

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ  
ΠΝΕΥΜΟΝΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ  
ΔΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΣΙΑΦΑΚΑΣ

ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΟ ΤΟΥ ΥΔΡΟΓΟΝΟΥ ΣΤΟ ΣΥΜΠΥΚΝΩΜΑ ΤΟΥ  
ΕΚΠΝΕΟΜΕΝΟΥ ΑΕΡΑ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΕΙΣ ΠΑΘΗΣΕΙΣ ΤΩΝ  
ΑΕΡΑΓΩΓΩΝ

ΣΤΕΛΙΟΣ Θ ΛΟΥΚΙΔΗΣ  
ΠΝΕΥΜΟΝΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ  
ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2002

Στην ιερή μνήμη του νονού μου Ιατρού Μενέλαου Σωτηριάδη

Στην Αθηνά, στη Σοφία και στο Θοδωρή  
Στους γονείς μου

**Ημερομηνία κατάθεσης 11-5-1998**

**Ορισμός Τριμελούς 25-6-1998**

Αν Καθηγητής Μπούρος Δ (επιβλέπων)

Καθηγητής Χελιδόνης Ε

Καθηγητής Σιαφάκας Ν

**Ημερομηνία παρουσίασης 4-6-2002**

**Επταμελής επιτροπή**

Αν Καθηγητής Μπούρος Δ (επιβλέπων)

Καθηγητής Σιαφάκας Ν

Καθηγητής Χελιδόνης Ε

Καθηγητής Πλαιτάκης Α

Αν Καθηγητής Γεωργόπουλος Δ

Επ Καθηγητής Τζανάκης Ν

Λέκτορας Φρουδαράκης Μ

**Βαθμός Άριστα**

## **ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ.**

Γεννήθηκα στη Θεσσαλονίκη το 1963. Εκεί τελείωσα την δευτεροβάθμια εκπαίδευση στο 5<sup>ο</sup> Πρότυπο Λύκειο Θεσσαλονίκης. Το 1981 μετά από Πανελλήνιες εξετάσεις πέτυχα στην Στρατιωτική Ιατρική σχολή εγγραφόμενος στην Ιατρική σχολή του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης. Απεφοίτησα το 1987 την Α' πτυχιακή περίοδο. Ακολούθησε ένας χρόνος εκπαίδευσης στο 401ΓΣΝΑ σε βασικές ειδικότητες της ιατρικής. Από το 11<sup>ο</sup> /1988-2<sup>ο</sup>/1990 εξασκούσα τα καθήκοντα του Ιατρού στο κέντρο κατάταξης Κορίνθου. Από το 3<sup>ο</sup>/90-3<sup>ο</sup>/94 ειδικεύτηκα στη Πνευμονολογία (Β' παθολογική κλινική 401ΓΣΝΑ [χρόνος Παθολογίας] και 4<sup>η</sup> κλινική του ΝΝΘΑ). Το 1994 απόκτησα το τίτλο ειδικότητας Πνευμονολογίας –Φυματιολογίας μετά από εξετάσεις. Από τον 4<sup>ο</sup>/1994-8<sup>ο</sup>/1996 τοποθετήθηκα Επιμελητής της Πνευμονολογικής κλινικής 401ΓΣΝΑ. Τον επόμενο 1.5 χρόνο μετεκπαιδεύτηκα στο National Heart Lung Institute, Royal Brompton Hospital ως clinical research fellow υπό τον καθηγητή P Barnes. Από τον 11<sup>ο</sup>/1997 είμαι Επιμελητής της Πνευμονολογικής κλινικής 401ΓΣΝΑ.

Είμαι μέλος στις κάτωθι Επιστημονικές εταιρείες.

Ελληνική Πνευμονολογική Εταιρίας-Ομάδα άσθματος.

Ελληνική Βρογχολογική Εταιρία.

American Thoracic Society.

European Respiratory Society.

Μαζί με τους συναδέλφους μου έχω παρουσιάσει σε ελληνικά συνέδρια 50 επιστημονικές εργασίες και σε ξένα συνέδρια 68. Έχω συμμετάσχει επίσης ως εισηγητής σε 21 στρογγυλές τράπεζες επιστημονικών συνεδρίων.

Έχω εκπονήσει τις κάτωθι δημοσιεύσεις:

### **Ξένες δημοσιεύσεις.**

1. K Kostikas, G Papatheodorou, K Ganas, K Psathakis, P Panagou, S Loukides. PH in expired breath condensate in patients with inflammatory airway diseases. AJRCCM 2002; 165: 1364-70.
2. S Loukides, D Bouros, G Papatheodorou P Panagou NM Siafakas. The relationship among hydrogen peroxide in expired breath condensate airway inflammation and asthma severity. Chest 2002; 121:338-46.

3. S Loukides, D Bouros, G Papatheodorou P Panagou NM Siafakas. Hydrogen peroxide in steady state bronchiectasis. *Chest* 2002; 121:81-7.
4. Ganas K, Loukides S, Papatheodorou G, Panagou P, Kalogeropoulos N. Total nitrite/nitrate in expired breath condensate of patients with asthma. *Respir Med* 2001; 95:649-54
5. Poulakis N, Androutsos G, Voucouti N, Paterakis G, Loukides S, Kontozoglou T, Bastas A, Bitsakou C, Provata A, Polyzogopoulos D, Tasiopoulou A. Cytokine production by monocytes/macrophages is normal in patients with alveolar proteinosis: a report of two cases. *Respiration* 2001;68: 224-5.
6. Zervas E, Loukides S, Papatheodorou G, Psathakis K, Tsindiris K, Panagou P, Kalogeropoulos N. Magnesium levels in plasma and erythrocytes before and after histamine challenge. *Eur Respir J* 2000;16:621-5.
7. Loukides S, Karameris A, Lachanis S, Panagou P, Kalogeropoulos N. Eosinophilic granuloma of the lung presenting as an endobronchial mass. *Monaldi Arch Chest Dis* 2000;55:208-9.
8. Loukides S, Katsoulis K, Tsarpalis K, Panagou P, Kalogeropoulos N. Serum concentrations of lignocaine before, during and after fiberoptic bronchoscopy. *Respiration* 2000;67:13-17.
9. Paredi P, Kharitonov SA, Loukides S, Pantelidis P, du Bois RM, Barnes PJ. Exhaled nitric oxide is increased in active fibrosing alveolitis. *Chest* 1999; 115:1352-6.
10. Culpitt SV, Maziak W, Loukides S, Nightingale JA, Matthews JL, Barnes PJ. Effect of high dose inhaled steroid on cells, cytokines, and proteases in induced sputum in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: 1635-9.
11. Paredi P, Loukides S, Ward S, Cramer D, Spicer M, Kharitonov SA, Barnes PJ. Exhalation flow and pressure-controlled reservoir collection of exhaled nitric oxide for remote and delayed analysis. *Thorax* 1998; 53: 775-9.

12. Horvath I, Loukides S, Wodehouse T, Kharitonov SA, Cole PJ, Barnes PJ. Increased levels of exhaled carbon monoxide in bronchiectasis: a new marker of oxidative stress. *Thorax* 1998; 53:867-70.
13. Loukides S, Panagou P, Kolokouris D, Kalogeropoulos N. Bacterial pneumonia as a suprainfection in young adults with measles. *Eur Respir J.* 1999;13:356-60.
14. Panagou P, Loukides S, Tsipra S, Syrigou K, Anastasakis C, Kalogeropoulos N. Evaluation of nasal patency: comparison of patient and clinician assessments with rhinomanometry. *Acta Otolaryngol* 1998; 118: 847-51.
15. Loukides S, Horvath I, Wodehouse T, Cole PJ, Barnes PJ. Elevated levels of expired breath hydrogen peroxide in bronchiectasis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998; 158: 991-4.
16. Loukides S, Kharitonov S, Wodehouse T, Cole PJ, Barnes PJ. Effect of arginine on mucociliary function in primary ciliary dyskinesia. *Lancet* 1998 1; 352: 371-2.
17. Panagou P, Loukides S, Tsipra S, Kalogeropoulos N. Suppressible BALF lymphocyte phenotype in a patient with prolonged stable alveolar proteinosis. *Respiration* 1998; 65: 79-82.
18. Maziak W, Loukides S, Culpitt S, Sullivan P, Kharitonov SA, Barnes PJ. Exhaled nitric oxide in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 998-1002.
19. Loukides S, Lachanis S, Katsoulis K, Panagou P, Bougas K, Papavergos T. Unilateral hypertranslucency of the left hemithorax due to aneurysm of the thoracic aorta. *Thorax* 1997; 52: 299-300.
20. Loukides S, Polyzogopoulos D. The effect of diabetes mellitus on the outcome of patients with chronic obstructive pulmonary disease exacerbated due to respiratory infections. *Respiration* 1996;63:170-3.

### **Ελληνικές Δημοσιεύσεις.**

1. Φυσική Ιστορία του άσθματος. Έκδοση ελληνικής Πνευμονολογικής Εταιρίας με θέμα "Άσθμα και Περιβάλλον". 2002; 34-48.
2. Συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα: Μια νέα μη επεμβατική μέθοδος για την εκτίμηση της φλεγμονής των αεραγωγών. Κ Κωστίκας Σ Λουκίδης. *Πνεύμων* 2001 (14):184-196.

3. Τα επίπεδα των νιτρικών/νιτρωδών στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα ασθενών με βρογχικό άσθμα. Κ Γκανάς, Σ Λουκίδης, Γ Παπαθεοδώρου, Κ Κωστίκας, Κ Ψαθάκης, Π Πανάγου, Ν Καλογερόπουλος. Πνεύμων 2001 (14): 224-231.
4. Λειτουργικές συνέπειες εγχειρήσεων κοιλίας στο αναπνευστικό σύστημα. Κ Κωστίκας Σ Λουκίδης Πνεύμων 2001 (Ειδικό τεύχος με θέμα "Περιεγχειρητικός έλεγχος και φροντίδα ασθενών με χρόνια αναπνευστική νόσο"). 31-39.
5. Συμπύκνωμα εκπνεόμενου αέρα. Σ Λουκίδης. Ανασκόπηση στο περιοδικό Info Respiratory Medicine 2001
6. Ενδείξεις νεφρολοποιητών. Σ Λουκίδης. Ανασκόπηση στο περιοδικό Info Respiratory Medicine 2001.
7. Πνευμονική σαρκοείδωση: Ευρήματα με Αξονική Τομογραφία Υψηλής Διακριτικότητας. Π Πατούρας, Β Κουτουλίδης, Δ Κόκκινος, Σ Λουκίδης, Κ Τσιντηρής, Σ Λάχανης. Ελληνική Ακτινολογία 2000 (31): 374-81.
8. Τα επίπεδα του υπεροξειδίου του υδρογόνου στον εκπνεόμενο αέρα ασθενών με βρογχεκτασίες: Σχέση με την φλεγμονή την βαρύτητα και την έκταση της νόσου. Σ Λουκίδης, Δ Μπούρος, Γ Παπαθεοδώρου Σ Λάχανης, Π Πανάγου, Ν Καλογερόπουλος, Ν Σιαφάκας. Πνεύμων 2000 (13) :144-153.
9. Περίπτωση κεραυνοβόλου πνευμονίτιδος με συνοδό οξεία αναπνευστική ανεπάρκεια ως προεξάρχουσα εκδήλωση ΣΕΛ. Ε Ζέρβας, Σ Λουκίδης, Σ Ξυδώρας, Δ Κασίμος, Π Πανάγου, Ν Καλογερόπουλος. Πνεύμων 2000 (13): 236-240.
10. Συγγενής βρογχική ατρησία: Απεικονιστικά ευρήματα. Σ Λάχανης, Β Κουτουλίδης, Δ Κόκκινος, Π Πατούρας, Σ Λουκίδης, Κ Τσιντηρής. Ελληνική Ακτινολογία 2000 (31):193-198.
11. 2<sup>ο</sup> Σεμινάριο Εντατικής νοσηλείας με θέμα Ισοβαρική και Υπερβαρική οξυγονοθεραπεία. Πρακτικά εισηγήσεων σε ειδικό τεύχος, 1999. Επιπλοκές και αντενδείξεις Υπερβαρικού Οξυγόνου. Σ Λουκίδης. 195-200.
12. Η επίδραση του Σακχαρώδη διαβήτη στην πορεία των λοιμώξεων ασθενών με ΧΑΠ. Σ Λουκίδης. ΙΕΕΔ 1999 (33):47-51.

13. Η επίδραση της δοκιμασίας πρόκλησης με ισταμίνη στα επίπεδα του μαγνησίου στον ορό και τα ερυθροκύτταρα. Ε Ζέρβας, Σ Λουκίδης, Γ Παπαθεοδώρου, Κ Τσιντηρής, Κ Ψαθάκης, Π Πανάγου, Ν Καλογερόπουλος. Πνεύμων 1999 (12): 182-88.
14. Μη βελτιούμενη πνευμονία σε νεαρό ενήλικα. Χ Μερμίγκης, Σ Λουκίδης, Α Καραμέρης, Κ Τσιντηρής, Σ Λάχανης, Π Πανάγου, Ν Καλογερόπουλος. Πνεύμων 1998 (11): 104-07.
15. Δύο περιπτώσεις κοινής πέμφιγας σε συνδυασμό με καρκίνο πνεύμονος πλακώδους τύπου. Κ Κατσούλης, Α Μπάστας, Δ Βενετούλης, Π Μυριανθεύς, Σ Λουκίδης, Δ Πολυζωγόπουλος. Ιατρική 1998(74):505-07.
16. Η βακτηριδιακή πνευμονία ως επιπλοκή σε νεαρούς ενήλικες με ιλαρά. Σ Λουκίδης, Δ Κολοκούρης, Κ Κατσούλης, Π Πανάγου, Ν Καλογερόπουλος. Πνεύμων 1998(11): 22-29.
17. Περίπτωση νόσου του Recklinjhausen σε συνδυασμό με εκτεταμένο πλεξοειδές νευρίνωμα μεσοθωρακίου. Σ Λουκίδης, Κ Κατσούλης, Σ Λάχανης, Ι Παναγιωτίδης, Δ Σαμπαζιώτης, Π Παπαδάκης, Θ Παπαβέργος. ΙΕΕΔ 1998(32): 165-68.
18. Ετερόπλευρη αγενεσία της πνευμονικής αρτηρίας : Απεικονιστικά ευρήματα. Σ Λάχανης, Δ Κεχαγιάς, Σ Λαζάρου, Σ Λουκίδης, Θ Παπαβέργος ΙΕΕΔ 1997(33):59-63.
19. Ο χρόνος χορήγησης του συνδυασμού  $\beta_2$  διεγερτών και αντιχολινεργικών για το καλύτερο θεραπευτικό αποτέλεσμα σε ασθενείς με βρογχικό άσθμα και ΧΑΠ σε παρόξυνση. Σ Λουκίδης. ΙΕΕΔ 1997(31): 167-71.
20. Χοληστερόλη ένας χρήσιμος δείκτης για την διαφορική διάγνωση εξιδρωματικών και διϊδρωματικών υπεζωκοτικών συλλογών. Σ Λουκίδης, Ι Σαμαρά, Χ Κάντζα, Ν Πουλάκης, Δ Ρίζος, Δ Πολυζωγόπουλος. ΙΕΕΔ 1996 (30): 101-06.
21. Ετερόπλευρη υπερδιαφάνεια πνεύμονος συνεπεία ανευρύσματος κατιούσης θωρακικής αορτής. Σ Λουκίδης, Σ Λάχανης, Κ Κατσούλης, Δ Φωτόπουλος, Π Πανάγου, Κ Μπουγάς, Θ Παπαβέργος. Αρχεία Ελληνικής Ιατρικής 1995 (12):506-09.



22. Τα επίπεδα του TNF-a και της IL-2 στον ορό και πλευριτικό υγρό ασθενών με υπεζωκοτικές συλλογές. Ν Πουλάκης, Σ Λουκίδης, Χ Μπιτσάκου, Ι Σαμαρά, Ι Πανταλός, Δ Ρίζος, Δ Πολυζωγόπουλος. Αρχεία Ελληνικής Ιατρικής 1994 (11):274-78.
23. Συσχέτιση μικτής νόσου συνδετικού ιστού με λοίμωξη από ιό ηπατίτιδας Α. Σ Λουκίδης, Μ Αρχαύλης, Θ Ροκκάς, Δ Καρράς, Ν Γιαννίκος. Ιατρική 1994 (66):65-69.
24. Φυματιώδης λεμφαδενίτιδα μετά συνοδού φυματιώσεως αριστερής κλείδας και αριστερής κατ' ώμο άρθρωσης. Σ Λουκίδης, Α Προβατά, Δ Πολυζωγόπουλος. ΙΕΕΔ 1994 (28):175-79.
25. Πρωτοπαθής υπερπαραθυρεοειδισμός συνεπεία καρκινώματος των παραθυρεοειδών με ασυνήθιστες κλινικές εκδηλώσεις. Σ Λουκίδης, Λ Καρνέσης, Μ Αρχαύλης, Π Αρσενίου, Δ Καρράς, Α Κοντοάγγελος, Ν Γιαννίκος. ΙΕΕΔ 1991 (25):149-52.
26. Η επίδραση της ενδοαρθρικής έγχυσης δύο διαφορετικών σκευασμάτων κορτικοειδούς βραχείας απορρόφησης επί της κυτταροκινητικής των λευκών αιμοσφαιρίων του περιφερικού αίματος. Μ Αρχαύλης, Σ Λουκίδης, Δ Πατρίκος, Δ Καρράς, Ν Γιαννίκος. Ελληνική Ρευματολογία 1990 (3):245-49.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον καθηγητή κύριο Σιαφάκα και τον Αναπληρωτή καθηγητή κύριο Μπούρο για την αμέριστη βοήθεια και συμπαράσταση για την εκπόνηση της διατριβής. Να ευχαριστήσω επίσης τον βιοχημικό Γεώργιο Παπαθεοδώρου για την βοήθεια του στην επεξεργασία των δειγμάτων και στις μετρήσεις αυτών, καθώς και το προσωπικό της κλινικής μου στο 401ΓΣΝΑ και ιδιαίτερα τους ιατρούς Κωνσταντίνο Κωστίκα, Κωνσταντίνο Γκανά και Λευτέρη Ζέρβα για την βοήθειά τους στη συλλογή των δειγμάτων.

## ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### **A) ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ STRESS ΣΕ ΠΑΘΗΣΕΙΣ ΤΩΝ ΑΕΡΑΓΩΓΩΝ.**

Γενικά.

Όλα τα άτομα με την φυσιολογική διαδικασία της αναπνοής παράγουν ελεύθερες ρίζες. Όταν η παραγωγή ελευθέρων ριζών είναι αυξημένη και συγχρόνως υπάρχει διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών μηχανισμών τότε οδηγούμαστε σε διαδικασίες που έχουν σαν αποτέλεσμα την καταστροφή των κυτταρικών δομών με παράλληλη έναρξη της φλεγμονής. Η ονομασία ελεύθερες ρίζες ουσιαστικά χαρακτηρίζει άτομα ή μόρια που περιέχουν μειωμένο αριθμό ηλεκτρονίων συμμετέχοντας και στις φυσιολογικές μεταβολικές λειτουργίες των κυττάρων, αλλά και στην διαδικασία της φλεγμονής οδηγώντας πολλές φορές σε μη αναστρέψιμες βλάβες. Αυτός ο μειωμένος αριθμός ηλεκτρονίων έχει ως αποτέλεσμα τα ηλεκτρόνια που βρίσκονται στην εσωτερική τροχιά τους να μην είναι κατά ζεύγη. Προσπαθώντας δε να ζευγαρώσουν τα ηλεκτρόνια τους παίρνουν ηλεκτρόνια από άλλα μόρια ή απελευθερώνουν τα δικά τους ηλεκτρόνια. Αυτή η συνεχής ανταλλαγή ηλεκτρονίων πυροδοτεί μια διαδικασία μετάλλαξης και πολλαπλασιασμού των ελευθέρων ριζών που έχει σαν συνέπεια τον περαιτέρω σχηματισμό και άλλων ελευθέρων ριζών, με τελικό αποτέλεσμα την δομική αλλαγή κυττάρων με φυσιολογική λειτουργία<sup>1</sup>. Η προέλευσή τους είναι από διαφορετικές ενδοκυττάριας πηγές όπως η βασική μεμβράνη, το ενδοπλασματικό δίκτυο και τα μιτοχόνδρια. Αυξημένη όμως παραγωγή έχει παρατηρηθεί και σε εξωκυττάρια μέρη κυρίως στην διαδικασία οξέων φλεγμονωδών καταστάσεων.

Στον άνθρωπο το οξυγόνο με την έννοια των συστατικών του που ονομάζονται ενεργά οξειδωτικά μόρια δρα ως βασικό οξειδωτικό στοιχείο. Η παραγωγή των οξειδωτικών μορίων μπορεί να αλλάξει την δομή και τον μεταβολισμό των κυττάρων, να αλληλεπιδρά με τα ακόρεστα λιπαρά οξέα της μεμβράνης, με τα νουκλεϊκά οξέα, οδηγώντας πολλές φορές σε αλλαγές του DNA και κατ' επέκταση σε κυτταρικές μεταλλάξεις. Τα πιο γνωστά οξειδωτικά μόρια είναι το ανιόν υπεροξειδίου ( $O_2^-$ ), το υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) και η ελεύθερη ρίζα υδροξυλίου ( $OH^\cdot$ ). Τα ενεργά οξειδωτικά μόρια

παράγονται ως αποτέλεσμα διαδικασιών που έχουν ως κοινό παρανομαστή καταλυτικές επιδράσεις κυτταρικών ενζύμων με ταυτόχρονη μεταφορά ηλεκτρονίων. Η παραγωγή τους εξαρτάται και από την ενεργοποίηση φλεγμονωδών και δομικών κυττάρων όπως τα ουδετερόφιλα, τα μακροφάγα, τα ηωσινόφιλα, τα μαστοκύτταρα και τα επιθηλιακά κύτταρα<sup>2</sup>. Η παραγωγή του  $O_2^-$  γίνεται μέσω της οξειδάσης της NADPH, ενώ το ίδιο μετατρέπεται σε  $H_2O_2$  μέσω της υπεροξειδικής δισμουτάσης. Το  $H_2O_2$  αποικοδομείται σε νερό μέσω των καταλασών. Η αλληλεπίδραση  $H_2O_2$  και  $O_2^-$  με ταυτόχρονη παρουσία ελεύθερου ανιόντος σιδήρου οδηγεί στη παραγωγή του υψηλής ενεργότητας μορίου  $OH^-$ . Το  $OH^-$  παράγεται επίσης από την αντίδραση  $O_2^-$  και μονοξειδίου του αζώτου<sup>3</sup>. Μία άλλη οδό του οξειδωτικού stress αποτελεί η υπεροξειδωση των λιπών με κύριο εκπρόσωπό της τα θειοβαρβιτουρικά οξέα και κυρίως τα ισοπροστάνια με γνωστότερο εκπρόσωπο το 8-ισοπροστάνιο. Αυτά είναι σταθερά δομημένες προσταγλανδίνες που παράγονται *in vivo*, μέσω της οξειδωσης του αραχιδονικού οξέος με μεσολαβητή μη ενζυμικούς μηχανισμούς, ανεξάρτητα από τον κύκλο της κυκλοοξυγενάσης<sup>4</sup>. Παρ' όλο ότι εξακολουθεί να υπάρχει το ερώτημα αν η λιποειδής υπεροξειδωση σχετίζεται με δυσλειτουργία οργάνων ή απλά καταδεικνύει οξειδωτική φλεγμονή, η παρουσία λιποειδούς υπεροξειδωσης σε συγκεκριμένους ιστούς επιβεβαιώνει την πρώτη θεωρία. Μια άλλη σημαντική οδός οξειδωτικού stress γίνεται μέσω της ενεργοποίησης του διαλυτού ενζύμου της οξυγενάσης της αίμης (HO-1) και την μετατροπή της αίμης και αιμίνης σε χολοπρασίνη, σε μονοξείδιο του άνθρακα (CO) και σε σίδηρο. Το CO θεωρείται ότι εκπροσωπεί ως τελικό προϊόν την οξειδωτική δράση της HO-1<sup>5</sup>. Η ενεργοποίηση της HO-1 γίνεται από διάφορους παράγοντες με ενδεικτικότερους τις βακτηριδιακές τοξίνες, τα οξειδωτικά μόρια, το όζον και τις προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες.

Σαν αντιστάθμισμα των οξειδωτικών μηχανισμών υπάρχουν και λειτουργούν οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί. Τα κυριότερα αντιοξειδωτικά στοιχεία είναι η καταλάση, η υπεροξειδική δισμουτάση και η γλουταθιόνη που προέρχεται από την εξαρτώμενη από το σελήνιο περοξειδάση της γλουταθιόνης<sup>6</sup>. Οι εξωκυτταριοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί περιλαμβάνουν διαιτητικές ουσίες όπως η βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ), η βιταμίνη D (α-τοχοφερόλη), η λακτοφερίνη και το ουρικό οξύ.

**Δράση οξειδωτικών μορίων στους αεραγωγούς.**

### **Επίδραση οξειδωτικών μορίων στους αεραγωγούς.**

Τα οξειδωτικά μόρια έχουν πολλαπλές επιδράσεις στους αεραγωγούς οι οποίες έχουν ως τελικό αποτέλεσμα την προαγωγή της φλεγμονής. Οι επιδράσεις αυτές μπορεί να είναι άμεσες και να αφορούν τα κύτταρα στόχους η έμμεσες και να σχετίζονται με την απελευθέρωση οξειδωτικών μεσολαβητών όπως είναι το 8-ισοπροστάσιο ή την ενεργοποίηση παραγόντων μεταφοράς όπως ο NF-κB με τελικό αποτέλεσμα την ενεργοποίηση πολλαπλών φλεγμονωδών γονιδίων. Εκτός από την εσωτερική διαδικασία η παρουσία εξωγενών πηγών οξειδωτικού stress είναι σημαντική στη διαδικασία της φλεγμονής. Η έκθεση σε όζον και σε λιγότερο ποσοστό σε νιτρικό διοξείδιο ενεργοποιούν διαδικασίες οξειδωτικού stress στους αεραγωγούς<sup>7</sup>.

### **Δράση στις λείες μυϊκές ίνες των αεραγωγών.**

Το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> προκαλεί *in vitro* άμεσα σπασμό των λείων μυϊκών ινών, με την διαδικασία να επηρεάζεται εν μέρει από την απελευθέρωση μεσολαβητών όπως είναι τα προστανοειδή<sup>8</sup>. Τα οξειδωτικά μόρια μπορεί να καταστρέψουν το επιθήλιο των αεραγωγών με αποτέλεσμα αυξημένες βρογχοσυσπαστικές απαντήσεις σε ανάλογα ερεθίσματα<sup>9</sup>. Η υπεροξειδική δισμουτάση προκαλεί μειωμένη υπεραντιδραστικότητα στην τραχεία πειραματόζων *in vitro*, οδηγώντας στην υπόθεση ότι η ανάλογη παρουσία O<sub>2</sub><sup>-</sup> μέσω της αυξημένης παραγωγής του θα παρουσίαζε αντίθετα αποτελέσματα, δηλαδή αύξηση της βρογχικής υπεραντιδραστικότητας<sup>10</sup>. Επιβεβαιωτικά του ρόλου των οξειδωτικών μορίων στην παρουσία βρογχικής υπεραντιδραστικότητας είναι ότι η παρουσία H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> προκαλεί αύξηση της βρογχικής υπεραντιδραστικότητας *in vitro* σε ανθρώπινους αεραγωγούς<sup>11</sup>. Ανάλογη δράση σε μοντέλα ζώων αλλά και ανθρώπων έχει και το 8-ισοπροστάσιο που ως γνωστό παράγεται από την μη ενζυματική οξείδωση του αραχιδονικού οξέος<sup>12</sup>.

### **Δράση στα αγγεία.**

Δεν υπάρχει σαφής βιβλιογραφική αναφορά για τον ρόλο των οξειδωτικών μορίων στη βρογχική κυκλοφορία. Το OH<sup>-</sup> προκαλεί εξίδρωση πλάσματος στα σαθρά αγγεία<sup>13</sup> ενώ ανάλογη δράση έχει και το 8-ισοπροστάσιο.

### **Δράση στην έκκριση βλέννας.**

Σε ποντίκια η παρουσία οξειδωτικού stress αυξάνει την έκκριση βλέννας μια διαδικασία που καταστέλλεται από τους καταστολείς της κυκλοοξυγενάσης<sup>14</sup>.

### **Δράση σε νεύρα.**

Τα διάφορα αλλεργιογόνα καταστέλλουν την λειτουργία των βρογχοδιασταλτικών νευρών σε μοντέλο πειραματόζωου in vivo. Αυτή η διαδικασία μπλοκάρεται από την υπεροξειδική δισμουτάση πράγμα που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το  $O_2^-$  μπορεί να καταστέλλει την απελευθέρωση του NO από τα κινητήρια νεύρα<sup>15</sup>. Σε αεραγωγούς ποντικών η παρουσία οξειδωτικού stress αυξάνει την βρογχοσύσπαση που προκαλούν οι χολινεργικοί νευρώνες. Το τελευταίο μπορεί να είναι το αποτέλεσμα της οξειδωτικής καταστολής της ακετυλχολινεστεράσης<sup>16</sup>.

### **Δράση στην διαδικασία της φλεγμονής.**

Τα οξειδωτικά μόρια μέσω της ενεργοποίησης των παραγόντων μεταφοράς δίνουν ενέργεια σε διάφορα φλεγμονώδη γονίδια με αποτέλεσμα την πρόκληση διαδικασίας που έχει σαν τελικό αποτέλεσμα την προαγωγή της φλεγμονής μέσω της απελευθέρωσης προφλεγμονωδών κυτταροκινών. Πολλοί επίσης παράγοντες που ενεργοποιούν τους παράγοντες μεταφοράς όπως ο NF-κB φαίνεται να δρουν μέσω της παραγωγής οξειδωτικών μορίων και κυρίως του  $H_2O_2$ <sup>17</sup>.

### **Ρόλος των οξειδωτικών μορίων σε διάφορες παθήσεις αεραγωγών.**

#### **A) Άσθμα.**

Πολλές μελέτες έχουν καταδείξει τον ρόλο των οξειδωτικών μορίων στο βρογχικό άσθμα. Κύτταρα από το βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (BAL) ασθματικών ασθενών παρουσιάζουν αυξημένη παραγωγή  $O_2^-$  συγκρινόμενα με αυτά των φυσιολογικών ατόμων<sup>18</sup>. Ανάλογη αύξηση παρατηρείται και μετά από πρόκληση με αλλεργιογόνο<sup>19</sup>. Αυξημένη απελευθέρωση  $O_2^-$  παρατηρείται σε κυκλοφορούντα μονοκύτταρα και ουδετερόφιλα ασθματικών ασθενών<sup>20</sup>. Μετά από ενεργοποίηση, ηωσινόφιλα κύτταρα παράγουν εκσεσημασμένες ποσότητες οξειδωτικών μορίων<sup>21</sup> που αυξάνονται περισσότερο μετά από πρόκληση με αλλεργιογόνο<sup>22</sup>. Σε μοντέλα πειραματόζωων η παρουσία ιογενών λοιμώξεων προκαλεί παραγωγή οξειδωτικών μορίων ανάλογη με αυτή που σχετίζεται με τις παροξύνσεις άσθματος<sup>6</sup>. Τα τελευταία χρόνια μέσω της διαδικασίας του εκπνεόμενου αέρα η της συλλογής του συμπυκνώματος του εκπνεόμενου αέρα έγινε δυνατή η μη επεμβατική αξιολόγηση δεικτών που εκφράζουν οξειδωτικό stress σε φλεγμονώδεις παθήσεις αεραγωγών. Τα επίπεδα του  $H_2O_2$  αυξάνουν σε ασθματικούς ασθενείς (ενήλικες και παιδιά)<sup>23,24</sup> με την μεγαλύτερη αύξηση να παρατηρείται στην διάρκεια των

παροξύνσεων<sup>25</sup>. Σε ασθενείς με άσθμα παρατηρείται αύξηση του CO που φαίνεται να οφείλεται στην ενεργοποίηση της HO-1 από το οξειδωτικό stress<sup>26</sup>. Ανάλογη αύξηση παρατηρείται και μετά από πρόκληση με αλλεργιογόνο<sup>27</sup>. Ανάλογα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και σε άλλες παραμέτρους όπως τα παράγωγα των θειοβαρβιτουρικών οξέων που θεωρούνται αποτέλεσμα της λιποειδούς υπεροξειδωσης<sup>28</sup>. Παράμετροι που εκφράζουν την τελευταία είναι και τα επίπεδα της πεντάνης και εθάνης που έχουν βρεθεί αυξημένα σε ασθενείς με άσθμα<sup>29,30</sup>. Ανάλογη αύξηση παρατηρείται και στα ισοπροστάνια με επιπλέον στοιχείο την συσχέτιση των επιπέδων τους με την βαρύτητα της νόσου<sup>31</sup>.

Σε αντιστάθμισμα των μεταβολών που παρατηρούνται στα οξειδωτικά μόρια υπάρχουν μεταβολές και στους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς. Η δραστηριότητα της περοξειδάσης της γλουταθιόνης είναι μειωμένη σε αιμοπετάλια ασθματικών ασθενών ενώ φαίνεται ότι ο βαθμός υπολειτουργικότητας της σχετίζεται με τα επίπεδα του σεληνίου στον ορό<sup>32</sup>. Αντίθετα με την παραπάνω θεωρία υπάρχουν απόψεις που υποστηρίζουν αύξηση των επιπέδων της γλουταθιόνης στο Βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (BALF)<sup>33</sup>. Η αύξηση αυτή πιθανώς να εκφράζει την απάντηση του αντιοξειδωτικού μηχανισμού στην παρουσία οξειδωτικού stress. Η μείωση της υπεροξειδικής δισμουτάσης σε κύτταρα του βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος και σε επιθηλιακά κύτταρα των αεραγωγών λόγω μειωμένης παρουσίας Cu/Zn οφείλεται καθαρά σε μηχανισμούς οξειδωτικής εξουδετέρωσης της<sup>34</sup>. Αυτό όμως που είναι σημαντικό να τονισθεί είναι ότι οι παραπάνω μεταβολές δεν παρατηρούνται σε ασθενείς που ελέγχονται με την θεραπεία εισπνεομένων στεροειδών<sup>20</sup>. Επιπρόσθετα μειωμένη λήψη της αντιοξειδωτικής βιταμίνης C σχετίζεται με μειωμένη αναπνευστική λειτουργία, αυξημένη παρουσία συρρίτσας αναπνοής και μεγαλύτερου βαθμού βρογχική υπεραντιδραστικότητα<sup>35</sup>. Μια άλλη μελέτη έδειξε συσχέτιση χαμηλής διαιτητικής πρόσληψης σε βιταμίνη E και εμφάνισης άσθματος<sup>36</sup>. Αντίθετα όμως με τις παραπάνω θέσεις η χορήγηση αντιοξειδωτικών παραγόντων ουσιαστικά δεν προκαλεί μεταβολές στην αναπνευστική λειτουργία και την βρογχική υπεραντιδραστικότητα<sup>37</sup> ασθματικών ασθενών.

## **B) ΧΑΠ**

Τα τελευταία χρόνια αρκετό ερευνητικό ενδιαφέρον έχει προσελκύσει η θέση ότι οι οξειδωτικοί και αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί παίζουν μεγάλο ρόλο στην παθογένεση της ΧΑΠ. Η παραπάνω θεωρία βασίζεται σε σημαντικό βαθμό στη θέση ότι ο καπνός του τσιγάρου, που σημειωτέον θεωρείται ο κύριος προδιαθεσικός παράγοντας για την ΧΑΠ, περιέχει  $10^{16}$ - $10^{17}$  οξειδωτικά μόρια ανά εισπνοή<sup>38</sup>. Ο καπνός του τσιγάρου θεωρείται ότι είναι μια σύνθετη μίξη από περισσότερα από 4700 χημικά παράγωγα που περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις ελευθέρων ριζών και άλλων οξειδωτικών μορίων. Είναι γνωστό επίσης ότι τα ουδετερόφιλα αποτελούν σημαντικό παράγοντα στην παθογένεια και παθοφυσιολογία της νόσου. Ελεύθερες ρίζες και οξειδωτικά μόρια παράγονται σε μεγάλο ποσοστό από τα ουδετερόφιλα και μακροφάγα στους πνεύμονες καπνιστών. Αυτό επιβεβαιώνει και μελέτη στην οποία παρατηρήθηκε ότι τα ουδετερόφιλα καπνιστών απελευθερώνουν μεγαλύτερο ποσοστό οξειδωτικών μορίων σε σχέση με αυτά των μη καπνιστών<sup>39</sup>. Είναι επίσης γνωστό ότι το ελεύθερο ανιόν σιδήρου συμμετέχει στις διεργασίες για παραγωγή  $\text{OH}^-$  που ως ελεύθερη ρίζα συμμετέχοντας στην υπεροξειδωση των λιπών προκαλεί καταστροφή κυτταρικών μεμβρανών. Μακροφάγα καπνιστών φαίνεται να απελευθερώνουν *in vitro* μεγαλύτερη ποσότητα ελεύθερου ανιόντος σιδήρου σε σχέση με αυτά των μη καπνιστών<sup>40</sup>. Σε ασθενείς με ΧΑΠ η παραδοσιακή θεωρία λειπει ότι τα οξειδωτικά μόρια που απελευθερώνονται είτε μέσω της καπνιστικής συνήθειας είτε μέσω των ενεργοποιημένων ουδετερόφιλων οδηγούν σε απενεργοποίηση του καταστολέα της  $\alpha_1$  πρωτεϊναισής<sup>41</sup>. Ένας ακόμα παράγοντας που σχετίζεται με παραγωγή οξειδωτικών μορίων στην ΧΑΠ είναι οι λοιμώξεις, είτε ως παράγων πρόκλησης παρόξυνσης είτε ως χρόνιος αποικισμός. Οι λοιμώξεις σχετίζονται με την παραγωγή οξειδωτικών μορίων μέσω της συγκέντρωσης και της ενεργοποίησης των φαγοκυττάρων, που ως γνωστό αποτελούν μέρος των κυττάρων που συμμετέχουν στην παραγωγή οξειδωτικών μορίων<sup>42</sup>. Αυτό εν μέρει τεκμηριώνεται από παρατηρήσεις που έδειξαν μεγαλύτερη απελευθέρωση  $\text{O}_2^-$  από ουδετερόφιλα σε φάση παρόξυνσης ΧΑΠ<sup>43</sup>, καθώς και από την φλεγμονή που προκαλούν βακτηρίδια μέσω μηχανισμών που περιλαμβάνουν οξειδωτικά μόρια<sup>44</sup>. Μια έμμεση συμμετοχή των οξειδωτικών μορίων στην παθογένεια της ΧΑΠ προέρχεται από την ενεργοποίηση

παραγόντων μεταφοράς όπως ο NF-kB. Η ενεργοποίηση του NF-kB οδηγεί σε ενεργοποίηση διαφόρων γονιδίων που ενεργοποιούν με την σειρά τους φλεγμονώδεις μεσολαβητές όπως οι κυτταροκίνες IL-8 και TNF- $\alpha$ <sup>45</sup>.

Η αξιολόγηση του οξειδωτικού stress γίνεται με δείκτες που μετρούνται στον ορό, στα ούρα, στο BALF, στον εκπνεόμενο αέρα ή στο συμπύκνωμα αυτού. Η οξειδάση της χανθίνης που απελευθερώνει  $O_2^-$  αυξάνεται στο BAL ασθενών με ΧΑΠ<sup>46</sup>. Ανάλογη αύξηση  $O_2^-$  παρατηρείται και σε ουδετερόφιλα ορού<sup>43</sup>. Το ισοπροσάνιο F<sub>2a</sub>-III που είναι ένα ισομερές της προσταγλαδίνης παραγόμενο από την υπεροξειδωση του αραχιδονικού οξέος αυξάνεται στα ούρα ασθενών με ΧΑΠ<sup>47</sup>. Τα επίπεδα του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> αυξάνουν στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα ασθενών με ΧΑΠ ανεξάρτητα από την ενεργό καπνιστική συνήθεια<sup>48,49</sup>. Η αύξηση αυτή φαίνεται να είναι μεγαλύτερη στην παρόξυνση της νόσου<sup>48</sup>. Αυτές οι παρατηρήσεις οδηγούν στο συμπέρασμα ότι το οξειδωτικό stress στους ασθενείς με ΧΑΠ είναι πρωτίστως αποτέλεσμα της φλεγμονής των αεραγωγών και της ενεργοποίησης των ουδετερόφιλων και λιγότερο εξηγείται από την παρουσία οξειδωτικών μορίων στο καπνό του τσιγάρου. Ανάλογα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και στην μέτρηση του 8-ισοπροσάνιου με αύξηση των τιμών σε ασθενείς με ΧΑΠ-ανεξάρτητα ενεργού καπνιστικής συνήθειας- σε σχέση με τους απλούς καπνιστές<sup>50</sup>.

Όπως και οι οξειδωτικοί μηχανισμοί έτσι και οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί επηρεάζονται σημαντικά από το κάπνισμα. Οι περισσότερες μελέτες συμφωνούν ότι παράλληλα με την ενεργοποίηση των οξειδωτικών μηχανισμών υπάρχει αυξημένη δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών μηχανισμών<sup>51</sup>. Υπάρχουν όμως μελέτες που δείχνουν ότι τα ερυθροκύτταρα των καπνιστών παρουσιάζουν μειωμένη δραστηριότητα περοξειδάσης της γλουταθιόνης και είναι πιο επιρρεπή σε υπεροξειδωση των λιπών<sup>52</sup>. Άλλες δε μελέτες υποστηρίζουν ότι η καπνιστική συνήθεια συνοδεύεται από μειωμένη δραστηριότητα αντιοξειδωτικών στον ορό<sup>53,42</sup>. Φαίνεται όμως ότι όταν εκτός από την καπνιστική συνήθεια συνυπάρχει και ο παράγοντας απόφραξη των αεραγωγών τότε οι αντιοξειδωτικές ουσίες μειώνονται σε επίπεδα ανάλογα του βαθμού απόφραξης<sup>54,55</sup>. Ανάλογη μείωση αντιοξειδωτικής δραστηριότητας παρατηρείται και στις παροξύνσεις της ΧΑΠ<sup>56</sup>. Οι τελευταίες παρατηρήσεις οδηγούν στην διατύπωση θεωρίας που υποστηρίζει ότι με την πρόοδο της



φλεγμονής οι οξειδωτικοί μηχανισμοί εξουδετερώνουν τις αντιοξειδωτικές ουσίες.

### **Γ) Βρογχεκτασίες –Κυστική ίνωση.**

Λίγες σχετικά μελέτες έχουν καταδείξει τον ρόλο των οξειδωτικών μορίων σε ασθενείς με βρογχεκτασίες. Οι περισσότερες αφορούν μελέτη παραμέτρων που εκφράζουν το οξειδωτικό stress στον εκπνεόμενο αέρα. Έχουν βρεθεί αυξημένα επίπεδα  $H_2O_2$  στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα<sup>57,58</sup> καθώς και αυξημένα επίπεδα  $CO$ <sup>59</sup> στον εκπνεόμενο αέρα ασθενών με βρογχεκτασίες.

