποιητικό άσθμα.⁹⁸ Έχει αναγνωρισθεί επίσης μία υποομάδα T κυτάρων, τα Th17, αν και η παραγωγή της ομάδας των ιντερλευκινών 17 δεν περιορίζεται μόνο στα T κύτταρα. Η διαφοροποίηση των Th17 εξαρτάται από τους ρετινοειδικούς υποδοχείς RORα (Retinoid-related orphan receptor alpha) και RORγ (Retinoid-related orphan receptor gamma), εμπλέκοντας τη διατροφή και το μεταβολισμό λιπιδίων,⁹⁹ και από τους ενδιάμεσους σημαντές STAT3 και STAT4 (Signal transducer and activator of transcription).¹⁰⁰ Η ιντερλευκίνη 17 προάγεται στον άνθρωπο από την ιντερλευκίνη 23, η οποία σχετίζεται με την ιντερλευκίνη 12 (έναν αρνητικό ρυθμιστή της Th2 ανοσίας), ιδιαίτερα μέσα στο πλαίσιο των ιντερλευκινών 1β και 6 καθώς και του παράγοντα αύξησης του όγκου β (Tumour growth factor β, TGF-β). Αυτή η αλληλεπίδραση είναι σημαντική γιατί ο TGF-β και η ιντερλευκίνη 6 ασκούν αντιρροπιστικό έλεγχο στα ρυθμιστικά T κυττάρων (Tregs) με αποτέλεσμα την

καταστολή της φλεγμονής, υποδεικνύοντας τη λεπτή ισορροπία ανάμεσα στην καταστολή της φλεγμονής και τη νόσο.^{98,101,102}

Τα δενδριτικά κύτταρα "ισορροπούν" ανάμεσα στην εγγενή και την επίκτητη ανοσία και είναι απαραίτητα τόσο για την προώθηση όσο και για τη διατήρηση της αλλεργικής φλεγμονής. Η ταυτόχρονη ενεργοποίηση των δενδριτικών κυττάρων από το αντιγόνο παρουσία του παράγοντα των βλαστικών κυττάρων (Stem cell factor, SCF), έναν ισχυρό αυξητικό παράγοντα των μαστοκυττάρων, προάγει τη σταθερή παραγωγή ιντερλευκίνης 6, ενεργοποιώντας την ταυτόχρονη προαγωγή των Th2 και Th17 μέσω του c-kit υποδοχέα (CD117), του υποδοχέα δηλαδή του SCF.¹⁰³ Επίσης, ο αυξητικός παράγοντας των βλαστικών κυττάρων (Stem cell growth factor, SCGF) εμπλέκεται στη διήθηση των λείων μυϊκών ινών των αεραγωγών από μαστοκύτταρα, με αποτέλεσμα νεότερα σκευάσματα (π.χ. imatinib mesylate - Gleevec), τα οποία μπλοκάρουν την κινάση του c-kit υποδοχέα, να αναδεικνύονται ιδιαίτερα χρήσιμα σε ορισμένους ενδότυπους άσθματος, ιδίως σε αυτούς όπου εμπλέκονται τα μαστοκύτταρα.

Η ιογενής βρογχολίτιδα στη βρεφική ηλικία, ιδιαίτερα από τον αναπνευστικό συγκυτιακό ιό (RSV), αποτελεί παράγοντα κινδύνου για εμμένον άσθμα. Στα ποντίκια, παρόμοια έκθεση οδηγεί σε χρόνια φλεγμονή και φαινοτυπική αλλαγή των πνευμόνων. Ο Kim και συνεργάτες¹⁰⁴ ανακάλυψαν ότι η ενεργοποίηση των μακροφάγων από τα CD1d-natural killer T (NKT) κύτταρα προκαλεί την παραγωγή ιντερλευκίνης 13 με τα παθολογικά επακόλουθά της ανεξάρτητα από την επίκτητη ανοσία. Αυτός ο μηχανισμός εμφανίζεται τόσο στο άσθμα όσο και τη ΧΑΠ,¹⁰⁴ και ορίζει έναν ανεξάρτητο ενδότυπο επίκτητης ανοσίας (από T κύτταρα). Το κάπνισμα επιδεινώνει άμεσα και ουσιαστικά την ιογενή φλεγμονή και την επαναδιάταξη των αεραγωγών (remodeling).^{105,106}

Οι πολυμορφισμοί της ιντερλευκίνης 18 έχουν αναπαραχθεί σε αρκετές γενετικές μελέτες. Αυτή η κυτταροκίνη είναι γνωστό ότι προάγει την παραγωγή των IgE μέσω της αυξητικής ρύθμισης του μορίου CD40 και της ιντερλευκίνης 4 από τα NKT κύτταρα. Η ιντερλευκίνη 18, η οποία προάγει την παραγωγή της ιντερφερόνης γ, έχει εμπλακεί σε διεργασίες που σχετίζονται με την πολυμορφοπυρηνική και τη μικτή φλεγμονή. Συγκεκριμένα, η εξωγενής ιντερλευκίνη 18 ενεργοποιεί τα παριστάμενα κύτταρα μνήμης, τον τύπο των κυττάρων τα οποία αντανακλούν παλαιές ιογενείς λοιμώξεις, για την απελευθέρωση όχι μόνο ιντερφερόνης γ, η οποία προκαλεί πολυμορφοπυρήνωση, αλλά και ιντερλευκίνης 13, προκαλώντας έτσι την επαναδιάταξη των αεραγωγών (remodeling).¹⁰⁷ Ο μηχανισμός αυτός μπορεί να σχετίζεται με τους ασθματικούς ενδότυπους στους οποίους οι υποτροπιάζουσες λοιμώξεις οδηγούν σε επιτάχυνση της πτώσης της πνευμονικής λειτουργικότητας ή στους οποίους εμφανίζεται εκτεταμένη πολυμορφοπυρήνωση. Παρ' όλα αυτά, είναι ακόμα αμφιλεγόμενος ο ρόλος των NKT κυττάρων στο άσθμα, τα οποία έχουν συνδεθεί με αλλεργικούς (μέσω της ιντερλευκίνης 4) και πολυμορφοπυρηνικούς (μέσω της ιντερλευκίνης 17) ενδότυπους.

Η ιντερλευκίνη 33 αποτελεί μία κυτταροκίνη τύπου ιντερλευκίνης 1, η οποία αρχικά αναγνωρίστηκε ως η ουσία πρόσδεσης στον υποδοχέα T1/ST2, ο οποίος κατά προτίμηση εκφράζεται πάνω στα Th2 κύτταρα. Παρ' όλα αυτά, η ιντερλευκίνη 33 προκαλεί βρογχική υπεραντιδραστικότητα, υπερπλασία των αδενικών επιθηλιακών κυττάρων και ηωσινοφιλική φλεγμονή μέσω της ST2 πρόσδεσης και μέσω της εγγενούς ανοσίας ταυτόχρονα με την προώθηση της παραγωγής ιντερλευκίνης 4, 5 και 13. Τα παραπάνω υποδεικνύουν ότι οι παθολογικές αλλαγές που μιμούνται την Th2 ανοσία μπορούν να προκληθούν χωρίς την παρουσία επίκτητης ανοσίας, ορίζοντας με αυτόν τον τρόπο ένα δεύτερο, επίκτητο, ανοσολογικό ενδότυπο.¹⁰⁸

Η λοίμωξη από το ρινοϊό αποτελεί τη βασική αιτία παροξύνσεων άσθματος. Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι οι ασθματικοί ασθενείς δεν εμφανίζουν πιο συχνά λοιμώξεις αλλά πιο σοβαρή φλεγμονή. Οι ασθενείς αυτοί επίσης υπερεκφράζουν τον υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (Epidermal growth factor receptor, EGFR). Ο Liu και συνεργάτες¹⁰⁹ ανακάλυψαν ένα νέο μηχανισμό καθορισμού της έντασης της φλεγμονώδους απάντησης στη λοίμωξη από ρινοϊό. Ο ρινοϊός προσδένεται στο ενδοκυττάριο μόριο πρόσδεσης 1 (Inter-cellular adhesion molecule 1, ICAM-1), προάγοντας την αυξητική ρύθμιση του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (Epidermal growth factor, EGF) και πυροδοτώντας μία φλεγμονώδη απάντηση στο μολυσμένο κύτταρο. Υπό την παρουσία αυξημένης μεταλλοπρωτεϊνάσης της μεσοκυττάριας ουσίας, ο πλεονάζων EGF απομακρύνεται από την επιφάνεια του κυττάρου και προσδένεται στον EGFR, στέλνοντας σήμα μέσω των εξωκυττάριας κινασών ERKs (Extracellular signal-regulated kinases), οι οποίες σε συνέργεια με την άμεση αντίδραση στη λοίμωξη από ρινοϊό, ενισχύουν σημαντικά τη φλεγμονή.¹⁰⁹ Αυτός ο μηχανισμός αποτελεί παράδειγμα του πως ένα υποψήφιο γονίδιο άσθματος (μεταλλοπρωτεϊνάση μεσοκυττάριας χώρας) με ασθενή αποδοτέο κίνδυνο μπορεί να εξασκήσει μία ισχυρότερη επίδραση μέσα στο πλαίσιο μίας παραλλαγμένης νόσου. Επίσης, επειδή ο EGFR μεσολαβεί και στην παραγωγή βλέννης, τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν τη χρησιμότητα των αναστολέων της EGFR-τυροσινικής κινάσης (π.χ. gefitinib ή erlotinib) ή αντισώματα/αναστολείς έναντι του υποδοχέα 2 του EGF σε ορισμένους ενδότυπους άσθματος. Παρ' όλα αυτά, δεν είναι ακόμα γνωστό εάν ο EGFR επηρεάζει την οδό CD200 των μακροφάγων, η οποία περιορίζει την ιογενή φλεγμονή.¹¹⁰

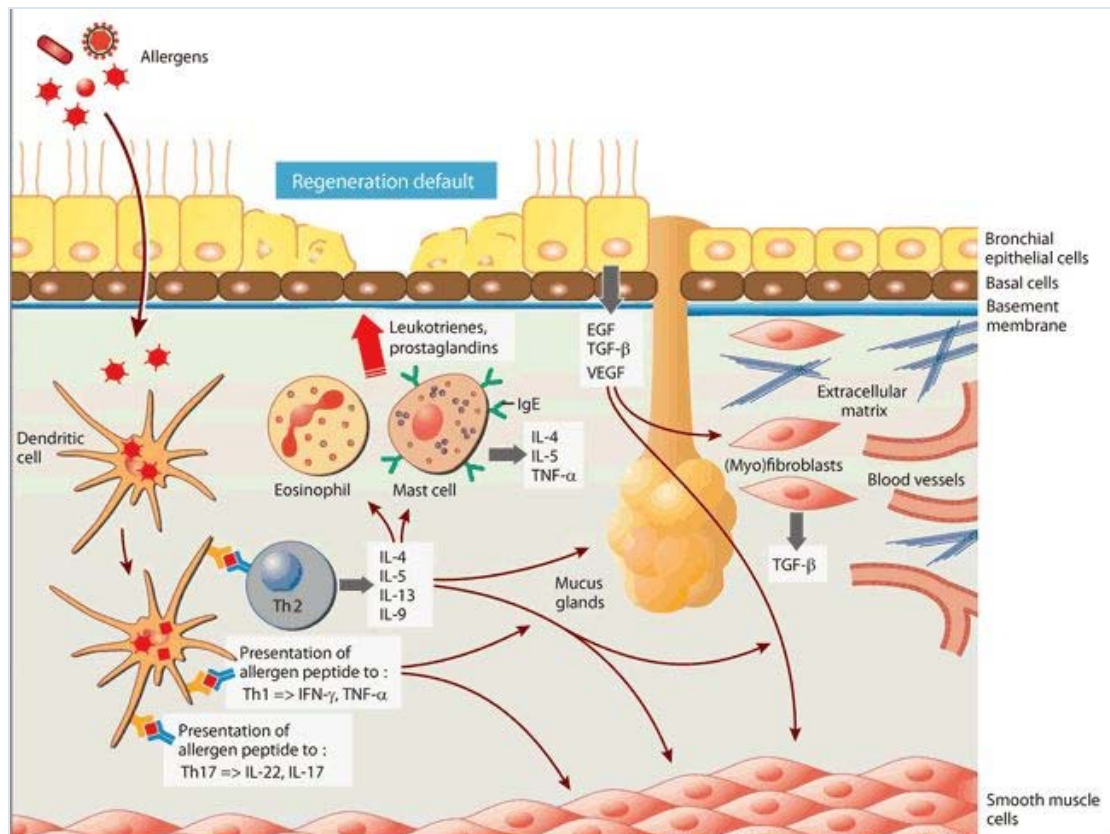
Ο ρόλος των μακροφάγων στο άσθμα πιθανά έχει υποεκτιμηθεί σε μεγάλο βαθμό ενώ η κυτταρική αυτή σειρά ερευνάται όλο και περισσότερο, όσο

αναδεικνύεται ο ρόλος της εγγενούς ανοσίας. Τα μακροφάγα δεν υπόκεινται πάντα στον κλασσικό τρόπο ενεργοποίησης, αλλά μπορούν να υιοθετήσουν και εναλλακτικούς φαινότυπους^{111,112} οι οποίοι σχετίζονται με σημαντικές διεργασίες, όπως είναι για παράδειγμα η προαγωγή των χυτινασών AMCases (Acidic mammalian chitinases), οι οποίες συνδέονται με τη βαρύτητα του άσθματος.¹¹³ Επίσης, ειδικά μακροφάγα αποτελούν τα κύρια υποψήφια κύτταρα για εκείνους τους ενδότυπους άσθματος στους οποίους δε συμμετέχουν τα T κύτταρα.

Το μεγαλύτερο μέρος των στοιχείων για την υπόθεση ότι εναλλακτικά καθορισμένα μακροφάγα μπορούν να επιτύχουν τις επιδράσεις αυτές προέρχεται από γενετικά παραλλαγμένα ποντίκια. Το SHIP-1 (SH2-containing inositol phosphatase) αποτελεί έναν αρνητικό ρυθμιστή (δηλ. αναστολέα) των φλεγμονωδών κυτταροκινών και της σήμανσης μέσω υποδοχέων επιφανείας. Η ανεπάρκεια του SHIP-1 προκαλεί αυθόρμητα άσθμα σε ποντίκια με τύπου-Th2 πρότυπο,¹¹⁴⁻¹¹⁶ συμπεριλαμβανομένης και της προαγωγής των AMCases.¹¹³ Παρομοίως, σε ποντίκια με ενεργοποιημένη την κινάση Hck (Hemopoietic cell kinase, μία κινάση της οικογένειας Src), αναπτύσσονται μία επιθετική ηωσινοφιλική φλεγμονή στους πνεύμονες η οποία σχετίζεται με προοδευτική ίνωση και είναι ανεξάρτητη από τα T κύτταρα.¹¹⁵⁻¹¹⁷ Η κινάση Lyn σχετίζεται με την Hck. Ένα βαρύ σύνδρομο σοβαρού άσθματος αναπτύσσεται σε ποντίκια με ανεπάρκεια της κινάσης Lyn το οποίο χαρακτηρίζεται από αύξηση των IgE, σημαντικό βρογχόσπασμο, αποκοκκιοποίηση των μαστοκυττάρων και των ηωσινοφίλων, πολύ σημαντική φλεγμονή, η οποία σχετίζεται με ανεπαρκή απόπτωση, και παρούσα κυτταροκινών τύπου Th2 με αυξημένη ιντερφερόνη γ .¹¹⁸

Βιοχημικά, η εναλλακτική ενεργοποίηση των μακροφάγων έχει συνδεθεί με τον παράγοντα νέκρωσης του όγκου β (Tumour necrosis factor β , TNF- β) και την ιντερλευκίνη 13.¹¹¹ Μιας και οι διεργασίες αυτές μπορούν να συμβούν και υπό την

πλήρη έλλειψη των T κυττάρων, η ιντερλευκίνη 13 πιθανά εξασκεί τη δράση της μέσω του τύπου II υποδοχέα της ιντερλευκίνης 4.¹¹⁹ Τα ευρήματα αυτά πιθανόν εξηγούν το γεγονός ότι η ιντερλευκίνη 13 αποτελεί υποψήφιο γονίδιο τόσο για το άσθμα όσο και για τη ΧΑΠ.¹²⁰



Εικόνα 1. Παθοφυσιολογικοί οδοί οι οποίοι οδηγούν σε βρογχική φλεγμονή και επαναδιάταξη των αεραγωγών (remodeling) μετά από επαναλαμβανόμενη ή χρόνια έκθεση σε αλλεργιογόνα. Μετά την πρόσδεση και την επεξεργασία του αλλεργιογόνου (allergen) από τα δενδριτικά κύτταρα (dendritic cell), τα πεπτίδια του αλλεργιογόνου (allergen peptide) παρουσιάζονται κυρίως μέσω του Μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας τάξης II (Major histocompatibility complex class II, MHC-II) στα Th2 T κύτταρα, και λιγότερο στα Th1 και Th17 T κύτταρα, προάγοντας την έκκριση των Th2, Th1 και Th17 T κυτταροκινών. Σε συνδυασμό με την παράλληλη ενεργοποίηση των μαστοκυττάρων (mast cell) από τις ειδικές για το αλλεργιογόνο IgE και τη συνεχιζόμενη έκθεση στο αλλεργιογόνο, τα ηωσινόφιλα (eosinophil) μεταναστεύουν από την κυκλοφορία του αίματος στο βλεννογόνο του κατώτερου αναπνευστικού συστήματος, όπου προάγουν την ιστική βλάβη του βρογχικού επιθηλίου (bronchial epithelial cells) μέσω της έκκρισης κυτταροτοξικών

ουσιών καθώς και λευκοτριενίων (leukotrienes) και προσταγλαδινών (prostaglandins). Η διαταραγμένη αναγέννηση (regeneration default) του βρογχικού επιθηλίου αποτελεί χαρακτηριστικό του άσθματος, το οποίο συνδέεται με την ανεξέλεγκτη έκκριση του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (Epidermal growth factor, EGF) και του μετατρεπτικού αυξητικού παράγοντα β (Transforming growth factor β, TGF-β) καθώς και την ενεργοποίηση των υποεπιθηλιακών μυοϊνοβλαστών (myofibroblasts). Η Th2 και Th1, μέσω κυτταροκινών, χρόνια φλεγμονή σε συνδυασμό με την ενεργοποίηση των μυοϊνοβλαστών και του επιθηλίου, έχει ως αποτέλεσμα την επαναδιάταξη των αεραγωγών (bronchial remodeling), η οποία χαρακτηρίζεται (δεξιά πλευρά της εικόνας) από την πάχυνση της βασικής μεμβράνης (basement membrane), τον πολλαπλασιασμό των αγγείων (blood vessels) του βλεννογόνου, την εναπόθεση εξωκυττάρων πρωτεϊνών μεσοκυττάριας ουσίας (extracellular matrix proteins), τη διέγερση των βλεννοπαραγωγών αδένων (mucus glands), τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών ινών (smooth muscle cells) και των μυοϊνοβλαστών, την ελαττωματική αναγέννηση του επιθηλίου και την επακόλουθη ατροφία του.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΣΘΜΑΤΟΣ

Η ανίχνευση του γονιδιώματος με την κλασική προσέγγιση της μελέτης σύνδεσης (linkage analysis) και της λεπτομερούς χαρτογράφησης (fine mapping) υποδεικνύουν ότι η προδιάθεση για άσθμα καθορίζεται από πολλά γονίδια.¹²¹⁻¹²⁴ Πρόσφατες προσπάθειες αποκρυπτογράφησης της γενετικής βάσης του άσθματος βασίστηκαν σε ειδικούς ενδιάμεσους φαινότυπους, όπως η βρογχική υπεραντιδραστικότητα, τα επίπεδα των ε ανοσοσφαιρινών ορού (IgE) και η ατοπία. Τα χαρακτηριστικά αυτά θεωρείται ότι αντιστοιχούν σε υποκατηγορίες ασθενών με ξεχωριστούς τύπους άσθματος ή προδιάθεσης για την ανάπτυξη άσθματος και έχουν χρησιμοποιηθεί για τη διευκόλυνση της αναγνώρισης των πολλαπλών γονιδίων που εμπλέκονται σε αυτήν τη σύνθετη νόσο.

Μελέτες οικογενειών (familial aggregation studies) και μελέτες διδύμων έχουν δείξει ότι υπάρχει ένα μείζον γενετικό στοιχείο για την ανάπτυξη άσθματος. Πολλές από τις μελέτες αυτές έχουν εξετάσει έως τώρα τον επιπολασμό της νόσου ανάμεσα στους συγγενείς ασθματικών ατόμων έναντι οικογενειών ελέγχου (control groups) για να καθορίσουν τον κίνδυνο που σχετίζεται με την κληρονομικότητα. Ήδη από το 1952, ο Schwartz¹²⁵ έδειξε ότι οι συγγενείς ασθματικών ατόμων είχαν αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης της νόσου αναφέροντας ότι ο επιπολασμός άσθματος κυμαινόταν στο 6,6% στους συγγενείς ασθματικών ατόμων έναντι 1% στην ομάδα ελέγχου. Σε μία μελέτη 80 ασθματικών παιδιών και υγιών ατόμων, ο επιπολασμός άσθματος (ατοπικού και μη ατοπικού) στους συγγενείς πρώτου βαθμού ήταν 13% για τα ασθματικά άτομα και 4% για την ομάδα ελέγχου.¹²⁶ Εξαιτίας του διαφορετικού ορισμού για το άσθμα καθώς και της ετερογένειας των πληθυσμών που έχουν μελετηθεί έως τώρα, ο σχετικός κίνδυνος που αποδίδεται στο θετικό οικογενειακό ιστορικό άσθματος ποικίλλει. Παρ' όλα αυτά, έχει φανεί ξεκάθαρα μεγαλύτερη επίπτωση σε συγκεκριμένες οικογένειες της βρογχικής υπεραντιδραστικότητας, των

αυξημένων επιπέδων των ηωσινοφίλων και των IgE ορού καθώς και της ατοπίας. Παρ' όλα αυτά, καθένας από τους υποτύπους αυτούς κληρονομείται με διαφορετικό τρόπο, υποδεικνύοντας με αυτόν τον τρόπο ότι οι ενδιάμεσοι αυτοί φαινότυποι αντιπροσωπεύουν διαφορετικές παθοφυσιολογικές διεργασίες.^{127,128}

Τα αποτελέσματα σχετικά με την κληρονομικότητα του άσθματος στις μελέτες οικογενειών επιβεβαιώθηκαν και σε μελέτες διδύμων. Η μελέτη μονοζυγωτικών και διζυγωτικών διδύμων επιτρέπει στους ερευνητές να διαχωρίσουν την επίδραση των κοινών περιβαλλοντικών παραγόντων από την επίδραση των γενετικών παραγόντων στην ανάπτυξη του άσθματος. Σε μία μεγάλη μελέτη 7.000 διδύμων από τον Edfors-Lubs, βρέθηκε ότι η παράλληλη εμφάνιση άσθματος ήταν 19% ανάμεσα σε μονοζυγωτικά δίδυμα και 4% ανάμεσα σε διζυγωτικά δίδυμα.¹²⁹ Η σπουδαιότητα των γενετικών παραγόντων και η απουσία στοιχείων υποστήριξης της επίδρασης κοινού περιβάλλοντος φάνηκε σε μία μελέτη διδύμων στη Νορβηγία, στην οποία το 75% της διακύμανσης της προδιάθεσης για άσθμα οφειλόταν σε γενετικούς παράγοντες.¹³⁰ Συγκρίσιμα αποτελέσματα προέκυψαν και από διάφορους άλλους πληθυσμούς διδύμων με διακύμανση της κληρονομικότητας από 35% έως 80%.¹³¹⁻¹³³

Η Tucson Children's Respiratory Study, μία μεγάλη μακρόχρονη μελέτη η οποία διερεύνησε τους παράγοντες κινδύνου για το άσθμα, βρήκε ότι η συσχέτιση του δυναμικά εκπνεόμενου όγκου σε 1 δευτερόλεπτο (Forced expiratory volume in 1 second, FEV₁) σε οικογένειες με ή χωρίς άσθμα είχε ισχυρή οικογενειακή συνιστώσα και ακολουθούσε πολυγονιδιακό τρόπο κληρονομικότητας.¹³⁴ Επίσης, βρέθηκε ότι υπάρχει μητρική επιρροή στη γενετική μεταβίβαση της τιμής του FEV₁ στις οικογένειες με άσθμα.¹³⁴ Επίσης, ερευνήθηκε ο τρόπος μεταβίβασης των επιπέδων των ηωσινοφίλων και βρέθηκε ότι η ηωσινοφιλία είχε πολυγονιδιακό τρόπο κληρονομικότητας ενώ δεν υπήρχε επίδραση της μητέρας στον τρόπο μεταβίβασης.¹³⁵

Έως σήμερα σε διάφορες μελέτες σύνδεσης (linkage studies) έχουν αναγνωρισθεί δείκτες και υποψήφια γονίδια που επιδεικνύουν σύνδεση ή συσχέτιση με το άσθμα ή τους ενδιάμεσους φαινοτύπους του σχεδόν σε όλα τα χρωμοσώματα (Εικόνα 1). Η ακριβής αναγνώριση των γενετικών τόπων που εμπλέκονται στην παθογένεια του άσθματος ήταν δύσκολη αλλά σημαντικοί γενετικοί τόποι πιστεύεται ότι εντοπίζονται στα χρωμοσώματα 5q,¹³⁶ 11q¹³⁷ και 12q.¹³⁸ Η κλασσική μέθοδος της κλωνοποίησης κατά θέση (positional cloning) οδήγησε στην αναγνώριση νέων γονιδίων δυνητικά σημαντικών στα χρωμοσώματα 14q και 20p.^{139,140} Μελέτες πολυμορφικής ποικιλομορφίας (polymorphic variation)^{136-138,141-143} ανάμεσα σε γονίδια που πιθανά εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία της νόσου, έχουν αναγνωρίσει επίσης έναν αριθμό υποψήφιων γονιδίων σε διάφορα χρωμοσώματα τα οποία θα μπορούσαν να επηρεάσουν τον κίνδυνο εμφάνισης άσθματος. Μερικές από τις περιοχές που πιθανά σχετίζονται με τον ασθματικό φαινότυπο περιγράφονται παρακάτω.

Μακρό Σκέλος Χρωμοσώματος 5 (5q)

Πρόκειται για περιοχή με ιδιαίτερο ενδιαφέρον εστιασμένο κυρίως στο τμήμα 5q31-33, το οποίο περιέχει πολλά γονίδια προδιάθεσης στο άσθμα, τα οποία κωδικοποιούν κυτταροκίνες (ιντερλευκίνη 3, 4, 5, 6, 9, 12 και 13) και αυξητικούς παράγοντες (αυξητικός παράγοντας του όγκου β1 – tumour growth factor β1, αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών 1 – fibroblast growth factor 1), οι οποίοι διαδραματίζουν κυρίαρχο ρόλο στην εμφάνιση και ανάπτυξη της φλεγμονώδους αντίδρασης. Ο Meyers και συνάδελφοι¹⁴⁴ επαλήθευσαν τη σημασία της ομάδας αυτής των Th2 κυτταροκινών και επιβεβαίωσαν τη σύνδεση αρκετών δεικτών της περιοχής 5q31-33 με την ατοπία, τη βρογχική υπεραντιδραστικότητα και το άσθμα. Η περιοχή

του 5q που κωδικοποιεί τον β₂ αδρενεργικό υποδοχέα έχει συσχετιστεί με το άσθμα και τους σχετικούς με αυτό φαινότυπους σε αρκετές μελέτες διαφορετικών πληθυσμών, όπως π.χ. Κίνα, Αυστραλία, Αγγλία, Ιαπωνία και ΗΠΑ.¹⁴⁵⁻¹⁵⁰ Μία μελέτη παιδιών στην Ολλανδία έδειξε ότι τα υψηλά επίπεδα των IgE ορού κληρονομούνται μαζί με τη βρογχική υπεραντιδραστικότητα και τα χαρακτηριστικά αυτά συνδέθηκαν με μία περιοχή του χρωμοσώματος 5.¹⁵¹ Η πρώτη μεγάλη μελέτη της περιοχής 5q31-33 πραγματοποιήθηκε από την Επιτροπή για τη Γενετική του Άσθματος (Consortium On Asthma Genetics, COAG),¹⁵² η οποία ανέλυσε τα αποτελέσματα ερευνών σε 1070 οικογένειες από 11 κέντρα παγκοσμίως και βρήκε συσχέτιση συγκεκριμένων γενετικών τόπων της περιοχής αυτής με την προδιάθεση για την εμφάνιση άσθματος ή ατοπίας. Επομένως, η περιοχή αυτή παραμένει ίσως η περιοχή με την καλύτερα αποδεδειγμένη σύνδεση με τον ατοπικό και ασθματικό φαινότυπο.

Βραχύ Σκέλος Χρωμοσώματος 6 (6p)

Η περιοχή 6p21-22 περιέχει μερικά από τα γονίδια του Μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (Major histocompatibility complex, MHC), το οποίο παίζει σημαντικό ρόλο στην ανοσολογική απάντηση καθώς τα μόρια της τάξης II του συστήματος HLA συνδέονται με τα προερχόμενα από το αλλεργιογόνο πεπτίδια και τα παρουσιάζουν στα T-λεμφοκύτταρα μέσω του T-λεμφοκυτταρικού υποδοχέα (T-cell receptor, TCR). Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των γονιδίων των μορίων του συστήματος HLA II, του TCR και της αντίδρασης μέσω IgE μετά από έκθεση σε αλλεργιογόνο. Επίσης, γονίδια του παράγοντα νέκρωσης του όγκου τύπου α (Tumour necrosis factor α, TNF-α) βρίσκονται στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 6.^{123,153,154} Η περιοχή 6p21

(περιοχή συστήματος HLA-D) συνδέθηκε από τον Hizawa με την ειδική IgE στο αλλεργιογόνο *Dermatophagoides pteronyssinus*.¹⁵⁵ Η σχέση της περιοχής 6p και ο πιθανός τρόπος με τον οποίο συντελεί στην ανάπτυξη της IgE αντίδρασης μετά από έκθεση σε αλλεργιογόνο συνεχίζει να ερευνάται.

