

KAUNO MEDICINOS UNIVERSITETAS

Algirda Krišukėnienė

RŪKYMO SĄLYGOTI IMUNINIO ATSAKO YPATUMAI
SERGANT ASTMA

Daktaro disertacija

Biomedicinos mokslai, medicina (07 B)

Kaunas, 2009

Disertacija rengta 2004-2008 metais Kauno medicinos universiteto Biomedicininiių tyrimų instituto Pulmonologijos laboratorijoje.

Mokslinis vadovas

prof. habil.dr. Brigita Šitkauskienė (Kauno medicinos universitetas, biomedicinos mokslai, medicina - 07 B).

Konsultantas

prof. dr. Jan Lötvall (Geteborgo universitetas, biomedicinos mokslai, medicina -07 B).

SANTRUMPOS

b.d. – būtino dydžio

BAL – bronchoalveolinis lavažas

BHR- padidėjęs bronchų reaktyvumas

CCL11- eotaksinas-1

CCL24- eotaksinas-2

CCL-26- eotaksinas-3

CCR- chemokinių receptoriai

CD⁺- baltymai, randami ląstelių paviršiuje, sutartinai žymimi CD raidėmis bei skaičiais

CO – anglies monoksidas

DTT- ditionitritolis

ECP – eozinofilų katijoninis baltymas (angl. *eosinophil cationic protein*)

EDN – iš eozinofilų kilęs neurotoksinas (angl. *eosinophil-derived neurotoxin*)

EKG - elektrokardiograma

ELISA- imunofermentinis tyrimas (angl. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

EPO-eozinofilų peroksidazė

FBS- fibrobronchoskopija

FEV1 – forsuoto iškvėpimo tūris per pirmąją sekundę (angl. *forced expiratory volume in 1 sec.*)

FVC – forsuota gyvybinė plaučių talpa (angl. *forced vital capacity*)

GINA- Visuotinės astmos iniciatyva (angl. Global Initiative For Asthma)

GM-CSF- granulocitų- makrofagų kolonijas stimuliuojantis veiksnys (angl. *granulocyte macrophage- colony stimulating factor*)

GPCR- G baltymo sujungti receptoriai (angl. *G protein-coupled receptor*)

GR- gliukokortikoidų receptoriai

IgE- E klasės imunoglobulinas

IL – interleukinas

I/v – į veną

JAV – Jungtinės Amerikos Valstijos

KMU – Kauno medicinos universitetas

L - litrai

LOPL – lėtinė obstrukcinė plaučių liga

LT- leukotrienai

MBP- didysis pagrindinis baltymas (angl. *Major basic protein*)

min.- minutė

mm- milimetras

n- imties tūris

NaCl – natrio chloridas

NO- azoto monoksidas

NS – statistiškai nereikšminga (angl. *not significant*)

PBS- fosfatinis buferis

PD₂₀- provokacinė metacholino dozė

PG- prostaglandinas

PI – protrombino indeksas

proc. - procentai

ROC- angl. *Receiver Operating Characteristic*

SaO₂ – hemoglobino prisotinimas deguonimi

Sav. – savaitė

SEM – standartinė vidurkio paklaida (angl. *standart error mean*)

ŠS- šansų santykis

TCR- T limfocitų receptoriai

Th- T limfocitai pagalbininkai

TLR- transmembraniniai atpažinimo receptoriai (angl. *Toll like receptors*)

TNF- α – tumoro nekrozės veiksnys- α (angl. *tumor necrosis factor- α*)

TSLP- užkrūčio stromos limfopoetinas (thymic stromal lymphopoietin)

TURINYS

1. ĮVADAS	8
2. DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI	10
3. DARBO MOKSLINIS NAUJUMAS	11
4. LITERATŪROS APŽVALGA	12
4.1 Astmos samprata	12
4.2 Astmos epidemiologija	12
4.3 Astmos patogenezė	13
4.3.1 Imuninis atsakas	14
4.3.2 Kvėpavimo takų epitelio reikšmė	14
4.3.3 T limfocitai	16
4.3.4 Neutrofilai	19
4.3.5 Eozinofilai	20
4.3.5.1 Eozinofilų įtaka astmos eigai	21
4.3.5.2 Eozinofilų reikšmė bronchų reaktyvumo pasireiškimui	23
4.3.5.3 Eozinofilų įtaka astmos gydymo efektyvumui	24
4.3.6 Citokinai	25
4.3.7 Chemokinai	28
4.4 Klinikiniai astmos variantai	30
4.5 Astma ir rūkymas	32
5. TYRIMO METODIKA	35
5.1 Tiriamųjų kontingentas ir tyrimo eiga	35
5.1.1 Alergine ir nealergine astma sergančių pacientų indukuotų skreplių ląstelių sudėties bei IL-9 raiškos tyrimas	35
5.1.2. Rūkorių ir nerūkančių asmenų, sergančių alergine ar nealergine astma kvėpavimo takų sekreto ląstelių sudėties, IL-5 ir eotaksinų koncentracijos tyrimas	36
5.2 Tyrimo metodai	38
5.2.1. Alerginiai odos dūrio mėginiai	38
5.2.2. Plaučių funkcijos tyrimas	39
5.2.3. Bronchų reaktyvumo tyrimas	39
5.2.4. Skreplių indukcija ir citologinis tyrimas	40
5.2.4.1 Skreplių indukcija	40

5.2.4.2 Indukuotų skreplių mėginių paruošimas ir citologinis ištyrimas	41
5.2.5 Fibrobronchoskopija ir bronchoalveolinio lavažo tyrimas	43
5.2.5.1 Tiramųjų paruošimas fibrobronchoskopijai	44
5.2.5.2 BAL skysčio paruošimas ir citologinis tyrimas	44
5.2.6 Citokinių ir chemokinių tyrimai	45
5.2.6.1 Chemokinių koncentracijos nustatymas	45
5.2.6.2 Citokinių koncentracijos nustatymas	47
5.2.6.3 IL-9 raiškos tyrimas	49
5.2.7 Matematinė statistinė analizė	51
6.REZULTATAI	52
6.1 Alergine ir nealergine astma sergančių pacientų indukuotų skreplių ląstelių sudėties bei IL-9 raiškos tyrimas	52
6.1.1 Tiriamųjų charakteristika	52
6.1.2 Indukuotų skreplių ląstelių sudėties palyginimas sergant alergine ir nealergine astma	52
6.1.3 Bronchų reaktyvumo sąsajos su indukuotų skreplių ląstelėmis	55
6.1.4 IL-9 raiška ir koncentracija indukuotuose skrepliuose, sąsajos su bronchų reaktyvumu	58
6.1.5 Lėtinio neinfekcinio kvėpavimo takų uždegimo žymenų prognostinė reikšmė, vertinant bronchų reaktyvumo pasireiškimą	59
6.2 Rūkorių ir nerūkančių asmenų, sergančių alergine ar nealergine astma kvėpavimo takų sekreto ląstelių sudėties, IL-5 ir eotaksinų koncentracijos tyrimas	63
6.2.1 Tiriamųjų charakteristika	63
6.2.2 Indukuotų skreplių ląstelių sudėties tyrimas	66
6.2.3 BAL skysčio ląstelių sudėties tyrimas	70
6.2.4 IL-5 koncentracijos serume, indukuotų skreplių supernatante ir BAL skystyje tyrimas	73
6.2.5 Indukuotų skreplių bei BAL skysčio eozinofilų kiekio ir IL-5 koncentracijų sąsajos	75
6.2.6 Eotaksino-1, eotaksino-2 ir eotaksino-3 koncentracijų tyrimas serume, indukuotų skreplių supernatante ir BAL skystyje	77
6.2.7 Eotaksinų sąsajos su indukuotų skreplių ir BAL skysčio ląstelėmis, plaučių funkcija bei bronchų reaktyvumu	78
6.2.8 Astmai būdingo lėtinio kvėpavimo takų uždegimo žymenų sąsajos su pacientų rūkymo įpročiais	83
7. REZULTATŲ APTARIMAS	85
7.1 Alerginės ir nealerginės astmos patomorfologiniai ypatumai	85
7.2 Rūkymo sąlygoti eotaksino-1, eotaksino-2 ir eotaksino-3 koncentracijos skirtumai sergant alergine ir nealergine astma	88

7.3	Rūkymo sąlygoti IL-5 koncentracijos skirtumai sergant alergine ir nealergine astma	91
8.	IŠVADOS	93
9.	DARBO PRAKTINĖ REIŠMĖ	95
10.	LITERATŪROS SĄRAŠAS	96
11.	PUBLIKACIJOS DISERTACIJOS TEMA	116

1. ĮVADAS

Astma-lėtinė kvėpavimo takų liga, pasireiškianti dusulio ar kosulio epizodais bei padidėjusiu bronchų reaktyvumu [1]. Dešimtmečiais vykdomi moksliniai tyrimai atskleidė daug svarbių šios ligos paslapčių, atvėrusių kelią naujiems diagnostikos bei gydymo metodams. Tačiau nežiūrint šių mokslinių pasiekimų, plačiai taikomų šiuolaikinių gydymo būdų, astma išlieka viena dažniausių lėtinių ligų, varginančių visų amžiaus grupių pacientus. Šiandien šia liga serga daugiau kaip 300 milijonų planetos gyventojų, o per pastaruosius 25 metus sergamumas astma padidėjo du kartus [2]. Todėl viena iš prioritetinių nūdienos mokslo krypčių yra išsamūs astmos patogenetinių mechanizmų tyrimai, kurie padėtų sukurti efektyvesnius ligos ankstyvos diagnostikos, profilaktikos bei gydymo būdus.

Eksperimentiniai bei klinikiniai tyrimai parodė, kad lėtinis neinfekcinis kvėpavimo takų uždegimas- svarbiausia astmos patogenezės grandis, lemianti šios ligos klinikinę eigą, sunkumą bei skiriamo gydymo efektyvumą [3]. Neabejojama, kad bronchų gleivinės infiltracija T limfocitais ir eozinofilais- centrinė patomorfologinė ašis, pradedanti imuninio atsako kaskadą, būdingą astmai [4]. Todėl šiandien atliekami tyrimai didelį dėmesį teikia mechanizmų, nulemiančių T limfocitų ir eozinofilų susitelkimą kvėpavimo takuose, paieškai. Ypatingą susidomėjimą kelia eozinofilų brendimui bei kinetikai svarbių Th2 gaminamų mediatorių- IL-5, IL-9 ir eotaksinų- reikšmė astmos patogenezėje. Eksperimentiniai tyrimai parodė, kad šios biologiškai aktyvios medžiagos- vienos svarbiausių lėtinio neinfekcinio kvėpavimo takų uždegimo išsivystymui, tačiau duomenys apie jų reikšmę žmogaus organizme kol kas prieštaringi.

Ilgą laiką manyta, kad bronchų gleivinės infiltracija eozinofilais- būdingiausias astmos patomorfologinis bruožas. Tačiau vėliau pastebėta, kad sunkios eigos, blogai gydymui pasiduodančios ligos metu kvėpavimo takuose vyrauja neutrofilai [5]. Taigi astma yra įvairialypė – skiriasi skatinamaisiais veiksniais, uždegimo pobūdžiu, klinikine eiga bei atsaku į skiriamą gydymą. Todėl vis dažniau vartojami šiuos skirtumus apibendrinantys fenotipų pavadinimai: eozinofilinė bei neeozinofilinė, sunkiai gydoma, alerginė ir nealerginė astma. Pastaruoju metu alerginė ir nealerginė astma pradėtos vertinti kaip patomorfologiškai ir patofiziologiškai vienodos ligos formos, tarpusavyje besiskiriančios klinikiniu pasireiškimu [1]. Todėl atliekamuose moksliniuose tyrimuose pacientai dažniausiai neskiriami pagal šiuos klinikinius ligos variantus. Žinoma, kad nealergine astma dažniau serga vyresni asmenys, jų tarpe vyrauja moterys, o ligos eiga dažnai būna sunkesnė nei sergančiųjų alergine astma [6]. Inhaliuojamųjų gliukokortikosteroidų uždegimą slopinantis poveikis aiškiai matomas alerginės ligos formos metu, tačiau nealergine astma sergantiems žmonėms šių vaistų efektyvumas nėra toks geras. Šie duomenys verčia daryti prielaidą, kad alerginė bei nealerginė astma skiriasi ne tik klinikiniu pasireiškimu, bet ir patomorfologiniais bei

patofiziologiniai kvėpavimo takų pakitimais. Nustačius esminius šių astmos klinikinių formų skirtumus, atsivertų platesnės galimybės efektyvių vaistų paieškai.

Astmos klinikinė eiga, efektyvus gydymas bei paūmėjimų dažnis priklauso nuo lėtinio neinfekcinio kvėpavimo takų uždegimo intensyvumo. Todėl pastaruoju metu intensyviai ieškomi jautrūs bei specifiški astmai būdingo kvėpavimo takų uždegimo žymenys, padėsiantys greičiau įvertinti bei efektyviau kontroliuoti patologinius kitimus bronchų gleivinėje, tokiu būdu užkertant kelią ligos paūmėjimams. Svarbu surasti ir priimtina, neinvazinį metodą lėtinio neinfekcinio uždegimo kvėpavimo takuose stebėjimui- „inflamometrą“. Daug vilčių teikia indukuotų skreplių tyrimas astmos metu, patikimai atspindintis pokyčius, vykstančius proksimaliniuose kvėpavimo takuose [7]. Tačiau ar šiuo tyrimo metodu galime pasikliauti kompleksiskai vertindami astmai būdingus patomorfologinius mechanizmus- dar nėra aišku.

Astma sergantiems pacientams reikšmingi ir išoriniai veiksniai- alergenai, oro tarša, rūkymas- galintys įtakoti ligos klinikines, patomorfologines bei patofizologines ypatybes. Visame Pasaulyje atlikti epidemiologiniai tyrimai atskleidė, kad daugiau nei 30 proc. astma sergančių pacientų yra rūkoriai [8]. Įrodyta, kad rūkančių tėvų vaikai turi du kartus didesnę tikimybę sirgti astma nei jų bendraamžiai, augantys nerūkančioje šeimoje. Intensyvus rūkymas siejamas su sunkesnės klinikinės eigos ligos vystimusi, blogesniu atsaku į skiriamą gydymą. Manoma, kad tabakas sukelia reikšmingus pokyčius kvėpavimo takų gleivinėje, kurie nulemia spartesnį sergančiųjų astma sveikatos blogėjimą. Tačiau kaip rūkymas įtakoja lėtinį neinfekcinį kvėpavimo takų uždegimą ir ar skiriasi rūkymo poveikis sergant fenotipiškai skirtingomis astmos formomis- nėra žinoma.

Taigi šios astmos patogenezės suvokimo spragos skatina naujų mokslinių hipotezių atsiradimą ir tyrimų vystymą.

2. DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI

Darbo tikslas

Nustatyti rūkymo sąlygotus imuninio atsako ypatumus sergant alergine ir nealergine astma.

Darbo uždaviniai

1. Ištirti alergine ir nealergine astma sergančių pacientų indukuotų skreplių ląstelių sudėtį bei įvertinti sąsajas su bronchų reaktyvumu.

2. Įvertinti IL-9 raišką indukuotų skreplių ląstelėse ir nustatyti IL-9 koncentraciją skreplių supernatante sergant alergine bei nealergine astma.

3. Nustatyti padidėjusio bronchų reaktyvumo prognostinius imuninius žymenis alerginės ir nealerginės astmos atvejais.

4. Įvertinti astma sergančių pacientų indukuotų skreplių ir BAL skysčio ląstelių sudėties savybes atsižvelgiant į tiriamųjų rūkymo įpročius

5. Ištirti ir palyginti rūkorių ir nerūkančių asmenų, sergančių astma, lėtinio uždegimo imuninių žymenų (eotaksinų ir IL-5) koncentracijas serume, BAL skystyje ir indukuotų skreplių supernatante.

6. Įvertinti galimas kvėpavimo takų ląstelių sąsajas su eotaksinų ir IL-5 koncentracija BAL skystyje ir indukuotų skreplių supernatante sergant astma.

3. DARBO MOKSLINIS NAUJUMAS

Astma viena labiausiai paplitusių lėtinių kvėpavimo takų ligų susijusių su svariais socialiniais ir ekonominiais nuostoliais visame pasaulyje. Didėjantis sergamumas šia liga skatina mokslinius tyrinėjimus, siekiančius išsiaiškinti svarbiausius patogenetinius, patomorfologinius bei patofiziologinius mechanizmus, lemiančius klinikinį pasireiškimą bei atsaką į gydymą. Nors visame pasaulyje ir Lietuvoje astma tyrinėjama jau daugiau kaip 100 metų, o gaunami rezultatai atskleidžia vis naujesnius, astmai būdingus ląstelių, baltymų ar molekulių pakitimus, tačiau išlieka dar daug neatsakytų klausimų.

Iki devintojo dešimtmečio atliktuose moksliniuose tyrimuose astmai būdingas lėtinis kvėpavimo takų uždegimas dažniausiai vertintas invaziniais tyrimo metodais: bronchoskopija, bronchų gleivinės biopsija ar bronchoalveoliniu lavažu. Tai trukdė ištirti vyresnius ir sunkesnės formos liga sergančius pacientus, ribojó tyrimų imtį. Šiame moksliniame darbe kvėpavimo takų uždegimui vertinti greta invazinių tyrimų naudojome ir neinvazinį indukuotų skreplių ištyrimą. Skreplių indukcijos hipertoniiniu NaCl tirpalu metodika buvo naujai įsisavinta bei įdiegta KMU Pulmonologijos klinikoje ir šiuo metu sėkmingai taikoma tiek mokslinėje veikloje, tiek klinikinėje praktikoje. Bronchoalveolinio lavažo ir indukuotų skreplių ląstelių sudėties tyrimams naudojome naują mėginių paruošimą naudojant citocentrifugą. Žinant tai, kad indukuoti skrepliai atspindi pokyčius stambiuose bronchuose, o BAL- smulkesniuose, šių abiejų metodų pritaikymas moksliniame darbe padėjo išsamiau ir tiksliau ištirti bei apibūdinti astmai būdingus pokyčius.

Pirmoje tyrimo dalyje, panaudodami neinvazinį tyrimą- skreplių indukciją, ištyrėme 40-70 metų pacientus, sergančius alergine ir nealergine astma. Mūsų žiniomis, tai pirmasis tyrimas, kurio imtį sudaro vien tik vyresnio amžiaus tiriamieji. Nustatyti indukuotų skreplių ląstelių sudėties bei IL-9 raiškos skirtumai pacientų grupėse paneigė vyraujančią nuomonę, kad alerginė ir nealerginė astma- patomorfologiškai vienodos ligos formos.

Antroje tyrimo dalyje pirmą kartą tiriamuosius suskirstėme į grupes pagal klinikinį astmos variantą ir rūkymo įpročius, o duomenis lyginome su sveikų rūkorių ir nerūkančiųjų duomenimis. Nustatėme, kad rūkymas keičia BAL skysčio ir indukuotų skreplių ląstelių sudėtį, slopina eozinofilų sukeltam uždegimui svarbaus citokino IL-5 gamybą bei skatina chemotaksio veiksmų (CCL11, CCL24) išsiskyrimą. Nauja ir tai, kad tyrimo metu nustatėme reikšmingas CCL24 sąsajas ne tik su eozinofilais, bet ir su neutrofilais. Parodėme, kad indukuotų skreplių tyrimas- informatyvus neinvazinis metodas lėtinio neinfekcinio uždegimo pobūdžiui bei aktyvumui įvertinti sergant astma.

4. LITERATŪROS APŽVALGA

4.1 Astmos samprata

Astma- tai lėtinė liga, kurios klinikinį pasireiškimą lemia persistuojantis neinfekcinis uždegimas kvėpavimo takuose [1].

Šia liga serga daugiau nei 300 milijonų žmonių visame pasaulyje, o per paskutiniuosius 25 metus sergamumas astma padidėjo dvigubai [9-11]. Nors ši liga aktyviai mokslininkų imta tyrinėti tik XX amžiaus antroje pusėje, tačiau astmos istorija siekia senovės Egipto laikus.

Ligos pavadinimas kilęs iš graikiškojo žodžio *asqma*, reiškiančio kvėpavimą atvira burna, dusulį. Pirmą kartą šis terminas paminėtas Hipokrato raštų rinkinyje *Corpus Hippocraticum* (460-360 metais prieš Kristų). Tačiau tiksliausiai astmą, kaip ligą aprašė Kapadocijos gydytojas Aratėjus (*Aretaeus*) prieš daugiau nei 2000 metų. Šimtmečiais astma buvo vertinama kaip reta psichosomatinė liga, kurios gydymui buvo rekomenduojamos inhaliacijos, pagamintos iš gydomųjų augalų, vėliau pastebėtas teigiamas atropino, adrenalino, teofilino poveikis ligos simptomams. Ir tik XX amžiaus pradžioje mokslininkai atskleidė, kad astmai būdingus simptomus provokuoja aplinkoje esantys alergenai [12], o padidėjusį kvėpavimo takų jautrumą histaminui [13] bei acetilcholinui [14] lemia bronchų gleivinės infiltracija uždegimą sukeliančiomis ląstelėmis [15]. Šiais atradimais prasidėjo astmos, kaip lėtinio uždegimo sukeltos ligos tyrimų era. Šiandien žinome, kad būdingiausi patomorfologiniai požymiai, bylojantys apie lėtinį išliekantį uždegimą ir jo padarinius astmos metu, yra audinių infiltracija leukocitais, epitelio pažeidimas, bazinės membranos sustorėjimas, gleives išskiriančių ląstelių hiperplazija ir edema bei bronchų lygiųjų raumenų hipertrofija [16,17]. Tyrinėdami lėtinio kvėpavimo takų uždegimo mechanizmus, mokslininkai siekia atsakyti į svarbiausią klausimą- kokios priežastys nulemia astmos išsivystymą. Tačiau šiandien atsakymo dar nežinome. Kalbant apie astmos priežastis, dažniausiai minima persistuojanti kvėpavimo takuose virusinė infekcija, žalingų aplinkos veiksnių įtaka bei genetinis paveldimumas. Mokslinėje literatūroje aprašyta daugiau nei 100 genų, susijusių su padidėjusiu bronchų reaktyvumu bei astmos išsivystymu. Manoma, kad dėl geno-geno ir geno- žalingų aplinkos veiksnių sąveikos atsiranda astmai būdingi patomorfologiniai bei patofiziologiniai pokyčiai [18].

4.2 Astmos epidemiologija

Astma- viena labiausiai paplitusių lėtinių kvėpavimo sistemos ligų [9]. Ilgą laiką buvo manoma, kad astma būdinga tik ekonomiškai išsivysčiusių šalių gyventojams, tačiau paskutinių tyrimų duomenys parodė, kad ir besivystančiose šalyse sergamumas šia liga sparčiai auga [10,11]. Apytikrių paskaičiavimų duomenimis Afrikoje daugiau kaip 50 milijonų gyventojų serga astma, Pietų bei Centrinėje Amerikoje tokių pacientų skaičius viršija 40 milijonų. Ši liga diagnozuojama

vienodai dažnai tiek vaikams tiek suaugusiems, o bloga simptomų kontrolė ar nepakankamas gydymas blogina pacientų fizinį, emocinį, socialinį bei profesinį gyvenimą. Jungtinėse Amerikos Valstijose pastaraisiais metais astma sirgo 16 milijonų suaugusiųjų ir 6,5 milijonai vaikų, o išlaidos šių pacientų medicininei priežiūrai ir gydymui bei nuostoliai netekus darbingumo siekė 13 milijardų JAV dolerių [11]. Europoje su astma susiję išlaidos sudaro 17,7 milijardus eurų, o blogos ligos kontrolės sukelti padariniai sudaro daugiau kaip 40 proc. šios sumos. Taigi- ši liga tampa svarbia gydytojų, mokslininkų, pacientų bei sveikatos politikų problema, atnešančia kiekvienai valstybei didžiulius ekonominius nuostolius. Manoma, kad tokį spartų sergamumo augimą lemia vykdomi urbanizacijos procesai besivystančiose šalyse, didėjanti oro tarša, cheminių priedų naudojimas maisto pramonėje, ankstyvas vaikų kontaktas su alergenais, rūkymas. Visi šie išorės veiksniai, derinyje su genetiniu paveldimumu, sukelia kvėpavimo takuose pokyčius, būdingus neinfekciniam uždegimui- epitelio, bronchų gleivinės bei pogleivio infiltraciją uždegimo ląstelėmis, lygiųjų raumenų išvešėjimą, padidėjusią gleivių gamybą taurinėse ląstelėse bei epitelio pažeidimą. Šie patomorfologiniai pokyčiai lemia klinikinę ligos pasireiškimą – kosulio ar dusulio epizodus, padidėjusį bronchų reaktyvumą ar praeinantį kvėpavimo takų laidumo sumažėjimą. Neabejojama, kad bloga ligos kontrolė ar nepakankamas inhaliuojamųjų vaistų poveikis susijęs su kvėpavimo takų uždegimo savybėmis, kurias dažnai apsprendžia išorės veiksniai- oro tarša, alergenų poveikis ar rūkymas. Pastarųjų metų klinikiniai bei eksperimentiniai tyrimai parodė, kad rūkančių tėvų šeimose gimę vaikai turi du kartus didesnę tikimybę susirgti astma, o rūkantys astma sergantys pacientai kenčia dėl sunkesnių, blogai pasiduodančių įprastiniam gydymui ligos simptomų. Nustatyta, kad tabako dūmai tiesiogiai dirgina kvėpavimo takų gleivinę, pažeidžia epitelį, skatina IL-8 gamybą bei neutrofilų susikaupimą bronchuose [12]. Pastebėta, kad rūkančiųjų kvėpavimo takuose sumažėja eozinofilų kiekis, tačiau kokie mechanizmai nulemia šiuos pokyčius iki šiol neaišku.

4.3 Astmos patogenezė

Lėtinis neinfekcinis kvėpavimo takų uždegimas- astmos patogenezės pagrindą sudarantis procesas, sukeltas eozinofilų, neutrofilų, CD4⁺ T limfocitų ir putliųjų ląstelių, o audinių infiltracija eozinofilais- būdingiausias šios ligos požymis [19]. Įprastai uždegimas apima stambiuosius kvėpavimo takus, tačiau ilgainiui, ypač sunkėjant ligos eigai, pakitimai pastebimi smulkiuosiuose bronchuose ar net alveolėse [20]. Pastebėta, kad stambiuose kvėpavimo takuose uždegimas dominuoja pogleivyje, o smulkiųjų bronchų uždegimas apima ir apie bronchus esančius lygiuosius raumenis [21]. Šis Th2 tipo uždegimas dažniausiai sutinkamas įvairiuose audiniuose, ypač jei astma pasireiškia kartu su kitomis lėtinėmis ligomis- atopiniu dermatitu, alergija maistui ar sinusitu [22].

4.3.1 Imuninis atsakas

Uždegimas- tai imuninės sistemos apsauginė reakcija į patekusį antigeną, kurios tikslas išlaikyti organizmo genetinį vientisumą. Ūmus uždegimas pasireiškia imuninių ląstelių susikaupimu antigeno patekimo vietoje, citokinų, chemokinų, mediatorių sparčia gamyba, leukocitų aktyvinimu bei padidėjusiu kraujagyslių pralaidumu. O kliniškai šios reakcijos pasireiškia uždegimo apimtos srities paraudimu, patinimu, skausmu, padidėjusia temperatūra bei sutrikusia funkcija (lot. *rubor, tumor, calor, dolor, functio laesa*). Pašalinus antigeną, imunines reakcijas ima slopinti endogeniniai priešuždegiminiai mediatoriai, skatinama uždegimą sukeliančių ląstelių žūtis bei žuvusių ląstelių fagocitozė- vyksta gijimas. Ši medicinos klasikų aprašytą ūmaus uždegimo modelį galime taikyti visoms uždegiminėms ligoms, taip pat ir astmai. Tačiau astmos metu gijimo fazė nevyksta- ūmus uždegimas tampa lėtinių, o kvėpavimo takuose rudenantys pokyčiai dažnai prilyginami lėtinei opai. Kodėl imuninės sistemos atsakas užsitęsia, sukeldamas lėtinį uždegimą- tai vienas aktualiausių nūdienos klausimų, atsakymo į kuriuos ieško viso pasaulio mokslininkai.