Ο ρόλος του οξειδωτικού stress στην παθογένεια της ινοκυστικής νόσου είναι σημαντικός. Οι κυριότερες μελέτες αφορούν σε μειωμένα επίπεδα της γλουταθιόνης στο BALF και την συσχέτισή τους με την κλινική βαρύτητα της νόσου<sup>60</sup>. Μια τελευταία παρατήρηση που επιβεβαιώνει το σημαντικό ρόλο του συστήματος οξειδωτικών/αντιοξειδωτικών αφορά μελέτη που έδειξε ότι η αναπλήρωση της ανεπάρκειας του μηχανισμού μεταφοράς χλωριούχων οδηγεί σε αποθήκευση γλουταθιόνης στις εκκρίσεις του επιθηλίου των αεραγωγών<sup>61</sup>. Οι περισσότερες μελέτες που αφορούν την κυστική ίνωση συμφωνούν ότι υπάρχει μια αυξημένη δραστηριότητα οξειδωτικών μορίων που εκφράζουν κυρίως την λιπιδιή υπεροξείδωση με παράλληλη μείωση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών<sup>62,63,64</sup>. Η θεραπεία δε των αναπνευστικών παροξύνσεων της νόσου οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων των αντιοξειδωτικών βιταμινών στον ορό με παράλληλη μείωση παραμέτρων που εκφράζουν λιπιδιή υπεροξείδωση<sup>65</sup>.

### **Β) ΣΥΜΠΥΚΝΩΜΑ ΕΚΠΝΕΟΜΕΝΟΥ ΑΕΡΑ.**

#### **Εισαγωγή.**

Η φλεγμονή των αεραγωγών παίζει κεντρικό ρόλο σε νοσήματα όπως το άσθμα και η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ). Η εκτίμηση αυτής της φλεγμονής είναι ιδιαίτερα σημαντική για τη διερεύνηση των βασικών παθογενετικών μηχανισμών κάποιων νοσημάτων, ενώ και ο ρόλος της στην εμφάνιση παροξύνσεων και στην πρόκληση χρόνιων δομικών μεταβολών στους αεραγωγούς είναι ιδιαίτερα σημαντικός. Επιπλέον, είναι πιθανό ότι η αξιολόγηση της φλεγμονής θα δώσει τη δυνατότητα διάγνωσης χρόνιων παθήσεων των αεραγωγών που δεν αποκαλύπτονται με την κλινική εξέταση, τις λειτουργικές δοκιμασίες των πνευμόνων ή με τον έλεγχο της βρογχικής

υπεραντιδραστικότητας. Η εκτίμηση της φλεγμονής των αεραγωγών γινόταν μέχρι πρόσφατα αποκλειστικά με βρογχοσκοπικές επεμβατικές τεχνικές, όπως είναι το BALF, η ενδοβρογχική και η διαβρογχική βιοψία. Ωστόσο, τέτοιες τεχνικές έχουν αυξημένους κινδύνους επιπλοκών και δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για διαδοχικές μετρήσεις στον ίδιο ασθενή. Κατά τα τελευταία χρόνια, η έρευνα έχει επικεντρωθεί σε λιγότερο επεμβατικές τεχνικές, όπως είναι η προκλητή απόχρεμψη και η μέτρηση δεικτών στον εκπνεόμενο αέρα (με κυριότερο το εκπνεόμενο μονοξείδιο του αζώτου [NO]) ή στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα<sup>66,67</sup>.

Το ενδιαφέρον για την αξιοποίηση του συμπυκνώματος του εκπνεόμενου αέρα (exhaled ή expired breath condensate) άρχισε στα μέσα της δεκαετίας του 1980, με τη μελέτη του σε ασθενείς που νοσηλεύονταν διασωληνωμένοι υπό μηχανική υποστήριξη της αναπνοής στη Μονάδα Εντατικής Θεραπείας<sup>68</sup>. Από τότε, ιδιαίτερα μετά τα μέσα της δεκαετίας του 1990, αυξάνεται διαρκώς το ενδιαφέρον για τη νέα αυτή μη επεμβατική τεχνική και τις πιθανές προοπτικές αξιοποίησής της στη μελέτη της φλεγμονής των αεραγωγών.

#### **ΤΙ ΕΙΝΑΙ ΤΟ ΣΥΜΠΥΚΝΩΜΑ ΤΟΥ ΕΚΠΝΕΟΜΕΝΟΥ ΑΕΡΑ**

Ο αέρας στους βρόγχους και τις κυψελίδες είναι κορεσμένος με υδρατμούς κατά 100% και έχει θερμοκρασία 37° C, ανεξάρτητα από την υγρασία και τη θερμοκρασία του εισπνεόμενου μίγματος αέρα<sup>69</sup>. Με βάση την παρατήρηση αυτή, η ψύξη του εκπνεόμενου αέρα θα επιφέρει υγροποίηση των υδρατμών. Οι υδρατμοί αυτοί συμπαρασύρουν διάφορα πτητικά και μη μόρια, με μέγεθος <65 kDa, που προέρχονται από το κατώτερο αναπνευστικό<sup>70</sup>. Η συλλογή του συμπυκνώματος του εκπνεόμενου αέρα στοχεύει στη μελέτη αυτών των μορίων, από τα οποία είναι δυνατό να αντληθούν πολύτιμες πληροφορίες για θέσεις του αναπνευστικού που είναι προσπελάσιμες μόνο επεμβατικά.

#### **ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΣΥΛΛΟΓΗΣ**

Το συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα συλλέγεται σήμερα με δύο κυρίως τεχνικές, που εφαρμόζονται σε διάφορα κέντρα με κάποιες παραλλαγές. Και στις δύο τεχνικές η αρχική προετοιμασία είναι η ίδια. Ο εξεταζόμενος ξεπλένει καλά το στόμα και το στοματοφάρυγγά του με νερό και κατόπιν αναπνέει ήρεμα και σταθερά (tidal breathing) μέσα σε ένα επιστόμιο για 10-15 λεπτά, με τη μύτη του κλειστή με ένα ρινικό clip. Στο επιστόμιο υπάρχει μια βαλβίδα

διπλής κατεύθυνσης (τύπου Heins-Rudolph), με την οποία επιτυγχάνεται διαχωρισμός της εισπνοής από την εκπνοή. Και με τους δύο τρόπους επιδιώκεται η συλλογή τουλάχιστον 1 ml συμπυκνώματος του εκπνεόμενου αέρα, το οποίο συνήθως καταψύχεται άμεσα (κατά κανόνα στους  $-70^{\circ}\text{C}$ ) προκειμένου να εξεταστεί σε δεύτερο χρόνο. Οι δύο τεχνικές διαφέρουν αποκλειστικά στον τρόπο συλλογής του συμπυκνώματος.

Στην πρώτη τεχνική<sup>23</sup>, το συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα συλλέγεται μέσα σε ένα γυάλινο δοχείο με δύο χώρους. Στον εσωτερικό χώρο τοποθετείται πάγος ενώ ο αέρας που εκπνέεται από τον εξεταζόμενο διέρχεται από τον εξωτερικό. Το συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα παράγεται στην ψυχρή εξωτερική επιφάνεια του εσωτερικού δοχείου και συλλέγεται στο κατώτερο τμήμα του εξωτερικού χώρου της διάταξης καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας. Στη δεύτερη τεχνική<sup>71</sup>, ο εκπνεόμενος αέρας ψύχεται με την εφαρμογή ψυχρού αέρα. Το μηχανήμα που χρησιμοποιείται για την πρόκληση με ψυχρό αέρα χρησιμοποιείται για την παραγωγή ψυχρού αέρα σε θερμοκρασίες από  $-15^{\circ}\text{C}$  έως  $-18^{\circ}\text{C}$  με ροή 80 L/λεπτό. Η συλλογή του συμπυκνώματος γίνεται με ένα γυάλινο σωλήνα διπλού αυλού μήκους 30 cm. Το ένα στόμιο του εξωτερικού αυλού συνδέεται με το σημείο εξόδου του ψυχρού αέρα και ο αέρας αυτός απομακρύνεται από το άλλο άκρο αυτού του αυλού. Στο ένα στόμιο του εσωτερικού αυλού εκπνέει ο εξεταζόμενος μέσω της βαλβίδας τύπου Heins-Rudolph. Στην περίπτωση αυτή το συμπύκνωμα παράγεται στον εσωτερικό αυλό και συλλέγεται σε ειδική διάταξη που βρίσκεται στο αντίθετο από τον ασθενή άκρο. Η δεύτερη μέθοδος πλεονεκτεί έναντι της πρώτης μεθόδου στα ακόλουθα: (1) με τη μέθοδο του ψυχρού αέρα αποφεύγεται εντελώς η ανάμειξη με σίελο, καθώς η συλλογή γίνεται στο περιφερικό άκρο του σωλήνα που βρίσκεται 30 cm μακριά από το στόμα του ασθενούς και (2) η θερμοκρασία ψύξεως του δείγματος μέσω του μηχανήματος του ψυχρού αέρα είναι σταθερή, κάτι που δεν είναι εφικτό με την πρώτη μέθοδο, όπου στη διαδικασία ο πάγος τήκεται με αποτέλεσμα τη μεταβολή της θερμοκρασίας.

Σε όλες τις μετρήσεις γίνεται προσδιορισμός της αμυλάσης στο δείγμα, προκειμένου να αποκλειστεί η πρόσμιξη με σίελο. Στο σίελο περιέχονται ποσότητες οξειδωτικών ουσιών, γεγονός που θα μπορούσε να οδηγήσει σε

λανθασμένα αποτελέσματα. Η τεχνική αυτή δεν εφαρμόστηκε στις αρχικές μελέτες, αλλά αποτελεί σήμερα απαραίτητη προϋπόθεση για την αξιοπιστία της μεθόδου.

### **ΤΙ ΜΕΤΡΑΤΑΙ ΣΤΟ ΣΥΜΠΥΚΝΩΜΑ ΤΟΥ ΕΚΠΝΕΟΜΕΝΟΥ ΑΕΡΑ;**

Ένα μεγάλο ερώτημα που δεν έχει απαντηθεί ακόμη σε όλη του την έκταση σήμερα είναι το ποια μόρια μπορούν να ανιχνευθούν στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα. Τα πτητικά μόρια είναι εκείνα που ανιχνεύονται ευκολότερα, αλλά υπάρχουν αναφορές προσδιορισμού μη πτητικών μορίων. Στη συνέχεια θα εξεταστούν μερικά από τα μόρια που έχουν ανιχνευθεί μέχρι σήμερα στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα, όπως το υπεροξειδίο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ), το δ-ισοπροστάνιο και τα προϊόντα του μεταβολισμού του NO (νιτρικά-νιτρώδη, νιτροτυροσίνη). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης ο προσδιορισμός του pH του συμπυκνώματος του εκπνεόμενου αέρα.

#### **1. Υπεροξειδίο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ )**

Οι κλασσικές βιβλιογραφικές αναφορές είναι εκείνες που σχετίζονται με την εκτίμηση της οξειδωτικής φλεγμονής μέσω του προσδιορισμού του  $H_2O_2$ , αρχικά σε ασθενείς με Σύνδρομο αναπνευστικής δυσχέρειας ενηλίκων (ARDS)<sup>68</sup> και οξεία αναπνευστική ανεπάρκεια<sup>72,73</sup> και κατόπιν σε ασθενείς με βρογχικό άσθμα<sup>24,25,26,74</sup>, ΧΑΠ<sup>48,75</sup>, βρογχεκτασίες<sup>57</sup> και κυστική ίνωση<sup>76</sup>. Το  $H_2O_2$  μετρήθηκε επίσης στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα υγιών καπνιστών<sup>77</sup> και καπνιστών με ΧΑΠ<sup>49</sup>, ενώ καταγράφηκαν και οι φυσιολογικές τιμές του σε υγιή παιδιά<sup>78</sup>. Οι μέθοδοι μέτρησης του υπεροξειδίου του υδρογόνου βασίζονται στην ικανότητά του να αντιδρά με κατάλληλα υποστρώματα, απελευθερώνοντας χρώμα, φως ή φθορισμό. Υπάρχουν, ωστόσο, προβλήματα στη μέτρησή του. Το ποσό που αποβάλλεται από τους φυσιολογικούς ανθρώπους είναι σχεδόν μη ανιχνεύσιμο, ενώ και σε πολλές παθήσεις τα επίπεδά του είναι στα κατώτερα όρια ανίχνευσης των χρησιμοποιούμενων μεθόδων. Ένα άλλο σύνηθες λάθος σχετίζεται με τη συλλογή και την αποθήκευση των δειγμάτων. Το  $H_2O_2$  είναι ένα πτητικό μόριο, το οποίο αποδομείται στη θερμοκρασία του δωματίου ή όταν έρχεται σε επαφή με μέταλλο. Τα δείγματα θα πρέπει να καταψύχονται ταχύτατα και να αποθηκεύονται σε θερμοκρασίες κάτω από τους  $-70^\circ C$ <sup>79</sup>. Στη μελέτη των Jöbbsis και συν<sup>78</sup>, που προσδιόρισε τις φυσιολογικές τιμές σε υγιή παιδιά

διαπιστώθηκε ότι τα δείγματα του συμπυκνώματος του εκπνεόμενου αέρα μπορούν να διατηρηθούν για ένα τουλάχιστον μήνα χωρίς μεταβολή της συγκέντρωσης του  $H_2O_2$ , γεγονός που οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η μέτρηση είναι επαναλήψιμη και αναπαραγώγιμη.

Ο προσδιορισμός του  $H_2O_2$  γίνεται κατά κύριο λόγο με τρεις μεθόδους. Στην πρώτη, που περιγράφηκε από τους Gallati και Pracht<sup>80</sup>, 100 μl συμπυκνώματος αναμιγνύονται με 100 μl διαλύματος 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) 420 μM (διαλελυμένα σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών 0,42 M, pH 3,8) και 10 μl διαλύματος υπεροξειδάσης horseradish 52,5 U/ml. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και, κατόπιν, το μίγμα οξεοποιείται σε pH 1 με την προσθήκη 10 μl διαλύματος θειικού οξέος 18 N. Το προϊόν της αντίδρασης προσδιορίζεται φασματοφωτομετρικά στα 450 nm. Η απορρόφηση είναι ευθέως ανάλογη με τη συγκέντρωση του  $H_2O_2$ . Το όριο ανίχνευσης της μεθόδου είναι περίπου 0,1 μM. Μια παραλλαγή αυτής της μεθόδου είναι εκείνη που περιγράφηκε από τους Ruch και συν.<sup>81</sup>, στην οποία προσδιορίζεται φασματοφθορισμομετρικά ένα προϊόν της οξειδωσης του ομοβανιλλικού οξέος (homovanillic acid-HVA) που σχετίζεται άμεσα με τη συγκέντρωση του  $H_2O_2$ . Οι Hyslop και Sklar<sup>82</sup> χρησιμοποιούν το p-υδροξυφαινυλοξικό οξύ ως υπόστρωμα οξειδωσης από το προϊόν της αντίδρασης του  $H_2O_2$  και της υπεροξειδάσης horseradish και το προϊόν της αντίδρασης προσδιορίζεται φωτομετρικά. Τέλος, οι Russell και συν.<sup>83</sup> έχουν προτείνει μια νέα μέθοδο για τον προσδιορισμό του  $H_2O_2$  στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα. Η μέθοδος εφαρμόζει μια τεχνική χημειοφωταύγειας με τη χρήση luminol που επιτρέπει την ανίχνευση  $H_2O_2$  σε συγκεντρώσεις μέχρι 2,5 nM. Οι περισσότεροι αποδεκτές είναι η φλοουομετρική μέθοδος και η σπεκτοφωτομετρική μέθοδος που έχουν χρησιμοποιηθεί στην πλειοψηφία των κλινικών μελετών.

## **2. 8-ισοπροστανίο (8-isoprostane)**

Τα ισοπροστανία ή εικοσανοειδή είναι ενώσεις ανάλογες με τις προσταγλανδίνες που παράγονται *in vivo* από την υπεροξειδωση του αραχιδονικού οξέος που καταλύεται από ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, κυρίως μη ενζυμικά (χωρίς τη συμμετοχή της κυκλοοξυγενάσης). Η παραγωγή τους γίνεται *in situ* στα φωσφολιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης, από τα οποία διαχωρίζονται με τη δράση της φωσφολιπάσης  $A_2$ . Λόγω της σταθερότητάς

τους, της ειδικότητάς τους για την υπεροξειδωση των λιπών, της παραγωγής τους *in vivo* και της σχετικής αφθονίας τους στα βιολογικά υγρά, οι ουσίες αυτές αποτελούν άριστους δείκτες του οξειδωτικού stress<sup>4</sup>. Η πιο γνωστή ένωση της κατηγορίας των F<sub>2</sub>-ισοπροστανίων είναι το 8-ισοπροστανίο (8-isoprostane ή 8-epi-prostaglandin F<sub>2a</sub>), που αποτελεί το κύριο μέλος της οικογένειας των εικοσανοειδών που μετράται στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα και έχει ισχυρή βιολογική δράση *in vivo*. Η μέθοδος αναφοράς για τον προσδιορισμό του 8-isoprostane σε βιολογικά υγρά είναι η αέριος χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (gas chromatography-mass spectrometry ή GC-MS), λόγω της μεγάλης της ειδικότητας και ευαισθησίας<sup>84</sup>. Ωστόσο, η μέθοδος αυτή είναι ιδιαίτερα χρονοβόρα και είναι διαθέσιμη σε λίγα μόνο κέντρα. Έτσι, το 8-ισοπροστανίο προσδιορίζεται σήμερα κυρίως με ανοσοχημικές μεθόδους<sup>85</sup>.

Το 8-ισοπροστανίο είναι αυξημένο σε ασθενείς με βρογχικό άσθμα<sup>31</sup>, ΧΑΠ<sup>50</sup>, ARDS<sup>86</sup> και κυστική ίνωση<sup>62</sup>. Οι τιμές που έχουν αναφερθεί στους υγιείς καπνιστές είναι περίπου διπλάσιες<sup>50</sup>, των υγιειών μη καπνιστών εύρημα συμβατό με την αύξηση του οξειδωτικού stress λόγω της υπεροξειδωσης των λιπών που παρατηρείται στους καπνιστές<sup>53</sup>. Χαρακτηριστικά, οι υγιείς καπνιστές εμφάνιζαν σημαντική αύξηση των συγκεντρώσεων του 8-ισοπροστανίου 15 λεπτά μετά το κάπνισμα, κάτι που σημαίνει ότι το κάπνισμα προκαλεί οξεία αύξηση του οξειδωτικού stress των αεραγωγών<sup>50</sup>.

### **3. Προϊόντα μεταβολισμού του Μονοξειδίου του αζώτου (NO) (νιτρικά [NO<sub>3</sub>]-νιτρώδη [NO<sub>2</sub>], νιτροτυροσίνη) .**

Τα επίπεδα του μονοξειδίου του αζώτου (NO) είναι αυξημένα σε όλες τις φλεγμονώδεις παθήσεις των αεραγωγών<sup>67</sup> με εξαίρεση την κυστική ίνωση<sup>87</sup> και την πρωτοπαθή δυσκινησία των κροσσών<sup>88</sup>. Είναι γνωστό ότι το NO είναι ένα ασταθές πτητικό μόριο, που μετατρέπεται ταχύτατα στα μη πτητικά νιτρικά (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) και νιτρώδη (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) και η αντίδραση αυτή επηρεάζεται από τη φλεγμονή των αεραγωγών. Διατυπώθηκε, έτσι, η υπόθεση ότι η μέτρηση των σταθερών τελικών προϊόντων του μεταβολισμού του NO, όπως είναι τα νιτρικά και τα νιτρώδη αποτελεί περισσότερο αξιόπιστο τρόπο έκφρασης της φλεγμονής των αεραγωγών σε καταστάσεις όπως η κυστική ίνωση, καθώς είναι πιθανό ότι το αέριο NO μετατρέπεται σε νιτρικά και νιτρώδη κοντά στη θέση παραγωγής του και για το λόγο αυτό δεν ανιχνεύεται<sup>89</sup>.

Ο προσδιορισμός των νιτρικών στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα γίνεται με μια χρωματογραφική μέθοδο που βασίζεται στην αντίδραση του Griess<sup>90</sup>. Συγκεκριμένα, 100 μl συμπυκνώματος αναμιγνύονται με 100 μl αντιδραστήριου του Griess (υδροχλωρική ναφθυλ-εθυλενδιαμίνη 0,1%, σουλφαναμίδη 1%, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 3%) και μετράται με φωτόμετρο η απορρόφηση του έγχρωμου προϊόντος της αντίδρασης στα 570 nm. Εναλλακτική μέθοδος είναι η φθορισμομετρική που περιγράφηκε από τους Misko και συν.<sup>91</sup> που είναι περισσότερο ευαίσθητη από τη μέθοδο Griess. Σε πρόσφατη μελέτη<sup>71</sup>, μετρήθηκε στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα το άθροισμα των νιτρικών και νιτρικών, το σύνολο δηλαδή των τελικών προϊόντων του μεταβολισμού του NO. Για το σκοπό αυτό, τα νιτρικά μετατράπηκαν ενζυμικά σε νιτρώδη με την επίδραση αναγωγάσης των νιτρικών<sup>92</sup> και στη συνέχεια μετρήθηκαν τα ολικά νιτρώδη (αναχθέντα νιτρικά + νιτρώδη) με την αντίδραση Griess.

Το NO αντιδρά με ανιόντα υπεροξειδίου (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) στους αεραγωγούς με αποτέλεσμα τη δημιουργία υπεροξειδίου του αζώτου (ONOO<sup>-</sup>), ενός ιδιαίτερα οξειδωτικού μορίου που αντιδρά με κατάλοιπα τυροσίνης από πρωτεϊνικά μόρια δημιουργώντας το σταθερό προϊόν *νιτροτυροσίνη*. Νιτροτυροσίνη ανιχνεύθηκε με ανοσολογικές μεθόδους σε ιστολογικά παρασκευάσματα από βρογχικές βιοψίες που λήφθηκαν από ασθματικούς ασθενείς<sup>93</sup>, καθώς και σε νεκροτομικά παρασκευάσματα πνεύμονα ασθενών με βρογχικό άσθμα που κατέληξαν από status asthmaticus ή άλλα αίτια<sup>94</sup>. Το μόριο αυτό μετρήθηκε πρόσφατα με ανοσοενζυμική μέθοδο στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα φυσιολογικών ατόμων και ασθματικών ασθενών. Παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση στους ασθματικούς σε σχέση με τους φυσιολογικούς<sup>95</sup>. Σε πρόσφατη μελέτη αυξημένα επίπεδα νιτροτυροσίνης βρέθηκαν και σε ασθενείς με κυστική ίνωση<sup>96</sup>.

#### 4. pH

Πρόσφατα προσδιορίστηκε το pH των αεραγωγών σε φυσιολογικά άτομα και σε ασθματικούς ασθενείς στην παρόξυνση και στην αποδρομή αυτής, με βάση την υπόθεση ότι η ενδογενής οξίνιση των αεραγωγών μπορεί να παίζει κάποιο ρόλο στην παθοφυσιολογία του άσθματος. Οι τιμές του pH στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα των ασθματικών σε παρόξυνση ήταν στατιστικά σημαντικά χαμηλότερες από αυτές των φυσιολογικών, ενώ η

επαναφορά τους σε φυσιολογικά επίπεδα επιτυγχάνεται μετά από την κατάλληλη θεραπεία και αποδρομή της παρόξυνσης<sup>97</sup>.

## 5. Άλλα μόρια

Οι ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (*thiobarbituric acid-reactive substances* ή *TBARs*) είναι πτητικά μόρια που παράγονται από την υπεροξειδωση των λιπών και μπορεί να περιέχονται στον εκπνεόμενο αέρα<sup>98</sup>. Οι *TBARs* ανιχνεύτηκαν στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα φυσιολογικών ατόμων, ασθματικών ασθενών<sup>28</sup> και ασθενών με ΧΑΠ<sup>75</sup> με ευρήματα που δηλώνουν αυξημένα επίπεδα στις παθήσεις σε σχέση με τους υγιείς. Ο προσδιορισμός τους έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο του Yagi<sup>99</sup>, που βασίζεται στην ανάμιξη του συμπυκνώματος με διάλυμα θειοβαρβιτουρικού οξέος (*thiobarbituric acid-TBA*) και στο συνακόλουθο προσδιορισμό των *TBAR* φασματοφωτομετρικά.

Σε μια από τις πρώτες μελέτες του συμπυκνώματος του εκπνεόμενου αέρα<sup>70</sup>, αναφέρεται η ανίχνευση *πρωτεϊνών* στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα ατόμων με διάφορες παθήσεις του αναπνευστικού, που προέρχονταν σύμφωνα με τους συγγραφείς εν μέρει από το κατώτερο αναπνευστικό. Στην ίδια μελέτη αναφέρεται επίσης η ανίχνευση μορίων όπως η *ιντερλευκίνη-1β* (*IL-1β*), και ο *νεκρωτικός παράγοντας των όγκων-α* (*tumor necrosis factor-α* ή *TNF-α*), με ανοσοενζυμικές και ραδιοανοσολογικές μεθόδους αντίστοιχα. Στη μελέτη αυτή δεν ήταν δυνατός ο προσδιορισμός *ιντερλευκίνης-6* (*IL-6*). Οι Cunningham και συν.<sup>100</sup> ανίχνευσαν *ιντερλευκίνη-8* (*IL-8*) στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα παιδιών με κυστική ίνωση με την εφαρμογή μιας ανοσο-προσοφνητικής μεθόδου.

Σε μη δημοσιευμένες μελέτες έχει αναφερθεί η μέτρηση και άλλων μορίων στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα. Σε μερικές από τις πλέον ενδιαφέρουσες, προσδιορίστηκαν λευκοτριένια (*LTB<sub>4</sub>*, *LTC<sub>4</sub>*, *LTD<sub>4</sub>*, *LTE<sub>4</sub>*), η προσταγλανδίνη *E<sub>2</sub>* (*PGE<sub>2</sub>*) σε υγιή άτομα και ασθενείς με άσθμα και ΧΑΠ, η ουρία σε υγιή άτομα και σε ασθενείς με άσθμα, ΧΑΠ και κυστική ίνωση, πρωτεΐνες, *IL-1β* και *TNF-α* σε καπνιστές και μη καπνιστές νεαρούς ενήλικες, ανιχνεύτηκε *DNA* και δυνατότητα προσδιορισμού μεταλλάξεων του ογκογονιδίου *K-ras* σε ασθενείς με μη μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα. Πολλά από αυτά τα ευρήματα θα αποτελέσουν μελλοντικές ερευνητικές



προοπτικές και παραμένει ανοικτό το ερώτημα τι ακριβώς μπορεί να ανιχνευθεί ακόμη στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα.

### **ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΩΝ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ ΣΤΟ ΣΥΜΠΥΚΝΩΜΑ ΤΟΥ ΕΚΠΝΕΟΜΕΝΟΥ ΑΕΡΑ ΣΕ ΠΑΘΗΣΕΙΣ ΤΟΥ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟΥ**

Οι ερευνητικές κατευθύνσεις στις οποίες έχει στραφεί το ενδιαφέρον των ερευνητικών ομάδων που ασχολούνται με το συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα περιλαμβάνουν παθήσεις στις οποίες η φλεγμονή των αεραγωγών παίζει κεντρικό ρόλο στον παθοφυσιολογικό μηχανισμό τους.

#### **A. Βρογχικό άσθμα**

Οι τιμές του  $H_2O_2$  στους ασθματικούς ασθενείς είναι μεγαλύτερες από εκείνες των φυσιολογικών μαρτύρων σε όλες τις μελέτες, τόσο στους ενήλικους<sup>23</sup>, όσο και στα παιδιά<sup>24</sup>. Σε μελέτη των Horvath και συν.<sup>23</sup> διατυπώθηκε η άποψη ότι τα επίπεδα του  $H_2O_2$  μπορούν να συσχετιστούν με τη βρογχική υπεραντιδραστικότητα των ασθματικών ασθενών και μπορούν να χρησιμοποιηθούν συμπληρωματικά με το εκπνεόμενο NO για την παρακολούθηση της φλεγμονής των αεραγωγών. Σημαντικό εύρημα αυτής της μελέτης ήταν επίσης ότι το  $H_2O_2$  αποτελεί περισσότερο ευαίσθητο δείκτη από το εκπνεόμενο NO για τον καθορισμό του οξειδωτικού stress, καθώς ασθενείς με σοβαρό ασταθές άσθμα εμφάνισαν αυξημένα επίπεδα  $H_2O_2$ , παρά τη λήψη στεροειδών (εισπνεόμενων ή από το στόμα) σε υψηλές δόσεις, ενώ το NO ήταν φυσιολογικό. Τα επίπεδα του  $H_2O_2$  δεν εμφάνιζαν συσχέτιση με τα σπιρομετρικά δεδομένα των ασθματικών ασθενών αν και σε πρόσφατη μελέτη τονίζεται ότι η συσχέτιση του  $H_2O_2$  με δείκτες λειτουργικής βαρύτητας εξαρτάται από την βαρύτητα της νόσου και την λήψη εισπνεομένων στεροειδών<sup>74</sup>. Στην ίδια μελέτη βρέθηκε ότι η παραγωγή του  $H_2O_2$  οφείλεται κυρίως στα ηωσινόφιλα, ενώ στις βαρύτερες μορφές φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο η παρουσία των πολυμορφοκυττάρων. Ο ρόλος των κορτικοστεροειδών στην αξιολόγηση των επιπέδων του  $H_2O_2$  σε ασθματικούς ασθενείς έχει ερευνηθεί μόνο σε μία μελέτη με σχεδιασμό διπλής-τυφλής και χορήγηση εικονικού φαρμάκου. Σε αυτήν βρέθηκε ότι τα εισπνεόμενα στεροειδή μειώνουν τα επίπεδα του  $H_2O_2$  σε σύγκριση με το εικονικό φάρμακο<sup>101</sup>.

Τα ισοπροστάνια αποτελούν έναν ακόμη δείκτη της οξειδωτικής φλεγμονής σε ασθενείς με βρογχικό άσθμα, που παρουσιάζει διαρκώς αυξανόμενο

ενδιαφέρον. Τα επίπεδα του 8-ισοπροστανίου βρέθηκαν αυξημένα στους ασθενείς με βρογχικό άσθμα<sup>35</sup>. Συγκεκριμένα, οι ασθενείς με ήπιο και μέτριο άσθμα εμφάνιζαν διπλάσιες τιμές σε σχέση με τους φυσιολογικούς, ενώ οι τιμές εκείνων με σοβαρό άσθμα ήταν τριπλάσιες. Οι τιμές του 8-ισοπροστανίου εμφάνιζαν συσχέτιση με τις τιμές του εκπνεόμενου NO στους ασθενείς με ήπιο άσθμα, κάτι που δεν συνέβαινε σε εκείνους με μέτριο και σοβαρό άσθμα. Επιπρόσθετα, οι ασθενείς με ήπιο και μέτριο άσθμα εμφάνιζαν παραπλήσιες τιμές 8-ισοπροστανίου, γεγονός που αντανακλά σε ένα βαθμό τον έλεγχο της οξειδωτικής φλεγμονής με τα εισπνεόμενα στεροειδή στις ομάδες αυτές. Αντίθετα, οι ασθενείς με σοβαρό άσθμα εμφανίζουν σημαντικά μεγαλύτερες τιμές, κάτι που αντανακλά την αυξημένη οξειδωτική φλεγμονή αυτών των ασθενών και τον πλημμελή έλεγχο της νόσου με τα εισπνεόμενα στεροειδή.

Οι Hunt και συν.<sup>102</sup> ανέφεραν αυξημένα επίπεδα νιτρωδών στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα ασθματικών ασθενών. Σε πρόσφατη μελέτη<sup>71</sup>, ωστόσο, μετρήθηκε το συνολικό ποσό νιτρικών/νιτρωδών το οποίο βρέθηκε αυξημένο στους ασθματικούς ασθενείς σε σχέση με τους φυσιολογικούς. Από τους ασθματικούς, εκείνοι που λάμβαναν εισπνεόμενα στεροειδή εμφάνιζαν χαμηλότερα επίπεδα νιτρικών/νιτρωδών (παραπλήσια με εκείνα των φυσιολογικών ατόμων) από εκείνους που δεν λάμβαναν στεροειδή. Επιπλέον οι ασθματικοί καπνιστές είχαν σημαντικά χαμηλότερες τιμές σε σχέση με τους μη καπνιστές. Διαπιστώθηκε δε και μια ισχυρά θετική συσχέτιση μεταξύ νιτρικών/νιτρωδών και  $H_2O_2$  στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα. Πρόσφατα, προσδιορίστηκε νιτροτυροσίνη στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα ασθματικών ασθενών. Τα επίπεδα της νιτροτυροσίνης ήταν αυξημένα στους ασθενείς με ήπιο άσθμα που δεν λάμβαναν στεροειδή, ενώ ήταν χαμηλότερα σε εκείνους που λάμβαναν συστηματικά στεροειδή, γεγονός που αντανακλά πιθανώς τον περιορισμό του οξειδωτικού stress στους τελευταίους<sup>95</sup>. Οι συγγραφείς θεωρούν ότι η νιτροτυροσίνη του εκπνεόμενου αέρα αποτελεί έναν περισσότερο ευαίσθητο δείκτη για την εκτίμηση του οξειδωτικού stress στο άσθμα. Στην ίδια μελέτη προσδιορίστηκαν λευκοτριένια ( $LTB_4$ ,  $LTC_4$ ,  $LTD_4$ ,  $LTE_4$ ) στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα και βρέθηκαν αυξημένα στους ασθενείς με μέτριο και

σοβαρό άσθμα σε σχέση με τα φυσιολογικά άτομα και τους ασθενείς με ήπιο άσθμα.

Φαίνεται ότι το pH των αεραγωγών αποτελεί σημαντική παράμετρο για τον καθορισμό της φλεγμονής των αεραγωγών και παίζει πιθανώς σημαντικό ρόλο στην παθοφυσιολογία του άσθματος. Άλλωστε είναι η πρώτη μέτρηση στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα στην οποία ο χρόνος που απαιτείται για την ολοκλήρωσή της μέτρησης είναι σημαντικά μικρότερος από εκείνον που απαιτείται για όλες τις υπόλοιπες. Οι πρώτες παρατηρήσεις στο άσθμα τονίζουν ότι η παρόξυνση της νόσου επηρεάζει σημαντικά την ενδογενή οξίνιση των αεραγωγών<sup>97</sup>.

### **B. Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ)**

Στους ασθενείς με ΧΑΠ, οι τιμές του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα ποικίλουν σημαντικά. Οι Dekhuizen και συν.<sup>48</sup> προσδιόρισαν το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> με τη μέθοδο της TMB και ανέφεραν ότι οι ασθενείς με ασταθή ΧΑΠ είχαν σημαντικά αυξημένα επίπεδα H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> σε σχέση με εκείνων με σταθερή ΧΑΠ. Τα ευρήματα αυτά αποδόθηκαν από τους συγγραφείς στην αυξημένη παραγωγή οξειδωτικών ουσιών στους ασθενείς με ασταθή ΧΑΠ. Οι Nowak και συν.<sup>49</sup> που χρησιμοποίησαν τη μέθοδο του HVA δεν διαπίστωσαν διαφορές μεταξύ των επιπέδων του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> σε καπνιστές και μη καπνιστές ασθενείς με σταθερή ΧΑΠ. Σε άλλη μελέτη των ίδιων συγγραφέων<sup>75</sup>, και οι δύο αυτές κατηγορίες ασθενών εμφάνιζαν αυξημένα επίπεδα H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> σε σχέση με τους υγιείς μη καπνιστές μάρτυρες. Στην ίδια μελέτη, τα επίπεδα των TBARs στους ασθενείς με ΧΑΠ ήταν κατά πολύ μεγαλύτερα από εκείνα των φυσιολογικών ατόμων εύρημα ενδεικτικό της αυξημένης υπεροξειδωσης των λιπών στους αεραγωγούς ασθενών με σταθερή ΧΑΠ.

Το 8-ισοπροσάνιο μετρήθηκε στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα ασθενών με ΧΑΠ<sup>50</sup>. Δεν διαπιστώθηκε σημαντική διαφορά στις τιμές του 8-ισοπροσάνιου μεταξύ πρώην καπνιστών και καπνιστών, αλλά και οι δύο αυτές κατηγορίες είχαν σημαντικά αυξημένες τιμές σε σχέση με τους υγιείς καπνιστές και τους υγιείς μη καπνιστές. Το εύρημα αυτό είναι ενδεικτικό της παρουσίας αυξημένου οξειδωτικού stress στους ασθενείς με σταθερή ΧΑΠ ανεξάρτητα της καπνιστικής συνήθειας.

### **Γ. Κυστική Ίνωση**

Τα επίπεδα του  $H_2O_2$  στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα ασθενών με κυστική ίνωση ήταν χαμηλότερα από εκείνα των υγιών ατόμων<sup>87</sup>, γεγονός που το καθιστά ακατάλληλο δείκτη για την εκτίμηση της φλεγμονής των αεραγωγών. Το εύρημα αυτό μπορεί να οφείλεται στην αδυναμία ανίχνευσής του λόγω των πυωδών εκκρίσεων, στην αντίδραση με άλλα δραστικά μόρια ή στην αυξημένη αντιοξειδωτική δραστηριότητα που προκαλείται από την παγίδευση αντιοξειδωτικών ουσιών στις εκκρίσεις των αεραγωγών. Σε αντίθεση με τα προηγούμενα έρχεται πρόσφατη μελέτη, στην οποία τα αυξημένα επίπεδα  $H_2O_2$  στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα παιδιών με παρόξυνση κυστικής ίνωσης λόγω λοίμωξης μειώθηκαν μετά από ενδοφλέβια χορήγηση αντιβιοτικών<sup>103</sup>.

Κατά ανάλογο τρόπο και το  $NO$  δεν αποτελεί αξιόπιστο δείκτη<sup>87</sup> της φλεγμονής των αεραγωγών στην κυστική ίνωση. Οι  $Ho$  και συν.<sup>87</sup> αναφέρουν χαρακτηριστικά ότι το εκπνεόμενο  $NO$  δεν είναι αυξημένο στην κυστική ίνωση και τις βρογχεκτασίες, παρά το φλεγμονώδη χαρακτήρα αυτών των παθήσεων. Πιθανές ερμηνείες αυτού του φαινομένου είναι η κακή διάχυση του  $NO$  διαμέσου των παχύρρευστων πυωδών εκκρίσεων στους αεραγωγούς, η απομάκρυνση του  $NO$  λόγω της αντίδρασής του με ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και η μειωμένη δραστηριότητα της  $iNOS$  (inducible  $NO$  synthase). Μια απάντηση στο προηγούμενο πρόβλημα της εκτίμησης της φλεγμονής των αεραγωγών στην κυστική ίνωση μπορεί να προέλθει από τον προσδιορισμό του 8-isoprostane και των προϊόντων του μεταβολισμού του  $NO$  (νιτρικά/νιτρώδη) στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα. Διαπιστώθηκε ότι τα επίπεδα του 8-ισοπροστανίου στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα ασθενών με κυστική ίνωση ήταν περίπου 2,8 φορές υψηλότερα από εκείνα των φυσιολογικών ατόμων<sup>62</sup>. Τα επίπεδα του 8-ισοπροστανίου εμφανίζουν σημαντική συσχέτιση με εκείνα του εκπνεόμενου  $CO$  και είναι ενδεικτικά της παρουσίας αυξημένου οξειδωτικού stress λόγω υπεροξειδωσίας λιπών στους αεραγωγούς ασθενών με κυστική ίνωση. Σε συμφωνία με τα προηγούμενα έρχονται και ανάλογα ευρήματα, που έδειξαν ότι τα επίπεδα των νιτρωδών στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα ασθενών με κυστική ίνωση είναι αυξημένα σε σχέση με τα φυσιολογικά άτομα<sup>89</sup>, κάτι που δεν ισχύει όπως προαναφέρθηκε για το εκπνεόμενο  $NO$ . Ωστόσο, τα επίπεδα των νιτρωδών δεν διέφεραν σημαντικά στη μελέτη αυτή μεταξύ των ατόμων που λάμβαναν ή

όχι εισπνεόμενα στεροειδή. Σε ανάλογα συμπεράσματα κατέληξαν και οι Cunningham και συν.<sup>100</sup> που μέτρησαν νιτρώδη και ιντερλευκίνη-8 στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα παιδιών με κυστική ίνωση. Τα επίπεδα νιτρωδών στα παιδιά με κυστική ίνωση ήταν σημαντικά υψηλότερα από εκείνα των φυσιολογικών παιδιών. Σύμφωνα με τα προηγούμενα, το 8-ισοπροστάσιο και τα νιτρώδη του συμπυκνώματος του εκπνεόμενου αέρα αποτελούν περισσότερο αξιόπιστους δείκτες για την εκτίμηση της φλεγμονής των αεραγωγών από το εκπνεόμενο NO στην κυστική ίνωση.

#### **Δ. Βρογχεκτασίες**

Η μελέτη του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα ασθενών με βρογχεκτασίες έδειξε ότι είναι αυξημένο σε σχέση με τα φυσιολογικά άτομα<sup>57</sup>, χωρίς σημαντικές διαφορές μεταξύ εκείνων που λάμβαναν ή όχι εισπνεόμενα στεροειδή. Ανάλογα ευρήματα υπάρχουν και σε νεότερη μελέτη όπου όμως τονίζεται η ισχυρή συσχέτιση των επιπέδων του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> με την πολυμορφοπυρηνική φλεγμονή της νόσου και την έκταση αυτής καθώς και αυξημένη παρουσία οξειδωτικού stress σε ασθενείς με χρόνια βακτηριδιακό αποικισμό<sup>58</sup>.

#### **Ε. Σύνδρομο Αναπνευστικής δυσχέρειας ενηλίκων (ARDS)**

Η οξειδωτική φλεγμονή παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια του συνδρόμου οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας (ARDS). Πολλές από τις αρχικές μελέτες πάνω στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα έγιναν σε Μονάδες Εντατικής Θεραπείας και σε ασθενείς που υποβάλλονταν σε μηχανική υποστήριξη της αναπνοής τους. Βρέθηκε ότι τα επίπεδα του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ήταν αυξημένα στους ασθενείς με ARDS σε σχέση με εκείνα των μαρτύρων<sup>68</sup>. Σε ανάλογη μελέτη διαπιστώθηκαν αυξημένα επίπεδα του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> στους ασθενείς με ARDS σε σχέση με εκείνα των ασθενών υπό μηχανική υποστήριξη της αναπνοής χωρίς πνευμονικές διηθήσεις<sup>73</sup>. Στις μελέτες αυτές φαίνεται ότι υπάρχει ενεργός ρόλος του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> στην πρόκληση πνευμονικής βλάβης, αν και δεν έχει διευκρινιστεί κατά πόσο η παραγωγή του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> είναι το πρωτοπαθές συμβάν στην οξειδωτική διαδικασία ή αποτελεί συνοδό εύρημα. Εκτός από τον προσδιορισμό του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα ασθενών με ARDS, προσδιορίστηκαν τα επίπεδα του 8-isoprostane με τη μέθοδο GC-MS<sup>86</sup>. Οι συγγραφείς ανακοίνωσαν οκταπλάσια περίπου επίπεδα στους ασθενείς αυτούς σε σχέση με τα φυσιολογικά άτομα γεγονός

ενδεικτικό της παρουσίας σημαντικής οξειδωτικής φλεγμονής στο ARDS. Είναι πιθανό όμως ότι το συμπύκνωμα εκπνεόμενου αέρα που συλλέγεται στις μελέτες αυτές, λόγω της φύσεως των ασθενών, να περιέχει πρόσμιξη σιέλου, γεγονός που αποτελεί σημαντικό μειονέκτημα για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων.