Μακρό Σκέλος Χρωμοσώματος 11 (11q)

Για πρώτη φορά το 1989 ο Cookson και συνάδελφοι¹⁵⁶ συνέδεσαν την περιοχή 11q13 με την ατοπία και συγκεκριμένα με την αύξηση των IgE και/ή με την αύξηση των ειδικών IgE έναντι κοινών αλλεργιογόνων και/ή με θετικά prick tests σε αλλεργιογόνα. Στη συνέχεια η συσχέτιση αυτή αναδείχτηκε πολλές φορές και από άλλες μελέτες.^{145,149,157-160} Η περιοχή 11q13 περιέχει υποψήφια γονίδια άσθματος, όπως την εκκριτική πρωτεΐνη των κυττάρων Clara (Clara cell secretory protein, CCSP), η οποία δρα προστατευτικά στο βρογχικό επιθήλιο, και την β υποομάδα του υψηλής συγγένειας υποδοχέα των IgE (FcεRI-β), η οποία συνδέθηκε κυρίως με τα επίπεδα των ειδικών IgE έναντι κοινών αλλεργιογόνων αλλά όχι με τα επίπεδα της ολικής IgE.^{161,162}

Μακρό Σκέλος Χρωμοσώματος 12 (12q)

Το μακρό σκέλος του χρωμοσώματος 12 φαίνεται επίσης ότι συγκεντρώνει αρκετά υποψήφια γονίδια τα οποία πιθανά συμμετέχουν στη παθογένεια του άσθματος. Συγκεκριμένα, η περιοχή 12q14-24 περιέχει γονίδια της ιντερφερόνης γ (IFN-γ), του Insulin-like growth factor 1 (IGF-1), της S-γλουταθειονικής τρανσφεράσης (Glutathione S-transferase, GST), της συνθετάσης 1 του νιτρικού οξειδίου (Nitric oxide synthase 1, NOS-1), της υδρολάσης-A4 των λευκοτριενίων

(Leukotriene A4 hydrolase, LTA4H) και του αυξητικού παράγοντα των μαστοκυττάρων (Mast cell growth factor, MGF).^{138,163-166} Έτσι η περιοχή 12q, όπως και η περιοχή του χρωμοσώματος 5, αποτελεί αντικείμενο έρευνας της διεθνούς πολυκεντρικής μελέτης της Επιτροπής της Γενετικής του Ασθματος (COAG).

Μακρό Σκέλος Χρωμοσώματος 13 (13q)

Η περιοχή 13q14 έχει επανειλημμένα συνδεθεί με την ατοπία και τα υψηλά επίπεδα των IgE.^{121,124} Ο Cookson και συνεργάτες,¹⁶⁷ βρήκαν ισχυρή συσχέτιση ενός νέου μικροδορυφορικού δείκτη, του USAT24G1, με τα υψηλά επίπεδα των IgE και στη συνέχεια χαρτογράφησαν στην περιοχή αυτή ένα νέο γονίδιο, το PHF11, του οποίου η λειτουργία δεν είναι επακριβώς γνωστή, φαίνεται όμως ότι παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της σύνθεσης των ανοσοσφαιρινών και των επιπέδων των IgE.¹⁶⁸

Μακρό Σκέλος Χρωμοσώματος 14 (14q)

Στην περιοχή 14q11-13 περιέχονται τα γονίδια για τις υποομάδες του υποδοχέα των T κυττάρων, όπως για παράδειγμα το α/δ τμήμα του υποδοχέα TCR.¹⁴³ Ο Moffat, σε μελέτη που έκανε σε οικογένειες από την Αυστραλία και τη Μεγάλη Βρετανία, βρήκε σύνδεση της περιοχής αυτής με την ειδική IgE στο αλλεργιογόνο *Dermatophagoides pteronyssinus*.¹⁴³

Μακρό Σκέλος Χρωμοσώματος 16 (16q)

Στην περιοχή αυτή περιέχεται το γονίδιο για την υποομάδα α του υποδοχέα της ιντερλευκίνης 4 (Interleukin-4R α), το οποίο αποτελεί γνωστό γονίδιο ατοπίας

και άσθματος.^{169,170} Επίσης, στην περιοχή αυτή εδράζεται και το γονίδιο του υποδοχέα της ιντερλευκίνης 21, ο οποίος παίζει σημαντικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των T, B και Natural killers κυττάρων ενώ ενδέχεται να ελέγχει και τα επίπεδα των IgE ορού.¹⁷¹

Μακρό Σκέλος Χρωμοσώματος 17 (17q)

Μέσω των μελετών συσχέτισμού γονιδιώματος (genome-wide association approaches), όπου ελέγχονται έως και 1 εκατομμύριο απλοί νουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (Single nucleotide polymorphisms, SNPs), έχει καταστεί δυνατή η αναγνώριση συχνών γενετικών παραλλαγών στο άσθμα. Σε πρόσφατη μελέτη από τον Moffatt και συνεργάτες,¹⁷² αναγνωρίστηκαν πολλαπλοί απλοί νουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί στο χρωμόσωμα 17q21 οι οποίοι συσχετίστηκαν ισχυρά με το παιδικό άσθμα. Οι ερευνητές στη συνέχεια προχώρησαν στην επικύρωση των συσχετισμών αυτών και σε άλλους πληθυσμούς και έδειξαν ότι οι πολυμορφισμοί αυτοί συνδέονται ισχυρά με τη μεταγραφική ρύθμιση του ORMDL3, ένα γονίδιο που κωδικοποιεί διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, οι οποίες βρίσκονται προσκολλημένες στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Φαίνεται λοιπόν ότι το γονίδιο αυτό αντιπροσωπεύει ένα σημαντικό γονίδιο προδιάθεσης στο παιδικό άσθμα.

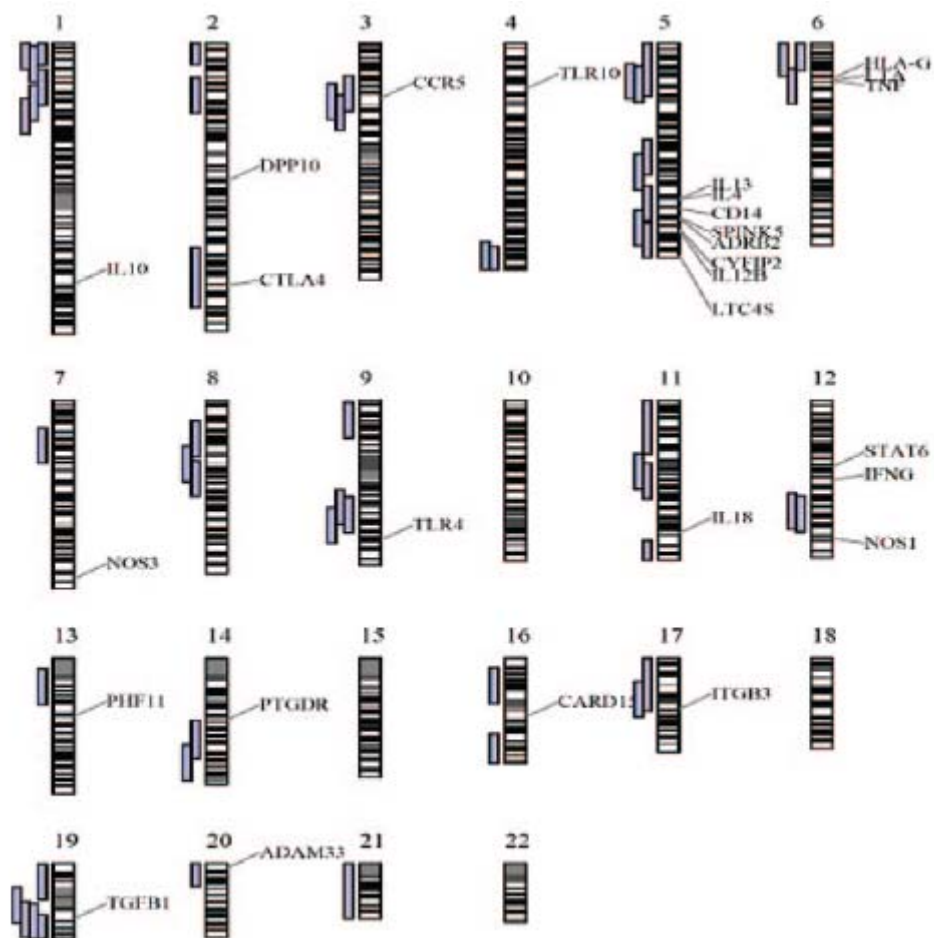
Βραχύ Σκέλος Χρωμοσώματος 20 (20p)

Το 2002 ο Van Eerdewegh και συνεργάτες¹⁷³ ανέφεραν τη χαρτογράφηση ενός νέου γονιδίου στην περιοχή 20p13, του ADAM33, το οποίο συσχέτισαν με το άσθμα και τη βρογχική υπεραντιδραστικότητα. Το γονίδιο αυτό εκφράζεται στις λείες μυϊκές ίνες των αεραγωγών και τους ινοβλάστες των πνευμόνων, τα οποία παίζουν

σημαντικό ρόλο στη βρογχική υπεραντιδραστικότητα και την επαναδιάταξη των αεραγωγών (remodeling) επηρεάζοντας άμεσα την αρχιτεκτονική και τη λειτουργικότητα των πνευμόνων. Επίσης, το γονίδιο αυτό πιστεύεται ότι έχει σημαντική επίδραση στη διέγερση διαφόρων κυτταροκινών και μέσω αυτών των οδών πιθανά συμβάλει στην προδιάθεση για άσθμα.¹⁷⁴ Παρ' όλα αυτά, σε επακόλουθες μελέτες¹⁷⁵⁻¹⁷⁷ προέκυψαν αντικρουόμενα αποτελέσματα, οπότε φαίνεται ότι ο ρόλος του στην παθοφυσιολογία του άσθματος χρειάζεται να διερευνηθεί περαιτέρω.

Σε πολλά γονίδια, τα οποία θεωρούνται σημαντικά στην παθοφυσιολογική εξέλιξη του άσθματος, έχει καθορισθεί επακριβώς η αλληλουχία τους, για να καθορισθεί εάν οι γενετικοί πολυμορφισμοί αυτών των υποψήφιων γονιδίων επηρεάζουν τον τρόπο μεταβίβασής τους (Εικόνα 1). Οι μελέτες μέσω υποψήφιου γονιδίου (candidate gene studies) έχουν επικεντρωθεί κυρίως σε διάφορες κυτταροκίνες, αυξητικούς παράγοντες και υποδοχείς που πιστεύεται ότι παίζουν ρόλο στην εμφάνιση άσθματος και κατ' επέκταση επηρεάζουν την κληρονομικότητά του. Παρ' όλα αυτά, τα περισσότερα από τα γονίδια προδιάθεσης στο άσθμα έχουν αναγνωρισθεί σε μελέτες στις οποίες η νόσος είχε οριστεί από την παρουσία ή μη άσθματος και επομένως είχαν την τάση περισσότερο να αναγνωρίσουν γονίδια που εμπλέκονται στην έναρξη της νόσου παρά στη βαρύτητα ή την εξέλιξή της. Μία μεγάλη πρόκληση για το μέλλον είναι να αναγνωρίσουμε πως τα γονίδια τα οποία προδιαθέτουν στο άσθμα αλληλεπιδρούν με περιβαλλοντικούς παράγοντες για να προκαλέσουν τη νόσο.

Επιπρόσθετα, η γνώση των γονιδίων που είναι σημαντικά στην έναρξη ή τη φυσική ιστορία του άσθματος θα μπορούσε να είναι πολύτιμη μόνο εάν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να αποτρέψει τη νόσο ή να βελτιώσει τη φροντίδα των ασθενών. Έως τώρα, δεν είναι ξεκάθαρο εάν η έγκαιρη αγωγή του άσθματος τροποποιεί την φυσική ιστορία της νόσου σε κλινικά σημαντικό βαθμό. Επιπλέον, η γονιδιακή θεραπεία είναι απίθανο να αποτελέσει μια λογική προσέγγιση για την πλειοψηφία των ασθενών για μία νόσο η οποία συνήθως μπορεί να ελεγχθεί με απλά και ασφαλή φάρμακα. Παρ' όλα αυτά, η προσέγγιση αυτή θα μπορούσε να είναι σημαντική σε ορισμένους ασθενείς με σοβαρή νόσο, πιθανά μέσω της υπερέκφρασης αντιφλεγμονωδών μεσολαβητών στον πνεύμονα. Θα μπορούσε επίσης να χρησιμοποιηθεί η γενετική πληροφορία για να προβλεφθεί η ανταπόκριση στη θεραπεία, μιας και πολλοί στόχοι για τα ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιασθματικά φάρμακα δείχνουν σημαντική γενετική ετερογένεια,¹⁷⁸ με καλύτερα παραδείγματα το β_2 αδρενεργικό υποδοχέα και τα ένζυμα της οδού της 5-λιποοξυγενάσης. Άτομα με τον πολυμορφισμό Arg-Gly-16 στο β_2 αδρενεργικό υποδοχέα έχουν παραλλαγμένες ανταποκρίσεις στα βρογχοδιασταλτικά,¹⁷⁹ ενώ ο αριθμός των επαναλήψεων μίας Sp1 αλληλουχίας αναγνώρισης στον προωθητή (promoter) της οδού της 5-λιποοξυγενάσης καθορίζει έως ένα βαθμό την ανταπόκριση σε φάρμακα τα οποία επηρεάζουν την ανταπόκριση των αεραγωγών που μεσολαβείται από λευκοτριένια.¹⁸⁰ Στην πραγματικότητα, οι διαφορές της κλινικής ανταπόκρισης σε σχέση με αυτούς τους πολυμορφισμούς είναι μικρές, αν και συνδυασμός πολυμορφισμών σε ένα γονίδιο (απλότυποι) θα μπορούσε να αποδειχθεί ότι είναι πιο σημαντικός από μεμονωμένους πολυμορφισμούς.



Εικόνα 2.

Χρωμοσωμικός χάρτης γενετικής σύνδεσης με σχετιζόμενα γονίδια άσθματος στον άνθρωπο. Τα 95% διαστήματα εμπιστοσύνης των γενετικών τόπων ποσοτικών χαρακτηριστικών (Quantitative trait loci, QTL) φαίνονται ως μπλε μπάρες στην αριστερή πλευρά των αντίστοιχων χρωμοσωμάτων, με τα peaks να σημειώνονται με μαύρες γραμμές. Τα ειδικά γονίδια τα οποία σχετίζονται με το άσθμα αναγνωρίζονται στη δεξιά πλευρά κάθε χρωμοσώματος.¹⁸¹

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ ΚΑΙ ΑΣΘΜΑ

Διάφοροι περιβαλλοντικοί παράγοντες έχουν συσχετιστεί με το άσθμα, όπως η έκθεση στα ακάρεα της οικιακής σκόνης,¹⁸² το υπερβολικά καθαρό οικιακό περιβάλλον σε συνδυασμό με τον πιο εύπορο και εκλεπτυσμένο τρόπο ζωής,¹⁸³ ο καπνός του τσιγάρου¹⁸⁴ και η διατροφή.¹⁸⁵

Η έκθεση στο *Dermatophagoides pteronyssinus* από τη διαβίωση σε θερμό και μονωμένο οικιακό περιβάλλον και ο ύπνος σε συγκεκριμένου τύπου μαξιλάρια και στρώματα σχετίζεται με σοβαρότερα συμπτώματα άσθματος σε ευαισθητοποιημένα άτομα.¹⁸⁶ Εντούτοις, η συσχέτιση αυτή δεν ευθύνεται για τη γενικευμένη αύξηση στον επιπολασμό της ευαισθητοποίησης σε άλλα αλλεργιογόνα και δεν εξηγεί γιατί, σε λιγότερο εύπορους πληθυσμούς, η ευαισθητοποίηση στο *D pteronyssinus*, αν και συχνή, σχετίζεται ελάχιστα με τον κίνδυνο για άσθμα.¹⁸⁷⁻¹⁸⁹

Το γεγονός ότι η ευαισθητοποίηση σε αλλεργιογόνα και, σε μικρότερο βαθμό, το άσθμα, είναι λιγότερο συχνά σε παιδιά με μεγαλύτερα αδέρφια έδωσε έδαφος στην υπόθεση υγιεινής, σύμφωνα με την οποία τα παιδιά που μεγαλώνουν στις σύγχρονες εύπορες κοινωνίες πιθανά εκτίθενται σε χαμηλότερα επίπεδα λοιμώξεων με αποτέλεσμα την πόλωση του ανοσοποιητικού τους συστήματος προς τον Th2 λεμφοκυτταρικό φαινότυπο έναντι του Th1 και την έκθεσή τους σε μεγαλύτερο κίνδυνο κάποιας αλλεργικής νόσου.¹⁹⁰ Φαίνεται λοιπόν ότι η αυξημένη έκθεση σε λοιμώξεις τον πρώτο χρόνο ζωής, ο αποικισμός του εντερικού βλεννογόνου με διαφορετικά βακτηρίδια^{191,192} και η υψηλότερη έκθεση σε βακτηριακές ενδοτοξίνες¹⁹³ δρουν προστατευτικά έναντι της εμφάνισης αλλεργίας στα επόμενα χρόνια ζωής. Οι μηχανισμοί αυτοί θα μπορούσαν να εξηγήσουν επίσης το γεγονός ότι η αλλεργία είναι λιγότερο συχνή σε παιδιά που έχουν μεγαλώσει σε φάρμες ή έχουν έρθει πρώιμα σε επαφή με ζώα.¹⁹³ Επίσης, οι παρασιτικές λοιμώξεις του εντέρου, ιδίως από παράσιτα τα οποία έχουν συστηματική φάση στον κύκλο ζωής τους, πιθανά

σχετίζονται με μειωμένο κίνδυνο για άσθμα. Αυτή η προστατευτική επίδραση μπορεί να είναι μέγιστη σε άτομα ευαίσθητοποιημένα σε αλλεργιογόνα και πιθανά οφείλεται στην καταστολή στα τελικά όργανα της μεσολαβούμενης από τα Th2 κύτταρα ανοσίας μέσω μηχανισμών οι οποίοι εξελίχθηκαν στο παράσιτο για να το προφυλάξουν από το αμυντικό σύστημα του ξενιστή.^{194,195}

Η παχυσαρκία είναι ένας ανεξάρτητος και αναστρέψιμος παράγοντας κινδύνου για το άσθμα, περισσότερο στις γυναίκες από τους άντρες, χωρίς ωστόσο καμία επίδραση στην αλλεργία.^{196,197} Η ανάλυση 20.016 παιδιών, ηλικίας 6-7 ετών, έδειξε ότι το υψηλό βάρος, η διαίτα πλούσια σε αλάτι και ο χρόνος παρακολούθησης τηλεόρασης αποτελούν ανεξάρτητους παράγοντες κινδύνου άσθματος¹⁹⁸ ενώ ο δείκτης μάζας σώματος επηρεάζει την αποτελεσματικότητα της αγωγής.¹⁹⁹ Επιπρόσθετα, τόσο ο β₂ αδρενεργικός υποδοχέας όσο και ο υποδοχέας των κορτικοστεροειδών, οι οποίοι σχετίζονται συχνά με το άσθμα, αποτελούν επίσης υποψήφια γονίδια παχυσαρκίας.

Τα αποτελέσματα μελετών παρατήρησης²⁰⁰ έχουν δείξει ότι διαίτα φτωχή σε τροφές που περιέχουν βιταμίνες E και C, μαγνήσιο και ω-3 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα ή πλούσια σε νάτριο και ω-6 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο για άσθμα. Επίσης, η ανεπάρκεια βιταμίνης D, εξαιτίας μειωμένης έκθεσης στον ήλιο και μειωμένης φυσικής δραστηριότητας, έχει προταθεί ως αιτιολογικός παράγοντας άσθματος.²⁰¹ Η έκφραση της βιταμίνης D στον πνεύμονα είναι απαραίτητη στη φλεγμονή και την εκδήλωση πειραματικού άσθματος, υποδεικνύοντας έτσι ότι η βιταμίνη D πιθανά να έχει ισχυρότερη επίδραση στην άμυνα του ξενιστή από τη φλεγμονή.^{202,203} Παρ' όλα αυτά, δεν έχει καταστεί δυνατό έως τώρα να τεκμηριωθεί η αιτιολογική συσχέτιση είτε μεμονωμένων θρεπτικών συστατικών είτε των τροφίμων που τα περιέχουν με το άσθμα.

Η έκθεση σε ατμοσφαιρικούς ρύπους (όπως π.χ. σωματίδια, διοξείδιο του θείου, οξείδια του αζώτου) έχει σύνθετο ρόλο στο άσθμα εμφανίζοντας βραχυπρόθεσμες και μακροπρόθεσμες επιδράσεις στο αναπνευστικό σύστημα, όπως μείωση της πνευμονικής λειτουργικότητας, βρογχική φλεγμονή και υπεραντιδραστικότητα, επηρεασμένη ανοσολογική απάντηση, ενίσχυση της αντίδρασης σε λοιμώξεις, αύξηση της συχνότητας των παροξύνσεων άσθματος και της θνησιμότητας.²⁰⁴ Παρ' όλα αυτά, η αύξηση του επιπολασμού του άσθματος σε πολλές χώρες σε μία περίοδο κατά την οποία παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στα ατμοσφαιρικά επίπεδα αυτών των ρύπων, καθώς και ο χαμηλός επιπολασμός αλλεργικού άσθματος στην Ανατολική Γερμανία πριν την ένωση,²⁰⁵ όπως και σε άλλες ανατολικές ευρωπαϊκές χώρες,²⁰⁶ όταν τα ατμοσφαιρικά επίπεδα των ρύπων αυτών ήταν υψηλά, αντικρούει την πιθανότητα μίας μείζονας παθογενετικής επίδρασης των ρύπων αυτών.

Μία εναλλακτική ερμηνεία των δεδομένων αυτών, ότι τα σωματίδια ρύπων προστατεύουν από την εμφάνιση αλλεργικής νόσου ενώ οξύνουν τα συμπτώματα σε ευαίσθητοποιημένα άτομα, υποστηρίζεται από την παρατήρηση ότι η αλλεργική ευαισθητοποίηση είναι λιγότερο συχνή σε ασθενείς των οποίων οι γονείς ήταν καπνιστές²⁰⁷ και από τη μικρότερη συχνότητα αλλεργικής ευαισθητοποίησης σε καπνιστές.²⁰⁸ Εάν υπάρχει τελικά παθογενετική συσχέτιση του άσθματος με τη ρύπανση, η μεγαλύτερη πηγή μόλυνσης πιθανά θα είναι από το εσωτερικό παρά από το εξωτερικό περιβάλλον, με την έκθεση σε οξείδια του αζώτου, σωματίδια και πτητικές οργανικές ενώσεις, συμπεριλαμβανομένων της φορμαλδεΐδης, της μούχλας και άλλων βιολογικών ή συνθετικών ουσιών, να παίζει σημαντικό ρόλο. Είναι καλά αναγνωρισμένο το άσθμα που εμφανίζεται από την έκθεση στις ουσίες αυτές καθώς

και από άλλες ουσίες στο επαγγελματικό περιβάλλον και αντιστοιχεί σε ένα μικρό αλλά σημαντικό ποσοστό περιστατικών άσθματος στους ενήλικες.

Διάφοροι άλλοι παράγοντες έχουν εμπλακεί επίσης στην παθογένεια του άσθματος και της αλλεργίας, συμπεριλαμβανομένων και προγεννητικών παραγόντων, όπως η μικρή ηλικία της μητέρας, η μητρική διατροφή και το κάπνισμα κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, η διάρκεια του θηλασμού, καθώς και παράγοντες σχετιζόμενοι με το νεογνό, όπως η προωρότητα και το χαμηλό βάρος γέννησης.²⁰⁹ Παρ' όλα αυτά, κανένας από τους παράγοντες αυτούς δεν έχει αποδειχθεί να συμβάλλει ουσιαστικά στην αύξηση του επιπολασμού του άσθματος κατά τις τελευταίες δεκαετίες.

Επομένως, παρά την εκτενή έρευνα και την αποδεδειγμένη σπουδαιότητα των περιβαλλοντικών επιδράσεων, οι μείζονες περιβαλλοντικοί αιτιοπαθογενετικοί παράγοντες του άσθματος δεν έχουν ακόμα αναγνωρισθεί. Εάν θεωρήσουμε ότι η έκθεση στους μείζονες περιβαλλοντικούς καθοριστικούς παράγοντες άσθματος είναι πλέον σχεδόν ομοιόμορφη στον ανεπτυγμένο κόσμο, τότε η εστία της έρευνας των περιβαλλοντικών παθογενετικών παραγόντων ίσως χρειαστεί να στραφεί προς τον αναπτυσσόμενο κόσμο, όπου το άσθμα και η αλλεργική νόσος είναι ακόμα σπάνιες αλλά ανακλύπουν ως κλινικά προβλήματα, σε συνδυασμό και με τις αλλαγές του τρόπου ζωής και της έκθεσης σε περιβαλλοντικούς παράγοντες.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

Οι δυσκολίες που ανακύπτουν στις διάφορες μελέτες με βάση κάποιο υποψήφιο γονίδιο (candidate gene studies) πιθανά αντανακλούν την έλλειψη ακρίβειας στον καθορισμό του ασθματικού φαινότυπου. Με δεδομένο το πόσο σημαντικές είναι οι περιβαλλοντικές επιδράσεις στην εξέλιξη αυτής της τόσο ετερογενούς νόσου, τα τελευταία δέκα χρόνια διάφορες μελέτες χρησιμοποίησαν τέτοιου τύπου επιδράσεις για να περιορίσουν τη γενετική μελέτη σε ειδικούς περιβαλλοντικούς – γονιδιακούς – ασθματικούς φαινοτυπικούς συνδυασμούς. Αντί να μελετήσουν ενδιάμεσους φαινότυπους, όπως την ατοπία, τα επίπεδα των IgE και τη βρογχική υπεραντιδραστικότητα, οι μελέτες των ειδικών περιβαλλοντικών – γονιδιακών αλληλεπιδράσεων όρισαν τον παθοφυσιολογικό φαινότυπο πιο στενά και έτσι αναγνώρισαν μια σειρά από σημαντικά γονίδια τα οποία πιθανά εμπλέκονται στην παθογένεια του άσθματος. Η γνώση του τρόπου με τον οποίο συγκεκριμένα γονίδια αυξάνουν την ευαισθησία σε συγκεκριμένους περιβαλλοντικούς παράγοντες είναι πολύ σημαντική για την κατανόηση της παθογένειας της νόσου και της ετερογένειας που εμφανίζει, ιδιαίτερα στα παιδιά. Οι πιο καλά μελετημένες αλληλεπιδράσεις περιβάλλοντος – γονιδίων είναι αυτές που σχετίζονται με την επίδραση των γονιδίων στην ανταπόκριση σε διάφορες μικροβιακές ενδοτοξίνες καθώς και τις αλληλεπιδράσεις που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες.