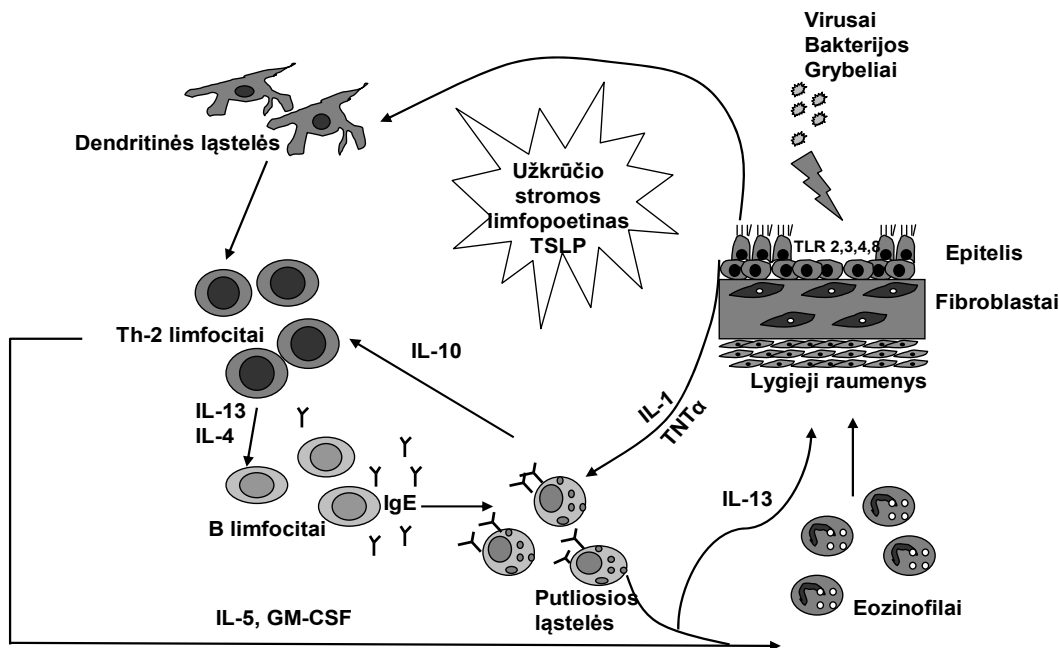
Viena svarbiausių alerginės astmos ypatybių- kvėpavimo takų gebėjimas atpažinti dažniausius aplinkos alergenų ir sukelti antrojo tipo T limfocitų pagalbininkų (Th2) gaminamų citokinų atsaką į juos. Populiariųjų tyrimų duomenimis, daugiau nei 40 proc. Vakarų valstybių gyventojų serga atopinėmis ligomis, tačiau tik 7 proc. iš jų diagnozuota astma [23]. Kodėl tik nedidelė dalis alergiškų žmonių suseraga astma išlieka aktuali klausimu šiandienos moksle.

4.3.2 Kvėpavimo takų epitelio reikšmė

Kvėpavimo takų epitelis- dengiamasis audinys, saugantis poepitelinius audinius nuo mechaninių, cheminių pažeidimų, mikrobu, alergenų ar skysčio netekimo. Sveikų bronchų gleivinę dengia daugiasluoksnis stulpinis epitelis, kuris, formuodamas epitelio paviršiuje glaudžiąsias jungtis, tampa beveik nepralaidžiu ir darniai reguliuojamu barjeru [24]. Glaudžiosios jungtys, susidedančios iš klodinių (angl. claudins) bei transmembraninių adhezijos baltymų, tampa greta esančias epitelio ląsteles, o E-kadherinas, desmosomos bei hemidesmosomos palaiko epitelio struktūrinį vientisumą sąveikaujant epitelio ląstelėms su tarpląsteliniu skysčiu [24]. Tačiau astmos metu epitelio apsauginė funkcija būna sutrikusi. Tyrimuose pastebėta, kad sergant astma bei veikiant agresyviems aplinkos veiksniams, greitai suyra desmosomos ir glaudžiosios jungtys tarp epitelio ląstelių, o epitelis tampa pralaidus alergenams, oro teršalams ar kitoms dirginančioms medžiagoms [25]. Ši epitelio savybė – skiriamasis astma sergančių pacientų bruožas, nulemtas profilagrino geno, esančio 1 chromosomos ilgajame petyje, polimorfizmo [26]. Su genetinėmis pokyčiais siejama ir sutrikusi citokinų- interferono- β (IFN- β) bei interferono- λ (IFN- λ) gamyba [27], bei sumažėjęs fermentų- superoksido dismutazės ir glutationo peroksidazės kiekis epitelio

[28,29]. Interferonų gamybos pokyčiai ir padidėjęs epitelio pralaidumas sudaro ypač palankias sąlygas rinovirusui daugintis ir prasiskverbti į gilesnius audinius bei sukelti agresyvių imuninių atsakų, kliniškai pasireiškiančių astmos paūmėjimais. Dėl antioksidacinių fermentų trūkumo, ozono dalelės, oksidacinis stresas ar tabako dūmai greičiau ir stipriau pažeidžia sergančiųjų astma bronchų epitelį nei sveikų asmenų [30].

Pastarųjų metų tyrimai atskleidė svarbų kvėpavimo takų epitelio vaidmenį astmos patogenezėje. Bronchų epitelio, lygiųjų raumenų, kraujagyslių bei nervinių skaidulų tarpusavio sąveika su įkvėptomis iš aplinkos dalelėmis (bakterijomis, grybelių sporomis, virusais, alergenais, tabako dūmais, oro teršalais, chemikalais) pradeda lėtinio uždegimo kaskadą [31]. Kvėpavimo takų įsijautrinimas alergenams- sudėtinga įvykių grandinė, kurios pradžioje gleivinės dendritinės ląstelės apdoroja patekusį alergeną ir, kartu su II klasės pagrindiniu audinių suderinamumo kompleksu (angl. major histocompatibility complex-MHC), pateikia specifinius alergeno peptidų epitopus naiviems T limfocitams [32]. Šis antigeno pateikimas T limfocitams, dalyvaujant chemokinių receptoriams CCR7, CCL19, CCL21- reikšmingas etapas, pažymintis organizmo įsijautrinimo pradžią bei atveriantis kelią tolimesniam imuninio atsako į alergeną vytimuisi [33]. Naivių T limfocitų aktyvinimas priklauso nuo patekusio alergeno savybių. Pastebėta, kad proteolitinių fermentų turintys alergenai (namų dulkių erkės, mikroskopiniai grybeliai, žiedadulkės) agresyviau veikia dendritinių ląstelių proteazėmis aktyvuotus receptorius (PAR) ir skatina imuninio atsako vystymąsi bei naivių T limfocitų diferenciaciją nei alergenai, neturintys šių fermentų [34]. Įkvėptos dulkės ar oro teršalai, turintys amino rūgščių liekanų, sąveikauja su daugiau kaip 10 transmembraninių atpažinimo receptorių (angl. toll like receptors-TLR) ir sukelia T limfocitų (Th-1, Th-2, Th-17, T reguliacinių limfocitų) atsaką, priklausantį nuo stimulo sudėties [35]. Kaip aktyvuoti TLR stimuliuoja T limfocitų (ypač Th-2 limfocitų) diferenciaciją nėra pilnai aišku. Manoma, kad svetimų amino rūgštys aktyvina TLR-3,4,7, ir 8 tipo receptorius, esančius ant epitelio ląstelių, ir paskatina į IL-7 panašių citokinių bei užkrūčio stromos limfopoetino (angl. thymic stromal lymphopoetin- TSLP) išsiskyrimą, tokiu būdu stiprėja Th-2 limfocitų poliarizacija. Savo ruožtu TSLP, sąveikaudamas su dendritinėmis bei putliosiomis ląstelėmis, skatina citokinių gamybą nepriklausomai nuo alergeno veikimo trukmės [36]. 2004 metais Amerikos mokslininkų atrastas augimą skatinantis citokinas TSLP siejamas su alerginių ligų, taip pat ir astmos vytimusi. Kaip jau buvo minėta, rinoviruso sukeltas kvėpavimo takų pažeidimas- svarbus veiksnys, lemiantis astmos atsiradimą [37]. Eksperimentinių tyrimų metu įrodyta, kad dvigrandė rinoviruso RNR sinergistiškai veikdama su IL-4 skatina TSLP gamybą bronchų epitelio ląstelėse, o išsiskyręs TSLP pradeda svarbią astmos išsivystymui uždegimo kaskadą- limfocitų aktyvinimą, antikūnų gamybą, citokinių bei chemokinių išsiskyrimą, uždegiminių ląstelių susikaupimą, fibroblastų bei lygiųjų raumenų išvešėjimą. (1 pav.)[38].



1pav. Užkrūčio stromos limfopoetino (TSLP) gamyba bei veikimas. TSLP gamina epitelio ląstelės, paskatintos aktyvuotų transmembraninių atpažinimo receptorių (TLR). TSLP veikdamas kartu su dendritinėmis bei putliosiomis ląstelėmis, stimuliuoja citokinų išsiskyrimą, nepriklausomai nuo alergeno veikimo trukmės.

4.3.3 T limfocitai

T limfocitai- imuninės sistemos dalis, lemianti ląstelinio imuniteto atsaką į patekusį antigeną. Tai 7-12 μ m skersmens ląstelės, turinčios didžiulį branduolį, užimantį beveik visą citoplazmą. Šios ląstelių grupės pavadinimas kilęs nuo užkrūčio liaukos (thymus), kurioje vyksta jų brendimas. T limfocitų paviršiuje esantys receptoriai- (angl. T cell receptors-TCR)- ypatybė, skirianti šias ląsteles nuo kitų limfocitų. Be TCR, T limfocitų paviršiuje randami baltymai (sutartinai žymimi CD), lemiantys ląstelių savybes, skirtingas funkcijas bei priklausymą subpopuliacijoms [39].

T limfocitai pagalbininkai (Th, CD4⁺)- svarbiausi adaptyvios imuninės sistemos tarpininkai. Jie sudaro apie 60 proc. visų limfocitų. Patekus antigenui į organizmą, imuninių ląstelių gaminami baltymai bei sąveika su MHC II klasės molekulėmis aktyvuoja Th limfocitus, skatindami jų diferenciaciją į Th1, Th2, Th3, Th17, ThF tipus.

T limfocitai žudikai (CD8⁺)- sudaro 30 proc. visų limfocitų. CD8⁺ veikdami kartu su MHC I klasės molekulėmis ardo vėžines ar viruso užkrėstas ląsteles. Sąveikaujant CD4⁺ su CD8⁺

limfocitais, pastarieji transformuojami į reguliacinius T limfocitus, saugančius organizmą nuo autoimuninių ligų.

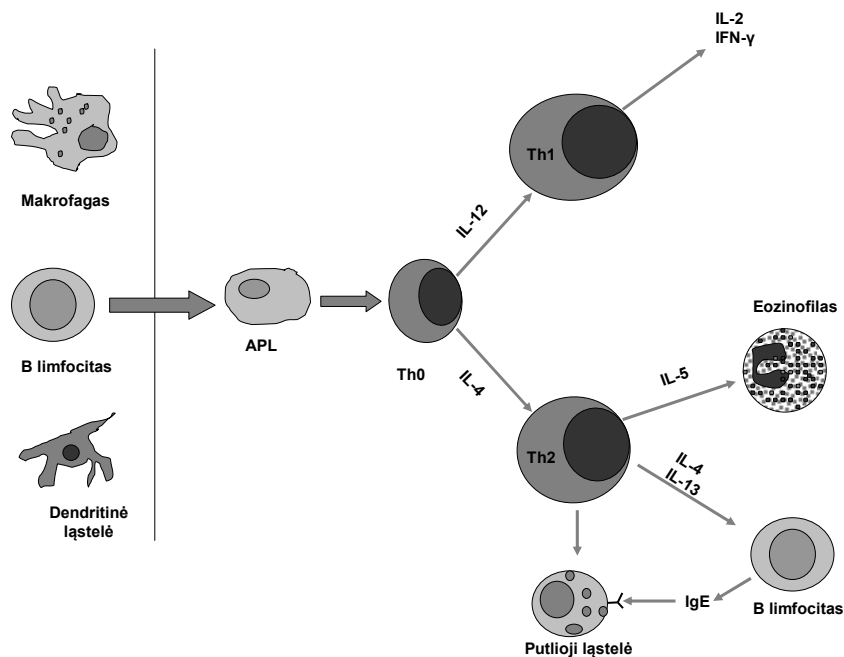
Reguliaciniai T limfocitai (slopinantieji T limfocitai)- lemia organizmo imuninį pakantumą. Svarbiausia šių ląstelių funkcija- saugoti organizmą, laiku slopinant ląstelinį imuninį atsaką bei autoreaktyvių T limfocitų funkciją.

$\gamma\delta$ T limfocitai- maža dalis visos T limfocitų populiacijos, kuri turi kitokios sandaros antigenų receptorių (TCR) nei $CD4^+$ ir $CD8^+$ limfocitai. Šios ląstelės randamos epitelyje bei gleivinėje, o antigeną atpažįsta savarankiškai, nepriklausomai nuo MHC molekulių.

Atminties T limfocitai- T limfocitų subpopuliacija, kilusi iš besidauginančių T_H , šiems susidūrus su antigenu. Tam pačiam antigenui patekus į organizmą, atminties T limfocitai padeda imuninei sistemai greičiau jį atpažinti ir sunaikinti.

T limfocitų pirmtakai susiformuoja iš kamieninių kraujodaros ląstelių kaulų čiulpuose. Iš ten patenka į užkrūčio liauką, kur vyksta brendimo procesas. Jo metu susiformuoja TCR receptoriai, CD3, CD4, CD8 baltymai, nulemiama priklausomybė vienai ar kitai subpopuliacijai. Subrendę T limfocitai iš užkrūčio liaukos patenka į periferinę limfinę sistemą, kur atlieka savo funkcijas.

Tačiau T limfocitai svarbūs ne tik saugant organizmą nuo išorės antigenų, bet ir formuojant imuninį atsaką į alergenų. Nustatyta, kad T_H2 tipo limfocitai- svarbiausi lėtinio uždegimo mediatoriai, koordinuojantys didžiąją dalį astmos patogenezės grandžių (2 pav.)



2 pav. Alerginio uždegimo schema. Antigeną prezentuojanti ląstelė (APL) aktyvuoja naivųjį T limfocitą (Th0), o audiniuose išsiskyrę citokinai (IL-12 ar IL-4) nulemia T limfocitų diferenciaciją į Th1 ar Th2 tipo ląsteles. Astmos metu vyrauja Th2 tipo limfocitai, kurie išskiria citokinus ir aktyvuoja kitas, alerginiame uždegime dalyvaujančias ląsteles.

Manoma, astmos atsiradimui svarbiausia grandimi tampa naivaus T limfocito diferenciaciją į Th2 tipo ląsteles. Eksperimentiniuose tyrimuose plačiai tirti veiksniai, nulemiantys ne Th1, bet Th2 limfocitų dominavimą [40]. Pastebėta, kad dažniau astma serga išsivysčiusių valstybių, miestų gyventojai nei gyvenantys kaime ar mažiau išsivysčiusiose šalyse. Buvo iškelta „Higienos hipotezė“, teigianti, kad ankstyvas organizmo kontaktas su bakterijų endotoksinais skatina Th1 tipo limfocitų dominavimą patekus alergenui [41]. Tokiu būdu, šių limfocitų gaminami uždegimą slopinantys mediatoriai (IL-2, IFN- γ) nutraukia tolimesnes lėtiniam uždegimui būdingas grandis. Jei ankstyvo kontakto su bakterijomis nebuvo, tuomet, audiniuose išsiskyręs IL-4 skatina Th0 vartimą Th2 tipo limfocitu, aktyvuojančiu putliąsias ląsteles, B limfocitus ir eozinofilus. Pasirodžius pirmiesiems eksperimentinių tyrimų duomenims apie Th1 tipo limfocitų dalyvavimą astmos patogenezėje, higienos hipoteze buvo suabejota [42]. Tyrimo su pelėmis metu mokslininkai pastebėjo, kad IFN- γ (Th1 tipo limfocitų gaminamas citokinas), neslopinga Th2 tipo limfocitų bei eozinofilų migracijos į plaučių audinį. Kiti tyrėjai nustatė, kad kvėpavimo takų eozinofilija eksperimentinės astmos metu- Th1 ir Th2 tipo limfocitų bendradarbiavimo padarinys [43].

4.3.4 Neutrofilai

Neutrofiliniai granulocitai- 12-15 μ m dydžio ląstelės, turinčios 3-4 segmentų branduolį bei neutraliai besidažančias citoplazmos granules. Tai trumpaamžė (neaktyvaus neutrofilo gyvenimo pusperiodis-12 val.) imuninės sistemos dalis, kurios pagrindinė funkcija- fagocitozė. Veikiant neutrofilų chemotaksį skatinantiems veiksniams- IL-8, IFN- γ , komplemento komponentui C5a- šios ląstelės greitai pasiekia uždegimo židinį ir, fagocitozės bei degranuliacijos pagalba, suardo į organizmą patekusį patogeną. Neutrofilų granulėse esantys baltymai (laktoferinas, mieloperoksidazė, katepsinas, želatinazė, defensinai ir kt.) suardo mikroorganizmų sienelę, pažeidžia ir aplinkinius audinius.

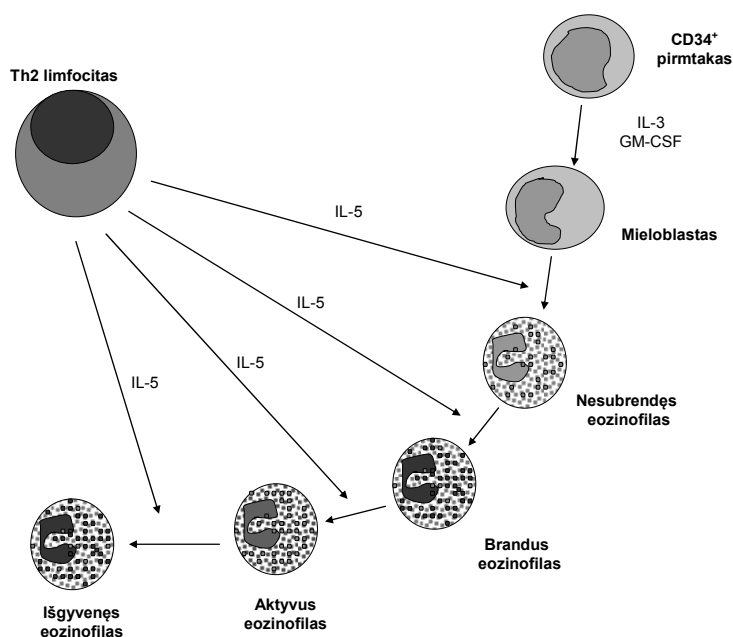
Nors tiriant astma sergančių pacientų plaučių audinio biopsinę medžiagą, BAL ar skreplių ląstelių sudėtį neutrofilai visuomet randami, tačiau šios ląstelės dar nesulaukė pakankamai mokslininkų dėmesio. Ilgą laiką astma sieta su eozinofilų sukeltais pokyčiais kvėpavimo takuose, o neutrofilams teko pagrindinis vaidmuo LOPL patogenezėje. Nors lengvos ar vidutinio sunkumo astmos metu neutrofilai nėra dominuojanti ląstelė, tačiau sunkios astmos atveju šių granulocitų daugėja ar jie net ima vyrauti. Ordonez su bendraautoriais atlikto tyrimo metu paaiškėjo, kad paūmėjus sunkiai astmai, pacientų kvėpavimo takuose vyrauja neutrofilai [44]. Neutrofilai vyrauja ir virusinės infekcijos sukulto astmos paūmėjimo metu [45]. Be to pastebėta, kad tiek neutrofilų skaičius, tiek jų sukelta ląstelių žūtis reikšmingai siejasi su sunkesne ligos eiga. Panašūs rezultatai gauti ir tiriant profesinę astma sergančius pacientus [46]. Ne mažiau iškalbingi ir staiga dėl astmos mirusių asmenų patohistologinių tyrimų duomenys, rodantys gausų neutrofilų susikaupimą kvėpavimo takuose, ypač bronchų gleivinėje [47]. Pradėjus atidžiau vertinti neutrofilų sukulto uždegimo mechanizmus paaiškėjo, kad šių granulocitų susikaupimą plaučiuose skatina makrofagų bei T limfocitų gaminami chemoatraktantai (IL-8, GM-CSF, leukotrienas B₄, 4 trombocitų faktorius ir kt.) [32]. Tačiau kaip jau buvo minėta, neutrofilų gyvenimo pusperiodis labai trumpas. Tai kas lemia ilgesnį jų išlikimą kvėpavimo takuose? Į šį klausimą neseniai atsakė Kanados mokslininkai, nustatę, kad, sergant alergine astma, neutrofilinį uždegimą sukelia IgE, slopindamas šių ląstelių apoptozę [48].

Nors neutrofilų sąsajos su klinikiniais astmos simptomais buvo nustatytos, tačiau jų reikšmė svarbiausiems patofiziologiniams ligos mechanizms dar nėra atskleista. Aišku tik tiek, kad šių granulocitų susikaupimas kvėpavimo takuose įtakoja gydymo inhaliuojamaisiais gliukokortikosteroidais efektyvumą [39].

4.3.5 Eozinofilai

Eozinofiliniai granulocitai- tai imuninės sistemos ląstelė, sauganti organizmą nuo infekcijos, parazitų invazijos ir aktyviai formuojanti atsaką į alergenų. Šios ląstelės citoplazmoje turi daug smulkių granulių, kurių viduje yra cheminių mediatorių (tokių kaip histaminas) bei baltymų (lipazė, dezoksiribonukleazė, ribonukleazė, plazminogenas bei didysis pagrindinis baltymas (angl. major basic protein)). Sveikame organizme šios ląstelės būna kai kuriuose organuose- užkrūčio liaukoje, žarnyne, kiaušidėse, gimdoje, blužnyje bei limfmazgiuose, tačiau plaučiuose eozinofilai randami tik ligos metu. Šie granulocitai vystosi ir bręsta kaulų čiulpuose iš mieloidinės eilės pirmtakų, audiniuose išlieka gyvi vidutiniškai 8-12 dienų.

Eozinofilai- tai geriausiai žinoma ir plačiausiai tyrinėta ląstelė, vaidinanti reikšmingą vaidmenį astmos patogenezėje. Astmos metu šie granulocitai susikaupia ne tik kvėpavimo takų sienelėje, tačiau, nekontroliuojamos ligos atveju, eozinofilija stebima pacientų skrepliuose bei bronchoalveolinio lavažo (BAL) skystyje [49]. CD34 žymenį turintys hemopoezės pirmtakai pritraukiami į plaučius iš kaulų čiulpų išsiskyrus citokinams, chemokinams, prostaglandinui D_2 (PGD_2) bei cisteinil leukotrienams. Bręstantys eozinofilai per kapiliarų tinklą iš kraujotakos patenka į bronchų sienelę. Įrodyta, kad IL-13, granulocitų-makrofagų kolonijas stimuliuojantis faktorius (GM-CSF) bei eotaksinai (CCL11, CCL24, CCL26) yra reikšmingiausi veiksniai, skatinantys ankstyvą CD34 žymenį turinčių kamieninių ląstelių virsmą eozinofilais, kurie toliau bręsta ir patenka į kvėpavimo takus veikiami IL-5 (3 pav.) [50].



3pav. Th2 citokinai, skatinantys eozinofilų papildymą iš CD34⁺ pirmtakų, eozinofilų brendimą, aktyvinimą bei sutelkimą audiniuose.

Išoriniam veiksmui veikiant organizmą, imuniniai stimulai aktyvuoja eozinofilus, sukelia jų degranuliaciją. Dėl šių procesų išsiskiria biologiškai aktyvios medžiagos (eozinofilų peroksidazė-EPO, didysis pagrindinis baltymas-MBP, eozinofilų kationinis baltymas-ECP, neurotoksinas-EDN), ardančios ląsteles bei audinius. Didysis pagrindinis baltymas sukelia putliųjų ląstelių bei bazofilų degranuliaciją. Eozinofilų kationinis baltymas slopina T limfocitų proliferaciją, antikūnų gamybą, skatina mastocitų irimą, pažeidžia ląstelių membranas. EPO- sudaro reaktyvias deguonies formas bei aktyvius azoto junginius, kurie sukelia oksidacinį stresą bei ląstelių žūtį [51]. Aktyvūs eozinofilai gamina eilę medžiagų, dalyvaujančių uždegime:

- Fermentus- elastazes [52];
- Leukotrienų (LTC_4 , LTD_4 , LTE_4) bei prostaglandinų (PGE_2) šeimai priklausančius eikosanoidus [53];
- Augimo faktorius ($TGF\beta$, VEGF, PDGF) [54];
- Citokinus: IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-13, alfa tumoro nekrozės faktorių (TNF alfa) [55].

4.3.5.1 Eozinofilų įtaka astmos klinikinei eigai

Nors eozinofilai jau seniai siejami su alerginiu uždegimu kvėpavimo takuose, tačiau tik 2004 metais JAV mokslininkų atliktas eksperimentinis tyrimas įrodė neabejotiną jų, kaip centrinių uždegimo mediatorių reikšmę astmos patogenezėje [56]. Genomikos priemonių pagalba tyrėjai išvedė pelių veislę, kurios neturi eozinofilų. Tuomet šios pelės, kartu su genetiškai nemodifikuotomis pelėmis buvo veikiamos ovalbuminu (nėspecifiniu, alerginį uždegimą sukeliančiu baltymu). Eksperimento metu autoriai išsiaiškino, kad eozinofilų neturinčioms pelėms, skirtingai nei kontrolinės grupės gyvūnams, neišsivystė astma. Taigi- eozinofilai būtini klinikinių simptomų, būdingų astmai, pasireiškimui.

Pastaruju metu mokslininkai siekia išsiaiškinti, kas lemia astmos kliniką, jos sunkumą bei paūmėjimų dažnį. Daugelis jau atliktų klinikinių ir eksperimentinių tyrimų susiejo ligos eigą su eozinofilais kvėpavimo takuose. Tačiau šių sąsajų mechanizmas išlieka neaiškus. Vieni tyrėjai teigia, kad astmos klinikai svarbus eozinofilų kiekis, kiti- kad šių ląstelių išskiriami mediatoriai, tretį pirmybę teikia eozinofilų programuotos žūties (apoptozės) sutrikimams.

Eozinofilų kiekio kraujyje, skrepliuose ar BAL įtaka astmos simptomams įrodyta ne kartą. Tyrimuose pastebėta, kad pacientų, kurių skrepliuose padidėjęs eozinofilų kiekis, astmos simptomai būna ryškesni, o ligos paūmėjimai- dažnesni [57]. Fujimoto [58] ir Ronchi [59] tyrimų duomenimis, sunkia astma sergančių pacientų skrepliuose eozinofilų yra daugiau nei lengvos ar vidutinio

Tačiau jau 1992 Virchow suabejojo, ar iš tiesų eozinofilų kiekis lemia astmos klinikinę eigą. Nors vadovaujant šiam profesoriui atliktas tyrimas su astma sergančiais asmenimis buvo mažos imties, tačiau jo duomenys sudomino daugelį tyrinėtojų. Mokslininkai nustatė, kad eozinofilų katijoninis baltymas (angl. eosinophil cationic protein- ECP)- aktyvių eozinofilų gaminamas mediatorius- patikimiau siejasi su kvėpavimo funkcija nei eozinofilų kiekis [61]. Taip pat tyrėjai įrodė sąsajas tarp skreplių ECP koncentracijos ir kintamos bronchų obstrukcijos bei kvėpavimo takų pasipriešinimo. Vėliau šiuos duomenis patvirtino ir kiti, didesnės imties tyrimai [62]. Tačiau vėliau paskelbti tyrimų rezultatai privertė suabejoti ir ECP svarba astmos eigai. Ištyrus lengva, vidutine bei sunkia astma sergančių pacientų skrepliuose ECP koncentraciją, reikšmingų skirtumų tarp tiriamųjų grupių nebuvo nustatyta [63]. O Suomijos mokslininkai, ištyrę astma sergančius vaikus, nerado serumo ECP sąsajų su maksimalia iškvėpimo srove (PEF), o ryšys su forsuoju iškvėpimo tūriu per pirmąją sekundę (FEV_1) buvo statistiškai silpnas [64].

Šie prieštaravimai paskatino kitus mokslininkus atidžiau pažvelgti į mechanizmus, lemiančius kvėpavimo takuose eozinofilų susikaupimą, bei galimą šių procesų sąsają su ligos klinika. Tokiu būdu gana plačiai imtas nagrinėti eozinofilų apoptozės sulėtėjimas astmos metu. Duncan su bendraautorais palyginę stabilia lengva, vidutine bei sunkia astma sergančių asmenų duomenis nustatė, kad sumažėjusi eozinofilų apoptozė bei didesnė eozinofilija skrepliuose reikšmingai siejasi su ligos sunkumu [65]. Įvertinę tai, kad eozinofilai iš kvėpavimo takų pašalinami programuotos ląstelių žūties (apoptozės) dėka, autoriai teigia, kad būtent šio biologinio proceso sulėtėjimas nulemia astmos klinikinį pasireiškimą. Panašių išvadų priėjo ir Jang vadovaujami mokslininkai, tyrę sunkia astma sergančių pacientų kvėpavimo funkciją ir skreplių ląstelių sudėtį ligos paūmėjimo metu [66]. Tyrimo metu šiems asmenims buvo nustatytos bcl-2 (sulėtėjusios eozinofilų apoptozės žymens) raiškos neigiamos sąsajos su Genslerio rodikliu (FEV_1/FVC). Eozinofilinių granulocitų, esančių ne tik skrepliuose bet ir plaučių audinyje, reikšme astmos klinikiniam pasireiškimui neabejoja ir Vignola su bendraautorais, nustatę neigiamas sąsajas tarp santykinio apoptozinių eozinofilų kiekio plaučių audinio biopsinėje medžiagoje ir astmos sunkumo (pagal Aas vertinimo sistemą) [67].

Tačiau kai kurie autoriai savo tyrimais paneigė, kad eozinofilai svarbūs astmos klinikinei eigai, ypač jos sunkumui. Štai vertinant indukuotų skreplių ląstelių sudėtį, buvo nustatyta, kad

lengvos astmos metu vyraujanti ląstelė yra eozinofilas, o sunkios ir atsparios gydymui ligos metu skrepliuose randama daugiau neutrofilų [68,69]. Turner, tyręs astma sergančius pacientus ligos paūmėjimo periodu, pastebėjo, kad jo tiriamųjų skrepliuose eozinofilijos nėra [70]. O 9 Europos šalių mokslininkai, susivieniję į Europos Sunkios Astmos Mechanizmų Tyrimo Tinklą (angl. European Network For Understanding Mechanisms Of Severe Asthma- ENFUMOSA), atliko daugiacentrinį tyrimą su sergančiais sunkia astma pacientais ir nustatė, kad didžiosios dalies tirtųjų skrepliuose vyravo neutrofilų sukeltas uždegimas [71]. Apibendrinami gautus duomenis tyrėjai teigė, kad sunkios astmos patogenezė gali skirtis nuo lengvos ar vidutinio sunkumo astmos, ir pasiūlė sunkią astmą vertinti kaip atskirą ligos fenotipą.