Μελετώντας κανείς τα αποτελέσματα των μετρήσεων των διάφορων δεικτών φλεγμονής στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα μπορεί εύκολα να καταλήξει ότι αποτελεί μια αξιόπιστη μέθοδο για την αξιολόγηση της οξειδωτικού stress των φλεγμονωδών παθήσεων των αεραγωγών. Η μέτρηση του  $H_2O_2$  φαίνεται να αποτελεί τον πιο αξιόπιστο δείκτη για την παραπάνω αξιολόγηση. Παράλληλα όμως, η μελέτη νεότερων δεικτών, όπως είναι το 8-ισοπροστάνιο και τα προϊόντα μεταβολισμού του  $NO$ , άνοιξε νέους ορίζοντες στη μελέτη της οξειδωτικής φλεγμονής των αεραγωγών. Εκείνο, ωστόσο, που δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως σε καμία από τις προηγούμενες μελέτες είναι η σχέση του οξειδωτικού stress με παραμέτρους που εκφράζουν φλεγμονή των αεραγωγών, κλινική ή λειτουργική βαρύτητα, με σκοπό να διευκρινισθεί απόλυτα πλέον σε ποιες παθήσεις και υπό ποιους όρους θα πρέπει να χρησιμοποιείται για αξιολόγηση. Αυτή την πρόκληση προσπαθεί να λύσει η παρούσα διατριβή μετρώντας το οξειδωτικό stress, όπως αυτό εκφράζεται με τα επίπεδα του  $H_2O_2$  στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα ασθενών με βρογχικό άσθμα, ΧΑΠ και βρογχεκτασίες. Τα επίπεδα αυτά θα προσπαθήσει να τα συσχετίσει με παραμέτρους που εκφράζουν φλεγμονή, κλινική και λειτουργική βαρύτητα σε κάθε νοσολογική οντότητα ξεχωριστά. Στην περίπτωση τεκμηρίωσης της αρχικής υπόθεσης είναι πιθανό ότι το συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα θα παίξει κεντρικό ρόλο στην παρακολούθηση και αξιολόγηση των ασθενειών αυτών.

## ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 1. ΓΕΝΙΚΑ

#### A) ΒΡΟΓΧΕΚΤΑΣΙΕΣ.

##### ΥΛΙΚΟ.

Τριάντα ασθενείς (24 άνδρες, διάμεση (SD) ηλικία 39 (16) έτη, εύρος 19-58, μέση (SD) FEV<sub>1</sub> % αναμενόμενης 69.5 (20), εύρος 27-101, Πίνακας 1) με διαγνωσμένες βρογχεκτασίες επιλέχθηκαν από τα εξωτερικά ιατρεία του 401ΓΣΝΑ. Η διάγνωση των ασθενών βασίσθηκε σε κλινικά και ακτινολογικά κριτήρια ενώ τεκμηριώθηκε με την Υψηλής Διακριτικότητας Υπολογιστική Τομογραφία Θώρακος (HRCT). Δέκα ασθενείς παρουσίαζαν χρόνια αποικισμό με Ψευδομονάδα *Aeruginosa*. Χρόνιος αποικισμός ορίσθηκε η απομόνωση της ψευδομονάδας σε τρία τουλάχιστο ανεξάρτητα δείγματα πτυέλων σε διάστημα τριών μηνών<sup>104</sup>. Οι ασθενείς συμμετείχαν στην μελέτη μόνο αν ήταν σε σταθερή κλινική κατάσταση και δεν παρουσίαζαν λοίμωξη του ανώτερου ή κατώτερου αναπνευστικού για τουλάχιστο 4 εβδομάδες πριν την μελέτη. Οι βρογχεκτασίες θεωρήθηκαν μεταφυματιώδεις σε ένα ασθενή, λόγω πρωτοπαθούς δυσκινησίας των κροσσών σε τρεις ασθενείς, σύνδρομο Young σε ένα, ανεπάρκεια υποκλάσματος IGg σε δύο ασθενείς, ανεπάρκεια IGA σε ένα ασθενή, ενώ στους εναπομείναντες είκοσι-δύο λόγω μη ανευρέσεως προφανούς αιτίας χαρακτηρίσθηκαν ως ιδιοπαθείς. Όλοι οι ασθενείς είχαν αρνητικό ιστορικό ατοπίας και αρνητικές δερματικές δοκιμασίες σε έξι κοινά αλλεργιογόνα. Όλοι οι ασθενείς σε ανάλογη χρονική περίοδο είχαν ελεγχθεί για ύπαρξη ινοκυστικής νόσου με αρνητικά αποτελέσματα (αρνητική δοκιμασία ιδρώτα, απουσία του υπεύθυνου χρωματοσώματος). Ασθενείς με βρογχοπνευμονική ασπεργίλλωση, βρογχικό άσθμα, ΧΑΠ, έλλειψη α1 αντιθρυψίνης και ατοπία αποκλείσθηκαν από την μελέτη. Κανείς ασθενής δεν είχε αναστρεψιμότητα στην σπιρομέτρηση (αύξηση της FEV<sub>1</sub> τριάντα λεπτά μετά από εισπνοή 200μg σαλβουταμόλης <12%).

Κανένας από τους ασθενείς δεν ήταν καπνιστής ενώ δύο από αυτούς είχαν σταματήσει το κάπνισμα από 3ετίας (ιστορικό καπνίσματος < 4 pack-years). 21 ασθενείς ελάμβαναν β<sub>2</sub> διεγέρτες βραχείας ή μακράς δράσης, 2 ελάμβαναν βρωμιούχο ιπρατρόπιο ενώ 14 ελάμβαναν εισπνεόμενα στεροειδή (προπιονική φλουτικαζόνη 500-1000μg ή βουδεσονίδη 400-800 μg ημερησίως). Κανείς ασθενής δεν ελάμβανε βλεννολυτικά και κανένας δεν

ευρίσκετο σε χρόνια οξυγονοθεραπεία. Έντεκα ασθενείς ελάμβαναν αντιβιοτικά από το στόμα σε χρόνια βάση (8 από την ομάδα που είχε χρόνια αποικισμό με ψευδομονάδα). Η θεραπεία των ασθενών ήταν αμετάβλητη για τουλάχιστο 3 μήνες πριν την εισαγωγή τους στη μελέτη και καμμία προσπάθεια δεν έγινε για την αλλαγή της.

Ως ομάδα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν 15 φυσιολογικά άτομα (12 άνδρες, διάμεση (SD) ηλικία 34 (8) έτη, εύρος 20-46, Πίνακας 1). Όλοι ήταν μη καπνιστές και δεν παρουσίαζαν λοίμωξη ανώτερου η κατώτερου αναπνευστικού για τουλάχιστο έξι εβδομάδες πριν από την συμμετοχή τους στην μελέτη. Δεν είχαν ιστορικό χρόνιας νόσου και δεν ελάμβαναν χρόνια φαρμακευτική αγωγή. Όλοι είχαν αρνητικό ιστορικό ατοπίας και αρνητικές δερματικές δοκιμασίες σε έξι κοινά αλλεργιογόνα. Όλοι είχαν φυσιολογική σπιρομέτρηση (μέση (SD) FEV<sub>1</sub> % αναμενόμενης 95 (8), εύρος 86-110) και δεν παρουσίαζαν βρογχική υπεραντιδραστικότητα όπως αυτή μετρήθηκε με δοκιμασία πρόκλησης με ισταμίνη (PD<sub>20</sub> >0.800mg, μέση τιμή 1.30 με εύρος 0.98-1.7).

#### **ΜΕΘΟΔΟΙ.**

Σε όλους τους ασθενείς έγινε συλλογή συμπυκνώματος εκπνεόμενου αέρα με μέτρηση των επιπέδων του υπεροξειδίου του υδρογόνου, συλλογή πτυέλων με την μέθοδο της προκλητής απόχρεμψης, Υπολογιστική τομογραφία θώρακος με τομές υψηλής διακριτικότητας καθώς και έλεγχος αναπνευστικής λειτουργίας με την απλή σπιρομέτρηση. Η συλλογή των δύο δειγμάτων καθώς και η απλή σπιρομέτρηση έγινε την ίδια μέρα.

Μετρήθηκαν τα επίπεδα του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και έγιναν οι ανάλογες συγκρίσεις με την ανάλογη ομάδα ελέγχου. Καταγράφηκε η επίδραση των εισπνεομένων στεροειδών (ΕΣ), η χρόνια λήψη αντιβιοτικών, καθώς και ο αποικισμός με Ψευδομονάδα *aeruginosa* (ΨΑ) στα επίπεδα του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Τα επίπεδα του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> συσχετίστηκαν με παραμέτρους που εξέφραζαν κλινική, λειτουργική βαρύτητα, έκταση της νόσου, καθώς και με παραμέτρους που εξέφραζαν την φλεγμονή όπως αυτή εκφράστηκε με τον κυτταρικό πληθυσμό από την προκλητή απόχρεμψη. Το άτομο που έκανε τις μετρήσεις του υπεροξειδίου του υδρογόνου δεν γνώριζε το κλινικό και λειτουργικό status των ατόμων της μελέτης.



### **Συλλογή συμπυκνώματος εκπνεόμενου αέρα και μέτρηση υπεροξειδίου του υδρογόνου.**

Η συλλογή του συμπυκνώματος του εκπνεόμενου αέρα έγινε σε πρωινές ώρες χρησιμοποιώντας μία εναλλακτική μέθοδο ψύξεως των σωλήνων συλλογής. Το μηχάνημα που χρησιμοποιείται για την πρόκληση με ψυχρό αέρα λειτούργησε στην συγκεκριμένη μέθοδο ως μέσο παραγωγής ψυχρού αέρα σε θερμοκρασίες  $-15^{\circ}\text{C}$  έως  $-18^{\circ}\text{C}$  με ροή αέρα 80 λίτρα/λεπτό. Το ένα άκρο ενός διπλού γυάλινου σωλήνα μήκους 30 cm συνδέθηκε με το σημείο εξόδου του ψυχρού αέρα, ενώ στο άλλο άκρο γινόταν η εκπνοή των ατόμων της μελέτης. Ο σωλήνας στο επάνω μέρος είχε μία βαλβίδα 2 κατευθύνσεων (Heins Rudolf) με σκοπό να διακρίνεται η εισπνοή από την εκπνοή. Όλοι οι συμμετέχοντες στην μελέτη πριν ξεκινήσουν την διαδικασία συλλογής του συμπυκνώματος εκπνεόμενου αέρα έκαναν στοματοφαρυγγικές πλύσεις με νερό, ενώ η διαδικασία συλλογής έγινε σε καθιστική θέση με σταθερή και ήρεμη αναπνοή και για χρονικό διάστημα 10 λεπτών. Το συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα συλλέχθηκε στο άκρο που ήταν συνδεδεμένο με το μηχάνημα του ψυχρού αέρα και άμεσα διατηρήθηκε στους  $-70^{\circ}\text{C}$  για την μετέπειτα επεξεργασία. Με την παραπάνω μέθοδο συλλέγεται τουλάχιστο 1ml συμπυκνώματος του εκπνεόμενου αέρα σε πλαστικό σωληνάριο χωρητικότητας 3ml. Η μέτρηση όλων των δειγμάτων του  $\text{H}_2\text{O}_2$  έγινε την ίδια ημέρα και σε διάστημα όχι μεγαλύτερο των 20 ημερών από την στιγμή της συλλογής. Οι μετρήσεις έγιναν σε 4 χρονικές περιόδους (μικρότερος χρόνος μέτρησης 2 ημέρες – μεγαλύτερος χρόνος μέτρησης 20 ημέρες από την συλλογή). Όλα τα δείγματα ελέγχθησαν για την παρουσία σιέλου με την μέθοδο ανίχνευσης της αμυλάσης. Η ανίχνευση αμυλάσης έγινε με φασματοφωτομετρική μέθοδο (model 981362 KONE Instr. Espoo, Finland. Με αυτή τη μέθοδο, η α-αμυλάση του δείγματος και το ένζυμο α-γλυκοσιδάση υδρολύουν το υπόστρωμα π-νιτροφενυλο-α-δ μαλτοχεπταοσίδη σε γλυκόζη και π-νιτροφενόλη. Ακολουθεί η απελευθέρωση της π-νιτροφενόλης στα 405 nm ( $37^{\circ}\text{C}$ ) για 2 λεπτά. Σε δύο δείγματα έγινε έγχυση σιέλου με σκοπό να ελεγχθεί η ευαισθησία της μεθόδου. Χρησιμοποιώντας την μέθοδο που περιγράφηκε δεν ανεβρέθηκε αμυλάση σε κανένα από τα δείγματα της μελέτης. Στα δείγματα που έγινε έγχυση σιέλου ανιχνεύθηκε αμυλάση  $>5000$

ΙΥ. Η επαναληψιμότητα των μετρήσεων του  $H_2O_2$  ελέγχθηκε σε 2 διαφορετικές ημέρες σε 5 φυσιολογικούς και σε δέκα ασθενείς που επιλέχθηκαν τυχαία. Για τον έλεγχο σταθερότητας του δείγματος χρησιμοποιήθηκαν 10 άτομα (5 ασθενείς). Στα παραπάνω άτομα ελήφθησαν 4 ml δείγματος. Αυτή η ποσότητα χωρίστηκε σε 4 ίσα μέρη και η μέτρηση του  $H_2O_2$  έγινε σε χρονικό διάστημα 2 ημερών, 1 εβδομάδας, 2 εβδομάδων και 3 εβδομάδων, που αποτελεί και το μέγιστο χρόνο μέτρησης που χρησιμοποιήθηκε για όλα τα δείγματα. Η επαναληψιμότητα των μετρήσεων του  $H_2O_2$  καθώς και η σταθερότητα των δειγμάτων εκτιμήθηκε όπως περιγράφηκε προηγούμενα στην βιβλιογραφία<sup>78</sup>.

Για την μέτρηση του  $H_2O_2$  χρησιμοποιήθηκε η παρακάτω περιγραφείσα ενζυμική μέθοδος<sup>48,80</sup>. Περιληπτικά 250 μl διαλύματος 420 μM 3',3,5,5' τετραμεθυλβενζιδίνης (διαλυμένης σε 0,42 M κιτρικού ρυθμιστικού διαλύματος, pH 3.8) και 10 μl διαλύματος 52,5 U/ml υπεροξειδάσης horseradish (HRP, Sigma Chemicals, St Louis, USA) αναμίχθηκαν με 250μl δείγματος εκπνεόμενου αέρα για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το μείγμα αυτό οξειδώθηκε σε pH 1 με 10 μl διαλύματος θειικού οξέος 18 N. Το προϊόν της αντίδρασης προσδιορίστηκε ποσοτικά με απορρόφηση σε 450 nm, χρησιμοποιώντας φασματοφωτόμετρο διπλής ακτίνας (Uvicon 940, Kontron Instr.). Μετρήθηκε τελικά με αυτόματο αναλυτή (model EL 312 Biotec). Το κατώτερο όριο μέτρησης ήταν 0.1 μM  $H_2O_2$ .

#### **Προκλητή απόχρεμψη.**

Η προκλητή απόχρεμψη έγινε σύμφωνα με την μέθοδο που έχει περιγραφεί στην βιβλιογραφία<sup>105</sup>, λαμβάνοντας όλα τα προληπτικά μέτρα για την ασφάλεια της μεθόδου<sup>106</sup>. Σε όλους τους ασθενείς έγινε βρογχοδιαστολή με εισπνοή  $\beta_2$  διεγέρτη μέσω αεροθαλάμου (200-400 μg σαλβουταμόλης). Δεκαπέντε λεπτά αργότερα έγινε μέτρηση της FEV<sub>1</sub>. Η τιμή αυτή της FEV<sub>1</sub> χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης αξιολόγησης για τις μετέπειτα μετρήσεις κατά την διάρκεια της προκλητής απόχρεμψης. Αν η παραπάνω τιμή ήταν < 60% αναμενόμενης ή <1L τότε οι εισπνοές ξεκινούσαν με διάλυμα φυσιολογικού ορού ενώ συγχρόνως μειωνόταν ο χρόνος εισπνοής του μείγματος. Αν κατά την διάρκεια της διαδικασίας η FEV<sub>1</sub> μειωνόταν μεταξύ 10-19% ανάλογη δόση βρογχοδιασταλτικού χορηγούνταν και η διαδικασία συνεχιζόταν όταν αυτή

επανερχόταν στα αρχικά επίπεδα. Αν παρουσίαζε πτώση > 20% η διαδικασία σταματούσε και χορηγούνταν βρογχοδιαστολή σε ανάλογη δόση. Στην πλειονότητα των ασθενών χρησιμοποιήθηκε εισπνοή υπέρτονου φυσιολογικού ορού 3.5% με νεφελοποιητή DeVilbiss ultrasonic (2696 Somerset PA, USA). Σε ασθενείς και φυσιολογικούς ζητήθηκε να καθαρίσουν τις ρινικές τους εκκρίσεις και να κάνουν καλές στοματοφαρυγγικές πλύσεις με σκοπό να μειωθεί η πιθανότητα ανάμειξης του δείγματος πτυέλου με οπισθορινικές εκκρίσεις και σίελο. Κατά την διάρκεια της διαδικασίας όλα τα άτομα της μελέτης έφεραν ρινοπίεστρο. Σε όλους ζητήθηκε να βήχουν βαθιά με χρονικά διαλείμματα 2-3 λεπτών, ανάλογα φυσικά και με την λειτουργική βαρύτητα της νόσου. Το πρώτο δείγμα πτυέλων δεν χρησιμοποιήθηκε μια και πιστεύεται ότι περιέχει υψηλό ποσοστό πλακωδών κυττάρων<sup>107</sup>. Ελήφθησαν τουλάχιστο 2 ml προκλητής απόχρεμψης σε πλαστικό σωληνάριο. Το δείγμα θεωρήθηκε αξιόπιστο εφ' όσον τα πλακώδη κύτταρα ήταν < 30% από το σύνολο των φλεγμονωδών κυττάρων. Η διεργασία του δείγματος έγινε σε χρονικό διάστημα 2 ωρών από την συλλογή του. Εν συντομία περιγράφουμε την διαδικασία προετοιμασίας και ανάγνωσης του δείγματος. Αλατούχο διάλυμα Hanks' (HBSS 2ml) που περιείχε 1% διθειοτριόλη (DTT: Sigma Chemicals, St Louis, USA) αναμείχθηκε με το δείγμα πτυέλων. Κατόπιν ανακινήθηκε αρκετές φορές μέχρι την πλήρη ομογενοποίησή του. Ακολούθησε καταγραφή του όγκου του πτυέλου και νέα ανάμειξη με το HBSS με σκοπό το συνολικό δείγμα να γίνει 10 ml. Ακολούθησε νέα ανακίνηση και φυγοκέντρηση για 10 λεπτά σε 400 x g. Χρησιμοποιώντας ανάλογο μετρητή και μετά από χρώση με kitamura έγινε η προετοιμασία του δείγματος για μέτρηση του συνολικού αριθμού των φλεγμονωδών κυττάρων. Τα τελικά δείγματα μετρήθηκαν μετά από χρώση με May-Grunwald-Giemsa. Χρησιμοποιήθηκαν 2 πλακίδια ενώ μετρήθηκαν τουλάχιστο 400 φλεγμονώδη κύτταρα. Τα φλεγμονώδη κύτταρα των πτυέλων εκφράστηκαν ως απόλυτη τιμή (κύτταρα/gr πτυέλων) και ως ποσοστό επί % των ολικών μη επιθηλιακών κυττάρων. Ο ολικός αριθμός κυττάρων εκφράστηκε σε τιμή  $\times 10^6 \text{ml}^{-1}$ . Όταν έγινε η μέτρηση της % ανάλυσης του κυτταρικού πληθυσμού δεν ήταν γνωστές οι τιμές του  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

#### **Λειτουργικές δοκιμασίες.**

Η μέτρηση της FEV<sub>1</sub>, VC, έγινε με σπιρόμετρο Vica-test, Mignhard, NL. Η καλύτερη προσπάθεια από τρεις εκφραζόμενη σε FEV<sub>1</sub>, VC % της αναμενόμενης χρησιμοποιήθηκε στην μελέτη. Σε όλα τα άτομα της ομάδας ελέγχου έγινε δοκιμασία βρογχικής πρόκλησης με ισταμίνη με σκοπό τον αποκλεισμό ατόμων με βρογχική υπεραντιδραστικότητα. Η βρογχική υπεραντιδραστικότητα μετρήθηκε με δοκιμασία πρόκλησης με ισταμίνη χρησιμοποιώντας το σύστημα APS Jaeger, Würzburg, Germany με νεφελοποιητή Sandoz (Jaeger). Η PD<sub>20</sub> μετρήθηκε ως η δόση ισταμίνης που προκαλεί πτώση της FEV<sub>1</sub> κατά 20%. Ως απουσία βρογχικής υπεραντιδραστικότητας θεωρήθηκε PD<sub>20</sub> >0.800mg. Η PD<sub>20</sub> υπολογίστηκε με τον υπολογισμό της ημιλογαριθμικής καμπύλης που περιγράφει τη σχέση δόσης-απάντησης<sup>108</sup>.

### **Παράμετροι Αξιολόγησης.**

#### **Φαρμακευτική θεραπεία.**

Σε όλους τους ασθενείς με βρογχεκτασίες έγινε μια περαιτέρω ανάλυση με σκοπό να καταγραφεί η επίδραση των εισπνεομένων στεροειδών στα επίπεδα του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> καθώς και στις διάφορες παραμέτρους αξιολόγησης. Στους ασθενείς με βρογχεκτασίες αναλύθηκε επίσης η επίδραση της χρόνιας λήψης αντιβιοτικών στα επίπεδα του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

#### **Υψηλής διακριτικότητας υπολογιστική τομογραφία.**

Αυτή αξιολογήθηκε ως παράμετρος που εκφράζει την έκταση της νόσου σε ασθενείς με βρογχεκτασίες. Οι 30 ασθενείς υπεβλήθησαν σε HRCT (GE 9800 Highlight advanced) με χρονικό όριο τις 10 ημέρες από την συμμετοχή στην μελέτη. Η HRCT αξιολογήθηκε και βαθμολογήθηκε από τον ίδιο ακτινολόγο ο οποίος δεν γνώριζε στοιχεία από τις παραμέτρους που εξετάστηκαν στην παρούσα μελέτη. Κάθε λοβός και στους δύο πνεύμονες αξιολογήθηκε για βρογχεκτασικές αλλοιώσεις με σύστημα βαθμολόγησης από 0-3 (η γλωσσίδα βαθμολογήθηκε ως ξεχωριστός λοβός). Μέγιστη βαθμολογία ήταν 18 βαθμοί (0= καμμία αλλοίωση 1=συμμετοχή ενός υποτμηματικού 2=συμμετοχή περισσότερο από ένα υποτμηματικό 3=παρουσία κυστικών βρογχεκτασιών, Πίνακας 2). Η παραπάνω αξιολόγηση είναι απόλυτα τεκμηριωμένη στην βιβλιογραφία και συνοδεύεται από χαμηλή παρέκλιση<sup>109</sup>. Στο διάστημα των 10 ημερών κανείς ασθενής δεν παρουσίασε μεταβολές της κλινικής κατάστασης του καθώς και της σπιρομέτρησης.

### **Κλινική βαρύτητα**

Αξιολογήθηκε στους ασθενείς με βρογχεκτασίες χρησιμοποιώντας μια βαθμολογία συμπτωμάτων βιβλιογραφικά κατοχυρωμένη με ελαφρές τροποποιήσεις (Πίνακας 3)<sup>110</sup>. Ζητήθηκε από τους ασθενείς να καταγράφουν καθημερινά και για χρονικό διάστημα δύο εβδομάδων τα ακόλουθα συμπτώματα: συριγμό, βήχα, παραγωγή πτυέλων. Τα δύο πρώτα βαθμολογήθηκαν με κλίμακα 0-3 (0=απουσία, 1=ήπια, 2=μέτρια, 3=βαριά). Η παραγωγή πτυέλων εκτιμήθηκε μετά από 24ωρη συλλογή πτυέλων και διατήρηση αυτών σε πλαστικό κύπελλο χωρητικότητας 50ml. Η βαθμολόγηση έγινε ως ακολούθως: 0=απουσία απόχρεμψης, 1=απόχρεμψη λιγότερη από το μισό κύπελλο, 1=απόχρεμψη περισσότερη από το μισό κύπελλο αλλά λιγότερη από ολόκληρο κύπελλο, 3=απόχρεμψη μεγαλύτερη από ένα κύπελλο. Η βαθμολογία των συμπτωμάτων αθροιζόταν κάθε ημέρα και υπολογιζόταν μέσος όρος και για τα τρία συμπτώματα. Το εύρος της βαθμολογίας ήταν 0-9. Επιπρόσθετα καταγράφηκε η διάρκεια της νόσου σε έτη καθώς και ο αριθμός παροξύνσεων /έτος

### **ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.**

Οι τιμές που αφορούσαν τα χαρακτηριστικά των ατόμων εκφράσθηκαν ως μέση τιμή (SD) με το εύρος των τιμών σε παρένθεση. Εξαίρεση αποτελούσε η ηλικία που εκφράστηκε ως διάμεση τιμή (SD). Όταν οι τιμές αφορούσαν συγκρίσεις μεταξύ παραμέτρων της μελέτης εκφράσθηκαν ως μέση τιμή με 95% confidence intervals (CI) για τις διαφορές μεταξύ των τιμών. Όλες οι τιμές εξετάσθηκαν για φυσιολογική κατανομή. Η φυσιολογική κατανομή των τιμών εξετάσθηκε με το Shapiro Wilk's test. Αν δεν κατανέμονταν φυσιολογικά το non parametric Mann Whitney test χρησιμοποιήθηκε για τις στατιστικές συγκρίσεις. Αντίθετα σε φυσιολογικές κατανομές χρησιμοποιήθηκε το paired-t-test. Pearson's correlation coefficient χρησιμοποιήθηκε για την αξιολόγηση στατιστικής σημαντικής συσχέτισης μεταξύ παραμέτρων με φυσιολογική κατανομή ενώ για παραμέτρους με μη φυσιολογική κατανομή χρησιμοποιήθηκε το Spearman's correlation coefficient. Τιμή  $p < 0.05$  χαρακτηρίσθηκε ως στατιστικά σημαντική.

### **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.**

Χρησιμοποιώντας την μέθοδο που περιγράφηκε για τον έλεγχο επαναληψιμότητας των μετρήσεων, βρέθηκε ότι οι τιμές του  $H_2O_2$  σε διάστημα

2 ημερών παρουσίαζαν μη στατιστικά σημαντική διαφορά και για τους ασθενείς αλλά και για τους φυσιολογικούς [0.07 (SD 0.04) για τους ασθενείς και 0.03 (SD 0.02) για τους φυσιολογικούς]. Ο έλεγχος σταθερότητας των δειγμάτων δεν έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των 4 μετρήσεων [0.62 (0.41) SD στις 2 ημέρες, 0.64 (0.4) μετά από 1 εβδομάδα, 0.635 (0.4) μετά από 2 εβδομάδες, 0.64 (0.42) μετά από 3 εβδομάδες,  $p=0.55$ ].

Τα επίπεδα του  $H_2O_2$  βρέθηκαν να είναι σημαντικά υψηλότερα στους ασθενείς με βρογχεκτασίες συγκριτικά με τους φυσιολογικούς (1.1, 95% CI 0.87-1.29  $\mu M$  έναντι 0.3 95% CI 0.19-0.36  $\mu M$  αντίστοιχα,  $p<0.0001$ , Εικόνα 1). Τα επίπεδα του  $H_2O_2$  στους ασθενείς που ελάμβαναν εισπνεόμενα στεροειδή δεν παρουσίαζαν σημαντική διαφορά με αυτούς που δεν ελάμβαναν ανάλογη αγωγή (1.15, 95% CI 0.81-1.5  $\mu M$  έναντι 1.02 95% CI 0.73-1.3  $\mu M$  αντίστοιχα,  $p=0.55$ , Εικόνα 1). Στις δύο αυτές ομάδες αξιολογήθηκαν και οι άλλες παράμετροι της μελέτης χωρίς να προκύψουν στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα μεταξύ τους (Πίνακας 1). Ασθενείς με χρόνια αποικισμό από ΨΑ είχαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα  $H_2O_2$  σε σχέση με αυτούς που δεν παρουσίαζαν αποικισμό από ΨΑ (1.6, 95% CI 1.25-1.92  $\mu M$  έναντι 0.8 95% CI 0.64-1.1  $\mu M$  αντίστοιχα,  $p<0.05$ , Εικόνα 1). Οι ασθενείς που ελάμβαναν αντιβιοτικά σε χρόνια βάση είχαν στατιστικά σημαντικά υψηλότερα επίπεδα  $H_2O_2$  σε σχέση με αυτούς που δεν ελάμβαναν ανάλογη θεραπεία (1.3, 95% CI 0.95-1.7  $\mu M$  έναντι 0.9, 95% CI 0.67-1.16  $\mu M$  αντίστοιχα,  $p<0.05$ ).

Ο ολικός αριθμός κυττάρων στην προκλητή απόχρεμψη ήταν σημαντικά υψηλότερος στους ασθενείς με βρογχεκτασίες σε σχέση με τους φυσιολογικούς (3.7 95% CI 1.6-3.9  $\times 10^6 ml^{-1}$  έναντι 2.1 95% CI 1.4 –2.3  $\times 10^6 ml^{-1}$ ,  $p<0.001$ ). Ο % αριθμός των πολυμορφοπυρήνων όπως αυτά αναλύθηκαν στην προκλητή απόχρεμψη ήταν σημαντικά υψηλότερος στους βρογχεκτασικούς ασθενείς συγκρινόμενος με τους φυσιολογικούς (59%, 595 $\times 10^3/g$ , 95% CI 54-63 %, 465-616 $\times 10^3/g$ , έναντι 27% 278 $\times 10^3/g$ , 95% CI 24-36 %, 209-296 $\times 10^3/g$ , αντίστοιχα  $p<0.0001$ , εικόνα 2). Αντίθετα οι φυσιολογικοί είχαν υψηλότερο αριθμό % μακροφάγων σε σχέση με τους βρογχεκτασικούς (72%, 95% CI 65-84 %, 721 $\times 10^3/g$ , 619-804 $\times 10^3/g$ , έναντι 40%, 95% CI 32-53 %, 328 $\times 10^3/g$ , 267-396 $\times 10^3/g$ , αντίστοιχα  $p<0.0001$ , εικόνα 2).

Οι συσχετίσεις μεταξύ των παραμέτρων συνοψίζονται στον πίνακα 4. Παρατηρήθηκε μια σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων του  $H_2O_2$  στον εκπνεόμενο αέρα, του % αριθμού των πολυμορφοπύρηνων στην προκλητή απόχρεμψη, της έκτασης της νόσου όπως αυτή εκφράσθηκε με την HRCT, της  $FEV_1$  % αναμ. και της κλινικής βαρύτητας όπως αυτή εκφράσθηκε με το κλινικό score βαρύτητας νόσου. ( $r_s = 0.9$ ,  $p < 0.0001$ ,  $r_s = 0.66$ ,  $p < 0.0001$ ,  $r_s = 0.43$ ,  $p < 0.05$  αντιστοίχως) (Εικόνα 3A-3B-4A). Παρατηρήθηκε ακόμα μία σημαντική αρνητική συσχέτιση μεταξύ της  $FEV_1$  % αναμ., των επιπέδων του  $H_2O_2$  στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα, του % αριθμού των πολυμορφοπύρηνων στην προκλητή απόχρεμψη και της έκτασης της νόσου ( $r_s = -0.42$ ,  $p < 0.05$ -εικόνα 4B,  $r_s = -0.39$ ,  $p < 0.05$  και  $r_s = -0.48$ ,  $p < 0.05$ , αντιστοίχως). Παρατηρήθηκε μία σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ του % αριθμού των πολυμορφοπύρηνων στην προκλητή απόχρεμψη και της έκτασης της νόσου ( $r_s = 0.6$ ,  $p < 0.0001$ ). Το score κλινικής βαρύτητας παρουσίαζε θετικά σημαντική συσχέτιση με τον % αριθμό πολυμορφοπύρηνων στην προκλητή απόχρεμψη και την έκταση της νόσου ( $r_s = 0.67$ ,  $p < 0.001$ ,  $r_s = 0.4$ ,  $p < 0.05$ ). Δεν παρατηρήθηκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ του % αριθμού των μακροφάγων και των επιπέδων του  $H_2O_2$  στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα ( $r_s = -0.14$ ,  $p = 0.54$ ). Η διάρκεια της νόσου και ο αριθμός παροξύνσεων / έτος δεν συσχετιζόντουσαν σημαντικά με τις παραμέτρους της μελέτης.

## **B) ΑΣΘΜΑ**

### **ΥΛΙΚΟ**

Μελετήθηκαν πενήντα ασθενείς με άσθμα (39 άνδρες, διάμεση (SD) ηλικία 29 (6) έτη, εύρος 19-43, μέση (SD) FEV<sub>1</sub> % αναμενόμενης 82 (16), εύρος 49-110, Πίνακας 5). Η διάγνωση του άσθματος βασίστηκε στα κριτήρια του Αμερικανικού Ινστιτούτου Καρδιάς Πνευμόνων<sup>111</sup>. Τριάντα δύο από αυτούς ήταν ατοπικοί με βάση τις θετικές δερματικές δοκιμασίες σε τουλάχιστο ένα από τα έξι κοινά αλλεργιογόνα καθώς και από την αύξηση των επιπέδων της ολικής IgE. Οι ασθενείς συμμετείχαν στη μελέτη μόνο αν ήταν κλινικά σταθεροί και δεν παρουσίαζαν παρόξυνση της νόσου από οποιαδήποτε εκλυτικό αίτιο για τουλάχιστο 4 εβδομάδες πριν την εισαγωγή τους στη μελέτη. Είκοσι ελάμβαναν εισπνεόμενα στεροειδή (προπιονική φλουτικαζόνη 500 έως 1000 µg ημερησίως ή βουδεσονίδη 400 έως 800 µg ημερησίως). Κανείς δεν ελάμβανε άλλη αντιφλεγμονώδη αγωγή συμπεριλαμβανομένου των ανταγωνιστών λευκοτριενίων και της θεοφυλλίνης. Κανείς ασθενής δεν ελάμβανε βλεννολυτικά και κανένας δεν ευρίσκετο σε χρόνια οξυγονοθεραπεία. Είκοσι δύο ασθενείς ελάμβαναν μακράς δράσεως β<sub>2</sub> διεγέρτες δύο φορές την ημέρα (μερικοί από αυτούς χρησιμοποιούσαν περιστασιακά βραχείας δράσεως β<sub>2</sub> διεγέρτες ως θεραπεία ανακούφισης) ενώ οι υπόλοιποι είκοσι οκτώ χρησιμοποιούσαν ως μόνο θεραπευτικό μέσο μακράς η βραχείας δράσεως β<sub>2</sub> διεγέρτες σαν θεραπεία ανακούφισης. Οι ασθενείς με βρογχικό άσθμα χωρίστηκαν σε τρεις ομάδες με βάση την βαρύτητα της νόσου όπως αυτή εκφράζεται με τα κριτήρια του Αμερικανικού Ινστιτούτου Καρδιάς Πνευμόνων<sup>111</sup>. 10 ασθενείς χαρακτηρίστηκαν ως ήπιο διαλείπον άσθμα, 20 ασθενείς χαρακτηρίστηκαν ως ήπιο επιμένον και 20 ασθενείς ως μέτριο.

Ως ομάδα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν 15 φυσιολογικά άτομα (11 άνδρες, διάμεση (SD) ηλικία 33 (7) έτη, εύρος 19-37, Πίνακας 5). Όλοι ήταν μη καπνιστές και δεν παρουσίαζαν λοίμωξη ανώτερου ή κατώτερου αναπνευστικού για τουλάχιστο έξι εβδομάδες πριν από την συμμετοχή τους στην μελέτη. Δεν είχαν ιστορικό χρόνιας νόσου και δεν ελάμβαναν χρόνια φαρμακευτική αγωγή. Όλοι είχαν αρνητικό ιστορικό ατοπίας και αρνητικές δερματικές δοκιμασίες σε έξι κοινά αλλεργιογόνα. Όλοι είχαν φυσιολογική



σπιρομέτρηση (μέση (SD) FEV<sub>1</sub> % αναμενόμενης 95 (3), εύρος 87-121) και δεν παρουσίαζαν βρογχική υπεραντιδραστικότητα όπως αυτή μετρήθηκε με δοκιμασία πρόκλησης με ισταμίνη (PD<sub>20</sub> >0.800mg, μέση τιμή 1.45 με εύρος 0.95-1.9).

### **ΜΕΘΟΔΟΙ.**

Σε όλους τους ασθενείς έγινε συλλογή συμπυκνώματος εκπνεόμενου αέρα με μέτρηση των επιπέδων του υπεροξειδίου του υδρογόνου, συλλογή πτυέλων με την μέθοδο της προκλητής απόχρεμψης καθώς και έλεγχος αναπνευστικής λειτουργίας με την απλή σπιρομέτρηση

Μετρήθηκαν τα επίπεδα του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και έγιναν οι ανάλογες συγκρίσεις με την ομάδα ελέγχου. Στους ασθενείς με βρογχικό άσθμα έγιναν περαιτέρω συγκρίσεις στις υποομάδες που προέκυψαν μετά από αξιολόγηση της κλινικής βαρύτητας με βάση τις διεθνείς οδηγίες. Καταγράφηκε η επίδραση των εισπνεομένων στεροειδών (ΕΣ) στα επίπεδα του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> για κάθε μια από τις ομάδες. Τα επίπεδα του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> συσχετίστηκαν για κάθε μια ομάδα με παραμέτρους που εξέφραζαν κλινική και λειτουργική βαρύτητα, καθώς και με παραμέτρους που εξέφραζαν την φλεγμονή όπως αυτή εκφράστηκε με τον κυτταρικό πληθυσμό από την προκλητή απόχρεμψη και τα επίπεδα της ηωσινοφιλικής κατιονικής πρωτεΐνης (ECP) στο υπερκείμενο των πτυέλων.

Η συλλογή των δύο δειγμάτων καθώς και η απλή σπιρομέτρηση έγινε την ίδια μέρα. Το άτομο που έκανε τις μετρήσεις του υπεροξειδίου του υδρογόνου δεν γνώριζε το κλινικό και λειτουργικό status των τόμων της μελέτης.

### **Συλλογή συμπυκνώματος εκπνεόμενου αέρα και μέτρηση υπεροξειδίου του υδρογόνου.**

Η συλλογή του συμπυκνώματος του εκπνεόμενου αέρα έγινε με την μέθοδο που περιγράφηκε για τις βρογχεκτασίες. Η επαναληψιμότητα των μετρήσεων του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ελέγχθηκε σε 2 διαφορετικές ημέρες σε 5 φυσιολογικούς και σε δέκα ασθενείς με άσθμα διαφορετικής βαρύτητας που επιλέχθηκαν τυχαία. Για τον έλεγχο σταθερότητας του δείγματος χρησιμοποιήθηκαν 10 άτομα (5 ασθενείς). Χρησιμοποιήθηκαν οι μέθοδοι που περιγράφηκαν για τις βρογχεκτασίες<sup>78</sup>. Για την μέτρηση του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> χρησιμοποιήθηκε η ήδη περιγραφείσα ενζυμική μέθοδος<sup>48,80</sup>.

### **Προκλητή απόχρεμψη.**

Η προκλητή απόχρεμψη έγινε σύμφωνα με την μέθοδο που περιγράφηκε προηγουμένως. Στους ασθενείς με βρογχικό άσθμα μετρήθηκε η ECP στο υπερκείμενο των πτυέλων με την μέθοδο που έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία<sup>106</sup>. Χρησιμοποιήθηκε ενζυμική ανοσο φλουομετρική μέθοδος (Pharmacia, Uppsala, Sweden). Οι μετρήσεις των πτυέλων έγιναν την ίδια μέρα για όλους τους ασθενείς.

#### **Λειτουργικές δοκιμασίες.**

Η μέτρηση της FEV<sub>1</sub>, VC, έγινε με σπιρόμετρο Vica-test, Mighard, NL. Η καλύτερη προσπάθεια από τρεις εκφραζόμενη σε FEV<sub>1</sub>, VC % της αναμενόμενης χρησιμοποιήθηκε στην μελέτη. Στην ομάδα ελέγχου καθώς και στους ασθενείς με ήπιο άσθμα έγινε δοκιμασία βρογχικής πρόκλησης με ισταμίνη με σκοπό για τις μεν πρώτη τον αποκλεισμό ατόμων με βρογχική υπεραντιδραστικότητα για την μεν δεύτερη για τον καθορισμό του βαθμού της βρογχικής υπεραντιδραστικότητας με σκοπό την αξιολόγηση του ως παραμέτρου βαρύτητας του άσθματος. Η βρογχική υπεραντιδραστικότητα μετρήθηκε με δοκιμασία πρόκλησης με ισταμίνη χρησιμοποιώντας το σύστημα APS Jaeger, Würzburg, Germany με νεφελοποιητή Sandoz (Jaeger). Η PD<sub>20</sub> μετρήθηκε ως η δόση ισταμίνης που προκαλεί πτώση της FEV<sub>1</sub> κατά 20%. Ως απουσία βρογχικής υπεραντιδραστικότητας θεωρήθηκε PD<sub>20</sub> >0.800mg. Η PD<sub>20</sub> καθορίστηκε με τον υπολογισμό της ημιλογαριθμικής καμπύλης που περιγράφει τη σχέση δόσης–απάντησης<sup>108</sup>. Σε όλους τους ασθενείς με βρογχικό άσθμα μετρήθηκε η μέγιστη εκπνευστική ροή (PEFR) 2 φορές ημερησίως (πρωί-βράδυ) και υπολογίστηκε η ημερήσια διακύμανση της PEFR με τον ακόλουθο τύπο: βραδυνή-ημερήσια/μέση τιμή ημερήσιας+βραδυνής × 100.

#### **Παράμετροι Αξιολόγησης.**

##### **Φαρμακευτική θεραπεία.**

Σε όλους τους ασθενείς έγινε μια περαιτέρω ανάλυση με σκοπό να καταγραφεί η επίδραση των εισπνεομένων στεροειδών στα επίπεδα του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> καθώς και στις διάφορες παραμέτρους αξιολόγησης. Η επίδραση των εισπνεομένων στεροειδών στο άσθμα έγινε και στις υποομάδες που προέκυψαν μετά την περαιτέρω ανάλυση τους με βάση την βαρύτητα της νόσου.