Μικροβιακές Ενδοτοξίνες

Ίσως το πιο καλά μελετημένο παράδειγμα τέτοιου τύπου αλληλεπιδράσεων αποτελεί η έκθεση στις ενδοτοξίνες και οι παροξύνσεις άσθματος. Οι ενδοτοξίνες είναι λιποπολυσακχαριδικά μόρια τα οποία ανευρίσκονται στην κυτταρική μεμβράνη πολλών Gram αρνητικών βακτηρίων. Υπάρχουν πολλά στοιχεία που υποδεικνύουν ότι οι ενδοτοξίνες είναι από τα πιο σημαντικά μόρια στην οργανική σκόνη, η οποία

προκαλεί φλεγμονή στους βρόγχους και απόφραξη των αεραγωγών. Υγιή άτομα τα οποία εκτέθηκαν σε σκόνη από ζώα που ζούσαν σε φάρμες, ανέπτυξαν απόφραξη των αεραγωγών ενώ αυξήθηκαν τα επίπεδα των πολυμορφοπύρηνων και της ιντερλευκίνης 6, επιδράσεις οι οποίες συσχετίστηκαν ισχυρά με τη συγκέντρωση της ενδοτοξίνης στο βιολογικό αερόλυμα.²¹⁰

Η έκθεση σε ενδοτοξίνες μπορεί να έχει ποικίλες επιδράσεις στην ανάπτυξη βρογχικής φλεγμονής και άσθματος, οι οποίες εξαρτώνται από τη χρονική στιγμή και την έκταση της έκθεσης. Η έκθεση σε ενδοτοξίνες τον πρώτο χρόνο ζωής φαίνεται να δρα προστατευτικά όσον αφορά την ανάπτυξη βρογχικής υπεραντιδραστικότητας και την αλλεργική ευαισθητοποίηση, αν και υπάρχουν αντικρουόμενα συμπεράσματα.^{211,212} Αντιθέτως, η έκθεση σε ενδοτοξίνες αργότερα στη ζωή μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση άσθματος και βρογχικής φλεγμονής. Σε μία μελέτη ασθενών με άσθμα και αλλεργική ευαισθητοποίηση στα ακάρεα της οικιακής σκόνης, η βαρύτητα του άσθματος συσχετίστηκε με τη συγκέντρωση της ενδοτοξίνης και όχι με τη συγκέντρωση των αλλεργιογόνων της οικιακής σκόνης. Συγκεκριμένα, οι συγκεντρώσεις της ενδοτοξίνης συσχετίστηκαν με τις μετρήσεις της σπιρομέτρησης, την ανάγκη σε κορτικοστεροειδή και β-αδρενεργικούς αγωνιστές καθώς και το κλινικό σκορ συμπτωμάτων.²¹³

Επειδή οι ενδοτοξίνες επηρεάζουν την ανάπτυξη φλεγμονής των αεραγωγών και βρογχικής υπεραντιδραστικότητας, έχουν γίνει πολλές προσπάθειες για την αναγνώριση πιθανών γενετικών καθοριστών για την ανάπτυξη άσθματος. Διάφορες μελέτες έκθεσης και ανταπόκρισης (exposure – response studies) έχουν δείξει ότι η εισπνοή κόκκων σκόνης και ενδοτοξίνης προκαλεί παρόμοιες φυσιολογικές και βιολογικές επιδράσεις στον άνθρωπο^{214,215} και τα ποντίκια,^{215,216} ενώ η γενετική ή η επίκτητη υποαντιδραστικότητα στην ενδοτοξίνη μείωσε σημαντικά την βιολογική

αντίδραση στους κόκκους σκόνης στα ποντίκια.²¹⁶ Έχουν αναγνωρισθεί στελέχη ποντικών τα οποία εμφανίζουν υποαντιδραστικότητα στην έκθεση σε ενδοτοξίνες και έχουν ανεπάρκεια του toll-like υποδοχέα ενδοτοξίνης 4 (endotoxin toll-like receptor 4, TLR4).²¹⁷ Ομοίως, TLR4 μεταλλάξεις έχουν συσχετισθεί με υποαντιδραστικότητα σε εισπνεόμενες ενδοτοξίνες στον άνθρωπο.²¹⁸

Τα CD14 και TLR4 αποτελούν τμήματα του λιποσακχαριδικού υποδοχέα, του οποίου το γονίδιο έχει χαρτογραφηθεί στο χρωμόσωμα 5q. Έχουν περιγραφεί πολυμορφισμοί του CD14 οι οποίοι επηρεάζουν την τάση για ανάπτυξη άσθματος και αλλεργίας και έχουν συσχετισθεί με τα επίπεδα των IgE ορού.^{219,220} Επίσης, αυξημένα επίπεδα CD14 έχουν βρεθεί στους αεραγωγούς ασθματικών ατόμων.^{217,221} Φαίνεται επομένως ότι τόσο οι πολυμορφισμοί του CD14 όσο και του TLR4 εμπλέκονται στην παθογένεια του άσθματος από έκθεση σε επαγγελματικές ή οικιακές περιβαλλοντικές επιδράσεις.

Οξειδωτικό Στρες

Το οξυγόνο, αν και απαραίτητο για την επιβίωσή μας, μπορεί να αποδειχθεί επιβλαβές σε περίπτωση οξειδωτικού στρες, το οποίο εμφανίζεται όταν υπάρχει ανισορροπία ανάμεσα στις δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive oxygen species, ROS) και τις προστατευτικές αντιοξειδωτικές ενώσεις.²²² Η πηγή των δραστικών μορφών οξυγόνου μπορεί να είναι είτε εξωγενής είτε ενδογενής. Οι εξωγενείς δραστικές μορφές οξυγόνου προέρχονται από την αποτοξίνωση βλαβερών εξωγενών ενώσεων ή ξενοβιοτικών (π.χ. καυσαέρια, όζον, σωματίδια, καπνός τσιγάρου). Οι ενδογενείς ενεργές μορφές οξυγόνου παράγονται από φλεγμονώδη κύτταρα του πνεύμονα, κυρίως από τα πολυμορφοπύρρηνα, ηωσινόφιλα, κυνελιδικά μακροφάγα και επιθηλιακά και ενδοθηλιακά κύτταρα, σε διάφορες φλεγμονώδεις και/ή λοιμώδεις

διεργασίες,²²³ καθώς και κατά το φυσιολογικό μεταβολισμό, όπως π.χ. κατά την αναερόβια αναπνοή των μιτοχονδρίων και τις ενζυμικές αντιδράσεις (κυκλοοξυγενάσες, λιποοξυγενάσες, υπεροξειδάσες, κυτόχρωμα P-450). Το αναπνευστικό σύστημα εκτίθεται διαρκώς και στις δύο μορφές δραστικών μορφών οξυγόνου, οι οποίες δρώντας στις πρωτεΐνες, τα λιπίδια και άμεσα στο DNA, προκαλούν βλάβη στο βρογχικό επιθήλιο και πυροδοτούν τη φλεγμονώδη κυτταρική διήθηση, την παραγωγή βλέννης καθώς και την αντιδραστικότητα και τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών ινών των αεραγωγών, με αποτέλεσμα τη βρογχική απόφραξη και υπεραντιδραστικότητα.²²³

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, το οξειδωτικό στρες εμφανίζεται όταν σημειώνεται υπερβολική παραγωγή ενεργών μορφών οξυγόνου ή ανεπαρκούν οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί.²²⁴ Οι ασθενείς με άσθμα εμφανίζουν αυξημένη παραγωγή ενεργών μορφών οξυγόνου, με αποτέλεσμα την αύξηση της υδρογονικής υπεροξειδάσης,²²⁵ του 8-ισοπροστανίου και του CO στο συμπύκνωμα αναπνοής (breath condensate), καθώς και αυξημένα επίπεδα γλουταθειονικής υπεροξειδάσης και υπεροξειδικής δισμουτάσης στα πνευμονικά κύτταρα.²²⁶ Επίσης έχουν καταγραφεί αυξημένα επίπεδα της ηωσινοφιλικής υπεροξειδάσης και μυελοπεροξειδάσης στο περιφερικό αίμα, τα προκλητά πτύελα και το βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα ασθματικών ασθενών.²²⁷ Σε πρόσφατη μελέτη²²⁴ σε ασθματικά παιδιά, κατέγραψαν αυξημένα επίπεδα οξειδωτικού στρες (αυξημένη μηλονική διαλδεϋδη πλάσματος) και μειωμένο αντιοξειδωτικό επίπεδο (μειωμένη γλουταθειόνη πλάσματος) σε σύγκριση με τα μη ασθματικά παιδιά που εξετάστηκαν.

Σε διάφορες κλινικές δοκιμές, έχουν καταγραφεί διαφορετικές αντιδράσεις σε επίπεδο φλεγμονής και πνευμονικής λειτουργικότητας από άτομο σε άτομο μετά από έκθεση σε διάφορους περιβαλλοντικούς ρύπους.²²⁸ Η διακύμανση αυτή οφείλεται σε

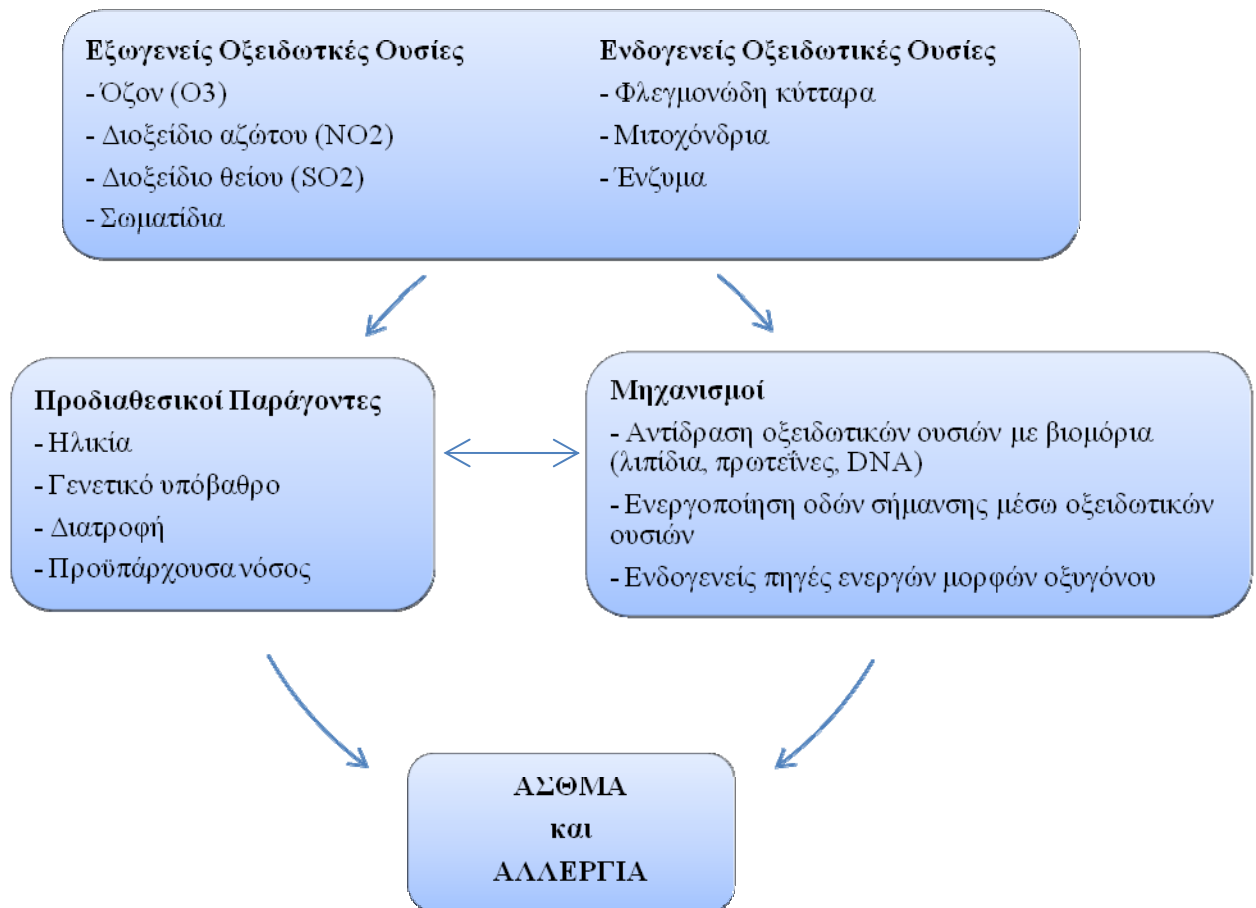
διάφορους ενδογενείς (π.χ. ηλικία, φύλο, γενετικό υπόβαθρο) και εξωγενείς (π.χ. διατροφή, προηγηθείσα ή ταυτόχρονη έκθεση, προϋπάρχουσα νόσος) παράγοντες, οι οποίοι επηρεάζουν την ευαισθησία σε οξειδωτικούς ατμοσφαιρικούς ρύπους και κατ' επέκταση τον κίνδυνο για αλλεργική νόσο (Εικόνα 2).

Όσον αφορά το γενετικό υπόβαθρο, φαίνεται ότι αποτελεί σημαντικό παράγοντα καθορισμού της ανταπόκρισης στην έκθεση σε οξειδωτικές ενώσεις στα παιδιά. Οι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (Single nucleotide polymorphisms, SNPs) γονιδίων που κωδικοποιούν ένζυμα αποτοξίνωσης (αντιοξειδωτικά ένζυμα) επηρεάζουν τη λειτουργικότητα των ενζύμων αυτών στους πνεύμονες και σε άλλα όργανα, με αποτέλεσμα την αυξημένη γενετική ευαισθησία στο οξειδωτικό στρες και το άσθμα. Στα γονίδια αυτά περιλαμβάνονται τα γονίδια της οικογένειας της γλουταθειονικής S-τρανσφεράσης (glutathione S-transferase, GST), τα οποία κωδικοποιούν ένζυμα της ομάδας α (alpha, GSTA), μ (mu, GSTM), π (pi, GSTP) και θ (theta, GSTT).²²⁴ Πολυμορφισμοί των GSTM1, GSTP1 και GSTT1 έχουν εμπλακεί στην αιτιολογία του άσθματος μέσω της επίδρασης τους στο οξειδωτικό στρες.

Συμπερασματικά, φαίνεται ότι η εμφάνιση άσθματος εξαρτάται από περίπλοκες αλληλεπιδράσεις ανάμεσα σε γονίδια και περιβάλλον μέσα στο χρόνο. Οι νέες ερευνητικές προσεγγίσεις θα πρέπει εκτός από τις μελέτες γενετικής σύνδεσης (linkage studies) και την αναγνώριση υπονήφιων γονιδίων, να συμπεριλάβουν πιο ακριβείς βιολογικούς δείκτες περιβαλλοντικής έκθεσης, να πραγματοποιήσουν πιο ακριβή χαρτογράφηση των γενετικών τόπων προδιάθεσης στη νόσο και να αποσαφήνισουν τους παθοφυσιολογικούς φαινότυπους του άσθματος.

Η αποσαφήνιση του ρόλου των γενετικών παραγόντων στο άσθμα αποτελεί παρ' όλα αυτά μόνο ένα κομμάτι της εξίσωσης. Φαίνεται ότι η ανάπτυξη και ο επιπολασμός του άσθματος δεν εξαρτώνται μόνο από την έκφραση ενός

συγκεκριμένου γονιδίου αλλά επηρεάζονται και από την έκθεση σε περιβαλλοντικούς παράγοντες. Επομένως, μεγάλης σημασίας για την αποκρυπτογράφηση της νόσου αποτελεί η κατανόηση του τρόπου που οι περιβαλλοντικές επιδράσεις επηρεάζουν την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων. Η μελέτη των επιγενετικών αλλαγών του γονιδιώματος αποτελεί μεγάλο πεδίο έρευνας, τόσο για την κατανόηση του άσθματος μέσω μίας διαφορετικής προσέγγισης, όσο και για τον καθορισμό του ρόλου των περιβαλλοντικών επιδράσεων σε γενετικά "ευαίσθητα" άτομα, ούτως ώστε στο μέλλον να είναι δυνατή η πρόληψη της έκθεσης σε συγκεκριμένους περιβαλλοντικούς παράγοντες στα άτομα αυτά.



Εικόνα 3. Διάγραμμα που απεικονίζει τη σύνδεση μεταξύ των οξειδωτικών ουσιών, των μηχανισμών επίδρασης τους και των ενδογενών προδιαθεσικών παραγόντων που εμπλέκονται στην πρόκληση άσθματος και αλλεργίας.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΜΙΚΡΟΔΟΡΥΦΟΡΙΚΗ ΑΣΤΑΘΕΙΑ ΚΑΙ

ΑΠΩΛΕΙΑ ΤΗΣ ΕΤΕΡΟΖΥΓΩΤΙΑΣ

1.1. Εισαγωγή

Το μικροδορυφορικό DNA (ΜΔ DNA) αποτελείται από μικρές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες νουκλεοτιδίων, μεγέθους 1-6bp, και ανευρίσκεται κυρίως σε περιοχές που δεν κωδικοποιούν κάποιο γονίδιο.²²⁹ Η πιο συχνή αλληλουχία ΜΔ DNA στον άνθρωπο είναι η επανάληψη του δινουκλεοτιδίου κυτοσίνης και αδενίνης, (CA)_n, το οποίο συναντάται σε δεκάδες χιλιάδες περιοχές του γονιδιώματος. Αν και τα τμήματα ΜΔ DNA είχαν θεωρηθεί ως ουδέτεροι δείκτες του DNA, ένα μικρό, αλλά παρ' όλα αυτά σημαντικό, τμήμα του έχει αποδειχθεί ότι συμμετέχει σε διάφορα βιολογικά φαινόμενα όπως η μεταγραφή και μετάφραση γονιδίων, η οργάνωση των χρωματινών, ο ανασυνδυασμός και η αντιγραφή του DNA, το σύστημα επιδιόρθωσης του DNA (DNA mismatch repair system, MMR), ο κυτταρικός κύκλος και άλλα.^{230,231}

Το ΜΔ DNA χαρακτηρίζεται ως πολυμορφικό όταν εμφανίζει κληρονομήσιμες και σταθερές διαφορές από άτομο σε άτομο όσον αφορά τον αριθμό των επαναλήψεων που περιλαμβάνει. Τα υψηλά επίπεδα πολυμορφισμού που συναντώνται στο ΜΔ DNA πιθανά οφείλονται σε λάθη κατά την αντιγραφή του DNA, αν και ο ακριβής μηχανισμός δεν έχει εξακριβωθεί ακόμα.²³² Με τη χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (Polymerase chain reaction, PCR), πολυμορφικά τμήματα ΜΔ DNA αυτού του τύπου αποτελούν άριστους γενετικούς δείκτες και χρήσιμα εργαλεία για τη χαρτογράφηση γονιδίων που εμπλέκονται στην παθογένεια διαφόρων παθήσεων μέσω μελετών σύνδεσης (linkage analysis) καθώς και για τη μελέτη γενετικών διαγραφών (απώλεια της ετεροζυγωτίας) σε κακοήθεις παθήσεις,²³³ ενώ επιπρόσθετα θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν και ως εργαλεία γενετικής ανίχνευσης σε μελέτες μοριακής επιδημιολογίας.²³⁴

1.2. Μικροδορυφορική Αστάθεια και Απώλεια της Ετεροζυγωτίας

Η γενετική αστάθεια συνιστάται είτε σε χρωμοσωμική αστάθεια (ΧΑ) είτε σε μικροδορυφορική αστάθεια (ΜΔΑ). Η ΜΔΑ εμφανίζεται όταν ένα μικροδορυφορικό αλληλόμορφο της βλαστικής σειράς έχει κερδίσει ή χάσει επαναλαμβανόμενες μονάδες, έχει δηλαδή υποστεί μία σωματική αλλαγή στο μήκος του. Αναντιστοιχία νουκλεοτιδίων συμβαίνει φυσιολογικά κατά την αντιγραφή των ελίκων του DNA, όμως όλα σχεδόν τα λάθη αυτά διορθώνονται άμεσα από το μοριακό μηχανισμό επιδιόρθωσης του DNA (DNA mismatch repair system, MMR). Μεταλλάξεις στα γονίδια MLH1, MSH2, PMS1, PMS2 και MSH6 του συστήματος επιδιόρθωσης MMR ή αναστολή της έκφρασης των γονιδίων αυτών έχει συσχετιστεί με αυξημένη συχνότητα εμφάνισης ΜΔΑ.²³⁵

Επιπρόσθετα, το ΜΔ DNA εμφανίζει υψηλή συχνότητα μεταλλάξεων συγκριτικά με περιοχές του γονιδιώματος που κωδικοποιούν γονίδια.²³⁶ Οι διεργασίες των μεταλλάξεων αυτών διαφέρουν ανάλογα με τον τύπο των επαναλαμβανόμενων βάσεων, την περιοχή και τα αλληλόμορφα γονίδια, την ηλικία και το φύλο.²³⁷ Το σύστημα επιδιόρθωσης του DNA (MMR) συμβάλλει στη σταθερότητα του γονιδιώματος μέσω της επίβλεψης και της επιδιόρθωσης των λαθών της αντιγραφής. Δυσλειτουργία του συστήματος επιδιόρθωσης μπορεί να οδηγήσει στην απώλεια της σταθερότητας του γονιδιώματος με αποτέλεσμα τη γρήγορη συσσώρευση μεταλλάξεων οι οποίες απενεργοποιούν γονίδια που έχουν σημαντικό ρόλο μέσα στα κύτταρα, οπότε διευκολύνεται η διαδικασία της καρκινογένεσης.^{238,239}

1.3. Μικροδορυφορική Αστάθεια και Καρκινογένεση

Στα καρκινικά κύτταρα έχουν αναγνωρισθεί δύο ξεχωριστές μορφές γενετικής αστάθειας: η χρωμοσωμική, η οποία οδηγεί σε ανευπλοειδία, απώλεια της ετεροζυγωτίας κ.α. και η μικροδορυφορική αστάθεια (ΜΔΑ), η οποία συμβαίνει εξαιτίας συχνών λαθών κατά την αντιγραφή βραχέων επαναλαμβανόμενων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών.²⁴⁰ Ανάμεσα στα γονίδια που παίζουν σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση πολλαπλών σταδίων είναι και τα ογκοκατασταλτικά γονίδια. Έχει φανεί ότι η απώλεια γενετικού υλικού στο ένα αλληλόμορφο (Απώλεια της ετεροζυγωτίας, ΑΤΕ) μπορεί δυνητικά να οδηγήσει σε καρκινογένεση.²⁴¹

Η ΜΔΑ περιγράφηκε για πρώτη φορά στον κληρονομικό, μη σχετιζόμενο με πολυποδίαση, καρκίνο του παχέος εντέρου (σύνδρομο Lynch),^{240,241} όπου βρέθηκαν μικροδορυφορικά αλληλόμορφα των οποίων το μήκος είχε αλλάξει λόγω της προσθήκης ή διαγραφής νουκλεοτιδίων. Οι αλλαγές αυτές καταγράφηκαν όχι μόνο στα τμήματα ΜΔ DNA στην εμπλεκόμενη με τη νόσο χρωμοσωμική περιοχή, αλλά και σε τμήματα ΜΔ DNA εντοπισμένα παντού στο γονιδίωμα του όγκου. Στη συνέχεια η εκτεταμένη αυτή ΜΔΑ συσχετίστηκε με ελαττωματική επιδιόρθωση του DNA από το σύστημα MMR. Συγκεκριμένα, καταγράφηκαν μεταλλάξεις στα γονίδια MLH1, MSH2, MSH6 και PMS2 του MMR. Το φαινόμενο αυτό έχει εμπλακεί στην παθογένεια του 15% των περιπτώσεων καρκίνου του παχέος εντέρου καθώς και άλλων κακοηθειών, όπως του πνεύμονα, του στομάχου, του ενδομητρίου, των ωοθηκών, του μαστού, του προστάτη, της ουροδόχου κύστης, των κακοηθειών κεφαλής και τραχήλου καθώς και του μελανώματος.^{240,242-250}

1.4. Μικροδορυφορική Αστάθεια και Απώλεια της Ετεροζυγωτίας σε Καλοήθεις Νόσους

Ένας μεγάλος αριθμός νευρολογικών διαταραχών έχει συσχετιστεί με αστάθεια του ΜΔ DNA (ΜΔΑ), όπως το σύνδρομο του εύθραυστου Χ χρωμοσώματος (μία από τις συχνότερες αιτίες διανοητικής υστέρησης), η μυοτονική δυστροφία και η νόσος του Huntington.²⁵¹ Επίσης, ΜΔΑ και καταστολή της έκφρασης στο DNA των ενζύμων αποκατάστασης έχει καταγραφεί στον αρθρικό ιστό στη ρευματοειδή αρθρίτιδα,²⁵² ενώ ΜΔΑ έχει ανιχνευθεί και στα μικροκυστικά αδενώματα του παγκρέατος, ένα σπάνιο καλοήγη όγκο ο οποίος συναντάται κύρια στις γυναίκες.²⁵³ Απώλεια της ετεροζυγωτίας (ΑΤΕ) σε συνδυασμό με ΜΔΑ έχει καταγραφεί στη διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια, το οφθαλμικό περύγιο, την ακτινική υπερκεράτωση και την αθηροσκλήρυνση,²⁵⁴⁻²⁵⁷ ενώ η ΑΤΕ αποτελεί κοινό εύρημα στην ψωρίαση.²⁵⁸

1.5. Μικροδορυφορική Αστάθεια και Απώλεια της Ετεροζυγωτίας σε Καλοήθεις Πνευμονικές Παθήσεις

Υπάρχουν στοιχεία που δείχνουν ότι κοινές παθήσεις του αναπνευστικού, όπως η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ) και το άσθμα, έχουν ισχυρό γενετικό υπόβαθρο και πολυγονιδιακό τρόπο μεταβίβασης. Για την περαιτέρω διερεύνηση του γενετικού υπόβαθρου διαφόρων πνευμονικών παθήσεων, το ΜΔ DNA έχει χρησιμοποιηθεί ως εργαλείο γενετικής ανίχνευσης. Συγκεκριμένα, ανίχνευση ΜΔΑ και ΑΤΕ έχει πραγματοποιηθεί σε ασθενείς με ΧΑΠ, άσθμα, σαρκοείδωση και ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση χρησιμοποιώντας κύτταρα πτυέλου και έχουν καταγραφεί αλλαγές σε επίπεδο ΜΔ DNA στο γενετικό υλικό το οποίο

εκχυλίστηκε από τα κύτταρα αυτά.²⁵⁹⁻²⁶⁴ Εκχύλιση DNA πραγματοποιήθηκε τόσο στα κύτταρα πτυέλου όσο και στα κύτταρα ολικού αίματος (συγκεκριμένα στα λευκά αιμοσφαίρια) κάθε ατόμου. Στη συνέχεια έγινε PCR για την ενίσχυση των αλληλουχιών του DNA. Η ΜΔΑ και/ή ΑΤΕ εκτιμήθηκαν συγκρίνοντας το ηλεκτροφορητικό πρότυπο των ΜΔ δεικτών, το οποίο είχε ενισχυθεί από τα ζεύγη DNA (πτυέλου/λευκών αιμοσφαιρίων), ως αλλαγή ενός ή και των δύο αλληλομόρφων στο παθολογικό δείγμα DNA ή ως δημιουργία καινούργιων αλληλομόρφων, όπως αυτό φαινόταν από την προσθήκη ή διαγραφή ενός ή περισσότερων επαναλαμβανόμενων μονάδων.

Όσον αφορά τη μελέτη γενετικών αλλαγών σε επίπεδο ΜΔ DNA στο άσθμα, ο Παρασκάκης και συνεργάτες²⁶² μελέτησαν δείγματα πτυέλου από 22 ασθενείς με μέτριο άσθμα και 8 με σοβαρό άσθμα. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν 18 υψηλά πολυμορφικοί ΜΔ δείκτες οι οποίοι εντοπίζονταν στις χρωμοσωμικές περιοχές 5q, 6p, 11q και 14q, σε περιοχές δηλαδή που περιέχουν γονίδια τα οποία κωδικοποιούν κυτταροκίνες, μεσολαβητές και υποδοχείς που εμπλέκονται στην παθογένεια της ατοπίας και του άσθματος. Γενετικές αλλαγές βρέθηκαν στο 73% (16/22) των ασθενών με μέτριο άσθμα και το 38% (3/8) των ασθενών με σοβαρό άσθμα. Το 54,5% των ασθενών (12/22) εμφάνισε ΑΤΕ, το 4,5% (1/22) ΜΔΑ ενώ το 13,6% (3/22) ΑΤΕ και ΜΔΑ. Η μέση τιμή των IgE και τα επίπεδα των ηωσινοφίλων αίματος ήταν σημαντικά υψηλότερα στους ασθματικούς ασθενείς με 3 ή περισσότερες γενετικές αλλαγές. Η υψηλή συχνότητα των γενετικών αλλαγών σε επίπεδο ΜΔ DNA σε γενετικούς τόπους γονιδίων που ελέγχουν τη φλεγμονή και τη βρογχική υπεραντιδραστικότητα και η συσχέτισή τους με φαινοτυπικά χαρακτηριστικά αλλεργίας και άσθματος (αυξημένα επίπεδα IgE και ηωσινοφίλων), υποδεικνύουν ότι οι γενετικοί αυτοί τόποι πιθανά παίζουν ρόλο στην παθογένεια του άσθματος, αν και

απαιτούνται περισσότερες μελέτες για να αποσαφηνίσουν τη σημασία της ΑΤΕ και της ΜΔΑ στο άσθμα.²⁶²

Πρόσφατα, η Ζερβού και συνεργάτες²⁶¹ προσπάθησαν να διερευνήσουν τις ομοιότητες ή/και τις διαφορές σε επίπεδο ΜΔ DNA σε ασθενείς ΧΑΠ και άσθματος. Χρησιμοποιήθηκαν 10 ειδικοί ΜΔ δείκτες στα χρωμοσώματα 2p, 5q, 6p, 10q, 13q, 14q και 17q, τα οποία περιέχουν γονίδια προδιάθεσης στο άσθμα, την αλλεργία και τη μη αναστρέψιμη απόφραξη των αεραγωγών, για τη διασταύρωση της συχνότητας της ΜΔΑ και στις δύο παθήσεις, με στόχο να αναγνωρίσουν εάν υπάρχουν κοινά ή ειδικά για κάθε νόσο πρότυπα ΜΔΑ. Αναλύθηκαν προκλητά πτύελα από 63 ασθενείς με ΧΑΠ, 60 καπνιστές (χωρίς ΧΑΠ), 36 ασθενείς με μέτριο έως σοβαρό άσθμα και 30 υγιή άτομα, μη καπνιστές, ως ομάδα ελέγχου. Οι συγγραφείς αναφέρουν ότι συγκεκριμένοι ΜΔ δείκτες στις χρωμοσωμικές περιοχές 6p25, 10q22 και 13q32 φαίνεται να είναι ειδικοί για τη ΧΑΠ. Παρ' όλα αυτά, κανένας ΜΔ δείκτης από αυτούς που εξετάστηκαν δεν φάνηκε να είναι ειδικός μόνο για το άσθμα. Επίσης, έδειξαν ότι οι ασθενείς με ΧΑΠ εμφάνισαν σημαντικά υψηλότερη συχνότητα ΜΔΑ συγκριτικά με την ομάδα των ασθματικών ασθενών (49,2% έναντι 22,2%), ενώ ΜΔΑ ανιχνεύθηκε ακόμα και σε ήπια νόσο (33,3% των ασθενών με ήπια ΧΑΠ και 22,2% των ασθενών με ήπιο άσθμα). Άρα, η ΜΔΑ θα μπορούσε να αποτελέσει ένα χρήσιμο εργαλείο γενετικής ανίχνευσης στη μοριακή επιδημιολογία, αναγνωρίζοντας τους καπνιστές που έχουν προδιάθεση να εμφανίσουν ΧΑΠ ή τα ατοπικά άτομα που έχουν προδιάθεση να εμφανίσουν άσθμα.²⁶¹

Συμπερασματικά, παλαιότερα το ΜΔ DNA θεωρείτο ότι χρησίμευε μόνο ως γενετικός δείκτης. Παρ' όλα αυτά, οι αλληλουχίες του ΜΔ DNA μπορούν να έχουν λειτουργικό ρόλο στο γονιδίωμα, είτε επηρεάζοντας την έκφραση γονιδίων δρώντας ως ρυθμιστικές αλληλουχίες οι οποίες μπορούν να αναγνωρισθούν από

μεταγραφικούς παράγοντες, είτε προστατεύοντας το DNA από δυσμενείς περιβαλλοντικές επιδράσεις (π.χ. καπνός τσιγάρου).^{236,265,266} Επομένως, η ανίχνευση γενετικών αλλαγών σε επίπεδο ΜΔ DNA θα μπορούσε να αποτελέσει μία χρήσιμη τεχνική για την αναγνώριση γενετικών τόπων που περιέχουν πιθανά μεταλλαγμένα γονίδια, τα οποία μπορεί να παίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεια διαφόρων καλόηθων παθήσεων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΠΡΟΚΛΗΣΗ ΠΤΥΕΛΟΥ

2.1. Εισαγωγή

Για τη διερεύνηση των παθογενετικών μηχανισμών φλεγμονωδών νόσων των αεραγωγών, όπως είναι το άσθμα, καθώς και για την κλινική παρακολούθησή τους, είναι απαραίτητη η μελέτη τόσο των υποκείμενων παθολογικών χαρακτηριστικών της νόσου όσο και των φυσιολογικών επακόλουθων της φλεγμονώδους διεργασίας. Η φλεγμονή των αεραγωγών αποτελεί κύριο χαρακτηριστικό του άσθματος και σημαντική παράμετρο κάθε θεραπευτικής στρατηγικής. Οι περισσότερες από τις αρχικές παρατηρήσεις που έγιναν στο άσθμα, καταγράφοντας την εμπλοκή στην παθοφυσιολογία της νόσου των ηωσινόφιλων, των μαστοκυττάρων, των Τ λεμφοκυττάρων, των ινοβλαστών, των ενδοθηλιακών και επιθηλιακών κυττάρων, προέκυψαν από δείγματα βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος ή βρογχικής βιοψίας, τα οποία λαμβάνονταν μετά από βρογχοσκόπηση. Το γεγονός όμως ότι η μέθοδος αυτή ήταν επεμβατική, περιόρισε τη χρήση της σε μικρό αριθμό ασθενών σε εξειδικευμένα κέντρα. Δεν ήταν έτσι δυνατή η εφαρμογή της βρογχοσκόπησης ως διαγνωστικό εργαλείο ρουτίνας ή σε μεγάλες κλινικές δοκιμές. Η δυνατότητα μελέτης της βρογχικής φλεγμονής άλλαξε ριζικά με την ανάπτυξη της τεχνικής της πρόκλησης πτυέλου, η οποία χρησιμοποιείται έκτοτε ευρέως ως ερευνητικό και κλινικό εργαλείο.