4.3.5.2 Eozinofilų reikšmė bronchų reaktyvumo pasireiškimui

Lėtinį uždegimą sukeliančių ląstelių savybės gana plačiai ištyrinėtos bei aprašytos, tačiau jų reikšmė padidėjusio bronchų reaktyvumo vytimuisi nėra pilnai aiški. E. Pizzini su bendraautoriais nustatė statistiškai patikimą sąryšį tarp eozinofilų kiekio skrepliuose ir padidėjusio bronchų reaktyvumo [68], tuo tarpu kiti autoriai nurodė silpną [72] ar statistiškai nepatikimą ryšį tarp šių ląstelių ir BHR [73]. Nors pirmieji tyrimai su plaučių audinio biopsijomis parodė, kad yra sąsajos tarp eozinofilijos bei BHR, tačiau eozinofilų kiekio ryšys su bronchų reaktyvumo laipsniu nebuvo nustatytas [74]. Vėliau atlikti didesnės imties tyrimai nerado sąsajų tarp eozinofilų bei BHR, nors patvirtino reikšmingą eozinofilų kiekio ryšį su bronchų obstrukcijos laipsniu [75]. Britų mokslininkai, ištyrę 200 pacientų priėjo išvados, kad eozinofilų kiekis skrepliuose siejasi su BHR (išreikštu PC₂₀) tik sergant alergine astma, o nealerginės astmos tiriamųjų grupėje tokių ryšių nėra [76]. Tokios pat tendencijos buvo pastebėtos ir tiriant astma sergančius vaikus [77]. Taigi jau daugiau kaip ketvirtį amžiaus išlieka neatsakytas klausimas- ar eozinofilai reikšmingi padidėjusio bronchų reaktyvumo atsiradimui. Šias abejones tikėtasi išsklaidyti po daug žadančių eksperimentinių tyrimų paskelbimo [78]. Paaiškėjo, kad paskyrus ovalbuminu įjautrintoms pelėms gydymą antikūnu prieš IL-5 (anti-IL-5), reikšmingai sumažėja eozinofilų kiekis kvėpavimo takuose bei BHR. Tačiau panašių klinikinių tyrimų rezultatai nuvylė- astma sergantiems pacientams gydymas anti-IL-5 neturėjo įtakos padidėjusio bronchų reaktyvumo mažėjimui [79]. Japonijos mokslininkai, ištyrę sveikus asmenis, kuriems nustatytas padidėjęs bronchų reaktyvumas, nerado padidėjusio eozinofilų ar ECP kiekio kraujyje lyginant su kontroline asmenų grupe [80]. Šie duomenys parodė, kad BHR vystimuisi eozinofilai nebūtini. Todėl vis dažniau imta teigti, kad astmos metu eozinofilija kvėpavimo takuose bei padidėjęs bronchų reaktyvumas vystosi kaip du atskiri, vienas nuo kito nepriklausomi mechanizmai. Tačiau 2009 metų pradžioje Allergy žurnale paskelbti tyrimo rezultatai vėl pasėjo naujų abejonių. Han su bendraautoriais įrodė, kad pacientams,

sergantiems lėtiniu rinosinusitu, padidėjęs bronchų reaktyvumas reikšmingai susijęs su eozinofilų kiekio padidėjimu kraujyje [81].

4.3.5.3 Eozinofilų įtaka astmos gydymo efektyvumui

Nors šiandien dar lieka daug neatsakytų klausimų, tačiau neabejojama, kad eozinofilai yra svarbiausias biologinis žymuo, susijęs su astmos vystymusi, jos klinicine eiga, sunkumu ar atsaku į skiriamą gydymą. Todėl ši ląstelė tapo pagrindiniu taikiniu, kuriant efektyvius alerginės ligos gydymo metodus. Didžiausias lūžis astmos farmakoterapijoje įvyko 1950 metais, kuomet pacientai pradėti gydyti kortizono injekcijomis. 10 metų vėliau atrasti pirmieji inhaliuojamieji gliukokortikosteroidai, mažinantys astmos simptomų skaičių, paūmėjimų dažnį, gerinantys kvėpavimo funkciją bei pacientų gyvenimo kokybę [82]. Šie vaistai, veikdami per gliukokortikoidų receptorių, slopina uždegimą sukeliančių citokinų gamybą, jų receptorių raišką, lygiųjų raumenų proliferaciją, epitelio ląstelių aktyvumą [83]. Be abejo, reikšmingiausias gliukokortikosteroidų veikimo mechanizmas- eozinofilų apoptozės skatinimas, jų chemotaksio bei aktyvumo slopinimas. Todėl visose tarptautinėse astmos gydymo rekomendacijose šie vaistai įvardijami kaip pagrindiniai gydant nuolatinę astmą [1]. Tačiau ilgainiui buvo pastebėta, kad ne visuomet skiriant gydymą inhaliuojamaisiais gliukokortikosteroidais pasiekama astmos kontrolė. Tyrimų metu nustatyta, kad gliukokortikosteroidų efektyvumą lemia eilė veiksnių: trumpesnė astmos trukmė iki skiriant gydymą [84], bronchų obstrukcijos grįžtamumas [85], skreplių eozinofilija [84], padidėjusi IgE koncentracija kraujo serume [86], vyriška lytis [86] ir nerūkantys pacientai [87]. Bacci su bendraautorais 1 mėn. gydymu beklometazonu 67 astma sergančius pacientus nustatė, kad gydymas nebuvo efektyvus (t.y. nepakito pacientų savijauta, kvėpavimo funkcija bei BHR) tiems asmenims, kurių skrepliuose eozinofilai neviršijo 3 proc. [88]. Pritaikę logistinės regresijos metodą tyrėjai nustatė, kad mažas eozinofilų kiekis skrepliuose- geriausias žymuo, nuspėjantis inhaliuojamųjų gliukokortikosteroidų efektyvumo stoką astmos gydyme. Taigi, apibendrinus šiuos rezultatus galime teigti, kad siekiant optimalaus ligos gydymo, būtina atsižvelgti į išvardintus veiksnius bei nustatyti vyraujančią uždegimo pobūdį kvėpavimo takuose (skrepliuose padidėjęs eozinofilų ar neutrofilų kiekis).

Nors šiandieninės astmos gydymo rekomendacijos skelbia, kad gydymas turi būti skiriamas bei koreguojamas atsižvelgiant į pacientų savijautą, tačiau klinikinėje praktikoje šie nurodymai ne visuomet pasiteisina. Mokslininkai pradėję ieškoti kitų, alternatyvių astmos kontrolės būdų, savo dėmesį nukreipė į skreplių eozinofilijos stebėjimus. Žinoma, kad astma- tai kintanti liga, kurios simptomų pasireiškimą ar paūmėjimų dažnį lemia daugelis veiksnių (virusinė infekcija, rūkymas, aplinkos tarša, alergenai, neadekvatus gydymas, gretutinės ligos ir pan.). Veikiant šiems veiksniams

aktyvėja uždegimą sukeltantys procesai kvėpavimo takuose. Laiku pastebėjus šiuos pokyčius bei paskyrus gydymą, pacientai išvengtų ligos paūmėjimų, ar jie būtų silpnesni. Todėl jau ilgą laiką norima rasti priimtinausią ir efektyvų būdą uždegimui kvėpavimo takuose stebėti. Pastarąjį dešimtmetį atlikti tyrimai parodė, kad tokiu „inflatometru“ gali tapti eozinofilų kiekio pokyčiai indukuotuose skrepliuose. 2000 metais Barnes paskelbti tyrimo duomenys atskleidė, kad didėjant skreplių eozinofilijai, blogėja astma sergančių pacientų kvėpavimo funkcija bei ligos kontrolė. Pritaikius daugiaveiksnių analizės metodus paaiškėjo, kad eozinofilų kiekio skrepliuose kitimas informatyviausias biologinis žymuo, numatantis astmos kontrolės praradimą bei ligos paūmėjimą [89]. Green su bendraautoriais atliko randomizuotą klinikinį tyrimą, kurio metu lygino dvi astma sergančių pacientų grupes, iš kurių viena buvo gydoma pagal tarptautines rekomendacijas, o kita-vertinant eozinofilų kiekio kitimus skrepliuose. Po 12 mėn. trukusio stebėjimo tyrėjai priėjo išvados, kad pacientams, kuriems gydymas skirtas atsižvelgiant į skrepliuose esančių eozinofilų kiekį, buvo reikšmingai retesni astmos paūmėjimai nei kitos grupės tiriamiesiems [90]. Be to, jei tiriamųjų skrepliuose vyravo ne eozinofilai o neutrofilai, buvo mažinama inhaliuojamo gliukokortikosteroido dozė, nesukeliant ligos paūmėjimo ir tokiu būdu išvengiant nereikalingai didelių vaistų dozių naudojimo. Įtikinami ir Malerba paskelbti tyrimo rezultatai, patvirtinantys kartotinių skreplių eozinofilų kiekio matavimų naudą astmos gydymui [91]. Šio mokslininko vadovaujama tyrėjų grupė į tyrimą įtraukė lengva ar vidutine astma sergančius pacientus, gydytus pagal Visuotinės astmos iniciatyvos (GINA) rekomendacijas. Po įvadinio laikotarpio tiriamiesiems pradėta skirti individuali inhaliuojamųjų gliukokortikoidų dozė, priklausanti nuo skreplių eozinofilijos išreikštumo. Po 1 metų paaiškėjo, kad tokio gydymo metu pacientai jautėsi geriau, buvo geresnė jų gyvenimo kokybė bei retesni ligos paūmėjimai palyginus su ankstesne gydymo taktika.

Įsitikinus neabejotina eozinofilų svarba astmos patogenezėje, aktyviai pradėti tyrinėti veiksniai (chemokinai, citokinai), lemiantys šių ląstelių susikaupimą kvėpavimo takuose.

4.3.6 Citokinai

IL-5- vienas svarbiausių citokinių, siejamų su kvėpavimo takų eozinofilija bei astma. Alergine astma sergančių pacientų organizme IL-5 gamina Th limfocitai bei putliosios ląstelės, o nealerginės astmos metu šį citokiną gamina ir CD8⁺ limfocitai [92]. Šio homodimero biologinė funkcija pasireiškia veikiant per IL-5 receptorių, turinčius du subvienetus: α - specifinį tik IL-5, ir β -, kurį IL-5 dalinasi kartu su IL-3 bei GM-CSF [93]. Dėl šio receptoriaus raiškos skirtumų, IL-5 žmogaus organizme veikia tik eozinofilus bei bazofilus, o gyvūnų organizme- ir B limfocitus [94]. Kadangi eozinofilai ir bazofilai svarbūs astmos patogenezėje, IL-5 vaidmeniu šios ligos vytimuisi taip pat neabejojama. Nustatyta, kad šis citokinas, skatindamas eozinofilų pirmtakų diferenciaciją kaulų

čiulpuose, įtakoja eozinofilų augimą, brendimą bei aktyvumą, spartina migraciją į audinius, prailgina jų išgyvenamumą [95,96]. Daug žinių apie IL-5 veikimą suteikė eksperimentiniai tyrimai, atlikti su jūros kiaulytėmis, neturinčiomis IL-5 geno. Šiems gyvūnams rekombinantinis žmogaus IL-5, įkvėptas į plaučius, sukelia eozinofilų bei neutrofilų pagausėjimą kvėpavimo takuose bei BAL skystyje [97]. Tačiau netikėta buvo tai, kad nei šis citokinas, nei išryškėjęs uždegimą sukeliančių ląstelių pagausėjimas nebuvo susiję su padidėjusiu bronchų reaktyvumu. IL-5 bei eozinofilų sąsajomis su padidėjusiu bronchų reaktyvumu suabejota ir Mauser atliktame tyrime [99]. Eksperimento metu įjautrinus jūros kiaulytes OVA, išryškėjo padidėjęs bronchų reaktyvumas bei plaučių audinio ir BAL infiltracija eozinofilais. Paskyrus monokloninį antikūną prieš IL-5, kvėpavimo takų eozinofilija sumažėjo 50 proc. Tačiau bronchų reaktyvumui sumažinti prireikė didesnių antikūno prieš IL-5 dozių nei eozinofilų kiekio sumažinimui. Tyrimo autoriai išvadose teigia, kad IL-5 gali veikti bronchų reaktyvumą nepriklausomai nuo šio citokino sukeltos eozinofilijos. Kita mokslininkų grupė pastebėjo, kad veikiant žmogaus kvėpavimo takų lygųjį raumenį rekombinantiniu IL-5, padidėja raumens reaktyvumas acetilcholinui [100]. Šie rezultatai įrodė, kad IL-5 įtakoja padidėjusį bronchų reaktyvumą, tačiau tikslūs šio veikimo mechanizmai nėra aiškūs. Manoma, kad IL-5 BHR gali veikti dvejopai- tiesioginiu keliu bei netiesioginiu. Tiesioginis veikimas pasireiškia IL-5 tarpininkaujant procesuose, aktyvuojančiuose IL-1 β gamybą kvėpavimo takų lygiuosiuose raumenyse. Netiesioginio veikimo esmė- IL-5 sukelta eozinofilų degranuliacija ir baltymų išsiskyrimas, kurie blokuodami presinapsinius muskarininius M₂ receptorius, stiprina bronchus sutraukiančių raumenų atsaką į klajoklio nervo siunčiamus stimulus. Dar aiškesnių įrodymų apie IL-5 ir padidėjusio bronchų reaktyvumo sąsajas pateikė Australijos mokslininkai, eksperimente įrodę IL-5 receptoriaus β subvieneto reikšmę astmos patogenezėje [101]. Tyrėjai, atkreipę dėmesį į tai, kad iki šiol atlikti tyrimai, kurių metu buvo slopinamas tik IL-5, neįrodė reikšmingo poveikio kvėpavimo takų eozinofilijai ar astmos progresavimui [102], išklėlė hipotezę, kad šioms ligos patogenezės procesams svarbus ne tik IL-5, bet ir kiti citokinai (IL-13, GM-CSF), veikiantys per IL-5 β receptorių. Genomikos pagalba išvedę pelių rūšį, neturinčią IL-5 β receptoriaus, autoriai pastebėjo, kad, veikiant alergenu, šių gyvūnų plaučiuose nesikaupia eozinofilai, slopinamas bronchų reaktyvumas, gleivių ir alergenui specifinių IgE gamyba. Šiame eksperimentiniame modelyje paaiškėjo, kad ,stokojant IL-5 β receptoriaus, slopinama Th2 limfocitų proliferacija, migracija į uždegimo židinį bei jų išskiriamų citokinų gamyba.

Stebint IL-5 koncentracijos ar raiškos ypatumus žmonių organizme, išryškėjo kitos svarbios šio citokino savybės. Žinoma, kad IL-5 svarbus tik formuojant vėlyvąjį atsaką į alergoną, o ankstyvo atsako metu šio citokino koncentracija kvėpavimo takuose nesikeičia [103]. Kai kurie tyrėjai rado IL-5 koncentracijos sąsają su T limfocitų aktyvumu bei astmos sunkumu [94], kiti įrodė ryšį tarp IL-5 matricinės ribonukleininės rūgšties (mRNR) raiškos ir padidėjusio bronchų

reaktyvumo [104]. Tačiau daugiausiai mokslinių diskusijų kelia klinikinių tyrimų su antikūnu prieš IL-5 rezultatai. Abejones sėjančių minčių sukėlė Flood-Page vadovaujama mokslininkų komanda atlikusi placebo kontroliuojamą tyrimą su 24 astma sergančiais pacientais [102]. Pastebėta, kad gydymo anti-IL-5 metu, tiriamųjų kraujyje bei BAL reikšmingai sumažėjo eozinofilų, tačiau vaisto poveikis kaulų čiulpų ir bronchų gleivinės eozinofilijai buvo nežymus. Be to šis gydymas neturėjo įtakos padidėjusiam bronchų reaktyvumui. Tyrimo autoriai pagrįstai suabejojo eozinofilų bei IL-5 reikšme astmos klinikiniam pasireiškimui. Tačiau vėlesni tyrinėjimai atskleidė galimas šio „nesėkmingo gydymo“ priežastis [105,106]. Įrodyta, kad plaučių audinyje esančių eozinofilų paviršiuje IL-5 receptoriaus α raiška susilpnėjusi, todėl ląstelės ne taip aktyviai reaguoja į citokino stimuliaciją bei, jam veikiant, nevyksta jų degranuliacija. Manoma, kad skirtinguose audiniuose (kaulų čiulpuose, kraujyje, bronchų gleivinėje) esantys eozinofilai skirtingai reaguoja į gydymą anti-IL-5 bei nevienodai įtakoja padidėjusį bronchų reaktyvumą. Be to tam tikri veiksniai saugo kaulų čiulpų bei audinių eozinofilus nuo anti-IL-5 poveikio. Todėl šiandieną atliekamų tyrimų užduotis- įvertinti visus galimus eozinofilų apsaugos nuo anti-IL-5 mechanizmus bei rasti būdus, kaip jų išvengti.

IL-9- tai citokinas, aktyviai dalyvaujantis astmos patogenezėje. Pagrindinis šio interleukino šaltinis- Th2 limfocitai [39]. IL-9 (Th2 citokino) gamyba- sudėtingas procesas, įtraukiantis daugelį kitų citokinių ir neatsiejamas nuo Th1 limfocitų [107]. IL-9 ekspresija T limfocituose sukeliama kaskados principu: IL-2 (Th1 citokinas) skatina IL-4 gamybą, vėliau abu šie citokinai dalyvauja IL-10 gamyboje, o pastarasis, veikdamas su IL-4, skatina T limfocitus išskirti IL-9 [108]. Atskleidus IL-9 svarbiausius veikimo mechanizmus, šis citokinas įvardintas kaip vienas svarbiausių uždegimo mediatorių astmos patogenezėje. In vitro tyrimai parodė, kad IL-9 skatina eozinofilų diferenciaciją, aktyvumą bei telkimąsi kvėpavimo takuose [109]. Alergeno sukelta aktyvi eozinofilopoezė kaulų čiulpuose taip pat vyksta dalyvaujant IL-9 [110]. Ovalbuminu įjautrintoms pelėms, paskyrus gydymą monokloniniu antikūniu prieš IL-9, kaulų čiulpuose reikšmingai sumažėjo jaunų eozinofilų bei šių ląstelių pirmtakų. Taip pat žinoma, kad šis citokinas, didindamas IL-5 receptorių raišką eozinofilų paviršiuje, stiprina IL-5 biologinį aktyvumą [111] ir skatina jo gamybą CD4⁺ limfocituose [112]. In vitro veikiant eozinofilus namų dulkių erkės lipopolisacharidu (specifiniu ir stipriu alergenu), akivaizdžiai padidėja IL-9 raiška šių ląstelių paviršiuje [113], ir šis procesas reikšmingai siejasi su atopija [114]. Taigi, IL-9- svarbus veiksnys, skatinantis eozinofilijos vystimąsi. O eozinofilai, būdami vienu iš IL-9 šaltinių, potencijuoja šio citokino sukeltą uždegimo kaskadą [115,116]: Th2 limfocitų apoptozės slopinimą, putliųjų ląstelių diferenciacijos aktyvinimą, proteazių gamybos bei IgE ir jo receptorių raškos skatinimą [39].

Žinant platų IL-9 veikimo ratą galima būtų tikėtis, kad šis citokinas dalyvauja svarbiausiuose astmos patofiziologiniuose procesuose: kvėpavimo takų remodeliacijoje, bronchų obstrukcijos ar

padidėjusio jų jautrumo vystimesi. Tačiau atliktų tyrimų duomenys kol kas prieštaringi. Eksperimentas su OVA įjautrintomis pelėmis parodė, kad gydymas antikūniu prieš IL-9 paveikė ne tik eozinofiliją plaučiuose, taurinių ląstelių vešėjimą ar epitelio pažeidimus, bet ir reikšmingai sumažino BHR [117]. Tačiau kiti tyrėjai, lyginę laukinių pelių bei pelių, neturinčių IL-9 geno, atsaką į alergoną, ryšio tarp IL-9 bei padidėjusio bronchų jautrumo nenustatė [118]. Akivaizdžiai patvirtintas tik šio citokino dalyvavimas fibroziniuose procesuose, sukeliančiuose kvėpavimo takų remodeliaciją [119].

4.3.7 Chemokinai

Mokslininkų išsakytos išvados apie įvairių ląstelių (eozinofilų, limfocitų, neutrofilų, bazofilų, putliųjų ląstelių) sukulto uždegimo svarbą astmos patogenezėje, paskatino tolimesnius tyrinėjimus ir molekulinį procesų, dalyvaujančių šių leukocitų telkime bei aktyvavime, paieškas. Per šį laiką nustatyta daugiau kaip 50 chemotaktinių citokinų (vadinamų chemokinais), veikiančių skirtingas ląsteles per specifinius G baltymo sujungtus receptorius (GPCR) [120]. Šie chemokinai, pagal cisteino liekanų struktūrą ligande, skiriami į 4 šeimas: CXC, CC, C ir CX3C (kur pirmoji C atspindi cisteiną, o sekantys dėmenys nurodo vienos ar trijų kitų amino rūgščių buvimą). 2000 metais buvo pradėta naudoti sisteminė chemokinų nomenklatūra, kurioje kiekvienas ligandas bei receptorius priskirti pošeimiams ir nustatyti jų identifikaciniai numeriai [121]. Kita chemokinų klasifikacija atspindi jų funkcinį aktyvumą [122]. Skiriami uždegiminiai ir homeostatiniai chemokinai. Uždegiminiai citokinai gaminami aktyvuotų ląstelių kaip atsakas į patekusią infekciją ar audinių pažeidimą. Homeostatiniai chemokinai nedideliais kiekiais gaminami nuolatos, jų pagrindinė funkcija- dalyvauti ląstelių migracijoje, kuri reikalinga normaliam imuninės sistemos darbui. Visų šių chemokinų bei jų receptorių funkcijos neapsiriboja dalyvavimu imuniniame atsake. Šios biologinės medžiagos siejamos su daugeliu autoimuninių ligų (tokių kaip psoriazė, reumatoidinis artritas, išsėtinė sklerozė) [123], astma, LOPL, vėžiniais susirgimais [124] ar transplantato atmetimo reakcijomis [1123].

Tarp didelės grupės nustatytų chemokinų tik eotaksinų pošeimis (eotaksinas-1/CCL11, eotaksinas-2/CCL24, eotaksinas-3/CCL26) selektyviai skatina eozinofilų chemotaksį, aktyvuodami 3 CC chemokinų receptorių (CCR3) [125].

Eotaksinas-1- pirmasis nustatytas dominuojantis eozinofilų chemoatraktantas eksperimentiniame alerginio uždegimo modelyje [126]. Tyrimo metu nustatyta, kad CCL11 skatina eozinofilų telkimąsi plaučiuose, bei, veikdamas kartu su IL-5, sukelia greitą eozinofilų ir jų pirmtakų išsiskyrimą iš kaulų čiulpų [126]. Nustačius eotaxino-1 komplementariosios DNR (cDNR) amino rūgščių seką, 1996 metais rastas genas, koduojantis žmogaus CCL-11, turintį 58 proc.

homologiją su pelių ar jūros kiaulyčių eotaksinu-1 [127]. Žmogaus CCL11 koduojantis genas yra 17 chromosomos ilgajame petyje, o jo transkripciją plaučių epitelioocituose bei fibroblastuose potencijuoja TNF- α (Th1 limfocitų gaminamas citokinas) ir IL-4 (Th2 citokinas), tuo tarpu budezonidas skatina šio eotaksino mRNR irimą [128].

Kiti du eotaksino homologai (pavadinti eotaksinu-2/CCL24 ir eotaksinu-3/CCL26), nustatyti kiek vėliau, pasitelkiant molekulinės biologijos metodus [129]. Nors šių eotaksinų amino rūgščių seka skiriasi, visi jie vaidina svarbų vaidmenį astmos patogenezėje: eotaksinas-1/CCL11 dalyvauja eozinofilų telkime ūmios atsako į alergoną fazės metu, o eotaksinas-2/CCL24 ir eotaksinas-3/CCL26 susiję su išliekančiu eozinofiliniu uždegimu kvėpavimo takuose [130,131]. Eotaksinas-2/CCL24 kaip ir eotaksinas-1/CCL11 taip pat selektyviai veikia per CCR3 receptorių, skatindamas eozinofilų pritraukimą į uždegimo židinį, tačiau šių citokinų struktūra ir genetinė lokalizacija skiriasi. Nustatyta, kad CCL24 amino rūgščių seka tik 39 proc. atitinka CCL11 amino rūgščių seką [132]. Įdomu tai, kad eotaksino-2 mRNR raiška daugiausiai stebima plaučiuose bei tuščiojoje žarnoje, todėl manoma, kad šis chemokinas- vienas svarbiausių, lemiančių eozinofilų susikaupimą šiuose organuose [132]. Daugelis mokslinių tyrimų, vertinusių CCL24 veikimo mechanizmus, buvo atlikti su pelėmis, tačiau paaiškėjo, kad pelių eotaksinas2/CCL24 turi 58 proc. homologiją su žmogaus eotaksino 2/CCL24 amino rūgščių seka.

Dar vėliau dvi mokslininkų grupės nustatė trečią eotaksinų pošeimio narį- eotaksiną-3/CCL26 [133,134], turintį 37 proc. amino rūgščių sekos tapatumą su eotaksinu-1. Tačiau apie šio chemokino veikimo mechanizmus žinome gerokai mažiau nei apie CCL11 ar CCL24, nes, neradus pelių genome geno, koduojančio šį baltymą, buvo manoma, kad šis mediatorius būdingas tik *Homo sapiens* rūšiai [135]. Ir tik visai neseniai identifikuotas CCL26 koduojantis genas karvės (*Bos taurus*), šuns (*Canis familiaris*) bei šimpanzės (*Pan troglodytes*) genomuose. Atlikus pirmuosius eksperimentinius tyrimus buvo pastebėta, kad CCL26 chemotaktinis aktyvumas apie 10 kartų silpnesnis nei CCL11 ar CCL24. Manoma, kad eotaksinas-3 svarbus ne tik ląstelių telkimui audiniuose, bet jis, kaip natūralus chemokinių receptorių (CCR1, CCR2 bei CCR5) antagonistas, slopina Th1 limfocitų bei monocitų patekimą į audinius, tokiu būdu reguliuoja kitus uždegimą sukeliančius ar slopinančius procesus [136].

Th2 limfocitai ir jų gaminami citokinai (IL-4, IL-13)- svarbiausi veiksniai skatinantys eotaksinų gamybą epitelio ląstelėse, kvėpavimo takų lygiuosiuose raumenyse, kraujagyslių endotelio ląstelėse, makrofaguose bei eozinofiluose [137]. Veikdami per CCR3 receptorių, chemokinai uždegimo pažeistame audinyje telkia Th2 limfocitus, bazofilus, putliąsias ląsteles [138]. Daugiausia diskusijų kyla dėl eotaksinų ir neutrofilų sąveikos. Eksperimentinių tyrimų metu pastebėta, kad paveikus peles CCL11, jų audiniuose stebimas ne tik eozinofilų, bet ir neutrofilų padidėjimas, o blokuojant CCR3 receptorių, šių ląstelių kiekis reikšmingai sumažėja [139]. Šie

rezultatai prieštaravo anksčiau paskelbtoms išvadoms, teigiančioms, kad neutrofilų paviršiuje CCR3 receptorių nėra [140]. Tačiau kiti tyrėjai paneigė šias išvadas, tyrimai parodę CCR3 raišką neutrofiliniuose granulocituose [141].

Taigi, eotaksinai, būdami aktyvūs eozinofilų chemoatraktantai, tiesiogiai dalyvauja astmos patogenezėje. Įrodyta, kad jie, sukeldami reaktyvių deguonies radikalų gamybą eozinofiluose, skatina jų degranuliaciją [142]. Be to šie chemokinai, panašiai kaip IL-5, slopina eozinofilų programuotą žūtį [144]. Dėl tokio biologinio veikimo eotaksinai siejami su astmos sunkumu [144], kvėpavimo funkcijos blogėjimu bei padidėjusiu bronchų jautrumu [145].

Taigi, apibendrinant aprašytas astmos patogenezės grandis ir žinant tai, kad šios ligos metu dėl sutrikusios ląstelės ciklo žymenų (tokių kaip proliferuojančių ląstelių branduolio antigeno-PSNA bei Ki67,) ekspresijos slopinamas pamatinių ląstelių dauginimasis ir vešėjimas kvėpavimo takų gleivinėje- galime atsakyti į anksčiau iškeltą klausimą- kodėl ūmus alerginis uždegimas tampa lėtiniu, sukeliančiu negrįžtamus pakitimus kvėpavimo takuose- remodeliaciją.