### **Κλινική βαρύτητα**

Η κλινική βαρύτητα της νόσου αξιολογήθηκε με βαθμολογία συμπτωμάτων τεκμηριωμένη βιβλιογραφικά (Πίνακας 6)<sup>112</sup>. Σε όλους τους ασθματικούς ασθενείς ζητήθηκε να καταγράφουν τα καθημερινά τους συμπτώματα για χρονικό διάστημα δύο εβδομάδων. Τα συμπτώματα περιελάμβαναν το βήχα, την παρουσία συρρίπτουσας αναπνοής στην διάρκεια της ημέρας, την δύσπνοια και τέλος την ύπαρξη νυχτερινής συμπτωματολογίας. Τα συμπτώματα βαθμολογήθηκαν με κλίμακα 0-3 (0=απουσία 1=ήπιο, 2=μέτριο, 3=βαρύ). Η βαθμολόγηση του κάθε συμπτώματος προστίθετο συνολικά και υπήρχε ένας μέσος ημερήσιος όρος για την περίοδο της αξιολόγησης. Δεν παρατηρήθηκαν μεταβολές στην αναπνευστική λειτουργία (FEV<sub>1</sub>, PEF<sub>R</sub>) μεταξύ της 1<sup>ης</sup> και της 14<sup>ης</sup> ημέρας (χρονικό διάστημα καταγραφής συμπτωμάτων).

### **ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.**

Οι τιμές που αφορούσαν τα χαρακτηριστικά των ατόμων εκφράσθηκαν ως μέση τιμή (SD) με το εύρος των τιμών σε παρένθεση. Εξαίρεση αποτελούσε η ηλικία που εκφράστηκε ως διάμεση τιμή (SD). Όταν οι τιμές αφορούσαν συγκρίσεις μεταξύ παραμέτρων της μελέτης εκφράσθηκαν ως μέση τιμή με 95% confidence intervals (CI) για τις διαφορές μεταξύ των τιμών. Η φυσιολογική κατανομή των τιμών εξετάσθηκε με το Shapiro Wilk's test. Αν δεν κατανέμονταν φυσιολογικά το non parametric Mann Whitney test χρησιμοποιήθηκε για τις στατιστικές συγκρίσεις. Αντίθετα σε φυσιολογικές κατανομές χρησιμοποιήθηκε το paired-t-test. Οι παράμετροι από τις υποομάδες του άσθματος συγκρίθηκαν μεταξύ τους με one-way analysis of variance (ANOVA) με ανάλογο διορθωτικό post hoc test (Bonferoni) για τις πολλαπλές συγκρίσεις. Pearson's correlation coefficient χρησιμοποιήθηκε για την αξιολόγηση στατιστικής σημαντικής συσχέτισης μεταξύ παραμέτρων με φυσιολογική κατανομή ενώ για παραμέτρους με μη φυσιολογική κατανομή χρησιμοποιήθηκε το Spearman's correlation coefficient. Στην προσπάθεια διερεύνησης παράλληλων συσχετίσεων μεταξύ κυτταρικού πληθυσμού και H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> χρησιμοποιήθηκε στατιστικό μοντέλο πολλαπλών συσχετίσεων (SPSS 98 for windows). Τιμή p <0.05 θεωρήθηκε ως στατιστικά σημαντική.

### **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.**

Η επαναληψιμότητα της μεθόδου και των μετρήσεων μεταξύ 2 ημερών κατέδειξε μέση διαφορά τιμών 0.09 (0.03)  $\mu\text{M}$  για τους ασθενείς και 0.07 (0.04)  $\mu\text{M}$  για την ομάδα ελέγχου. Η σταθερότητα του  $\text{H}_2\text{O}_2$  στα δείγματα που καταψύχθηκαν κατέδειξε μη στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις τέσσερις μετρήσεις [0.54 (0.21)  $\mu\text{M}$  μετά από 2 ημέρες, 0.58 (0.3)  $\mu\text{M}$  μετά από μία εβδομάδα, 0.6 (0.3) μετά από 2 εβδομάδες, 0.57 (0.4)  $\mu\text{M}$  μετά από 3 εβδομάδες,  $p=0.43$ ].

Η μέση τιμή (95%CI) της συγκέντρωσης του  $\text{H}_2\text{O}_2$  στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα ασθματικών ασθενών ήταν σημαντικά υψηλότερη από αυτή της ομάδας ελέγχου (0.67, 0.56-0.77  $\mu\text{M}$  vs 0.2, 0.16-0.24  $\mu\text{M}$ ,  $p<0.0001$ , Εικόνα 5). Η στατιστικά αυτή σημαντική διαφορά οφειλόταν κυρίως στην αυξημένη συγκέντρωση του  $\text{H}_2\text{O}_2$  στους ασθενείς με μέτριο άσθμα, μια και είχαν τιμές σημαντικά υψηλότερες σε σύγκριση με τους ασθενείς με ήπιο διαλείπον και ήπιο επιμένον αντίστοιχα (0.94, 0.76-1.12 $\mu\text{M}$ , 0.27, 0.23-0.32 $\mu\text{M}$  και 0.59, 0.47-0.7 $\mu\text{M}$  αντίστοιχα,  $p<0.0001$ , Εικόνα 5). Οι ασθενείς με ήπιο διαλείπον, ήπιο επιμένον και μέτριο άσθμα είχαν σημαντικά υψηλότερες τιμές συγκρινόμενοι με την ομάδα ελέγχου ( $p=0.04$ ,  $p<0.001$  και  $p<0.0001$  αντίστοιχα). Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ ατοπικών και μη ατοπικών ασθενών, (0.7 95%CI 0.6-0.8 vs 0.6 95%CI 0.4-0.8,  $p=0.08$ ). Και στις τέσσερις ομάδες ασθματικών παρατηρήθηκε υψηλότερο ποσοστό ηωσινοφίλων το οποίο χαρακτηριζόταν από ανοδική τάση σε συνάρτηση με την βαρύτητα της νόσου (0.3%, 95%CI 0.1-0.6,  $7 \times 10^3/\text{g}$ , 95%CI 2-8 για την ομάδα ελέγχου, 7%, 95%CI 2-9,  $98 \times 10^3/\text{g}$ , 95%CI 71-114 για όλους τους ασθματικούς, 2%, 95%CI 0.8-3,  $21 \times 10^3/\text{g}$ , 95%CI 14-27 για το ήπιο διαλείπον, 5%, 95%CI 2-7,  $74 \times 10^3/\text{g}$ , 95%CI 63-81 για το ήπιο επιμένον, 11.5%, 95%CI 4-13,  $164 \times 10^3/\text{g}$ , 95%CI 137-198 για το μέτριο άσθμα εικόνα 6, πίνακας 7,  $p<0.001$  στατιστικά σημαντικά υψηλότερο ποσοστό στους ασθενείς με μέτριο άσθμα). Ο % αριθμός μακροφάγων ήταν σημαντικά χαμηλότερος σε ασθενείς με μέτριο άσθμα συγκρινόμενος με αυτόν των ασθενών με ήπιο διαλείπον και ήπιο επιμένον (57%, 95%CI 51-60,  $518 \times 10^3/\text{g}$ , 95%CI 435-562, 72%, 95%CI 67-74,  $737 \times 10^3/\text{g}$ , 95%CI 637-816 και 70%, 95%CI 69-75,  $621 \times 10^3/\text{g}$ , 95%CI 577-703 αντίστοιχα, εικόνα 6,  $p<0.0001$ ). Τέλος οριακή σημαντικότητα παρατηρήθηκε στον αριθμό των πολυμορφοπύρηνων σε ασθενείς με μέτριο άσθμα συγκρινόμενοι με τους αντίστοιχους με ήπιο διαλείπον και ήπιο

επιμένον (31%, 95%CI 28-35,  $255 \times 10^3/g$ , 95%CI 211-273, 25%, 95%CI 20-26,  $224 \times 10^3/g$ , 95%CI 195-237 και 24%, 95%CI 21-25,  $201 \times 10^3/g$ , 95%CI 189-220 αντίστοιχα, εικόνα 6,  $p < 0.05$ ). Σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν στην συγκέντρωση της ECP στο υπερκείμενο των πτυέλων με την μεγαλύτερη αύξηση να παρατηρείται σε ασθενείς με μέτριο άσθμα (πίνακας 5,  $p < 0.001$ ). Παρατηρήθηκε μια σημαντική διαφορά στην μέση τιμή (95%CI) της συγκέντρωσης του  $H_2O_2$  μεταξύ των ασθενών που ελάμβαναν ΕΣ και αυτών που δεν ελάμβαναν (0.66,0.52-0.8  $\mu M$  vs 0.87,0.68-1.05  $\mu M$ ,  $p < 0.05$ , εικόνα 7). Ανάλογα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν μετά το διαχωρισμό των ασθενών σε ήπιο επιμένον και μέτριο άσθμα και με βάση πάντοτε την λήψη ή όχι ΕΣ (0.65,0.4-0.87  $\mu M$  vs 0.52,0.41-0.64  $\mu M$ ,  $p < 0.001$  και 1.09,0.83-1.34  $\mu M$  vs 0.74,0.46-1.02  $\mu M$ ,  $p < 0.0001$  αντίστοιχα, εικόνα 7). Οι ασθενείς υπό ΕΣ είχαν σημαντικά χαμηλότερες τιμές ηωσινοφίλων στην προκλητή απόχρεμψη καθώς και ECP στο υπερκείμενο των πτυέλων (πίνακας 5,  $p < 0.001$  και  $p < 0.0001$  αντίστοιχα).

Σε όλους τους ασθματικούς ασθενείς παρατηρήθηκε μια θετική σημαντική συσχέτιση μεταξύ  $H_2O_2$ , της συγκέντρωσης της ECP και του αριθμού των ηωσινοφίλων στη προκλητή απόχρεμψη (πίνακας 7). Ανάλογα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν μεταξύ  $H_2O_2$ , κλινικού score βαρύτητας και διακύμανσης της PEF (πίνακας 7). Μία αρνητικά σημαντική συσχέτιση παρατηρήθηκε μεταξύ  $H_2O_2$  και της  $FEV_1\%$  αναμ (πίνακας 7). Η συγκέντρωση του  $H_2O_2$  δεν συσχετιζόταν σημαντικά με τον αριθμό των μακροφάγων και πολυμορφοπύρηνων στη προκλητή απόχρεμψη καθώς και με το βαθμό της βρογχικής υπεραντιδραστικότητας όπως αυτή εκφράσθηκε με την  $PD_{20}$  στην ισταμίνη (πίνακας 7 για το κυτταρικό πληθυσμό και  $r_s = 0.02$ ,  $p = 0.77$  για την  $PD_{20}$ ). Οι παραπάνω αναφερθείσες σημαντικές συσχετίσεις δεν παρατηρήθηκαν όταν οι ασθενείς χωρίστηκαν σε υποομάδες με βάση την βαρύτητα της νόσου και την λήψη ΕΣ. Παρατηρήθηκαν μόνο σε ασθενείς με μέτριο άσθμα και κυρίως σε αυτούς που δεν ελάμβαναν εισπνεόμενα στεροειδή. (πίνακας 8). Περαιτέρω ανάλυση συσχετίσεων μεταξύ κυτταρικού πληθυσμού και συγκέντρωσης  $H_2O_2$  κατέδειξε μια σημαντικά θετική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων του  $H_2O_2$  και του αριθμού των πολυμορφοπύρηνων σε ασθενείς με μέτριο άσθμα ( $r = 0.6$ ,  $p = 0.005$ , πίνακας 7). Στο μέτριο άσθμα παρατηρήθηκε μια παράλληλη θετική συσχέτιση της συγκέντρωσης του  $H_2O_2$

με τον αριθμό των ηωσινοφίλων και ουδετεροφίλων στην προκλητή απόχρεμψη ( $r=0.61$ ,  $p=0.003$ ).

## Γ) ΧΡΟΝΙΑ ΑΠΟΦΡΑΚΤΙΚΗ ΠΝΕΥΜΟΝΟΠΑΘΕΙΑ (ΧΑΠ).

### ΥΛΙΚΟ

Εξετάσθηκαν 30 ασθενείς (όλοι άνδρες, διάμεση (SD) ηλικία 59 (9) έτη, εύρος 42-76, μέση (SD) FEV<sub>1</sub> % αναμενόμενης 59.5 (14), εύρος 36-80, Πίνακας 9). Όλοι ήταν καπνιστές με μέση τιμή (SD) καπνιστικής συνήθειας 41 (9) pack years. Οι παραπάνω ασθενείς χωρίστηκαν σε τρεις ομάδες με βάση της βαρύτητα της νόσου όπως αυτή εκφράστηκε με τα κριτήρια της ERS<sup>113</sup>. 10 χαρακτηρίστηκαν ως ήπια ΧΑΠ (διάμεση (SD) ηλικία 59 (10) έτη, εύρος 42-76, μέση (SD) FEV<sub>1</sub> % αναμενόμενης 75 (3), εύρος 71-80), 10 ως μέτρια ΧΑΠ (διάμεση (SD) ηλικία 59.5 (9) έτη, εύρος 44-71, μέση (SD) FEV<sub>1</sub> % αναμενόμενης 60 (7), εύρος 50-69) και 10 ως σοβαρή ΧΑΠ (διάμεση (SD) ηλικία 58 (9) έτη, εύρος 47-70, μέση (SD) FEV<sub>1</sub> % αναμενόμενης 43 (4), εύρος 36-50). Οι ασθενείς συμμετείχαν στη μελέτη μόνο αν ήταν κλινικά σταθεροί και δεν παρουσίαζαν παρόξυνση της νόσου από οποιαδήποτε εκλυτικό αίτιο για τουλάχιστο 4 εβδομάδες πριν την εισαγωγή τους στη μελέτη. Δεκαπέντε ελάμβαναν εισπνεόμενα στεροειδή (προπιονική φλουτικαζόνη 500 έως 1000 µg ημερησίως ή βουδεσονίδη 400 έως 800 µg ημερησίως). Ανάλογος αριθμός ελάμβανε θεοφυλλίνη (600mg ημερησίως σε 2 δόσεις). Κανείς ασθενής δεν ελάμβανε βλεννολυτικά ενώ 3 άτομα από την ομάδα με την σοβαρή ΧΑΠ ελάμβαναν οξυγονοθεραπεία κατ'οίκον (μέση τιμή (SD) PaO<sub>2</sub> 53 (4) mmHg στον αέρα). Δέκα ασθενείς ελάμβαναν μακράς δράσεως β<sub>2</sub> διεγέρτες δύο φορές την ημέρα, δεκαπέντε χρησιμοποιούσαν τον συνδυασμό σαλβουταμόλης –βρωμιούχου ιπρατρόπιου τρεις έως τέσσερις φορές ημερησίως, ενώ δέκα ελάμβαναν εισπνοές βρωμιούχου ιπρατρόπιου τρεις έως τέσσερις φορές ημερησίως. Ασθενείς με έλλειψη α1 αντιθρυψίνης και ατοπία αποκλείστηκαν από την μελέτη. Κανείς ασθενής δεν είχε αναστρεψιμότητα στην σπιρομέτρηση (αύξηση της FEV<sub>1</sub> τριάντα λεπτά μετά από εισπνοή 200µg σαλβουταμόλης <12%). Όλοι οι ασθενείς είχαν αρνητικό ιστορικό ατοπίας και αρνητικές δερματικές δοκιμασίες σε έξι κοινά αλλεργιογόνα.

Ως ομάδα ελέγχου στην ΧΑΠ θεωρήθηκαν 10 άτομα με συμπτωματολογία χρόνιας βρογχίτιδας χωρίς όμως απόφραξη των αεραγωγών (FEV<sub>1</sub>/VC > 88% ) όπως αυτή εκφράζεται από την θέση της ERS<sup>113</sup>. Όλοι ήταν καπνιστές με

μέση τιμή (SD) καπνιστικής συνήθειας 35 (6) pack years και δεν παρουσίαζαν λοίμωξη ανώτερου ή κατώτερου αναπνευστικού για τουλάχιστο έξι εβδομάδες πριν από την συμμετοχή τους στην μελέτη. Δεν είχαν ιστορικό χρόνιας νόσου και δεν ελάμβαναν χρόνια φαρμακευτική αγωγή. Όλοι είχαν αρνητικό ιστορικό ατοπίας και αρνητικές δερματικές δοκιμασίες σε έξι κοινά αλλεργιογόνα. Όλοι είχαν φυσιολογική σπιρομέτρηση (μέση (SD) FEV<sub>1</sub>, % αναμενόμενης 93 (8), εύρος 82-108) και δεν παρουσίαζαν βρογχική υπεραντιδραστικότητα όπως αυτή μετρήθηκε με δοκιμασία πρόκλησης με ισταμίνη (PD<sub>20</sub> >0.800mg, μέση τιμή 1.17 με εύρος 0.89-1.5).

### **ΜΕΘΟΔΟΙ**

Σε όλους τους ασθενείς και στην ομάδα ελέγχου έγινε συλλογή συμπυκνώματος εκπνεόμενου αέρα με μέτρηση των επιπέδων του υπεροξειδίου του υδρογόνου, συλλογή πτυέλων με την μέθοδο της προκλητής απόχρεμψης καθώς και έλεγχος αναπνευστικής λειτουργίας με την απλή σπιρομέτρηση. Η συλλογή των δύο δειγμάτων καθώς και η απλή σπιρομέτρηση έγινε την ίδια μέρα.

Μετρήθηκαν τα επίπεδα του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και έγιναν οι ανάλογες συγκρίσεις με την ομάδα ελέγχου. Στους ασθενείς έγιναν περαιτέρω συγκρίσεις στις υποομάδες που προέκυψαν μετά από αξιολόγηση της κλινικής βαρύτητας με βάση τις διεθνείς οδηγίες. Καταγράφηκε η επίδραση των εισπνεομένων στεροειδών (ΕΣ) στα επίπεδα του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Τα επίπεδα του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> συσχετίστηκαν για κάθε μια ομάδα με παραμέτρους που εξέφραζαν κλινική και λειτουργική βαρύτητα, καθώς και με παραμέτρους που εξέφραζαν την φλεγμονή όπως αυτή εκφράστηκε με τον κυτταρικό πληθυσμό από την προκλητή απόχρεμψη. Το άτομο που έκανε τις μετρήσεις του υπεροξειδίου του υδρογόνου δεν γνώριζε το κλινικό και λειτουργικό status των ατόμων της μελέτης.

### **Συλλογή συμπυκνώματος εκπνεόμενου αέρα και μέτρηση υπεροξειδίου του υδρογόνου.**

Η συλλογή του συμπυκνώματος του εκπνεόμενου αέρα έγινε σύμφωνα με την ήδη περιγραφείσα μέθοδο. Η επαναληψιμότητα των μετρήσεων του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ελέγχθηκε σε 2 διαφορετικές ημέρες σε 5 φυσιολογικούς και σε δέκα ασθενείς (ποικίλης βαρύτητας) που επιλέχθηκαν τυχαία. Για τον έλεγχο σταθερότητας του δείγματος χρησιμοποιήθηκαν 10 άτομα (5 ασθενείς). Η επαναληψιμότητα



των μετρήσεων του  $H_2O_2$  καθώς και η σταθερότητα των δειγμάτων εκτιμήθηκε όπως περιγράφηκε προηγούμενα στην βιβλιογραφία<sup>78</sup>.

Για την μέτρηση του  $H_2O_2$  χρησιμοποιήθηκε η ήδη περιγραφείσα ενζυμική μέθοδος<sup>48,80</sup>.

#### **Προκλητή απόχρεμψη.**

Η προκλητή απόχρεμψη έγινε σύμφωνα με την μέθοδο που έχει ήδη περιγραφεί.

#### **Λειτουργικές δοκιμασίες.**

Η μέτρηση της  $FEV_1$ , VC, έγινε με σπιρόμετρο Vica-test, Mighard, NL. Η καλύτερη προσπάθεια από τρεις εκφραζόμενη σε  $FEV_1$ , VC % της αναμενόμενης χρησιμοποιήθηκε στην μελέτη. Στην ομάδα ελέγχου της ΧΑΠ χρησιμοποιήθηκε ο λόγος  $FEV_1/VC$  με σκοπό να καθορίσει την παρουσία ή όχι απόφραξης των αεραγωγών<sup>113</sup>. Στην ομάδα ελέγχου έγινε δοκιμασία βρογχικής πρόκλησης με ισταμίνη με σκοπό τον αποκλεισμό ατόμων με βρογχική υπεραντιδραστικότητα. Η βρογχική υπεραντιδραστικότητα μετρήθηκε με δοκιμασία πρόκλησης με ισταμίνη χρησιμοποιώντας το σύστημα APS Jaeger, Würzburg, Germany με νεφελοποιητή Sandoz (Jaeger). Η  $PD_{20}$  μετρήθηκε ως η δόση ισταμίνης που προκαλεί πτώση της  $FEV_1$  κατά 20%. Ως απουσία βρογχικής υπεραντιδραστικότητας θεωρήθηκε  $PD_{20} > 0.800mg$ . Η  $PD_{20}$  υπολογίστηκε με τον υπολογισμό της ημιλογαριθμικής καμπύλης που περιγράφει τη σχέση δόσης–απάντησης<sup>108</sup>.

#### **Παράμετροι Αξιολόγησης.**

##### **Φαρμακευτική θεραπεία.**

Σε όλους τους ασθενείς έγινε μια περαιτέρω ανάλυση με σκοπό να καταγραφεί η επίδραση των εισπνεομένων στεροειδών στα επίπεδα του  $H_2O_2$  καθώς και στις διάφορες παραμέτρους αξιολόγησης. Η επίδραση των εισπνεομένων στεροειδών στην ΧΑΠ έγινε και στις υποομάδες που προέκυψαν μετά την περαιτέρω ανάλυση τους με βάση την βαρύτητα της νόσου.

##### **Κλινική βαρύτητα**

Η κλινική βαρύτητα στους ασθενείς με ΧΑΠ αξιολογήθηκε με σύστημα βαθμολόγησης της δύσπνοιας (Τροποποιημένη κλίμακα δύσπνοιας του MRC [MEDICAL research Council], Πίνακας 10)<sup>114</sup> ως ακολούθως: 0= απουσία δύσπνοιας εκτός από την περίπτωση της έντονης σωματικής άσκησης, 1=

εμφάνιση δύσπνοιας όταν βιάζεται στο ίσωμα ή όταν ανεβαίνει σε μικρή ανηφόρα, 2= βαδίζει βραδύτερα από ανθρώπους ίδιας ηλικίας στο ίσωμα εξαιτίας της δύσπνοιας ή σταματά λόγω δύσπνοιας όταν βαδίζει με το δικό του βήμα στο ίσωμα, 3= Σταματά για να ανασάνει όταν περπατήσει περίπου 100 μέτρα η μετά από λίγα λεπτά στο ίσωμα, 4= Πολύ μεγάλη δύσπνοια για να μπορέσει να βγει από το σπίτι η όταν ντύνεται η ξεντύνεται. Εύρος βαθμολογίας 0-4.

### **ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.**

Οι τιμές που αφορούσαν τα χαρακτηριστικά των ατόμων εκφράστηκαν ως μέση τιμή (SD) με το εύρος των τιμών σε παρένθεση. Εξαίρεση αποτελούσε η ηλικία που εκφράστηκε ως διάμεση τιμή (SD). Όταν οι τιμές αφορούσαν συγκρίσεις μεταξύ παραμέτρων της μελέτης εκφράστηκαν ως μέση τιμή με 95% confidence intervals (CI) για τις διαφορές μεταξύ των τιμών. Η φυσιολογική κατανομή των τιμών εξετάστηκε με το Shapiro Wilk's test. Αν δεν κατανέμονταν φυσιολογικά το non parametric Mann Whitney test χρησιμοποιήθηκε για τις στατιστικές συγκρίσεις. Αντίθετα σε φυσιολογικές κατανομές χρησιμοποιήθηκε το paired-t-test. Οι παράμετροι από τις υποομάδες της ΧΑΠ συγκρίθηκαν μεταξύ τους με one-way analysis of variance (ANOVA) με ανάλογο διορθωτικό post hoc test (Bonferoni) για τις πολλαπλές συγκρίσεις. Pearson's correlation coefficient χρησιμοποιήθηκε για την αξιολόγηση στατιστικής σημαντικής συσχέτισης μεταξύ παραμέτρων με φυσιολογική κατανομή ενώ για παραμέτρους με μη φυσιολογική κατανομή χρησιμοποιήθηκε το Spearman's correlation coefficient. Τιμή  $p < 0.05$  χαρακτηρίστηκε ως στατιστικά σημαντική.

### **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.**

Η επαναληψιμότητα της μεθόδου και των μετρήσεων μεταξύ 2 ημερών κατέδειξε μια μέση διαφορά τιμών 0.04 (0.01)  $\mu\text{M}$  για τους ασθενείς και 0.08 (0.04)  $\mu\text{M}$  για την ομάδα ελέγχου. Η σταθερότητα του  $\text{H}_2\text{O}_2$  στα δείγματα που καταψύχθηκαν κατέδειξε μη στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις τέσσερις μετρήσεις [0.56 (0.11)  $\mu\text{M}$  μετά από 2 ημέρες, 0.61 (0.2)  $\mu\text{M}$  μετά από μία εβδομάδα, 0.6 (0.4) μετά από 2 εβδομάδες, 0.59 (0.3)  $\mu\text{M}$  μετά από 3 εβδομάδες,  $p=0.38$ ].

Οι ασθενείς με ΧΑΠ είχαν σημαντικά υψηλότερες τιμές  $\text{H}_2\text{O}_2$  σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (0.66, 95%CI 0.54-0.78  $\mu\text{M}$  vs 0.3, 95%CI 0.25-0.32  $\mu\text{M}$ ,

$p < 0.0001$ , εικόνα 8). Περαιτέρω ανάλυση έδειξε ότι στους ασθενείς με σοβαρή ΧΑΠ η μέση τιμή 95%CI του  $H_2O_2$  ήταν σημαντικά υψηλότερη συγκρινόμενη με αυτή των ασθενών με ήπια και μέτρια ΧΑΠ αντίστοιχα (0.96, 0.79-1.13  $\mu M$  vs 0.33, 0.24-0.43  $\mu M$  και 0.68, 0.55-0.81 αντίστοιχα,  $p < 0.0001$ , εικόνα 8). Οι ασθενείς με ΧΑΠ που ελάμβαναν εισπνεόμενα στεροειδή παρουσίαζαν στατιστικά σημαντικά υψηλότερες τιμές  $H_2O_2$  σε σχέση με αυτούς που δεν ελάμβαναν εισπνεόμενα στεροειδή (0.8, 95%CI 0.6-1  $\mu M$  vs 0.52, 95%CI 0.4-0.63  $\mu M$ ,  $p < 0.05$ ).

Οι ασθενείς με ΧΑΠ παρουσίαζαν σημαντικά υψηλότερο αριθμό ουδετερόφιλων στην προκλητή απόχρεμψη σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (56%, 95%CI 51-61,  $538 \times 10^3/g$ , 95%CI 439-601, έναντι 39%, 95%CI 37-40,  $317 \times 10^3/g$ , 95%CI 279-341, εικόνα 9,  $p < 0.0001$ ). Ανάλογη σημαντική διαφορά παρατηρήθηκε και για τα μακροφάγα με την διαφορά ότι στους ασθενείς με ΧΑΠ ο αριθμός ήταν μικρότερος σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (42%, 95%CI 37-47,  $371 \times 10^3/g$ , 95%CI 306-397, έναντι 60%, 95%CI 59-62,  $568 \times 10^3/g$ , 95%CI 517-604, εικόνα 9,  $p < 0.0001$ ). Ανάλογα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν στους ασθενείς με σοβαρή ΧΑΠ όταν συγκρίθηκαν με ασθενείς με μέτρια και ήπια ΧΑΠ αντίστοιχα (66%, 95%CI 64-68  $601 \times 10^3/g$ , 95%CI 533-644, έναντι 63%, 95%CI 58-67.5  $570 \times 10^3/g$ , 95%CI 521-611 και 39%, 95%CI 36-43,  $308 \times 10^3/g$ , 95%CI 270-334, αντίστοιχα  $p < 0.0001$  για τα πολυμορφοπύρηνα, εικόνα 4B), (32%, 95%CI 30-34,  $285 \times 10^3/g$ , 95%CI 224-301, έναντι 36%, 95%CI 32-41  $314 \times 10^3/g$ , 95%CI 278-341 και 60%, 95%CI 56-63,  $561 \times 10^3/g$ , 95%CI 519-603, αντίστοιχα,  $p < 0.0001$ , για τα μακροφάγα, εικόνα 9).

Οι συσχετίσεις μεταξύ της συγκέντρωσης του  $H_2O_2$  στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα και των παραμέτρων της μελέτης συνοψίζονται στον Πίνακα 11. Παρατηρήθηκε μια σημαντικά θετική συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης του  $H_2O_2$  στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα και του % αριθμού των πολυμορφοπύρηνων στην προκλητή απόχρεμψη ( $r_s = 0.77$ ,  $p < 0.0001$ , εικόνα 10A). Αρνητική συσχέτιση παρατηρήθηκε μεταξύ της συγκέντρωσης του  $H_2O_2$  στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα και της  $FEV_1$  % αναμενόμενης ( $r_s = -0.9$ ,  $p < 0.0001$ , εικόνα 10B). Ανάλογη αρνητική συσχέτιση παρατηρήθηκε μεταξύ του % αριθμού των μακροφάγων στην προκλητή απόχρεμψη και της συγκέντρωσης του  $H_2O_2$  στο συμπύκνωμα του

εκπνεόμενου αέρα ( $r_s=-0.76$ ,  $p<0.0001$ ). Το κλινικό score της δύσπνοιας δεν παρουσίαζε σημαντική συσχέτιση με την συγκέντρωση του  $H_2O_2$  στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα ( $r_s=0.12$ ,  $p=0.09$ ). Περαιτέρω ανάλυση των συσχετίσεων στις τρεις υποομάδες της νόσου έδειξε ότι οι παραπάνω συσχετίσεις αφορούσαν μόνο τους ασθενείς με μέτρια και σοβαρή ΧΑΠ. (Πίνακας 11). Οι συσχετίσεις μεταξύ των παραμέτρων της μελέτης έδειξαν ότι η μοναδική ισχυρή συσχέτιση ήταν αυτή μεταξύ του βαθμού της απόφραξης όπως εκφράστηκε με την  $FEV_1$  % αναμενόμενης και του % αριθμού των πολυμορφοπύρηνων στη προκλητή απόχρεμψη (Πίνακας 12).

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η συγκέντρωση του  $H_2O_2$  στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα ασθενών με φλεγμονώδεις παθήσεις των αεραγωγών αυξάνεται σημαντικά συγκρινόμενη με τις αντίστοιχες ομάδες ελέγχου. Στους ασθενείς με ΧΑΠ και βρογχεκτασίες εξαρτάται από την πολυμορφοπυρηνική φλεγμονή, ενώ στους ασθενείς με βρογχικό άσθμα εξαρτάται κυρίως από την ηωσινοφιλική φλεγμονή της νόσου, αν και στις πιο βαριές μορφές φαίνεται να συμμετέχουν στην παραγωγή του και τα ουδετερόφιλα. Η αύξηση αυτή για μεν το βρογχικό άσθμα φαίνεται να επηρεάζεται από την κλινική βαρύτητα και την λήψη ΕΣ, ενώ για τις άλλες δύο παθήσεις είναι ανεξάρτητη της λήψης ΕΣ και εξαρτάται μόνο από την βαρύτητα της νόσου. Τα παραπάνω ευρήματα τεκμηριώνουν την παρουσία αυξημένου οξειδωτικού stress στους αεραγωγούς ασθενών με φλεγμονώδεις παθήσεις των πνευμόνων αλλά συγχρόνως καταδεικνύουν ότι ο ρόλος του στην αξιολόγηση της φλεγμονής και της κλινικής βαρύτητας της νόσου εξαρτάται από την παθοφυσιολογία της υποκείμενης πάθησης. Φαίνεται δε, ότι η σημαντικότητα του ρόλου αυτού να είναι μεγαλύτερη στις βρογχεκτασίες ενώ στο βρογχικό άσθμα και την ΧΑΠ να εξαρτάται από την σταδιοποίηση της νόσου ανάλογα με τον βαθμό βαρύτητας.

Το οξειδωτικό stress προέρχεται από μια διαδικασία που περιλαμβάνει την παραγωγή οξειδωτικών μορίων με ταυτόχρονη όμως δραστηριότητα αντιοξειδωτικών μηχανισμών. Φυσιολογικά η παραγωγή οξειδωτικών μορίων στους αεραγωγούς εξουδετερώνεται από τους διάφορους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς του ανθρώπινου αναπνευστικού συστήματος. Οι κύριες ενδοκυττάρια αντιοξειδωτικές ουσίες είναι η καταλάση, η υπεροξειδική δισμουτάση και η γλουταθιόνη. Η τελευταία προέρχεται από το εξαρτώμενο από το σελήνιο ένζυμο της περοξειδάσης της γλουταθιόνης. Η αυξημένη συγκέντρωση  $H_2O_2$  στο συμπύκνωμα εκπνεόμενου αέρα ασθενών με φλεγμονώδεις παθήσεις δηλώνει αυξημένη παραγωγή οξειδωτικών μορίων, ή μειωμένη ικανότητα εξουδετέρωσης τους από τις αντιοξειδωτικές ουσίες. Αυτό φαίνεται να επιβεβαιώνεται από διάφορες μελέτες που ασχολούνται με την μειωμένη αντιοξειδωτική δραστηριότητα. Όσο αναφορά το βρογχικό άσθμα η δραστηριότητα της περοξειδάσης της γλουταθιόνης μειώνεται σε αιμοπετάλια ασθματικών ασθενών, ενώ η μείωση αυτή φαίνεται να είναι ανάλογη των επιπέδων του σεληνίου στον ορό<sup>32</sup>. Ανάλογα ευρήματα που αφορούν όμως

βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα και επιθηλιακά κύτταρα έχουν βρεθεί και για την υπεροξειδική δισμουτάση<sup>34</sup>. Είναι όμως ενδιαφέρον να τονισθεί ότι τα παραπάνω ευρήματα δεν έχουν τεκμηριωθεί σε ασθενείς με ήπιο άσθμα και ειδικότερα σε αυτούς που ελέγχονται με θεραπεία ΕΣ<sup>20</sup>. Εκεί λοιπόν φαίνεται ότι μέσω του ελέγχου της φλεγμονής και συνεπώς της μείωσης της παραγωγής οξειδωτικών μορίων υπάρχει μια υπεροχή των αντιοξειδωτικών μηχανισμών έναντι του οξειδωτικού stress. Αν λοιπόν αναλύσουμε τα αποτελέσματα μας θα δούμε ότι το οξειδωτικό stress δεν αυξάνεται στους ασθενείς με ήπιο διαλείπων άσθμα, ενώ περιορίζεται σημαντικά από την χρήση ΕΣ στις άλλες δύο μορφές κλινικής ταξινόμησης της νόσου. Αυτές οι επισημάνσεις σε συνδυασμό με τα βιβλιογραφικά δεδομένα που αναφέρθηκαν για την δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών μηχανισμών μας οδηγούν στην διατύπωση θεωρίας που υποστηρίζει ότι στις ήπιες μορφές της νόσου οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί εξουδετερώνουν την δράση των οξειδωτικών μορίων, ενώ όσο η βαρύτητα της νόσου αυξάνεται, ενώ παράλληλα επιτείνεται η φλεγμονή οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί δεν είναι επαρκείς για να ελέγξουν την αυξημένη παραγωγή τους. Η χορήγηση δε των ΕΣ φαίνεται να μειώνει την ανεπάρκεια αυτή έμμεσα, μέσω του ελέγχου που εξασκεί στην φλεγμονώδη διαδικασία.

Στους ασθενείς με ΧΑΠ η αύξηση των οξειδωτικών μορίων προέρχεται είτε από τον καπνό του τσιγάρου ή και από την ενεργοποίηση φλεγμονωδών κυττάρων. Φαίνεται δε από τα αποτελέσματα της μελέτης ότι ο βαθμός αύξησής τους εξαρτάται από την βαρύτητα της νόσου. Αυτό έμμεσα είχε τονισθεί και σε προηγούμενες μελέτες όπου φαινόταν ότι το οξειδωτικό stress αυξανόταν σημαντικά σε παροξύνσεις της νόσου ή και σε ασθενείς με ασταθή κλινική πορεία<sup>43,48</sup>. Δεν είχε όμως αξιολογηθεί σε ασθενείς με σταδιοποίηση της νόσου σύμφωνα με διεθνείς οδηγίες. Η κινητοποίηση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών φαίνεται να μην είναι όμως ανάλογη αυτής του άσθματος. Αυτό συμβαίνει λόγω της παρουσίας του παράγοντος κάπνισμα. Τα επίπεδα των αντιοξειδωτικών ουσιών φαίνεται να ποικίλουν με τις βιταμίνες E και C να μειώνονται<sup>42</sup> ενώ η γλουταθιόνη να αυξάνεται<sup>39</sup>. Φαίνεται δε ότι η ανεπάρκεια των αντιοξειδωτικών μηχανισμών να εξαρτάται μεν από την ποσότητα του καπνίσματος στο χρόνο<sup>42</sup>, αλλά συγχρόνως όταν εμφανίζεται σε ασθενείς με εγκατεστημένη ΧΑΠ να είναι ανεξάρτητη της καπνιστικής συνήθειας και να

σχετίζεται με τον βαθμό της μείωσης της αναπνευστικής λειτουργίας<sup>54,55</sup>. Είναι επίσης δεδομένο ότι η αντιοξειδωτική επάρκεια σχετίζεται αρνητικά με τον αριθμό των ουδετερόφιλων σε ασθενείς με ΧΑΠ<sup>53</sup>. Αν λοιπόν θεωρήσουμε όπως δείξαμε στην μελέτη μας ότι όσο αυξάνεται το ποσοστό ουδετερόφιλων τόσο απελευθερώνονται οξειδωτικά μόρια με ανάλογη μείωση ή και ανεπάρκεια του αντιοξειδωτικού μηχανισμού, τότε οδηγούμαστε στην λογική σκέψη ότι η πρόοδος της νόσου μέσω της επιδείνωσης της φλεγμονής και με συνεργικό παράγοντα αλλά όχι επικρατούντα το κάπνισμα εξουδετερώνει τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς. Αν και δεν υπάρχουν σαφείς βιβλιογραφικές παραπομπές φαίνεται ότι στις βρογχεκτασίες επικρατεί η ίδια θεωρία μόνο όμως όσο αναφορά τα ουδετερόφιλα μια και εκεί δεν συμμετέχει στην πλειονότητα των ασθενών η καπνιστική συνήθεια.