2.2. Μέθοδος

Πρώτη η Pin και συνεργάτες το 1992 περιέγραψε μία τυποποιημένη μέθοδο πρόκλησης πτυέλου,²⁶⁷ η οποία έκτοτε έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως στη μελέτη της βρογχικής φλεγμονής, ακόμα και στα παιδιά (άνω των 5 ετών).²⁶⁸ Η πρόκληση πτυέλου έχει πολλά πλεονεκτήματα έναντι άλλων επεμβατικών μεθόδων, εφόσον είναι μία τεχνική η οποία μπορεί να εφαρμοσθεί εύκολα, μπορεί να πραγματοποιηθεί

ακόμα και σε ασθενείς με σοβαρό άσθμα ενώ είναι ελάχιστα επεμβατική.²⁶⁹ Στόχος της πρόκλησης πτυέλου είναι η συλλογή επαρκούς δείγματος εκκρίσεων από το κατώτερο αναπνευστικό σύστημα, με σκοπό τη μελέτη των χαρακτηριστικών της βρογχικής φλεγμονής. Για την απόκτηση του δείγματος, προηγείται εισπνοή, μέσω νεφελοποίησης, ενός ισότονου ή υπέρτονου διαλύματος χλωριούχου νατρίου (NaCl) για διάφορα χρονικά διαστήματα, με αποτέλεσμα την πρόκληση παραγωγής μικρής ποσότητας εκκρίσεων από τους αεραγωγούς, η οποία αποβάλλεται ως απόχρεμψη και αναλύεται περαιτέρω. Πριν την πρόκληση, γίνεται σπιρομέτρηση για την εκτίμηση της βασικής τιμής του δυναμικά εκπνεόμενου όγκου σε 1 δευτερόλεπτο (Forced expiratory volume in 1 sec, FEV₁) ενώ οι επαναλαμβανόμενες σπιρομετρήσεις (συνήθως ανά 5-10 λεπτά) κατά τη διάρκεια της εισπνοής του διαλύματος NaCl στόχο έχουν την παρακολούθηση της πνευμονικής λειτουργικότητας και την έγκαιρη ανίχνευση σημαντικού βρογχόσπασμου. Η συνεργασία του ασθενούς κατά τη διάρκεια της πρόκλησης είναι πολύ σημαντική.

Η συγκέντρωση του διαλύματος NaCl που χρησιμοποιείται ποικίλλει στις διάφορες μελέτες, από 0,9% έως και 7%.²⁷⁰ Φαίνεται πάντως ότι τα υπέρτονα διαλύματα είναι πιο αποτελεσματικά συγκριτικά με τα ισότονα στην πρόκληση πτυέλου,²⁷⁰ παρ' όλα αυτά θα πρέπει να χρησιμοποιούνται με προσοχή σε ασθενείς υψηλού κινδύνου για βρογχόσπασμο.²⁷¹ Ο ακριβής μηχανισμός που τα υπέρτονα διαλύματα προκαλούν βρογχόσπασμο στους ασθματικούς ασθενείς δεν είναι ακριβώς γνωστός, πιθανά όμως οφείλεται στην ενεργοποίηση των μαστοκυττάρων στους βρόγχους²⁷² ή τη διέγερση των απολήξεων των αισθητήριων νεύρων.²⁷³ Για την αποφυγή σημαντικού βρογχόσπασμου συνιστάται, πριν την έναρξη της διαδικασίας, η προετοιμασία του ασθενούς με τη χορήγηση ενός β₂-αγωνιστή βραχείας δράσης (συνήθως 200-400 mcg εισπνεόμενης σαλβουταμόλης).²⁶⁷

Έχει αναφερθεί ότι τα κυτταρικά και βιοχημικά στοιχεία του προκλητού πτυέλου αλλάζουν κατά τη διάρκεια της πρόκλησης.²⁷⁴ Σε δείγματα τα οποία είχαν συλλεχθεί πρώιμα υπερίσχυαν τα πολυμορφοπύρηνα και ηωσινοφιλα, ενώ σε δείγματα που συλλέχθηκαν αργότερα βρέθηκε μεγαλύτερος πληθυσμός λεμφοκυττάρων και μακροφάγων. Φαίνεται λοιπόν ότι κύτταρα από το κεντρικό τμήμα της αναπνευστικής οδού συλλέγονται πρώτα, ενώ κύτταρα προερχόμενα από τους περιφερικούς αεραγωγούς και τα βρογχιόλια συλλέγονται αργότερα. Για να είναι επομένως αντιπροσωπευτικό το δείγμα, συνιστάται η συνολική διάρκεια νεφελοποίησης να κυμαίνεται στα 15-20 λεπτά, περιλαμβάνοντας 4 διαδοχικές περιόδους διάρκειας περίπου 5 λεπτών η καθεμία, αν και η χρονική διάρκεια της διαδικασίας δεν είναι τυποποιημένη.²⁷⁵ Ο ασθενής παροτρύνεται να βήξει παραγωγικά στο τέλος κάθε περιόδου νεφελοποίησης.

Υπάρχουν δύο μέθοδοι επεξεργασίας του πτυέλου: η μία περιλαμβάνει την διαλογή των βλεννωδών τμημάτων από το δείγμα υπό μικροσκοπική καθοδήγηση, ενώ η δεύτερη περιλαμβάνει την επεξεργασία όλου του δείγματος (πτύελο και σιέλο).²⁷⁶ Τα πλεονεκτήματα της πρώτης μεθόδου είναι ότι η παρουσία πλακωδών επιθηλιακών κυττάρων στο δείγμα είναι μικρή (<5%), οπότε η μέτρηση των κυττάρων γίνεται πιο γρήγορα και πιο εύκολα, ο ολικός αριθμός κυττάρων (Total cell count, TCC) μπορεί να εκφρασθεί ανά γραμμάριο δείγματος, ενώ οι συγκεντρώσεις των χημικών ουσιών κατά την επεξεργασία του δείγματος δεν επηρεάζονται από την παρουσία σιέλου. Το πλεονέκτημα της δεύτερης μεθόδου είναι ότι η επεξεργασία του δείγματος γίνεται πιο γρήγορα, όμως η παρουσία σιέλου πιθανά επηρεάζει την ανάλυση του πτυέλου, ενώ συχνά καταγράφεται παρουσία >20% πλακωδών επιθηλιακών κυττάρων οπότε το δείγμα κρίνεται ως ακατάλληλο για περαιτέρω επεξεργασία.

Μετά την ομογενοποίηση του δείγματος και το φιλτράρισμα του για την απομάκρυνση της βλέννης, γίνεται φυγοκέντρηση του δείγματος για διαχωρισμό των κυττάρων από το υπερκείμενο. Στη συνέχεια, γίνεται μέτρηση στο κυτταρικό ίζημα του ολικού αριθμού κυττάρων με τη χρήση κυτταρομετρητή καθώς και εκτίμηση της βιωσιμότητας των κυττάρων με την "trypan blue" μέθοδο αποκλεισμού. Τέλος, ετοιμάζονται τα cytospin με το αρχικό διήθημα (το οποίο προσαρμόζεται σε συγκέντρωση 1×10^6 κύτταρα/ml) και μετά από μέτρηση τουλάχιστον 400 μη πλακωδών κυττάρων σε πλακίδια τα οποία είναι σταθεροποιημένα σε μεθανόλη και χρωσμένα με May–Grunwald–Giemsa ή Wright χρώση, καταγράφεται ο σχετικός αριθμός των ηωσινόφιλων, ουδετερόφιλων πολυμορφοπύρηνων, μακροφάγων, λεμφοκυττάρων και βρογχικών επιθηλιακών κυττάρων, εκφρασμένα ως ποσοστό του συνολικού αριθμού των μη πλακωδών κυττάρων (διαφορική μέτρηση των κυττάρων - differential cell count, DCC).

2.3. Ασφάλεια

Η πρόκληση πτυέλου είναι ασφαλής εφ' όσον λαμβάνονται τα κατάλληλα μέτρα προφύλαξης. Οι παράγοντες που δυνητικά μπορεί να επηρεάσουν την ασφάλεια της πρόκλησης πτυέλου είναι: η προετοιμασία με κάποιον β_2 -αγωνιστή βραχείας δράσης, ο βαθμός απόφραξης των αεραγωγών πριν την πρόκληση, η κατάχρηση των β_2 -αγωνιστών βραχείας δράσης, ο βαθμός ελέγχου του άσθματος, η ένταση νεφελοποίησης, η συγκέντρωση του εισπνεόμενου διαλύματος NaCl, η διάρκεια της περιόδου νεφελοποίησης, η συχνότητα και η χρονική στιγμή εκτίμησης του FEV₁.²⁶⁹

Για τη μέγιστη δυνατή ασφάλεια της μεθόδου, θα πρέπει να λαμβάνονται τα ακόλουθα μέτρα:²⁶⁹

- Θα πρέπει να γίνεται προετοιμασία του ασθενούς πριν την έναρξη της πρόκλησης πτυέλου με τη χορήγηση βρογχοδιαστολής (βραχείας δράσης β₂-αγωνιστή).
- Σε ασθενείς με σοβαρή απόφραξη των αεραγωγών (FEV₁ μετά τη βρογχοδιαστολή < 60% του προβλεπόμενου φυσιολογικού), με υψηλά επίπεδα βρογχικής υπεραντιδραστικότητας, με μη ελεγχόμενα συμπτώματα άσθματος ή σε φάση παρόξυνσης, θα πρέπει να γίνεται εισπνοή με ισότονο διάλυμα NaCl 0,9% και για μικρότερες χρονικές περιόδους.
- Ο FEV₁ θα πρέπει να μετράται μετά το πέρας κάθε περιόδου εισπνοής του διαλύματος NaCl. Σε περίπτωση που παρατηρηθεί πτώση του FEV₁ ≥ 20% από την αντίστοιχη αρχική, μετά τη βρογχοδιαστολή, τιμή ή παρουσιασθούν συμπτώματα δυσφορίας, θα πρέπει να διακόπτεται η διαδικασία.
- Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας, θα πρέπει να χορηγείται στον ασθενή εισπνεόμενος β₂-αγωνιστής βραχείας δράσης, ιδιαίτερα εάν σημειώθηκε πτώση του FEV₁ >10% από την τιμή αναφοράς. Οι ασθενείς θα πρέπει να παραμένουν στο χώρο που πραγματοποιήθηκε η πρόκληση έως ότου επανέλθει ο FEV₁ στο 5% της τιμής αναφοράς.
- Δεν θα πρέπει να υποβάλλεται ο ίδιος ασθενής σε νέα πρόκληση σε διάστημα μικρότερο των 2 ημερών.

2.4. Κλινικές Εφαρμογές

Η πρόκληση πτυέλου θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως διαγνωστική δοκιμασία για το άσθμα. Όπως είναι γνωστό, το άσθμα συχνά σχετίζεται με ηωσινοφιλία στα πτύελα (δηλαδή ηωσινόφιλα >1%). Συγκεκριμένα, περίπου το 80% των ασθματικών ασθενών που δεν έχουν λάβει στο παρελθόν κορτικοστεροειδή και το 50% των ασθενών που έχουν λάβει τέτοιου τύπου θεραπεία και οι οποίοι εμφανίζουν συμπτώματα, έχουν μη φυσιολογικές τιμές ηωσινοφίλων πτυέλου, με ποσοστό ηωσινοφίλων έως και 50%.²⁷⁷ Έχει βρεθεί επομένως ότι η καταγραφή ηωσινοφιλίας στα πτύελα έχει ευαισθησία >80% και ειδικότητα 95% ως διαγνωστική δοκιμασία άσθματος.²⁷⁸

Επίσης, με τη συμβολή της πρόκλησης πτυέλου έγινε δυνατή η αναγνώριση του μη ηωσινοφιλικού άσθματος, το οποίο συναντάται στο 25-55% των ασθματικών ασθενών που δεν έχουν λάβει στο παρελθόν κορτικοστεροειδή. Η μέτρηση των ηωσινοφίλων πτυέλου μπορεί να αναγνωρίσει έγκαιρα αυτόν τον τύπο άσθματος, του οποίου η θεραπευτική προσέγγιση είναι διαφορετική μιας και εμφανίζει μικρή ανταπόκριση στην αγωγή με κορτικοστεροειδή,³³ σε αντίθεση με το ηωσινοφιλικό άσθμα στο οποίο η ανταπόκριση στα κορτικοστεροειδή είναι πολύ καλή. Βρέθηκε μάλιστα ότι αριθμός ηωσινοφίλων πτυέλου >4% έχει 68% θετική προγνωστική αξία, με 59% ευαισθησία και 76% ειδικότητα, στη βελτίωση του FEV1 >15% μετά από αγωγή διάρκειας 2 εβδομάδων με από του στόματος κορτικοστεροειδή.²⁷⁹ Επίσης, τα ηωσινόφιλα πτυέλου εμφανίζουν θετική συσχέτιση με το βαθμό κλινικής βελτίωσης στη αγωγή με εισπνεόμενα κορτικοστεροειδή.²⁸⁰

Τέλος, σε πρόσφατες μελέτες αναφέρθηκε η σημασία της παρακολούθησης της βρογχικής φλεγμονής μέσω της πρόκλησης πτυέλου στη μείωση των ασθματικών

παροξύνσεων.^{45,281} Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι η αύξηση των ηωσινοφίλων στα πτύελα συμβαίνει πολύ νωρίτερα από την έναρξη παρόξυνσης άσθματος, ενώ η χορήγηση θεραπείας με στόχο τη φυσιολογική τιμή ηωσινοφίλων πτυέλου είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση των ασθματικών παροξύνσεων.^{45,281} Θα μπορούσε επομένως η τεχνική της πρόκλησης πτυέλου να χρησιμοποιηθεί στην εκτίμηση ασθενών με σοβαρό ή ανθεκτικό στην αγωγή άσθμα, καθώς και για τη βελτιστοποίηση της αντιμετώπισής τους.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΣΩΜΑΤΙΚΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ

ΣΤΟ ΜΙΚΡΟΔΟΥΡΥΦΟΡΙΚΟ DNA ΣΕ ΠΑΙΔΙΑ

ΜΕ ΒΡΟΓΧΙΚΟ ΑΣΘΜΑ

3.1. Εισαγωγή

Το άσθμα είναι μία χρόνια φλεγμονώδης νόσος των αεραγωγών με μεγάλη φαινοτυπική και γενετική ετερογένεια.²⁸² Η ποικίλη κληρονομικότητα και η γενετική ετερογένεια σε συνδυασμό με την επίδραση του περιβάλλοντος προκαλούν σημαντικές δυσκολίες στον καθορισμό του γενετικού υπόβαθρου της νόσου, παρά τις εντατικές προσπάθειες οι οποίες έχουν γίνει έως τώρα. Εντούτοις, η χρήση νέων τεχνικών, όπως η ανίχνευση γονιδιώματος (genome scan) και η προσέγγιση μέσω υποψήφιου γονιδίου (candidate gene approach), έχει αποκαλύψει διάφορες περιοχές που περιέχουν γονίδια προδιάθεσης στο άσθμα.^{282,283} Ένας μεγάλος αριθμός μελετών έχει δείξει ότι αρκετές χρωμοσωμικές περιοχές που κωδικοποιούν κυτταροκίνες, φλεγμονώδεις μεσολαβητές και υποδοχείς σχετίζονται με την ατοπία, τη βρογχική φλεγμονή και τη βρογχική υπεραντιδραστικότητα. Οι πιο σημαντικές περιοχές οι οποίες κωδικοποιούν τέτοια γονίδια βρίσκονται στα χρωμοσώματα 5q, 6p, 11q, 13q, 14q και 20p.^{282,283}

Τα τμήματα μικροδορυφορικού (ΜΔ) DNA περιλαμβάνονται ανάμεσα στους πιο εύχρηστους γενετικούς δείκτες χρησιμοποιούμενα σε έναν εντυπωσιακό αριθμό βιολογικών εφαρμογών. Αποτελούνται από μικρές αλληλουχίες DNA (συνήθως 1–5 bp) οι οποίες επαναλαμβάνονται και οι οποίες ανευρίσκονται στο ανθρώπινο γενετικό υλικό σε 100.000 διαφορετικές χρωμοσωμικές περιοχές.²³³ Το ΜΔ DNA στις περισσότερες περιπτώσεις δεν ελέγχει την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων αλλά αποδεδειγμένα παίζει σημαντικό ρόλο στη σταθερότητα του γενετικού υλικού και επηρεάζει διάφορα βιολογικά φαινόμενα, όπως η μεταγραφή και μετάφραση γονιδίων, ο ανασυνδυασμός και η αντιγραφή του DNA και κυρίως το σύστημα επιδιόρθωσης του DNA (DNA mismatch repair system).^{265,284-288} Η Μικροδορυφορική αστάθεια (ΜΔΑ) συμβαίνει όταν οι έλικες του ΜΔ DNA δεν

επιδιορθώνονται λόγω δυσλειτουργίας του συστήματος επιδιόρθωσης του DNA.²⁸⁹ Μία από τις σημαντικότερες αιτίες απενεργοποίησης του συστήματος επιδιόρθωσης του DNA στον άνθρωπο έχει αποδειχθεί ότι είναι το οξειδωτικό στρες, το οποίο εμφανίζεται τόσο σε φλεγμονώδεις παθήσεις, όπως το άσθμα, όσο και σε κακοήθεις παθήσεις.^{289,290}

Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι γενετικές αλλαγές σε ΜΔ δείκτες, όπως η ΜΔ απώλεια της ετεροζυγωτίας (ΑΤΕ) και η ΜΔΑ παρατηρούνται σε διάφορες κακοήθεις^{242,291,292} και καλοήθεις παθήσεις,²⁹³⁻²⁹⁵ όπως η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ),^{260,261} η σαρκοείδωση²⁶³ και η ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση.²⁶⁴ Επιπρόσθετα, πρόσφατες μελέτες του τμήματός μας αποκάλυψαν μεγάλη επίπτωση γενετικών αλλαγών σε επίπεδο ΜΔ DNA σε ασθματικούς ασθενείς, οι οποίες σχετίζονταν με συγκεκριμένα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά της νόσου, όπως οι IgE ανοσοσφαιρίνες και ο ολικός αριθμός των ηωσινοφίλων.²⁶² Ένα από τα ερωτήματα που ενέκυψε από τις μελέτες αυτές σε ασθματικούς ενήλικες^{261,262} ήταν εάν οι μεταλλάξεις αυτές εμφανίζονταν πρώιμα στη φυσική ιστορία του άσθματος ή αργότερα κατά την εξέλιξη της νόσου.

Στόχοι αυτής της μελέτης ήταν να διερευνηθεί εάν επίκτητες γενετικές αλλαγές σε επίπεδο ΜΔ DNA ανιχνεύονται σε ασθματικά παιδιά και να συσχετίσει τις αλλαγές αυτές με την ατοπία, τη βαρύτητα της νόσου και τον αριθμό των ηωσινοφίλων στα πτύελα και το αίμα. Τέλος, συγκρίναμε τη συχνότητα ΜΔΑ ανάμεσα σε ασθματικά παιδιά και ασθματικούς ενήλικες από προηγούμενες μελέτες.

3.2. Υλικά και Μέθοδος

3.2.1. Ασθενείς

Συνολικά συμμετείχαν στη μελέτη 40 παιδιά (26 αγόρια, 14 κορίτσια), 6–17 ετών, με διάγνωση ήπιου ή μέτριου άσθματος και υπό ελεγχόμενη ή μερικά ελεγχόμενη νόσο, σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες του Global Initiative for Asthma (Global Initiative for Asthma Guidelines).¹

Τα **κριτήρια εισαγωγής** στη μελέτη ήταν:

1. παιδιά με ιστορικό άσθματος για ≥ 1 χρόνο και υπό αντιασθματική αγωγή για τουλάχιστον 6 μήνες,
2. κατά τη διάγνωση, είτε μετά τη χορήγηση 200mg εισπνεόμενης σαλβουταμόλης αύξηση του προ της βρογχοδιαστολής δυναμικά εκπνεόμενου όγκου σε 1 δευτερόλεπτο (Forced expiratory volume in 1 sec, FEV₁) $\geq 12\%$ (ή ≥ 200 ml), ή βελτίωση της προ της βρογχοδιαστολής μέγιστης εκπνευστικής ροής (Peak expiratory flow rate, PEF) κατά 60L/min (ή $\geq 20\%$), είτε ημερήσια διακύμανση της PEF $>20\%$ για ≥ 4 ημέρες την εβδομάδα για μία περίοδο 2 εβδομάδων. Όλοι οι ασθενείς λάμβαναν αγωγή είτε με εισπνεόμενα κορτικοστεροειδή (100–500mcg/ημέρα φλουτικαζόνη ή 160–480mcg βουδεσονίδη), ή/και από του στόματος νατριούχο μοντελουκάστη 5–10mg/ημέρα, για τουλάχιστον 6 μήνες πριν την συμμετοχή τους στη μελέτη.

Τα **κριτήρια αποκλεισμού** ήταν τα ακόλουθα:

1. ασθενείς με ενεργό πνευμονική νόσο εκτός από άσθμα (κυστική ίνωση, πρωτοπαθές σύνδρομο δυσκίνητων κροσσών),
2. γαστροοισοφαγική παλινδρόμηση,

3. οποιαδήποτε σοβαρή πάθηση η οποία θα μπορούσε να επηρεάσει τη συμμετοχή τους στη μελέτη (κακοήθεια, συστηματικό νόσημα, ανοσοανεπάρκεια),
4. σοβαρή παρόξυνση άσθματος, δηλαδή επιδείνωση των συμπτωμάτων άσθματος για την οποία απαιτήθηκε αγωγή με από του στόματος ή ενδοφλέβια κορτικοστεροειδή, ή λοίμωξη κατώτερου αναπνευστικού συστήματος ≤ 4 εβδομάδες πριν την εισαγωγή τους στη μελέτη,
5. κακή ή μη συμμόρφωση στην αντιασθματική αγωγή τους.

Η ομάδα ελέγχου (control group) αποτελούταν από 8 υγιείς ενήλικες (3 άντρες, 5 γυναίκες) με μέση ηλικία τα 21 ± 5 έτη, χωρίς ιστορικό άσθματος, αλλεργίας ή καπνίσματος και FEV₁ (% προβλεπόμενη τιμή): 107 ± 9 , δυναμική ζωτική χωρητικότητα [Forced vital capacity, FVC, (% προβλεπόμενη τιμή)]: 108 ± 11 και FEV₁/FVC (%): 83 ± 5 .

3.2.2. Σχεδιασμός Μελέτης

Στην πρώτη επίσκεψη, όλοι οι ασθενείς υποβάλλονταν σε μία αρχική εκτίμηση [ιστορικό άσθματος, ιατρικό ιστορικό, τρέχουσα αντιασθματική αγωγή, ερωτηματολόγιο ελέγχου άσθματος - asthma control questionnaire (ACQ), φυσική εξέταση].^{1,296,297} Μετά την πρώτη επίσκεψη, ακολουθούσε μία περίοδος εισαγωγής στη μελέτη διάρκειας 2 εβδομάδων (run-in-period) κατά τη διάρκεια της οποίας συνέχιζαν να λαμβάνουν τη συνήθη αγωγή τους, ενώ οι γονείς των παιδιών διατηρούσαν ένα ημερολόγιο άσθματος (ημερήσια καταγραφή, daily record card) στο οποίο τα συμπτώματα, η PEF καθώς και η χρήση του φαρμάκου "ανακούφισης" (εισπνεόμενη σαλβουταμόλη κατ' επίκληση) καταγράφονταν δύο φορές την ημέρα. Οι ασθενείς οι οποίοι κατά την περίοδο εισαγωγής εμφάνισαν σοβαρή παρόξυνση

άσθματος ή λοίμωξη κατώτερου αναπνευστικού αποκλείστηκαν από τη μελέτη και μπόρεσαν να επανεισαχθούν σε αυτήν τουλάχιστον 1 μήνα μετά την υποχώρηση των συμπτωμάτων τους.

Μετά την περίοδο εισαγωγής διάρκειας 2 εβδομάδων ακολούθουσε η δεύτερη επίσκεψη κατά την οποία συλλέγονταν δείγματα περιφερικού αίματος από όλους τους ασθενείς και καταγράφονταν ο ολικός αριθμός ηωσινοφίλων και οι ολικές IgE. Στους ασθενείς γινόταν επίσης μέτρηση των ειδικών IgE (Radioallergoabsorbent tests, Rast tests) σε 12 κοινά εισπνεόμενα αλλεργιογόνα: γρασίδι (*Anthoxanthum odoratum*, *Cynodon dactylon*), περδικόχορτο (*Parietaria officinalis*), γύρη ελιάς, μούχλα (*Penicillium notatum*, *Cladosporium herbarum*), ακάρεα οικιακής σκόνης (*Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*), οικιακή σκόνη, και επιθήλιο γάτας και σκύλου. Συμπληρωνόταν το ερωτηματολόγιο ελέγχου του άσθματος (ACQ) και όλοι οι ασθενείς υποβάλλονταν σε σπιρομέτρηση και πρόκληση πτυέλου.

3.2.3. Λειτουργικές Μετρήσεις Πνευμόνων

Σπιρομέτρηση γινόταν πριν και 15 λεπτά μετά την εισπνοή 200mg σαλβουταμόλης, σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες της Αμερικανικής Πνευμονολογικής Εταιρείας (American Thoracic Society guidelines),²⁹⁸ και καταγράφονταν οι βασικές τιμές του FEV₁ και της FVC πριν και μετά τη βρογχοδιαστολή. Εάν η τιμή του FEV₁ μετά τη βρογχοδιαστολή ήταν >65% της προβλεπόμενης φυσιολογικής τότε ο ασθενής προχωρούσε στην πρόκληση πτυέλου.