4.4 Klinikiniai astmos variantai

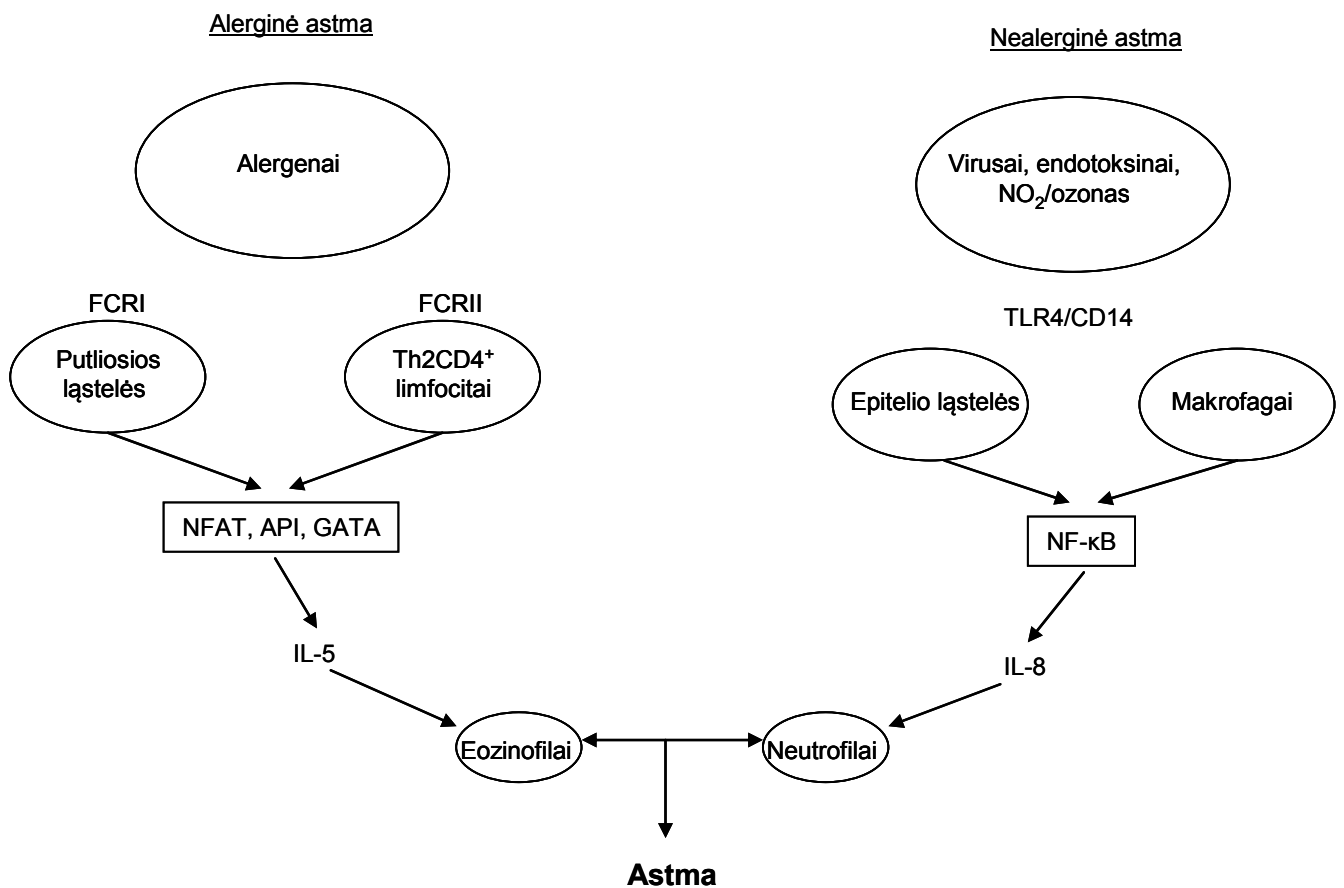
Peržvelgus iki šiol atliktus tyrimus, parašytus vadovėlius ar apžvalgas matome, kad astma plačiąja prasme suvokiama kaip alergeno sukelta atopinė liga, pasireiškianti būdingiausiais klinikiniais, patologiniais ir patofiziologiniais ypatumais: dusulio epizodais, padidėjusiu kvėpavimo takų reaktyvumu ar obstrukcija bei eozinofilų ir Th2 limfocitų sukeltu nuolatinu uždegimu bronchų gleivinėje. Taigi, atsiradus inhaliuojamiesiems gliukokortikosteroidams, kurie tikrai veikia visus išvardintus patogenetinius mechanizmus, buvo galima tikėtis, kad greitai laiku astma taps visiškai kontroliuojama liga. Tačiau realybė kiek kitokia. Vieni pacientai, naudodami nedideles vaistų dozes jaučiasi puikiai, kitus, nepaisant gydymo, vargina besikartojantys dusulio epizodai, dažni ligos paūmėjimai, liga blogina šių žmonių gyvenimo kokybę. Todėl klinikinėje praktikoje astma jau seniai vertinama kaip įvairialypė, varijuojančios klinikinės eigos liga, pasireiškianti skirtingu atsaku į gydymą. Šie klinikiniai skirtumai skatina naujų mokslinių hipotezių atsiradimą ir tyrimų plėtojimą. Todėl pastarąjį dešimtmetį daugėja duomenų, įrodančių, kad skirtingos, o kai kada ir tos pačios klinikinės eigos astma turi ir skirtingus patomorfologinius bei patofiziologinius pokyčius. O moksliniuose tyrimuose ar publikacijose sutinkami šiuos skirtumus apibendrinantys klinikinių astmos fenotipų pavadinimai: alerginė ir nealerginė astma, eozinofilinė bei neutrofilinė astma, sunkiai gydoma astma ir t.t. Nors iki šiol astmos klinikinio fenotipo sąvoka yra neapibrėžta, taip pat nėra ir visuotinai priimtos šios ligos nomenklatūros, atsižvelgiančios į vyraujančią fenotipą, tačiau galime teigti, kad egzistuoja du dažniausiai minimi klinikiniai ligos variantai: alerginė ir nealerginė (atopinė ir neatopinė) bei eozinofilinė ir neutrofilinė astma [146]. Svarbiausias kriterijus skiriant alerginę ir nealerginę ligos formą- įsijautrinimo aplinkos alergenams nustatymas, tačiau pastebimi ir

patofiziologiniai šių fenotipų skirtumai: sergančiųjų alergine astma bronchų gleivinėje aptinkamas padidėjęs eozinofilų bei II tipo T limfocitų pagalbininkų kiekis, o neutrofilai ir limfocitai vyrauja sergant nealergine astma [147,148]. Eozinofilinis ar neutrofilinis ligos variantas nustatomas pagal kvėpavimo takuose (bronchų gleivinės biopsijoje, BAL skystyje ar skrepliuose) vyraujančią uždegimo pobūdį. Tačiau dažniausiai eozinofiline astma siejasi su atopija, o vyraujant neutrofilų sukeltam kvėpavimo takų uždegimui derinys su įsijautrinimu aplinkos alergenams būna retas. Todėl labai dažnai mokslinėje literatūroje šių keturių ligos fenotipų sąvokos persipina viena su kita.

Jau 1947 metais Rackemann su bendraautoriais suskirstė astmą į išorinę, pasireiškiančią jaunesniame amžiuje (<30 metų), ir vidinę, kliniškai pasireiškiančią vyresniems asmenims (>40 metų) [149]. Nuo 2001 metų astma buvo klasifikuojama į alerginę ir nealerginę [150]. Tačiau naujausios peržiūros Visuotinės astmos iniciatyvos (GINA) rekomendacijose alerginė ir nealerginė astma apibūdinamos kaip turinčios kai kurių klinikinių skirtumų bet patomorfolgiškai panašios ligos formos, todėl jų išskyrimas ligos klasifikacijoje netikslingas, o gydymas vaistais parenkamas pagal paciento jaučiamus simptomus ar kvėpavimo funkcijos rodiklius [1]. Tuo tarpu tiek klinikiniai, tiek eksperimentiniai tyrimai atskleidžia vis naujus šių formų skirtumus, nulemiančius ligos kliniką ir atsaką į skiriamą gydymą.

Tiriant alergine astma sergančius pacientus, įrodytas eozinofilų ir II tipo T limfocitų pagalbininkų (helperių) vaidmuo lėtinio ligos uždegimo metu bei šių ląstelių sąsaja su padidėjusiu bronchų reaktyvumu [151,152].

Tuo tarpu duomenys apie nealerginės astmos patomorfolginius ir patofiziologinius pokyčius iki šiol negausūs ir prieštaringi [153]. P. Gibson su bendraautoriais teigia, kad nealerginės astmos metu viena svarbesnių ląstelių, dalyvaujančių lėtiniame uždegime, yra eozinofilas [154], kiti tyrimuose nurodo reikšmingą putliųjų ląstelių vaidmenį [155]. Grupė Švedijos mokslininkų alergine astma sergančiųjų plaučių audinyje nustatė didesnę eozinofilų ir T limfocitų bei mažesnę neutrofilų skaičių palyginus su sergančiais nealergine astma [156]. Tyrėjai įsitikino, kad neutrofilų susikaupimas kvėpavimo takuose, sergant nealergine astma, reikšmingai siejasi su IL-8- citokinu, kuris labai svarbus ir lėtinės obstrukcinės plaučių ligos (LOPL) patogenezėje. Tiriant uždegiminio proceso aktyvumą atspindintį azoto monoksido (NO) kiekį iškvepiamame ore nustatyta, kad alergine astma sergančių pacientų iškvepiamame ore NO yra daugiau, nei sergančiųjų nealergine astma [157], taip pat jų kvėpavimo takai jautresni įkvepiamam adenozino-5-monofosfatui nei sergančiųjų nealergine astma [158]. Šie duomenys parodė, kad alerginė ir nealerginė astma skiriasi ne tik ligą ar jos simptomus sukeliančiu veiksniu, bet ir imunologinių mechanizmų kaskadomis, lemiančiomis klinikinę astmos pasireiškimą (4 pav.).



4 pav. Alerginės ir nealerginės astmos imunologiniai mechanizmai (adaptuota pagal 159). FCRI, FCRII- didelio afiniteto FC receptoriai; NFAT, API, GATA, NF-κB- transkripcijos veiksniai; TLR4- transmembraniniai atpažinimo receptoriai.

Epidemiologinių tyrimų duomenys atskleidė ir klinikinius alerginės bei nealerginės astmos skirtumus [160]. Nealerginė astma pasireiškia vyresniame amžiuje, ja serga dažniau moterys, ligos klinikinė eiga būna sunkesnė, o inhaliuojamųjų gliukokortikosteroidų poveikis blogesnis palyginus su alergine astma. Ulrik vadovaujami mokslininkai, 10 metų stebėję astma sergančius pacientus nustatė, kad nealerginės ligos atveju greičiau blogėja kvėpavimo funkcija nei sergant alergine astma [161]. Vertinant indukuotų skreplių ląstelių sudėtį, nustatyta, kad lengvos astmos metu vyraujanti ląstelė yra eozinofilas, o sunkios ir atsparios gydymui ligos metu skrepliuose randama daugiau neutrofilų [68,69]. Šie duomenys patvirtina hipotezę, kad astma yra heterogeninė liga, turinti klinikinius fenotipus, lemiančius ligos patomorfologinius, patofiziologinius bei klinikinius skirtumus.

4.5 Astma ir rūkymas

Šiandien vis plačiau kalbama apie rūkymo žalą astma sergančiam pacientui, nes daugelyje ekonomiškai išsivysčiusių šalių ne mažiau kaip 25 proc. šia liga sergančių žmonių yra aktyvūs

rūkoriai [162]. Šiandien rūkymas siejamas su padidėjusiu sergamumu astma, sunkesne ligos klinicine eiga, pasikeitusiu kvėpavimo takų uždegimo pobūdžiu ar blogesniu atsaku į skiriamą gydymą. Kai kurie atlikti tyrimai parodė, kad rūkymas didina tikimybę susirgti astma [163,164], tačiau kiti tyrėjai tokio ryšio nepatvirtino [165,166]. Epidemiologinis astmos genetinių ir aplinkos veiksnių tyrimas (angl. The Epidemiological Study on the Genetics and Environment of Asthma-EGEA) taip pat nepatvirtino teiginio, kad rūkymas, kaip nepriklausomas veiksnys, lemia astmos atsiradimą, tačiau parodė neabejotiną ryšį tarp rūkymo ir ligos sunkumo [160]. Astma sergantys rūkoriai jaučia sunkesnius ligos simptomus, jiems daugiau tenka vartoti pagalbinius vaistus, dėl sunkių paūmėjimų jie dažniau gydomi ligoninėje nei nerūkantys astma sergantys asmenys [167-169]. Tabako dūmų toksinai ar jų sukeltas oksidacinis stresas audiniuose pažeidžia bronchų epitelį, slopina jo apsaugines funkcijas, lemia uždegimą sukeliančių ląstelių susitelkimą kvėpavimo takuose [170]. Tyrimų metu pastebėti uždegime dalyvaujančių ląstelių bei citokinų gamybos skirtumai tarp rūkančių ir nerūkančių astma sergančių pacientų [171,172]. Rūkančių žmonių bronchų gleivinėje nustatomas lėtinis neutrofilų sukeltas uždegimas. Dėl tabako sumažėja gliukokortikosteroidams jautrių receptorių skaičius kvėpavimo takuose [173]. Šie pokyčiai lemia blogą priešuždegiminį inhaliuojamųjų gliukokortikosteroidų veikimą astma sergantiems pacientams. Tačiau tikslios atsparumo gliukokortikoidams priežastys dar nėra nustatytos. Literatūroje diskutuojama apie kelis svarbiausius rūkymo sukeltus pokyčius, kurie gali nulemti sunkios ar gydymui atsparios astmos vystimąsi.

Rūkymo sukelti gliukokortikosteroidų farmakokinetikos pokyčiai. Įrodyta, kad rūkorių kvėpavimo takai pralaidesni aplinkos teršalams [174,175], o taurinėse ląstelėse vyksta intensyvesnė gleivių gamybą nei nerūkančiųjų bronchų gleivinėje [175]. Šie pokyčiai gali nulemti greitesnį įkvepiamųjų gliukokortikosteroidų pasišalinimą iš kvėpavimo takų, o gleivių perteklius blokuoja šių vaistų sąveiką su gliukokortikosteroidų receptoriais (GR), esančiais uždegimą sukeliančių ląstelių paviršiuje.

Rūkymas keičia ląstelių, sukeliančių uždegimą, savybes. Ilgą laiką rūkančių astma sergančių pacientų skrepliuose mažėja eozinofilų kiekis bei pastebimas didesnis neutrofilų kiekis palyginus su nerūkančiais astma sergančiais pacientais [176-178]. O inhaliuojamieji gliukokortikosteroidai, slopindami neutrofilų apoptozę, šį uždegimą palaiko [179]. Nustatyta, kad astma sergančių rūkorių kvėpavimo takuose pagausėja ne tik neutrofilų, bet ir CD8⁺ limfocitų, kurie taip pat neįturi gydymui inhaliuojamaisiais gliukokortikosteroidais [180,181].

Rūkymo įtaka uždegimo mediatorių bei citokinų gamybai. Rūkančių ir astma sergančių pacientų kvėpavimo takuose nustatyta aktyvesnė uždegimą sukeliančių mediatorių IL-4, IL-8, IL-1 β , ir TNF- α gamyba, kurios nepažaboja gydymas gliukokortikosteroidais [182-184]. Sumažėjusi uždegimą slopinančių citokinų gamyba, tokių kaip IL-10 bei IL-18, taip pat įtakoja sunkesnę ligos

eigą, aktyvesnį uždegimą kvėpavimo takuose bei blogesnį atsaką skiriamam gydymui [185,186]. Be to nustatyta, kad IL-18 svarbus mediatorius, skatinantis Th1 limfocitų aktyvumą [187], o sumažėjusi šio interleukino gamyba sukelia Th1/Th2 limfocitų pusiausvyros sutrikimus, lemiančius oksidacinį stresą ir padidėjusią azoto monoksido gamybą, o tai slopina GR jautrumą [188].

Rūkymas lemia padidėjusią GR-β raišką. Eksperimentinių tyrimų metu nustatyta, kad tabako dūmai sukelia padidėjusią GR-β raišką ląstelės branduolyje ir slopina GR-α receptorius [189], per kuriuos gliukokortikosteroidai mažina eozinofilų sukeltą uždegimą. Įrodyta, kad veikdami GR-β gliukokortikosteroidai slopina neutrofilų apoptozę, tokiu būdu paskatina šių granulocitų sukulto uždegimo persistavimą kvėpavimo takuose [190,191].

Rūkymas keičia transkripcijos veiksnius ir informacijos sklidimą ląstelėje. Rūkorių bronchų epitelijoje nustatoma ryškesnė NF-κB didžiojo subvieneto p65 raiška. O NF-κB fosforilinimo metu slopina GR savybes prisijungti prie DNR bei blokuoja GR-α funkciją [192]. Todėl silpna GR-α raiška bei padidėjęs NF-κB aktyvumas nulemia atsparumą gliukokortikosteroidams. Oksidacinio streso pasekmė- sumažėjęs histonų deacetilazės aktyvumas alveolių makrofaguose- taip pat viena iš priežasčių, lemiančių mažesnę jautrumą gliukokortikosteroidams [193]. p38 mitogeno aktyvuojamos baltymų kinazės BAL ląstelėse mažina GR afinitetą gliukokortikosteroidams [194].

Rūkymas slopina β₂-adrenerginių receptorių funkciją. β₂-agonistai sustiprina prieš uždegiminį gliukokortikosteroidų veikimą, skatindami GR raišką [33]. Įrodyta, kad rūkymas mažina β₂-adrenerginių receptorių tankį bei ciklinio adenozino monofosfato kiekį ląstelėse [195], o šio poveikio apimtį nulemia β₂-adrenerginių receptorių genų polimorfizmas [196].

Visi šių tyrimų duomenys leidžia manyti, kad rūkymas, keisdamas astmos patogenetinius mechanizmus, keičia ligos sunkumą ir atsaką į skiriamą gydymą. [196-202].

Tačiau tikslus rūkymo poveikis kvėpavimo takams dar nėra aiškus. Manoma, kad vienas labiausiai žalojančių veiksnių, susijusių su sunkesne ligos eiga ar blogu gydymo efektu- oksidacinio streso nulemta histonų deacetilazės sumažėjusi raiška ir aktyvumas [203]. Be to iki šiol atliktuose tyrimuose astma sergantys pacientai nebuvo skiriami pagal fenotipus, todėl išlieka neatsakytas klausimas, ar rūkymas sukelia vienodus pokyčius pacientams, sergantiems fenotipiškai skirtingomis astmos formomis.

Taigi apibendrinant visus iki šiol atliktų tyrimų duomenis galime kelti hipotezę, kad rūkymas, veikdamas citokinų, chemokinų, receptorių raišką, įtakoja uždegimo ląstelių susikaupimą kvėpavimo takuose ir keičia astmai būdingo lėtinio uždegimo savybes. Žinodami molekulinis eotaksinų (CCL11, CCL24, CCL26) skirtumus, iškeliamo hipotezę, kad tabako dūmai gali skirtingai veikti šių biologiškai aktyvių medžiagų gamybą sergant alergine ir nealergine astma.

5. TYRIMO METODIKA

Tyrimas sudarytas iš dviejų dalių:

I dalis. Alergine ir nealergine astma sergančių pacientų indukuotų skreplių ląstelių sudėties bei IL-9 raiškos tyrimas. Šio tyrimo metu siekėme išsiaiškinti, ar skiriasi alergine bei nealergine astma sergančių pacientų ląstelių sudėtis, IL-9 raiška ir koncentracija indukuotuose skrepliuose.

II dalis Rūkorių ir nerūkančių asmenų, sergančių alergine ar nealergine astma, kvėpavimo takų sekreto ląstelių sudėties, IL-5 ir eotaksinų koncentracijos tyrimas. Pirmoje tyrimo dalyje patvirtinus, kad alergine bei nealergine astma sergančių pacientų uždegimo ląstelių sudėtis indukuotuose skrepliuose skiriasi, iškėlėme hipotezę, kad rūkymas sukelia nevienodus pokyčius kvėpavimo takuose sergant fenotipiškai skirtingomis (alergine ir nealergine) astmos formomis.

Kvėpavimo takų sekretu tyrimo metu vadinome indukuotus skreplius ir bronchoalveolinio lavažo skystį.

Tyrimo metu ištirti pacientai, sergantys astma bei sveiki asmenys:

I dalyje-41 tiriamasis;

II dalyje-106 tiriamieji.

Tyrimas atliktas Kauno medicinos universiteto (KMU) Biomedicininų tyrimų instituto Pulmonologijos laboratorijoje bei KMU Pulmonologijos ir imunologijos klinikoje, gavus Kauno regioninio Bioetikos komiteto leidimą. Visi tiriamieji buvo supažindinti su tyrimo protokolu, prieš pradėdant tyrimą jie pasirašė informuoto asmens sutikimo formoje.

5.1 Tiriamųjų kontingentas ir tyrimo eiga

5.1.1 Alergine ir nealergine astma sergančių pacientų indukuotų skreplių ląstelių sudėties bei IL-9 raiškos tyrimas.

Šioje tyrimo dalyje ištirti 41 pacientas, sergantis lengva astma [1].

Tiriamųjų atrankos kriterijai:

1. Astmos simptomai vargina ne mažiau kaip 12 mėnesių, bet ne ilgiau kaip keturis metus;
2. Pacientai, kurie niekuomet negydyti inhaliuojamais ar sisteminio poveikio gliukokortikosteroidais;
3. Nerūkantys ar rūkę asmenys, kurių rūkymo intensyvumas mažiau kaip dvidešimt cigarečių per dieną ir ne ilgiau kaip penkerius metus;
4. Amžius nuo 40 iki 70 metų;
5. Iki tyrimo bent vieną mėnesį nesirgę ūmia kvėpavimo takų infekcija.

Atrinkti pacientai tyrimo centre lankėsi tris kartus.

Pirmojo vizito metu pacientai, pasirašę informuoto asmens sutikimo formoje, buvo apklausiami pagal paruoštą klausimyną, surinkta informacija apie tiriamųjų ligos bei gyvenimo anamnezę, gretutines ligas, naudojamus vaistus, astmą provokuojančius veiksniai. Plaučių funkcija įvertinta spirometrijos metodu, įsijautrinimas aplinkos alergenams nustatytas alerginių odos dūrio mėginių pagalba.

Antrojo vizito metu įvertintas pacientų bronchų reaktyvumas rezervuariniu metodu, naudojant metacholiną ir nustatytas metacholino dozė, sumažinančią forsuito iškvėpimo tūrį per pirmąją sekundę 20 proc. (PD₂₀). Prieš tyrimą pacientai nevartojo ilgo bei trumpo veikimo bronchus plečiančių vaistų, 6 val. iki tyrimo negėrė kavos.

Trečiasis vizitas įvyko praėjus 2 savaitėms po antrojo, siekiant išvengti galimų metacholino sukeltų pakitimų kvėpavimo takuose [204]. Šio vizito metu pacientams atlikta skreplių indukcija ir citologinis indukuotų skreplių tyrimas. Įvertinta IL-9 raiška bei koncentracija indukuotuose skrepliuose.

Tyrimo metu pacientams, astmos simptomų malšinimui buvo rekomenduotas trumpo veikimo bronchus plečiantis vaistas salbutamolis (Ventolin®, Glaxo Wellcome), tiriamieji prašyti šiuo laikotarpiu nekeisti gyvenamosios vietos bei rūkymo įpročių.

Pagal alergologinės anamnezės duomenis (simptomus provokuojantys veiksniai) bei alerginių odos dūrio mėginių rezultatus pacientai suskirstyti į dvi grupes:

1. Alerginė astma sergantys pacientai (nustatytas įsijautrinimas alergenams, provokuojantiems ligos simptomus) – n=21;
2. Nealerginė astma sergantys pacientai- n=20.

5.1.2. Rūkorių ir nerūkančių asmenų, sergančių alergine ar nealergine astma, kvėpavimo takų sekreto ląstelių sudėties, IL-5 ir eotaksinų koncentracijos tyrimas.

Ištyrėme 81 pacientą, sergantį lengva ar vidutinio sunkumo astma ir 25 kvėpavimo takų ligomis nesergančius asmenis. Astma nustatyta pagal tarptautines Globalios astmos iniciatyvos (GINA) rekomendacijas [1].

Tiriamųjų atrankos kriterijai:

1. Astmos simptomai vargina ne mažiau kaip 12 mėnesių.
2. Pacientai, negydyti inhaliuojamais ar sisteminio poveikio gliukokortikosteroidais.
3. Tiriamieji ne mažiau nei 1 mėnesį iki tyrimo nevartojo ilgo veikimo bronchus plečiančių vaistų.
4. Tiriamųjų amžius nuo 40 iki 70 metų.
5. Visi tiriamieji bent 1 mėnesį iki tyrimo nesirgo ūmia kvėpavimo takų infekcija.

Neįtraukimo kriterijai:

1. Kitos diagnozuotos kvėpavimo organų ligos (sarkoidozė, tuberkuliozė, plaučių vėžys ir kt.).
2. Sunkios ar nekontroliuojamos gretutinės ligos.
3. Buvę plaučių operacijos.
4. Buvęs astmos paūmėjimas mažiau nei 6 savaitės iki tyrimo
5. Gydytas ilgo veikimo bronchus plečiančiais (β_2 receptorių agonistais), anticholinerginiais vaistais.

Atrinkti pacientai tyrimo centre lankėsi keturis kartus.

Pirmojo vizito metu pasirašius informuoto asmens sutikimo formą ir surinkus informaciją apie tiriamųjų ligos bei gyvenimo anamnezę, gretutines ligas, naudojamus vaistus, astmą provokuojančius veiksnius, rūkymo įpročius, buvo įvertinta plaučių funkcija spirometrijos metodu ir nustatytas galimas įsijautrinimas aplinkos alergenams atlikus alerginius odos dūrio mėginius.

Antrojo vizito metu įvertintas pacientų bronchų reaktyvumas provokaciniu inhaliaciniu mėginiu naudojant metacholiną, apskaičiuotas PD₂₀.

Po dviejų savaitių pacientai atvyko trečiajam vizitui, kurio metu atlikta skreplių indukcija ir citologinis skreplių įvertinimas bei paimtas kraujo mėginys. Indukuotų skreplių supernatante bei kraujo serume nustatytos citokinų bei chemokinų koncentracijos ELISA metodu.

Ketvirtasis vizitas paskirtas praėjus vienai savaitei po trečiojo vizito, siekiant išvengti hipertoninio NaCl tirpalo įtakos uždegimo ląstelių sudėčiai kvėpavimo takuose [205]. Šio tyrimo metu pacientams atlikta fibrobronchoskopija bei bronchoalveolinis lavažas. Atliktas citologinis BAL skysčio tyrimas bei nustatytos eotaksinų ir IL-5 koncentracijos BAL skystyje imunofluorescenciniu metodu.

Rūkymo įpročiai vertinti apskaičiuojant pakmečius t.y. suminį rūkymo intensyvumo rodiklį (per dieną surūkytų cigarečių kiekį padalinome iš 20 ir padauginome iš rūkymo trukmės (metais)).

Astma sergantys pacientai pagal alergologinės anamnezės duomenis (simptomus provokuojančius veiksnius), alerginių odos dūrio mėginių rezultatus ir rūkymo įpročius buvo suskirstyti į keturias grupes:

1. Rūkoriai, sergantys alergine astma n=16:
 - a. nustatytas įsijautrinimas alergenams, provokuojantiems astmos simptomus;
 - b. tyrimo metu rūkantys asmenys, turintys ne mažesnę nei 10 pakmečių rūkymo intensyvumą.
2. Nerūkantieji, sergantys alergine astma n=20:

- a. nustatytas įsijautrinimas alergenams, provokuojantiems astmos simptomus;
- b. niekuomet nerūkę asmenys.

3. Rūkoriai, sergantys nealergine astma n= 19:

- a. neaiškūs dusulį provokuojantys veiksniai;
- b. nenustatytas įsijautrinimas aplinkos alergenams;
- c. nesergantys kitomis alerginėmis ligomis (atopiniu dermatitu, alerginiu rinitu);
- d. tyrimo metu rūkantys asmenys, turintys ne mažesnę kaip 10 pakmečių rūkymo intensyvumą.

4. Nerūkantieji, sergantys nealergine astma n=26:

- a. neaiškūs dusulį provokuojantys veiksniai;
- b. nenustatytas įsijautrinimas aplinkos alergenams;
- c. nesergantys kitomis alerginėmis ligomis (atopiniu dermatitu, alerginiu rinitu);
- d. niekuomet nerūkę asmenys.

Sveiki tiriamieji suskirstyti į dvi grupes:

1. „Sveiki“ rūkoriai n=10:

- a. nesergantys kvėpavimo takų ligomis;
- b. nenustatytas įsijautrinimas aplinkos alergenams;
- c. nesergantys kitomis alerginėmis ligomis (atopiniu dermatitu, alerginiu rinitu);
- d. tyrimo metu rūkantys ir turintys ne mažesnę nei 10 pakmečių rūkymo intensyvumą.

2. Sveiki nerūkantieji n=15:

- a. nesergantys kvėpavimo takų ligomis;
- b. nenustatytas įsijautrinimas aplinkos alergenams;
- c. nesergantys kitomis alerginėmis ligomis (atopiniu dermatitu, alerginiu rinitu);
- d. niekuomet nerūkę asmenys.

5.2 Tyrimo metodai

5.2.1 Alerginiai odos dūrio mėginiai

Tiriamiesiems įsijautrinimas aplinkos alergenams tirtas ir vertintas atliekant alerginius odos dūrio mėginius su standartiniais namų dulkių erkių *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, 12 žolių žieddulkių mišinio, beržinių medžių žieddulkių mišinio, piktžolių mišinio, mikroskopinių grybų ir katės epitelio alergenais (Stallergen, Prancūzija) pagal Lietuvoje galiojančias rekomendacijas [206].