Η προκλητή απόχρεμψη αποτελεί μία σημαντική, μη επεμβατική διαδικασία για την αξιολόγηση της φλεγμονής. Η αξία της στην μέτρηση φλεγμονωδών κυττάρων και μεσολαβητών έχει τονισθεί σε διάφορες μελέτες<sup>106,115,116</sup>. Πολλά δομικά και φλεγμονώδη κύτταρα ενεργοποιούνται στους αεραγωγούς ασθενών με φλεγμονώδεις παθήσεις με αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγή οξειδωτικών μορίων<sup>1</sup>. Παρά την παραπάνω θεωρία ο ρόλος των οξειδωτικών μορίων στην παθοφυσιολογία της κάθε νόσου παραμένει αδιευκρίνιστος, λόγω του ότι δεν έχει καθορισθεί επακριβώς ποια κύτταρα συμμετέχουν στην παραγωγή οξειδωτικών μορίων και κατά πόσο διαφέρουν σε κάθε κλινικό στάδιο της νόσου. Είναι γνωστό ότι η ηωσινοφιλική φλεγμονή αποτελεί χαρακτηριστικό στοιχείο του ήπιου άσθματος ενώ η παρουσία ουδετερόφιλων μπορεί να χαρακτηρίζει τις σοβαρότερες μορφές της νόσου<sup>112</sup>. Η παρουσία δε ουδετερόφιλων στη προκλητή απόχρεμψη φαίνεται να χαρακτηρίζει τους ασθματικούς ασθενείς που παραμένουν συμπτωματικοί παρά την χρήση ΕΣ. Τα παραπάνω ευρήματα τεκμηριώθηκαν και στην μελέτη μας. Σήμερα πιστεύουμε ότι η παρουσία ηωσινοφίλων στα προκλητά πτύελα είναι ο πιο χρήσιμος δείκτης στην αξιολόγηση της φλεγμονής της νόσου μια και εκφράζει, ευρήματα από βρογχικές βιοψίες, μειωμένη αναπνευστική λειτουργία και κλινική βαρύτητα νόσου<sup>117,118</sup>. Τα ευρήματα της μελέτης μας επιβεβαίωσαν εν μέρει τις παραπάνω παρατηρήσεις τονίζοντας παράλληλα την προέλευση του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> κυρίως από τα ηωσινόφιλα, με συμμετοχή των ουδετερόφιλων στις βαρύτερες μορφές της νόσου. Αν λοιπόν προσπαθήσει κανείς να συσχετίσει

τα ευρήματα της μελέτης σε σχέση με τις μέχρι τώρα επικρατούσες απόψεις θα οδηγηθεί στο συμπέρασμα ότι τα ηωσινόφιλα μετέχουν ως κύριο κύτταρο στην παραγωγή  $H_2O_2$ , ενώ τα ουδετερόφιλα έχουν συμμετοχή σαν επικουρικό κύτταρο στις βαρύτερες μορφές της νόσου. Η τελευταία παρατήρηση επιβεβαιώνεται και από το εύρημα της στατιστικά σημαντικής συσχέτισης της παράλληλης εξάρτησης της συγκέντρωσης  $H_2O_2$  από ηωσινόφιλα και ουδετερόφιλα στο μέτριο άσθμα. Επιπρόσθετα με τις παραπάνω θέσεις τα αποτελέσματα της μελέτης συμφωνούν με προηγούμενες επισημάνσεις που θεωρούν τα ηωσινόφιλα ως τα πρωταρχικά κύτταρα που συμμετέχουν στην παραγωγή  $H_2O_2$ <sup>119,120</sup> σε ασθματικούς, ενώ τα ουδετερόφιλα θεωρούνται σε γενική έννοια ως τα κύτταρα που απελευθερώνουν μεγάλες ποσότητες οξειδωτικών μορίων<sup>20</sup>. Ανάλογα ευρήματα έχουν βρεθεί σε ανάλογη μελέτη με παραπλήσιο σχεδιασμό που όμως διαφέρει σημαντικά στην μεθοδολογία<sup>23</sup>. Οι κύριες διαφορές αφορούσαν το χωρισμό των ασθενών σε σχέση με την κλινική βαρύτητα της νόσου, μια και δεν χρησιμοποιήθηκαν διεθνείς οδηγίες για την ταξινόμηση. Επιπρόσθετα δεν χρησιμοποιήθηκαν στην κυτταρική ανάλυση όλα τα κύτταρα παρά μόνο τα ηωσινόφιλα. Στις βρογχεκτασίες η αξιολόγηση της φλεγμονής των αεραγωγών μέσω της διαδικασίας της βρογχοσκόπησης έχει επικεντρωθεί στην παρουσία των πολυμορφοπυρήνων ως των κυττάρων εκείνων που συμμετέχουν πρώτιστα στην διαδικασία της φλεγμονής ενώ συγχρόνως επηρεάζουν την ισορροπία οξειδωτικών /αντιοξειδωτικών μηχανισμών<sup>121</sup>. Ανάλογα ήταν και τα δικά μας ευρήματα χρησιμοποιώντας μια μη επεμβατική μέθοδο όπως είναι η προκλητή απόχρεμψη. Παρατηρήσαμε λοιπόν ότι τα ουδετερόφιλα είναι τα κύρια κύτταρα που συμμετέχουν στην διαδικασία της φλεγμονής στις βρογχεκτασίες ενώ η ισχυρή τους συσχέτιση τους με την συγκέντρωση του  $H_2O_2$  με ταυτόχρονη απουσία συσχέτισης με τα υπόλοιπα φλεγμονώδη κύτταρα οδηγούν στην διατύπωση της θεωρίας ότι τα πολυμορφοπύρηνα αποτελούν την κύρια πηγή παραγωγής  $H_2O_2$  σε ασθενείς με βρογχεκτασίες. Αυτό άλλωστε υποστηρίζεται από μελέτη που δείχνει ότι η παρουσία ουδετερόφιλων στους αεραγωγούς ασθενών με βρογχεκτασίες συνδυάζεται με βλάβη των αεραγωγών με ενδιάμεσους μεσολαβητές τα οξειδωτικά μόρια και τις πρωτεάσες<sup>51</sup>. Σε ασθενείς με βρογχεκτασίες είναι γνωστή η άμεση σχέση της έκτασης της νόσου και του βαθμού μείωσης της αναπνευστικής



λειτουργίας<sup>122</sup>. Επιπρόσθετα έχει δείχθει ότι ο αριθμός των πολυμορφοπυρήνων στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα σχετίζεται με τον βαθμό μείωσης της αναπνευστικής λειτουργίας<sup>121</sup>. Αυτές οι βιβλιογραφικά κατοχυρωμένες παρατηρήσεις οδηγούν στην διατύπωση θεωρίας που υποστηρίζει ότι η πολυμορφοπυρηνική φλεγμονή και η έκταση της νόσου σχετίζονται άμεσα με τον βαθμό μείωσης της αναπνευστικής λειτουργίας σε ασθενείς με βρογχεκτασίες. Στην παρούσα μελέτη εκτός από την τεκμηρίωση της παραπάνω θεωρίας δείξαμε ότι η πολυμορφοπυρηνική φλεγμονή σχετίζεται με την κλινική βαρύτητα καθώς και την έκταση της νόσου. Η τελευταία παρατήρηση είναι η πρώτη βιβλιογραφικά κατοχυρωμένη που αποδεικνύει ότι οι κλινικές και λειτουργικές παράμετροι βαρύτητας στις βρογχεκτασίες συμβαδίζουν με την πολυμορφοπυρηνική φλεγμονή. Εφ' όσον λοιπόν το  $H_2O_2$  σχετίζεται σημαντικά με τις παραπάνω παραμέτρους τότε τα επίπεδά του εκφράζουν απόλυτα τη φλεγμονή και κλινική βαρύτητα της νόσου των βρογχεκτασιών. Μια άλλη όμως πηγή οξειδωτικών μορίων που αφορά ασθενείς κυρίως με βρογχεκτασίες, χωρίς όμως να αποκλείει και αυτούς με ΧΑΠ φαίνεται να είναι ο χρόνιος αποικισμός με βακτήρια. Τα βακτήρια μέσω της προσέλκυσης και ενεργοποίησης κυττάρων όπως είναι τα φαγοκύτταρα παράγουν οξειδωτικά μόρια στους αεραγωγούς<sup>123</sup>. Αυτό επιβεβαιώθηκε και στην μελέτη μας που έδειξε ότι ασθενείς με χρόνια αποικισμό με ΨΑ απελευθερώνουν μεγαλύτερη ποσότητα  $H_2O_2$ . Είναι γνωστό ότι ο χρόνιος αποικισμός με ψευδομονάδα σε ασθενείς με βρογχεκτασίες συνδυάζεται με μεγαλύτερη έκταση της νόσου, βαρύτερη κλινική εικόνα και μεγαλύτερο επηρεασμό της αναπνευστικής λειτουργίας<sup>124</sup>. Παραμένει όμως ως ερωτηματικό αν η ψευδομονάδα είναι το αίτιο ή το αποτέλεσμα των παραπάνω. Η τεκμηρίωση όμως των ευρημάτων μας βασίζεται κυρίως στην θεωρία που λέει ότι τα βακτηριδιακά προϊόντα που απελευθερώνονται από την ψευδομονάδα καταστέλλουν την κινητικότητα των κροσσών οδηγώντας σε μόνιμη φλεγμονώδη διεργασία μέσω μιας οδού που περιλαμβάνει την παρουσία ουδετερόφιλων και οξειδωτικών μορίων που δεν καταστέλλονται από τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς<sup>44</sup>. Είναι γνωστή η θεωρία ότι η φλεγμονή των αεραγωγών παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της ΧΑΠ. Μελέτες σε προκλητά πτύελα και σε BALF υποστηρίζουν ότι η φλεγμονή των αεραγωγών στην ΧΑΠ σχετίζεται κυρίως με την παρουσία

ουδετερόφιλων<sup>125,126</sup>. Τα παραπάνω ευρήματα επιβεβαιώθηκαν και από την δική μας μελέτη η οποία έδειξε ότι τα ουδετερόφιλα αποτελούν την κύρια κυτταρική πηγή του  $H_2O_2$ . Άλλωστε οι περισσότερες αναφορές για την παραγωγή οξειδωτικών μορίων σε ασθενείς με ΧΑΠ σχετίζονται με την παρουσία ουδετερόφιλων. Δεν μπορεί όμως να αποκλείσει κανείς τον πιθανό ρόλο των φαγοκυττάρων μέσω του χρόνιου βακτηριδιακού αποικισμού, βασιζόμενος κυρίως στην θεωρία που αναφέρθηκε ήδη για τις βρογχεκτασίες. Η παρουσία αυξημένης συγκέντρωσης  $H_2O_2$  στην ομάδα ελέγχου της ΧΑΠ σε σχέση με τις ομάδες ελέγχου των ασθενών με άσθμα και βρογχεκτασίες εξηγείται από δύο λόγους. Ο ένας αφορά την καπνιστική συνήθεια και ο άλλος αφορά τον σχετικά αυξημένο αριθμό ουδετερόφιλων σε σύγκριση με τις άλλες δύο ομάδες. Άλλωστε η ομάδα αυτή έρχεται να επιβεβαιώσει την θεωρία ότι η καπνιστική συνήθεια συνεισφέρει στην παραγωγή οξειδωτικών μορίων χωρίς να είναι όμως η κύρια πηγή παραγωγή τους. Αυτό επιβεβαιώνεται και από την μελέτη αυτή όπου 4 ομάδες με την ίδια περίπου καπνιστική συνήθεια παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές στην παραγωγή  $H_2O_2$  που φαίνεται να σχετίζονται με την αριθμό των ουδετερόφιλων. Άλλωστε είναι γνωστό ότι η βαρύτητα της ΧΑΠ όπως εκφράζεται με την σταδιοποίηση της εξαρτάται άμεσα από την υποκείμενη φλεγμονή μέσω κυρίως της αρνητικής συσχέτισης του βαθμού απόφραξης των αεραγωγών και του ολικού αριθμού των ουδετερόφιλων στα υλικά αξιολόγησης<sup>127</sup>. Το ότι δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση στην ήπια ΧΑΠ εξηγείται ίσως από την θεωρία ότι η φλεγμονή μπορεί να προηγείται της απόφραξης σε ασθενείς με ήπια νόσο<sup>128</sup>.

Η παραπάνω διασταυρούμενη μελέτη δεν μπορεί να αποδείξει μια τεκμηριωμένη σχέση μεταξύ ΕΣ και συγκέντρωσης  $H_2O_2$ . Διπλές τυφλές μελέτες με χρησιμοποίηση εικονικού φαρμάκου χρειάζονται για τεκμηρίωση της παραπάνω σχέσης. Μια τέτοια μελέτη σε ασθενείς με βρογχικό άσθμα έχει δείξει ότι η συγκέντρωση του  $H_2O_2$  σε διάστημα τεσσάρων εβδομάδων θεραπείας με ΕΣ μειώθηκε σημαντικά σε σχέση με την θεραπεία με το εικονικό φάρμακο<sup>101</sup>. Η δική μας μελέτη καθώς και ανάλογη στο παρελθόν<sup>23</sup> έδειξαν ότι η συγκέντρωση του  $H_2O_2$  μειώνεται με την χρησιμοποίηση ΕΣ στο άσθμα. Υπάρχει όμως μελέτη που υποστηρίζει ότι τα στεροειδή δεν επηρεάζουν την απελευθέρωση του  $H_2O_2$  από τα ηωσινόφιλα<sup>129</sup>. Η

διαφορετική αυτή όμως άποψη είναι ουσιαστικά αντίθετη με την θεωρία ότι η φλεγμονή του άσθματος εκφράζεται κυρίως από τα ηωσινόφιλα τα οποία ελέγχονται από τα ΕΣ<sup>112</sup>. Οι διαφορετικές τιμές του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> μεταξύ αυτών που λαμβάνουν ΕΣ και αυτών που δεν λαμβάνουν ΕΣ ουσιαστικά δεν εκφράζουν διαφορές στο οξειδωτικό stress αλλά διαφορές στην υποκείμενη ηωσινοφιλική φλεγμονή. Αυτό ουσιαστικά επιβεβαιώνεται από την ισχυρή συσχέτιση των ηωσινοφίλων και της ECP με την συγκέντρωση H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> στους μη λαμβάνοντες ΕΣ, καθώς και από την στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ συγκέντρωσης H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και ουδετεροφίλων της προκλητής απόχρεμψης ανεξάρτητα από την λήψη ΕΣ. Άλλωστε είναι γνωστή η ανικανότητα των στεροειδών να αναστείλουν την παραγωγή H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> από τα ουδετερόφιλα<sup>130</sup>. Όλα τα παραπάνω ουσιαστικά οδηγούν στην θεωρία ότι η δράση των στεροειδών στην παραγωγή H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> στους ασθματικούς ασθενείς εξαρτάται από τον κατασταλτικό τους ρόλο στην υποκείμενη ηωσινοφιλική φλεγμονή. Οι ασθενείς με βρογχεκτασίες και ΧΑΠ που ελάμβαναν εισπνεόμενα στεροειδή δεν παρουσίαζαν μειωμένη συγκέντρωση H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> συγκρινόμενοι με αυτούς που δεν ελάμβαναν. Ανάλογα ευρήματα βρέθηκαν και σε βρογχεκτασικούς ασθενείς που ελάμβαναν χρόνια αντιβιοτική αγωγή από το στόμα. Τα παραπάνω ευρήματα εξηγούνται εν μέρει από την αδυναμία των στεροειδών να καταστείλουν την παραγωγή H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> από τα ουδετερόφιλα<sup>130</sup>, καθώς και από την ικανότητα των αντιβιοτικών να ελέγχουν την φλεγμονή σε παροξύνσεις αλλά όχι σε χρονίζουσες μορφές<sup>131</sup>. Άλλωστε σε ασθενείς με ΧΑΠ χωρίς παρόξυνση είναι γνωστή η ανεπάρκεια των ΕΣ να ελέγξουν την φλεγμονή<sup>132,133</sup>. Μια θετική επίδραση ΕΣ στις βρογχεκτασίες βασίζεται κυρίως σε υποκειμενικές παραμέτρους και όχι στον ρόλο τους στη φλεγμονώδη διεργασία<sup>110</sup>. Η αιτία των υψηλότερων τιμών H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> σε αυτούς που ελάμβαναν χρόνια αντιβιοτική αγωγή εξηγείται και από το γεγονός ότι οι περισσότεροι από αυτούς είχαν χρόνια αποικισμό με ψευδομονάδα, παράγοντα που οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Συμπερασματικά η παρούσα μελέτη δείχνει ότι η συγκέντρωση του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα ασθενών με φλεγμονώδεις παθήσεις των αεραγωγών είναι αυξημένη. Η αύξηση αυτή φαίνεται να είναι περισσότερη στις ασθένειες εκείνες που έχουν σαν υποκείμενη φλεγμονώδη διεργασία εξαρτώμενη από τα ουδετερόφιλα. Ο ρόλος του στην αξιολόγηση της

φλεγμονής και της κλινικής βαρύτητας της νόσου φαίνεται να είναι περιορισμένος σε ασθενείς με σταδιοποιημένη βαρύτητα ενώ αντίθετα είναι σημαντικός στις βρογχεκτασίες. Παραμένει όμως ως μεγάλο ερωτηματικό αλλά και ως πρόκληση για μελλοντικές μελέτες αν η χορήγηση αντιοξειδωτικών ουσιών μέσω της μείωσης των οξειδωτικών μορίων θα προκαλεί την ανάλογη κλινική και λειτουργική βελτίωση της νόσου.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της μελέτης αυτής ήταν η μέτρηση των επιπέδων του υπεροξειδίου του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα ασθενών με φλεγμονώδεις παθήσεις των αεραγωγών, ο καθορισμός των κυττάρων που συμμετέχουν στην παραγωγή του για κάθε νόσο ξεχωριστά, καθώς και η πιθανή συσχέτιση των επιπέδων του με παραμέτρους που εκφράζουν φλεγμονή και βαρύτητα σε κάθε νόσο. Μελετήθηκαν τριάντα ασθενείς με βρογχεκτασίες, πενήντα ασθενείς με σταθερό άσθμα βαρύτητας από ήπιο έως μέτριο και τριάντα ασθενείς με σταθερή ΧΑΠ βαρύτητας από ήπια έως σοβαρή. Η μέση συγκέντρωση του  $H_2O_2$  ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερη από αυτή των ομάδων ελέγχου για κάθε νόσο. Τα ηωσινόφιλα ήταν τα επικρατούντα κύτταρα που συμμετείχαν στην παραγωγή  $H_2O_2$  στο άσθμα, ενώ τα ουδετερόφιλα ήταν υπεύθυνα για την υψηλή συγκέντρωση του  $H_2O_2$  στις βρογχεκτασίες και στην ΧΑΠ. Ο ρόλος του  $H_2O_2$  στην αξιολόγηση της υποκείμενης φλεγμονής και βαρύτητας στο άσθμα ήταν περιορισμένος μια και εξαρτώνταν από την λήψη εισπνεομένων στεροειδών (ΕΣ) και την ταξινόμηση αυτής σε στάδια. Στους ασθενείς με βρογχεκτασίες τα επίπεδα του  $H_2O_2$  εξέφραζαν την υποκείμενη φλεγμονή της νόσου, την έκταση και την βαρύτητα αυτής, μη επηρεαζόμενα από την λήψη ΕΣ και αντιβιοτικών σε μακρό χρόνο, αλλά σημαντικά επηρεαζόμενα από τον χρόνιο αποικισμό με Ψευδομονάδα *Aeruginosa*. Τέλος στους ασθενείς με ΧΑΠ ο ρόλος του  $H_2O_2$  στην αξιολόγηση της υποκείμενης φλεγμονής και βαρύτητας επηρεαζόταν από την ταξινόμηση αυτής σε στάδια αλλά όχι από την λήψη ΕΣ.

## SUMMARY

Hydrogen peroxide in expired breath condensate of patients with inflammatory airway diseases.

Stelios Loukides MD, Pneumonology Dept Athens Army General Hospital.

The aim of our study was to determine the concentration of exhaled hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) in patients with inflammatory airway diseases, to investigate which cells are the main source of hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) production in each disease and finally to evaluate the association between  $H_2O_2$  levels, airway inflammation and disease severity. Thirty patients with bronchiectasis, fifty stable asthmatics with disease severity ranging from mild to moderate and finally thirty patients with stable COPD with disease severity ranging from mild to severe were studied. Mean concentration of  $H_2O_2$  was significantly elevated in patients with inflammatory airway diseases compared to the values of control subjects for each disease. Eosinophils were the predominate cells which generate  $H_2O_2$  in asthma, while neutrophils were responsible for the highest levels which were observed in bronchiectasis and COPD. The role of  $H_2O_2$  concentration in predicting the severity of the disease as well as the inflammatory process, is limited in asthma and depends on the use of inhaled steroids (ICS) and the classification severity. In patients with bronchiectasis increased levels of exhaled  $H_2O_2$  reflected the severity of the disease as well as the inflammatory process, were not decreased either by the use of ICS or the long term oral antibiotic treatment but were significantly affected by chronic colonization with *Pseudomonas Aeruginosa*. In patients with COPD the role of  $H_2O_2$  concentration in predicting the severity of the disease as well

as the inflammatory process depends on the classification severity and was not affected by the use of inhaled steroids.

**BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:**

1. Barnes PJ. Reactive oxygen species and airway inflammation. *Free Rad Biol Med* 1990; 9:235-43.
2. Barnes PJ. Reactive oxygen species in asthma. *Eur Respir Rev* 2000;73:240-43.
3. Freeman B. Free radical chemistry of nitric oxide. Looking at the dark side. Review. *Chest* 1994; 105: Suppl. 79S-84S.
4. Morrow JD, Roberts LJ. The isoprostanes. Current knowledge and direction for future research. *Biochem Pharmacol* 1996; 271:1432-37.
5. Choi AM, Alam J. Heme oxygenase-1: function regulation and implication of a novel stress-inducible protein in oxidant induced lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996; 15:9-19.
6. Cantin AM, Fells GA, Hubbard RC, Crystal RG. Antioxidant macromolecules in the epithelial lining fluid of the normal human respiratory tract. *J Clin Invest* 1990; 86:962-71.
7. Lim HB, Ichinose T, Miyabara Y et al. Involvement of superoxide and nitric oxide on airway inflammation and hyperresponsiveness induced by diesel exhaust particles. *Free Rad Biol Med* 1998; 25:635-44.
8. Rhoden KJ, Barnes PJ. Effect of oxygen derived free radicals on responses of guinea –pig tracheal smooth muscle in vitro. *Br J Pharmacol* 1989;98:325-30.
9. Yukawa T, Read RC, Krogel C et al. The effects of activated eosinophils and neutrophils on guinea pig airway epithelium in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1990; 2:314-54.
10. De Boer J, Pouw FM, Zaagsma J, Meurs U. Effects of endogenous superoxide anion and nitric oxide on cholinergic constriction of normal and hyperreactive guinea pig airways. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158:1784-89.
11. Hulsmann AR, Raatgeep HR, den Hollander JC et al.. Oxidative epithelial damage produces hyperresponsiveness of human peripheral airways. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149:519-25.
12. Kawikova I, Barnes PJ, Takahasi T, Tadjkarimi S, Yacoub MH, Belvisi MG. 8-epi-prostaglandin Fa, a novel non-cyclooxygenase derived prostaglandin, is



a potent constrictor of guinea –pig and human airways. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153:590-96.

13. Lei Y-H, Barnes PJ, Rogers DF. Involvement of hydroxyl radicals in neurogenic airway plasma exudation and bronchoconstriction in guinea pigs in vivo *Br J Pharmacol* 1996; 117:449-54.

14. Adler KB, Holden Stauffer WJ, Repine JE. Oxygen metabolites stimulate release of high-molecular weight glycoconjugates by cell and organ cultures of rodent respiratory epithelium via an arachidonic acid-dependent mechanism. *J Clin Invest* 1990;85:75-85.

15. Miura M, Yamauchi H, Ichinose M et al. Impairment of neural nitric oxide-mediated relaxation after antigen exposure in guinea pigs airways in vitro. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156:217-22.

16. Ohrui T, Sekizawa K, Yamauchi H et al. Chemical oxidant potentiates electrically and acetylcholine-induced contraction in rat trachea: possible involvement of cholinesterase inhibition. *J Pharmacol exp Ther* 1991; 259:371-76.

17. Adcock IM, Brown CR, Kwon OJ, Barnes PJ. Oxidative stress induces NF- $\kappa$ B DNA binding and inducible NOS mRNA in human epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 199:1518-24.

18. Jarjour NN, Calhoun WJ. Enhanced production of oxygen radicals in asthma. *J Lab Clin Med* 1994; 123:131-36.

19. Calhoun WJ, Bush RK. Enhanced reactive oxygen species metabolism of airspace cells and airway inflammation follow antigen challenge in human asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1990;86:306-13.

20. Vachier I, Channez P, Le Doucen C et al. Enhancement of reactive oxygen species formation in stable and unstable asthmatic patients. *Eur Respir J* 1994; 7:1585-92.

21. Raible DG, Mohanty JG, Jaffe JS et al. Hydrogen peroxide release from human eosinophils on fibronectin: scopoletin enhances eosinophil activation. *Free Radic Biol Med* 2000; 28:1652-60.

22. Evans DJ, Lindsay MA, O' Connor BJ, Barnes PJ. Priming of circulating human eosinophils following exposure to allergen challenge. *Eur Respir J* 1996;9: 703-08.

23. Horvath I, Donnely LE, Kiss A, Kharitonov SA, Lim S, Fan Chung K, Barnes PJ. Combined use of exhaled hydrogen peroxide and nitric oxide in monitoring asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med* 1998; 158: 1042-1046.
24. Jöbbsis Q, Raatgeep HC, Hermans PW, de Jongste JC. Hydrogen peroxide in exhaled air is increased in stable asthmatic children. *Eur Respir J* 1997; 10:519-521.
25. Dohlman AW, Black HR, Royal JA. Expired breath condensate is a marker of acute airway inflammation in pediatric patients with asthma. *Am Rev Respir Dis* 1993; 148:955-960.
26. Horvath I, Donnely LE, Kiss A, Paredi P, Kharitonov SA, Barnes PJ. Elevated levels of exhaled carbon monoxide are associated with an increased expression of heme-oxygenase-1 in airway macrophages in asthma: a new marker of oxidative stress. *Thorax* 1998; 53: 668-72.
27. Paredi P, Leckie M, Horvath I, Allegra L, Kharitonov SA, Barnes PJ. Changes in exhaled carbon monoxide and nitric oxide levels following allergen challenge in patients with asthma. *Eur Respir J* 1999;13:48-53.
28. Antzak A, Nowak D, Shariati B, Krol M, Piasecka G, Kurmanowska Z. Increased hydrogen peroxide and thiobarbituric acid-reactive products in expired breath condensate of asthmatic patients. *Eur Respir J* 1997;10:1235-1241.
29. Paredi P, Kharitonov SA, Barnes PJ. Elevation of exhaled ethane concentration in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:1450-54.
30. Olopade CO, Zakkar M, Swedler WI, Rubinstein I. Exhaled pentane levels in acute asthma. *Chest* 1997; 111:862-65.
31. Montuschi P, Corradi M, Ciabattoni G, Nightingale J, Kharitonov SA, Barnes PJ. 8-isoprostane, a marker of oxidative stress, in exhaled condensate of asthma patients. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160:216-220.
32. Misso NL, Powers KA, Gillon RL et al. Reduced platelet glutathione peroxidase and selenium concentration in atopic asthmatic patients. *Clin Exp Allergy* 1996; 26: 838-47.
33. Smith LG, Houston M, Anderson J. Increased levels of glutathione in bronchoalveolar lavage fluid from patients with asthma. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147:1461-64.

34. Smith CAD, Harrison DJ. Association between polymorphism in gene for microsomal epoxide hydrolase and susceptibility to emphysema. *Lancet* 1997; 350; 630-33.
35. Bielory L, Gandhi L. Asthma and vitamin C. *Ann Allergy* 1994;73:89-96.
36. Troisi RJ, Willet WC, Weiss ST, Trichopoulos D, Rosner B, Speizer FA. A prospective study of diet and adult-onset asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151:1401-08.
37. Hasselmark L, Malmgren R, Zetterstrom O, Unge G. Selenium supplementation in intrinsic asthma. *Allergy* 1993; 48:30-36.
38. Church T, Pryor WA. Free radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. *Environ Health Perspect* 1985; 64:11-26.
39. Morrison D, Rahman I, Lannan S, Macnee W. Epithelial permeability, inflammation and oxidant stress in the air spaces of smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159:473-79.
40. Mateos F, Brock JH, Perez JL. Iron metabolism in the lower respiratory tract. *Thorax* 1998; 53:594-600.
41. MacNee W, Rahman I. Oxidants and antioxidants as therapeutic targets in COPD. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160:S58-S65.
42. Rahman I, MacNee W. Role of oxidants and antioxidants in smoking induced lung diseases. *Free Radic Biol Med* 1996; 21:669-81.
43. Postma DS, Renkema TEJ, Noordhoek A, Faber H, Sluiter HJ, Kauffman H. Association between non-specific bronchial hyperreactivity and superoxide anion production by polymorphonuclear leucocytes in chronic airflow obstruction. *Am Rev Respir Dis* 1998; 137:57-61.
44. Dunn MM, Dunne M, Kamp DW. Polymorphonuclear leukocytes and *Pseudomonas aeruginosa* induced damage to a human pulmonary epithelial cell line. *J Infect Dis* 1990;162:172-77.
45. Rahman I, MacNee W. Role of transcription factors in inflammatory lung diseases. *Thorax* 1998; 53:601-12.
46. Pinamonti S Muzzuli M Chicca MC, Papi A, Ravenna F, Fabbri LM, Ciaccia A. Xanthine oxidase activity in bronchoalveolar lavage fluid from patients with COPD. *Free Radic Biol Med* 1996; 21:147-55.
47. PraticoD, Basili S, Vieri M, Cordova C, Violi F, Fitzgerald GA. Chronic obstructive pulmonary disease associated with an increase in urinary levels

of isoprostane F<sub>2a</sub>-III, an index of oxidative stress. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 158:1709-14.

48. Dekhuijzen PNR, Aben KKH, Dekker I, Aarts LPHJ, Wielders PLML., van Heerwarden CLA, Bast A. Increased exhalation of hydrogen peroxide in patients with stable and unstable chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1996 Sep; 154:813-816.

49. Nowak D, Kasielski M, Pietras T, Bialasiewicz P, Antzac A. Cigarette smoking does not increase hydrogen peroxide levels in expired breath condensate of patients with stable COPD. *Monaldi Arch Chest Dis* 1998; 53(3):268-273.

50. Montuschi P, Collins JV, Ciabattini G, Lazzeri N, Corradi M, Kharitonov SA, Barnes PJ. Exhaled 8-isoprostane as an *in vivo* biomarker of lung oxidative stress in patients with COPD and healthy smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162:1175-1177.

51. Repine JE, Bast AALT, Lankhorst IDA and the oxidative stress study group. Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156:341-57.

52. Duthie GG, Arthur JR, James WP. Effects of smoking and vitamin E on blood antioxidant status. *Am J Clin Nutr* 53: 1061-63.

53. Rahman I, Morrison D, Donaldson K, MacNee W. Systemic oxidative stress in asthma, COPD and smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154:1054-60.

54. Abbard R, Dy Buncio A, Vedal S. Peripheral leucocyte count and longitudinal decline in lung function. *Thorax* 1998; 43:426-68.

55. Chan-Yeung M, Dy Buncio A. Leucocyte count , smoking and lung function. *Am J Med* 1984; 76:31-7.

56. Rahman I, Skwarska E, MacNee W. Attenuation of oxidant/antioxidant imbalance during treatment of exacerbations in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 1997; 52:565-68.

57. Loukides S., Horvath I, Wodehouse T, Cole PJ, Barnes PJ. Elevated levels of expired breath hydrogen peroxide in bronchiectasis. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158:991-94.

58. Loukides S, Bouros D, Papatheodorou G, Lachanis S, Panagou P; Siafakas NM. Exhaled hydrogen peroxide in steady-state bronchiectasis. *Chest* 2002; 121:81-7.
59. Horvath I, Loukides S, Wodehouse T, Kharitonov SA, Cole PJ, Barnes PJ. Increased levels of exhaled carbon monoxide in bronchiectasis. A new marker of oxidative stress. *Thorax* 1998; 53:867-70.
- 60 Roun JH, Buhl R, McElvaney NG, Borok Z, Crystal RG. Systemic deficiency of glutathione in cystic fibrosis. *J Appl Physiol* 1993; 75:2419-24.
- 61 Gao L, Broughman JR, Iwamoto T, Tomich JM, Venglarik CJ, Forman HJ. Synthetic chloride channel restores glutathione secretion in cystic fibrosis airway epithelia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001; 281:24-30.
- 62 Montuschi P, Kharitonov SA, Ciabattini G, Corradi M, van Rensen L, Geddes DM, Hodson ME, Barnes PJ. Exhaled 8-isoprostane as a new non-invasive biomarker of oxidative stress in cystic fibrosis. *Thorax* 2000; 55:205-9.
- 63 Paredi P, Kharitonov SA, Leak D, Shah PL, Cramer D, Hodson ME, Barnes PJ. Exhaled ethane is elevated in cystic fibrosis and correlates with carbon monoxide levels and airway obstruction. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161:1247-51.
- 64 Lands LC, Grey VL, Grenier C. Total plasma antioxidant capacity in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 2000; 29:81-7.
- 65 Range SP, Dunster C, Knox AJ, Kelly FJ. Treatment of pulmonary exacerbations of cystic fibrosis leads to improved antioxidant status. *Eur Respir J* 1999;13:560-4.
66. O'Byrne PM, Hargreave FE. Non-invasive monitoring of airway inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 150:S100-S102.
67. Kharitonov SA, Barnes PJ. Exhaled markers. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163:1693-1722.
68. Baldwin SR, Grum CM, Boxer LA, Simon RH, Ketai LH, Devall LJ. Oxidant activity in expired breath of patients with adult respiratory distress syndrome. *Lancet* 1986; 1:11-4.
69. Ingelstedt S. Studies of the conditioning of air in the respiratory tract. *Acta Otolaryngol.* 1956 [Suppl] 131:1-81.

70. Scheideler L, Manke HG, Schwulera U, Inacker O, Hämmerle H. Detection of non-volatile macromolecules in breath: a possible diagnostic tool? *Am J Respir Crit Care Med* 1993; 148:778-84.
71. Ganas K, Loukides S, Papatheodorou G, Panagou P, Kalogeropoulos. Total nitrite/nitrate in expired breath condensate of patients with asthma. *Respir Med* 2001; 95:649-54.
72. Kietzmann D, Kahl R, Müller M, Burchardi H, Kettler D. Hydrogen peroxide in expired breath condensate of patients with acute respiratory failure and with ARDS. *Intensive Care Med* 1993; 19: 78-81.
73. Sznajder JI, Fraiman A, Hall JB, Sanders W, Schmidt G, Crawford G, Nahum A, Factor P, Wood LDH. Increased hydrogen peroxide in the expired breath condensate of patients with acute hypoxemic respiratory failure. *Chest* 1989; 96:606-612.
74. Loukides S, Bouros D, Papatheodorou G, Panagou P; Siafakas NM. The relationship between hydrogen peroxide in expired breath condensate, airway inflammation and asthma severity. *Chest* 2002; 121:338-46.
75. Nowak D, Kasielski M, Antzak A, Pietras T, Bialasiewicz P. Increased content of thiobarbituric acid-reactive substances and hydrogen peroxide in the expired breath condensate of patients with stable chronic obstructive pulmonary disease: no significant effect of cigarette smoking. *Respir Med* 1999; 93:389-396.
76. Ho LP, Faccenda J, Innes JA, Greening AP. Expired Hydrogen peroxide in breath condensate of cystic fibrosis patients. *Eur Respir J* 1999; 13(1):103-106.
77. Nowak D, Antzak A, Krol M, Pietras T, Shariati B, Bialasiewicz P, Jeczowski K, Kula P. Increased content of hydrogen peroxide in the expired breath of cigarette smokers. *Eur Respir J* 1996; 9:652-657.
78. Jöbbsis Q, Raatgeep HC, Schellekens SL, Hop WCJ, Hermans PW, de Jongste JC. Hydrogen peroxide in exhaled air of healthy children: reference values. *Eur Respir J* 1998; 12:483-485.
79. Culpitt SV, Russell REK. The measurement of hydrogen peroxide in airways disease. *Eur Respir Rev* 1999; 9:68, 246-248.
80. Gallati H, Pracht I. Horseradish peroxidase: kinetic studies and optimization of peroxidase activity determination using the substrates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

and 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine. *J Clin Chem Clin Biochem* 1985; 23:453-460.

81. Ruch W, Cooper PH, Baggiolini M. Assay of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production by macrophages and neutrophils with homovanillic acid and horseradish peroxidase. *J Immunol Methods* 1983; 63:347-357.

82. Hyslop PA, Sklar LA. A quantitative fluorimetric assay for the determination of oxidant production by polymorphonuclear leucocytes: its use in simultaneous fluorimetric assay of cellular activation processes. *Anal Biochem* 1984; 141:280-286.

83. Russell REK, Culpitt SV, Wiggins J, Barnes PJ. A new method for the measurement of hydrogen peroxide in breath condensate. *Eur Respir J* 1998; 12:Suppl.28, p 1660.

84. Montuschi P. Isoprostanes and other exhaled markers in respiratory diseases. *Eur Respir Rev* 1999; 9:68, 249-253.

85. Basu S. Radioimmunoassay of b-iso-prostaglandin F<sub>2a</sub>: an index for oxidative injury via free radical catalyzed liquid peroxidation. *Prostaglandin Leucot Essent Fatty Acids* 1998; 58:319-325.

86. Carpenter CT, Price PV, Christman BW. Exhaled breath condensate isoprostanes are elevated in patients with acute lung injury or ARDS. *Chest* 1998; 114:1653-1659.

87. Ho LP, Innes JA, Greening AP. Exhaled nitric oxide is not elevated in the inflammatory airways diseases of cystic fibrosis and bronchiectasis. *Eur Respir J* 1998; 12:1290-1294.

88. Loukides S, Kharitonov S, Wodehouse T, Cole PJ, Barnes PJ. Effect of arginine on mucociliary function in primary ciliary dyskinesia. *Lancet* 1998; 352:371-2.

89. Ho LP, Innes JA, Greening AP. Nitrite levels in breath condensate of patients with cystic fibrosis is elevated in contrast to exhaled nitric oxide. *Thorax* 1998; 53:680-684.

90. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite and [<sup>15</sup>N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 1982; 126:131-138.

91. Misko TP, Schilling RJ, Salvemini D, Moore WM, Currie MG. A fluorometric assay for the measurement of nitrite in biological samples. *Anal Biochem* 1988; 136:111-18.
92. Moshage H, Kok B, Huizenga JR, Jansen PL. Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation. *Clin Chem* 1995; 41:892-896.
93. Saleh D, Ernst P, Lim S, Barnes PJ, Giaid A. Increased formation of the potent oxidant peroxynitrate in the airways of asthmatic patients is associated with induction of nitric oxide synthase: effect of inhaled glucocorticoid. *FASEB J* 1998; 12:929-937.
94. Kaminsky DA, Mitchell J, Carroll N, James A, Soultanakis R, Janssen Y. Nitrotyrosine formation in the airways and lung parenchyma of patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104:747-754.
95. Hanazawa T, Kharitonov SA, Barnes PJ. Increased nitrotyrosine in exhaled breath condensate of patients with asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162:1273-1276.
96. Balint B, Kharitonov SA, Hanazawa T, Donnelly LE, Shah PL, Hodson ME, Barnes PJ. Increased nitrotyrosine in exhaled breath condensate in cystic fibrosis. *Eur Respir J* 2001;17:1201-7.
97. Hunt JF, Fang K, Rajesh M, Snyder A, Malhotra N, Platts-Mills TAE, Gaston B. Endogenous airway acidification: implications for asthma pathophysiology. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161:694-699.
98. Janero DR. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices for lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Rad Biol Med* 1990; 9:515-540.
99. Yagi K. A simple fluorimetric assay for lipid peroxides in blood plasma. *Biochem Med* 1986; 15:212-216.
100. Cunningham S, McColm JR, Pei Ho L, Greening AP, Marshall TG. Measurement of inflammatory markers in the breath condensate of children with cystic fibrosis. *Eur Respir J* 2000; 15:955-957.
101. Antzak A, Kurmanowska Z, Kasielski M, Novak D. Inhaled glucocorticosteroids decrease hydrogen peroxide level in expired air condensate in asthmatic patients. *Respir Med* 2000 May; 94:416-421.
102. Hunt J, Byrns RE, Ignarro LJ, *et al.* Condensed expired nitrate as a home marker for acute asthma. *Lancet* 1995; 346:1235-1236.



103. Jöbsis Q, Raatgeep HC, Schellekens SL, Kroesbergen A, Hop WCJ, de Jongste JC. Hydrogen peroxide and nitric oxide in exhaled air of children with cystic fibrosis during antibiotic treatment. *Eur Respir J* 2000; 16:95-100.
104. Evans SA, Turner SM, Bosch BJ et al. Lung function in bronchiectasis: the influence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur Respir J* 1996;9:1601-04.
105. Keatings VM, Evans DJ, O'Connor BJ, et al. Cellular profiles in asthmatic airways: a comparison of induced sputum, bronchial washings and bronchoalveolar lavage. *Thorax* 1997;52:372-74.
106. Pizzichini MMM, Pizzichini E, Clelland L et al. Sputum in severe exacerbations of asthma: kinetics of inflammatory indices after prednisone treatment. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155: 1501-08.
107. Keatings VM, O'Connor BJ, Wright LG, et al. Late response to allergen is associated with increased concentrations on TNF- $\alpha$  and interleukin-5 in induced sputum. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 99: 693-98.
108. Sterk PJ, Fabbri LM, Quanjer PH et al. Airway responsiveness: Standardized challenge tests with pharmacological, physical and sensitizing stimuli in adults. *Eur Respir J (Suppl)* 1993;16:53-83.
109. Hansell DM. Bronchiectasis. *Radiol Clin North Am* 1998; 36: 107-28.
110. Elborn JS, Jonhston B, Allen F, et al. Inhaled steroids in bronchiectasis. *Resp Med* 1992; 86:121-24.
111. National Institutes of Health. National Health, Lung and Blood Institute 1997. Guidelines for the diagnosis and management of asthma. NIH Publication No 97-4051A.
112. Louis R, Lau KCL, Bron AO et al. The relationship between airways inflammation and asthma severity. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161:9-16.
113. Siafakas NM, Vermeire P, Pride NB et al on behalf of the ERS task force. Consensus statement. Optimal assesement and management of COPD. *Eur Respir J* 1995; 8: 1398-1420.
114. American Thoracic Society. Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and asthma. *Am Rev Respir Dis.* 1987; 136:225-44.

115. Keatings VM, Evans DJ, O'Connor BJ, et al. Cellular profiles in asthmatic airways: a comparison of induced sputum, bronchial washings and bronchoalveolar lavage. *Thorax* 1997; 52:372-74.
116. Keatings VM, Barnes PJ. Granulocyte activation markers in induced sputum: comparison between chronic obstructive pulmonary disease, asthma and normal subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155:449-53.
117. Maestrelli P, Saetta M, di Stefano A et al. Comparison of leukocyte counts in sputum, bronchial biopsies and bronchoalveolar lavage. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155: 542-48.
118. Lim S, Jatakanon A, John M et al. Effect of inhaled budesonide on lung function and airway inflammation: assessment by various inflammatory markers in mild asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159: 22-30.
119. Raible DG, Mohanty JG, Jaffe JS et al. Hydrogen peroxide release from human eosinophils on fibronectin: scopoletin enhances eosinophil activation. *Free Radic Biol Med* 2000; 28:1652-60.
120. Ayars G, Altman LC, McManus MM et al. Injurious effect of the eosinophil peroxidase-Hydrogen Peroxide-Halide system and major basic protein on human nasal epithelium in vitro. *Am Rev Respir Dis* 1989;140: 125-31.
121. Sepper R, Kontinen YT, Ding Y, et al. Human neutrophil esterase with collagenase (MMP-8), identified in bronchiectasis BAL fluid, correlates severity disease. *Chest* 1995; 107:1641-47.
122. Wilson CB, Jones PW, O'Leary CJ, et al. Systemic markers of inflammation in stable bronchiectasis. *Eur Respir J* 1998; 12:820-24.
123. Plotkowski M, Bajolet –Laudinat CO, Puchelle E. Cellular and molecular mechanisms of bacterial adhesion to respiratory mucosa. *Eur Respir J* 1993;6:903-16.
124. Ho PL, Chan KN, Ip MSM et al. The effect of *Pseudomonas aeruginosa* infection on clinical parameters in steady-state bronchiectasis. *Chest* 1998; 114: 1594-98.
125. Rutgers SR, Timens W, Kaufmann HF, van der Mark TW, Koeter GH, Postma DS. Comparison of induced sputum with bronchial wash, bronchoalveolar lavage and bronchial biopsies in COPD. *Eur Respir J* 2000;15:109-15

126. Martin TR, Raghu G, Maunder RJ, Springmeyer SC. The effects of chronic bronchitis and chronic airflow obstruction on lung cell populations recovered by bronchoalveolar lavage. *Am Rev Respir Dis* 1985; 132:254-60.
127. Keatings VM, Collins PD, Scott DM, Barnes PJ. Differences in interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153:530-34.
128. Saetta M. Airway pathology of COPD compared to asthma. *Eur Respir Rev* 1997;7:11-15.
129. Lantero S, Oddera S, Silvestri M et al. Budesonide down-regulates eosinophil locomotion but has no effects on ECP release or on hydrogen peroxide production. *Lung* 1999;177:219-28.
130. McLeish KR, Miller FN, Stelzer GT et al. Mechanism by which methylprednisolone inhibits acute immune complex induced changes in vascular permeability. *Inflammation* 1986; 10: 321-32.
131. Ip M, Shum D, Lauder I, et al. Effects of antibiotics on sputum inflammatory contents in acute exacerbations of bronchiectasis. *Respir Med* 1993; 87:449-54.
132. Keatings VM, Jatakanon A, Worsdell M et al. Effect of inhaled and oral glucocorticosteroids on inflammatory indices in asthma and COPD. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155: 542-48.
133. Culpitt SV, Maziak W, Loukides S, Nightingale JA, Matthews JL, Barnes PJ. Effect of high dose inhaled steroid on cells, cytokines, and proteases in induced sputum in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999; 160:1635-39.

**ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α ΠΙΝΑΚΕΣ.**

Πίνακας 1. Χαρακτηριστικά ασθενών με Βρογχεκτασίες και ομάδας ελέγχου.

	Ομάδα Ελέγχου n=15	Ασθενείς (n=30)	<u>Βρογχεκτασίες</u>			
			ΕΣ (+) (n=14)	ΕΣ (-) (n=16)	ΨΑ (+) (n=10)	ΨΑ (-) (n=20)
Ηλικία	34(8) (20-46)	39(16) (19-58)	37 (11) (21-56)	41(20) (19-58)	42(13) (19-58)	37.5(18) (23-56)
FEV <sub>1</sub> % αναμ.	95(8) (86-110)	69.5(20) (27-101)	71(16) (38-89)	69(23) (27-101)	59(25) (27-101)	72(22) (65-91)
HRCT score		9.5(4.5) (2-18)	10(5) (3-18)	9(4) (2-17)	14(3) (7-18)	8(4) (2-14)
Διάρκεια Νόσου (έτη)		11(8) (3-21)	13(9) (4-21)	9(7) (3-18)	14(9) (10-21)	9.5(7.5) (3-20)
Κλινική Βαρύτητα		5(1.7) (2-8)	5(2) (2-8)	4.5(1.3) (2-7)	6(1.4) (3-8)	4(1.4) (2-8)

Οι τιμές εκφράζονται ως μέση τιμή (SD) (εύρος) με εξαίρεση την ηλικία που εκφράζεται ως διάμεση τιμή (SD). Οι συντμήσεις εκφράζουν τα ακόλουθα: Α= άνδρας, Γ= γυναίκα n= αριθμός ατόμων, ΕΣ= Εισπνεόμενα Στεροειδή, ΨΑ= Ψευδομονάδα Aeruginosa.

Πίνακας 2. Αξιολόγηση έκτασης της νόσου σε ασθενείς με βρογχεκτασίες. Η βαθμολογία βασίστηκε σε ευρήματα από την Υπολογιστική Τομογραφία Θώρακος Υψηλής Διακριτικότητας.