3.2.4. Πρόκληση Πτυέλου

Μέσω ενός επιστομίου και μίας μεγάλης βαλβίδας διπλής διόδου τα οποία συνδέονταν σε ένα νεφελοποιητή υπερήχων (Ultraneb 2000; DeVilbiss Healthcare, Inc., Somerset, PA) γινόταν εισπνοή ενός αποστειρωμένου διαλύματος υπερτονικού χλωριούχου νατρίου (3,5% NaCl). Ο ασθενής ξέπλενε το στόμα του με νερό για την απομάκρυνση τυχόν υπολειμμάτων καθώς και των πλακωδών επιθηλιακών κυττάρων και έπειτα εισέπνεε υπέρτονο διάλυμα 3,5% NaCl για τέσσερις διαδοχικές περιόδους διάρκειας 5 λεπτών η καθεμία για συνολικό χρόνο 20 λεπτών. Ένα λεπτό μετά από κάθε περίοδο εισπνοής γινόταν σπιρομέτρηση για ανίχνευση πιθανού βρογχόσπασμου. Μετά από κάθε περίοδο εισπνοής, ο ασθενής, αφού ξέπλενε το στόμα του με νερό, ενθαρρυνόταν να βήξει παραγωγικά και το δείγμα πτυέλου συλλεγόταν σ' ένα αποστειρωμένο δοχείο. Το δείγμα πτυέλου διατηρούνταν στους 4°C και γινόταν η επεξεργασία του μέσα σε 2 ώρες. Εάν κατά τη διάρκεια της διαδικασίας ο ασθενής παρουσίαζε συμπτώματα δυσφορίας (βήχα, συριγμό, δύσπνοια), γινόταν διακοπή της πρόκλησης πτυέλου. Εάν κατά τη διάρκεια της διαδικασίας παρατηρούνταν πτώση του $FEV_1 \geq 20\%$ συγκριτικά με την τιμή μετά τη βρογχοδιαστολή (βασική τιμή FEV_1), χορηγούνταν 200mg εισπνεόμενης σαλβουταμόλης και γινόταν διακοπή της πρόκλησης πτυέλου.^{267,299,300}

3.2.5. Επεξεργασία Πτυέλου

Εάν προέκυπτε επαρκές δείγμα πτυέλου, το οποίο να περιείχε τουλάχιστον 0,5ml αδιαφανούς βλεννοκυτταρικού υλικού, το κολλώδες τμήμα του δείγματος της απόχρεμψης διαχωριζόταν από τη σίελο και ακολουθούσε η επεξεργασία του δείγματος σύμφωνα με συγκεκριμένα πρωτόκολλα επεξεργασίας πτυέλου (μέθοδος επιλεγμένου πτυέλου, selected sputum method).^{267,299,300} Συνοπτικά, 0,1%

διθειοθρεϊτόλη (dithiothreitol, DTT) προστίθετο στο δείγμα σε αναλογία 4ml DDT προς 1g πτυέλου και το μίγμα αναδεύεται για 15–30 λεπτά μέχρι την ομογενοποίηση του πτυέλου. Στη συνέχεια, προστίθετο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού άλατος (phosphate buffered saline, PBS) σε αναλογία 4ml PBS προς 1g αρχικού βάρους πτυέλου και το μίγμα αναδεύεται για άλλα 5–10 λεπτά. Στη συνέχεια, το εναιώρημα φιλτράρονταν χρησιμοποιώντας ένα νάιλον πλέγμα διαμέτρου 48mm και φυγοκεντρώνεται στις 400g για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο αναρροφούνται και αποθηκεύεται στους -80°C για μελλοντική ανάλυση. Το κυτταρικό ίζημα από τη φυγοκέντρηση του πτυέλου διαλύεται ξανά σε PBS και γίνονται εκτίμηση της βιωσιμότητας των κυττάρων με την "trypan blue" μέθοδο αποκλεισμού. Γίνονται προσδιορισμός του ολικού αριθμού κυττάρων (total cell count, TCC) χρησιμοποιώντας τον κυτταρομετρητή Neubauer και ετοιμάζονται τα cytospin με το αρχικό διήθημα προσαρμόζοντάς το σε μία συγκέντρωση 1×10^6 κύτταρα/ml.

3.2.6. Κυτταροχημεία

Η διαφορική μέτρηση των κυττάρων (differential cell count, DCC) γίνονται μετά από μέτρηση τουλάχιστον 400 μη πλακωδών κυττάρων σε πλακίδια τα οποία ήταν σταθεροποιημένα σε μεθανόλη και χρωσμένα με May–Grunwald–Giemsa (MGG) και καταγραφόταν ο σχετικός αριθμός των ηωσινοφίλων, ουδετερόφιλων πολυμορφοπύρηνων, μακροφάγων, λεμφοκυττάρων και βρογχικών επιθηλιακών κυττάρων εκφρασμένα ως ποσοστό του συνολικού αριθμού των μη πλακωδών κυττάρων. Το ποσοστό των πλακωδών κυττάρων εκφραζόταν ξεχωριστά και το δείγμα πτυέλου θεωρούνταν κατάλληλο εάν περιείχε $<20\%$ πλακώδη επιθηλιακά κύτταρα.^{262,300} Το κυτταρολογικό προφίλ του πτυέλου καθοριζόταν από δύο

ανεξάρτητους ερευνητές οι οποίοι δεν είχαν γνώση των κλινικών χαρακτηριστικών των ασθενών.

3.2.7. Εκχύλιση DNA

Μέρος του δείγματος πτυέλου και αίματος αποθηκευόταν στους -80°C για εκχύλιση DNA και μελλοντική γενετική ανάλυση. Αναζητούνταν η παρουσία ΜΔΑ και/ή ΑΤΕ στα κύτταρα πτυέλου σε σύγκριση με το DNA προερχόμενο από λευκά αιμοσφαίρια περιφερικού αίματος από τον ίδιο ασθενή.

Η εκχύλιση DNA γινόταν από λευκά αιμοσφαίρια περιφερικού αίματος και από κύτταρα πτυέλου σε κάθε ασθενή, σύμφωνα με συγκεκριμένα πρωτόκολλα (QIAmp DNA Blood Maxi and Mini Kits; QIAGEN, Inc., Valencia, CA).^{261,262} Τα δείγματα DNA αποθηκεύονταν στους -20°C .

3.2.8. Μικροδορυφορικοί Δείκτες, Ανάλυση Μικροδορυφορικής Αστάθειας και Απώλειας της Ετεροζυγωτίας

Για την εκτίμηση της ΜΔΑ και της ΑΤΕ χρησιμοποιήθηκαν δεκατέσσερις πολυμορφικοί ΜΔ δείκτες οι οποίοι εντοπίζονταν στα χρωμοσώματα (chr) 5q, 6p, 11q, 13q και 14q. Οι χρωμοσωμικές αυτές περιοχές θεωρούνται ότι περιέχουν γονίδια προδιάθεσης στο άσθμα και την ατοπία κωδικοποιώντας φλεγμονώδεις κυτταροκίνες, μεσολαβητές ή υποδοχείς που εμπλέκονται στην παθογένεια του άσθματος.³⁰¹⁻³⁰⁵ Οι ΜΔ δείκτες οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν ήταν: D5S207, D5S820, D5S637, D6S344, D6S2223, D6S263, SGC35231, D11S1253, D11S1337, D11S97, USAT24G1, D13S273, D14S258 και D14S292. Οι αλληλουχίες τους ανακτήθηκαν από τη Βάση δεδομένων του Διεθνούς Κέντρου Βιοτεχνολογίας (NCBI database).³⁰⁶ Για την ενίσχυση των αλληλουχιών του DNA χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της αλυσιδωτής

αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Τα ενισχυμένα με PCR τμήματα τοποθετήθηκαν σε αντιδραστήρια τελικού όγκου 50ml σ' ένα TECHNE C-412 θερμικό κυκλοποιητή (MIDSCI, St Louis, MO), χρησιμοποιώντας το Qiagen Taq PCR Core Kit (QIAGEN, Inc.). Τα forward primers σημαίνονταν με το LI-COR IR800 φλουοροχρώμιο (LI-COR, Inc., Lincoln, NE). Το ακόλουθο θερμικό κυκλικό πρωτόκολλο χρησιμοποιήθηκε: 3 λεπτά στους 94°C ακολουθούμενο από 30 κύκλους στους 94°C για 30 δευτερόλεπτα, 55°C για 30 δευτερόλεπτα, 72°C για 30 δευτερόλεπτα και 72°C για 5 λεπτά και ολοκληρωνόταν στους 4°C.

Τα προϊόντα της PCR αναλύθηκαν και οπτικοποιήθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε 8% Long Ranger πολυακρυλαμίδιο (BMA, Rockland, ME)/7M πηκτώματος αλληλουχιών ουρίας (urea sequencing gels) σε ένα LI-COR 4200 DNA sequencer και τα αλληλόμορφα αναλύονταν με το λογισμικό Μικροδορυφορικής ανάλυσης LI-COR Saga GT (Version 3.2, LI-COR, Inc.). Η ΜΔΑ αναγνωριζόταν συγκρίνοντας τα ηλεκτροφορητικά πρότυπα των ΜΔ δεικτών του DNA πτυέλου έναντι του DNA περιφερικού αίματος κάθε ασθενή χρησιμοποιώντας τυποποιημένη μεθοδολογία.^{261,262,295,307}

3.2.9. Στατιστική Ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το GraphPad Prism 5.0 Software. Οι συνεχείς μεταβλητές συνοψίστηκαν ως μέση \pm σταθερή απόκλιση. Το unpaired ή paired t-test χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση διαφορών σε συνεχείς μεταβλητές. Τα Fisher και chi-square tests χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση διαφορών σε ποιοτικές μεταβλητές. Ως στατιστικά σημαντικές θεωρήθηκαν οι τιμές με $p < 0,05$.

3.2.10. Δεοντολογία

Η παρούσα μελέτη εγκρίθηκε από την Επιτροπή Ηθικής και Δεοντολογίας του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου και έντυπο συγκατάθεσης υπογράφηκε από τους γονείς των παιδιών που συμμετείχαν στη μελέτη.

3.3. Αποτελέσματα

Κανένας από τους υγιείς ενήλικες της ομάδας ελέγχου δεν παρουσίασε καμία γενετική αλλαγή στους 14 ΜΔ δείκτες οι οποίοι ελέγχθηκαν, εύρημα το οποίο είναι σε συμφωνία με προηγηθείσες μελέτες σε 152 υγιείς ενήλικες στους οποίους δεν καταγράφηκε καμία γενετική αλλαγή σε επίπεδο ΜΔ DNA.²⁶⁰⁻²⁶⁴ Η μέση ηλικία της ομάδας ελέγχου ήταν 21 ± 5 έτη, ο FEV₁ (% προβλεπόμενη τιμή) ήταν 107 ± 9 , η FVC (% προβλεπόμενη τιμή) ήταν 108 ± 11 και ο λόγος FEV₁/FVC ήταν 83 ± 5 .

Συνολικά, 40 ασθματικά παιδιά συμμετείχαν στη μελέτη, 38 δέχτηκαν να υποβληθούν σε πρόκληση πτυέλου και επαρκές DNA πτυέλου (ποσοτικά και ποιοτικά) ανακτήθηκε σε 27 από τα 38. Τα κλινικά χαρακτηριστικά των 27 παιδιών στα οποία έγινε γενετική ανάλυση φαίνονται στον Πίνακα 1. Η μέση τιμή του FEV₁ (% προβλεπόμενη) ήταν $112,9 \pm 13,5$, της ηλικίας των ασθενών ήταν $10,8 \pm 2,5$ έτη ενώ της διάρκειας της νόσου ήταν ~8 έτη. Όλοι οι ασθενείς είχαν θετικό οικογενειακό ιστορικό ατοπίας, 77,8% είχαν αλλεργική ρινίτιδα, 51,9% είχαν έκζεμα και 74,1% είχαν είτε θετικό τεστ ειδικών IgE (Rast test) σε τουλάχιστον ένα αλλεργιογόνο είτε ολικό αριθμό IgE >160IU/ml. Όλοι οι ασθενείς λάμβαναν αγωγή με εισπνεόμενα κορτικοστεροειδή (μέση δόση $287,8 \pm 163,7$ mcg/ημέρα).

Στον Πίνακα 2 συνοψίζονται οι γενετικές αλλαγές ανά ΜΔ δείκτη και χρωμοσωμική περιοχή στον παιδιατρικό πληθυσμό. Πέντε από τα 27 παιδιά (18,5%) εμφάνισαν ΜΔΑ ή ΑΤΕ στα κύτταρα πτυέλου έναντι των δειγμάτων αίματος

(Πίνακας 2), από τα οποία 3 στο ΜΔ δείκτη USAT24G1 (χρ 13q14.1), 1 στο ΜΔ δείκτη D14S258 (χρ 14q23-q24.3) και 1 στον ΜΔ δείκτη D5S637 (χρ 5q12-q13), (Πίνακας 2). Η Εικόνα 1 απεικονίζει αντιπροσωπευτικές εικόνες πηκτώματος (gel) ΜΔΑ και ΑΤΕ στον ΜΔ δείκτη D14S258.

Τέλος, δεδομένου και του μικρού αριθμού ασθματικών παιδιών με γενετική ΜΔΑ, δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στα παιδιά με ή χωρίς γενετικές αλλαγές στη διάρκεια της νόσου ($p = 0,84$), τη βαρύτητα της νόσου ($p = 0,85$), τον ολικό αριθμό ηωσινοφίλων αίματος ($p = 0,69$), τον ολικό αριθμό ηωσινοφίλων πτυέλου ($p = 0,47$) ή τον ολικό αριθμό λεμφοκυττάρων πτυέλου ($p = 0,47$), (Πίνακας 3).

ΠΙΝΑΚΑΣ 1

ΚΛΙΝΙΚΑ, ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΑ & ΣΠΙΡΟΜΕΤΡΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΑΣΘΜΑΤΙΚΩΝ ΠΑΙΔΙΩΝ	
Ασθενείς, n	27
Φύλλο, Α/Θ	18/9
Ηλικία (έτη)	10,8 ± 2,5
Διάρκεια άσθματος (έτη)	8,1 ± 4
FEV ₁ (% προβλ.)	112,9 ± 13,5
% Αναστρεψιμότητα από βασική τιμή FEV ₁ (μετά τη χορήγηση β ₂ αγωνιστή)	2,7 ± 7
Εισπνεόμενα κορτικοστεροειδή (mcg/ημέρα)	287,8 ± 163,7
Αλλεργική ρινίτιδα, n (%)	21 (77,8)
Έκζεμα, n (%)	14 (51,9)
Οικογενειακό ιστορικό ατοπίας, n (%)	27 (100)
Θετικά τεστ ειδικών IgE (Rast test), n (%)	12 (44,4)
Ολικές IgE ορού (IU/ml)	248,2 ± 341,7
Ολικός αριθμός ηωσινοφίλων ορού (%)	4,4 ± 2,6
Ολικός αριθμός ηωσινοφίλων πτυέλου (%)	1,2 ± 0,1

Τα στοιχεία παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερά απόκλιση (SD), εκτός εάν δηλώνεται κάτι διαφορετικό.

FEV₁: δυναμικά εκπνεόμενος όγκος σε 1 δευτερόλεπτο; (% προβλ.): ποσοστό της προβλεπόμενης τιμής; *Εισπνεόμενα κορτικοστεροειδή*: εισπνεόμενη βουδεσονίδη ή ισοδύναμη ουσία; *IgE*: ε ανοσοσφαιρίνη.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2: Περιστατικά Θετικά για Μικροδορυφορική Αστάθεια (ΜΔΑ) και Απώλεια της Ετεροζυγωτίας (ΑΤΕ) Ανά Μικροδορυφορικό (ΜΔ) Δείκτη και Χρωμοσωμική Περιοχή στον Παιδιατρικό Πληθυσμό (n=27)

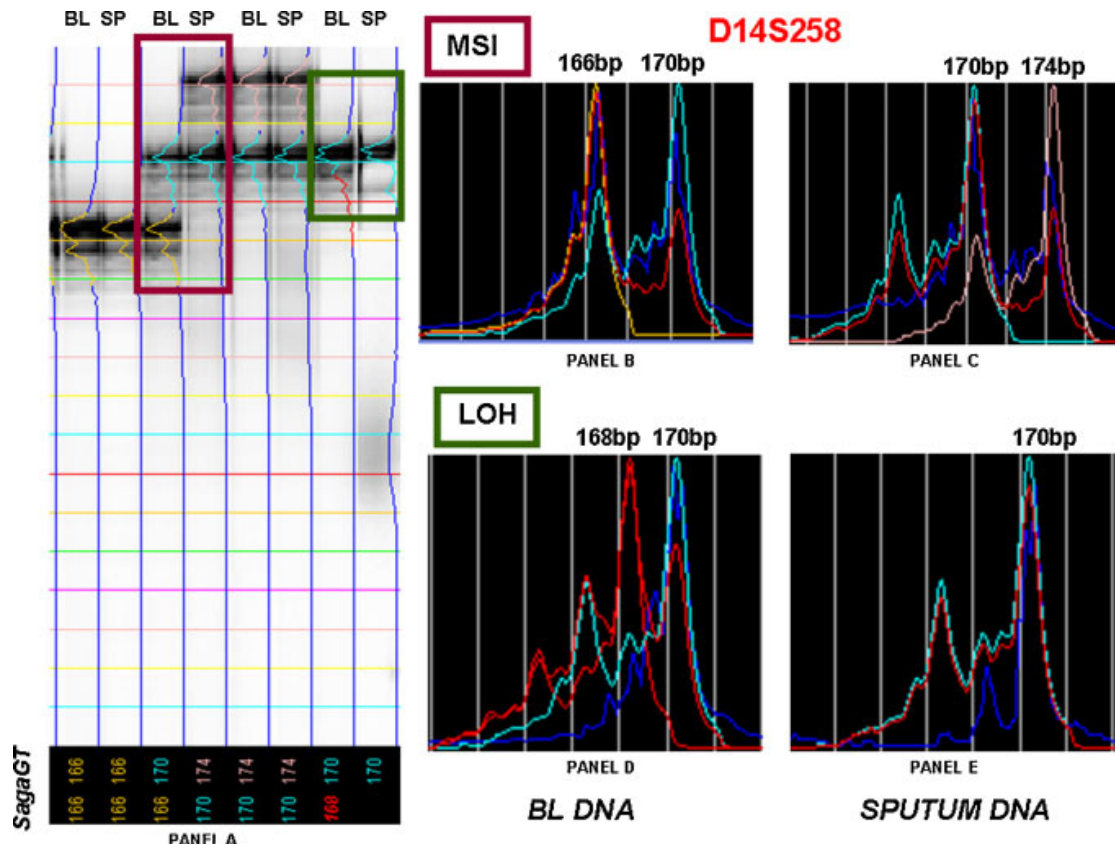
ΜΔ ΔΕΙΚΤΗΣ	ΧΡΩΜΟΣΩΜΑ	ΜΔΑ (n)	ΑΤΕ (n)
D5S207	5q31.3-5q33.3	0	0
D5S637	5q12-13	0	1
D5S820	5q31.3-5q33.3	0	0
D6S344	6p25	0	0
D6S2223	6p22	0	0
D6S263	6p24	0	0
SGC35231	11q.13	0	0
D11S1253	11q13.1-11q13.4	0	0
D11S1337	11q13.4	0	0
D11S97	11q13	0	0
USAT24G1	13q14.1	1	2
D13S273	13q.14.3-21.1	0	0
D14S258	14q23-14q24.3	1	0
D14S292	14q32	0	0

ΠΙΝΑΚΑΣ 3: Σύγκριση των Κλινικών και Εργαστηριακών Στοιχείων των Ασθματικών Παιδιών Με ή Χωρίς Γενετικές Αλλαγές

	ΧΩΡΙΣ ΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΑΛΛΑΓΕΣ	ΜΕ ΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΑΛΛΑΓΕΣ	P
Ασθενείς (n)	22	5	—
Φύλο, Α/Θ	16/6	2/3	—
Ηλικία (έτη)	11 ± 2,7	9,7 ± 1,2	0,29
Διάρκεια άσθματος (έτη)	7,8 ± 4,4	8,4 ± 1,2	0,84
FEV ₁ (% προβλ.)	113,2 ± 15,5	111,8 ± 17,3	0,85
% Αναστρεψιμότητα από βασική τιμή FEV ₁ (μετά τη χορήγηση β ₂ αγωνιστή)	4,2 ± 6,1	-3,2 ± 7,3	0,3
Αλλεργική ρινίτιδα, n (%)	17 (77,3)	4 (80)	1
Έκζεμα, n (%)	12 (54,5)	2 (40)	0,65
Οικογενειακό ιστορικό ατοπίας, n (%)	22 (100)	5 (100)	—
Ολικός αριθμός ηωσινοφίλων ορού	341 ± 215,3	300 ± 141,4	0,69
Ολικός αριθμός ηωσινοφίλων πτυέλου	1,3 ± 1,5	0,75 ± 0,5	0,47
Ολικός αριθμός λεμφοκυττάρων πτυέλου	1 ± 1	1,4 ± 1,5	0,47

Τα στοιχεία παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερά απόκλιση (SD), εκτός εάν δηλώνεται κάτι διαφορετικό.

FEV₁: δυναμικά εκπνεόμενος όγκος σε 1 δευτερόλεπτο; (% προβλ.): ποσοστό της προβλεπόμενης τιμής.



Εικόνα 1

Panel A: Αντιπροσωπευτική εικόνα πηκτώματος (gel) που απεικονίζει μικροδορυφορική αστάθεια του DNA (ΜΔΑ) και απώλεια της ετεροζυγωτίας (ΑΤΕ) στο μικροδορυφορικό δείκτη D14S258 μετά από ανάλυση με το πρόγραμμα LI-COR Saga GT Microsatellite Analysis Software. Το αναμενόμενο μέγεθος του προϊόντος της PCR για τον τόπο D14S258 είναι ανάμεσα σε 160 και 182 bp (NCBI UniSTS: 64714). Ξεκινώντας από τα 160 bp το πρόγραμμα Saga βάζει έγχρωμες γραμμές κάθε 2 bp, παρέχοντας το ακριβές μέγεθος κάθε αλληλομόρφου.

Panels B και C: Παράδειγμα μικροδορυφορικής αστάθειας του DNA. Κάθε αλληλόμορφο χαρακτηρίζεται σύμφωνα με το μέγεθός του. Το δείγμα DNA αίματος (**Panel B**), δείχνει ένα αλληλόμορφο στα 166 bp, χρωματισμένο κίτρινο (μαζί με το αντίστοιχο peak του) και το άλλο είναι στα 170 bp, χρωματισμένο γαλάζιο. Αντιθέτως, το δείγμα DNA πτυέλου (**Panel C**), είναι παρεκτοπισμένο δείχνοντας

ξεκάθαρα την αστάθεια. Το πρώτο αλληλόμορφο είναι στα 170 bp (χρωματισμένο γαλάζιο) και το δεύτερο στα 174 bp (ροζ).

Panels D και E: Παράδειγμα ATE. Στο δείγμα DNA αίματος (**Panel D**), το ένα αλληλόμορφο είναι στα 168 bp, χρωματισμένο κόκκινο, και το δεύτερο στα 170 bp, χρωματισμένο γαλάζιο. Αντιθέτως, στο δείγμα DNA πτυέλου (**Panel E**), το πρώτο αλληλόμορφο λείπει ενώ το άλλο εντοπίζεται στα 170 bp (χρωματισμένο επίσης γαλάζιο). Όσο μεγαλύτερα τα peaks τόσο πιο ενισχυμένη είναι η αλληλουχία. Χαμηλότερα peaks φαίνονται μόνο από τα προϊόντα της αντίδρασης.

BL: δείγμα DNA περιφερικού αίματος; S: δείγμα DNA πτυέλου; bp: ζεύγος βάσεων.

3.4. Συζήτηση

Σύμφωνα με την έως τώρα γνώση μας, αυτή είναι η πρώτη μελέτη η οποία διερευνά τις σωματικές γενετικές αλλαγές σε επίπεδο ΜΔ DNA σε ασθματικά παιδιά. Βρήκαμε ότι επίκτητες σωματικές μεταλλάξεις στο ΜΔ DNA σε χρωμοσωμικές περιοχές που σχετίζονται με την παθογένεια του άσθματος ανιχνεύονται σε ασθματικά παιδιά. Οι αλλαγές αυτές φαίνεται να είναι λιγότερο συχνές σε ασθματικά παιδιά σε σύγκριση με ασθματικούς ενήλικες από προηγούμενες μελέτες. Λόγω του περιορισμένου αριθμού των ασθματικών παιδιών (με ή χωρίς γενετικές αλλαγές) δεν φαίνεται να υπάρχει συσχέτιση των σωματικών μεταλλάξεων με συγκεκριμένα κλινικά και ανοσολογικά χαρακτηριστικά της νόσου στην παρούσα μελέτη.

Σημαντικά στοιχεία από μελέτες σε οικογένειες (family based studies) και μοντέλα ζώων έχουν δείξει ότι το άσθμα έχει ισχυρό γενετικό υπόβαθρο. Πολλοί ερευνητές έχουν προσπαθήσει να αναγνωρίσουν ειδικά γονίδια και συγκεκριμένους πολυμορφισμούς που καθορίζουν την κληρονομική προδιάθεση στη νόσο.³⁰⁸⁻³¹⁰ Σε μία πρόσφατη ανασκόπηση της βιβλιογραφίας αναγνωρίστηκαν περισσότερες από 100 καταγραφές γενετικών παραλλαγών που σχετίζονταν με το άσθμα και τα χαρακτηριστικά του.³¹¹

Παρ' όλα αυτά, ο ρόλος των επίκτητων σωματικών μεταλλάξεων στην παθογένεια του παιδικού άσθματος δεν έχει λάβει μεγάλο ενδιαφέρον. Αυτού του είδους οι γενετικές αλλαγές έχουν καταγραφεί και σε χρόνιες φλεγμονώδεις παθήσεις, όπως η ΧΑΠ και το άσθμα των ενηλίκων.^{260-262,295} Οι επίκτητες σωματικές αλλαγές θεωρούνται σποραδικές αλλαγές σε γονίδια ή περιοχές ελέγχου γονιδίων οι οποίες συμβαίνουν αυθόρμητα και σπάνια.

Οι σωματικές μεταλλάξεις δεν επηρεάζουν τη βλαστική σειρά και δεν είναι κληρονομήσιμες, αν και η προδιάθεση στην εμφάνιση τέτοιου τύπου μεταλλάξεων

μπορεί να ελέγχεται από κληρονομούμενα γονίδια.²⁸⁴⁻²⁸⁷ Παρ' όλα αυτά, η συχνότητα των σωματικών μεταλλάξεων αυξάνει δραματικά σε ιστούς που εκτίθενται σε επαναλαμβανόμενες εξωγενείς μεταλλαξιογόνες επιδράσεις, όπως το οξειδωτικό στρες και το κάπνισμα,^{266,289,312,313} με αποτέλεσμα τη μειωμένη δραστηριότητα του συστήματος επιδιόρθωσης του DNA (MMR system). Κατά τη διάρκεια της ζωής, η ακεραιότητα του γονιδιώματος υπόκειται σε διάφορους τύπους επίκτητης βλάβης του DNA, τόσο από εξωγενή (π.χ. υπεριώδες φως, ιονίζουσα ακτινοβολία, τοξικές χημικές ουσίες, καπνός τσιγάρου), όσο και από ενδογενή αίτια [π.χ. προϊόντα φυσιολογικού μεταβολισμού, όπως δραστικές μορφές οξυγόνου - reactive oxygen species (ROS) και ελεύθερες ρίζες]. Αυτές οι κριτικές βλάβες του DNA μπορεί να προκαλέσουν κυτταρικό θάνατο ή ποικίλες γενετικές αλλαγές, όπως για παράδειγμα διαγραφή και μετάθεση γονιδίων, ΜΔΑ και ΑΤΕ.²⁸⁹ Σε φυσιολογικές συνθήκες, τα κύτταρα είναι εξοπλισμένα με μηχανισμούς επιδιόρθωσης οι οποίοι αφαιρούν τη βλάβη και αποκαθιστούν το DNA. Παρ' όλα αυτά, το αυξημένο συνεχές οξειδωτικό στρες μπορεί να απενεργοποιήσει το σύστημα επιδιόρθωσης του DNA (MMR) στον άνθρωπο οδηγώντας σε επίκτητες μεταλλάξεις.²⁸⁹ Αυτές οι μεταλλάξεις αλλοιώνουν μόνιμα την ικανότητα αυτοεπιδιόρθωσης του DNA, με αποτέλεσμα την αστάθεια του γονιδιώματος. Μελέτες σε κυτταρικές σειρές στον άνθρωπο κατέγραψαν αύξηση των ΜΔ μεταλλάξεων έως και 27 φορές μετά από οξειδωτική βλάβη του DNA.³⁰⁷

Η εκτίμηση της ΜΔΑ και της ΑΤΕ σε δείγματα προκλητών πτυέλων έχει προσφέρει ένα αξιόπιστο μέσο για τη μελέτη επίκτητων μεταλλάξεων.^{260-264,295,307} Στην παρούσα μελέτη, τα παιδιά ανέχθηκαν καλά τη διαδικασία και λήφθηκε επαρκές δείγμα πτυέλου για γενετική ανάλυση στο 72% των ασθενών (μέσης ηλικίας 10 ετών). Αυτό αποτελεί σημαντική πληροφορία για το ότι η πρόκληση πτυέλου είναι μία μέθοδος εύκολη στην εφαρμογή της, μη επεμβατική και ασφαλής για γενετικές

μελέτες στα παιδιά. Επιπλέον, σε μία πρόσφατη μελέτη, η Παπαδοπούλη και συνεργάτες³⁰⁰ έδειξαν ότι οι κυτταρικοί πληθυσμοί στα πτύελα δεν διέφεραν ανάμεσα σε ενήλικες με άσθμα από την ενήλικη ζωή και σε ασθματικά παιδιά. Αυτό αποτελεί υποστηρικτικό στοιχείο ότι η διαφορά στις γενετικές ανωμαλίες ανάμεσα σε ενήλικες και παιδιά οι οποίες βρέθηκαν στην παρούσα μελέτη δεν σχετίζεται με διαφορές στα κύτταρα πτυέλου.