Visi pacientai iki tyrimo nevartojo vaistų, galinčių įtakoti mėginio rezultatus:

- I kartos antihistamininių vaistų- ne trumpiau nei 4 dienas;
- II kartos antihistamininių vaistų- ne trumpiau kaip 1 savaitę;
- Triciklinių antidepresantų- ne trumpiau nei 1 savaitę;
- Ketotifeno- 1 savaitę;
- Gliukokortikosteroidų tepalai- tiriamos odos paviršiuje netepti ne trumpiau nei 3 mėnesius.

Mėginys atliktas pacientui sėdint, tiriamieji alergenai lašinti ant vidinio dilbio odos, 3 cm atstumu. Mėginio teigiamai kontrolei naudotas 10mg/ml histamino tirpalas, neigiamai kontrolei- alergenų diagnostinio tirpalo skiediklis. Kiekvienam alergenui buvo naudojamos atskiros sterilios adatos, kuriomis, duriant stačiai per užlašintus lašus, buvo pažeidžiamas tik epidermis. Odos reakcija buvo vertinta po 15 minučių, liniuote išmatuotas didžiausias ir jam statmenas pūkšlės skersmuo bei paskaičiuotas aritmetinis jų vidurkis (mm). Mėginys vertintas kaip teigiamas, kai vidutinis pūkšlės dydis buvo didesnis nei 3mm. Jei histamino pūkšlė buvo mažesnė nei 3mm ir/arba kontrolinio tirpalo pūkšlė buvo lygi ar viršijo 3 mm- odos dūrio mėginiai nebuvo vertinti, o tokie tiriamieji nedalyvavo tolimesniame tyrime.

5.2.2 Plaučių funkcijos tyrimas

Plaučių funkcija tirta pneumotachometriniu spirometru CustoVitM (Custo Med; Munchen, Vokietija). Tiriamieji nevartojo trumpo poveikio bronchus plečiančių vaistų ne mažiau nei 8 valandas iki tyrimo.

Kiekvienas tiriamasis atliko ne mažiau kaip 3 kokybiškus forsuito iškvėpimo veiksmus, nustatant didžiausią FEV₁ ir FVC. Skirtumas tarp dviejų didžiausių FEV₁ ir FVC buvo ne didesnis nei 150ml [207].

Plaučių funkciją atspindintys FVC ir FEV₁ rodikliai buvo išreikšti absoliučiais dydžiais (l) bei būtino dydžio procentais. Būtinai dydžiai buvo nustatyti pagal Quanjer su bendraautoriais pasiūlytą metodą [208]. Taip pat nustatytas FEV₁/FVC santykio absoliutus dydis ir būtino dydžio procentai. Plaučių funkcija vertinta kaip normali, jei FEV₁ buvo ≥ 80 proc. b.d, FEV₁/FVC ≥ 88 proc. būtino dydžio vyrams ir 89 proc. būtino dydžio moterims.

5.2.3 Bronchų reaktyvumo tyrimas inhaliaciniu provokaciniu mėginu naudojant metacholiną

Bronchų reaktyvumas tirtas rezervuariniu metodu (Provocations Test I, Pari, Vokietija), pradedant nuo 15 μ g metacholino ir kas penkias minutes šia dozę didinant du kartus iki suminės į plaučius patenkančios 1929 μ g dozės [209]. Po kiekvienos įkvėptos metacholino dozės, praėjus 30

ir 90 sekundžių, tiriamiesiems buvo atliekama spirograma ir vertinamas FEV₁ pokytis. Tyrimas buvo nutraukiamas sumažėjus FEV₁, ar atsiradus subjektyviai netoleruojamam dusuliui. Padidėjęs bronchų reaktyvumas vertintas apskaičiavus provokacinę metacholino dozę (PD₂₀), sumažinančią FEV₁ 20 proc. palyginus su pradiniu dydžiu bei nustatčius dozės-atsako kreivės nuolydį. PD₂₀ apskaičiuota linijinės interpoliacijos tarp dviejų taškų metodu, o PD₂₀ <150 µg laikyta ribine, padidėjusiam bronchų reaktyvumui nustatyti.

5.2.4 Skreplių indukcija ir citologinis tyrimas

5.2.4.1 Skreplių indukcija

Skreplių atkosėjimui paskatinti buvo naudojamas skirtingų koncentracijų (3proc., 4proc., 5proc.) sterilus, hipertoniškas natrio chlorido tirpalas, skiriamas tiriamiesiems inhaliuoti ultragarsinio purkštuvu (DeVilbiss Ultraneb, DeVilbiss Health Care, Somerset, JAV, 5 pav.) pagal Chanez ir bendraautorių aprašytą metodą [210].



5 pav. DeVilbiss Ultraneb ultragarsinis purkštuvas.

Žinodami tai, kad hipertoniškas NaCl tirpalas gali sukelti bronchų lygiųjų raumenų susitraukimą, visiems tiriamiesiems prieš skreplių indukciją skyrėme 400 µg salbutamolio (Ventolin®, Glaxo Wellcome). Po 15 min. nustatytas podilatacinis FEV₁, kuris buvo naudojamas kaip bazinis dydis, stebint FEV₁ kitimus kas 5 minutės viso tyrimo metu. Skreplių indukcija atlikta pacientams, kurių podilatacinis FEV₁ buvo didesnis nei 60 proc. b.d. ar daugiau nei 1l. Skreplių atkosėjimui paskatinti ultragarsinio purkštuvu talpa buvo užpildoma 7ml 3 proc. NaCl tirpalu, ir duodama tiriamajam inhaliuoti 7 minutes. Nustatyta purkštuvu galia- 3ml/min. Po kiekvieno inhaliacijos etapo pacientas buvo prašomas atkosėti skreplių į sterilų indelį. Nepavykus atkosėti skreplių, sekančias 7 minutes buvo skirtas 4 proc. NaCl tirpalas, vėliau- 5 proc. Tyrimas buvo nutraukiamas, sumažėjus FEV₁ daugiau kaip 20 proc. lyginant su pradiniu rezultatu. Atkosėti

skrepliai laikyti sterilioje Petri lėkštelėje, padėtoje ant sauso ledo plokštelių, o citologinis tyrimas pradėtas ne vėliau nei 2 valandos nuo skreplių indukcijos pabaigos.

5.2.4.2 Indukuotų skreplių mėginių paruošimas ir citologinis ištyrimas

Atkosėti skrepliai buvo atskirti nuo seilių priemaišos. Žinodami tai, kad ditiotreitolis (DTT) gali pakeisti citokinų bei chemokinų koncentracijas tiriant imunofermeniniu metodu [211], atkosėtus skreplių mėginius padalinome į dvi dalis ir tyrėme pagal parengtus skirtingus protokolus. Viena skreplių dalis buvo pasverta ir sumaišyta su 0,1 proc. DTT (DTT; Sigma-Aldrich, Vokietija) bei fosfatinio buferio druskos tirpalu (PBS; Sigma-Aldrich, Vokietija). Gautas mišinys 15 min. maišytas kambario temperatūroje, vėliau dar kartą praskiestas tokiu pat kiekiu PBS tirpalo. Suspensija nufiltruota per 52µm nailoninį filtrą (Milipore, North Ryde, NSW, Australija). Gautame tirpale naudojant Neubauerio hemocitometrą ir tripano mėlynojo dažus (0,4 proc., Sigma Aldrich, JAV) mikroskopu (B5 Professional, Motic, Kinija) įvertintas ląstelių gyvybingumas, epitelio ląstelių skaičius, absoliutus ląstelių skaičius bei ląstelių kiekis 1 grame skreplių. Šie parametrai paskaičiuoti pagal formules:

Epitelio ląstelės x 100

$$A. \text{ Epitelio ląstelės (proc.)} = (\text{Epitelio ląstelės} + \text{gyvybingi leukocitai} + \text{žuvę leukocitai})$$

Gyvybingi leukocitai x 100

$$B. \text{ Gyvybingi leukocitai (proc.)} = (\text{gyvybingi leukocitai} + \text{žuvę leukocitai})$$

[(Gyvybingi + žuvę leukocitai) x 2 x ląstelių suspensija (ml)] / 100

$$C. \text{ Absoliutus ląstelių skaičius (x } 10^6/\text{ml.)} = \quad 5$$

5- Hemocitometro laukai, kuriuose skaičiuotos ląstelės; 2- Tripano mėlynojo skiedimas.

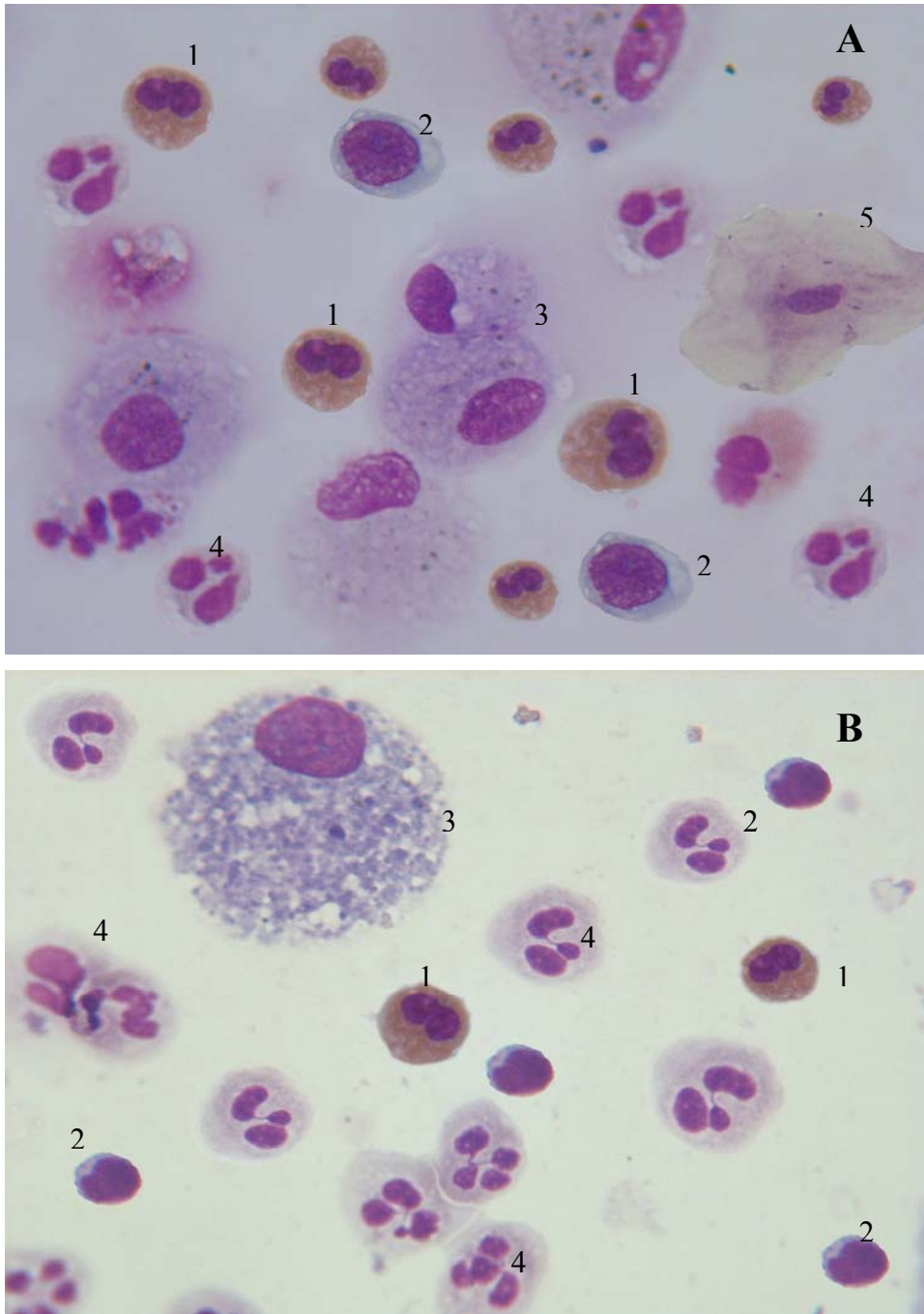
Absoliutus ląstelių skaičius (x 10⁶/ml)

$$D. \text{ Bendras ląstelių skaičius (x } 10^6/\text{ 1 g skreplių)} = \quad \text{Skreplių svoris (g)}$$

Kokybiškais laikyti tie mėginiai, kuriuose gyvų ląstelių buvo ne mažiau kaip 50 proc., o epitelio ląstelių - ne daugiau kaip 20 proc. visų ląstelių.

Tolimesniam tyrimui tinkantys mėginiai 10 minučių centrifuguoti 4°C temperatūroje 2100 apsisukimų/min. greičiu. Supernatantas buvo atskirtas nuo ląstelių ir užšaldytas – 70°C temperatūroje. Likusias ląsteles praskiedėme PBS iki galutinės koncentracijos 0,5-1x10⁶ ląstelių/ml tirpalo, iš kurio paruošėme ląstelių preparatus naudojant citocentrifugą (Shandon Southern Instruments, JAV). Dalis ląstelių preparatų, fiksavus juos paraformaldehide, buvo užšaldyti – 70°C temperatūroje ir naudoti imunocitocheminiam tyrimui. Citologinis kitų preparatų tyrimas atliktas

šviesiniu mikroskopu atsitiktinai pasirinktame lauke skaičiuojant ląsteles, dažytas standartizuotu *May-Grünwald-Giemza* metodu (skaičiuota iki 400 ląstelių regėjimo lauke, išskyrus epitelio ląsteles) (6pav.). Ląstelės buvo atskiriamos pagal joms būdingus morfologinius kriterijus (branduolį, citoplazmos granules), o jų kiekis išreikštas absoliučiais ($\times 10^6/\text{ml}$) bei santykiniais (bendro ląstelių kiekio proc.) dydžiais.



6 pav. Sergančių alergine (A) ir nealergine (B) astma pacientų indukuotų skreplių mėginiai, dažyti *May-Grünwald-Giemsa* metodu (padidinimas-1000 kartų). 1-eozinofilai, 2-limfocitai, 3-makrofagai, 4-neutrofilai, 5- epitelio ląstelė.

Kita skreplių dalis tirta pagal Di Stefano su bendraautoriais aprašytą metodą, DTT pakeičiant PBS [212], o gautas šių mėginių supernatantas naudotas citokinų bei chemokininų koncentracijos tyrimams ELISA metodu.

5.2.5 Fibrobronchoskopija ir bronchoalveolinio lavažo skysčio tyrimas

Fibrobronchoskopija (FBS) atlikta astma sergantiems pacientams, kurie sutiko su šio tyrimo atlikimu, neturėjo kontraindikacijų tyrimui, o podilatacinis FEV₁ buvo ne mažesnis nei 40 proc. būtinojo dydžio. Taip pat FBS atlikta kontrolinės grupės asmenims, sutikusiems su šiuo tyrimu ir neturintiems kontraindikacijų tyrimo atlikimui.

Prieš FBS visiems tiriamiesiems atlikti tyrimai:

1. Bendras kraujo tyrimas, vertinant trombocitų kiekį.
2. Kraujo krešumo rodikliai:
 - a. Protrombino indeksas (PI) su SPA reagentu.
 - b. Dalinai aktyvuoto tromboplastino laikas.
 - c. Tarptautinis normalizuotas santykis (TNS).
2. Krūtinės ląstos organų rentgenograma.
3. Plaučių funkcija vertinta spirometrijos būdu.
4. Pulsoksimetru matuotas SaO₂.
5. EKG.

Kontraindikacijos atlikti FBS:

1. Pneumotoraksas ar pneumotoraksą galinčios sąlygoti būklės (plaučių cistos, bulos, emfizema).
2. PI su SPA reagentu < 60 proc., TNS > 1,5, trombocitų skaičius < 60 x 10⁹/l.
3. SaO₂ < 90 proc., parcialinis deguonies slėgis arteriniame kraujyje < 50 mmHg.
4. FEV₁ < 1,0 l.
5. Gyvybei pavojingi širdies ritmo ir laidumo sutrikimai.
6. Mažiau nei prieš 6 savaites įvykęs miokardo infarktas .
7. Mažiau nei prieš 6 savaites nustatyti smegenų kraujotakos sutrikimai.
8. Pacientas nuolat vartoja antikoaguliantus.
9. *Vena cava superior* sindromas.
10. Plaučių arterijos tromboembolija.

11. Ligos ir būklės, didinančios kraujavimo tikimybę: uremija (kreatininas > 270 μmol/l), nekontroliuojamas cukrinis diabetas, hemoblastozės, lėtinės kepenų ligos.

12. Ligonis atsisako tyrimo.

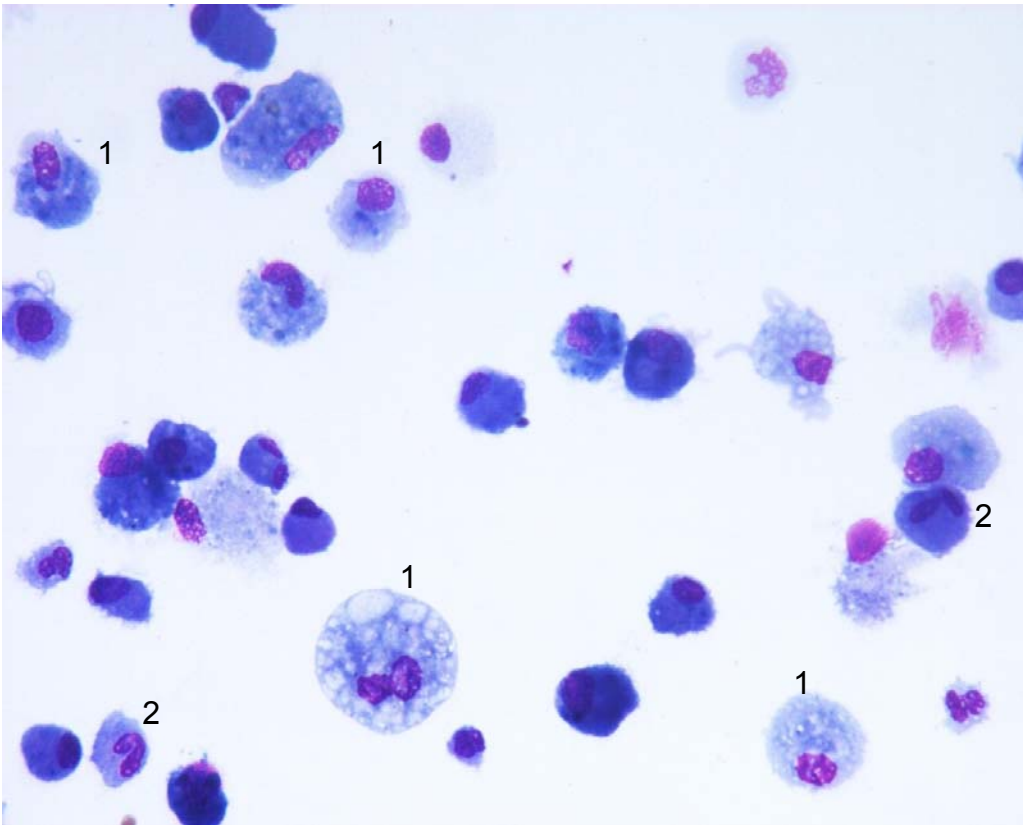
5.2.5.1 Tiriamųjų paruošimas FBS

Tiriamiesiems bronchoskopija atlikta praėjus vienai savaitei po skreplių indukcijos. Tyrimo dieną pacientai nerūkė ne mažiau nei 10 valandų ir nevalgė 6 val. iki FBS. 30 min. iki tyrimo tiriamieji įkvėpė 400 μg salbutamolio.

Tiriamiesiems prieš tyrimą skirta premedikacija atropino sulfatu (Sanitas, Lietuva) 0,5 - 1,0 mg i/v, midazolamu (Dormicum®, Roche) 2,5 - 7,5 mg i/v. Fibrobronchoskopija atlikta vietinėje 2proc. lidokaino tirpalo (Grindex, Latvija) neįtaroje, pacientui pusiau sėdint. Tyrimo metu pacientams pulsoksimetru stebėtas širdies susitraukimų dažnis ir SaO₂. Sumažėjus SaO₂ < 90 proc., buvo skiriamas deguonis per nosinį kateterį, siekiant padidinti SaO₂ > 90 proc. Nepavykus padidinti SaO₂ > 90 proc., tyrimas buvo nutraukiamas. Fibrobronchoskopas (BF-1T200 Olympus; Tokyo, Japonija) per nosį arba burną buvo įvedamas į dešinio ar kairio plaučio S4 arba S5 segmentus. Septynios porcijos po 20ml sterilaus 0,9proc.NaCl tirpalo buvo sulašintos per bronchoskopo kanalą į segmentinius bronchus ir nedelsiant buvo išsiurbiamos atgal į švirkštą.

5.2.5.2 BAL skysčio paruošimas ir citologinis tyrimas

Atsiurbtas BAL skystis buvo filtruotas per 48 μm nailono filtrą (Millipore; North Ryde, NSW, Australija) ir 10 min. centrifuguotas 4°C temperatūroje 2100 apsisukimų/min. greičiu. Supernatantas buvo atskirtas nuo ląstelių ir užšaldytas – 70°C temperatūroje tolimesniam tyrimui. Likusias ląsteles praskiedėme PBS iki galutinės koncentracijos 1x10⁶ ląstelių/ml tirpalo, iš kurio paruošėme ląstelių preparatus naudojant citocentrifugą (Shandon Southern Instruments, JAV). Citologinis gautų preparatų tyrimas atliktas šviesiniu mikroskopu (B5 Professional, Motic, Kinija) atsitiktinai pasirinktame lauke skaičiuojant ląsteles, dažytas standartizuotu *May-Grünvald-Giemza* metodu (skaičiuota iki 400 ląstelių regėjimo lauke, išskyrus epitelio ląsteles) (7 pav.). Ląstelės buvo atskiriamos pagal joms būdingus morfologinius kriterijus (branduolį, citoplazmos granules), o jų kiekis išreikštas absoliučiais (x10⁶/ml) bei santykiniais (bendro ląstelių kiekio proc.) dydžiais.



7 pav. Bronchoalveolinio lavažo skysčio ląstelių mėginys, dažytas *May-Grünwald-Giemsa* metodu (padidinimas-500 kartų). 1-makrofagai, 2-neutrofilai.

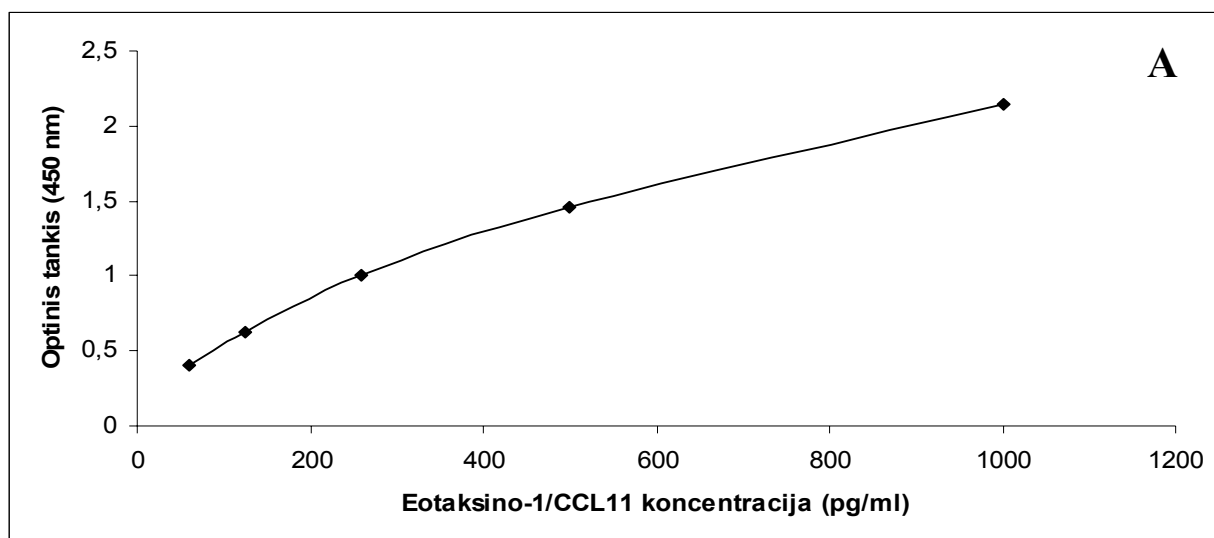
5.2.6 Citokinų ir chemokinų tyrimai

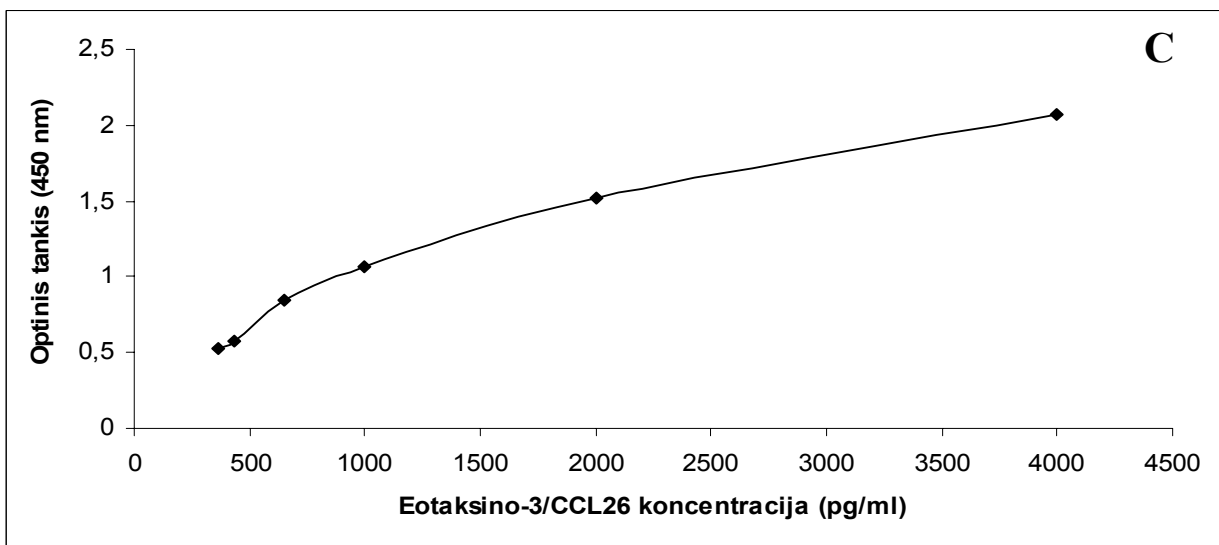
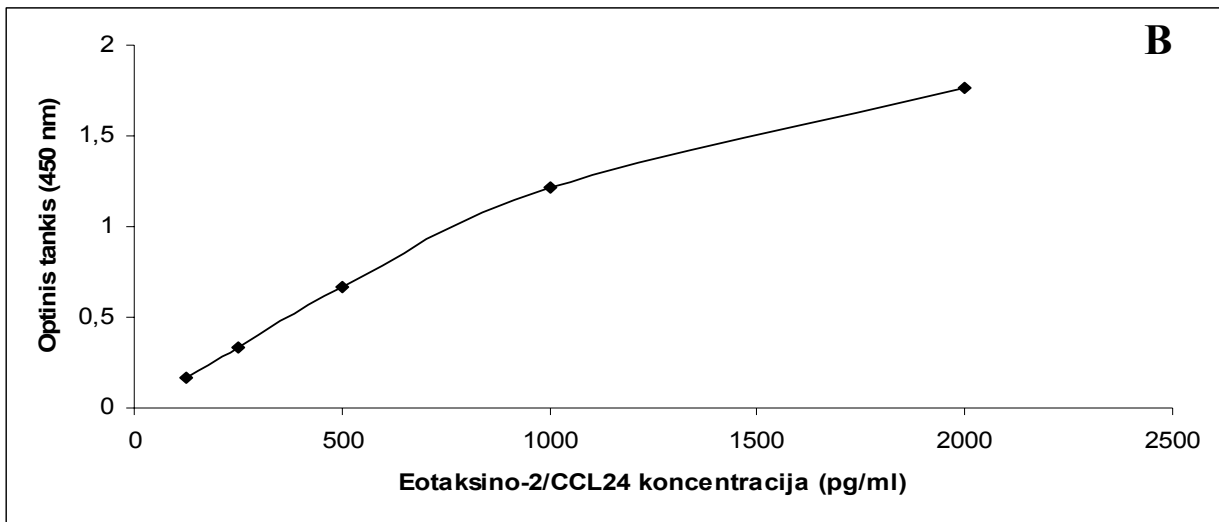
5.2.6.1 Chemokinų koncentracijos tyrimas

Eotaksino-1/CCL11, eotaksino-2/CCL24 ir eotaksino-3/CCL26 koncentracija nustatyta imunofermentiniu ELISA (angl. *enzyme linked immunosorbent assay*) metodu, naudojant R&D Systems reagentus (JAV). Tyrimai atlikti kambario temperatūroje. Sterilias 96 šulinėlių ELISA plokšteles padengėme dengiamuoju pelės monokloniniu antikūnu prieš žmogaus eotaksiną-1/CCL11, eotaksiną-2/CCL24 ar eotaksiną-3/CCL26. Sandariai uždengtas plokšteles inkubavome 12 val. kambario temperatūroje. 3 kartus praplovus 400 µl plaunančiojo buferio (0,05 proc. Tween-20®, pH 7,2-7,4, JAV), nespecifinės reakcijos 1 valandą blokuotos 300 µl analiziniu skiedikliu (10 proc. BSA, pH 7,2-7,4). 3 kartus praplovus plokšteles, šulinėliai buvo padengti 100 µl kartotinių skiedimų rekombinantinio eotaksino-1/CCL11 (0; 15,6; 31,2; 62,5; 125; 250; 500; 1000 pg/ml) eotaksino-2/CCL24 (0; 237; 348; 504; 752; 1276; 1796; 2275 pg/ml) ar eotaksino-3/CCL26 (0; 360; 430; 650; 1000; 2000; 4000 pg/ml) tirpalu, tiriamuoju mėginiu (kraujo serumo, skreplių

supernatanto ar BAL skysčio) ir neigiama kontrole (analiziniu skiedikliu). Po 2 val. inkubacijos, šulinėliai 5 kartus praplauti plaunančiuoju buferiu, užpildyti 100 µl atpažįstančio antikūno (ožkos antikūnas prieš žmogaus eotaksiną-1/CCL11, eotaksiną-2/CCL24 ar eotaksiną-3/CCL26) ir inkubuoti 2 valandas kambario temperatūroje. 5 kartus praplovus plokšteles plaunančiuoju buferiu, šulinėliai buvo padengti 100 µl substratinio tirpalo ir 20 minučių inkubuoti tamsoje. Po to imunofermentinė reakcija sustabdyta 50 µl sieros rūgšties tirpalu (2N H₂SO₄) (R&D, JAV).