Βαθμολογία	0	1	2	3
Αλλοιώσεις	Καμία	Συμμετοχή ενός υποτμηματικού	Συμμετοχή περισσότερου του ενός υποτμηματικού	Παρουσία κυστικών βρογχεκτασιών

Κάθε λοβός και στους δύο πνεύμονες αξιολογήθηκε για βρογχεκτασικές αλλοιώσεις με σύστημα βαθμολόγησης από 0-3 (η γλωσσίδα βαθμολογήθηκε ως ξεχωριστός λοβός). Μέγιστη βαθμολογία ήταν 18 βαθμοί

Πίνακας 3. Αξιολόγηση κλινικής βαρύτητας της νόσου σε ασθενείς με βρογχεκτασίες. Η βαθμολογία βασίστηκε σε κλίμακα βαρύτητας συμπτωμάτων.

	Συμπτώματα	Συμπτώματα
Βαθμολογία	Βήχας-Συριγμός	Απόχρεμψη
0	απουσία	Απουσία
1	ήπια	Λιγότερη από μισό κύπελλο
2	μέτρια	Περισσότερη από μισό κύπελλο αλλά λιγότερη από ολόκληρο
3	βαριά	Περισσότερη από ένα κύπελλο

Στην αξιολόγηση της απόχρεμψης χρησιμοποιήθηκε κύπελλο χωρητικότητας 50ml. Εύρος βαθμολογίας 0-9.

Πίνακας 4. Συσχετίσεις μεταξύ συγκέντρωσης H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και των κύριων κλινικών και λειτουργικών παραμέτρων της μελέτης σε ασθενείς με βρογχεκτασίες.

	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		HRCT		FEV <sub>1</sub> % αναμ		Κλινικό score		Πολυμορφοπύρηνα %	
	r <sub>s</sub>	p value	r <sub>s</sub>	p value	r <sub>s</sub>	p value	r <sub>s</sub>	p value	r <sub>s</sub>	p value
Πολυμορφοπύρηνα %	0.9	<b>&lt;0.0001</b>	0.6	<b>&lt;0.0001</b>	-0.39	<b>&lt; 0.05</b>	0.67	<b>&lt;0.001</b>		
HRCT	0.66	<b>&lt;0.0001</b>			-0.48	<b>&lt; 0.05</b>	0.4	<b>&lt;0.05</b>	0.6	<b>&lt;0.0001</b>
FEV <sub>1</sub> % αναμ	-0.42	<b>&lt; 0.05</b>	-0.48	<b>&lt; 0.05</b>			-0.21	0.08	-0.39	<b>&lt; 0.05</b>
Κλινική βαθμονόμηση	0.43	<b>&lt;0.05</b>	0.4	<b>&lt;0.05</b>	-0.21	0.08			0.67	<b>&lt;0.001</b>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>			0.66	<b>&lt;0.0001</b>	-0.42	<b>&lt; 0.05</b>	0.43	<b>&lt;0.05</b>	0.9	<b>&lt;0.0001</b>

Οι συχετίσεις αναλύθηκαν με το Spearman's rank correlation coefficient. Τα έντονα γράμματα παριστάνουν στατιστικά σημαντική συσχέτιση.



Πίνακας 5. Χαρακτηριστικά ασθενών με βρογχικό άσθμα και ομάδας ελέγχου..

Άσθμα

	Ομάδα Ελέγχου (n=15)	Ασθενείς (n=50)	ΕΣ (+) (n=20)	ΕΣ (-) (n=20)	Ήπιο διαλείπον (n=10)	Ήπιο επιμένον (n=20)	Μέτριο (n=20)
Ηλικία (έτη)	30 (4) (19-37)	29 (6) (19-43)	30(5) (19-36)	28(7) (19-43)	30.5(6) (22-43)	29(5) (19-36)	29(7) (19-43)
FEV <sub>1</sub> % αναμ.	95 (3) (87-121)	82 (16) (49-110)	81(14) (49-101)	76(18) (59-110)	96(5) (84-104)	92(7) (80-110)	64(9) (41-74)
PEFR διακύμανση (%)		12.5 (2) (7-34)	10(2) (8-21)	14(2.5) (7-34)	7 (2) (7-14)	12(4) (10-24)	15(6) (11-34)
% ηωσινόφιλα σε προκλητή απόχρεμψη	0.3(0.7) (0-2)	7(4) (0-20)	5(1.5) (0-15)	9(3) (2-20)	2(1) (0-3)	5(3) (1-15)	11.5(6) (3-20)
Κλινική βαθμονόμηση (εύρος 0-12)		6 (2.5) (2-12)	6.5 (2) (3-11)	7(2.5) (4-12)	3(0.8) (2-4)	5(1.4) (3-8)	8(2) (4-12)
ECP(ng/ml)	19 (16) (0-132)	364(579) (0-2850)	256(357) (0-986)	624(776) (0-2850)	58(55) (0-178)	171(336) (0-1084)	710(712) (5-2850)

Οι τιμές εκφράζονται ως μέση τιμή (SD) (εύρος) με εξαίρεση την ηλικία που εκφράζεται ως διάμεση τιμή (SD). Οι συντμήσεις εκφράζουν τα ακόλουθα: n= αριθμός ατόμων, ΕΣ= Εισπνεόμενα Στεροειδή, ECP= Ηωσινοφιλική κατιονική πρωτεΐνη.

Πίνακας 6. Αξιολόγηση κλινικής βαρύτητας της νόσου σε ασθενείς με βρογχικό άσθμα. Η βαθμολογία βασίστηκε σε κλίμακα βαρύτητας συμπτωμάτων.

	Συμπτώματα
Βαθμολογία	Βήχας-Συριγμός-Δύσπνοια-Νυχτερινά συμπτώματα
0	απουσία
1	ήπια
2	μέτρια
3	βαριά

Η αξιολόγηση έγινε για χρονικό διάστημα 15 ημερών. Εύρος βαθμολογίας 0-12.

Πίνακας 7. Συσχετίσεις μεταξύ συγκέντρωσης H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και των κύριων κλινικών φλεγμονωδών και λειτουργικών παραμέτρων της μελέτης σε ασθενείς με άσθμα.

Συγκέντρωση H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> στο συμπύκνωμα εκπνεόμενου αέρα

	Όλοι		Ήπιο διαλείπον		Ήπιο επιμένον		Μέτριο		ΕΣ (-)		ΕΣ (+)	
	r <sub>s</sub>	p value	r	p value	r	p value	r	p value	r	p value	r	p value
Μακροφάγα%	0.05	0.4	0.11	0.6	0.03	0.8	0.14	0.55	0.12	0.6	0.11	0.5
Πολυμορφοπύρηνα%	0.13	0.4	0.14	0.7	0.04	0.9	0.6	<b>0.005</b>	0.1	0.7	0.11	0.13
Ηωσινόφιλα%	0.48	<b>0.0004</b>	0.24	0.15	0.006	0.8	0.76	<b>&lt;0.0001</b>	0.67	<b>0.001</b>	0.57	<b>0.007</b>
ECP	0.5	<b>0.0002</b>	0.23	0.25	0.34	0.1	0.61	<b>&lt;0.0001</b>	0.76	<b>&lt;0.0001</b>	0.55	<b>0.01</b>
FEV <sub>1</sub> % αναμ	-0.68	<b>&lt;0.0001</b>	-0.1	0.7	-0.005	0.8	-0.5	<b>0.01</b>	-0.64	<b>0.001</b>	0.14	0.2
PEFR (διακύμανση) %	0.3	<b>&lt;0.05</b>	0.24	0.5	0.04	0.6	0.49	<b>0.002</b>	0.54	<b>0.001</b>	0.21	0.3
Κλινική βαθμονόμηση	0.55	<b>&lt;0.0001</b>	0.1	0.7	0.14	0.5	0.46	<b>0.005</b>	0.43	<b>0.002</b>	0.19	0.1

Οι συσχετίσεις έγιναν με το Pearson's correlation coefficient για τις υποομάδες άσθματος και με το Spearman's correlation coefficient για το άσθμα σαν σύνολο. Τα έντονα γράμματα υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική συσχέτιση.

Πίνακας 8. Συσχετίσεις μεταξύ συγκέντρωσης H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και των κύριων κλινικών φλεγμονωδών και λειτουργικών παραμέτρων της μελέτης σε ασθενείς με ήπιο επιμένον και μέτριο άσθμα.

	<u>Ήπιο επιμένον</u>		<u>Μέτριο</u>	
	ΕΣ(-)	ΕΣ(+)	ΕΣ(-)	ΕΣ(+)
	r	p value	r	p value
Μακροφάγα%	0.01	0.65	0.14	0.1
Πολυμορφοπύρηνα%	0.13	0.4	0.14	0.8
Ηωσινόφιλα%	0.21	0.06	0.08	0.55
ECP	0.2	0.08	0.03	0.25
FEV <sub>1</sub> % αναμ	-0.07	0.11	-0.07	0.7
PEFR (διακύμανση) %	0.10	0.23	0.09	0.5
Κλινική βαθμονόμηση	0.09	0.2	0.1	0.7

Οι συσχετίσεις έγιναν με το Pearson's correlation coefficient. Τα έντονα γράμματα υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική συσχέτιση

Πίνακας 9. Χαρακτηριστικά ασθενών με ΧΑΠ και ομάδας ελέγχου

	Ομάδα Ελέγχου (n=10)	Ασθενείς (n=30)	ΕΣ (+) (n=15)	ΕΣ (-) (n=15)	Ήπια (n=10)	Μέτρια (n=10)	Σοβαρή (n=10)
Κάπνισμα (pack/years)	35(6) 21-42	41(9) 24-56	39(9) 34-56	43(9) 24-48	39(8) 24-46	43(10) 34-56	41(9) 33-52
Ηλικία (έτη)	56 (4) (41-77)	59 (9) (42-76)	56 (10) (42-76)	62 (12) (51-71)	59 (9.5) (42-76)	59.5 (9) (44-71)	58 (9) (47-70)
FEV <sub>1</sub> % αναμ.	93 (8) (82-108)	59.5 (14) (36-80)	53 (14) (36-76)	66 (12) (45-80)	75 (3) (71-80)	60 (7) (50-69)	43 (4) (36-49)
% πολυμορφοπύρινα προκλητή απόχρεμψη	39(7) (37-40)	56(13) (31-70)	62 (9) (38-70)	51 (14) (31-70)	39(5) (31-46)	63 (7) (50-70)	66 (2) (63-70)
Βαθμονόμηση δύσπνοιας (εύρος 0-4)	0	2 (0.8) (1-4)	2.4 (0.8) (1-4)	1.7 (0.8) (1-3)	1(0.9) (0-2)	1.9 (0.6) (1-3)	2.9 (0.6) (2-4)

Οι τιμές εκφράζονται ως μέση τιμή (SD) (εύρος) με εξαίρεση την ηλικία που εκφράζεται ως διάμεση τιμή (SD).

Πίνακας 10. Αξιολόγηση της βαρύτητας της δύσπνοιας σε ασθενείς με ΧΑΠ. Η βαθμολογία βασίστηκε σε κλίμακα βαρύτητας (MRC scale).

Βαθμολογία	Δύσπνοια
0	Απουσία εκτός από την περίπτωση έντονης σωματικής άσκησης
1	Εμφάνιση όταν βιάζεται στο ίσωμα ή όταν ανεβαίνει σε μικρή ανηφόρα
2	Βαδίζει βραδύτερα από ανθρώπους ίδιας ηλικίας στο ίσωμα ή σταματά όταν βαδίζει με το δικό του βήμα στο ίσωμα
3	Σταματά για να ανασάνει όταν βαδίζει 100μέτρα ή μετά από λίγο στο ίσωμα
4	Πολύ μεγάλη δύσπνοια για να μπορέσει να βγει από το σπίτι ή όταν ντύνεται ή ξεντύνεται

Εύρος βαθμολογίας 0-4.

Πίνακας 11. Συσχετίσεις μεταξύ συγκέντρωσης H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και των κύριων κλινικών φλεγμονωδών και λειτουργικών παραμέτρων της μελέτης σε ασθενείς με ΧΑΠ.

Συγκέντρωση H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> στο συμπύκνωμα εκπνεόμενου αέρα

	Ασθενείς		Ήπια		Μέτρια		Σοβαρή	
	r <sub>s</sub>	p value	r	p value	r	p value	r	p value
Μακροφάγα%	-0.76	<b>&lt;0.0001</b>	-0.14	0.18	0.2	0.55	-0.33	<b>&lt;0.05</b>
Πολυμορφοπύρηνα%	0.77	<b>&lt;0.0001</b>	0.11	0.19	0.6	<b>&lt;0.001</b>	0.7	<b>0.002</b>
Δύσπνοια	0.12	0.09	0.19	0.07	0.1	0.11	0.13	0.35
FEV <sub>1</sub> % αναμ	-0.9	<b>&lt;0.0001</b>	-0.18	0.12	-0.76	<b>0.009</b>	-0.84	<b>0.002</b>

Οι συσχετίσεις έγιναν με το Pearson's correlation coefficient για τις υποομάδες της ΧΑΠ και με το Spearman's correlation coefficient για τη ΧΑΠ σαν σύνολο. Τα έντονα γράμματα υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική συσχέτιση.

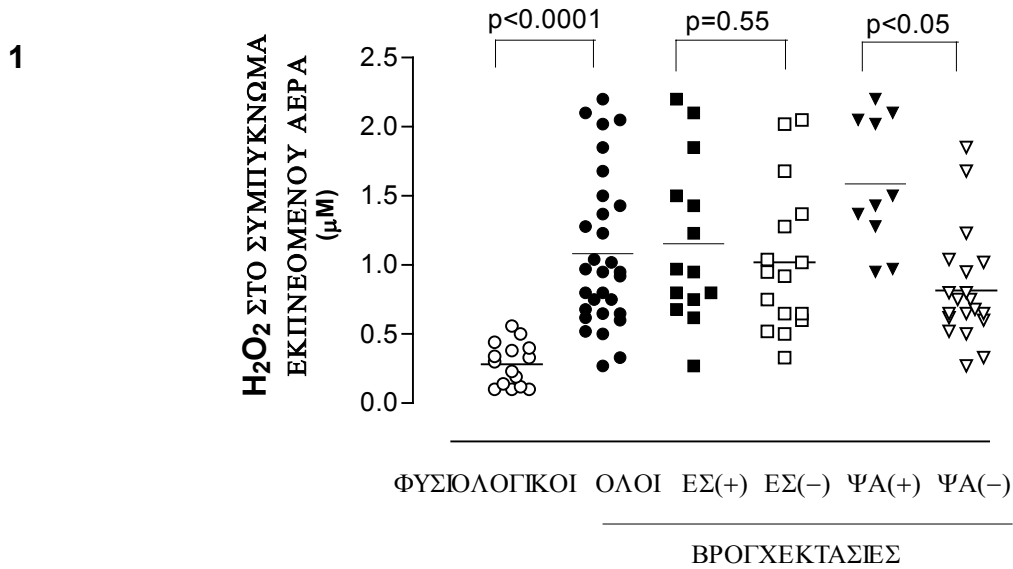
Πίνακας 12. Συσχετίσεις μεταξύ των κύριων φλεγμονωδών κλινικών και λειτουργικών παραμέτρων της μελέτης σε ασθενείς με ΧΑΠ.

	FEV <sub>1</sub> % αναμ				Δύσπνοια				Πολυμορφοπύρηνα %			
	Όλοι	Ήπια	Μέτρια	Σοβαρή	Όλοι	Ήπια	Μέτρια	Σοβαρή	Όλοι	Ήπια	Μέτρια	Σοβαρή
	r <sub>s</sub> - p value	r <sub>s</sub> - p value	r <sub>s</sub> - p value	r <sub>s</sub> - p value	r <sub>s</sub> - p value	r <sub>s</sub> - p value	r <sub>s</sub> - p value	r <sub>s</sub> - p value	r <sub>s</sub> - p value	r <sub>s</sub> - p value	r <sub>s</sub> - p value	r <sub>s</sub> - p value
Πολυμορφοπύρηνα %	0.8- <b>0.001</b>	0.3- <b>&lt;0.05</b>	0.7- <b>0.001</b>	0.75- <b>&lt;0.0001</b>	0.04-0.43	0.01-0.35	0.09-0.42	0.1-0.11				
FEV <sub>1</sub> % αναμ					0.16-0.09	0.08-0.15	0.09-0.23	0.17-0.06	0.8- <b>0.001</b>	0.3- <b>&lt;0.05</b>	0.7- <b>0.001</b>	0.75- <b>&lt;0.0001</b>
Δύσπνοια	0.1-0.09	0.08-0.15	0.09-0.23	0.2- 0.06					0.04-0.43	0.01-0.35	0.09-0.42	0.1-0.11

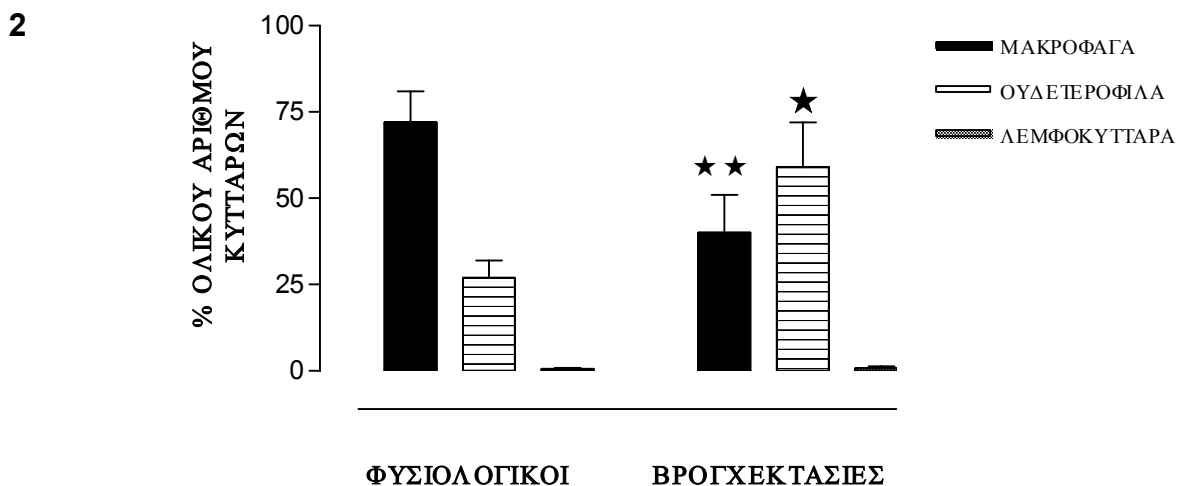
Οι συσχετίσεις έγιναν με το Pearson's correlation coefficient για τις υποομάδες της ΧΑΠ και με το Spearman's correlation coefficient για τη ΧΑΠ σαν σύνολο.



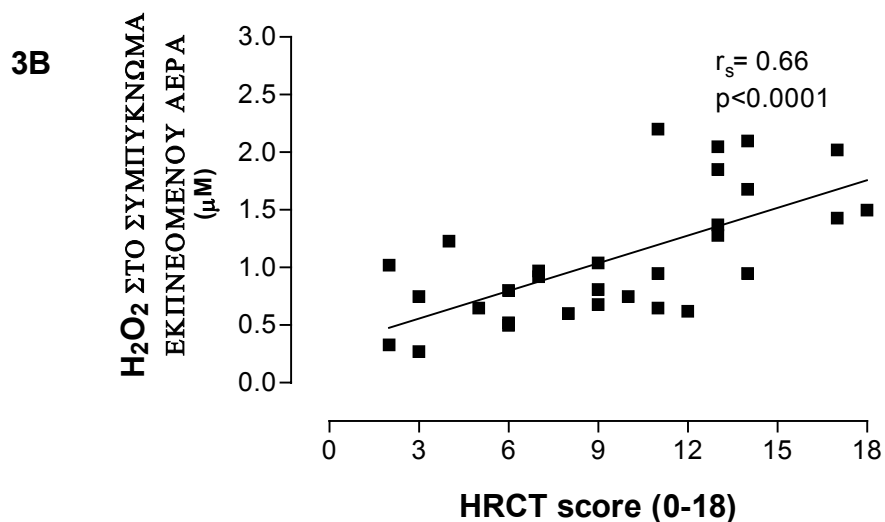
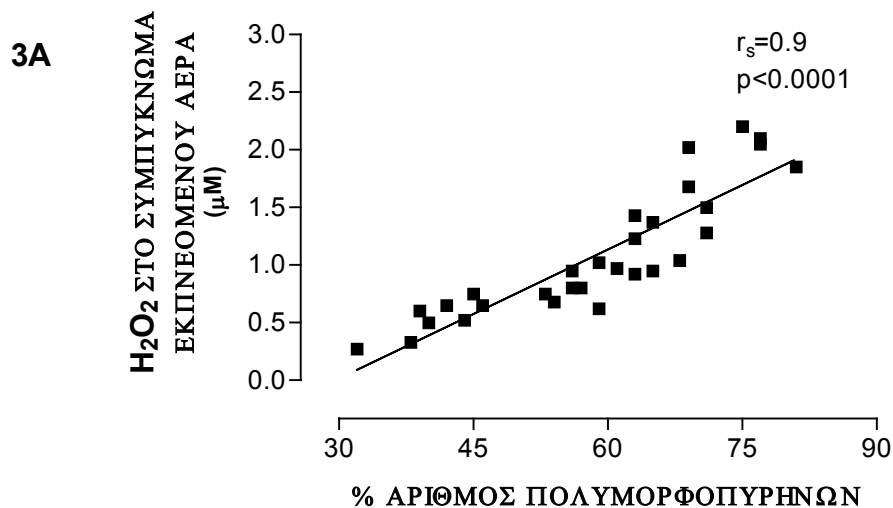
## **ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β ΕΙΚΟΝΕΣ.**



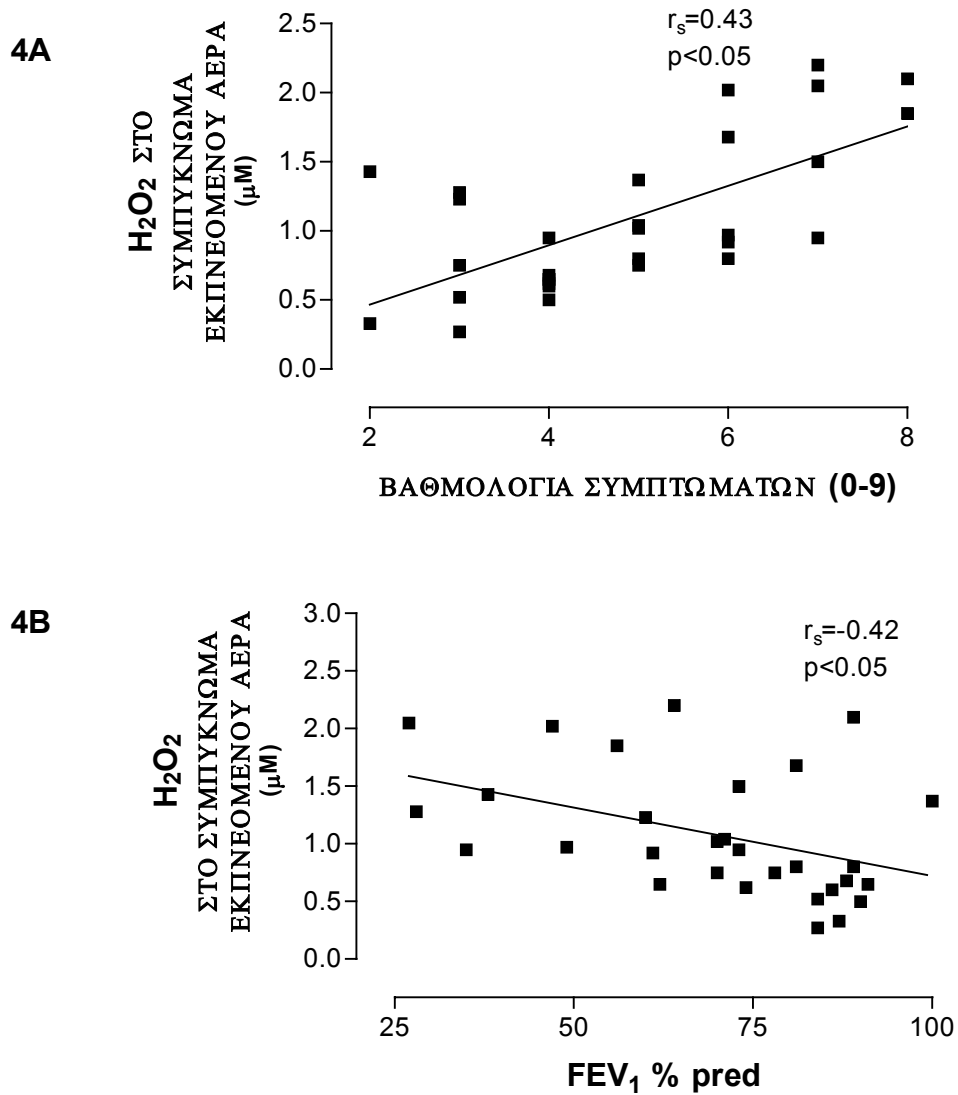
ΕΙΚΟΝΑ 1. Συγκέντρωση υπεροξειδίου του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) στο συμπύκνωμα εκπνεόμενου αέρα σε ασθενείς με βρογχεκτασίες (όλοι n=30●, σε θεραπεία με εισπνεόμενα κορτικοστεροειδή (ΕΣ+) n=14■, χωρίς εισπνεόμενα στεροειδή (ΕΣ-) n=16□, χρόνια αποικισμένοι με Ψευδομονάδα aeruginosa (ΨΑ+) n=10▼, μη αποικισμένοι με Ψευδομονάδα aureginosa (ΨΑ-) n=20▽) και φυσιολογικοί ασθενείς (n=15○). Κάθε σύμβολο παριστάνει τιμή για ένα άτομο μελέτης. Η συγκέντρωση του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> στους ασθενείς με βρογχεκτασίες ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερη από εκείνη των φυσιολογικών ατόμων, p<0.0001. Οι ασθενείς με ΨΑ (+) είχαν στατιστικά σημαντικά υψηλότερες τιμές H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> σε σύγκριση με τους ΨΑ (-) p<0.05. Οι οριζόντιες γραμμές δείχνουν μέση τιμή.



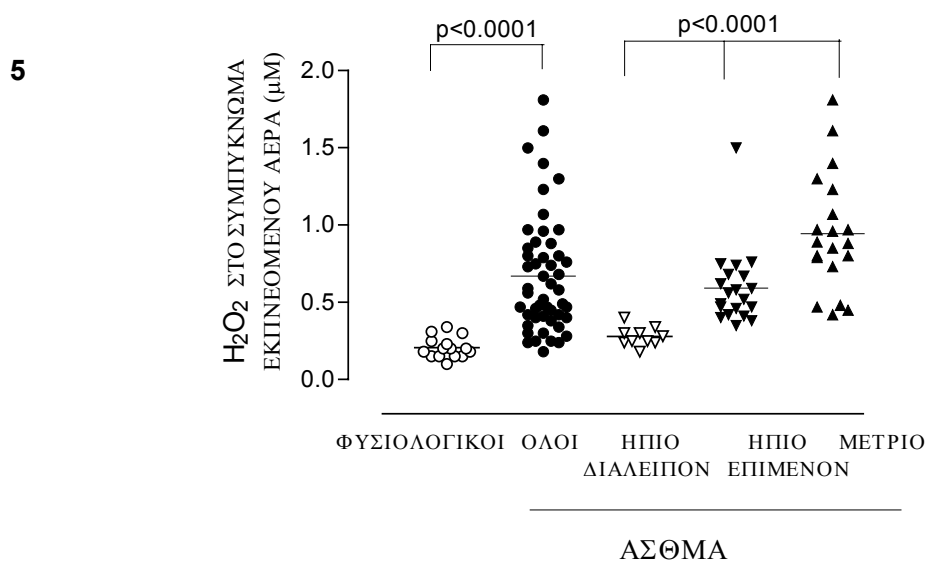
ΕΙΚΟΝΑ 2. % αριθμός μη πλακωδών κυττάρων από την ανάλυση της προκλητής απόχρεμψης ασθενών με βρογχεκτασίες και φυσιολογικών ατόμων. Ο μονήρης αστερίσκος υποδηλώνει στατιστικά υψηλότερο ποσοστό (%) πολυμορφοπύρηνων σε ασθενείς με βρογχεκτασίες συγκρινόμενοι με φυσιολογικούς ( $p < 0.0001$ ). Ο διπλός αστερίσκος υποδηλώνει στατιστικά χαμηλότερο ποσοστό (%) μακροφάγων σε ασθενείς με βρογχεκτασίες συγκρινόμενοι με φυσιολογικούς ( $p < 0.0001$ ).



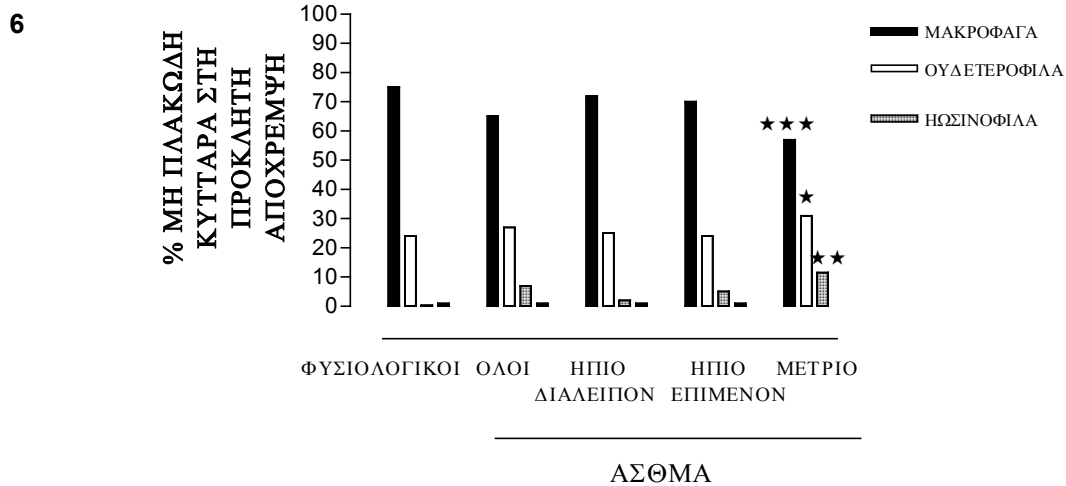
ΕΙΚΟΝΑ 3. Συσχέτιση συγκέντρωσης υπεροξειδίου του υδρογόνου ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) στο συμπύκνωμα εκπνεόμενου αέρα ασθενών με βρογχεκτασίες και Α) % αριθμό πολυμορφοπύρηνων στην προκλητή απόχρεμψη ( $r_s=0.9$ ,  $p<0.0001$ ) Β) Βαθμολόγηση υψηλής διακριτικότητας αξονική τομογραφία (HRCT) ( $r_s=0.66$ ,  $p<0.0001$ ). ■ παριστάνει τιμή για ένα άτομο μελέτης.



ΕΙΚΟΝΑ 4. Συσχέτιση συγκέντρωσης υπεροξειδίου του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) στο συμπύκνωμα εκπνεόμενου αέρα ασθενών με βρογχεκτασίες και Α) Score κλινικής βαρύτητας ( $r_s=0.43$ ,  $p<0.05$ ) Β) βίαια εκπνεόμενου όγκου στο 1' (FEV<sub>1</sub> )% αναμενόμενης ( $r_s=-0.42$ ,  $p<0.05$ ). ■ παριστάνει τιμή για ένα άτομο μελέτης.

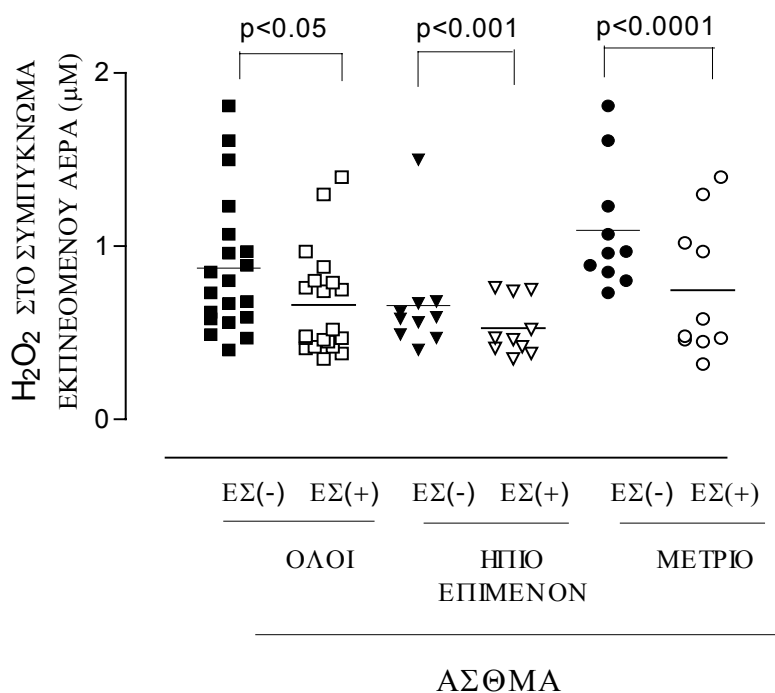


ΕΙΚΟΝΑ 5. Συγκέντρωση υπεροξειδίου του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) στο συμπύκνωμα εκπνεόμενου αέρα ασθενών με άσθμα (Όλοι  $n=50$  ●, ήπιο διαλείπον  $n=10$  ▽, ήπιο επιμένον  $n=20$  ▼, μέτριο  $n=20$  ▲) και φυσιολογικών ατόμων ( $n=15$  ○). Κάθε σύμβολο παριστάνει τιμή για ένα άτομο μελέτης. Η συγκέντρωση του  $H_2O_2$  στους ασθενείς με άσθμα ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερη από εκείνη των φυσιολογικών ατόμων,  $p < 0.0001$ . Οι ασθενείς με μέτριο άσθμα είχαν σημαντικά υψηλότερες τιμές συγκρινόμενοι με αυτές των ασθενών με ήπιο επιμένον και ήπιο διαλείπον αντίστοιχα,  $p < 0.0001$ . Οι οριζόντιες γραμμές δείχνουν μέση τιμή.



ΕΙΚΟΝΑ 6. % αριθμός μη πλακωδών κυττάρων από την ανάλυση της προκλητής απόχρεμψης ασθενών με άσθμα (όλοι, ήπιο διαλείπον, ήπιο επιμένον, μέτριο) και φυσιολογικών ατόμων. Ο μονήρης αστερίσκος υποδηλώνει στατιστικά υψηλότερο ποσοστό (%) πολυμορφοπύρηνων σε ασθενείς με μέτριο άσθμα συγκρινόμενους με φυσιολογικούς και ασθματικούς με ήπια νόσο ( $p < 0.05$ ). Ο διπλός αστερίσκος υποδηλώνει στατιστικά υψηλότερο ποσοστό (%) ηωσινοφίλων σε ασθενείς με μέτριο άσθμα συγκρινόμενους με φυσιολογικούς και ασθματικούς με ήπια νόσο ( $p < 0.001$ ). Ο τριπλός αστερίσκος υποδηλώνει στατιστικά σημαντικά χαμηλότερο ποσοστό (%) μακροφάγων σε ασθενείς με μέτριο άσθμα συγκρινόμενους με φυσιολογικούς και ασθματικούς με ήπια νόσο ( $p < 0.0001$ ).

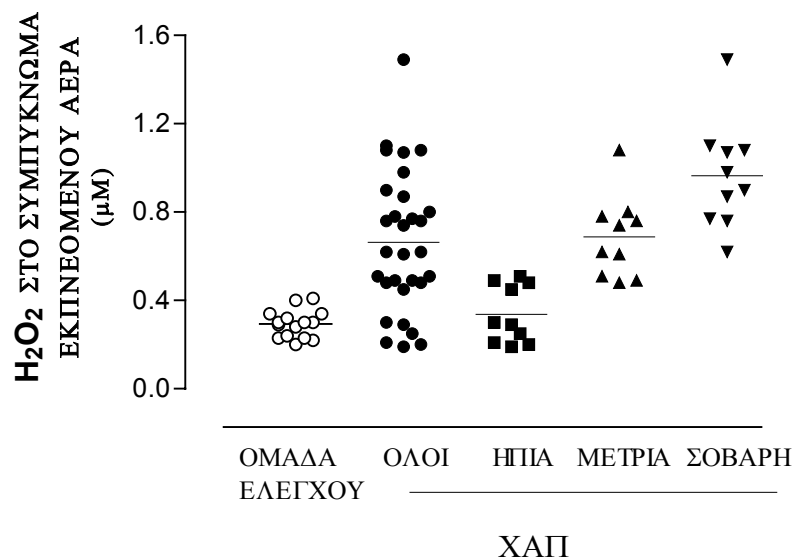
7



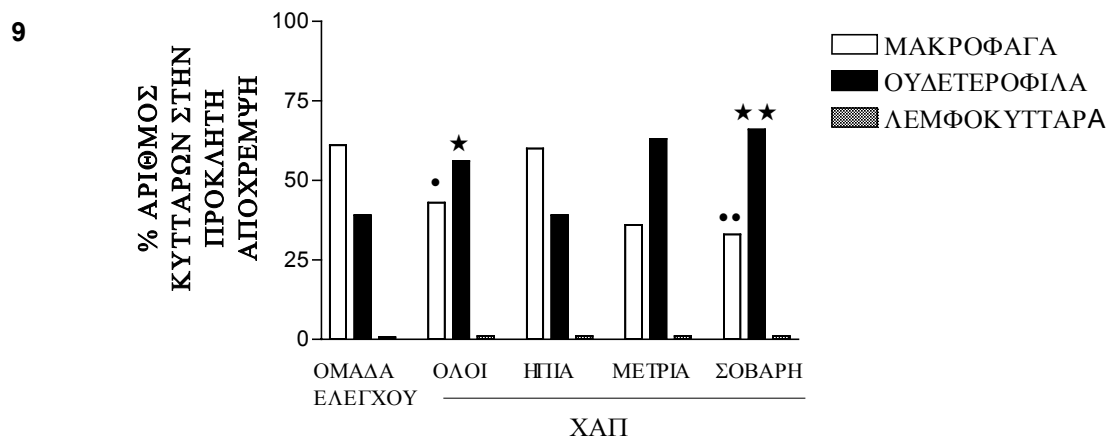
ΕΙΚΟΝΑ 7. Συγκέντρωση υπεροξειδίου του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) στο συμπύκνωμα εκπνεόμενου αέρα ασθενών με άσθμα που ελάμβαναν εισπνεόμενα στεροειδή (ΕΣ) (Όλοι  $n=20$ , ήπιο επιμένων  $n=10$  ▽, μέτριο  $n=10$  ○) και αυτών που δεν ελάμβαναν ΕΣ (-) (Όλοι  $n=20$  ■, ήπιο επιμένον  $n=10$  ▼, μέτριο  $n=10$  ●). Κάθε σύμβολο παριστάνει τιμή για ένα άτομο μελέτης. Η συγκέντρωση του  $H_2O_2$  ήταν στατιστικά σημαντικά χαμηλότερη σε ασθενείς με ΕΣ (+) συγκρινόμενους με εκείνους που ήταν ΕΣ(-) ( $p < 0.05$  όλοι,  $p < 0.001$  ήπιο επιμένον,  $p < 0.0001$  μέτριο). Οι οριζόντιες γραμμές δείχνουν μέση τιμή.



8

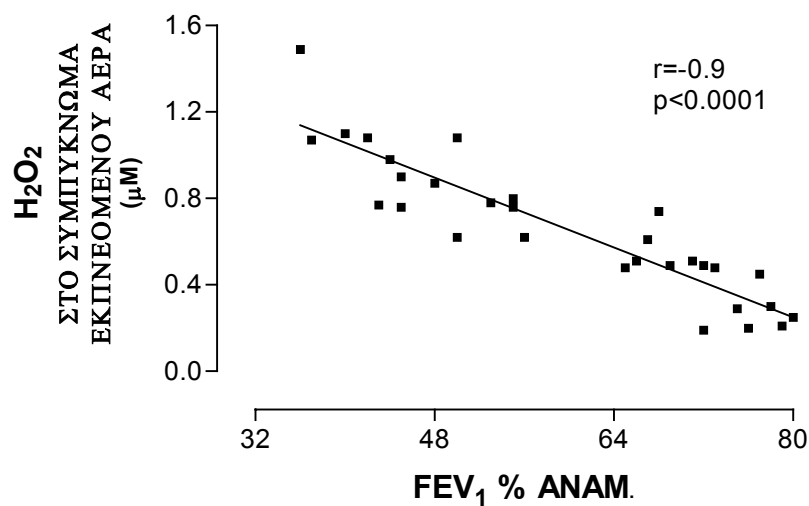


ΕΙΚΟΝΑ 8. Συγκέντρωση υπεροξειδίου του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) στο συμπύκνωμα εκπνεόμενου αέρα ασθενών με ΧΑΠ (Όλοι  $n=30$ ●, ήπια  $n=10$ ■, μέτρια  $n=10$ ▲, σοβαρή  $n=10$ ▼) και ομάδας ελέγχου ( $n=15$ ○). Κάθε σύμβολο παριστάνει τιμή για ένα άτομο μελέτης. Η συγκέντρωση του  $H_2O_2$  στους ασθενείς με ΧΑΠ ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερη από εκείνη της ομάδας ελέγχου,  $p<0.0001$ . Οι ασθενείς με σοβαρή ΧΑΠ είχαν σημαντικά υψηλότερες τιμές συγκρινόμενοι με αυτές των ασθενών με ήπια και μέτρια ΧΑΠ,  $p<0.0001$ . Οι οριζόντιες γραμμές δείχνουν μέση τιμή.

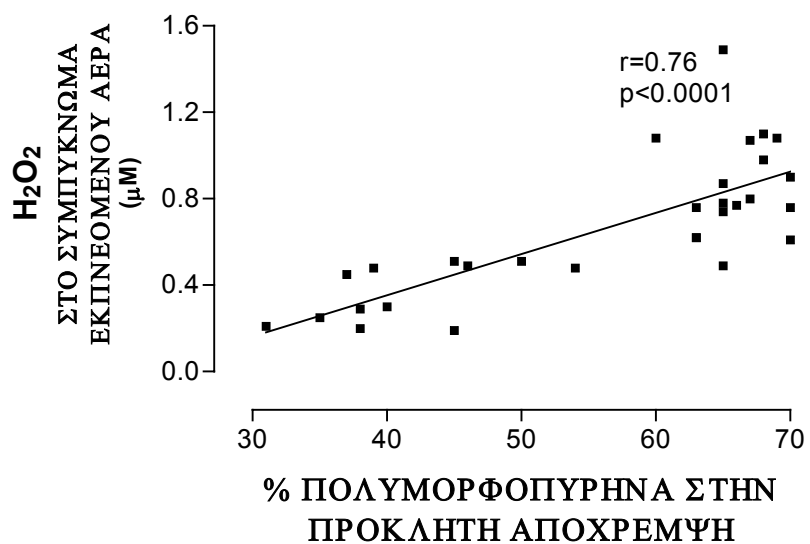


ΕΙΚΟΝΑ 9. % αριθμός μη πλακωδών κυττάρων από την ανάλυση της προκλητής απόχρεμψης ασθενών με ΧΑΠ (όλοι, ήπια, μέτρια, σοβαρή) και ομάδας ελέγχου. Ο μονήρης αστερίσκος υποδηλώνει στατιστικά υψηλότερο ποσοστό (%) πολυμορφοπύρηνων σε ασθενείς με ΧΑΠ συγκρινόμενους με την ομάδα ελέγχου ( $p < 0.001$ ). Ο διπλός αστερίσκος υποδηλώνει στατιστικά υψηλότερο ποσοστό (%) πολυμορφοπύρηνων σε ασθενείς με σοβαρή ΧΑΠ συγκρινόμενους με τους ασθενείς με ήπια και μέτρια ΧΑΠ αντίστοιχα ( $p < 0.0001$ ). Ο μονήρης ● υποδηλώνει στατιστικά σημαντικά χαμηλότερο ποσοστό (%) μακροφάγων σε ασθενείς με ΧΑΠ συγκρινόμενους με την ομάδα ελέγχου ( $p < 0.0001$ ). Ο διπλός ● υποδηλώνει στατιστικά σημαντικά χαμηλότερο ποσοστό (%) μακροφάγων σε ασθενείς με σοβαρή ΧΑΠ συγκρινόμενους με ασθενείς με μέτρια και ήπια νόσο ( $p < 0.0001$ ). Οι τιμές εκφράζονται ως μέση τιμή.