Από τα 27 ασθματικά παιδιά τα οποία συμμετείχαν στη μελέτη, 5 (18,5%) παρουσίασαν ΜΔΑ ή ΑΤΕ στους 14 ΜΔ δείκτες που ελέγχθηκαν σε κύτταρα πτυέλου έναντι δειγμάτων αίματος, επιβεβαιώνοντας έτσι ότι επίκτητες γενετικές αλλαγές ανιχνεύονται ακόμα και σε ασθματικά παιδιά. Ο δείκτης USAT24G1, ο οποίος εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 13q14.1 και ο οποίος σταθερά συνδέεται με την ατοπία και τις ολικές IgE ορού,^{224,314} ήταν ο δείκτης ο οποίος συχνότερα εμφάνισε είτε ΜΔΑ είτε ΑΤΕ στα παιδιά (τρεις ασθενείς). Καμία διαφορά δεν βρέθηκε σε φαινοτυπικούς δείκτες, όπως η διάρκεια και η βαρύτητα της νόσου, ο ολικός αριθμός ηωσινοφίλων ορού ή ο αριθμός ηωσινοφίλων πτυέλου, ανάμεσα σε παιδιά με ή χωρίς ΜΔΑ ή ΑΤΕ (Πίνακας 3). Παρ' όλα αυτά, θα πρέπει να αναφερθεί ότι μεγαλύτερος αριθμός ασθενών απαιτείται για την εκτίμηση πιθανών διαφορών σε φαινοτυπικές μεταβλητές, δεδομένου της μεγάλης τυπικής απόκλισης των φαινοτυπικών μεταβλητών σε συνδυασμό με το μικρό αριθμό των ασθματικών παιδιών με γενετικές αλλαγές (μόνο πέντε ασθενείς στη μελέτη μας).

Σε προηγούμενη μελέτη του τμήματός μας σε 22 ασθματικούς ενήλικες αναφέρεται ότι 13 από τους 22 (59%) ασθματικούς ενήλικες παρουσίασαν ΜΔΑ και/ή ΑΤΕ.²⁶² Εντούτοις, στην παρούσα μελέτη καταγράψαμε σημαντικά μικρότερη επίπτωση γενετικών αλλαγών σε ασθματικά παιδιά σε σύγκριση με ασθματικούς ενήλικες. Μία ελκυστική υπόθεση θα μπορούσε να είναι ότι η υψηλή επίπτωση των

αλλαγών του ΜΔ DNA που ανιχνεύτηκαν σε ασθματικούς ενήλικες ίσως είναι το αποτέλεσμα συσσωρευμένων επίκτητων σωματικών μεταλλάξεων κατά τη διάρκεια της φυσικής πορείας της νόσου. Πιθανά η παρουσία χρόνιου οξειδωτικού στρες, του οποίου η μεταλλαξιόγonos επίδραση στο γονιδίωμα του ανθρώπου είναι γνωστή, να είναι απαραίτητη για την πρόκληση βλάβης στο DNA και την επακόλουθη απενεργοποίηση του συστήματος επιδιόρθωσης του DNA (MMR) με αποτέλεσμα τη ΜΔΑ.^{224,266,289,290,312-315}

Σε συμφωνία με αυτήν την υπόθεση, ο Μακρής και συνεργάτες³¹⁶ πρόσφατα ανέφεραν σημαντική συσχέτιση της συχνότητας της ΜΔΑ και των παροξύνσεων ΧΑΠ κατά τη διάρκεια μίας περιόδου 3 χρόνων. Οι συγγραφείς βρήκαν ότι ασθενείς με ΧΑΠ οι οποίοι εμφάνισαν ΜΔΑ παρουσίασαν σημαντικά αυξημένη συχνότητα παροξύνσεων συγκριτικά με ασθενείς οι οποίοι δεν εμφάνισαν ΜΔΑ, ιδιαίτερα παροξύνσεις μεγαλύτερης βαρύτητας, υποδεικνύοντας πιθανή συσχέτιση μεταξύ παραλλαγμένου συστήματος επιδιόρθωσης του DNA και οξειδωτικής βλάβης του DNA λόγω των συχνών παροξύνσεων της νόσου ή αντίστροφα.³¹⁶

Για την επιβεβαίωση της υπόθεσης αυτής σκοπεύουμε να επανεκτιμήσουμε μετά από αρκετά χρόνια τα ίδια ασθματικά παιδιά χρησιμοποιώντας τους ίδιους ΜΔ δείκτες, με σκοπό να δούμε κατά πόσο η επίπτωση της ΜΔΑ ή της ΑΤΕ θα αυξηθεί με την πρόοδο της νόσου.

Κριτική των Μεθόδων

Ο μικρός αριθμός των ασθενών και των ΜΔ δεικτών που εξετάστηκαν θα μπορούσαν να αποτελούν περιορισμούς για τη μελέτη. Παρ' όλα αυτά, η επιστράτευση παιδιατρικών ασθενών και πόσο μάλλον υγιών παιδιών για επεμβατικές ή ημι-επεμβατικές τεχνικές θέτει τεχνικά και ηθικά θέματα τα οποία περιορίσαν τον

τελικό αριθμό των ασθενών που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη μας (π.χ. από ένα σύνολο 40 ασθματικών παιδιών που συμμετείχαν στη μελέτη, επαρκές δείγμα DNA σε ποιότητα και ποσότητα εκχυλίστηκε μόνο από 27 ασθματικά παιδιά).

Αναγνωρίζουμε επίσης ότι σε αυτήν τη μελέτη δεν συμπεριλήφθηκαν υγιή παιδιά ως ομάδα ελέγχου (control group). Παρ' όλα αυτά συμπεριλήφθηκε μία μικρή ομάδα οκτώ υγιών νέων ενηλίκων. Λαμβάνοντας υπόψη πρακτικά και ηθικά θέματα, όπως την απουσία εκκρίσεων σε φυσιολογικά παιδιά και το γεγονός ότι η πρόκληση πτυέλου είναι μία μέτρια αλλά παρ' όλα αυτά επεμβατική μέθοδος, η συμμετοχή υγιών παιδιών σαν ομάδα ελέγχου παρουσίαζε σημαντικά ηθικά προβλήματα. Ωστόσο, προηγούμενες μελέτες σε 152 υγιείς ενήλικες δεν κατέγραψαν καμία γενετική αλλαγή σε επίπεδο ΜΔ DNA.²⁶⁰⁻²⁶⁴

3.5. Μελλοντικές Προοπτικές

Συμπερασματικά, καταγράψαμε επίκτητες σωματικές αλλαγές (ΜΔΑ και/ή ΑΤΕ) σε παιδιά με άσθμα, αν και σε μικρότερη συχνότητα συγκριτικά με ασθματικούς ενήλικες. Αυτά τα ευρήματα θα μπορούσαν να προάγουν την υπόθεση ότι επιγενετικοί παράγοντες (π.χ. οξειδωτικό στρες, έκθεση σε αλλεργιογόνα, χρόνια φλεγμονή κ.α.) κατά τη διάρκεια της φυσικής πορείας του άσθματος έχουν τη δυνατότητα να προκαλούν επίκτητες σωματικές μεταλλάξεις του DNA. Επομένως, θα ήταν ενδιαφέρον να λάβουμε υπόψη μας, όχι μόνο την κληρονομούμενη γενετική προδιάθεση στο άσθμα, αλλά και τις σωματικές μεταλλάξεις στην παθοβιολογία και φυσική ιστορία της νόσου. Μελλοντική έρευνα, συμπεριλαμβάνοντας μεγαλύτερες και πιο μακροχρόνιες μελέτες, καθώς και επανεκτίμηση της ομάδας των παιδιατρικών ασθενών μετά από κάποια χρόνια, θα επιβεβαιώσει την υπόθεσή μας αυτή.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. *Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary.* **Bateman ED, Hurd SS, Barnes PJ, et al.** Eur Respir J 2008, Vol. 31, pp. 143–178.
2. *Clinical phenotypes of asthma.* **EH., Bel.** Curr Opin Pulm Med 2004, Vol. 10, pp. 44–50.
3. *A systematic review and meta-analysis of interventions used to reduce exposure to house dust and their effect on the development and severity of asthma.* **MacDonald C, Sternberg A, Hunter PR.** Environ Health Perspect 2007, Vol. 115, pp. 1691–95.
4. *US Environmental Protection Agency. America's Children and the Environment. Available at: http://yosemite.epa.gov/ochp/ochpweb.nsf/content/respiratory_diseases.htm. Accessed July 9, 2007.*
5. *Worldwide variations in the prevalence of asthma symptoms: the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC).* Eur Respir J 1998, Vol. 12, pp. 315-35.
6. *Physician-diagnosed asthma and drug utilization in the European Community Respiratory Health Survey.* **Janson C, Chinn S, Jarvis D, Burney P.** Eur Respir J 1997, Vol. 10, pp. 1795-802.
7. *Gender differences in asthma development and progression.* **DS., Postma.** Gend Med 2007, Vol. 4 (suppl B), pp. S133–46.
8. *Asthma.* **A E Tattersfield, A J Knox, J R Britton, I P Hall.** Lancet 2002, Vol. 360, pp. 1313-22.
9. *National Hospital Discharge Survey: 2002 annual summary with detailed diagnosis and procedure data.* **Kozak LJ, Owings MF, Hall MJ.** Vital Health Stat 13. 2005, Vol. 158, pp. 1–199.
10. *Physician-diagnosed asthma and drug utilization in the European Community Respiratory Health Survey.* **Janson C, Chinn S, Jarvis D, Burney P.** Eur Respir J 1997, Vol. 10, pp. 1795–802.

11. *Urbanization and childhood asthma: an African perspective.* **EG., Weinberg. J** Allergy Clin Immunol 2000, Vol. 105, pp. 224-31.
12. *Prevalence of childhood asthma, rhinitis and eczema in Scandinavia and Eastern Europe.* **Bjorksten B, Dumitrascu D, Foucard T, et al.** Eur Respir J 1998, Vol. 12, pp. 432-37.
13. *Asthma mortality and hospitalization among children and young adults: United States, 1980-1993.* MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 1996, Vol. 45(17), pp. 350-353.
14. *The prevalence and incidence of asthma and asthma-like symptoms in a general population sample.* **Dodge RR, Burrows B.** Am Rev Respir Dis 1980, Vol. 122, pp. 567-75.
15. *Factors in childhood as predictors of asthma in adult life.* **Jenkins MA, Hopper JL, Bowes G, Carlin JB, Flander LB, Giles.** BMJ 1994, Vol. 309, pp. 90-93.
16. *Perennial allergen sensitisation early in life and chronic asthma in children: a birth cohort study.* **Illi S, von Mutius E, Lau S, Niggemann B, Gruber C, Wahn U.** Lancet 2006, Vol. 368, pp. 763-70.
17. *Wheezy babies—wheezy adults? Review on long-term outcome until adulthood after early childhood wheezing.* **Piippo-Savolainen E, Korppi M.** Acta Paediatr 2008, Vol. 97, pp. 5-11.
18. *A 15-year follow-up study of ventilatory function in adults with asthma.* **Lange P, Parner J, Vestbo J, Schnohr P, Jensen G.** N Engl J Med 1998, Vol. 339, pp. 1194-200.
19. *Pathology of asthma.* **JC., Hogg.** J Allergy Clin Immunol 1993, Vol. 92, pp. 1-5.
20. *What is the relationship between airway hyperresponsiveness and atopy?* **Woolcock AJ, Peat J.** Am J Respir Crit Care Med 2000, Vol. 161, pp. 215S-217.
21. *New insights into the relationship between airway inflammation and asthma.* **Wardlaw AJ, Brightling CE, Green R, Woltmann G, Bradding P, Pavord ID.** Clin Sci (Lond) 2002, Vol. 103, pp. 201-11.

22. *Mast-cell infiltration of airway smooth muscle in asthma.* **Brightling CE, Bradding P, Symon FA, Holgate ST, Wardlaw AJ, Pavord ID.** N Engl J Med 2002, Vol. 346, pp. 1699–705.
23. *Airway hyperresponsiveness is dissociated from airway wall structural remodeling.* **Siddiqui S, Mistry V, Doe C, et al.** J Allergy Clin Immunol 2008, Vol. 122, pp. 335–41.
24. *Inflammatory subtypes in asthma: assessment and identification using induced sputum.* **Simpson JL, Scott R, Boyle MJ, Gibson PG.** Respirology 2006, Vol. 11, pp. 54–61.
25. *Innate immune activation in neutrophilic asthma and bronchiectasis.* **Simpson JL, Grissell TV, Douwes J, Scott RJ, Boyle MJ, Gibson PG.** Thorax 2007, Vol. 62, pp. 211–18.
26. *Noneosinophilic asthma: a distinct clinical and pathologic phenotype.* **Haldar P, Pavord ID.** J Allergy Clin Immunol 2007, Vol. 119, pp. 1043–52.
27. *Molecular phenotyping of severe asthma using pattern recognition of bronchoalveolar lavage-derived cytokines.* **Brasier AR, Victor S, Boetticher G, et al.** J Allergy Clin Immunol 2008, Vol. 121, pp. 30–37.
28. *Factor analysis in the Genetics of Asthma International Network family study identifies five major quantitative asthma phenotypes.* **Pillai SG, Tang Y, van den Oord E, et al.** Clin Exp Allergy 2008, Vol. 38, pp. 421–29.
29. *Severe asthma in adults: what are the important questions?* **Chanez P, Wenzel SE, Anderson GP, et al.** J Allergy Clin Immunol 2007, Vol. 119, pp. 1337–48.
30. *The Melbourne Asthma Study: 1964-1999.* **Phelan PD, Robertson CF, Olinsky A.** J Allergy Clin Immunol 2002, Vol. 109, pp. 189–94.
31. *Evidence that severe asthma can be divided pathologically into two inflammatory subtypes with distinct physiologic and clinical characteristics.* **Wenzel SE, Schwartz LB, Langmack EL, et al.** Am J Respir Crit Care Med 1999, Vol. 160, pp. 1001–08.

32. *Airway inflammation assessed by invasive and noninvasive means in severe asthma: eosinophilic and noneosinophilic phenotypes.* **Lemiere C, Ernst P, Olivenstein R, et al.** *J Allergy Clin Immunol* 2006, Vol. 118, pp. 1033–39.
33. *Non-eosinophilic corticosteroid unresponsive asthma.* **Pavord ID, Brightling CE, Woltmann G, Wardlaw AJ.** *Lancet* 1999, Vol. 353, pp. 2213–14.
34. *Variable p-CREB expression depicts different asthma phenotypes.* **Chiappara G, Chanez P, Bruno A, et al.** *Allergy* 2007, Vol. 62, pp. 787–94.
35. *Association of the RIP2 gene with childhood atopic asthma.* **Nakashima K, Hirota T, Suzuki Y, et al.** *Allergol Int* 2006, Vol. 55, pp. 77–83.
36. *Diminished lipoxin biosynthesis in severe asthma.* **Levy BD, Bonnans C, Silverman ES, Palmer LJ, Marigowda G, Israel E.** *Am J Respir Crit Care Med* 2005, Vol. 172, pp. 824–30.
37. *Reversing the defective induction of IL-10-secreting regulatory T cells in glucocorticoid-resistant asthma patients.* **Xystrakis E, Kusumakar S, Boswell S, et al.** *J Clin Invest* 2006, Vol. 116, pp. 146–55.
38. *TH2 and 'TH2-like' cells in allergy and asthma: pharmacological perspectives.* **Anderson GP, Coyle AJ.** *Trends Pharmacol Sci* 1994, Vol. 15, pp. 324–32.
39. *Interleukin-4 is required for the induction of lung Th2 mucosal immunity.* **Coyle AJ, Le Gros G, Bertrand C, et al.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995, Vol. 13, pp. 54–59.
40. *Changes in chromatin accessibility across the GM-CSF promoter upon T cell activation are dependent on nuclear factor kappaB proteins.* **Holloway AF, Rao S, Chen X, Shannon MF.** *J Exp Med* 2003, Vol. 197, pp. 413–23.
41. *The balance between plasmacytoid DC versus conventional DC determines pulmonary immunity to virus infections.* **Smit JJ, Lindell DM, Boon L, Kool M, Lambrecht BN, Lukacs NW.** *PLoS ONE* 2008, Vol. 3, p. e1720.
42. *In vivo depletion of lung CD11c+ dendritic cells during allergen challenge abrogates the characteristic features of asthma.* **van Rijt LS, Jung S, Kleinjan A, et al.** *J Exp Med* 2005, Vol. 201, pp. 981–91.

43. *Endotyping asthma: new insights into key pathogenic mechanisms in a complex, heterogeneous disease.* **Anderson, Gary P.** Lancet 2008, Vol. 372, pp. 1107–19.
44. *External validity of randomised controlled trials in asthma: to whom do the results of the trials apply?* **Travers J, Marsh S, Williams M, et al.** Thorax 2007, Vol. 62, pp. 219–23.
45. *Asthma exacerbations and sputum eosinophil counts: a randomised controlled trial.* **Green RH, Brightling CE, McKenna S, et al.** Lancet 2002, Vol. 360, pp. 1715–21.
46. *Search for quantitative trait loci of atopy-associated immune responses using allergen-specific IgG1 as an “endophenotype”.* **Jackola DR, Miller MB, Liebeler CL, Blumenthal MN.** Hum Immunol 2007, Vol. 68, pp. 839–43.
47. *Lower airways inflammation in allergic rhinitis: a comparison with asthmatics and normal controls.* **Brown JL, Behndig AF, Sekerel BE, et al.** Clin Exp Allergy 2007, Vol. 37, pp. 688–95.
48. *Segmental bronchoprovocation in allergic rhinitis patients affects mast cell and basophil numbers in nasal and bronchial mucosa.* **Braunstahl GJ, Overbeek SE, Fokkens WJ, et al.** Am J Respir Crit Care Med 2001, Vol. 164, pp. 858–65.
49. *Mucosal and systemic inflammatory changes in allergic rhinitis and asthma: a comparison between upper and lower airways.* **Braunstahl GJ, Fokkens WJ, Overbeek SE, KleinJan A, Hoogsteden HC, Prins JB.** Clin Exp Allergy 2003, Vol. 33, pp. 579–87.
50. *Allergen-induced bronchial inflammation in house dust mite-allergic patients with or without asthma.* **Lopuhaa CE, Out TA, Jansen HM, Aalberse RC, van der Zee JS.** Clin Exp Allergy 2002, Vol. 32, pp. 1720–27.
51. *Comparison of allergen-induced changes in bronchial hyperresponsiveness and airway inflammation between mildly allergic asthma patients and allergic rhinitis patients.* **Alvarez MJ, Olaguibel JM, Garcia BE, Tabar AI, Urbiola E.** Allergy 2000, Vol. 55, pp. 531–39.

52. *Airway inflammation in asthma and perennial allergic rhinitis. Relationship with nonspecific bronchial responsiveness and maximal airway narrowing.* **Alvarez MJ, Olaguibel JM, Garcia BE, Rodriquez A, Tabar AI, Urbiola E.** *Allergy* 2000, Vol. 55, pp. 355–62.
53. *Increased interleukin-4, interleukin-5, and interferon-gamma in airway CD4+ and CD8+ T cells in atopic asthma.* **Cho SH, Stanciu LA, Holgate ST, Johnston SL.** *Am J Respir Crit Care Med* 2005, Vol. 171, pp. 224–30.
54. *Immunosuppressive therapy does not prevent the occurrence of Immunoglobulin E-mediated allergies in children and adolescents with organ transplants.* **Dehlink E, Gruber S, Eiwegger T, et al.** *Pediatrics* 2006, Vol. 118, pp. e764–70.
55. *Interactions between corticosteroids and beta-adrenergic agonists in asthma disease induction, progression, and exacerbation.* **GP., Anderson.** *Am J Respir Crit Care Med* 2000, Vol. 161, pp. S188–96.
56. *Direct and indirect inhibition of Th1 development by progesterone and glucocorticoids.* **Miyaura H, Iwata M.** *J Immunol* 2002, Vol. 168, pp. 1087–94.
57. *TBX21: a functional variant predicts improvement in asthma with the use of inhaled corticosteroids.* **Tantisira KG, Hwang ES, Raby BA, et al.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2004, Vol. 101, pp. 18099–104.
58. *T-bet polymorphisms are associated with asthma and airway hyperresponsiveness.* **Raby BA, Hwang ES, Van Steen K, et al.** *Am J Respir Crit Care Med* 2006, Vol. 173, pp. 64–70.
59. *FCER2: a pharmacogenetic basis for severe exacerbations in children with asthma.* **Tantisira KG, Silverman ES, Mariani TJ, et al.** *J Allergy Clin Immunol* 2007, Vol. 120, pp. 1285–91.
60. *Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response.* **Leckie MJ, ten Brinke A, Khan J, et al.** *Lancet* 2000, Vol. 356, pp. 2144–48.
61. *Effect of an interleukin-4 variant on late phase asthmatic response to allergen challenge in asthmatic patients: results of two phase 2a studies.* **Wenzel S,**

- Wilbraham D, Fuller R, Getz EB, Longphre M.** Lancet 2007, Vol. 370, pp. 1422–31.
62. *Chemokines in asthma: redundancy of functions or a co-ordinated effort.* **Lukacs NW, Oliveita SHP, Hogaboam CM.** J Clin Invest 1999, Vol. 104, pp. 995–99.
63. *Airway epithelium more than just a barrier.* **Folkerts G, Nijkamp FP.** Trends Pharmacol Sci 1998, Vol. 19, pp. 334–41.
64. *Synthetic functions of airway smooth muscle in asthma.* **Johnson S, Knox AJ.** Trends Pharmacol Sci 1997, Vol. 18, pp. 288–92.
65. *Adhesion molecule strategies.* **PG., Hellewell.** Pulm Pharmacol Ther 1999, Vol. 12, pp. 137–41.
66. *Enhanced survival of lung granulocytes in an animal model of asthma: evidence for a role of CM-CSF activated STAT-5 pathway.* **Turlej RK, Fievez L, Sandersen CF, et al.** Thorax 2001, Vol. 56, pp. 696–702.
67. *Effect of inhaled formoterol and budesonide on exacerbations of asthma. Formoterol and Corticosteroids Establishing Therapy (FACET) International Study Group.* **Pauwels RA, Lofdahl CG, Postma DS, et al.** N Engl J Med 1997, Vol. 337, pp. 1405–11.
68. *Human bronchial smooth muscle cells in culture produce stem cell factor.* **Kassel O, Schmidlin F, Duvernelle C, Gasser B, Massard G, Frossard N.** Eur Respir J 1999, Vol. 13, pp. 951–54.
69. *Gene expression in asthmatic airway smooth muscle.* **PG., Woodruff.** Proc Am Thorac Soc 2008, Vol. 5, pp. 113–18.
70. *Airway smooth muscle dynamics: a common pathway of airway obstruction in asthma.* **An SS, Bai TR, Bates JHT, et al.** Eur Respir J 2007, Vol. 29, pp. 834–60.
71. *Bronchial asthma: response to pilocarpine and epinephrine.* **Alexander HL, Paddock R.** Arch Intern Med 1921, Vol. 27, pp. 184–91.

72. *How does airway inflammation modulate asthmatic airway constriction? An antigen challenge study.* **Henderson AC, Ingenito EP, Atileh H, Israel E, Suki B, Lutchen KR.** *J Appl Physiol* 2003, Vol. 95, pp. 873–82.
73. *Complex airway behavior and paradoxical responses to bronchoprovocation.* **Winkler T, Venegas JG.** *J Appl Physiol* 2007, Vol. 103, pp. 655–63.
74. *Airway constriction pattern is a central component of asthma severity: the role of deep inspirations.* **Lutchen KR, Jensen A, Atileh H, et al.** *Am J Respir Crit Care Med* 2001, Vol. 164, pp. 207–15.
75. *Self-organized patchiness in asthma as a prelude to catastrophic shifts.* **Venegas JG, Winkler T, Musch G, et al.** *Nature* 2005, Vol. 434, pp. 777–82.
76. *The structural basis of airways hyperresponsiveness in asthma.* **Brown RH, Pearse DB, Pyrgos G, Liu MC, Togias A, Permutt S.** *J Appl Physiol* 2006, Vol. 101, pp. 30–39.
77. *Inhaled corticosteroids and the beneficial effect of deep inspiration in asthma.* **Scichilone N, Permutt S, Bellia V, Togias A.** *Am J Respir Crit Care Med* 2005, Vol. 172, pp. 693–99.
78. *Familial aggregation and heritability of asthma-associated quantitative traits in a population-based sample of nuclear families.* **Palmer LJ, Burton PR, James AL, Musk AW, Cookson WO.** *Eur J Hum Genet* 2000, Vol. 8, pp. 853–60.
79. *Intrinsic and antigen-induced airway hyperresponsiveness are the result of diverse physiological mechanisms.* **Wagers SS, Haverkamp HC, Bates JHT, et al.** *J Appl Physiol* 2007, Vol. 102, pp. 221–30.
80. *A longitudinal, population-based, cohort study of childhood asthma followed to adulthood.* **Sears MR, Greene JM, Willan AR, et al.** *N Engl J Med* 2003, Vol. 349, pp. 1414–22.
81. *Risk factors for growth and decline of lung function in asthmatic individuals up to age 42 years. A 30-year follow-up study.* **Grol MH, Gerritsen J, Vonk JM, et al.** *Am J Respir Crit Care Med* 1999, Vol. 160, pp. 1830–37.

82. *Risk factors associated with irreversible airflow limitation in asthma.* **A., ten Brinke.** *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2008, Vol. 8, pp. 63–69.
83. *Scores of asthma and asthma severity reveal new regions of linkage in EGEA study families.* **Bouzigon E, Siroux V, Dizier MH, et al.** *Eur Respir J* 2007, Vol. 30, pp. 253–59.
84. *Determinants of lung function and airway hyperresponsiveness in asthmatic children.* **Bisgaard H, Pedersen S, Anhoj J, et al.** *Respir Med* 2007, Vol. 101, pp. 1477–82.
85. *Risk factors from childhood to adulthood for bronchial responsiveness at age 32–42 yr.* **Grol MH, Postma DS, Vonk JM, et al.** *Am J Respir Crit Care Med* 1999, Vol. 160, pp. 150–56.
86. *Airway remodelling in asthma.* **Elias JA, Zhu Z, Chupp G, Homer RJ.** *J Clin Invest* 1999, Vol. 104, pp. 1001–06.
87. *Resolvin E1 dampens airway inflammation and hyperresponsiveness in a murine model of asthma.* **Aoki H, Hisada T, Ishizuka T, et al.** *Biochem Biophys Res Commun* 2008, Vol. 367, pp. 509–15.
88. *Lipid mediators as agonists for the resolution of acute lung inflammation and injury.* **Bonnans C, Levy BD.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007, Vol. 36, pp. 201–05.
89. *Airway smooth muscle remodelling in asthma: role of airway smooth muscle.* **AJ., Knox.** *Clin Sci* 1994, Vol. 86, pp. 647–52.
90. *Epithelial damage and angiogenesis in the airways of children with asthma.* **Barbato A, Turato G, Baraldo S, et al.** *Am J Respir Crit Care Med* 2006, Vol. 174, pp. 975–81.
91. *Bronchial eosinophilic infiltration in Crohn's disease in the absence of pulmonary disease.* **Louis E, Louis R, Shute J, et al.** *Clin Exp Allergy* 1999, Vol. 29, pp. 660–66.
92. *Increased levels of airway neutrophils reduce the inhibitory effects of inhaled glucocorticosteroids on allergen-induced airway eosinophils.* **Gauvreau GM, Inman**

MD, Kelly M, Watson RM, Dorman SC, O’Byrne PM. *Can Respir J* 2002, Vol. 9, pp. 26–32.

93. *Comprehensive testing of positionally cloned asthma genes in two populations.* **Hersh CP, Raby BA, Soto-Quiros ME, et al.** *Am J Respir Crit Care Med* 2007, Vol. 176, pp. 849–57.

94. *Glucocorticoids enhance or spare innate immunity: effects in airway epithelium are mediated by CCAAT/enhancer binding proteins.* **Zhang N, Truong-Tran QA, Tancowny B, Harris KE, Schleimer RP.** *J Immunol* 2007, Vol. 179, pp. 578–89.

95. *Relative corticosteroid insensitivity of alveolar macrophages in severe asthma compared to non-severe asthma.* **Bhavsar P, Hew M, Khorasani N, et al.** *Thorax* 2008, Vol. 63, pp. 784–90.

96. *Functional relevance of the IL-23-IL-17 axis in lungs in vivo.* **Ivanov S, Bozinovski S, Bossios A, et al.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007, Vol. 36, pp. 442–51.

97. *Neutrophils, interleukin-17A and lung disease.* **Linden A, Laan M, Anderson GP.** *Eur Respir J* 2005, Vol. 25, pp. 159–72.

98. *Chronically inflamed human tissues are infiltrated by highly differentiated Th17 lymphocytes.* **Pene J, Chevalier S, Preisser L, et al.** *J Immunol* 2008, Vol. 180, pp. 7423–30.

99. *T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma.* **Yang XO, Pappu BP, Nurieva R, et al.** *Immunity* 2008, Vol. 28, pp. 29–39.

100. *Stat3 and Stat4 direct development of IL-17-secreting Th cells.* **Mathur AN, Chang H-C, Zisoulis DG, et al.** *J Immunol* 2007, Vol. 178, pp. 4901–07.

101. *CD4+CD25+ T cells protect against experimentally induced asthma and alter pulmonary dendritic cell phenotype and function.* **Lewkowich IP, Herman NS, Schleifer KW, et al.** *J Exp Med* 2005, Vol. 202, pp. 1549–61.

102. *Regulation of inflammatory responses by IL-17F.* **Yang XO, Chang SH, Park H, et al.** *J Exp Med* 2008, Vol. 205, pp. 1063–75.