Mėginių optinis tankis nustatytas mikroplokštelių skaitytuvu (Murex Diagnostics Ltd, England), naudojant 450 nm bangos ilgį. Eotaksino-1/CCL11, eotaksino-2/CCL24, eotaksino-3/CCL26 koncentracijos mėginiuose nustatytos pagal standartinę kreivę (8 pav.), gautą naudojant kartotinius rekombinantinio eotaksino-1/CCL11, eotaksino-2/CCL24, eotaksino-3/CCL26 skiedimus. Neigiamos kontrolės optinio tankio vertė buvo atimta iš tiriamųjų mėginių bei standartinių tirpalų optinių tankių vertės. Standartinės kreivės nubrėžtos naudojant programą Imunlab (Oksfordo universitetas, Jungtinė Karalystė). Pažymėjus kreivėje mėginio optinį tankį sužinota tiriamosios medžiagos koncentracija, o įvertinus skiedimo koeficientą, nustatyta tikroji eotaksino-1/CCL11, eotaksino-2/CCL24 ar eotaksino-3/CCL26 koncentracija tiriamojoje medžiagoje.





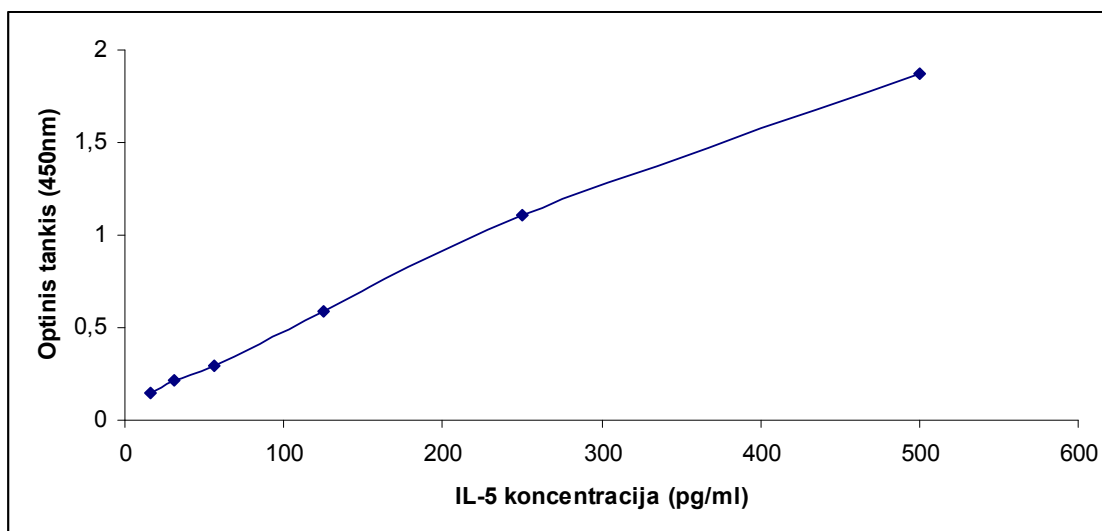
8pav. Standartinės eotaksino-1/CCL11 (A), eotaksino-2/CCL24 (B) ir eotaksino-3/CCL26 (C) kreivės.

5.2.6.2 Citokinų koncentracijos tyrimas

IL-5 koncentracijos tyrimas. IL-5 koncentracija serume, indukuotų skreplių supernatante bei BAL skystyje tirta taip pat imunofermentiniu ELISA metodu, naudojant R&D Systems (JAV) reagentų rinkinius. 96 šulinėlių ELISA plokštelės buvo padengtos dengiamuoju žiurkės monokloninio antikūno prieš žmogaus IL-5. Po 18 val. inkubacijos kambario temperatūroje, šulinėliai 3 kartus praplauti 400 μl plaunančiuoju buferiu, vėliau 1 valandą kambario temperatūroje blokuotos nespecifinės reakcijos rinkinyje esančiu reagentu. Vėliau šulinėliai buvo vėl tris kartus praplauti ir padengti kartotinių skiedimų (0; 7,8; 15,6; 31,3; 56; 125; 250; 500 pg/ml)

rekombinantinio IL-5 tirpalu, neigiama kontrole ir mėginiais (kartojant po du šulinėlius). Po 2 val. inkubacijos, šulinėliai 5 kartus praplauti plaunančiuoju buferiu, užpildyti 100 μ l atpažįstančiojo antikūno (žiurkės antikūnas prieš žmogaus IL-5) ir inkubuoti 2 valandas kambario temperatūroje. Vėliau 5 kartus praplovus plokšteles ir 20 minučių inkubavus mėginius su substratiniu tirpalu, imunofermentinė reakcija sustabdyta 50 μ l sieros rūgšties tirpalu (2N H₂SO₄) (R&D, JAV).

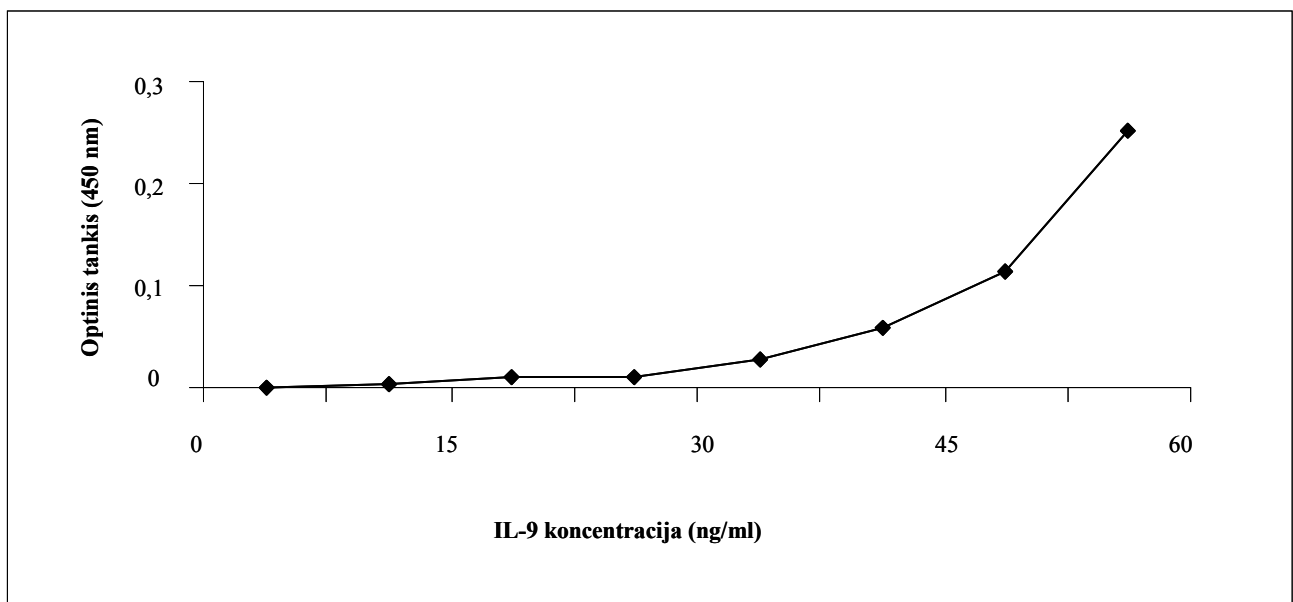
Mėginių optinis tankis nustatytas mikroplokštelių skaitytuvu (Murex Diagnostics Ltd, England), aukščiau aprašytu principu, naudojant 450 nm bangos ilgį. Tikroji IL-5 koncentracija mėginiuose nustatyta pagal standartinę kreivę (9 pav.), gautą naudojant kartotinius rekombinantinio IL-5 skiedimus. Standartinė kreivė nubrėžta naudojant programą Imunlab (Oksfordo universitetas, Jungtinė Karalystė). Pažymėjus kreivėje mėginio optinį tankį sužinota tiriamosios medžiagos koncentracija, o įvertinus skiedimo koeficientą, nustatėme tikrąją IL-5 koncentraciją tiriamojoje medžiagoje.



9pav. Standartinė IL-5 kreivė.

IL-9 koncentracijos tyrimas. ELISA metodu tyrėme IL-9 koncentraciją indukuotų skreplių supernatante, naudodami Pepro Tech (Jungtinė Karalystė) ELISA plėtojimo rinkinį (angl. Human IL-9 ELISA Development Kit 900-K20). Standartines 96 šulinėlių mikroplokšteles padengėme dengiamuoju triušio IL-9 antikūnu prieš žmogaus ląsteles, inkubavome 18 val. kambario temperatūroje. 4 kartus praplovus 300 μ l plaunančiojo buferio, nespecifinės reakcijos 1 valandą blokuotos rinkinyje esančiu reagentu kambario temperatūroje. Po blokavimo ir 4 plokštelių praplovimų, šulinėliai padengti 100 μ l indukuotų skreplių supernatanto (kartojant po tris šulinėlius). Standartinei kreivei gauti naudojome rekombinantinio žmogaus IL-9 antikūno skiedimus (0,125-2 ng/ml). Po 2 val. inkubacijos, šulinėliai 5 kartus praplauti plaunančiuoju buferiu, užpildyti 100 μ l atpažįstančiojo antikūno (žiurkės antikūnas prieš žmogaus IL-5) ir inkubuoti 2 valandas kambario

temperatūroje. Komplexo su antigenu formavimui naudojame 100 µl biotinu konjuguoto triušio antikūno prieš žmogaus IL-9. Substratiniu tirpalu naudojome tetrametilenzidiną. Mėginių optinį tankį matavome ties 450 nm bangos ilgiu mikroplokštelių skaitytuvu (Murex Diagnostics Ltd, England). Mažiausia detekcinė IL-9 koncentracija – 250 pg/ml. IL-9 koncentracija mėginiuose nustatyta pagal standartinę kreivę (10 pav.), gautą naudojant kartotinius rekombinantinio žmogaus IL-9 antikūno skiedimus. Neigiamos kontrolės optinio tankio vertė buvo atimta iš tiriamųjų mėginių bei standartinių tirpalų optinių tankių vertės. Tikroji IL-9 koncentracija indukuotuose skrepliuose nustatyta įvertinus mėginio optinį tankį ir skiedimo koeficientą.



10 pav. Standartinė IL-9 kreivė.

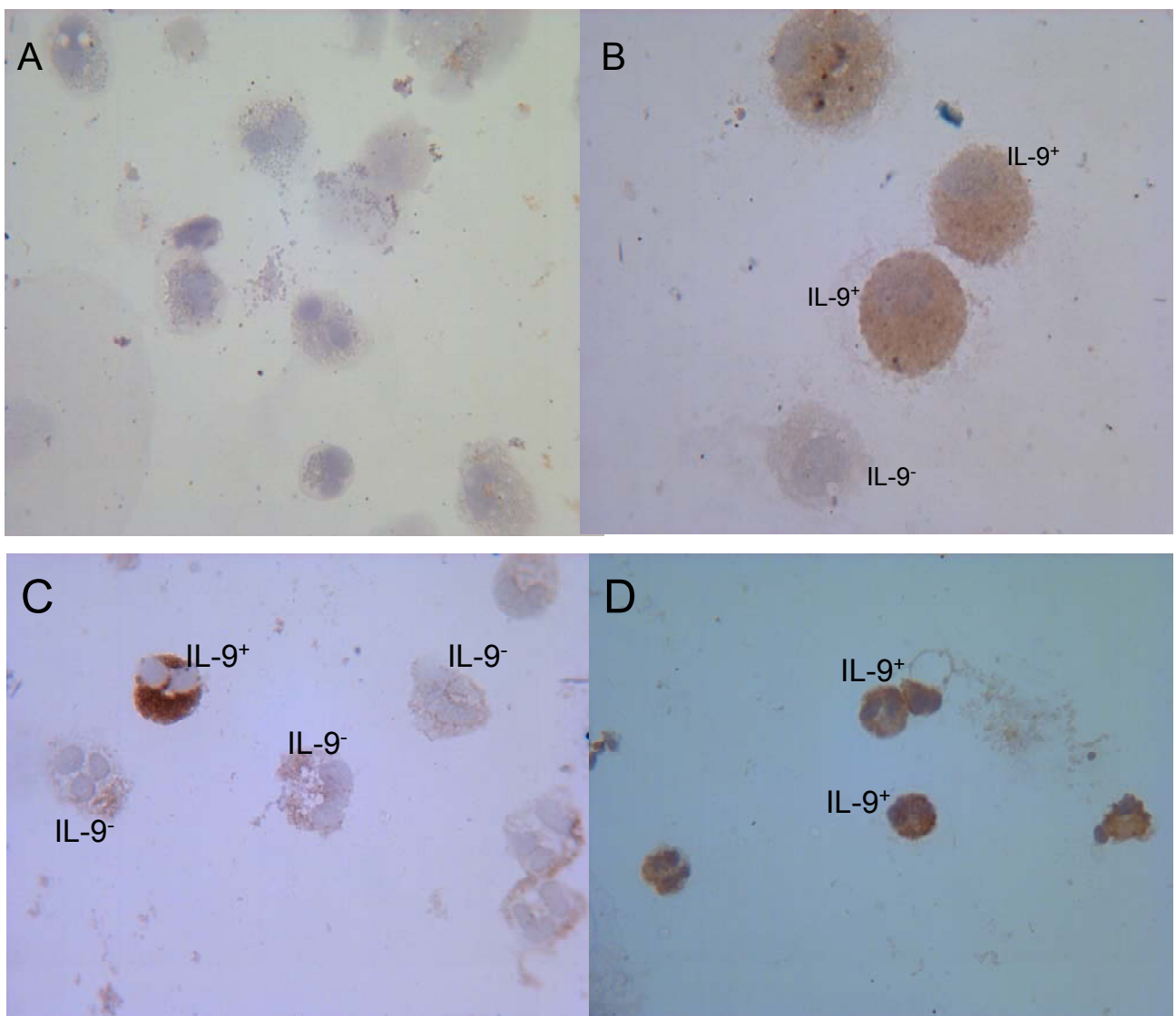
5.2.6.3 IL-9 raiškos tyrimas imunocitochemijos metodu

IL-9 sekretuojančių ląstelių kiekis indukuotų skreplių citospinuose vertintas imunocitochemijos metodu. Triušio IL-9 antikūną naudojome antikūno-antigeno kompleksu formavimui mėginių ląstelėse. Šiai sąveikai įvertinti naudojome biotinu konjuguotą antrinį antikūną. Spalvinę antigeno substrato precipitaciją sąlygojome DAB chromogenu.

Tyrimui naudoti užšaldyti indukuotų skreplių ląstelių mėginiai. Atšildžius citospinus kambario temperatūroje, jie 20 min. fiksuoti 4 proc. paraformaldehido ištirpinto PBS tirpale (Merck, JAV). Po to mėginiai tris kartus po 5 min. praplauti fosfatinio buferio tirpale (PBS; Sigma-Aldrich, JAV). Blokavus nespecifines reakcijas, citospinai dar du kartus po 5 min. plauti PBS. Vėliau mėginiai 1 valandą inkubuoti 1,5 proc. blokuojančio serumo tirpalo (blokuojantis serumas skiestas PBS) (Goat ABC staining system, Santa Cruz, JAV). Po to 1 valandą kambario temperatūroje citospinai inkubuoti su pirminiais ožio antikūnais prieš žmogaus IL-9 (skiedimas

1:200) (Santa Cruz, JAV) ir neigiama kontrolė. Tris kartus po 5 min. praplovus PBS, mėginiai 45 min. inkubuoti su antriniais biotinu konjuguotais antikūnais (skiedimas 1:200) kambario temperatūroje. Dar tris kartus po 5 min. praplovus PBS, 45 min. citospinai inkubuoti su avidinu-biotinu konjuguotu peroksidazės kompleksu. Po trijų praplovimų PBS, ant mėginių paviršiaus užlašinta po tris lašus chromogeninio 3'3' DAB substrato ir inkubuota 20 min. Praplovus 5 min. destiliuotame vandenyje, 2 min. ląstelės dažytos hematoksilinu, vėliau dar kartą plautos 5 min. destiliuotame vandenyje. Ant citospinų paviršiaus užlašintas lašas Crystal Mounting Medium ir uždėtas dengiamasis stiklelis.

IL-9 raiška stebėta šviesiniu mikroskopu – ląsteles, kurių citoplazmos granulės nusidažė ruda spalva vertintos kaip IL-9 sekretuojančios ląstelės (IL-9⁺) (11 pav.).



11 pav. IL-9 raiška indukuotų skreplių ląstelėse sergant astma. A- neigiama kontrolė, B,C,D- skreplių mėginiai, kuriuose stebėta IL-9 raiška. IL-9⁺- ląstelė, ekspresuojanti interleukiną-9; IL-9⁻- ląstelė, kurioje interleukino-9 raiška nenustatyta.

5.2.7 Matematinė statistinė duomenų analizė

Statistinė duomenų analizė atlikta naudojant statistinės programos paketą „Statistical Package for the Social Sciences, version 15.0 for Windows“ (SPSS for Windows, 15.0 versija, Čikaga, JAV). Tirtos atsitiktinės lygiagrečiosios imtys. Imties dydis paskaičiuotas pagal formulę:

$$n = \frac{z^2 s^2}{\Delta^2}$$

n - imties tūris;

z - normaliojo skirsnio $N(0,1)$ $\frac{1+P}{2}$ eilės kvantilis, kai $P = 0,95$, $z = 1,96$;

Δ - generalinės aibės vidurkio įvertinimo tikslumas.

s^2 – imties dispersija

Matuojamų požymių reikšmių skirstiniui įvertinti naudotas Kolmogorovo-Smirnovo testas. Apskaičiuoti atskirų grupių duomenų vidurkiai ir standartinė vidurkio paklaida. Požymių, turinčių normalųjį skirstinį, skirtumui tarp daugiau nei dviejų imčių įvertinimui naudota ANOVA dispersinė analizė. Jei kiekybinių požymiai netenkino normaliojo skirstinio kriterijų, skirtumui tarp nepriklausomų grupių įvertinti naudotas neparametrinių duomenų Kruskal-Wallis H-testas. Ryšys tarp tirtųjų parametrų nustatytas regresinės analizės metodu pagal Spearmano (duomenims, netenkinantiems normaliojo skirstinio kriterijų) ar Pirsono (duomenims, turintiems normalųjį skirstinį) koreliacijos koeficientą. Koreliacija vertinta kaip silpna ($r < 0,3$), vidutinė ($0,3 \leq r \leq 0,7$), stipri ($r > 0,7$). Binarinės regresinės analizės metodu nustatyta nagrinėjamų žymenų ar jų derinių prognozė vertė prognozuojant padidėjusio bronchų reaktyvumo pasireiškimą. Tašką, skiriančią mažos ir didelės rizikos grupes nustatėme ROC (ang. *Receiver operating Characteristics*) kreivėmis. Apskaičiuotas plotas po ROC kreivėmis.

Statistinių hipotezių tikrinimui pasirinkome kriterijaus reikšmingumo lygmenį $\alpha = 0,05$. Klaidos tikimybė $p < 0,05$ laikyta ribine statistiniam patikimumui įvertinti (1 lentelė) [213].

5.2.7.1 lentelė. Klaidos tikimybės interpretacija bei ženklėjimas.

Klaidos tikimybė	Interpretacija	Ženklėjimas
$p > 0,05$	Nėra reikšmingų įrodymų ar jų mažai, norint atmesti H_0	NS
$p \leq 0,05$	Vidutiniškai reikšmingi įrodymai prieš H_0	*
$p \leq 0,01$	Aiškūs įrodymai prieš H_0	**
$p \leq 0,001$	Ypač reikšmingi įrodymai prieš H_0	***

6. REZULTATAI

6.1 Alerginė ir nealerginė astma sergančių pacientų indukuotų skreplių ląstelių sudėties bei IL-9 raiškos tyrimas

6.1.1 Tiriamųjų charakteristika

Pirmoje tyrimo dalyje dalyvavusių pacientų pagrindinės charakteristikos pateiktos 6.1.1.1 lentelėje. Alerginė bei nealerginė astma sirgę pacientai buvo panašaus amžiaus, nesiskyrė astmos simptomų trukme bei pagrindiniais plaučių funkcijos rodikliais. Abejose pacientų grupėse buvo panašus tirtų vyrų bei moterų santykis. Alerginė ir nealerginė astma sergančių pacientų bronchų reaktyvumas (išreikštas PD₂₀) reikšmingai nesiskyrė.

6.1.1.1 lentelė. Pagrindinės alerginė ir nealerginė astma sergančių pacientų charakteristikos.

Požymis	Alerginė astma sergantys pacientai	Nealerginė astma sergantys pacientai	p
Tiriamųjų skaičius	21	20	
Vyrai/moterys	9/12	10/10	
Amžius	51,8±1,5	51,3±1,5	NS
Astmos simptomų trukmė (metais)	3,5±0,9	4,1±1,2	NS
FEV ₁ (l)	3,53±0,1	3,77±0,5	NS
FEV ₁ (proc. b.d.)	98,0±4,5	90,0±3,1	NS
PD ₂₀ (mg metacholino)	0,13±0,02	0,11±0,04	NS

Duomenys pateikti vidurkis±SEM; FEV₁-forsuotas iškvėpimo tūris per pirmąją minutę; PD₂₀-metacholino dozė, sumažinanti FEV₁ 20 proc.; p-reikšmingumo lygmuo, NS- statistiškai nereikšminga.

6.1.2 Indukuotų skreplių ląstelių sudėties palyginimas sergant alergine ir nealergine astma

Visi tiriamieji skreplių indukciją toleravo gerai, jų atkosėti skrepliai atitiko kokybiškų mėginių kriterijus. Tyrimo eiga ir mėginių kokybė aprašyta 6.1.2.1 lentelėje.

6.1.2.1 lentelė. Skreplių indukcijos ir atkosėtų skreplių kokybės charakteristikos

Požymis	Alerginė astma sergantys pacientai n=21	Nealerginė astma sergantys pacientai n=20
Indukcijos trukmė min.	12,35±5,85	8,42±3,73
FEV ₁ pokytis tyrimo metu (proc.)	-9,59±4,32	-12,45±6,13
Ląstelių gyvybingumas indukuotuose skrepliuose (proc.)	62,72±2,07	62,82±1,91
Epitelio ląstelių kiekis indukuotuose skrepliuose (proc.)	12,45±5,75	15,32±3,75
Bendras ląstelių skaičius (x10 ⁶ /1g skreplių)	4,19± 0,32	10,35±2,45***

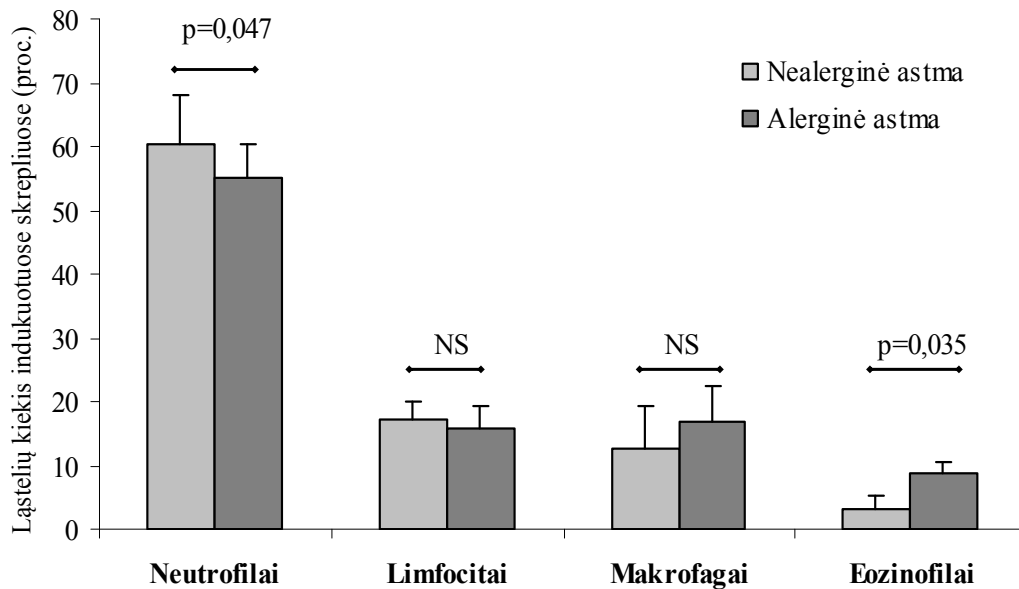
Duomenys pateikti vidurkis±SEM; FEV₁-forsuotas iškvėpimo tūris per pirmąją minutę.

***p=0,001 palyginus su alergine astma sergančiais pacientais

Skreplių indukcija ilgiau truko pacientams, sergantiems alergine astma, tačiau reikšmingo skirtumo palyginus su nealergine astma sergančiais nenustatėme (p=0,13). Tyrimo metu FEV₁ sumažėjimo daugiau nei 20 proc. palyginus su pradiniu FEV₁ nebuvo nė vienam pacientui. Sergantiems nealergine astma pacientams indukcija hipertoniiniu druskos tirpalu sukėlė ryškesnį FEV₁ sumažėjimą nei sergantiems nealergine astma, tačiau skirtumas nebuvo reikšmingas (p=0,57). Nealergine astma sergančių pacientų skrepliuose buvo didesnis bendras ląstelių skaičius 1 grame skreplių nei sergančiųjų alergine astma (p=0,001).

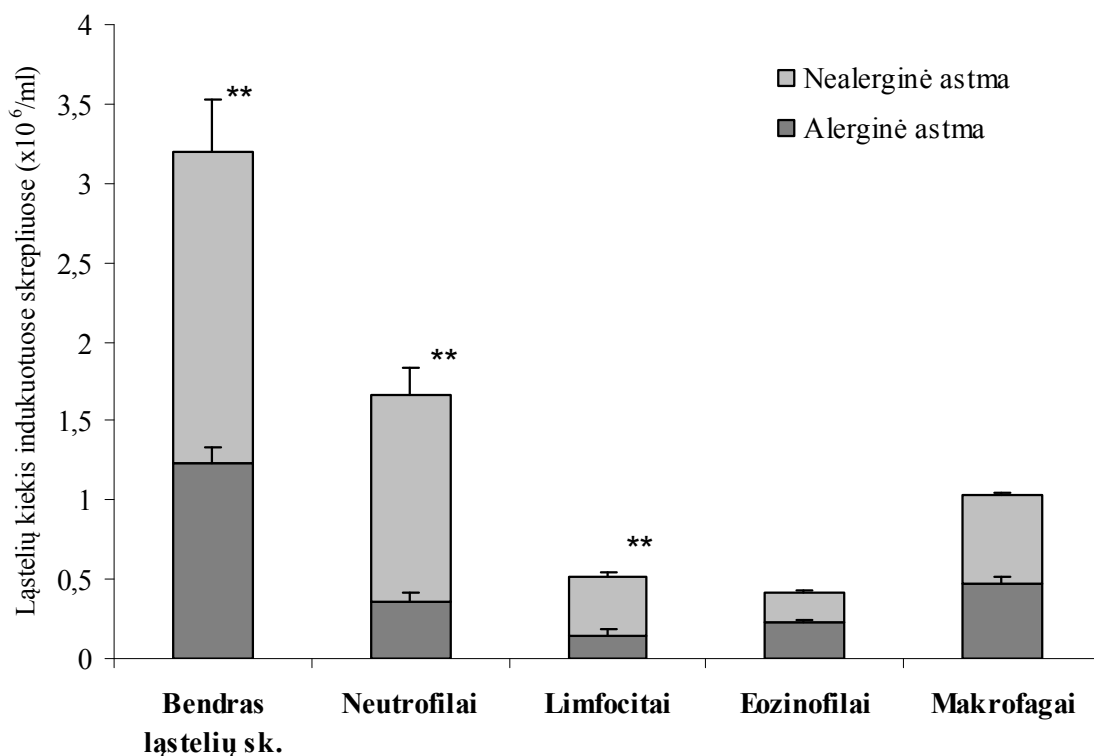
Indukuotų skreplių ląstelių sudėtis vertinta apskaičiavus jų kiekį absoliučiais (x 10⁶/ml) bei santykiniais (visų mėginyje suskaičiuotų ląstelių dalis procentais) dydžiais.