10A



10B



ΕΙΚΟΝΑ 10. Συσχέτιση συγκέντρωσης υπεροξειδίου του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) στο συμπύκνωμα εκπνεόμενου αέρα ασθενών με ΧΑΠ και Α) βίαια εκπνεόμενου όγκου στο 1' (FEV<sub>1</sub> )% αναμενόμενης ( $r_s = -0.9$ ,  $p < 0.0001$ ). Β) % αριθμό πολυμορφοπύρηνων στην προκλητή απόχρεμψη ( $r_s = 0.76$ ,  $p < 0.0001$ ).

■ παριστάνει τιμή για ένα άτομο μελέτης.

**ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Γ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ**

1. S Loukides, D Bouros, G Papatheodorou P Panagou NM Sifakas. The relationship among hydrogen peroxide in expired breath condensate airway inflammation and asthma severity. Chest 2002;121:338-46.
2. S Loukides, D Bouros, G Papatheodorou P Panagou NM Sifakas. Hydrogen peroxide in steady state bronchiectasis. Chest 2002;121:81-7.

# Exhaled H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Steady-State Bronchiectasis\*

## Relationship With Cellular Composition in Induced Sputum, Spirometry, and Extent and Severity of Disease

Stelios Loukides, MD; Demosthenes Bouros, MD, FCCP;  
Georgios Papatheodorou, PhD; Stephanos Lachanis, MD; Panos Panagou, MD;  
and Nikolaos M. Siafakas, MD, PhD, FCCP

**Study objectives:** To determine the concentration of exhaled H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in patients with bronchiectasis, and to study the relationship between levels of exhaled H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, extent of disease, symptoms score, spirometry, and cellular composition obtained from induced sputum; furthermore, to account for possible confounding effects of inhaled corticosteroids (ICS) usage, long-term oral antibiotic treatment, and chronic colonization with *Pseudomonas aeruginosa*.

**Design:** Cross-sectional study.

**Patients:** Thirty patients with steady-state bronchiectasis.

**Results:** Mean (95% confidence interval [CI]) exhaled H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels were significantly elevated in patients with bronchiectasis compared to normal subjects: 1.1 (0.87 to 1.29) μM vs 0.3 (0.19 to 0.36) μM, respectively (p < 0.0001). Patients treated with ICS had similar values as steroid-naïve patients. The group of patients with *P aeruginosa* colonization showed a significantly increased concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> compared to the group without *P aeruginosa* colonization. Patients receiving long-term oral antibiotic treatment had significantly higher values of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> compared to those not receiving antibiotics. There was a significant positive correlation between H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and either the percentage of neutrophils in induced sputum or the extent of the disease as defined by high-resolution CT. A significant negative correlation was found between H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and FEV<sub>1</sub> percent predicted. Finally, there was a significant positive correlation between H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and the symptoms score.

**Conclusions:** Patients with bronchiectasis in stable condition showed increased levels of exhaled H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The above-mentioned levels were not decreased either by ICS or long-term oral antibiotic treatment, but were significantly affected by chronic colonization with *P aeruginosa*. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels could be an indirect index of neutrophilic inflammation, impairment of lung function, and extension and severity of the disease. (CHEST 2002; 121:81–87)

**Key words:** bronchiectasis; hydrogen peroxide; induced sputum; *Pseudomonas aeruginosa*; spirometry

**Abbreviations:** BSS = bronchiectasis severity score; CI = confidence interval; HRCT = high-resolution CT; ICS = inhaled corticosteroids; ROI = reactive oxygen intermediate

**B**ronchiectasis is a chronic suppurative lung disease of diverse etiology characterized by irreversible dilation of the bronchi and persistent purulent sputum production. High levels of proinflammatory cytokines are present in airway secretions, and neutrophils are the predominate cells in the airway lumen.<sup>1</sup> In patients

with bronchiectasis, bronchial damage is thought to exist due to neutrophil inflammatory products released in response to bacterial infection.<sup>2</sup> The patient's condition can be monitored by lung function tests and high-resolution CT (HRCT), although the latter requires exposure to radiation.<sup>3</sup> Chronic colonization with *Pseudomonas aeruginosa* is associated with extensive lung disease and severe airflow obstruction.<sup>4</sup>

Induced sputum is a relatively noninvasive, reliable, valid, and responsive technique to measure airway inflammation.<sup>5</sup> It can be applied even in the more severe conditions, and can be used repeatedly to investigate the inflammatory pattern as well as the effects of treatment on various diseases.<sup>6</sup>

\*From the Departments of Pneumology (Drs. Loukides and Panagou), Clinical Research (Dr. Papatheodorou), and Radiology (Dr. Lachanis), Athens Army General Hospital, Athens, Greece; and the Department of Pneumology (Drs. Bouros and Siafakas), Medical School, University of Crete, Greece.

Manuscript received October 25, 2000; revision accepted June 12, 2001.

Correspondence to: Stelios Loukides, MD, Smolika 2, 16673, Athens, Greece; e-mail ssaat@hol.gr

Oxidative stress, defined as an increased exposure to oxidants or decreased antioxidant capacities, is implicated in airway inflammatory diseases including bronchiectasis.<sup>7,8</sup> Oxygen-derived free radicals or metabolites, collectively termed *reactive oxygen species*, are important mediators of cell and tissue injury during inflammation and may be produced by several types of inflammatory cells.<sup>9</sup> It has been shown<sup>7</sup> that the increased oxidative burden in the lungs of patients with bronchiectasis is being reflected by increased levels of exhaled H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

In testing the hypothesis that reactive oxygen intermediates (ROIs) such as H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> are important in bronchial inflammation seen in bronchiectasis as well as in predicting the severity of the disease, it would be necessary and interesting to define which of the inflammatory cells express the main source of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in patients with bronchiectasis. Furthermore, it would be interesting to show whether the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration contributes to the development of bronchial inflammation and consequently to the extent of the disease, to disease severity, and to lung function impairment. We therefore measured H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations in the expired breath condensate of patients with steady-state bronchiectasis. We also assessed whether there is an association between H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration, airway inflammation as defined by induced sputum cytology, the extent of the disease as defined by a HRCT scoring scale system, the disease activity as defined by a symptoms score, and lung function impairment. To account for possible confounding effects of the use of inhaled corticosteroids (ICS), long-term oral

antibiotic treatment, or chronic colonization with *P aeruginosa*, further analysis was conducted after subclassifying the patients on the basis of treatment with ICS, oral antibiotics, and chronic colonization with *P aeruginosa*.

## MATERIALS AND METHODS

### Subjects

Fifteen normal subjects (12 men; mean [SD] age, 34 [8] years; range, 20 to 46 years; Table 1) were recruited from the staff of our department. All were nonsmokers and were free of both upper and lower respiratory tract infections for at least 6 weeks before this study. They had no history of chronic disease and were not receiving any regular medication. The subjects had a negative history of allergy (negative skin prick test results to common allergens), normal spirometry (FEV<sub>1</sub>, 95 [8]% predicted; range, 86 to 110% predicted), and normal bronchial reactivity with a provocative concentration of histamine causing a 20% fall in FEV<sub>1</sub> > 0.800 mg in all subjects.

Thirty patients (24 men; mean [SD] age, 39 [16] years; range, 19 to 58 years; FEV<sub>1</sub>, 69.5 [20]% predicted; range, 27 to 101% predicted) with diagnosed bronchiectasis were recruited from the outpatient clinic at Athens Army General Hospital (Table 1). All patients had a negative history of allergy (negative skin prick test result to common aeroallergens). None of our patients had reversibility with inhaled salbutamol of ≥ 12% of predicted FEV<sub>1</sub>. All patients had bronchiectasis diagnosed on the basis of clinical and radiologic features and confirmed by HRCT of the thorax. Patients were included in the study only if they were in clinically stable condition and had no evidence of acute infective exacerbation (lower or upper airways) for at least 4 weeks prior to the study. Ten patients with chronic colonization with *P aeruginosa* were separately studied and compared with the remaining 20 patients who had no evidence of any chronic colonization with bacteria (Table 1). Chronic colonization with *P aeruginosa* was

**Table 1—Subject Characteristics\***

Characteristics	Normal Subjects (n = 15)	Bronchiectasis				
		All (n = 30)	ICS (+) (n = 14)	ICS (-) (n = 16)	PA Group (n = 10)	PA Group (-) (n = 20)
Male/female sex, No.	12/3	24/6	10/4	14/2	8/2	16/4
Age, yr	34 (8)	39 (16)	37 (11)	41 (20)	42 (13)	37.5 (18)
Range	20–46	19–58	21–56	19–58	19–58	23–56
FEV <sub>1</sub> % predicted	95 (8)	69.5 (20)	71 (16)	69 (23)	59 (25)	72 (22)
Range	86–110	27–101	38–89	27–101	27–101	65–91
FVC % predicted	97 (7)	78 (14)	79 (12)	77 (16)	67 (9)	83.5 (17)
Range	88–119	38–114	38–106	42–114	38–81	61–114
HRCT score	Not done	9.5 (4.5)	10 (5)	9 (4)	14 (3)	8 (4)
Range		2–18	3–18	2–17	7–18	2–14
Disease duration, yr		11 (8)	13 (9)	9 (7)	14 (9)	9.5 (7.5)
Range		3–21	4–21	3–18	10–21	3–20
BSS		5 (1.7)	5 (2)	4.5 (1.3)	6 (1.4)	4 (1.4)
Range		2–8	2–8	2–7	3–8	2–8
IE/previous year	4 (2)	3 (1.5)	5 (3)	5 (3)	3.5 (2)	
Range		2–8	2–7	2–8	2–8	2–6

\*Data are presented as mean (SD) unless otherwise indicated.

IE/previous year = infective exacerbations in the previous year; ICS (+) = patients treated with ICS; ICS (-) = patients not treated with ICS; PA group = patients with *P aeruginosa* colonization; PA group (-) = patients without *P aeruginosa* colonization.

defined as more than three isolations of *P aeruginosa* from separate samples over 3 months.<sup>4</sup> All patients had negative sweat test results. Patients with cystic fibrosis, allergic bronchopulmonary aspergillosis, asthma,  $\alpha_1$ -antitrypsin deficiency, COPD, and atopic diseases were excluded. Asthma and COPD were excluded by using the American Thoracic Society criteria.<sup>10</sup> None of our patients were current smokers. Two patients had stopped smoking > 3 years prior to the study (mean smoking history, < 4 pack-years), and the remaining 28 patients had a negative smoking history. Twenty-one patients were receiving regular inhaled  $\beta_2$ -agonists (short or long acting) and 14 patients were receiving ICS (fluticasone propionate, 500 to 1,000  $\mu\text{g}/\text{d}$ , or budesonide, 400 to 800  $\mu\text{g}/\text{d}$ ). Eleven patients received long-term oral antibiotics (8 patients in the group with *P aeruginosa* colonization). No attempt was made to modify their treatment with inhaled steroids and long-term oral antibiotics, which remained unchanged for at least 3 months before sputum induction and  $\text{H}_2\text{O}_2$  collection. None of the patients were receiving inhaled or oral mucolytics, and none were receiving oxygen therapy. The study protocol was approved by the ethics committee of our hospital, and all subjects gave written informed consent.

#### Assessment of Disease Severity

Symptoms were assessed as previously described<sup>11</sup> using a different analog scale score. Patients were instructed to record accurately their daily symptoms (wheezing, sputum production, cough) for a 2-week period. Symptoms were scored by the patient every day using a subjective 0 to 3 scoring system, where 0 = none, 1 = mild, 2 = moderate, and 3 = severe. Sputum was collected over a 24-h period and was stored in clear plastic pots (50 mL). Sputum production was scored as follows: 0 = no sputum, 1 = less than a half pot, 2 = more than a half pot but less than a full pot, 3 = more than a pot per day. The symptoms were added for each day, and a mean daily score was calculated for the period of assessment (score range, 0 to 9).

#### Lung Function

$\text{FEV}_1$  and FVC were measured using a dry spirometer (Vicat, model VEP2; Mijnhard; Rotterdam, Holland). The best value of three maneuvers was expressed as a percentage of the predicted value. Airway responsiveness was measured only in normal subjects by histamine provocation challenge. The provocative concentration of histamine causing a 20% fall in  $\text{FEV}_1$  was calculated by linear interpolation of the semilogarithmic dose-response curve.

#### HRCT

A recent HRCT (within a week from entering the study) scan (GE 9800 Highlight Advanced; General Electric Medical Systems; Milwaukee, WI) of 30 patients was assessed and scored by the same radiologist, who was blinded to all other details concerning the patients' clinical and functional conditions. During the 7-day interval, none of our patients had an exacerbation of disease. Each lobe of both lungs was graded for bronchiectatic changes on a scale of 0 to 3 (lingula was scored as a separate lobe), giving a maximum of 18 points (0 = no bronchiectasis, 1 = one bronchopulmonary segment involved, 2 = more than one bronchopulmonary segment involved, and 3 = gross cystic bronchiectasis). Patients with emphysematous changes were excluded. This scoring has been used in a previous study<sup>3</sup> with low interobserver variation.

#### Collection of Expired Breath Condensate and $\text{H}_2\text{O}_2$ Measurement

A heat-exchanger unit (RHES, model 6V3; Jaeger; Wuerzburg, Germany) was used to produce cold air of  $-15^\circ\text{C}$  to  $-18^\circ\text{C}$  at an air flow of 80 L/min. A double-jacketed glass tube of 30 cm in length was specifically adapted to the cold-air system and a two-way unidirectional valve (Series 2-200; Hans Rudolph; Kansas City, MO) was connected to the tube in order to separate inspiration from expiration. After rinsing their mouths, the subjects were comfortably seated in a chair wearing nose clips and breathed in a relaxed manner (tidal breathing) for 10 min. The breath condensate was collected at the other end of the tube and was immediately stored at  $-70^\circ\text{C}$  for later analysis. According to this design, salivary contamination was highly unlikely and was easily observed, as the proximal cold-air connection was 20 cm away from the mouthpiece. Approximately 1 mL of breath condensate was collected in a 2-mL sterile plastic tube.  $\text{H}_2\text{O}_2$  measurements were performed the same day (minimum of 2 days and maximum of 20 days from collection time in all samples). To examine the repeatability of  $\text{H}_2\text{O}_2$  measurements within subjects, condensate was collected from 5 normal subjects and 10 patients on 2 consecutive days. To assess the stability of  $\text{H}_2\text{O}_2$  in the frozen condensate, 4 mL of condensate was collected from eight subjects (four patients). The above-mentioned concentration was divided into 1-mL aliquots, in which  $\text{H}_2\text{O}_2$  concentrations were determined after 2 days, 1 week, 2 weeks, and 3 weeks of storage (the maximum time between collection and measurement in the whole samples). Repeatability of exhaled  $\text{H}_2\text{O}_2$  measurements and stability of  $\text{H}_2\text{O}_2$  frozen samples were estimated as previously described.<sup>12</sup>

All condensate samples were tested for salivary contamination by determination of amylase activity. Amylase activity was carried out spectrophotometrically (kinetic method) using a commercial reagent kit (model 981362; KONE Instruments; Espoo, Finland). In this procedure,  $\alpha$ -amylase of the sample and the enzyme  $\alpha$ -glucosidase hydrolyzes the substrate p-nitrophenyl- $\alpha$ -D-maltoheptaoside to glucose and p-nitrophenol. The liberation of p-nitrophenol is followed at 405 nm ( $37^\circ\text{C}$ ) for 2 min. Two samples were spiked with saliva to ensure that it can be detected by our method. In all samples, no amylase was detected using the method described, suggesting no contamination of breath condensate with saliva. The samples that were spiked with saliva, showed levels of > 5,000 IU salivary amylase.

$\text{H}_2\text{O}_2$  concentration was determined by an enzymatic assay as previously described.<sup>13,14</sup> Briefly, 250  $\mu\text{L}$  of 420  $\mu\text{M}$  3', 3,5,5'-tetramethylbenzidine (dissolved in 0.42 mol/L citrate buffer, pH 3.8) and 10  $\mu\text{L}$  of 52.5 U/mL of horseradish peroxidase (HRP; Sigma Chemicals; St Louis, MO) were reacted with 250  $\mu\text{L}$  of the condensate for 20 min at room temperature. Subsequently, the mixture was acidified to a pH of 1 with 10  $\mu\text{L}$  of 18 N sulfuric acid. The reaction product was quantitated at the absorbency of 450 nm using a double-beam spectrophotometer (Uvicon 940; Kontron Instruments; Zurich, Switzerland). A standard curve was performed for the assay, with limit of determination of 0.1  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ . The investigator who performed the  $\text{H}_2\text{O}_2$  measurements was blinded to the clinical and functional status of the subjects as well as to the results of sputum inflammatory cells.

#### Sputum Induction and Processing

Sputum was induced by the inhalation of an aerosol 3.5% hypertonic saline solution generated by an ultrasonic nebulizer (model 2696; DeVilbiss; Somerset, PA) with modifications to improve its safety.<sup>6</sup> At least 2 mL of sputum was collected into a sterile container. The sample from the first cough was discarded, as this is heavily contaminated with squamous epithelial cells.<sup>15</sup>

An adequate sample was defined if the number of squamous epithelial cells was < 30% of the total number of inflammatory cells.<sup>16</sup> Cytospin slides were prepared and stained with May-Grunwald-Giemsa. The person who performed the differential cell counts was not aware of the clinical and functional status of the patients, as well as of the expired breath condensate measurements. Two slides were used for counting, and at least 300 inflammatory cells were counted for each slide.

### Statistical Analysis

Data concerning characteristics of the subjects are shown as mean (SD) and range. Data concerning the comparisons between the various parameters in the study groups are given as mean with 95% confidence intervals (CIs) for the differences. Parameters from patients and control subjects, as well as from all the subgroups, were compared using the Student's *t* test. Spearman's rank correlation coefficient was used to investigate the relation between the various parameters. A *p* value < 0.05 was considered significant.

## RESULTS

Repeated measurements on 2 consecutive days showed a mean (SD) within-subject difference of 0.07 (0.04)  $\mu\text{M}$  for patients and 0.03 (0.02)  $\mu\text{M}$  for normal subjects. The stability of  $\text{H}_2\text{O}_2$  in frozen samples showed no significant difference among the four measurements: 0.62 (0.41)  $\mu\text{M}$  after 2 days, 0.64 (0.4)  $\mu\text{M}$  after 1 week, 0.6 (0.4)  $\mu\text{M}$  after 2 weeks, and 0.6 (0.4)  $\mu\text{M}$  after 3 weeks (*p* = 0.55).

Mean  $\text{H}_2\text{O}_2$  levels were significantly increased in patients with bronchiectasis compared to normal subjects: 1.1  $\mu\text{M}$  (95% CI, 0.87 to 1.29  $\mu\text{M}$ ) vs 0.3  $\mu\text{M}$  (95% CI, 0.19 to 0.36  $\mu\text{M}$ ), respectively (*p* < 0.0001; Fig 1, top). Patients treated with ICS had similar values than those not receiving ICS: 1.15  $\mu\text{M}$  (95% CI, 0.81 to 1.5  $\mu\text{M}$ ) vs 1.02  $\mu\text{M}$  (95% CI, 0.73 to 1.3  $\mu\text{M}$ ), respectively (*p* = 0.55; Fig 1, top). Patients with *P aeruginosa* colonization had significantly higher levels of  $\text{H}_2\text{O}_2$  compared to patients without *P aeruginosa* colonization: 1.6  $\mu\text{M}$  (95% CI, 1.25 to 1.92  $\mu\text{M}$ ) vs 0.8  $\mu\text{M}$  (95% CI, 0.64 to 1.01  $\mu\text{M}$ ), respectively (*p* < 0.05; Fig 1, top).  $\text{H}_2\text{O}_2$  levels were significantly increased in patients receiving long-term oral antibiotic treatment compared to those not receiving any antibiotics: 1.3  $\mu\text{M}$  (95% CI, 0.95 to 1.7  $\mu\text{M}$ ) vs 0.9  $\mu\text{M}$  (95% CI, 0.67 to 1.16  $\mu\text{M}$ ), respectively (*p* < 0.05). The total cell count was significantly higher in patients with bronchiectasis compared to normal subjects:  $3.7 \times 10^6/\text{mL}$  (95% CI, 1.6 to  $3.9 \times 10^6/\text{mL}$ ) vs  $2.1 \times 10^6/\text{mL}$  (95% CI, 1.4 to  $2.3 \times 10^6/\text{mL}$ ) respectively (*p* < 0.001). The percentage of neutrophils obtained from induced sputum was significantly higher in patients with bronchiectasis than in normal subjects: 59% (95% CI, 54 to 63%) vs 27% (95% CI, 24 to 36%), respectively (*p* < 0.0001; Fig 1, bottom). Spu-

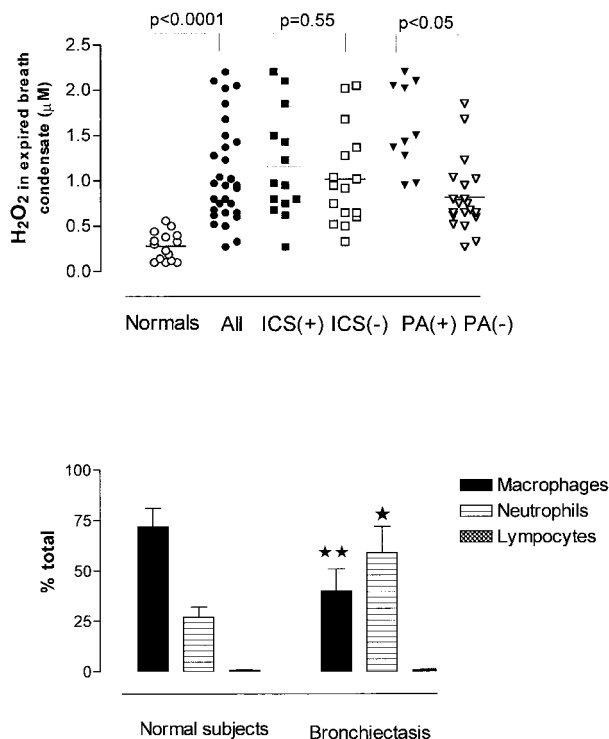


FIGURE 1. Top:  $\text{H}_2\text{O}_2$  concentrations in expired-breath condensate of patients with bronchiectasis (All; *n* = 30; closed circles), inhaled corticosteroid-treated patients (ICS+; *n* = 14; closed squares), inhaled corticosteroid-naïve patients (ICS-; *n* = 16; open squares), patients with *P aeruginosa* colonization (PA+; *n* = 10; closed triangles), patients without *P aeruginosa* colonization (PA-; *n* = 20; open triangles), and normal subjects (Normals; *n* = 15; open circles). Each symbol represents one individual. The concentration of  $\text{H}_2\text{O}_2$  was significantly higher in patients with bronchiectasis compared to normal subjects (*p* < 0.0001). Patients with *P aeruginosa* colonization had significantly higher values compared to patients without *P aeruginosa* colonization (*p* < 0.05). Horizontal bars represent mean values. Bottom: Percentage of differential cell counts in induced sputum in patients with bronchiectasis and in normal subjects. \* = Statistically significantly higher percentage of neutrophils in induced sputum of patients with bronchiectasis compared to normal subjects (*p* < 0.0001). \*\* = Statistically significant lower percentage of macrophages in induced sputum of patients with bronchiectasis compared to normal subjects (*p* < 0.0001). Data are shown as mean (SD).

tum macrophage levels were significantly lower in patients than in normal subjects: 40% (95% CI, 32 to 53%) vs 72% (95% CI, 65 to 84%), respectively (*p* < 0.0001; Fig 1, bottom).

Correlations are summarized in Table 2. There was a significant positive correlation between  $\text{H}_2\text{O}_2$  concentration in exhaled breath condensate and either the percentage of sputum neutrophils or the HRCT scoring scale system (*r* = 0.9, *p* < 0.0001; and *r* = 0.66, *p* < 0.0001, respectively; Fig 2, top left, A, and top right, B). A significant negative correlation was observed between FEV<sub>1</sub> percent predicted and  $\text{H}_2\text{O}_2$  concentration in exhaled breath



**Table 2—Associations Between H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Concentration and the Main Clinical, Inflammatory, and Functional Parameters in Patients With Bronchiectasis\***

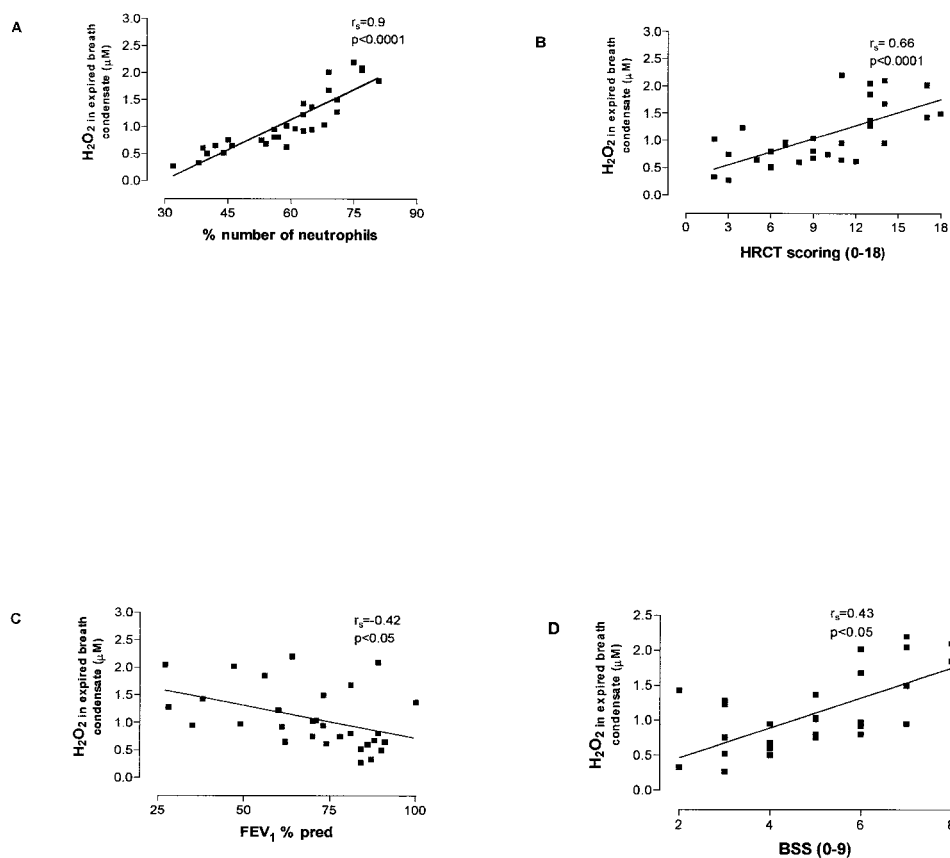
Variables	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		HRCT		FEV <sub>1</sub> % Predicted		BSS		Percentage of Neutrophils	
	r	p Value	r	p Value	r	p Value	r	p Value	r	p Value
Neutrophils %	0.9	< 0.0001†	0.6	< 0.0001†	- 0.39	< 0.05†	0.67	< 0.001†	0.6	< 0.0001†
HRCT	0.66	< 0.0001†			- 0.48	< 0.05†	0.4	< 0.05†		
FEV <sub>1</sub> % predicted	- 0.42	< 0.05†	- 0.48	< 0.05†			- 0.21	0.08	- 0.39	< 0.05†
BSS	0.43	< 0.05†	0.4	< 0.05†	- 0.21	0.08			0.67	< 0.001†
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>			0.66	< 0.0001†	- 0.42	< 0.05†	0.43	< 0.05†	0.9	< 0.0001†

\*Correlations were conducted using the Spearman's rank correlation coefficient.

†Significant correlation.

condensate ( $r = - 0.42$ ,  $p < 0.05$ ; Fig 2, *bottom left, C*). Finally, a significant positive correlation was observed between H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and the bronchiectasis severity score (BSS) [ $r = 0.43$ ,  $p < 0.05$ ; Fig 2, *bottom right, D*]. A negative correlation was found between FEV<sub>1</sub> percent predicted and either the percentage of sputum neutrophils or the HRCT scoring scale system ( $r = - 0.39$ ,  $p < 0.05$ ; and  $r = - 0.48$ ,  $p < 0.05$ , respectively). A significant positive correla-

tion was found between percent number of sputum neutrophils and HRCT scoring scale system ( $r = 0.6$ ,  $p < 0.0001$ ). No correlation was found between H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and the percentage of macrophages in induced sputum ( $r = - 0.14$ ,  $p = 0.54$ ). There was a significant positive correlation between BSS and either the percentage of sputum neutrophils or the HRCT scoring scale system ( $r = 0.67$ ,  $p < 0.001$ ; and  $r = 0.4$ ,  $p < 0.05$ , respectively). No correlation was



**FIGURE 2.** Correlation between H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in expired-breath condensate and (*top left, A*) percentage of neutrophils in induced sputum ( $r = 0.9$ ,  $p < 0.0001$ ), (*top right, B*) HRCT scoring scale system ( $r = 0.66$ ,  $p < 0.0001$ ), (*bottom left, C*) FEV<sub>1</sub> percent predicted ( $r = - 0.42$ ,  $p < 0.05$ ), and (*bottom right, D*) BSS ( $r = 0.43$ ,  $p < 0.05$ ). Closed squares indicate individual data points; pred = predicted.

observed between BSS and FEV<sub>1</sub> percent predicted, FVC percent predicted, duration of disease, and number of infective exacerbations in the previous year did not correlate with the any of the variables tested.

## DISCUSSION

We have demonstrated that patients with bronchiectasis showed elevated levels of exhaled H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, which were significantly correlated with the neutrophil differential counts in induced sputum, extent of disease, lung function impairment, and disease severity. We interpret these findings as confirmation that oxidative stress is increased in the airways of patients with bronchiectasis, and reflects the severity of the disease as well as the inflammatory process.

The concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> measured in exhaled-breath condensate may be considered as the net result of production vs scavenging. Compared with the cellular antioxidant scavenging systems, the extracellular space and airway have significantly less ability to scavenge reactive oxygen species.<sup>17</sup> Thus, the airway inflammation that occurs in bronchiectasis and other acute or chronic inflammatory processes involving the respiratory tract may be particularly likely to induce increased oxidant production that is detectable by increased H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in expired breath. Activation of inflammatory cells, including neutrophils, eosinophils, and macrophages, induces a respiratory burst, resulting in marked production of reactive oxygen species, including H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.<sup>18</sup> However, the precise role of ROIs in the pathophysiology of inflammatory process remains unclear due to the difficulty in identifying which cells produce ROIs in the inflamed lung and bronchi in each disease, as well as to specify the activated state of the above-mentioned cells. Therefore, the major problem is to determine a strong relationship between oxidant production and the development of an inflammatory reaction. Airway assessments performed by bronchoscopy biopsy and lung lavage have suggested that inflammation contributes to the development of bronchiectasis.<sup>2</sup> Most observations dealing with inflammatory cells in bronchiectasis have focused on neutrophils that undoubtedly impact on the inflammatory process and may alter the oxidant-antioxidant balance.<sup>19,9</sup> Similar results were observed in our study using a noninvasive method, such as sputum induction. The high percentage of neutrophils observed in this study, the strong correlation with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration, and the lack of correlation between macrophages and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration lead to the plausible explanation that in patients with bronchiectasis, neutrophils express the main source of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production, while macrophages seem not to be the

cells that generate H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. These findings are partially supported by previous observations,<sup>1,9</sup> where accumulation of neutrophils in bronchiectatic airways is associated with airways damage. Polymorphonuclear leukocytes release several molecules that mediate this damage, particularly proteases and oxidants.<sup>9,20</sup> This means that neutrophilic inflammation in the bronchiectatic airways is an endogenous source of oxidants leading to proteolytic and cellular damage and thereby contributes to oxidant stress.

In patients with bronchiectasis, a correlation between the extent of the disease and the degree of lung function impairment has already been shown.<sup>21</sup> Furthermore, the degree of lung function impairment and the number of neutrophils recovered from lung lavage appeared to be strongly correlated in most patients.<sup>19</sup> These earlier observations lead to the plausible explanation that lung function impairment expresses both the degree of neutrophilic inflammation in the airway lumen and the extent of the disease. These data are partially confirmed by our study, which also showed a strong positive correlation between neutrophil differential counts in induced sputum and disease severity. The last observation is the first, to our knowledge, to give evidence that the inflammatory process in the airway of patients with bronchiectasis is strongly associated with both the severity and extent of the disease. Taking all these points into consideration and based on previous observations where early knowledge of these parameters could be beneficial for the monitoring and treatment of the disease,<sup>3,22</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration seems to be an appropriate way to detect and follow up the course of these features. However, our study was designed as cross-sectional and could not strongly support the above-mentioned statements, which would require prospective controlled longitudinal data.

The present cross-sectional study cannot demonstrate a causal relationship between ICS usage, long-term oral antibiotic treatment, and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration. In fact, patients receiving ICS had similar values with steroid-naïve patients, while patients receiving long-term oral antibiotics consistently showed the highest values. Prospective, controlled studies are needed for that purpose. However, our findings are similar to those previously reported, where steroids have failed to alter H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production from polymorphonuclear leukocytes,<sup>23</sup> and antibiotics reduced effectively the amount of inflammation during an exacerbation but they are inadequate in dealing with persistent airway inflammation.<sup>24</sup> The finding that patients receiving long-term oral antibiotic treatment had the highest H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> values may be due to the fact that patients with the most severe infections were the only patients receiving antibiotic

therapy. The results of our study and the findings of others<sup>4,25</sup> suggest that *P aeruginosa* colonization in patients with bronchiectasis is associated with more extensive disease, more severe disease, and greater lung function impairment. However, it remains unclear whether *P aeruginosa* is the cause or the result of advanced disease. We additionally showed that chronic colonization with *P aeruginosa* may have a causal role in the oxidant-mediated lung injury. This is partially supported by previous observations where bacterial products released from *P aeruginosa* impair ciliary activity and lead to persistent inflammation by a pathway that involves neutrophils and is mediated by ROIs, which are not inhibited by antioxidants.<sup>26</sup>

In summary, exhaled H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, an index of oxidative stress, may be an indirect index of neutrophilic inflammation, lung function impairment, and severity and extension of disease. As collection of breath condensate is simple and noninvasive, it may be useful in patients with severe disease who may not tolerate more invasive investigations. If certain oxygen species contribute to airway inflammation in patients with bronchiectasis, then oxygen radical scavengers or antioxidants could play a critical role in treating the disease. However, no justification exists for this treatment, and further studies are needed to confirm this hypothesis.

#### REFERENCES

- 1 Eller J, Lapa-E-Silva JR, Poulter LW, et al. Cells and cytokines in chronic bronchial infection. *Ann NY Acad Sci* 1994; 725:331-345
- 2 Barker AF, Bardana EJ. Bronchiectasis: update of an orphan disease. *Am Rev Respir Dis* 1988; 137:969-978
- 3 Hansell DM. Bronchiectasis. *Radiol Clin North Am* 1998; 36:107-128
- 4 Evans SA, Turner SM, Bosch BJ, et al. Lung function in bronchiectasis: the influence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur Respir J* 1996; 9:1601-1604
- 5 Pizzichini E, Pizzichini MM, Efthimiadis A, et al. Indices of airway inflammation in induced sputum: reproducibility and validity of cell and fluid phase measurements. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154:308-317
- 6 Pizzichini MM, Pizzichini E, Clelland L, et al. Sputum in severe exacerbations of asthma: kinetics of inflammatory indices after prednisone treatment. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155:1501-1508
- 7 Loukides S, Horvath I, Wodehouse T, et al. Elevated levels of expired breath hydrogen peroxide in bronchiectasis. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158:991-994
- 8 Horvath I, Loukides S, Wodehouse T, et al. Increased levels of exhaled carbon monoxide in bronchiectasis: a new marker of oxidative stress. *Thorax* 1998; 53:867-870
- 9 Repine JE, Bast A, Lankhorst I. Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. *Oxidative Stress Study Group. Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156:341-357
- 10 American Thoracic Society. Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and asthma. *Am Rev Respir Dis* 1987; 136:225-244
- 11 Elborn JS, Jonhston B, Allen F, et al. Inhaled steroids in bronchiectasis. *Respir Med* 1992; 86:121-124
- 12 Jobsis Q, Raatgeep HC, Schellekens SL, et al. Hydrogen peroxide in exhaled air of healthy children: reference values. *Eur Respir J* 1998; 12:483-485
- 13 Dekhuijzen RPN, Aben KKH, Dekker I, et al. Increased exhalation of hydrogen peroxide in patients with stable and unstable chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154:813-816
- 14 Gallati H, Pracht I. Horseradish peroxidase: kinetic studies and optimization of peroxidase activity determination using the substrates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine. *J Clin Chem Clin Biochem* 1985; 23:453-460
- 15 Keatings VM, Jatakanon A, Worsdell YM, et al. Effect of inhaled and oral glucocorticoids on inflammatory indices in asthma and COPD. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155:542-548
- 16 Keatings VM, O'Connor BJ, Wright LG, et al. Late response to allergen is associated with increased concentrations on TNF- $\alpha$  and interleukin-5 in induced sputum. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 99:693-698
- 17 Heffner JE, Repine JE. Pulmonary strategies of antioxidant defense. *Am Rev Respir Dis* 1989; 140:531-554
- 18 Greening AP, Lowrie DB. Extracellular release of hydrogen peroxide by human alveolar macrophages: the relationship to cigarette smoking and lower respiratory tract infections. *Clin Sci* 1983; 65:661-664
- 19 Sepper R, Kontinen YT, Ding Y, et al. Human neutrophil collagenase (MMP-8), identified in bronchiectasis BAL fluid, correlates with severity of disease. *Chest* 1995; 107:1641-1647
- 20 Mendis AHW, Venaille TJ, Robinson BWS. Study of human epithelial cell detachment and damage: effects of proteases and oxidants. *Immunol Cell Biol* 1990; 68:95-105
- 21 Wong-You-Cheong JJ, Leahy BC, Taylor PM, et al. Airways obstruction and bronchiectasis: correlation with duration of symptoms and extent of bronchiectasis on computed tomography. *Clin Radiol* 1992; 45:256-259
- 22 Wilson CB, Jones PW, O'Leary CJ, et al. Systemic markers of inflammation in stable bronchiectasis. *Eur Respir J* 1998; 12:820-824
- 23 McLeish KR, Miller FN, Stelzer GT, et al. Mechanism by which methylprednisolone inhibits acute immune complex induced changes in vascular permeability. *Inflammation* 1986; 10:321-332
- 24 Ip M, Shum D, Lauder I, et al. Effects of antibiotics on sputum inflammatory contents in acute exacerbations of bronchiectasis. *Respir Med* 1993; 87:449-454
- 25 Ho PL, Chan KN, Ip MS, et al. The effect of *Pseudomonas aeruginosa* infection on clinical parameters in steady-state bronchiectasis. *Chest* 1998; 114:1594-1598
- 26 Dunn MM, Dunne M, Kamp DW. Polymorphonuclear leukocytes and *Pseudomonas aeruginosa* induced damage to a human pulmonary epithelial cell line. *J Infect Dis* 1990; 162:172-177

# The Relationships Among Hydrogen Peroxide in Expired Breath Condensate, Airway Inflammation, and Asthma Severity\*

Stelios Loukides, MD; Demosthenes Bouros, MD, FCCP;  
Georgios Papatheodorou, PhD; Panos Panagou, MD; and  
Nikolaos M. Siafakas, MD, PhD, FCCP

**Study objective:** To investigate which cells are the main source of hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) production in stable patients with asthma and the associations among  $H_2O_2$  levels, airway inflammation, and disease severity.

**Setting:** Inpatient respiratory unit and outpatient clinic in tertiary-care hospital.

**Patients:** Fifty stable asthmatic patients with disease severity ranging from mild to moderate.

**Methods:**  $H_2O_2$  was measured in expired breath condensate and was correlated with variables expressing both asthma severity (ie, FEV<sub>1</sub> percent predicted, peak expiratory flow rate [PEFR] variability, symptom score, and histamine airways responsiveness) and airway inflammation (ie, differential cell counts from induced sputum and levels of eosinophil cationic protein [ECP]).

**Results:** The mean (95% confidence interval [CI]) concentration of  $H_2O_2$  was significantly elevated in patients with asthma compared to that in control subjects (mean, 0.67  $\mu$ M [95% CI, 0.56 to 0.77  $\mu$ M] vs 0.2  $\mu$ M [95% CI, 0.16 to 0.24  $\mu$ M];  $p < 0.0001$ ). The difference was primarily due to the elevation of  $H_2O_2$  in patients with moderate asthma whose expired breath  $H_2O_2$  level of 0.95  $\mu$ M (95% CI, 0.76 to 1.12  $\mu$ M) was significantly higher from that of patients with mild-persistent and mild-intermittent asthma (mean, 0.59  $\mu$ M [95% CI, 0.47 to 0.7  $\mu$ M] and 0.27 [95% CI, 0.23 to 0.32  $\mu$ M], respectively;  $p < 0.0001$ ).  $H_2O_2$  concentration was positively related to sputum eosinophilia as well as to ECP concentration. A similar correlation was found between  $H_2O_2$  and neutrophils in patients with moderate asthma. A positive correlation was observed between  $H_2O_2$  level, symptom score, and PEFR variability.  $H_2O_2$  level was negatively related to FEV<sub>1</sub> percent predicted. Further analysis showed that only patients with moderate asthma who were not receiving inhaled steroids were found to have a strong relationship with the variables tested.

**Conclusions:** Eosinophils are the predominate cells that generate  $H_2O_2$  in all forms of the disease, while neutrophils might be responsible for the highest levels that are observed in the more severe forms of the disease. The role of  $H_2O_2$  concentration in predicting the severity of the disease as well as in the inflammatory process is limited and depends on the use of inhaled steroid therapy and the classification of the severity of the disease. (CHEST 2002; 121:338–346)

**Key words:** airway inflammation; hydrogen peroxide; severity; stable asthma

**Abbreviations:** CI = confidence interval; ECP = eosinophil cationic protein;  $H_2O_2$  = hydrogen peroxide; ICS = inhaled corticosteroids; NHLBI = National Heart, Lung, and Blood Institute; PD<sub>20</sub> = provocative dose of histamine causing a 20% fall in FEV<sub>1</sub>; PEFR = peak expiratory flow rate; ROS = reactive oxygen species

Asthma is a chronic lung disorder with the cardinal features of reversible airway obstruction, airway inflammation, and airway hyperresponsiveness.<sup>1</sup>

\*From the Department of Pneumology and Clinical Research Unit (Drs. Loukides, Papatheodorou, and Panagou), Athens Army General Hospital, Athens, Greece; and the Department of Pneumology (Drs. Bouros and Siafakas), Medical School, University of Crete, Heraklion, Greece.