103. *Activation of c-Kit in dendritic cells regulates T helper cell differentiation and allergic asthma.* **Krishnamoorthy N, Oriss TB, Paglia M, et al.** Nat Med 2008, Vol. 14, pp. 565–73.
104. *Persistent activation of an innate immune response translates respiratory viral infection into chronic lung disease.* **Kim EY, Battaile JT, Patel AC, et al.** Nat Med 2008, Vol. 14, pp. 633–40.
105. *Cigarette smoke worsens lung inflammation and impairs resolution of influenza infection in mice.* **Gualano RC, Hansen MJ, Vlahos R, et al.** Respir Res 2008, Vol. 9, p. 53.
106. *Cigarette smoke selectively enhances viral PAMP- and virus-induced pulmonary innate immune and remodeling responses in mice.* **Kang MJ, Lee CG, Lee JY, et al.** J Clin Invest 2008, Vol. 118, pp. 2771–84.
107. *T helper 1 cells stimulated with ovalbumin and IL-18 induce airway hyperresponsiveness and lung fibrosis by IFN- γ and IL-13 production.* **Hayashi N, Yoshimoto T, Izuhara K, Matsui K, Tanaka T, Nakanishi K.** Proc Natl Acad Sci USA 2007, Vol. 104, pp. 14765–70.
108. *Administration of IL-33 induces airway hyperresponsiveness and goblet cell hyperplasia in the lungs in the absence of adaptive immune system.* **Kondo Y, Yoshimoto T, Yasuda K, et al.** Int Immunol 2008, Vol. 20, pp. 791–800.
109. *Epidermal growth factor receptor signaling to Erk1/2 and STATs control the intensity of the epithelial inflammatory responses to rhinovirus infection.* **Liu K, Gualano RC, Hibbs ML, Anderson GP, Bozinovski S.** J Biol Chem 2008, Vol. 283, pp. 9977–85.
110. *A critical function for CD200 in lung immune homeostasis and the severity of influenza infection.* **Snelgrove RJ, Goulding J, Didierlaurent AM, et al.** Nat Immunol 2008, Vol. 9, pp. 1074–83.
111. *IL-13 induces disease-promoting type 2 cytokines, alternatively activated macrophages and allergic inflammation during pulmonary infection of mice with *Cryptococcus neoformans*.* **Muller U, Stenzel W, Kohler G, et al.** J Immunol 2007, Vol. 179, pp. 5367–77.

112. *CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce alternative activation of human monocytes/macrophages.* **Tiemessen MM, Jagger AL, Evans HG, van Herwijnen MJC, John S, Taams LS.** Proc Natl Acad Sci USA 2007, Vol. 104, pp. 19446–51.
113. *A chitinase-like protein in the lung and circulation of patients with severe asthma.* **Chupp GL, Lee CG, Jarjour N, et al.** N Engl J Med 2007, Vol. 357, pp. 2016–27.
114. *Src homology 2 domain-containing inositol 5-phosphatase 1 deficiency leads to a spontaneous allergic inflammation in the murine lung.* **Oh SY, Zheng T, Bailey ML, et al.** J Allergy Clin Immunol 2007, Vol. 119, pp. 123–31.
115. *The role of SHIP in macrophages.* **Sly LM, Ho V, Antignano F, et al.** Front Biosci 2007, Vol. 12, pp. 2836–48.
116. *SHIP represses the generation of alternatively activated macrophages.* **Rauh MJ, Ho V, Pereira C, et al.** Immunity 2005, Vol. 23, pp. 361–74.
117. *Constitutive activation of the SRC family kinase Hck results in spontaneous pulmonary inflammation and an enhanced innate immune response.* **Ernst M, Inglese M, Scholz GM, et al.** J Exp Med 2002, Vol. 196, pp. 589–604.
118. *Lyn-deficient mice develop severe, persistent asthma: Lyn is a critical negative regulator of Th2 immunity.* **Beavitt SJ, Harder KW, Kemp JM, et al.** J Immunol 2005, Vol. 175, pp. 1867–75.
119. *Distinct roles for IL-13 and IL-4 via IL-13 receptor alpha1 and the type II IL-4 receptor in asthma pathogenesis.* **Munitz A, Brandt EB, Mingler M, Finkelman FD, Rothenberg ME.** Proc Natl Acad Sci USA 2008, Vol. 105, pp. 7240–45.
120. *Genetics of asthma and COPD. Similar results for different phenotypes.* **Meyers DA, Larj MJ, Lange L.** Chest 2004, Vol. 26 (suppl 2), pp. 105S–10S.
121. *The Collaborative Study on the Genetics of Asthma (CSGA). A genomewide search for asthma susceptibility loci in ethnically diverse populations.* Nat Genet 1997, Vol. 15, pp. 389–92.
122. *Genomewide search for asthma susceptibility loci in a founder population.* **Ober C, Cox NJ, Abney M, et al.** Hum Mol Genet 1998, Vol. 7, pp. 1393–98.

123. *A genome wide search for linkage to asthma.* **Wjst M, Fisher G, Immervoll T, et al.** Genomics 1999, Vol. 58, pp. 1-8.
124. *A genomewide search for quantitative trait loci underlying asthma.* **Daniels S, Bhattacharrya S, James A, et al.** Nature 1996, Vol. 383, pp. 247–50.
125. *Heredity in bronchial asthma: a clinical and genetic study of 191 asthma probands and 50 probands with Baker's asthma.* **M., Schwartz.** Acta Allergol Suppl (Copenh). 1952, Vol. 2, pp. 1–288.
126. *Genetic factors in childhood asthma.* **Sibbald B, Horn M, Brain E, Gregg I.** Thorax. 1980, Vol. 35(9), pp. 671–674.
127. *Independent inheritance of serum immunoglobulin E concentrations and airway responsiveness.* **Palmer LJ, Burton PR, Faux JA, James AL, Musk AW, Cookson WO.** Am J Respir Crit Care Med 2000, Vol. 161(6), pp. 1836–1843.
128. *Familial aggregation and segregation analysis of eosinophil levels.* **Palmer LJ, Burton PR.** Am J Respir Crit Care Med. 2000, Vol. 162(2), pp. 759–760.
129. *Allergy in 7000 twin pairs.* **M-L., Edfors-Lubs.** Acta Allergol. 1971, Vol. 26(4), pp. 249–285.
130. *No evidence for effects of family environment on asthma: a retrospective study of Norwegian twins.* **Harris JR, Magnus P, Samuelsen SO, Tambs K.** Am J Respir Crit Care Med. 1997, Vol. 156(1), pp. 43–49.
131. *Genetic and environment in asthma: the answer of twin studies.* **Koppelman G, Los H, Postma D.** Eur Respir J. 1999, Vol. 13(1), pp. 2-4.
132. *Importance of genetic factors in adolescent asthma: a population-based twin-family study.* **Laitinen T, Rasanen M, Kaprio J, Koskenvuo M, Laitinen LA.** Am J Respir Crit Care Med. 1998, Vol. 157(4), pp. 1073–1078.
133. *A population-based study of bronchial asthma in adult twin pairs.* **Nieminen MM, Kaprio J, Koskenvuo M.** Chest. 1991, Vol. 100(1), pp. 70–75.

134. *Segregation analysis of physician-diagnosed asthma in Hispanic and non-Hispanic white families.* **Holberg CJ, Elston RC, Halonen M, et al.** *Am J Respir Crit Care Med.* 1996, Vol. 54(1), pp. 144–150.
135. *Familial aggregation and segregation analysis of eosinophil levels.* **Holberg CJ, Halonen M, Wright AL, Martinez FD.** *Am J Respir Crit Care Med.* 1999, Vol. 160(5), pp. 1604–1610.
136. *A first trial of retrospective collaboration for positional cloning in complex inheritance: assay of the cytokine region on chromosome 5 by the Consortium on Asthma Genetics (COAG).* **Lonjou C, Barnes K, Chen H, et al.** *PNAS* 2000, Vol. 97, pp. 10942–47.
137. *Allelic association of gene markers on chromosomes 5q and 11q with atopy and bronchial hyperresponsiveness.* **Doull IJ, Lawrence S, Watson M, et al.** *Am J Respir Crit Care Med* 1996, Vol. 153, pp. 1280–84.
138. *Linkage of asthma to markers on chromosome 12 in a sample of 240 families using quantitative phenotype scores.* **Wilkinson J, Grimley S, Collins A, Thomas NS, Holgate ST, Morton N.** *Genomics* 1998, Vol. 53, pp. 251–59.
139. *A major susceptibility gene for asthma maps to chromosome 14q24.* **Hakonarson H, Bjornsdottir US, Halapi E, et al.** *Am J Hum Genet* 2002, Vol. 71, pp. 483–91.
140. *Association of the ADAM33 gene with asthma and bronchial hyperresponsiveness.* **van Eerdewegh P, Little RD, Dupuis J, et al.** *Nature* 2002, Vol. 418, pp. 426–30.
141. *Variation in the interleukin 4-receptor alpha gene confers susceptibility to asthma and atopy in ethnically diverse populations.* **Ober C, Leavitt SA, Tsalenko A, et al.** *Am J Hum Genet* 2000, Vol. 66, pp. 517–26.
142. *Tumour necrosis factor haplotypes and asthma.* **Moffatt MF, Cookson WO.** *Hum Mol Genet* 1997, Vol. 6, pp. 551–54.
143. *Genetic linkage of T-cell receptor alpha/delta complex to specific IgE responses.* **Moffatt MF, Hill MR, Cornelis F, et al.** *Lancet* 1994, Vol. 343, pp. 1597–600.

144. *Evidence for a locus regulating total serum IgE levels mapping to chromosome 5.* **Meyers DA, Postma DS, Panhuysen C. et al.** *Genomics* 1994, Vol. 23, pp. 464-70.
145. *Genetic influences of chromosomes 5q31–q33 and 11q13 on specific IgE responsiveness to common inhaled allergens among African American families.* **Hizawa N, Freidhoff L, Ehrlich E, et al.** *J Allergy Clin Immunol.* 1998, Vol. 102(3), pp. 449–453.
146. *Linkage analysis of the 5q31–33 candidate region for asthma in 240 UK families.* **Holloway JW, Lonjou C, Beghe B, et al.** *Genes Immun.* 2001, Vol. 2(1), pp. 20–24.
147. *Significant evidence for linkage of mite-sensitive childhood asthma to chromosome 5q31–q33 near the interleukin 12 B locus by a genome-wide search in Japanese families.* **Yokouchi Y, Nukaga Y, Shibasaki M, et al.** *Genomics.* 2000, Vol. 66(2), pp. 152–160.
148. *Factor analysis of asthma and atopy traits shows 2 major components, one of which is linked to markers on chromosome 5q.* **Holberg CJ, Halonen M, Solomon S, et al.** *J Allergy Clin Immunol.* 2001, Vol. 108(5), pp. 772-780.
149. *Linkage of chromosome 5q and 11q gene markers to asthma-associated quantitative traits in Australian children.* **Palmer L, Daniels S, Rye P, et al.** *Am J Respir Crit Care Med.* 1998, Vol. 158(6), pp. 1825–1830.
150. *Genetic susceptibility to asthma and atopy among Chinese in Singapore: linkage to markers on chromosome 5q31–33.* **Shek LP, Tay AH, Chew FT, Goh DL, Lee BW.** *Allergy.* 2001, Vol. 56(8), pp. 749–753.
151. *Genetic susceptibility to asthma–bronchial hyperresponsiveness coinherited with a major gene for atopy.* **Postma DS, Bleecker ER, Amelung PJ, et al.** *N Engl J Med.* 1995, Vol. 333(14), pp. 894-900.
152. *A retrospective collaboration on chromosome 5 by the International Consortium on Asthma Genetics (COAG).* **Palmer L, Lonjou C, Barnes K, Chen H, Cookson WO, Deichmann KA, Holloway JW, Laitinen T, Wjst M, Morton NE.** *Clin Exp Allergy* 2001, Vol. 31, pp. 152-4.

153. *Genomewide screen and identification of gene-gene interactions for asthma-susceptibility loci in three US populations: collaborative study on the genetics of asthma.* **Xu J, Meyers DA, Ober C, et al.** *Am J Hum Genet.* 2001, Vol. 68, pp. 1437–1446.
154. *The genetics of asthma.* **J.W.Holloway, Jongepier H, Beghe B, Koppelman G.H, Holgate S.T, Postma D.S.** *Eur Respir Mon* 2003, Vol. 23, pp. 26-56.
155. *Linkage analysis of Dermatophagoides pteronyssinus-specific IgE responsiveness with polymorphic markers on chromosome 6p21 (HLA-D region) in Caucasian families by the transmission/disequilibrium test. Collaborative Study on the Genetics of Asthma (CSGA).* **Hizawa N, Collins G, Rafnar T, Huang SK, Duffy DL, Weber JL, Freidhoff LR, Ehrlich E, Marsh DG, Beaty TH, Barnes KC.** *J Allergy Clin Immunol.* 1998, Vol. 102, pp. 443-8.
156. *Linkage between immunoglobulin E responses underlying asthma and rhinitis and chromosome 11q.* **Cookson WO, Sharp PA, Faux JA, Hopkin JM.** *Lancet* 1989, Vol. 1, pp. 1292–1295.
157. *Genetic analysis using DNA polymorphism of the linkage between chromosome 11q13 and atopy and bronchial hyperresponsiveness to metacholine.* **Lympany P, Welsh K, MacCochrane G, Kemeny DM, Lee TH.** *J Allergy Clin Immunol.* 1992, Vol. 89, pp. 619-28.
158. *Linkage between severe atopy and chromosome 11q13 in Japanese families.* **Shirakawa T, Hashimoto T, Furuyama J, Takeshita T, Morimoto K.** *Clin Genet.* 1994, Vol. 46, pp. 228–232.
159. *Linkage analysis of markers on chromosome 11q13 with asthma and atopy in a United Kingdom population.* **Simon Thomas N, Wilkinson J, Lonjou C, Morton NE, Holgate ST.** *Am J Respir Crit Care Med.* 2000, Vol. 162, pp. 1268–1272.
160. *Linkage analysis of bronchial hyperreactivity and atopy with chromosome 11q13.* **Wong Z, Tsonis D, van Herwerden L, et al.** *Electrophoresis.* 1997, Vol. 18, pp. 1641–1645.

161. *Localisation of atopy and beta subunit of high-affinity IgE (FceRI) on chromosome 11q.* **Sandford AJ, Shirakawa T, Moffatt MF. et al.** Lancet 1993, Vol. 341, pp. 332–334.
162. *FceRI-b polymorphism and risk of atopy in a general population sample.* **Hill MR, James AL, Faux JA. et al.** BMJ 1995, Vol. 311, pp. 776–779.
163. *Linkage of asthma and total serum IgE concentration to markers on chromosome 12q: evidence from Afro-Caribbean and Caucasian populations.* **Barnes KC, Neely JD, Duffy DL, et al.** Genomics. 1996, Vol. 37, pp. 41-50.
164. *Dense mapping of chromosome 12q13.12–q23.3 and linkage to asthma and atopy.* **Barnes KC, Freidhoff LR, Nickel R, et al.** J Allergy Clin Immunol. 1999, Vol. 104, pp. 485–491.
165. *Studies on linkage and association of atopy with the chromosomal region 12q13–24.* **Heinzmann A, Grotherr P, Jerkic SP, et al.** Clin Exp Allergy. 2000, Vol. 30, pp. 1555–1561.
166. *Linkage analysis of chromosome 12 markers in Italian families with atopic asthmatic children.* **Malerba G, Lauciello MC, Scherpbier T, et al.** Am J Respir Crit Care Med. 2000, Vol. 162, pp. 1587-90.
167. *Positive association to IgE levels and a physical map of the 13q14 atopy locus.* **Anderson GG, Leaves NI, Bhattacharyya S, et al.** Eur J Hum Genet. 2002, Vol. 10, pp. 266-70.
168. *Positional cloning of a quantitative trait locus on chromosome 13q14 that influences immunoglobulin E levels and asthma.* **Zhang Y, Leaves NI, Anderson GG, et al.** Nat Genet. 2003 , Vol. 34, pp. 181-6.
169. *V75R576 IL-4 receptor alpha is associated with allergic asthma and enhanced IL-4 receptor function.* **Risma KA, Wang N, Andrews RP, et al.** J Immunol. 2002, Vol. 169, pp. 1604-10.
170. *Gene-gene interaction in asthma: IL4RA and IL13 in a Dutch population with asthma.* **Howard TD, Koppelman GH, Xu J, et al.** Am J Hum Genet. 2002, Vol. 70, pp. 230-6.

171. *Novel genetic variation of human interleukin-21 receptor is associated with elevated IgE levels in females.* **Hecker M, Bohnert A, König IR, et al.** *Genes Immun.* 2003, Vol. 4(3), pp. 228-33.
172. *Genetic variants regulating ORMDL3 expression contribute to the risk of childhood asthma.* **Moffatt MF, Kabesch M, Liang L, et al.** *Nature* 2007, Vol. 448, pp. 470-73.
173. *Association of the ADAM33 gene with asthma and bronchial hyperresponsiveness.* **Van Eerdewegh P, Little RD, Dupuis J, et al.** *Nature* 2002, Vol. 418, pp. 426-30.
174. *A new gene for asthma: would you ADAM and Eve it?* **W., Cookson.** *Trends Genet.* 2003, Vol. 19, pp. 169-72.
175. *Association of a disintegrin and metalloprotease 33 (ADAM33) gene with asthma in ethnically diverse populations.* **Howard TD, Postma DS, Jongepier H, et al.** *J Allergy Clin Immunol.* 2003, Vol. 112, pp. 717-22.
176. *ADAM33 is not associated with asthma in Puerto Rican or Mexican populations.* **Lind DL, Choudhry S, Ung N, et al.** *Am J Respir Crit Care Med.* 2003, Vol. 168, pp. 1312-6.
177. *ADAM33 polymorphisms and phenotype associations in childhood asthma.* **Raby BA, Silverman EK, Kwiatkowski DJ, et al.** *J Allergy Clin Immunol.* 2004, Vol. 113, pp. 1071-8.
178. *Pharmacogenetics of Asthma.* **Fenech AG, Hall IP.** *Br J Clin Pharmacol* 2002, Vol. 53, pp. 3-5.
179. *Association between genetic polymorphisms of the beta-2 adrenoceptor and response to albuterol in children with and without a history of wheezing.* **Martinez FD, Graves PE, Baldini M, Solomon S, Erickson R.** *J Clin Invest* 1997, Vol. 100, pp. 3184–88.
180. *Pharmagenetic association between ALOX5 promoter genotype and the response to anti-asthma treatment.* **Drazen JM, Yandava C, Dube L, et al.** *Nat Genet* 1999, Vol. 22, pp. 168–70.

181. *Gene-Environment Interactions and Airway Disease in Children*. **Schwartz, David A.** *Pediatrics* 2009, Vol. 123, pp. S151-S159.
182. *Exposure to house-dust mite allergen (Der p 1) and the development of asthma in childhood. A prospective study*. **Sporik R, Holgate ST, Platts-Mills TA, et al.** *N Engl J Med* 1990, Vol. 323, pp. 502-7.
183. *Family size, infection and atopy: the first decade of the "hygiene hypothesis"*. **DP., Strachan.** *Thorax* 2000, Vol. 55(Suppl 1), pp. S2-10.
184. *Secondhand smoke, dietary fruit intake road traffic exposures, and the prevalence of asthma: a cross-sectional study in young children*. **Lewis SA, Antoniak M, Venn AJ, et al.** *Am J Epidemiol* 2005, Vol. 161, pp. 406-11.
185. *Diet as a risk factor for atopy and asthma*. **Devereux G, Seaton A.** *J Allergy Clin Immun* 2005, Vol. 115, pp. 1109-17.
186. *House dust mite allergens: a major risk factor for childhood asthma in Australia*. **Peat JK, Tovey E, Toelle BG, et al.** *Am J Respir Crit Care Med* 1996, Vol. 153, pp. 141-46.
187. *Prevalence of wheeze and asthma and relation to atopy in urban and rural Ethiopia*. **Yemaneberhan H, Bekele Z, Venn A, Lewis S, Parry E, Britton J.** *Lancet* 1997, Vol. 350, pp. 85-90.
188. *The association between atopy and asthma in a semirural area of Tanzania (East Africa)*. **Sunyer J, Torregrosa J, Anto JM, et al.** *Allergy* 2000, Vol. 55, pp. 762-66.
189. *Asthma and allergy in Albania and the UK*. **Priftanji A, Strachan D, Burr M, et al.** *Lancet* 2001, Vol. 358, pp. 1426-27.
190. *Family size, infection and atopy: the first decade of the "hygiene hypothesis"*. **DP., Strachan.** *Thorax* 2000, Vol. 55 (suppl), pp. S2-10.
191. *Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial*. **Kalliomaki M, Salminen S, Arvilommi H, Kero P, Koskinen P, Isolauri E.** *Lancet* 2001, Vol. 357, pp. 1076-79.

192. *Allergy development and the intestinal microflora during the first year of life.* **Bjorksten B, Sepp E, Julge K, Voor T, Mikelsaar M.** *J Allergy Clin Immunol* 2001, Vol. 108, pp. 516–20.
193. *Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey.* **Riedler J, Braun-Fahrlander C, Eder W, et al.** *Lancet* 2001, Vol. 358, pp. 1129–33.
194. *Decreased atopy in children infected with Schistosoma haematobium: a role for parasite-induced interleukin-10.* **van den Biggelaar AHJ, van Ree R, Rodrigues LC, et al.** *Lancet* 2000, Vol. 356, pp. 1723–27.
195. *Independent effects of intestinal parasite infection and domestic allergen exposure on risk of wheeze in Ethiopia: a nested case-control study.* **Scrivener S, Yemaneberhan H, Zebenigus M, et al.** *Lancet* 2001, Vol. 358, pp. 1493–99.
196. *Prospective study of body mass index, weight change, and risk of adult-onset asthma in women.* **Camargo CA, Jr, Weiss ST, Zhang S, Willett WC, Speizer FE.** *Arch Intern Med* 1999, Vol. 159, pp. 2582–88.
197. *Immediate and long term effects of weight reduction in obese people with asthma: randomised controlled study.* **Stenius-Aarniala B, Poussa T, Kvarnstrom J, Gronlund EL, Ylikahri M, Mustajoki P.** *BMJ* 2000, Vol. 320, pp. 827–32.
198. *Wheeze and asthma in children: associations with body mass index, sports, television viewing, and diet.* **Corbo GM, Forastiere F, Sario MD, et al.** *Epidemiology* 2008, Vol. 19, pp. 747–55.
199. *Influence of body mass index on the response to asthma controller agents.* **Peters-Golden M, Swern A, Bird SS, Hustad CM, Grant E, Edelman JM.** *Eur Respir J* 2006, Vol. 27, pp. 495–503.
200. *The role of diet in the aetiology of asthma.* **Fogarty A, Britton J.** *Clin Exp Allergy* 2000, Vol. 30, pp. 615–27.
201. *Maternal vitamin D intake during pregnancy and early childhood wheezing.* **Devereux G, Litonjua AA, Turner SW, et al.** *Am J Clin Nutr* 2007, Vol. 85, pp. 853–59.

202. *Vitamin D receptor-deficient mice fail to develop experimental allergic asthma.* **Wittke A, Weaver V, Mahon BD, August A, Cantorna MT.** *J Immunol* 2004, Vol. 173, pp. 3432–36.
203. *Vitamin D receptor expression by the lung micro-environment is required for maximal induction of lung inflammation.* **Wittke A, Chang A, Froicu M, et al.** *Arch Biochem Biophys* 2007, Vol. 460, pp. 306–13.
204. *Health effects of air pollution.* **Bernstein JA, Alexis N, Barnes C, et al.** *J Allergy Clin Immunol* 2004, Vol. 114, pp. 1116-23.
205. *Prevalence of asthma and allergic disorders among children in united Germany: a descriptive comparison.* **von Mutius E, Fritzsche C, Weiland SK, Roll G, Magnussen H.** *BMJ* 1992, Vol. 305, pp. 1395–99.
206. *Prevalence of childhood asthma, rhinitis and eczema in Scandinavia and Eastern Europe.* **Björkstén B, Dumitrascu D, Foucard T, et al.** *Eur Respir J* 1998, Vol. 12, pp. 432–37.
207. *Childhood antecedents of allergic sensitization in young British adults.* **Strachan DP, Harkins LS, Johnston IDA, Anderson HR.** *J Allergy Clin Immunol* 1997, Vol. 99, pp. 6-12.
208. *Smoking and the development of allergic sensitization to aeroallergens in adults: a prospective population-based study. The Copenhagen Allergy Study.* **Linneberg A, Nielsen NH, Madsen F, Frolund L, Dirksen A, Jorgensen T.** *Allergy* 2001, Vol. 56, pp. 328–32.
209. *Air pollutant effects on fetal and early postnatal development.* **Wang L, Pinkerton KE.** *Birth Defects Res C Embryo Today* 2007, Vol. 81, pp. 144-54.
210. *Exposure to bacteria in swine-house dust and acute inflammatory reactions in humans.* **Zhiping W, Malmberg P, Larsson BM, et al.** *Am J Respir Crit Care Med.* 1996, Vol. 154, pp. 1261-66.
211. *Exposure to endotoxin or other bacterial components might protect against the development of atopy.* **von Mutius E, Braun-Fahrlander C, Schierl R, et al.** *Clin Exp Allergy.* 2000, Vol. 30, pp. 1230-34.

212. *House dust endotoxin and wheeze in the first year of life.* **Park JH, Gold DR, Spiegelman DL, et al.** Am J Respir Crit Care Med. 2001, Vol. 163, pp. 322-8.
213. *Severity of asthma is related to endotoxin in house dust.* **Michel O, Kips J, Duchateau J, et al.** Am J Respir Crit Care Med. 1996, Vol. 154, pp. 1641-6.
214. *Grain dust and endotoxin inhalation produce similar inflammatory responses in normal subjects.* **Jagiello PJ, Thorne PS, Watt JL, et al.** Chest 1996, Vol. 110, pp. 263-70.
215. *The kinetics of grain dust-induced inflammation of the lower respiratory tract.* **Deetz DC, Jagiello PJ, Quinn TJ, et al.** Am J Respir Crit Care Med 1997, Vol. 155, pp. 254-9.
216. *Endotoxin responsiveness and grain dust-induced inflammation in the lower respiratory tract.* **Schwartz DA, Thorne PS, Jagiello PJ, et al.** Am J Physiol 1994, Vol. 267, pp. L609-17.
217. *Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product.* **Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, et al.** J Immunol 1999, Vol. 162, pp. 3749-52.
218. *TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans.* **Arbour NC, Lorenz E, Schutte B, et al.** Nat Genet. 2000, Vol. 25, pp. 187-91.
219. *A polymorphism in the 5' flanking region of the CD14 gene is associated with circulating soluble CD14 levels and with total serum immunoglobulin E.* **Baldini M, Lohman IC, Halonen M, et al.** Am J Respir Cell Mol Biol 1999, Vol. 20, pp. 976-83.
220. *Association of a promoter polymorphism of the CD14 gene and atopy.* **Koppelman GH, Reijmerink NE, Colin Stine O, et al.** Am J Respir Crit Care Med 2001, Vol. 163, pp. 965-9.
221. *CD14 expression and soluble CD14 after segmental allergen provocation in atopic asthma.* **Virchow JC Jr, Julius P, Matthys H, et al.** Eur Respir J 1998, Vol. 11, pp. 317-23.

222. *Inflammatory mediators of asthma: an update.* **Barnes PJ, Chung KF, Page CP.** *Pharmacol Rev* 1998, Vol. 50, pp. 515-96.
223. *Reactive oxygen species as mediators in asthma.* **Henricks PA, Nijkamp FP.** *Pulm Pharmacol Ther* 2001, Vol. 14, pp. 409-20.
224. *Oxidative stress and genetic and epidemiologic determinants of oxidant injury in childhood asthma.* **Ercan H, Birben E, Dizdar EA, et al.** *J Allergy Clin Immunol* 2006, Vol. 118, pp. 1097–1104.
225. *Elevated concentrations of exhaled hydrogen peroxide in asthmatic patients.* **Emelyanov A, Fedoseev G, Abulimity A, et al.** *Chest* 2001, Vol. 120, pp. 1136-9.
226. *Reduced superoxide dismutase in lung cells of patients with asthma.* **Smith LJ, Shamsuddin M, Sporn PH, et al.** *Free Radic Biol Med* 1997, Vol. 22, pp. 1301-7.
227. *Elevated secretion of myeloperoxidase by neutrophils from asthmatic patients: the effect of immunotherapy.* **Monteseirin J, Bonilla I, Camacho J, et al.** *J Allergy Clin Immunol* 2001, Vol. 107, pp. 623-6.
228. *Oxidants and the pathogenesis of lung diseases.* **Ciencewicki J, Trivedi S, Kleeberger SR.** *J Allergy Clin Immunol.* 2008, Vol. 122, pp. 456-68.
229. *On the essence of 'meaningless' simple repetitive DNA in eukaryote genomes.* **Epplen C., Melmer G, Siedlaczek I, et al.** In: *DNA fingerprinting: state of the science* EXS 1993, Vol. 67, pp. 29-45.
230. *Simple sequence repeats as a source of quantitative genetic variation.* **Y. Kashi, D.G. King and M. Soller, et al.** *Trends Genet* 1997, Vol. 13, pp. 74-8.
231. *Simple sequence repeats in E. coli: abundance, distribution, composition and polymorphism.* **R. Gur-Arie, C.J. Cohen, Y. Eitan, et al.** *Genome Res* 2000 , Vol. 10, pp. 62-71.
232. *Conservation of polymorphic simple sequence loci in cetacean species.* **C. Schlotterer, B. Amos, D. Tautz, et al.** *Nature* 1991, Vol. 354, pp. 63-5.