Įvertinus abiejų pacientų grupių indukuotų skreplių ląstelių sudėtį procentais nustatėme, kad nealergine astma sergančių pacientų skrepliuose buvo reikšmingai didesnis neutrofilų kiekis palyginus su sergančiais alergine astma (60,48±7,07 vs 55,14±5,25 proc. atitinkamai, p=0,047). Alerginė astma sergančiųjų skrepliuose buvo reikšmingai didesnis eozinofilų kiekis palyginus su nealergine astma sergančių pacientų grupe (8,94±1,67 vs 3,3±2,0 proc. atitinkamai, p=0,035). Santykinis limfocitų ir makrofagų kiekis abejose tiriamųjų grupėse reikšmingai nesiskyrė (12 pav.).



12 pav. Indukuotų skreplių ląstelių sudėtis (proc.) sergant alergine ir nealergine astma.

Įvertinus sergančiųjų nealergine astma indukuotų skreplių ląstelių sudėtį absoliučiais skaičiais, nustatėme reikšmingai didesnę bendrą ląstelių kiekį palyginus su alergine astma sergančiais pacientais ($1,97 \pm 0,33$ vs $1,23 \pm 0,11 \times 10^6/\text{ml}$ atitinkamai, $p=0,007$). Nealergine astma sergančių pacientų skrepliuose buvo reikšmingai daugiau neutrofilų ($1,34 \pm 0,18$ vs $0,41 \pm 0,06 \times 10^6/\text{ml}$ atitinkamai, $p=0,003$) ir limfocitų ($0,36 \pm 0,04$ vs $0,15 \pm 0,03 \times 10^6/\text{ml}$ atitinkamai, $p=0,005$) nei sergančiųjų alergine astma. Nealergine ir alergine astma sergančių tiriamųjų skrepliuose eozinofilų ($0,21 \pm 0,01$ vs $0,25 \pm 0,01 \times 10^6/\text{ml}$ atitinkamai, $p=0,79$) bei makrofagų ($0,62 \pm 0,03$ vs $0,55 \pm 0,02 \times 10^6/\text{ml}$ atitinkamai, $p=0,42$) absoliutus kiekis reikšmingai nesiskyrė (13pav.).



13 pav. Indukuotų skreplių ląstelių sudėtis absoliučiais skaičiais sergant alergine ir nealergine astma. **p<0,01 palyginus su alergine astma.

6.1.3 Bronchų reaktyvumo sąsajos su indukuotų skreplių ląstelėmis

Tyrimo metu atlikome koreliacinę analizę, norėdami įvertinti galimas PD₂₀ ir indukuotų skreplių ląstelių sąsajas sergant alergine ir nealergine astma (6.1.3.1 lentelė).

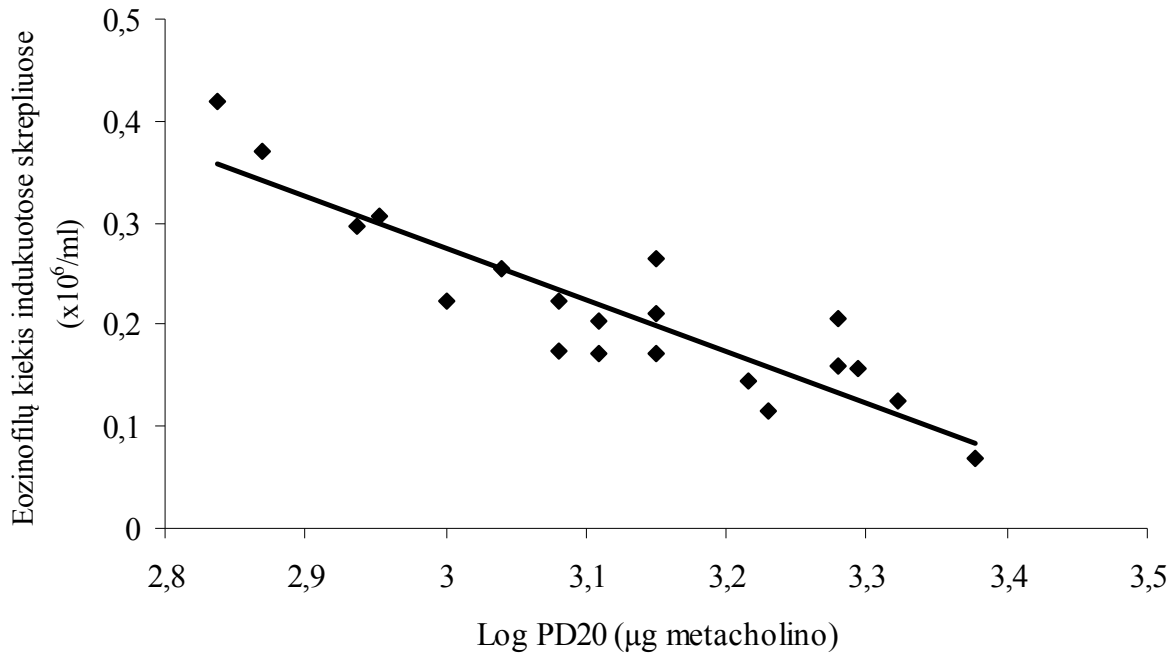
6.1.3.1 lentelė. PD₂₀ sąsajos su indukuotų skreplių ląstelėmis sergant alergine ir nealergine astma.

Tiriamųjų grupė	Eozinofilai x10 ⁶ /ml (proc.)	Limfocitai x10 ⁶ /ml (proc.)	Makrofagai x10 ⁶ /ml (proc.)	Neutrofilai x10 ⁶ /ml (proc.)
Alerginė astma sergantys pacientai				
PD ₂₀	r=-0,71; p=0,001 (r=-0,65, p=0,03)	r=-0,28; p=0,69 (r=-0,33, p=0,57)	r=0,11; p=0,87 (r=0,18, p=0,12)	r=-0,24; p=0,54 (r=-0,3, p=1,2)
Nealerginė astma sergantys pacientai				
PD ₂₀	r=-0,31; p=0,08 (r=-0,28, p=0,10)	r=-0,41; p=0,04 (r=-0,47, p=0,04)	r=0,25; p=0,74 (r=0,15, p=0,9)	r=-0,28; p=0,69 (r=-0,37, p=0,78)

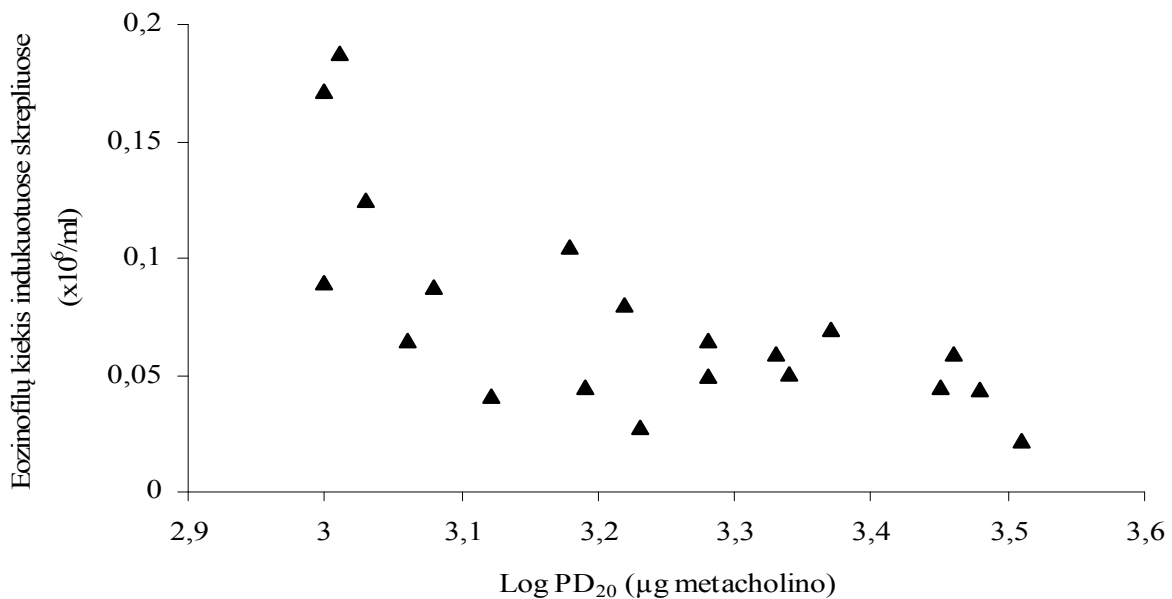
PD₂₀- metacholino dozė, sumažinanti forsuito iškvėpimo tūrį per pirmąją sekundę (FEV₁) 20 proc.
r- Spearmano koreliacijos koeficientas; p- reikšmingumo lygmuo.

Sergančiųjų alergine astma grupėje nustatėme reikšmingą neigiamą PD₂₀ sąsają su eozinofilų kiekiu indukuotuose skrepliuose, tačiau sergant nealergine astma tokia sąsaja buvo statistiškai nepatikima (14 pav.).

A



B

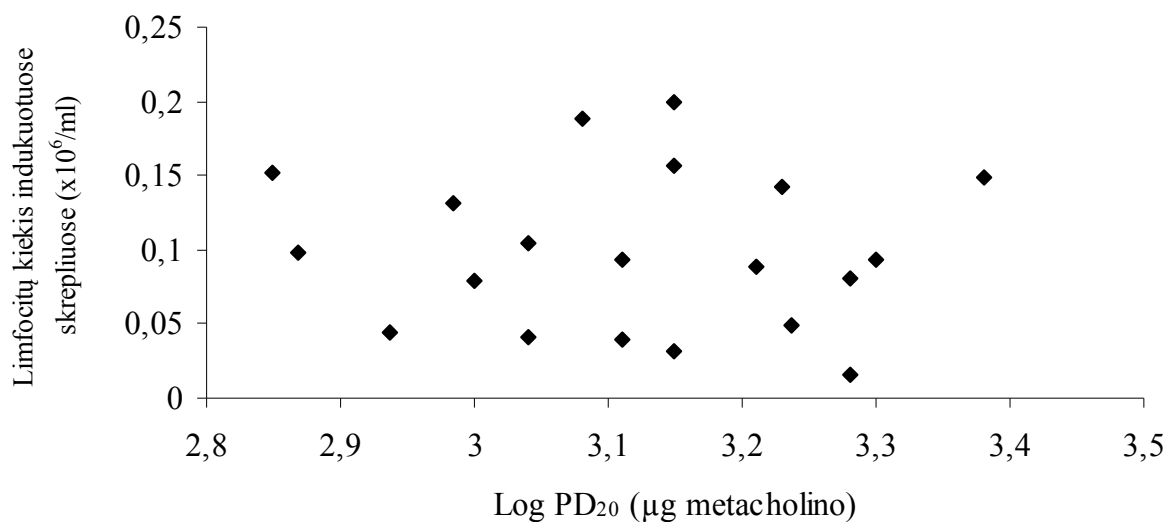


14 pav. Sąsaja tarp eozinofilų kiekio indukuotuose skrepliuose ir PD₂₀ sergant [A] alergine (r=-0,71, p=0,001) ir nealergine [B] astma (r=-0,31, p=0,08).

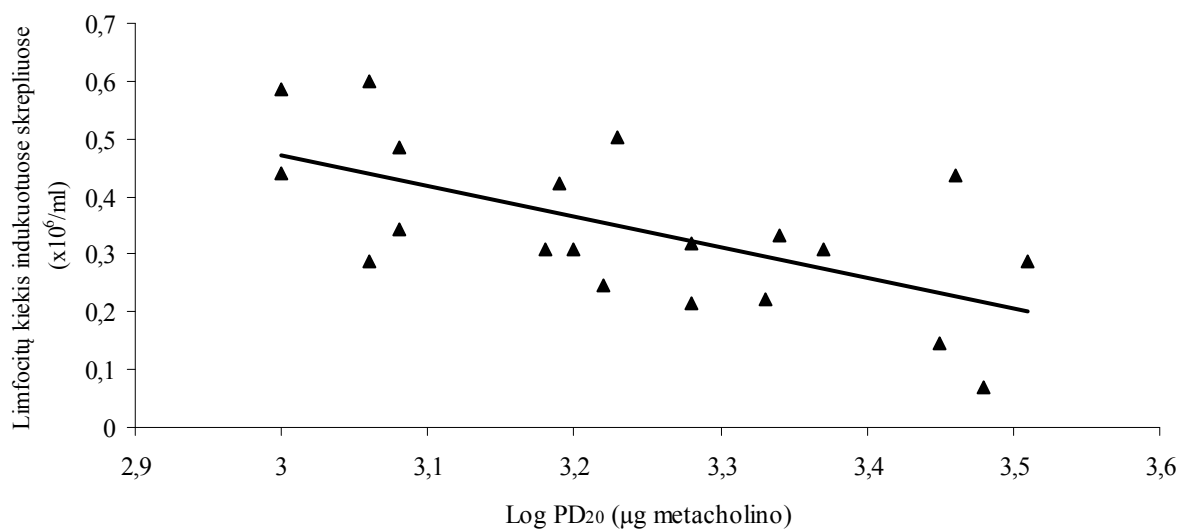
r- Spearmano koreliacijos koeficientas; p- reikšmingumo lygmuo.

Nealergine astma sergančių pacientų bronchų reaktyvumas, išreikštas PD₂₀ patikimai siejosi su limfocitų kiekiu indukuotuose skrepliuose, tačiau sergant alergine astma ryšio tarp PD₂₀ ir limfocitų kiekio nenustatėme (15 pav.).

A



B



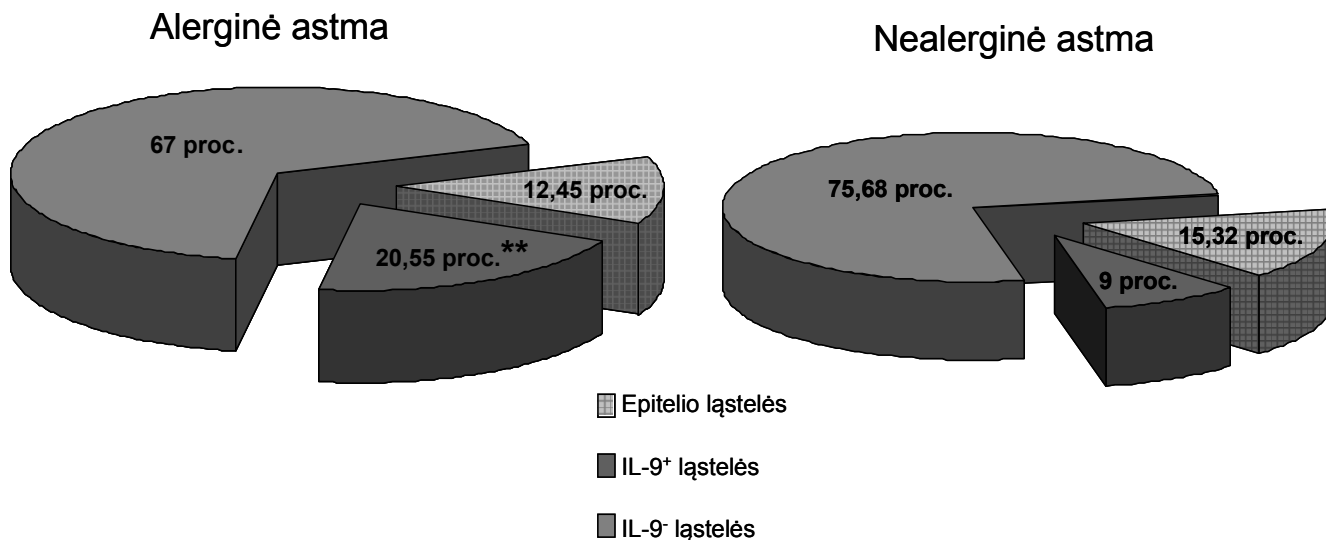
15 pav. Indukuotų skreplių limfocitų sąsaja su PD₂₀ sergant alergine [A] ($r=-0,28$, $p=0,69$) ir nealergine [B] astma ($r=-0,41$, $p=0,04$).

r- Spearmano koreliacijos koeficientas; p- reikšmingumo lygmuo.

Indukuotų skreplių neutrofilai bei makrofagai neturėjo ryšio su bronchų reaktyvumu nei sergant alergine, nei sergant nealergine astma.

6.1.4 IL-9 raiška ir koncentracija indukuotuose skrepliuose, sąsajos su bronchų reaktyvumu

IL-9 raiška indukuotų skreplių ląstelių mėginiuose vertinta imunocitochemijos metodu, o šį citokiną gaminančių ląstelių proporcija išreikšta procentais (16 pav.).

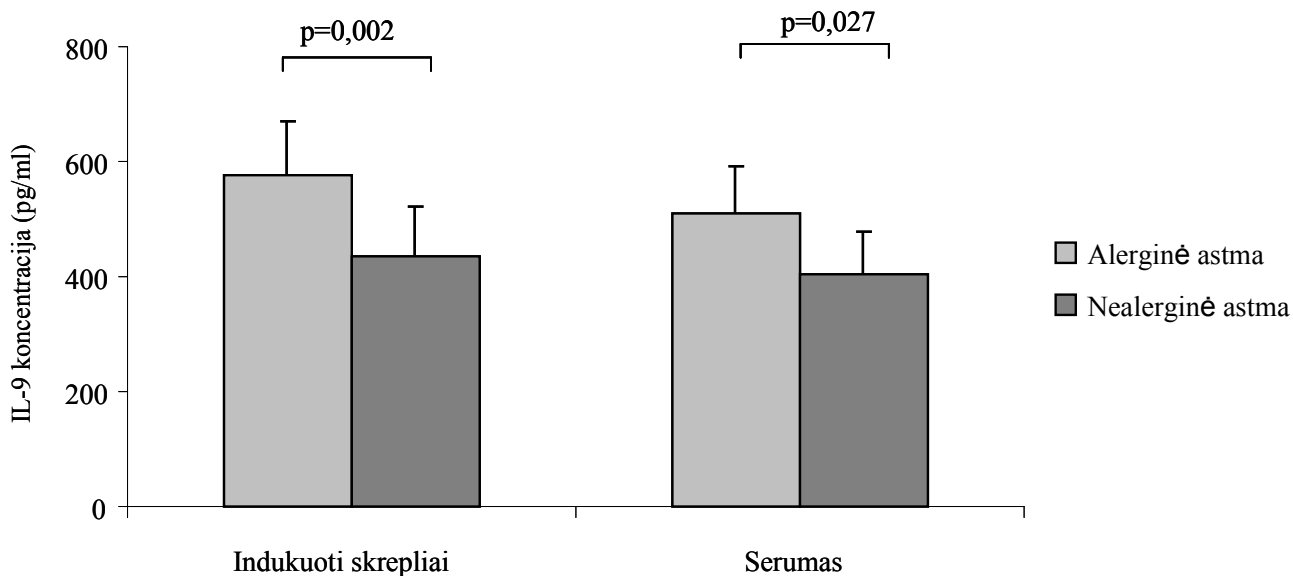


16 pav. IL-9 raiška indukuotų skreplių ląstelėse sergant astma.

** $p < 0,01$ palyginus su nealergine astma.

Alergine astma sergančių pacientų indukuotuose skrepliuose buvo reikšmingai daugiau IL-9⁺ ląstelių nei sergant nealergine astma ($20,55 \pm 4,3$ ir $9 \pm 3,7$ proc. atitinkamai, $p = 0,007$).

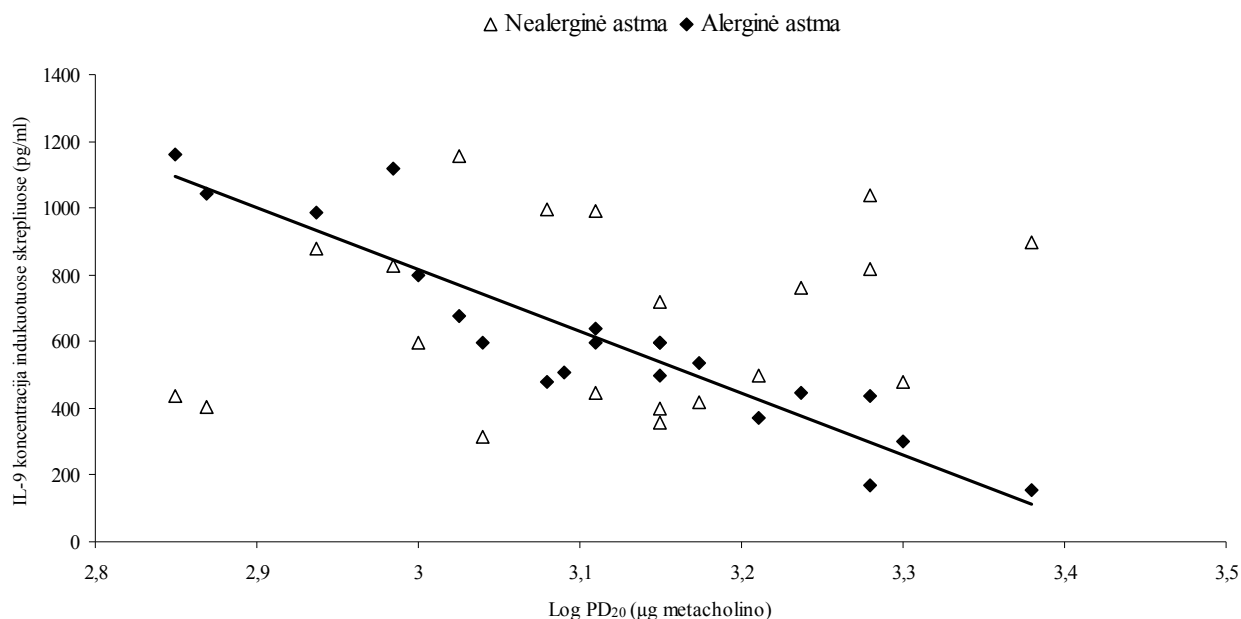
IL-9 koncentraciją nustatėme tiriamųjų kraujo serume bei skreplių supernatante (17 pav.)



17 pav. IL-9 koncentracija indukuotų skreplių supernatante ir kraujo serume sergant alergine ir nealergine astma.

Sergančiųjų alergine astma kraujo serume buvo reikšmingai daugiau IL-9 nei sergančiųjų nealergine astma ($510,3 \pm 83,7$ ir $402,5 \pm 76,1$ pg/ml atitinkamai, $p=0,027$). Panašios tendencijos stebėtos nustatius IL-9 koncentraciją indukuotų skreplių supernatante ($575,5 \pm 94,4$ pg/ml sergant alergine astma ir $434,7 \pm 88,2$ pg/ml sergant nealergine astma, $p=0,002$).

Sergančiųjų alergine astma bronchų reaktyvumas (PD_{20}) reikšmingai siejosi su indukuotų skreplių IL-9 koncentracija ($r=-0,85$, $p=0,002$), tačiau tokių sąsajų nealergine astma sergančių pacientų grupėje nenustatėme ($r=0,03$, $p=0,79$) (18 pav.).



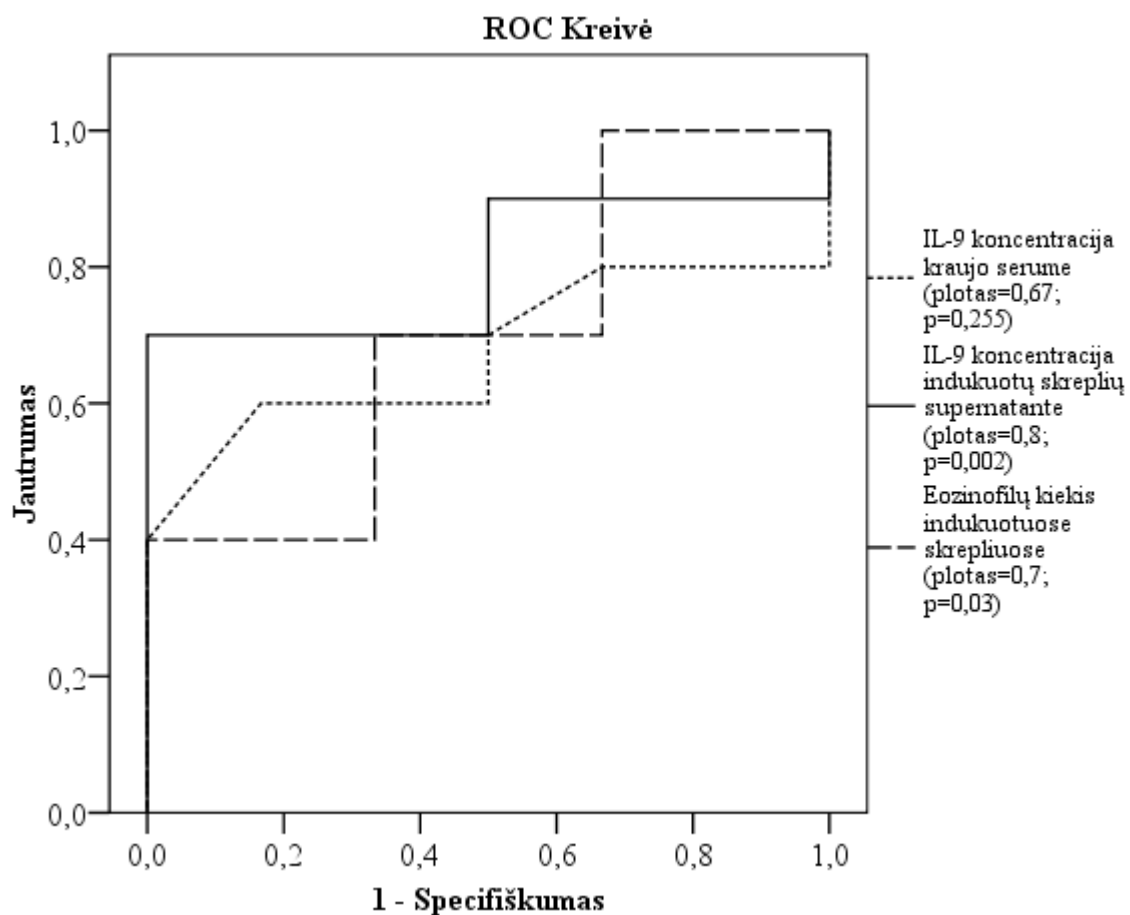
18 pav. PD_{20} sąsajos su IL-9 koncentracija indukuotuose skrepliuose sergant alergine (■ $r=-0,85$, $p=0,002$) ir nealergine (△ $r=0,03$, $p=0,79$) astma. r- Sparmeno koreliacijos koeficientas, p- reikšmingumo lygmuo.

Nustatytos reikšmingos PD_{20} ir IL-9 koncentracijos kraujo serume sąsajos sergant alergine astma ($r=-0,45$, $p=0,035$), tačiau sergančiųjų nealergine astma grupėje ryšio tarp bronchų reaktyvumo (išreikšto PD_{20}) bei IL-9 kiekio kraujyje nebuvo ($r=-0,13$, $p=0,67$).

6.1.5 Lėtinio neinfekcinio kvėpavimo takų uždegimo žymenų vertė prognozuojant III^o padidėjusį bronchų reaktyvumą

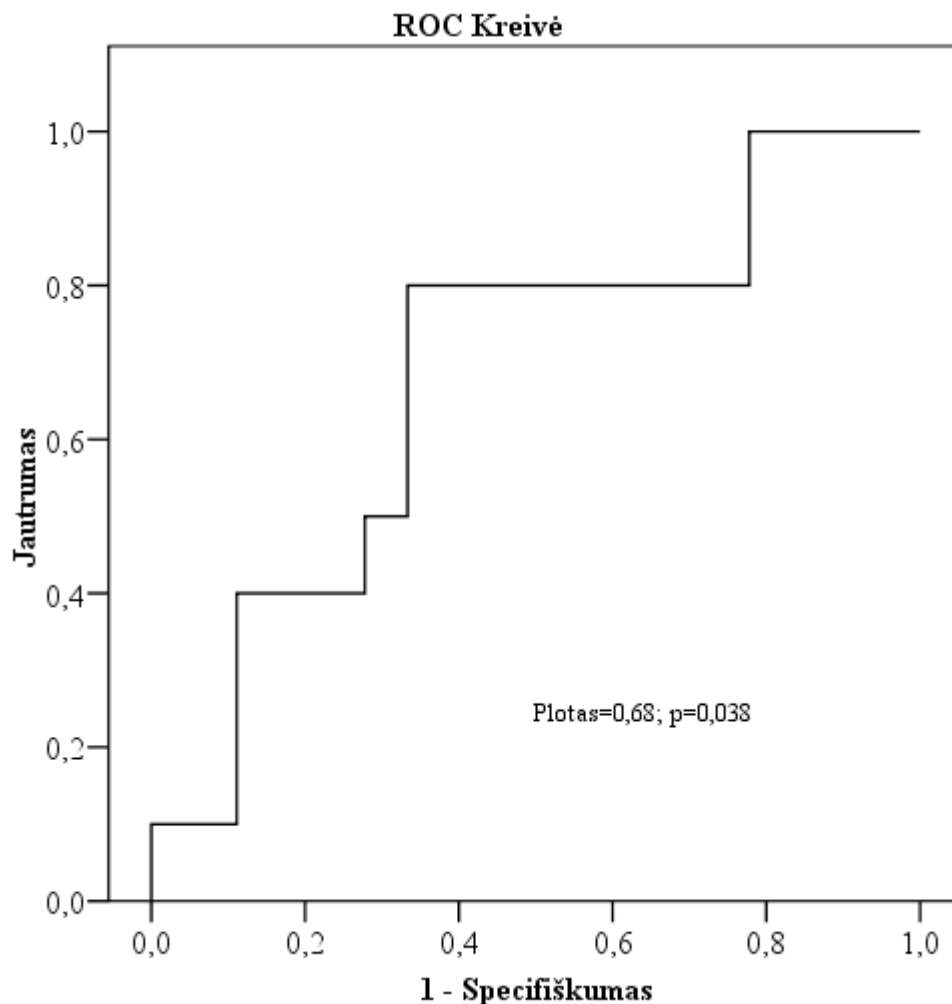
III^o padidėjęs bronchų reaktyvumas- opi problema medicinoje, turinti įtakos pacientų gyvenimo kokybės blogėjimui, astmos simptomų pasireiškimui bei didesnių vaistų dozių vartojimui. Todėl logistinės regresijos ir ROC kreivių pagalba analizavome imuninių žymenų vertę ir galimą riziką III^o padidėjusio bronchų reaktyvumo pasireiškimui.