Manuscript received December 20, 2000; revision accepted September 5, 2001.

Correspondence to: Stelios Loukides, MD, Smolika 2, 16673, Athens, Greece; e-mail [ssat@hol.gr](mailto:ssat@hol.gr)

Asthma severity may be defined in various ways such as by symptom score, drug therapy requirements, and the results of lung function tests. The technique of induced sputum, a validated research tool, is being widely used to identify cellular factors that may be responsible for the inflammatory basis of the disease.<sup>2</sup>

Oxidative stress plays an important pathogenetic role in many inflammatory diseases including asthma.<sup>3,4</sup> The activation of inflammatory cells such as neutrophils, eosinophils, and macrophages is seen in

patients with asthma as well as in those with other inflammatory airway diseases. Activated inflammatory cells respond with a respiratory burst, which results in the production of reactive oxygen species (ROS) such as hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).<sup>5</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reflects the underlying state of oxidative stress and has been measured in exhaled breath condensate, a simple noninvasive technique that is highly reproducible,<sup>6</sup> which reflects abnormalities that are noted in specimens obtained bronchoscopically<sup>7</sup> and in the sputum.<sup>8</sup>

However, a number of important issues regarding the value of ascertaining H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels in asthma patients remain unresolved, the main one being whether the oxidative stress seen in stable patients with asthma contributes to airway inflammation as well as to the classification of the severity. Our primary aim was to evaluate whether there is an association between H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration in expired breath condensate and airway inflammation or disease severity. Furthermore, we investigated which cells are the main source of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in stable patients with asthma and whether these cells differ according to the severity classification as well as according to the use of inhaled corticosteroids (ICS). As indexes of airway inflammation in sputum, we studied validated variables, including differential cell counts and eosinophil cationic protein (ECP) levels. Disease severity was assessed by a symptom score, the results of lung function tests, and airway responsiveness to histamine. To account for the possible confounding effects of ICS, further analysis was conducted after subdividing the patients on this basis.

## MATERIALS AND METHODS

### Patients

Fifty nonsmoking stable patients with asthma who were attending the asthma outpatient clinic and 15 healthy, nonatopic, nonsmoking control subjects (Table 1) participated in the study. Thirty-two asthma patients were atopic, as judged by positive responses to skin prick tests of six common allergens and the elevated serum level of IgE. A diagnosis of asthma was established according to the National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI) guidelines for the diagnosis and management of asthma.<sup>1</sup> Patients were included in the study only if they were clinically stable and had no evidence of acute exacerbation for at least 4 weeks prior to the study. Twenty patients were receiving therapy with ICS (fluticasone propionate, 500 to 1000 µg daily, or budesonide, 400 to 800 µg daily). None was receiving any other anti-inflammatory treatment, including therapy with leukotriene antagonists, theophylline, inhaled or oral mucolytics, or oxygen. Twenty-two patients were receiving long-acting β<sub>2</sub>-agonists twice a day (some of them occasionally required therapy with short-acting β<sub>2</sub>-agonists as relief medication), while the remaining 28 patients were receiving therapy only with short-acting β<sub>2</sub>-agonists as a relief medication.

**Table 1—Subjects Characteristics\***

Characteristics	Patients						
	Control Subjects (n = 15)	All Patients (n = 50)	ICS (+) (n = 20)	ICS (-) (n = 20)	Mild-Intermittent Asthma (n = 10)	Mild-Persistent Asthma (n = 20)	Moderate Asthma (n = 20)
Age, yr	30 (4) (19–37)	29 (6) (19–43)	30 (5) (19–36)	28 (7) (19–43)	30.5 (6) (22–43)	29 (5) (19–36)	29 (7) (19–43)
FEV <sub>1</sub> , % predicted	95 (3) (87–121)	82 (16) (49–110)	81 (14) (49–101)	76 (18) (59–110)	96 (5) (84–104)	92 (7) (80–110)	64 (9) (41–74)
PEFR variability, %	ND	12.5 (2) (7–34)	10 (2) (8–21)	14 (2.5) (7–34)	7 (2) (7–14)	12 (4) (10–24)	15 (6) (11–34)
Eosinophils in induced sputum, %	0.3 (0.7) (0–2)	7 (4) (0–20)	5 (1.5) (0–15)	9 (3) (2–20)	2 (1) (0–3)	5 (3) (1–15)	11.5 (6) (3–20)
Symptom score†	ND	6 (2.5) (2–12)	6.5 (2) (3–11)	7 (2.5) (4–12)	3 (0.8) (2–4)	5 (1.4) (3–8)	8 (2) (4–12)
ECP, ng/mL	19 (16) (0–132)	364 (579) (0–2850)	256 (357) (0–986)	624 (776) (0–2850)	58 (55) (0–178)	171 (336) (0–1084)	710 (712) (5–2850)

\*Values given as mean (SD) (range). ND = not determined; (+) = receiving ICS; (-) = not receiving ICS.

†Scale, 0 to 12.

Healthy subjects had a negative history of allergy (*ie*, negative responses to skin prick tests for common allergens), normal spirometry results, and normal bronchial reactivity with a provocative dose of histamine causing a 20% fall in FEV<sub>1</sub> (PD<sub>20</sub>) of > 0.800 mg (mean, 1.30 mg; range, 0.98 to 1.7 mg) in all healthy subjects.

The Ethics Committee of Athens Army General Hospital approved the study protocol, and all participants gave informed written consent.

#### Assessment of Disease Severity

On enrollment into the study, all patients with mild asthma underwent histamine challenge (*ie*, PD<sub>20</sub>, 0.273 mg; range, 0.05 to 0.61 mg). All the patients with asthma were instructed to record accurately for 2 weeks their daily asthma symptoms (*ie*, cough, daytime wheezing, nighttime asthma, and daytime breathlessness), bronchodilator requirements, and peak expiratory flow rate (PEFR) measurements twice daily (morning and evening).<sup>9</sup> Simultaneously, they had to comply with the terms of receiving their regular medication. The foresaid asthma symptoms were scored by the patients every day using a subjective scoring system of 0 to 3 (0, none; 1, mild; 2, moderate; 3, severe). The symptoms were added for each day, and a mean daily score was extracted for the period of assessment. No attempt was made to modify their treatment, which remained unchanged for 4 weeks before sputum induction and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> collection. There were no differences in lung function (*ie*, FEV<sub>1</sub> and PEFR) between days 1 and 14 of the period during which disease severity was assessed.

#### Classification of Asthmatic Subjects According to Asthma Severity

We used the recommendations for the classification of asthma severity of the NHLBI workshop on the global strategy for asthma<sup>1</sup> to classify patients into the following three asthma categories: mild intermittent; mild persistent; and moderate. Ten patients were classified as having mild-intermittent asthma, 20 patients were classified as having mild-persistent asthma, and the remaining 20 patients were classified as having moderate asthma (Table 1).

#### Analysis for the Effects of ICS

In a subanalysis performed to account for the use of ICS, we excluded patients with mild-intermittent asthma. The remaining 40 patients were divided into the following two subgroups: those who received ICS (*n* = 20); and those who were steroid-naïve (*n* = 20). Patients with mild-persistent asthma and moderate asthma also were subdivided according to the use of ICS (10 patients in each subgroup received ICS).

#### Lung Function

FEV<sub>1</sub> was measured using a dry spirometer (Vica-test; Mijnhard; Rotterdam, Netherlands). The best value of three maneuvers was expressed as a percentage of the predicted value. Airway responsiveness was measured by histamine provocation challenge<sup>10</sup> in healthy subjects and in patients with mild asthma. The PD<sub>20</sub> was calculated by the interpolation of the semi-logarithmic dose-response curve. The diurnal PEFR variation was calculated by the formula (evening and morning PEFR/the mean of the evening and morning PEFR) × 100, and the results are shown as the mean daily variation.

#### Collection of Expired Breath Condensate and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Measurement

Expired breath condensate was collected in the morning using an alternative way of cooling the tubes in order to enhance the formation of condensate. A heat-exchanger unit (RHES; Jaeger; Wuerzburg, Germany) was used to produce cold air of -15 to -18°C at an airflow of 80 L/min. A double-jacketed glass tube of 30 cm length was specifically adapted to the cold air system and a two-way unidirectional valve (Hans Rudolf; Kansas City, MO) was connected to the tube in order to separate inspiration from expiration. After rinsing their mouths, study participants were seated comfortably in a chair wearing nose clips and breathed in a relaxed manner (*ie*, tidal breathing) for 10 min. The breath condensate was collected at the other end of the tube and was immediately stored at -70°C for later analysis. According to this design, salivary contamination was highly unlikely and was easily observed, as the proximal cold air connection was 20 cm from the mouthpiece. Approximately 1 mL breath condensate was collected in a 2-mL sterile plastic tube. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> measurements were performed on the same day. To examine the repeatability of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> measurements within subjects, the condensate was collected from 5 healthy subjects and from 10 patients on 2 consecutive days. To assess the stability of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the frozen condensate, 4 mL condensate was collected from eight subjects (four patients). The above concentration was divided into 1-mL aliquots, in which H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations were determined after 2 days, 1 week, 2 weeks, and 3 weeks of storage (which was the maximum time between collection and measurement in the whole samples). The repeatability of exhaled H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> measurements and the stability of the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> frozen samples was estimated as previously described.<sup>6</sup>

All condensate samples were tested for salivary contamination by the determination of amylase activity. Amylase activity was carried out spectrophotometrically (kinetic method) using a commercial reagent kit (KONE Instruments; Espoo; Finland). In this procedure, the  $\alpha$ -amylase of the sample and the enzyme  $\alpha$ -glucosidase hydrolyzes the substrate *p*-nitrophenyl- $\alpha$ -D-maltoheptaoside to glucose and *p*-nitrophenol. The liberation of *p*-nitrophenol is followed at 405 nm (37°C) for 2 min. Two samples were spiked with saliva to ensure that this could be detectable by our method of detection. In all the samples, no amylase was detected using the method described, suggesting that no contamination of breath condensate with saliva had occurred. The samples, which were spiked with saliva, showed levels of > 5000 IU salivary amylase.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration was determined by an enzymatic assay, as previously described.<sup>11,12</sup> Briefly, 250  $\mu$ L 420  $\mu$ M 3',3,5,5'-tetramethylbenzidine (dissolved in 0.42 M citrate buffer; pH 3.8) and 10  $\mu$ L 52.5 U/mL horseradish peroxidase (Sigma Chemical Co; St Louis, MO) were reacted with 250  $\mu$ L condensate for 20 min at room temperature. Subsequently, the mixture was acidified to a pH of 1 with 10  $\mu$ L 18 N sulfuric acid. The reaction product was quantitated at an absorbency of 450 nm using a double-beam spectrophotometer (Uvicon 940; Kontron Instruments; Zurich, Switzerland). A standard curve was performed for the assay with a limit of determination of 0.1  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

#### Sputum Induction and Processing

Sputum was induced by the inhalation of an aerosol of 3.5% hypertonic saline solution that was generated by an ultrasonic nebulizer (model 2696; DeVilbiss; Somerset PA)<sup>13</sup> that was used with modifications to improve its safety.<sup>14</sup> At least 2 mL sputum was collected into a sterile container. The sample from the first cough was discarded as it was heavily contaminated with squamous epithelial cells. An adequate sample was defined if the

number of squamous epithelial cells was < 30% of the total number of inflammatory cells.<sup>15</sup> Cytospin slides were prepared and stained with May-Grunwald-Giemsa stain. The person who performed the differential cell counts was not aware of the clinical and functional status of the patients or of the expired breath condensate measurements. Two slides were used for counting, and at least 400 inflammatory cells were counted for each slide. The ECP was analyzed as previously described<sup>14</sup> using a fluorometric enzyme immunoassay (Pharmacia; Uppsala, Sweden). The inflammatory cells in sputum are shown as both absolute counts (*ie*, number of cells per gram of sputum) and as percentages of the total number of nonsquamous cells. Condensate and sputa were obtained after the period during which the disease severity was assessed. Sputum measurements were performed on the same day for all the patients.

### Statistical Analysis

Data concerning the characteristics of participants are shown as the mean (SD; range). Data concerning the comparisons among the various parameters in the study groups are given as the mean with 95% confidence intervals (CIs). The data were examined for normal distributions, and when the data were not normally distributed the nonparametric Mann-Whitney test was used for statistical comparisons. For normally distributed data, paired *t* tests were used for statistical comparisons. The normality of distribution was tested with the Shapiro Wilks test. Data from the whole study group of asthma patients were not normally distributed, while the data from subgroups of asthma patients were normally distributed. Parameters from patients with mild-intermittent, mild-persistent, and moderate asthma were compared using the one-way analysis of variance with an appropriate *post hoc* test (*ie*, Bonferroni correction) for multiple comparisons. Pearson's correlation coefficient was used to investigate the relation between the normally distributed parameters. For non-normally distributed parameters, Spearman's correlation coefficient was used. The co-dependence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production both from neutrophils and eosinophils in patients with moderate asthma was estimated by multilinear regression analysis (SPSS, version 10.0 Windows; SPSS; Chicago, IL). As a dependent variable, we used the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration in expired breath condensate, and as independent variable we used the percentage of eosinophils and neutrophils in induced sputum samples. A *p* value < 0.05 was considered to be significant.

## RESULTS

### H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Concentration in Expired Breath Condensate, Airway Inflammatory Cells, and ECP in Induced Sputum

Repeated measurements on 2 consecutive days showed a mean within-subject difference of 0.09  $\mu$ M (SD, 0.03  $\mu$ M) for patients and 0.07  $\mu$ M (SD, 0.04  $\mu$ M) for healthy subjects. The stability of the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in frozen samples showed no significant differences among the four measurements (after 2 days: mean, 0.54  $\mu$ M [SD, 0.21  $\mu$ M]; after 1 week: mean, 0.58  $\mu$ M [SD, 0.3  $\mu$ M]; after 2 weeks: mean, 0.6  $\mu$ M [SD, 0.3  $\mu$ M]; after 3 weeks: mean, 0.57  $\mu$ M [SD, 0.4  $\mu$ M]; *p* = 0.43).

The mean H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration in expired breath condensate of all asthmatic subjects was significantly

higher than that from healthy control subjects (0.67  $\mu$ M [95% CI, 0.56 to 0.77  $\mu$ M] vs 0.2  $\mu$ M [95% CI, 0.16 to 0.24  $\mu$ M], respectively; *p* < 0.0001) [Fig 1, *top*]. The difference was primarily due to the elevation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations in patients with moderate asthma whose expired breath H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> level was significantly higher than that of those with mild-intermittent and mild-persistent asthma (0.94  $\mu$ M [95% CI, 0.76 to 1.12  $\mu$ M], 0.27  $\mu$ M [95% CI, 0.23 to 0.32  $\mu$ M], and 0.59  $\mu$ M [95% CI, 0.47 to 0.7  $\mu$ M], respectively; *p* < 0.0001) [Fig 1, *top*]. Patients with mild-intermittent, mild-persistent, and moderate asthma had significantly higher levels of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> compared with those of healthy subjects (*p* = 0.04, *p* < 0.001, and *p* < 0.0001, respectively). There was no significant difference between patients with atopy and those with no atopy (0.7 [95% CI, 0.6 to 0.8] vs 0.6 [95% CI, 0.4 to 0.8], respectively; *p* = 0.08). All four groups of asthma patients had higher levels of sputum eosinophilia than did control subjects, with a progressive increase that was related to asthma severity (control subjects, 0.3% [95% CI, 0.1 to 0.6%] and  $7 \times 10^3$ /g [95% CI, 2 to  $8 \times 10^3$ /g]; all asthma patients, 7% [95% CI, 2 to 9%] and  $98 \times 10^3$ /g [95% CI, 71 to  $114 \times 10^3$ /g]; patients with mild-intermittent asthma, 2% [95% CI, 0.8 to 3%] and  $21 \times 10^3$ /g [95% CI, 14 to  $27 \times 10^3$ /g]; patients with mild-persistent asthma, 5% [95% CI, 2 to 7%] and  $74 \times 10^3$ /g [95% CI, 63 to  $81 \times 10^3$ /g]; and patients with moderate asthma, 11.5% [95% CI, 4 to 13%] and  $164 \times 10^3$ /g [95% CI, 137 to  $198 \times 10^3$ /g]) [Fig 1, *middle*; Table 1; *p* < 0.001 and significantly higher in patients with moderate asthma]. The percentage and number of macrophages were significantly lower in patients with moderate asthma compared both to those with mild-intermittent asthma and mild-persistent asthma (moderate asthma, 57% [95% CI, 51 to 60%] and  $518 \times 10^3$ /g [95% CI, 435 to  $562 \times 10^3$ /g]; mild-intermittent asthma, 72% [95% CI, 67 to 74%] and  $737 \times 10^3$ /g [95% CI, 637 to  $816 \times 10^3$ /g]; and mild-persistent asthma, 70% [95% CI, 69 to 75%] and  $621 \times 10^3$ /g [95% CI, 577 to  $703 \times 10^3$ /g]) [Fig 1, *middle*; *p* < 0.0001]. Furthermore, there were significant differences in the relative neutrophil counts between patients with moderate asthma and patients both with mild-intermittent and mild-persistent asthma (moderate asthma, 31% [95% CI, 28 to 35%] and  $255 \times 10^3$ /g [95% CI, 211 to  $273 \times 10^3$ /g]; mild-intermittent asthma, 25% [95% CI, 20 to 26%] and  $224 \times 10^3$ /g [95% CI, 195 to  $237 \times 10^3$ /g]; and mild-persistent asthma, 24% [95% CI, 21 to 25%] and  $201 \times 10^3$ /g [95% CI, 189 to  $220 \times 10^3$ /g]) [Fig 1, *middle*; *p* < 0.05]. Significant differences among the groups were detected for the ECP concentration with a progressive increase, which was related to

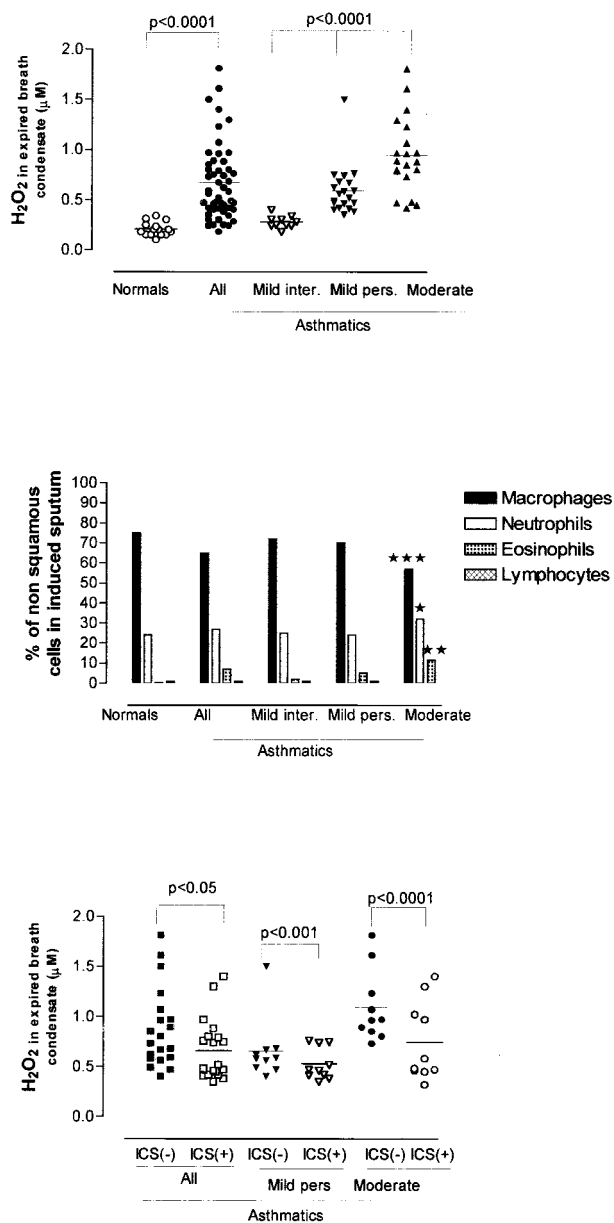


FIGURE 1. *Top*:  $H_2O_2$  concentration in the expired breath condensate of patients with asthma (●, all subjects [n = 50]; ▽, patients with mild-intermittent asthma [n = 10]; ▼, patients with mild-persistent asthma [n = 20]; ▲, patients with moderate asthma [n = 20]; ○, healthy subjects [normals] [n = 15]). Each symbol represents one individual. The concentration of  $H_2O_2$  was significantly higher in patients with asthma compared to healthy subjects ( $p < 0.0001$ ). Patients with moderate asthma had significant higher values compared to those with mild-intermittent and mild-persistent asthma ( $p < 0.0001$ ). The horizontal bar represents mean values. *Middle*: the percentage and number of differential cell counts in the induced sputum of patients with asthma (ie, all patients, patients with mild-intermittent asthma, patients with mild-persistent asthma, and patients with moderate asthma) and in healthy subjects. \* = a statistically significant higher percentage of neutrophils in the induced sputum of patients with moderate asthma compared to healthy subjects and patients in the other asthma subgroups ( $p < 0.05$ ). \*\* = a statistically significant higher percentage of eosinophils in the induced sputum of patients with moderate asthma compared to healthy subjects and patients in the other asthma subgroups ( $p < 0.001$ ). \*\*\* = a significantly lower percentage of macrophages in the

asthma severity (Table 1;  $p < 0.001$  significantly higher concentration in patients with moderate asthma).

#### Analysis for the Effects of ICSs

There was a significant difference in the mean  $H_2O_2$  concentrations between asthma patients who were treated with ICS and those who were steroid-naive ( $0.66 \mu\text{M}$  [95% CI, 0.52 to  $0.8 \mu\text{M}$ ] vs  $0.87 \mu\text{M}$  [95% CI, 0.68 to  $1.05 \mu\text{M}$ ], respectively;  $p < 0.05$ ) [Fig 1, *bottom*]. Similar results regarding the use of ICS were observed after subdividing patients into those with mild-persistent asthma ( $0.65 \mu\text{M}$  [95% CI, 0.4 to  $0.87 \mu\text{M}$ ] vs  $0.52 \mu\text{M}$  [95% CI, 0.41 to  $0.64 \mu\text{M}$ ], respectively;  $p < 0.001$ ) and moderate asthma ( $1.09 \mu\text{M}$  [95% CI, 0.83 to  $1.34 \mu\text{M}$ ] vs  $0.74 \mu\text{M}$  [95% CI, 0.46 to  $1.02 \mu\text{M}$ ], respectively;  $p < 0.0001$ ) [Fig 1, *bottom*]. Patients treated with ICS had markedly lower eosinophil counts and concentrations of ECP (Table 1;  $p < 0.001$  and  $p < 0.0001$ , respectively).

#### Associations Among $H_2O_2$ Concentration, Inflammatory Indexes in Induced Sputum, Lung Function, and Severity Scores in Subjects With Asthma

In all asthmatic subjects, there was a positive correlation between  $H_2O_2$  levels and both ECP concentrations and eosinophil counts. (Table 2). Similar results were observed between  $H_2O_2$  levels and both symptom score and PEFR variability (Table 2).  $H_2O_2$  was inversely correlated with  $FEV_1$  percent predicted (Table 2).  $H_2O_2$  levels did not correlate with macrophage and neutrophil counts as well as with the  $PD_{20}$  (see Table 2 for the sputum results;  $PD_{20}$ ,  $r = 0.02$  and  $p = 0.77$ ). The above correlations did not remain significant after dividing the patients on the basis of disease severity and ICS use. They were present only in patients with moderate asthma (Fig 2, *top*) and in patients not treated with ICS (Table 2). Furthermore, in patients with

induced sputum of patients with moderate asthma compared to healthy subjects and patients in the other asthma subgroups ( $p < 0.0001$ ). *Bottom*:  $H_2O_2$  concentration in the expired breath condensate of patients with asthma who were treated with ICS (+; □, all patients [n = 20]; ▽, patients with mild-persistent asthma [n = 10]; ○, patients with moderate asthma [n = 10]) and in that of those not treated with ICS (- (■, all patients [n = 20]; ▼, patients with mild-persistent asthma [n = 10]; ●, patients with moderate asthma [n = 10]). Each symbol represents one individual. The concentration of  $H_2O_2$  was significantly lower in patients treated with ICS compared to steroid-naive patients (all patients,  $p < 0.05$ ; patients with mild-persistent asthma,  $p < 0.001$ ; patients with moderate asthma,  $p < 0.0001$ ). The horizontal bar represents mean values.



**Table 2—Associations Among H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Concentration in Expired Breath Condensate, Inflammatory Indices in Induced Sputum, Clinical Parameters, and Lung Function Parameters\***

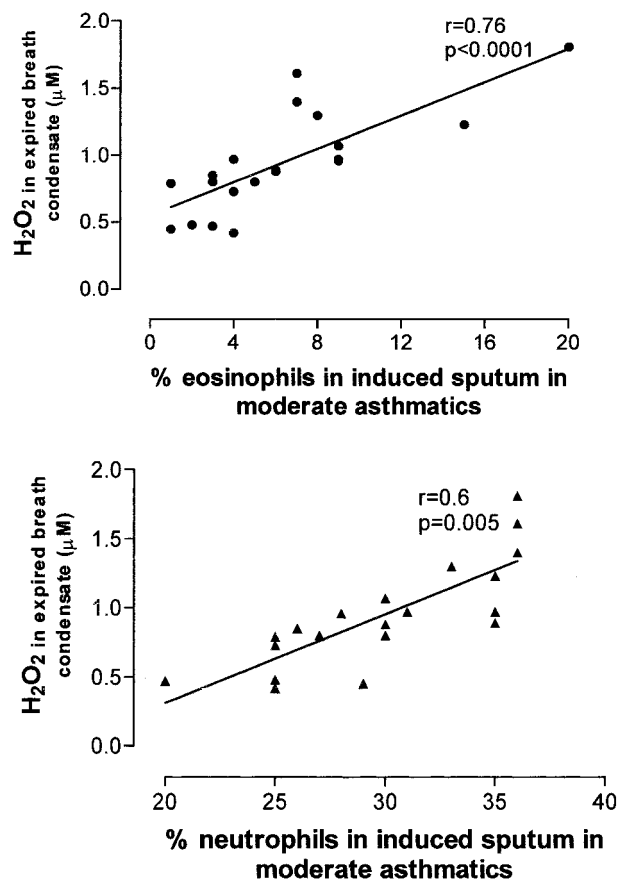
Variables	All		Mild-Intermittent Asthma		Mild-Persistent Asthma		Moderate Asthma		ICS (-)		ICS (+)	
	r Value	p Value	r Value	p Value	r Value	p Value	r Value	p Value	r Value	p Value	r Value	p Value
Macrophages, %	0.05	0.4	0.11	0.6	0.03	0.8	0.14	0.55	0.12	0.6	0.11	0.5
Neutrophils, %	0.13	0.4	0.14	0.7	0.04	0.9	0.6	<b>0.005</b>	0.1	0.7	0.11	0.13
Eosinophils, %	0.48	<b>0.0004</b>	0.24	0.15	0.006	0.8	0.76	<b>&lt; 0.0001</b>	0.67	<b>0.001</b>	0.57	<b>0.007</b>
ECP	0.5	<b>0.0002</b>	0.23	0.25	0.34	0.1	0.61	<b>&lt; 0.0001</b>	0.76	<b>&lt; 0.0001</b>	0.55	<b>0.01</b>
FEV <sub>1</sub> , % pred	-0.68	<b>&lt; 0.0001</b>	-0.1	0.7	-0.005	0.8	-0.5	<b>0.01</b>	-0.64	<b>0.001</b>	0.14	0.2
PEFR variability	0.3	<b>&lt; 0.05</b>	0.24	0.5	0.04	0.6	0.49	<b>0.002</b>	0.54	<b>0.001</b>	0.21	0.3
Symptom score	0.55	<b>&lt; 0.0001</b>	0.1	0.7	0.14	0.5	0.46	<b>0.005</b>	0.43	<b>0.002</b>	0.19	0.1

\*Bold letters indicate significant correlation. See Table 1 for abbreviations not used in the text.

moderate asthma a positive correlation between neutrophils counts and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels ( $r = 0.6$ ;  $p = 0.005$ ) was observed (Table 2; Fig 2, *bottom*). When we further analyzed the patients with mild-persistent asthma and moderate asthma on the basis of ICS use, the above significant correlations existed only in those with moderate asthma who had not been treated with ICS (Table 3). However, the patients with moderate asthma who had been treated with ICS showed positive correlations both with sputum neutrophilia and eosinophilia (Table 3). A statistically significant correlation also was found when we analyzed the codependence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production from both eosinophils and neutrophils in patients with moderate asthma (eosinophils, adjusted  $R^2 = 0.72$ ;  $p = 0.04$ ; neutrophils,  $p = 0.014$ ).

## DISCUSSION

In a cross-sectional study from a wide spectrum of patients with asthma of stable severity, we have demonstrated for the first time that the increased oxidative stress, as assessed by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels in expired breath condensate, is related to eosinophilic inflammation, while in more severe forms of the disease neutrophils might participate to a lesser extent. This increase in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels is affected by both the severity of the disease and the use of ICS. We interpret these findings as a confirmation that oxidative stress is increased in the airways of stable patients with asthma, but its role in predicting the disease severity as well as the inflammatory process is limited and is based on the use of ICS and the classification severity. We did not study patients with severe asthma for two main reasons. First, the number of such patients in stable condition in our department was limited. Additionally, the majority of such patients have persistent exacerbations for multiple reasons, a fact that might significantly affect our data.



**FIGURE 2.** Correlation between H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels in expired breath condensate and (*top*) the percentage and number of eosinophils in the induced sputum of patients with moderate asthma ( $r = 0.76$ ;  $p < 0.0001$ ) and (*bottom*) the percentage and number of neutrophils in the induced sputum of patients with moderate asthma ( $r = 0.6$ ;  $p = 0.005$ ).

Oxidative stress describes an imbalance between ROS and antioxidants. The normal production of oxidants is counteracted by several antioxidative mechanisms in the human respiratory tract. The major intracellular antioxidants in the airways are

**Table 3—Associations Among H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Concentration in Expired Breath Condensate, Inflammatory Indices in Induced Sputum, and Clinical and Lung Function Parameters in Patients with Mild-Persistent and Moderate Asthma\***

Variables	Mild Persistent				Moderate			
	ICS (–)		ICS (+)		ICS (–)		ICS (+)	
	r Value	p Value	r Value	p Value	r Value	p Value	r Value	p Value
Macrophages, %	0.01	0.65	0.14	0.1	0.13	0.21	0.14	0.55
Neutrophils, %	0.13	0.4	0.14	0.8	0.34	<b>0.04</b>	0.24	<b>0.05</b>
Eosinophils, %	0.21	0.06	0.08	0.55	0.68	<b>&lt; 0.0001</b>	0.36	<b>&lt; 0.05</b>
ECP	0.2	0.08	0.03	0.25	0.64	<b>&lt; 0.0001</b>	0.33	<b>&lt; 0.05</b>
FEV <sub>1</sub> , % predicted	–0.07	0.11	–0.07	0.7	–0.54	<b>0.002</b>	–0.12	0.13
PEF variability	0.10	0.23	0.09	0.5	0.4	<b>&lt; 0.05</b>	0.19	0.09
Symptom score	0.09	0.2	0.1	0.7	0.44	<b>0.003</b>	0.20	0.07

\*Bold letters indicate significant correlation. See Table 1 for abbreviations not used in the text.

catalase, superoxide dismutase, and glutathione, which are formed by the selenium-dependent enzyme glutathione peroxidase. An increased concentration of exhaled H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> may represent an increased production of oxidants and/or a reduced free radical-scavenging capacity in the airways of asthmatic subjects. In addition to the increased production of ROS in patients with asthma, there may be a deficiency of antioxidant defenses. Glutathione peroxidase activity is reduced in the platelets of asthmatic patients and is correlated with the reduction in serum selenium concentrations.<sup>16</sup> There is a reduced superoxide dismutase activity in both cells obtained by BAL and in the epithelial cells of asthmatic patients.<sup>17</sup> Interestingly, there is no abnormality in antioxidant levels in patients with mild asthma, and specifically in those whose disease is being controlled with ICS. Our results showed that oxidative stress was not increased in patients with mild-intermittent asthma, irrespective of their use of ICS, and is significantly affected by the use of ICS in patients with all forms of the disease. Taking all these points together, we interpret our findings as following: in patients with mild asthma, antioxidant defenses are adequate to overcome the increased production of ROS. However, as the severity of the disease progresses the production of ROS overcomes the antioxidant defenses. In patients with more severe forms of the disease, in which the increased production of ROS overcomes the antioxidant defenses, therapy with ICS significantly affect the imbalance between oxidants and antioxidants by decreasing the ROS production through the control of the inflammatory process.

Many inflammatory and structural cells that are activated in the airways of asthma patients result in the marked production of ROS, including H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.<sup>5</sup> However, the precise role of ROS in the pathophysiology of the inflammatory process remains unclear due to the difficulty in the identification of which cells produce ROS in the lungs and bronchi of

asthmatic subjects as well as to the difficulty in specifying the differences in these cells among the various states of the disease. One conclusion of the studies conducted so far is that eosinophilic inflammation is a characteristic feature of intermittent and mild asthma, whereas the association of eosinophilia and neutrophilia characterizes more severe forms of the disease.<sup>9</sup> Moreover, sputum neutrophil counts were particularly evident in asthma patients who remained symptomatic despite treatment with ICS. Sputum induction is considered to be a noninvasive means to monitor inflammation. The value of the measurement of inflammatory cells and mediators such as ECP in induced sputum from asthma patients has been highlighted in several studies.<sup>2,9,14</sup> The present evidence suggests that the number of sputum eosinophils may possibly be the most useful parameter that directly reflects the intensity of the inflammation measured in bronchial biopsy specimens, lung function impairment, and, finally, disease severity.<sup>18,19</sup> In the present study, we found a significant correlation among eosinophil counts in induced sputum, disease severity, lung function impairment, and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration in expired breath condensate. Further analysis showed that the above correlations existed only in patients with moderate asthma in whom a strong correlation between the number of neutrophils and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels also was observed. Taking all these points together, and based on the above data from the literature, we believe that eosinophils are the predominant cells that generate ROS in patients with all forms of the disease, while neutrophils might be responsible for the highest levels that are observed in the more severe forms of the disease. These findings are supported mainly by the observations of our study, which showed a statistically significant correlation of the codependence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production from both eosinophils and neutrophils in patients with moderate asthma. Additionally, they are partially supported by previous

observations which demonstrated that eosinophils are the predominant cells that produce  $H_2O_2$ <sup>20,21</sup> in asthma patients, while neutrophils from asthma patients released higher quantities of ROS in comparison to healthy control subjects.<sup>22</sup> Moreover, the accumulation of neutrophils in the airways is associated with the extensive release of several molecules, particularly proteases and oxidants.<sup>23</sup> However, in mild forms of the disease active treatment with ICS leads to low levels of  $H_2O_2$  by suppressing the eosinophilic inflammation and controlling the symptoms. Similar results regarding the correlation data between eosinophils and  $H_2O_2$  concentrations also were observed in another study with a design similar to that of our study.<sup>24</sup> However, the above study classified patients as stable and unstable without using the NHLBI guidelines, which are more acceptable for the classification of disease severity. Moreover, it correlated  $H_2O_2$  only with eosinophils and did not provide data for the other inflammatory cells (*ie*, macrophages and neutrophils) as well as mediators such as ECP concentration. Finally, our study was more detailed regarding the parameters used for asthma evaluation (*ie*, symptom score and PEF variability) offering new information about the correlation of  $H_2O_2$  with both clinical severity and the inflammatory process.

The present cross-sectional study cannot demonstrate a causal relationship between ICS use and  $H_2O_2$  concentration. In a prospective controlled study,<sup>25</sup> therapy with ICS reduced the levels of  $H_2O_2$  in the expired breath condensate over a 4-week period, indicating an anti-inflammatory effect on oxidative stress. Data from a previous study<sup>24</sup> also have suggested that the differences in exhaled  $H_2O_2$  levels between steroid-treated and steroid-naïve patients imply differences in oxidative stress. However, other studies<sup>26</sup> support the idea that steroids do not decrease  $H_2O_2$  release from eosinophils. The current evidence suggests that there are significant quantitative differences in the number of eosinophils in sputum in relation to disease severity, directly reflecting the magnitude of airway inflammation.<sup>9</sup> Moreover, sputum eosinophils may be the most useful parameter directly reflecting airway inflammation that can be directed, modulated, and controlled by ICS.<sup>27</sup> Since the available evidence suggests that therapy with corticosteroids is considerably more effective when there is eosinophilic inflammation, this should logically lead to the plausible explanation that the differences in exhaled  $H_2O_2$  levels between steroid-treated and steroid-naïve patients did not imply differences in oxidative stress but reflected differences in the eosinophilic inflammation of the disease. The above theory is partially supported by the finding that the correlation be-

tween  $H_2O_2$  levels and both sputum eosinophilia and ECP concentration seems to exist only in steroid-naïve patients, as well as by the strong correlation between neutrophil and  $H_2O_2$  levels, irrespective of the use of ICS. These observations as well as those of previous reports that demonstrated that steroids failed to alter  $H_2O_2$  production from polymorphonuclear leukocytes,<sup>28</sup> confirm the initial theory that therapy with ICS influences  $H_2O_2$  production through their inhibitory role in eosinophilic recruitment to the airways.

The results of this study indicate that the role of exhaled  $H_2O_2$ , an index of oxidative stress, in predicting the severity of the disease as well as the course of the inflammatory process is limited. It depends on the use of inhaled steroids and the classification of the severity of the disease. Prospective controlled studies are needed to confirm the effects of anti-inflammatory drugs and oxygen radical scavengers on both the airway inflammatory indexes and ROS, in order to apply the technique of expired breath condensate in the evaluation of inflammatory pulmonary disorders.

## REFERENCES

- 1 National Asthma Education and Prevention Program. Expert panel report 2: guidelines for the diagnosis and management of asthma. Bethesda, MD: National Institutes of Health; April 1997; Publication No. 97-4051A
- 2 Pizzichini E, Pizzichini MM, Efthimiadis A, et al. Indices of airway inflammation in induced sputum: reproducibility and validity of cell and fluid phase measurements. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154:308-317
- 3 Dohman AW, Black HR, Royall JA. Expired breath hydrogen peroxide is a marker of acute airway inflammation in pediatric patients with asthma. *Am Rev Respir Dis* 1993; 148:955-960
- 4 Montuschi P, Corradi M, Giabattoni G, et al. Increased 8-isoprostane a marker of oxidative stress in exhaled condensate of asthma patients. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160:216-220
- 5 Barnes PJ. Reactive oxygen species and airway inflammation. *Free Radic Biol Med* 1990; 9:235-243
- 6 Jobsis Q, Raatgeep HC, Schellekens SL, et al. Hydrogen peroxide in exhaled air of healthy children: reference values. *Eur Respir J* 1998; 12:483-485
- 7 Arias-Diaz J, Vara E, Torres-Mellero J, et al. Nitrite/nitrate levels in bronchoalveolar lavage fluid of lung cancer patients. *Cancer* 1994; 74:1546-1551
- 8 Kanazawa H, Shoji S, Yamada M, et al. Increased levels of nitric oxide derivatives in induced sputum in patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 99:624-629
- 9 Louis R, Lau LC, Bron AO, et al. The relationship between airways inflammation and asthma severity. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161:9-16
- 10 Sterk PJ, Fabbri LM, Quanjer PH, et al. Airway responsiveness: standardized challenge testing with pharmacological, physical and sensitizing stimuli in adults. Report working party standardization of lung function tests, European Community for Steel and Coal. Official Statement of the European Respiratory Society. *Eur Respir J* 1993; 16(suppl):53-83
- 11 Gallati H, Pracht I. Horseradish peroxidase: kinetic studies

- and optimization of peroxidase activity determination using the substrates  $H_2O_2$  and 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine. *J Clin Chem Clin Biochem* 1985; 23:453–460
- 12 Loukides S, Horvath I, Wodehouse T, et al. Elevated levels of expired breath hydrogen peroxide in bronchiectasis. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158:991–994
  - 13 Keatings VM, Evans DJ, O'Connor BJ, et al. Cellular profiles in asthmatic airways: a comparison of induced sputum, bronchial washings and bronchoalveolar lavage. *Thorax* 1997; 52:372–374
  - 14 Pizzichini MM, Pizzichini E, Clelland L, et al. Sputum in severe exacerbations of asthma: kinetics of inflammatory indices after prednisone treatment. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155:1501–1508
  - 15 Keatings VM, O'Connor BJ, Wright LG, et al. Late response to allergen is associated with increased concentrations on TNF- $\alpha$  and interleukin-5 in induced sputum. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 99:693–698
  - 16 Misso NL, Powers KA, Gillon RL, et al. Reduced platelet glutathione peroxidase and selenium concentration in atopic asthmatic patients. *Clin Exp Allergy* 1996; 26:838–847
  - 17 Smith CA, Harrison DJ. Association between polymorphism in gene for microsomal epoxide hydrolase and susceptibility to emphysema. *Lancet* 1997; 350:630–633
  - 18 Maestrelli P, Saetta M, di Stefano A, et al. Comparison of leukocyte counts in sputum, bronchial biopsies and bronchoalveolar lavage. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155:542–548
  - 19 Lim S, Jatakanon A, John M, et al. Effect of inhaled budesonide on lung function and airway inflammation: assessment by various inflammatory markers in mild asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159:22–30
  - 20 Raible DG, Mohanty JG, Jaffe JS, et al. Hydrogen peroxide release from human eosinophils on fibronectin: scopoletin enhances eosinophil activation. *Free Radic Biol Med* 2000; 28:1652–1660
  - 21 Ayars G, Altman LC, McManus MM, et al. Injurious effect of the eosinophil peroxidase-hydrogen peroxide-halide system and major basic protein on human nasal epithelium *in vitro*. *Am Rev Respir Dis* 1989; 140:125–131
  - 22 Vachier I, Channez P, Le Doucen C, et al. Enhancement of reactive oxygen species formation in stable and unstable asthmatic patients. *Eur Respir J* 1994; 7:1585–1592
  - 23 Repine JE, Bast A, Lankhorst I. Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease: Oxidative Stress Study Group. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156:341–357
  - 24 Horvath I, Donnelly LE, Kiss A, et al. Combined use of exhaled hydrogen peroxide and nitric oxide in monitoring asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158:1042–1046
  - 25 Antczak A, Kurmanowska Z, Kasielski M, et al. Inhaled glucocorticosteroids decrease hydrogen peroxide level in expired air condensate in asthmatic patients. *Respir Med* 2000; 94:416–421
  - 26 Lantero S, Oddera S, Silvestri M, et al. Budesonide down-regulates eosinophil locomotion but has no effects on ECP release or on hydrogen peroxide production. *Lung* 1999; 177:219–228
  - 27 Keatings VM, Jatakanon A, Worsdell M, et al. Effect of inhaled and oral glucocorticosteroids on inflammatory indices in asthma and COPD. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155:542–548
  - 28 McLeish KR, Miller FN, Stelzer GT, et al. Mechanism by which methylprednisolone inhibits acute immune complex induced changes in vascular permeability. *Inflammation* 1986; 10:321–332