233. *Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction.* **Weber JL, May PE.** Am J Hum Genet 1989, Vol. 44, pp. 388–396.
234. *Few smokers develop COPD. Why?* **N.M. Sifakas, E. Tzortzaki.** 96, Respir Med 2002, pp. 615-24.
235. *Apoptosis and genomic instability.* **Zhivotovsky B, Kroemer G.** Nat Rev Mol Cell Biol 2004, Vol. 5, pp. 752-62.
236. *Selection against frameshift mutations limits microsatellite expansion in coding DNA.* **Metzgar D, Bytof J, Wills C.** Genome Res 2000, Vol. 10, pp. 72-80.
237. *Microsatellite mutations in the germline: implications for evolutionary inference.* **H., Ellegren.** Trends Genet 2000, Vol. 16, pp. 551-8.
238. *Mismatch repair in correction of replication errors and processing of DNA damage.* **Aquilina G, Bignami M.** J Cell Physiol 2001, Vol. 187, pp. 145-54.
239. *Microsatellite instability.* **NB., Atkin.** Cytogenet Cell Genet 2001, Vol. 92, pp. 177-81.
240. *Screening for the Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer).* **Hampel H, Frankel WL, Martin E, et al.** N Engl J Med 2005, Vol. 352, pp. 1851-60.
241. *Principles of molecular oncology.* **Hirsch-Ginsberg CF, Stass SA, Freireich EJ.** In: Freireich EJ, Stass SA, editors. Molecular basis of oncology. Cambridge, MA: Blackwell Science 1995, pp. 1-20.
242. *Microsatellite instability and loss of heterozygosity at chromosomes 9 and 17 in non-small cell lung cancer.* **Froudarakis ME, Sourvinos G, Fournel P, et al.** Chest 1998, Vol. 113, pp. 1091–1094.
243. *Microsatellite instability in gastric intestinal metaplasia in patients with and without gastric cancer.* **Leung WK, Kim JJ, Kim JG, et al.** Am J Pathol 2000, Vol. 156, pp. 537-43.

244. *Genetic instability of microsatellites in endometrial carcinoma.* **Risinger JI, Berchuck A, Kohler MF, et al.** *Cancer Res* 1993, Vol. 53, pp. 5100-3.
245. *A common region on chromosome 17 in both sporadic and familial epithelial ovarian tumors distal to BRCA1.* **Godwin AK, Vanderveer L, Schultz DC, et al.** *Am J Hum Genet* 1993, Vol. 55, pp. 666-7.
246. *Microsatellite instability and loss of heterozygosity in breast cancer.* **Yee CJ, Roodi N, Verrier CS, et al.** *Cancer Res* 1994, Vol. 54, pp. 1641-4.
247. *Loss of heterozygosity of the BRCA1 and other loci on chromosome 17q in human prostate cancer.* **Gao X, Zacharek A, Salkowski A, et al.** *Cancer Res* 1995, Vol. 55, pp. 1002-5.
248. *DNA alterations in body fluids as molecular tumor markers for urologic malignancies.* **Goessl C, Muller M, Straub B, et al.** *Eur Urol* 2002, Vol. 41, pp. 668-76.
249. *Microsatellite instability in squamous cell carcinoma of the head and neck.* **Field JK, Kiaris H, Howard P, et al.** *Br J Cancer* 1995, Vol. 71, pp. 1065-9.
250. *Microsatellite instability in malignant melanomas.* **Kroiss MM, Vogt TM, Schlegel J, et al.** *Acta Derm Venereol* 2001, Vol. 81, pp. 242-5.
251. *Stability of the human fragile X (CGG)_n triplet repeat array in Saccharomyces cerevisiae deficient in aspects of DNA metabolism.* **White PJ, Borts RH, Hirst MC.** *Mol Cell Biol* 1999, Vol. 19, pp. 5675-84.
252. *Microsatellite instability and suppressed DNA repair enzyme expression in rheumatoid arthritis.* **Lee SH, Chang DK, Goel A, et al.** *J Immunol* 2003, Vol. 170, pp. 2214-20.
253. *Molecular characterization of pancreatic serous microcystic adenomas: evidence for a tumor suppressor gene on chromosome 10q.* **Moore PS, Zamboni G, Brighenti A, et al.** *Am J Pathol* 2001, Vol. 158, pp. 317-21.
254. *Length rather than a specific allele of dinucleotide repeat in the 5' upstream region of the aldose reductase gene is associated with diabetic retinopathy.* **Fujisawa T, Ikegami H, Kawaguchi Y, et al.** *Diabet Med* 1999, Vol. 16, pp. 1944-7.

255. *Evaluation of loss of heterozygosity and microsatellite instability in human pterygium: clinical correlations.* **Detorakis ET, Sourvinos G, Tsampralakis J, et al.** Br J Ophthalmol 1998, Vol. 82, pp. 1324-8.
256. *High frequency of loss of heterozygosity in actinic keratoses, a usually benign disease.* **Rehman I, Quinn AG, Healy E, et al.** Lancet 1994, Vol. 344, pp. 788-9.
257. *Loss of heterozygosity and microsatellite instability in human atherosclerotic plaques.* **Hatzistamou J, Kiaris H, Ergazaki M, et al.** Biochem Biophys Res Commun 1996, Vol. 225, pp. 186-90.
258. *Evidence for loss of heterozygosity in human psoriatic lesion.* **Zachos G, Koumantaki E, Vareltzidis A, et al.** Br J Dermatol 1998, Vol. 139, pp. 974-7.
259. *Microsatellite instability in patients with chronic obstructive pulmonary disease.* **Spandidos DA, Ergazaki M, Hatzistamou J, et al.** Oncol Rep 1996, Vol. 3, pp. 489-91.
260. *Microsatellite DNA instability in chronic obstructive pulmonary disease. A marker of genetic susceptibility?* **Siafakas NM, Tzortzaki EG, Sourvinos G, et al.** Chest 1999, Vol. 116, pp. 47-51.
261. *Differences in microsatellite DNA level between asthma and chronic obstructive pulmonary disease.* **Zervou MI, Tzortzaki EG, Makris D, et al.** Eur Respir J 2006, Vol. 28, pp. 472-478.
262. *Microsatellite DNA instability and loss of heterozygosity in bronchial asthma.* **Paraskakis E, Sourvinos G, Passam F, et al.** Eur Respir J 2003, Vol. 22, pp. 951-955.
263. *Microsatellite DNA instability and loss of heterozygosity in pulmonary sarcoidosis.* **Vassilakis DA, Sourvinos G, Markatos M, et al.** Am J Respir Crit Care Med 1999, Vol. 160, pp. 1729-1733.
264. *Frequent genetics alterations at the microsatellite level in cytologic sputum samples of patients with idiopathic pulmonary fibrosis.* **Vassilakis DA, Sourvinos G, Spandidos DA, et al.** Am J Respir Crit Care Med 2000, Vol. 162, pp. 1115-1119.

265. *Over-representation of repeats in stress response genes: a strategy to increase versatility under stressful conditions.* **Rocha E, Matic I, Taddei F.** *Nucleic Acids Res* 2002, Vol. 30, pp. 1886–1894.
266. *Smoking molecular damage in bronchial epithelium.* **Wistuba II, Mao L, Gazdar AF, et al.** *Oncogene* 2002, Vol. 21, pp. 7298–7306.
267. *Use of induced sputum cell counts to investigate airway inflammation in asthma.* **Pin I, Gibson PG, Kolendowicz R, et al.** *Thorax* 1992, Vol. 47, pp. 25–29.
268. *Sputum induction in children.* **Gibson PG, Grootendor DC, Henry RL, et al.** *Eur Respir J Suppl.* 2002, Vol. 37, pp. 44s-46s.
269. *Safety of sputum induction.* **Pizzichini E, Pizzichini MM, Leigh R, et al.** *Eur Respir J Suppl.* 2002, Vol. 37, pp. 9s-18s.
270. *Comparison between hypertonic and isotonic saline-induced sputum in the evaluation of airway inflammation in subjects with moderate asthma.* **Bacci E, Cianchetti S, Paggiaro PL, et al.** *Clin Exp Allergy* 1996, Vol. 26, pp. 1395-400.
271. *Inhalation provocation tests using nonisotonic aerosols.* **Smith CM, Anderson SD.** *J Allergy Clin Immunol* 1989, Vol. 84, pp. 781-90.
272. *Mediator release in an isolated airway segment in subjects with asthma.* **Gravelyn TR, Pan PM, Eschenbacher WL.** *Am Rev Respir Dis* 1988, Vol. 137, pp. 641-46.
273. *The contribution of neurogenic reflexes to hypertonic saline-induced bronchoconstriction in asthma.* **Makker HK, Holgate ST.** *J Allergy Clin Immunol* 1993, Vol. 92, pp. 82-88.
274. *Fractional analysis of sequential induced sputum samples during sputum induction: evidence that different lung compartments are sampled at different time points.* **Gershman NH, Liu H, Wong HH, et al.** *J Allergy Clin Immunol* 1999, Vol. 104, pp. 322-8.
275. *Sputum induction.* **Paggiaro PL, Chanez P, Holz O, et al.** *Eur Respir J Suppl.* 2002, Vol. 37, pp. 3s-8s.

276. *Methods of sputum processing for cell counts, immunocytochemistry and in situ hybridisation.* **Efthimiadis A, Spanevello A, Hamid Q, et al.** Eur Respir J Suppl. 2002, Vol. 37, pp. 19s-23s.
277. *Analysis of induced sputum in adults with asthma: identification of subgroup with isolated sputum neutrophilia and poor response to inhaled corticosteroids.* **Green RH, Brightling CE, Woltmann G, et al.** Thorax 2002, Vol. 57, pp. 875-79.
278. *A comparison of the validity of different diagnostic tests in adults with asthma.* **Hunter CJ, Brightling CE, Woltmann G, et al.** Chest 2002, Vol. 121, pp. 1051-57.
279. *Non-invasive markers of airway inflammation as predictors of oral steroid responsiveness in asthma.* **Little SA, Chalmers GW, MacLeod KJ, et al.** Thorax 2000, Vol. 55, pp. 232-34.
280. *Accuracy of eosinophils and eosinophil cationic protein to predict steroid improvement in asthma.* **Meijer RJ, Postma DS, Kauffman HF, et al.** Clin Exp Allergy 2002, Vol. 32, pp. 1096-103.
281. *Determining asthma treatment by monitoring sputum cell counts: effect on exacerbations.* **Jayaram L, Pizzichini MM, Cook RJ, et al.** Eur Respir J 2006, Vol. 27, pp. 483-94.
282. *Asthma genetics 2006: the long and winding road to gene discovery.* **Ober C, Hoffjan S.** Genes Immun 2006, Vol. 7, pp. 95-100.
283. *Meta-analysis of genome-wide linkage studies of asthma and related traits.* **Denham S, Koppelman GH, Blakey J, Wjst M, Ferreira MA, Hall IP, Sayers I.** Respir Res 2008, Vol. 9, p. 38.
284. *Mining microsatellites in eukaryotic genomes.* **Sharma PC, Grover A, Kahl G.** Trends Biotechnol 2007, Vol. 25, pp. 490–498.
285. *The rise, fall and renaissance of microsatellites in eukaryotic genomes.* **Buschiazzo E, Gemmell NJ.** Bioessays 2006, Vol. 28, pp. 1040–1050.
286. *Evolutionary dynamics of microsatellite DNA.* **C, Schlötterer.** Chromosoma 2000, Vol. 109, pp. 365-371.

287. *Constitutional mismatch repair-deficiency syndrome: have we so far seen only the tip of an iceberg?* **Wimmer K, Etzler J.** Hum Genet 2008, Vol. 124, pp. 105–122.
288. *Microsatellite instability in the development of DNA mismatch repair deficient tumors.* **Woerner SM, Kloor M, von Knebel Doeberitz M, Gebert JF.** Cancer Biomark 2006, Vol. 2, pp. 69–86.
289. *Oxidative stress inactivates the human DNA mismatch repair system.* **Chang CL, Marra G, Chauhan DP, et al.** Am J Physiol Cell Physiol 2002, Vol. 283, pp. C148–C154.
290. *Oxidative stress in allergic respiratory diseases.* **Bowler RP, Crapo JD.** J Allergy Clin Immunol 2002, Vol. 110, pp. 349–356.
291. *Carcinogenesis and microsatellite instability: the interrelationship between genetics and epigenetics.* **Imai K, Yamamoto H.** Carcinogenesis 2008, Vol. 29, pp. 673–680.
292. *The clinical relevance of microsatellite alterations in head and neck squamous cell carcinoma: a critical review.* **De Schutter H, Spaepen M, Mc Bride WH, Nuyts S.** Eur J Hum Genet 2007, Vol. 15, pp. 734–741.
293. *Length rather than a specific allele of dinucleotide repeat in the 50 upstream region of the aldose reductase gene is associated with diabetic retinopathy.* **Fujisawa T, Ikegami H, Kawaguchi Y, et al.** Diabet Med 1999, Vol. 16, pp. 1944–1947.
294. *Evaluation of loss of heterozygosity and microsatellite instability in human pterygium: clinical correlations.* **Detorakis ET, Sourvinos G, Tsamparlakis J, et al.** Br J Ophthalmol 1998, Vol. 82, pp. 1324–1328.
295. *Microsatellite DNA instability in benign lung diseases.* **Samara K, Zervou M, Sifakas NM, Tzortzaki EG.** Respir Med 2006, Vol. 100, pp. 202–211.
296. *Identifying ‘well-controlled’ and ‘not well-controlled’ asthma using the Asthma Control Questionnaire.* **Juniper EF, Bousquet J, Abetz L, Bateman ED, GOAL Committee.** Respir Med 2006, Vol. 100, pp. 616–621.

297. *Development and validation of a questionnaire to measure asthma control.* **Juniper EF, O' Byrne PM, Guaytt GH, et al.** Eur Respir J 1999, Vol. 14, pp. 902–907.
298. *American Thoracic Society/European Respiratory Society Working Group on Infant and Young Children Pulmonary Function Testing. An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: pulmonary function testing in preschool children.* **Beydon N, Davis SD, Lombardi E, et al.** Am J Respir Crit Care Med 2007, Vol. 175, pp. 1304-1345.
299. *Measurement of inflammatory indices in induced sputum: effects of selection of sputum to minimize salivary contamination.* **Pizzichini E, Pizzichini MM, Efthimiadis A, et al.** Eur Respir J 1996, Vol. 9, pp. 1174–1180.
300. *Comparison of induced sputum inflammatory profiles between childhood and adult-onset asthma.* **Papadopouli E, Tzanakis N, Tsoumakidou M, et al.** Respir Med 2006, Vol. 100, pp. 1442–1450.
301. *The genetics of asthma.* **Sandford A, Pare P.** Am J Respir Crit Care Med 2000, Vol. 161, pp. 202–206.
302. *The role of genetics in the development of asthma and atopy.* **MN., Blumenthal.** Curr Opin Allergy Clin Immunol 2005, Vol. 5, pp. 141–145.
303. *The genetics of bronchial asthma in children.* **Bierbaum S, Heinzmann A.** Respir Med 2007, Vol. 101, pp. 1369–1375.
304. *Local genetic and environmental factors in asthma disease pathogenesis: chronicity and persistence mechanisms.* **Holgate ST, Davies DE, Powell RM, Howarth PH, Haitchi HM, Holloway JW.** Eur Respir J 2007, Vol. 29, pp. 793–803.
305. *Interpatient variability in rates of asthma progression: can genetics provide an answer?* **Holloway JW, Yang IA, Holgate ST.** J Allergy Clin Immunol 2008, Vol. 121, pp. 573–579.
306. *National Center for Biotechnology Information. Summary of Maps in UniSTS.* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=unists>.

307. *The immunogenetics of asthma and eczema: a new focus on the epithelium.* **W. Cookson.** Nat Rev Immunol 2004, Vol. 4, pp. 978–988.
308. *Making sense of asthma genes.* **Cookson W, Moffatt M.** N Engl J Med 2004, Vol. 21, pp. 1794–1796.
309. *Association studies for asthma and atopic diseases: a comprehensive review of the literature.* **Hoffjan S, Nicolae D, Ober C.** Respir Res 2003, Vol. 4, p. 14.
310. *Linkage and association of atopic asthma to markers on chromosome 13 in the Japanese population.* **Kimura K, et al.** Hum Mol Genet 1999, Vol. 8, pp. 1487–1490.
311. *Interactions between genes and environment in the development of asthma.* **Patino CM, Martinez FD.** Allergy 2001, Vol. 56, pp. 279–286.
312. *Evidence for linkage of chromosome 5q31-q33 and 13q12-q14 markers to atopic dermatitis.* **Beyer K, et al.** J Allergy Clin Immunol 1998, Vol. 101, p. 152.
313. *Induction of microsatellite mutations by oxidative agents in human lung cancer cell lines.* **Zienolddiny S, Ryberg D, Haugen A.** Carcinogenesis 2000, Vol. 21, pp. 1521–1526.
314. *GSTM1 and GSTP1 and respiratory health in asthmatic children exposed to ozone.* **Romieu I, Ramirez-Aguilar M, Siembra-Monge JJ, et al.** Eur Respir J 2006, Vol. 28, pp. 953–959.
315. *Problems of reporting genetic associations with complex outcomes.* **Colhoun HM, McKeigue PM, Davey Smith G.** Lancet 2003, Vol. 361, pp. 865–872.
316. *Microsatellite DNA instability and chronic obstructive pulmonary disease exacerbations.* **Makris D, Tzanakis N, Damianaki A, et al.** Eur Respir J 2008, Vol. 32, pp. 612–618.
317. *Filaggrin variants confer susceptibility to asthma.* **McLean WH, Palmer CN, Henderson J, Kabesch M, Weidinger S, Irvine AD.** J Allergy Clin Immunol 2008, Vol. 121, pp. 1294–95.
318. *Meta-analysis of genome-wide linkage studies of asthma and related traits.* **Denham S, Koppelman GH, Blakey J, et al.** Respir Res 2008, Vol. 9, p. 38.

319. *Genetic linkage of T-cell receptor α/δ complex to specific IgE responses.*
Moffatt MF, Hill MR, Cornelis F, et al. Lancet 1994, Vol. 343, pp. 1597–1600.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

&

**ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΟ ΑΡΘΡΟ ΣΕ ΠΕΡΙΟΔΙΚΟ ΑΞΙΟΛΟΓΗΜΕΝΟ
ΣΤΟ INDEX MEDICUS (Pubmed)**

Genetic Alterations at Microsatellite DNA in Children with Bronchial Asthma

C.K. Thomou, E. Paraskakis, E.G. Tzortzaki, M.I. Zervou, E. Neofytou, M. Kalmanti, N.M. Siafakas

Background: High incidence of genetic alterations at microsatellite DNA level have been reported in asthmatic adults. The aim of our study was to investigate whether microsatellite instability (MSI) and loss of heterozygosity (LOH) were detectable phenomena in children with asthma.

Subjects and Methods: DNA was extracted from sputum and blood cells of 27 children, (10.8±2.5 years, 18 males) with mild to moderate asthma. Twelve polymorphic microsatellite markers located on chromosomes (chr) 5q, 6p, 11q, 13q and 14q were used to assess MSI and LOH.

Results: 5 of the 27 children exhibited MSI and/or LOH in sputum cells versus blood samples from which 3 in the MS marker USAT24G1 (chr 13q14.1), 1 in the MS marker D14S258 (chr 14q23-q24.3) and 1 in the MS marker D5S637 (chr 5q12-q13). There was no significant difference between the children without alterations and those that presented MI or LOH in the median (range) sputum eosinophils [1(0-6.5) vs 1(0-1)%, p=0.7], mean blood eosinophils (4.6±2.6 vs 3.4±2.3%, p=0.3), duration of the disease (7.9±1 vs 6.7±1.4 years, p=0.5) or serum total IgE (288.6±366.8 vs 69.9±54.8 IU/ml, p=0.2).

Conclusion: Children with asthma presented a lower incidence of genetic alterations

compared to asthmatic adults. This finding implies that genetic alterations observed at asthmatic adults might be acquired and that gene-environmental interactions are important for the future evolution of the disease. Further studies are needed to evaluate the role of MSI and LOH in the pathogenesis of asthma taking into account environmental susceptibility factors as well.

Genetic Alterations at Microsatellite DNA Level in Asthmatic Children

Thomou, C., Paraskakis, E., Tzortzaki, E.G., Zervou, M.I., Neofytou, E., Kalmanti, M., Siafakas, N.M.

Background and Aims: Asthma is a chronic inflammatory disease of the airways with great phenotypic and genetic diversity. The study of the genetic basis of asthma has been of great interest in the last years. In asthmatic adults, high incidence of genetic alterations at microsatellite DNA level has been reported. The aim of our study was to investigate whether microsatellite instability (MSI) and loss of heterozygosity (LOH) were detected in asthmatic children and if so the incidence of these genetic alterations and their probable correlation with atopy, severity and duration of disease, sputum and blood eosinophils and environmental factors.

Subjects and Methods: DNA was extracted from sputum and blood cells of 27 children, (10.8±2.5 years, 18 males) with mild to moderate asthma. Twelve polymorphic microsatellite markers located on chromosomes (chr) 5q, 6p, 11q, 13q and 14q were used to assess MSI and LOH.

Results: 5 of the 27 children exhibited MSI and/or LOH in sputum cells versus blood samples from which 3 in the MS marker USAT24G1 (chr 13q14.1), 1 in the MS marker D14S258 (chr 14q23-q24.3) and 1 in the MS marker D5S637 (chr 5q12-q13). There was no significant difference between the children without alterations and those

that presented MI or LOH in the median (range) sputum eosinophils [1(0-6.5) vs 1(0-1) %, $p=0.7$], mean blood eosinophils (4.6 ± 2.6 vs $3.4\pm 2.3\%$, $p=0.3$), duration of the disease (7.9 ± 1 vs 6.7 ± 1.4 years, $p=0.5$) or serum total IgE (288.6 ± 366.8 vs 69.9 ± 54.8 IU/ml, $p=0.2$).

Conclusions: Children with asthma presented a lower incidence of genetic alterations compared to asthmatic adults. This finding implies that genetic alterations observed at asthmatic adults might be acquired and that gene-environmental interactions are of great importance as well for the future evolution of the disease. Further studies are needed to evaluate the role of MSI, LOH and gene-environmental interactions in order to understand the pathogenesis of asthma and to identify at-risk individuals.

ERS Annual Congress 2007

Microsatellite DNA Instability and Loss of Heterozygosity in Asthmatic Children

E. Paraskakis, C. Thomou, H. Tzortzaki, E. Neofytou, M. Kalmanti, N.M. Siafakas.

Background: High incidence of genetic alterations, such as loss of heterozygosity (LOH) or microsatellite instability (MI), have been reported in adult asthmatics.

Aim: To study the presence of MI and LOH in cells from the sputum of asthmatic children.

Subjects and Methods: DNA was extracted from cells in the sputum and blood cells of 25 (17 male) children aged 10.5 years (range 7-17) with moderate asthma. Cells were analysed for MI and LOH using 9 polymorphic markers on chromosome 5q, 6p, 11q, 13q, 14q.

Results: Genetic alterations were found in 5 out of 25 asthmatic patients (20%). Three children (12%) exhibited LOH and two (8%) MI. Genetic alterations were found in markers D5S637, USAT24G1 and D14S258 on chromosomes 5q, 13q and 14q respectively. Highest incidence of LOH (2) and MI (1) found on marker USAT24G1 on chromosome 13. Mean (\pm SD) IgE and blood eosinophils of the asthmatics with genetic alterations were similar with those with no LOH or MI (340.9IU/ml \pm 45.90 vs 260.0IU/ml \pm 81.24, $p=0.4446$, 288.7 \pm 78.20 vs 70.16 \pm 24.58, $p=0.2$ respectively).

Conclusion: Compared to adult asthmatics a low incidence of genetic alterations was found in asthmatic children. These findings imply that genetic alterations such as LOH and MI in asthmatic patients may be acquired. Further studies are needed to identify the role of LOH and MI in the pathogenesis of asthma.

**Πρόκληση Πτυέλων σε Ασθματικά Παιδιά: Ασφάλεια και
Δυνατότητα Εφαρμογής Νέων Μεθόδων Παρακολούθησης
της Φλεγμονής σε Δείγματα Πτυέλων**

*Θώμου Χ., Παρασκάκης Ε., Παπαδοπούλη Ε., Τζανάκης Ν., Σιαφάκας Νικόλαος.,
Καλμαντή Μ.*

Εισαγωγή. Η πρόκληση πτυέλων είναι μία μη επεμβατική μέθοδος παρακολούθησης της φλεγμονής των αεραγωγών σε ασθματικούς ασθενείς.

Σκοπός μας ήταν να μελετήσουμε την ασφάλεια της πρόκλησης πτυέλων σε παιδιά και τη δυνατότητα εφαρμογής νέων μεθόδων για την αξιολόγηση κυττάρων και δεικτών φλεγμονής σε δείγματα πτυέλων.

Μέθοδος. Πρόκληση πτυέλων έγινε σε 41 (26 αγόρια) ασθματικά παιδιά υπό χρόνια αγωγή με εισπνεόμενα κορτικοστεροειδή [μέση ηλικία (διακύμανση) 10.5 έτη (6-16)], χρησιμοποιώντας 3.5% φυσιολογικό ορό σε 4 περιόδους διάρκειας 5 λεπτών η κάθε μία. Οι υποπληθυσμοί των Τ-λεμφοκυττάρων στα πτύελα (CD4+,8+,3+,25+) μετρήθηκαν σε 13 παιδιά με κυτταρομετρία ροής, ενώ στο υπερκείμενο των πτυέλων 14 παιδιών μετρήθηκαν η ιντερλευκίνη-8 (IL-8), ο αυξητικός παράγοντας μονοκυττάρων-κοκκιοκυττάρων (GM-CSF) και η ηωσινοφιλική κατιονική πρωτεΐνη (ECP).

Αποτελέσματα. Το 95% των παιδιών ανέχθηκαν καλά τη δοκιμασία. Σε 2/41 (5%) από αυτά η δοκιμασία διακόπηκε λόγω πτώσης της FEV₁ πάνω από 20%. Επαρκές δείγμα πτυέλου πάρθηκε στο 80.5% (33/41) των παιδιών. Υψηλότερο ποσοστό επιτυχίας παρατηρήθηκε σε παιδιά ≥ 10 ετών συγκριτικά με παιδιά μικρότερης ηλικίας (85% έναντι 50% αντίστοιχα, $p=0.03$). Αποτελέσματα των μετρήσεων: CD4+=43 \pm 15(%), CD3+=75 \pm 15(%), CD8+=24 \pm 13(%), CD25+=17 \pm 12(%), CD4+/CD8+=3.05 \pm 1.08, ECP=0.77 \pm 1.11 μ g/l, GM-CSF=31.97 \pm 32.74 pg/ml, IL-8=8991 \pm 7246pg/ml. Στατιστικά σημαντική συσχέτιση βρέθηκε μεταξύ των επιπέδων της ECP και της αναλογίας CD4+/CD8+ (0.631, $p=0.03$). Η εκχύλιση DNA από κύτταρα πτυέλου ήταν επιτυχής σε 15/16 (94%) των παιδιών με επαρκές δείγμα.

Συμπέρασμα. Συμπερασματικά, η πρόκληση πτυέλων είναι μία ασφαλής, απλή στην εφαρμογή της, μη επεμβατική μέθοδος για τη μελέτη κυττάρων και δεικτών φλεγμονής των αεραγωγών σε παιδιά μεγαλύτερα των 6 ετών. Επιπλέον, με αυτή τη δοκιμασία μπορούν να ληφθούν δείγματα DNA εύκολα για να υποβληθούν σε περαιτέρω γενετική ανάλυση.

Sputum Induction in Asthmatic Children: Safety in Children and Feasibility of New Methods of Monitoring Inflammation in Sputum Samples

E. Paraskakis, E. Papadopouli, C. Thomou, N. Tzanakis, M. Kalmanti, N.M. Siafakas.

Background. Sputum induction is a non invasive method of airway inflammation monitoring in asthmatics. We aimed to test the safety of sputum induction in children and the feasibility of new methods of assessment of inflammatory cells and markers in sputum samples.

Methods. Sputum induction was performed in 41(26 males) steroid treated asthmatic children [median age (range) 10.5 years (6-16)], using 3.5% saline for four 5-min periods. Sputum T- cell subpopulations (CD4+,8+,3+,25+) was counted in 13 children by flow-cytometry and at the supernatant fraction of 14 children, interleukin-8 (IL-8), granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) and eosinophilic cationic protein (ECP) was measured.

Results. 95% of the children tolerated well the procedure, in 2/41 (5%) of them the procedure stopped because of decrease FEV₁ more than 20%. Adequate sample was obtained in 80.5% (33/41) of the children. Higher success rate was found in children ≥ 10 years than in younger children (85% vs. 50%, $p = 0.03$). Results of the assessments are as follows: CD4+=43 \pm 15(%), CD3+=75 \pm 15(%), CD8+=24 \pm 13(%), CD25+=17 \pm 12(%), CD4/CD8 =3.05 \pm 1.08, ECP= 0.77 \pm 1.11 μ g/l, GM-CSF=31.97 \pm 37.24pg/ml, IL-8=8991 \pm 7246pg/ml. Statistically significant correlation

was found between ECP levels and CD4+/ CD8+ ratio (0.631, p=0.03). DNA extraction was performed successfully in 15/16 (94%) of children with adequate sample.

Conclusion. In conclusion, sputum induction is an easily applicable, non-invasive and safe method to study airway inflammatory cells and markers in children older than 6 years old. Moreover the procedure may easily provide DNA samples for further genetic studies.