Alergine astma sergančių pacientų grupėje analizuojant ROC kreives nustatyta, kad IL-9 koncentracija indukuotų skreplių supernatante pasižymi didžiausia verte prognozuojant III^o padidėjusio bronchų reaktyvumo išsivystymą (plotas po ROC kreive- 0,8, p=0,002) (19 pav.). Esant IL-9 koncentracijai indukuotų skreplių supernatante $\geq 475,5$ pg/ml, prognozuojant III^o padidėjusio bronchų reaktyvumo išsivystymą tyrimo jautrumas 70 proc., specifiškumas- 100 proc. Kiek mažesnė prognostinė eozinofilų kiekio indukuotuose skrepliuose vertė (plotas po ROC kreive-0,7, p=0,03). Tuo tarpu IL-9 koncentracija kraujyje nebuvo statistiškai reikšmingas žymuo prognozuojant III^o padidėjusio bronchų reaktyvumo vystimąsi sergant alergine astma (plotas po ROC kreive -0,67, p=0,255).



19 pav. Serumo ir indukuotų skreplių IL-9 koncentracijų bei eozinofilų kiekio indukuotuose skrepliuose jautrumo bei specifiškumo palyginimas vertinant III^o padidėjusio bronchų reaktyvumo pasireiškimą sergantiesiems alergine astma.

Limfocitų kiekis indukuotuose skrepliuose $\geq 0,35 \times 10^6/\text{ml}$ buvo reikšmingas žymuo prognozuojant III^o padidėjusio bronchų reaktyvumo pasireiškimą sergant nealergine astma (jautrumas- 80 proc., specifiškumas-67 proc., plotas po ROC kreive-0,68, $p=0,038$) (20pav.).



20 pav. Limfocitų kiekio indukuotuose skrepliuose prognostinė reikšmė vertinant III^o padidėjusio bronchų reaktyvumo pasireiškimą sergant nealergine astma.

Analizuojant duomenis vienaveiksme logistine regresija (6.1.5.1 lentelė), nustatyta, kad IL-9 koncentracija indukuotų skreplių supernatante, didesnė nei 475,7 pg/ml (ŠS=4,5; PI=2,43-8,42; $p=0,002$) ir skreplių eozinofilų kiekis, didesnis nei $0,23 \times 10^6/\text{ml}$ (ŠS=3,6 ;PI=1,74-5,94; $p=0,02$) reikšmingai didina III^o padidėjusio bronchų reaktyvumo tikimybę pacientams, sergantiems alergine astma.

6.1.5.1 lentelė. Veiksnių turinčių įtakos III⁰ padidėjusio bronchų reaktyvumo pasireiškimui vieneveiksmė analizė sergant (sergant alergine astma).

Veiksny	ŠS	PI (95 proc.)	p
Lytis: vyrai moterys	1 0,97	0,26-3,67	0,85
Rūkymas: nėra yra	1 1,54	0,45-5,57	0,08
Kitos atopinės ligos: nėra yra	1 0,8	0,37-2,34	0,54
Įsijautrinimas daugiau nei vienam alergenui: nėra yra	1 1,12	0,56-3,68	0,07
IL-9 koncentracija IS: <475,7pg/ml ≥475,7pg/ml	1 4,5	2,43-8,42	0,002
Eozinofilų kiekis IS <0,23x10 ⁶ /ml ≥0,23x10 ⁶ /ml	1 3,6	1,74-5,93	0,02

ŠS- šansų santykis; PI- pasikliautiniai intervalai; p- reikšmingumo lygmuo.

Nealergine astma sergančių pacientų duomenų analizė vieneveiksmė logistine regresija parodė, kad didesnis nei 0,35x10⁶/ml limfocitų kiekis indukuotuose skrepliuose reikšmingai didino III⁰ padidėjusio bronchų reaktyvumo tikimybę (ŠS=2,1; PI=1,21-3,84; p=0,03) (6.1.5.2 lentelė).

6.1.5.2 lentelė. Veiksnių turinčių įtakos III⁰ padidėjusio bronchų reaktyvumo pasireiškimui vieneveiksmė analizė sergant (sergant nealergine astma).

Veiksny	ŠS	PI (95 proc.)	p
Lytis: vyrai moterys	1 0,68	0,29-4,25	0,85
Rūkymas: nėra yra	1 1,74	0,53-4,97	0,09
Limfocitų kiekis IS <0,35x10 ⁶ /ml ≥0,35x10 ⁶ /ml	1 2,1	1,21-3,84	0,03

ŠS- šansų santykis; PI- pasikliautiniai intervalai; p- reikšmingumo lygmuo.

Daugiaveiksmė logistinė analizė parodė, kad, sergant alergine astma, kad IL-9 koncentracija indukuotų skreplių supernatante, didesnė ar lygi 475,7 pg/ml (regresijos koeficientas=1,2; ŠS=4,9, PI=2,2-8,1, p=0,001) ir skreplių eozinofilų kiekis, didesnis ar lygus 0,23x10⁶/ml (ŠS=4,3; PI=1,2-

7,5 p=0,03) reikšmingai didina III⁰ padidėjusio bronchų reaktyvumo tikimybę pacientams, sergantiems alergine astma.

Nealergine astma sergančių pacientų grupėje, daugiaveiksmės analizės duomenimis, tik limfocitų kiekis indukuotuose skrepliuose, didesnis ar lygus $0,35 \times 10^6/\text{ml}$ reikšmingai didino III⁰ padidėjusio bronchų reaktyvumo tikimybę ($\bar{S}S=1,8$ PI=0,68-3,69; p=0,04).

6.2 Rūkorių ir nerūkančių asmenų, sergančių alergine ar nealergine astma kvėpavimo takų sekreto ląstelių sudėties, IL-5 ir eotaksinų koncentracijos tyrimas

6.2.1 Tiriamųjų charakteristika

Tyrimė dalyvavusių alergine astma sergančių pacientų pagrindinės charakteristikos pateiktos 6.2.1.1 lentelėje. Rūkoriai ir nerūkantieji alergine astma sergantys pacientai tarpusavyje reikšmingai nesiskyrė amžiumi, ligos simptomų trukme, plaučių funkcijos rodikliais bei eozinofilų skaičiumi kraujyje.

6.2.1.1 lentelė. Pagrindinės alergine astma sergančių rūkorių ir nerūkančiųjų charakteristikos

Požymis	Rūkoriai, sergantys alergine astma	Nerūkantieji, sergantys alergine astma	p
Tiriamųjų skaičius	16	20	
Vyrai/moterys	7/9	8/12	
Amžius (metais)	52,4±5,3	49,5±2,4	NS
Ligos simptomų trukmė (metais)	10,2±3,1	12,4±7,3	NS
Rūkymo trukmė (pakmečiais)	15,4±5,3	-	-
FVC (proc. b.d.)	97,2±2,3	98,6±5,4	NS
FEV ₁ (proc. b.d.)	94,4±6,3	97,6±1,7	NS
FEV ₁ /FVC (proc.)	78,8±4,1	79,4±2,7	NS
FEV ₁ /FVC (proc. b.d.)	102,5±8,5	106±6,8	NS
Eozinofilų kiekis kraujyje ($\times 10^6/\text{l}$)	0,4±0,3	0,8±0,6	NS

Duomenys pateikti vidurkis±SEM; FVC- forsuota gyvybinė plaučių talpa; FEV₁-forsuotas iškvėpimo tūris per pirmąją minutę; FEV₁/FVC- Genslerio indeksas, p-reikšmingumo lygmuo, NS- statistiškai nereikšminga.

Nealergine astma sergančių rūkorių bei nerūkančiųjų pagrindinės charakteristikos pateiktos 6.2.1.2 lentelėje. Rūkoriai, sergantys nealergine astma nuo nerūkančiųjų, sergančių nealergine astma reikšmingai nesiskyrė amžiumi, ligos simptomų trukme, plaučių funkcijos rodikliais bei eozinofilų kiekiu kraujyje.

6.2.1.2 lentelė. Pagrindinės nealerginė astma sergančių rūkatorių ir nerūkančiųjų charakteristikos

Požymis	Rūkoriai, sergantys nealergine astma	Nerūkantieji, sergantys nealergine astma	p
Tiriamųjų skaičius	19	26	
Vyrai/moterys	14/5	6/20	
Amžius (metais)	54.7±5.1	56.9±1.7	NS
Ligos simptomų trukmė (metais)	9.5±6.1	11.3±2.5	NS
Rūkymo trukmė (pakmečiais)	17.4±7.3	-	-
FVC (proc. b. d.)	78.8±6.4	89.3±3.6	NS
FEV ₁ (proc. b.d.)	80.4±9.7	85.3±4.8	NS
FEV ₁ /FVC (proc.)	67.4±7.5	69.8±3.4	NS
FEV ₁ /FVC (proc. b.d.)	100,4±5,2	102,5±7,3	NS
Eozinofilų kiekis kraujyje (x10 ⁶ /l)	0,1±0,1	0,2±0,1	NS

Duomenys pateikti vidurkis±SEM; FVC- forsuta gyvybinė plaučių talpa; FEV₁-forsutas iškvėpimo tūris per pirmąją minutę; FEV₁/FVC- Genslerio indeksas, p-reikšmingumo lygmuo, NS- statistiškai nereikšminga.

Pagrindinės „sveikų“ rūkatorių ir sveikų nerūkančiųjų charakteristikos pateiktos 6.2.1.3 lentelėje. Sveiki tiriamieji tarpusavyje reikšmingai nesiskyrė amžiumi, plaučių funkcijos rodikliais bei eozinofilų kiekiu kraujyje.

6.2.1.3 lentelė. Pagrindinės sveikų nerūkančiųjų ir „sveikų“ rūkatorių charakteristikos.

Požymis	„Sveiki“ rūkoriai	Sveiki nerūkantieji	p
Tiriamųjų skaičius	10	15	
Vyrai/moterys	8/2	6/9	
Amžius (metais)	55,4±3,3	53,4±2,3	NS
Rūkymo trukmė (pakmečiais)	22,3±6,1	-	-
FVC (proc. b. d.)	97,6±9,5	108,6±4,7	NS
FEV ₁ (proc. b.d.)	112,6±5,3	117,5±4,1	NS
FEV ₁ /FVC (proc.)	79,0±4,6	80,5±1,0	NS
FEV ₁ /FVC (proc. b. d.)	105,4±3,1	107,8±3,4	NS
Eozinofilų kiekis kraujyje x10 ⁶ /l	0,1±0,06	0,1±0,03	NS

Duomenys pateikti vidurkis±SEM; FVC- forsuta gyvybinė plaučių talpa; FEV₁-forsutas iškvėpimo tūris per pirmąją minutę; FEV₁/FVC- Genslerio indeksas, p-reikšmingumo lygmuo, NS- statistiškai nereikšminga.

Palyginę šešių grupių tiriamųjų charakteristikas tarpusavyje nustatėme, kad visi tyrime dalyvavę asmenys nesiskyrė amžiumi. Rūkatorių, sergančių alergine ir nealergine astma bei „sveikų“ rūkatorių rūkymo intensyvumas (pakmečiais) buvo panašus.

Alergine astma sergančių rūkatorių bei nerūkančiųjų ir nealergine astma sergančių rūkatorių ir nerūkančių pacientų FEV₁ (proc. b.d.) buvo reikšmingai mažesnis nei „sveikų“ rūkatorių ar sveikų

nerūkančiųjų (6.2.1.4 lentelė). Nealergine astma sergančių pacientų FEV₁ (proc. b.d.) buvo reikšmingai mažesnis nei alergine astma sergančiųjų.

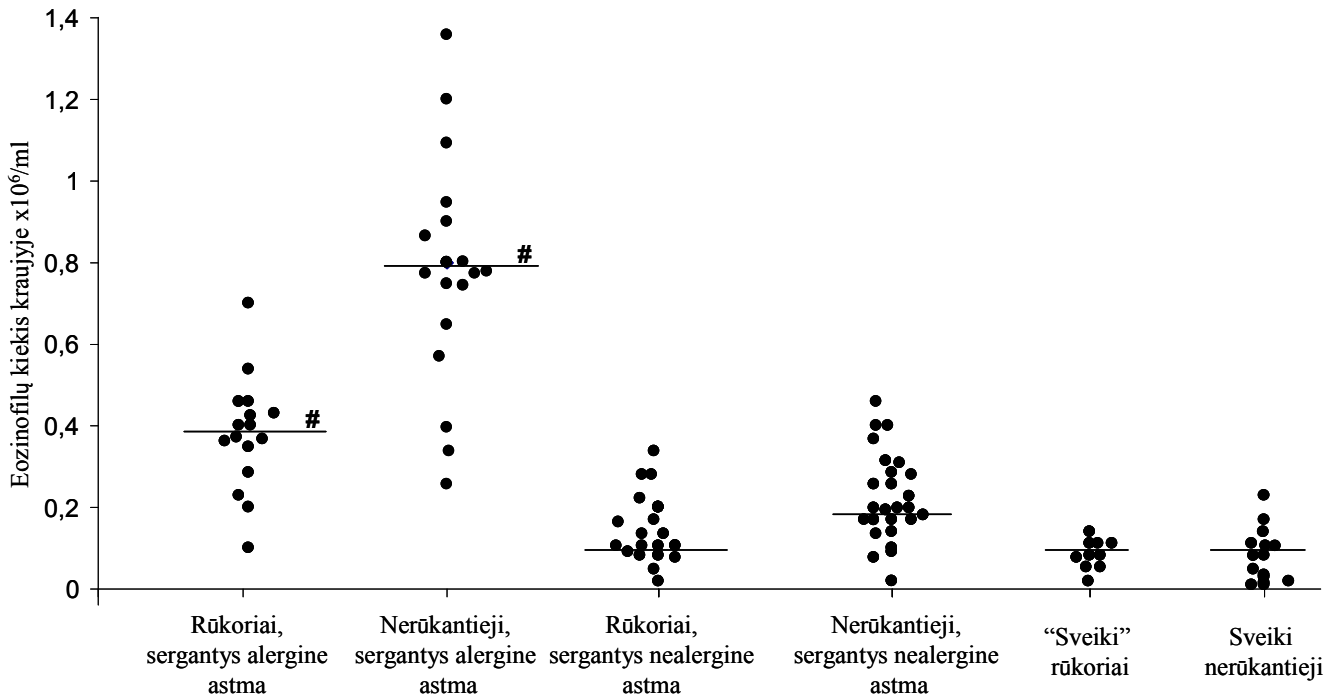
6.2.1.4 lentelė. Forsuoto iškvėpimo tūrio (proc. būtinojo dydžio) per pirmąją sekundę (FEV₁) palyginimas.

Tiriamųjų grupės	FEV ₁ (proc. būtinojo dydžio)
Rūkoriai, sergantys alergine astma	94,4±6,3*
Nerūkantieji, sergantys alergine astma	97,6±1,7*
Rūkoriai, sergantys nealergine astma	82,6±7,5*#
Nerūkantieji, sergantys nealergine astma	89,1± 3,2*#
„Sveiki“ rūkoriai	112,7±4,1
Sveiki nerūkantieji	115,5±5,9

*p<0,05 palyginus su „sveikais“ rūkoriais ir sveikais nerūkančiaisiais;

#p<0,05 palyginus su alergine astma sergančiais rūkoriais ir nerūkančiaisiais.

Alergine astma sergančių rūkorių ir nerūkančiųjų kraujyje buvo reikšmingai didesnis eozinofilų kiekis nei nealergine astma sergančių rūkorių bei nerūkančiųjų ir abejose sveikų asmenų grupėse (21 pav.).



21 pav. Eozinofilų kiekio kraujyje palyginimas tiriamųjų grupėse.

$p < 0,05$ palyginus su sergančiais nealergine astma rūkoriais bei nerūkančiaisiais, „sveikais“ rūkoriais ir sveikais nerūkančiaisiais.

6.2.2 Indukuotų skreplių ląstelių sudėties tyrimas

Tiriamieji skreplių indukciją toleravo gerai, pašalinių reakcijų ar komplikacijų tyrimo metu nebuvo. Tačiau 4 nerūkantiems ir sergantiems alergine astma, 3 nerūkantiems bei sergantiems nealergine astma ir 3 sveikiems nerūkantiems asmenims nepavyko atkosėti skreplių. Taigi šio tyrimo rezultatai vertinti 16 nerūkančiųjų, sergančių alergine astma, 23 nerūkančiųjų, sergančių nealergine astma bei 12 sveikų nerūkančiųjų asmenų.

Atlikti indukuotų skreplių mėginiai buvo vertinti kaip kokybiški, kuomet ląstelių gyvybingumas visose tiriamųjų grupėse buvo $>60\text{proc.}$, epitelio ląstelės mėginiuose sudarė ne daugiau nei 20 proc.

Pagrindinės skreplių indukcijos ir atkosėtų skreplių kokybės charakteristikos pateiktos 6.2.2.1 lentelėje.

6.2.2.1 lentelė. Skreplių indukcijos ir atkosėtų skreplių kokybės charakteristikos

Požymis	Rūkoriai, sergantys alergine astma N=16	Nerūkantieji, sergantys alergine astma N=16	Rūkoriai, sergantys nealergine astma N=17	Nerūkantieji, sergantys nealergine astma N=23	„Sveiki“ rūkoriai N=10	Sveiki nerūkantieji N=12
Indukcijos trukmė min.	6,15±1,25	9,42±1,73	5,48±1,92	10,12±3,43	12,42±5,45	13,05±4,97
FEV ₁ pokytis tyrimo metu (proc.)	-8,45±5,82	-9,95±3,93	-10,05±2,46	-9,02±5,08	-2,15±1,10*	-1,28±0,23*
Ląstelių gyvybingumas indukuotuose skrepliuose (proc.)	69,68±2,37	74,04±3,62	70,32±5,76	78,68±2,51	78,29±3,16	76,69±2,25
Epitelio ląstelių kiekis indukuotuose skrepliuose (proc.)	8,25±1,47	6,32±1,64	8,97±2,14	4,71±1,12	1,02±0,48*	0,63±0,22*
Bendras ląstelių skaičius (x10 ⁶ /ml/1g skreplių)	5,11±0,34	4,94±0,68	5,48±0,75	6,88±1,15	3,35±0,15	3,47±0,26

Duomenys pateikti vidurkis±SEM; FEV₁-forsuotas iškvėpimo tūris per pirmąją minutę.

*p<0,05 palyginus su visomis astma sergančių pacientų grupėmis.

Skreplių indukcija ilgiau truko „sveikiems“ rūkoriais ir sveikiems nerūkantiems asmenims nei alergine ar nealergine astma sergantiems rūkoriais, tačiau skirtumas nebuvo reikšmingas.

Tyrimo metu kas 5 minutės visiems tiriamiesiems atlikta spirometria ir vertintas FEV₁ kitimas. Nė vienam pacientui nebuvo stebėtas FEV₁ sumažėjimas daugiau kaip 20 proc. palyginus su pradiniu dydžiu. Tačiau visose astma sergančių pacientų grupėse, veikiant hipertonišiam NaCl tirpalui, reikšmingai daugiau sumažėjo FEV₁ nei „sveikų“ rūkorių ar sveikų nerūkančiųjų.

Abejose sveikų asmenų grupėse nustatytas patikimai mažesnis epitelio ląstelių kiekis indukuotuose skrepliuose (vidurkis- 0,82proc., svyravimai nuo 0,4 iki 1,5proc.) nei visų astma sergančių pacientų (vidurkis-7,06 proc., svyravimai nuo 3,59 iki 11,11proc., p < 0,05.). Bendras ląstelių skaičius 1 grame skreplių tarp tiriamųjų grupių nesiskyrė.

Indukuotų skreplių ląstelių procentinė sudėtis pateikta 6.2.2.2 lentelėje.

Visose tiriamųjų grupėse bendras skreplių ląstelių skaičius buvo panašus. Visų astma sergančių pacientų, nepriklausomai nuo rūkymo įpročių, indukuotuose skrepliuose buvo patikimai didesnis eozinofilų kiekis nei „sveikų“ rūkorių ir sveikų nerūkančiųjų . Nerūkančiųjų, alergine astma sergančių grupėje nustatėme didesnį eozinofilų kiekį nei rūkorių, sergančių alergine astma skrepliuose (p=0,027).

Nealergine astma sergančių pacientų skrepliuose stebėjome didesnį neutrofilų skaičių rūkorių grupėje nei nerūkančiųjų, tačiau skirtumas buvo statistiškai nereikšmingas (p=0,082). Nerūkančiųjų,

sergančių nealergine astma skrepliuose buvo reikšmingai didesnis santykinis eozinofilų kiekis nei rūkantių, sergančių nealergine astma ($p=0,008$).

Abejose sveikų asmenų grupėse indukuotų skreplių ląstelių sudėtis nesiskyrė. „Sveiki“ rūkaliai skrepliuose turėjo didesnę santykinę neutrofilų kiekį nei sveiki nerūkantieji, tačiau skirtumas buvo statistiškai nereikšmingas ($p=0,097$).

6.2.2.2 lentelė. Indukuotų skreplių ląstelių procentinės sudėties palyginimas.

Požymis	Rūkaliai, sergantys alergine astma	Nerūkantieji, sergantys alergine astma	Rūkaliai, sergantys nealergine astma	Nerūkantieji, sergantys nealergine astma	„Sveiki“ rūkaliai	Sveiki nerūkantieji
Neutrofilai	35,19±7,35	28,09±6,64	31,60±6,09	28,9±5,16	25,25±30,75	20,64±12,96
Eozinofilai	9,01±2,05* ^{&}	13,75±0,39*	3,30±1,03* [#]	6,52±1,64*	0,88±0,13	1,4±0,51
Limfocitai	5,60±0,66	6,0±3,50	6,25±2,27	7,68±1,02	6,37±2,13	10,67±2,41
Makrofagai	50,20±4,51	15,16±5,43	58,85±4,80	56,9±4,4	67,50±28,75	67,29±11,03

Duomenys atspindi vidurkį± standartinę vidurkio paklaidą.

* $p<0,05$ palyginus su „sveikais“ rūkaliais ir sveikais nerūkančiaisiais

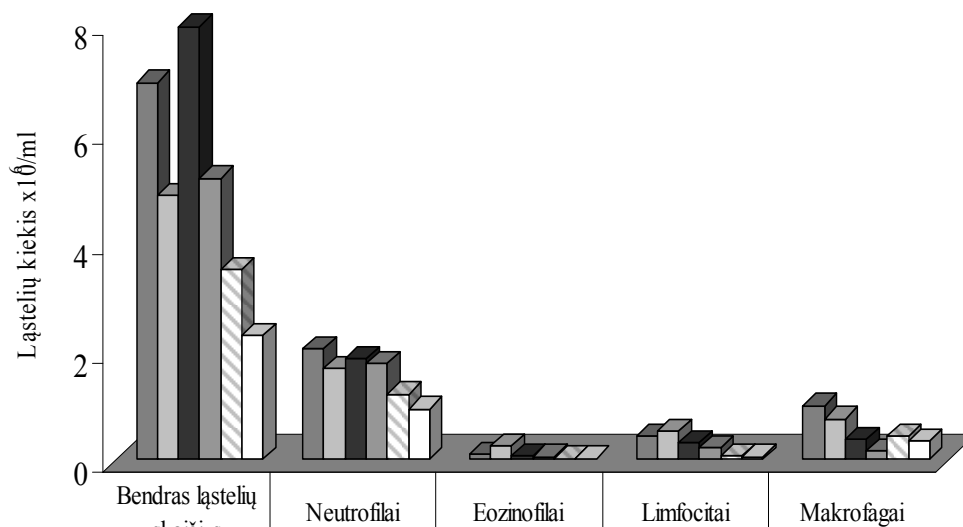
& $p<0,05$ palyginus su nerūkančiaisiais, sergančiais alergine astma

$p<0,05$ palyginus su nerūkančiaisiais, sergančiais nealergine astma.

Indukuotų skreplių ląstelių kiekis absoliučiais skaičiais pateikta 22 pav.

Visų astma sergančių pacientų, nepriklausomai nuo jų rūkymo įpročių, indukuotuose skrepliuose buvo didesnis bendras ląstelių kiekis bei eozinofilų kiekis nei „sveikų“ rūkantių ar sveikų nerūkančiųjų.

Alergine astma sergančių rūkantių skrepliuose buvo reikšmingai didesnis absoliutus neutrofilų kiekis nei nerūkančiųjų, alergine astma sergančių asmenų ($2,03±1,43$ ir $1,66±0,31 \times 10^6/\text{ml}$ atitinkamai, $p=0,035$). Nerūkančiųjų, alergine astma sergančių grupėje nustatėme didesnę eozinofilų ($0,24±0,17$ ir $0,09±0,05 \times 10^9/\text{ml}$ atitinkamai, $p=0,001$) ir limfocitų ($0,52±0,27$ ir $0,41±0,25 \times 10^6/\text{ml}$ atitinkamai, $p=0,025$) kiekį nei rūkantių, sergančių alergine astma skrepliuose. Rūkantių, sergančių alergine astma skrepliuose nustatėme didesnę bendrą ląstelių ($6,90±1,84$ ir $4,84±0,31 \times 10^6/\text{ml}$ atitinkamai, $p=0,15$) ir makrofagų kiekį ($0,98±0,33$ ir $0,74±0,29 \times 10^6/\text{ml}$ atitinkamai, $p=0,26$) nei nerūkančiųjų, alergine astma sergančių pacientų, tačiau skirtumas buvo statistiškai nereikšmingas.



	Bendras ląstelių skaičius	Neutrofilai	Eozinofilai	Limfocitai	Makrofagai
■ Rūkoriai, sergantys alergine astma	6,9 *	2,03 [#]	0,09 [#]	0,41 [#]	0,98
▒ Nerūkantieji, sergantys alergine astma	4,84 *	1,66	0,24 *	0,52	0,74
■ Rūkoriai, sergantys nealergine astma	7,93 *	1,83	0,05 *	0,3	0,36 ^{&}
▒ Nerūkantieji, sergantys nealergine astma	5,15 *	1,75	0,04 *	0,2	0,14
□ "Sveiki" rūkoriai	3,47	1,19	0,01	0,06	0,43
□ Sveiki nerūkantieji	2,26	0,92	0,01	0,04	0,33

22 pav. Indukuotų skreplių ląstelių sudėties ($\times 10^6/\text{ml}$) palyginimas.

Duomenys atspindi vidurkį.

* $p < 0,05$ palyginus su „sveikais“ rūkoriais ir sveikais nerūkančiaisiais.

$p < 0,05$ palyginus su nerūkančiaisiais, sergančiais alergine astma.

& $p < 0,05$ palyginus su nerūkančiaisiais, sergančiais nealergine astma.

Nealergine astma sergančių rūkorių skrepliuose buvo daugiau makrofagų nei nerūkančiųjų, sergančių nealergine astma ($0,36 \pm 0,09$ ir $0,14 \pm 0,05 \times 10^6/\text{ml}$ atitinkamai, $p=0,005$). Palyginę rūkorių, sergančių nealergine astma skreplių sudėtį su nerūkančiųjų, sergančių nealergine astma tyrimo rezultatais nustatėme didesnę bendrą ląstelių ($7,93 \pm 1,99$ ir $5,15 \pm 2,09 \times 10^6/\text{ml}$ atitinkamai, $p=0,09$) ir neutrofilų ($1,83 \pm 0,29$ ir $1,75 \pm 0,42 \times 10^6/\text{ml}$ atitinkamai, $p=0,18$) kiekį, tačiau skirtumas buvo nereikšmingas.

„Sveikų“ rūkorių skrepliuose, palyginus su sveikais nerūkančiaisiais, buvo didesnis bendras ląstelių ($0,48 \pm 0,23$ ir $0,33 \pm 0,15 \times 10^6/\text{ml}$ atitinkamai, $p=0,45$), neutrofilų ($1,19 \pm 0,62$ ir $0,92 \pm 0,01 \times 10^6/\text{ml}$ atitinkamai, $p=0,08$) ir makrofagų kiekis ($0,43 \pm 0,23$ ir $0,33 \pm 0,15 \times 10^6/\text{ml}$ atitinkamai, $p=0,1$), tačiau skirtumas buvo nereikšmingas.

6.2.3 BAL skysčio ląstelių sudėties tyrimas

Bronchoalveolinis lavažas atliktas pacientams, kurie pasirašė sutikimo formoje ir neturėjo kontraindikacijų šiam tyrimui. Tyrimas atliktas 16 rūkorių, sergančių alergine astma, 20 nerūkančiųjų, sergančių alergine astma, 19 rūkorių, sergančių nealergine astma, 26 nerūkantiems, sergantiems nealergine astma bei visiems sveikiems asmenims. Pacientai bronchoskopiją toleravo gerai, komplikacijų nebuvo.

Pagrindinės BAL charakteristikos (gautas tūris, ląstelių gyvybingumas, bendras ląstelių skaičius) pateiktos 6.2.3.1 lentelėje.

6.2.3.1 lentelė. Gauta bronchoalveolinio lavažo tūrio, ląstelių gyvybingumo bei bendro ląstelių skaičiaus palyginimas.

Požymis	Rūkoriai, sergantys alergine astma N=16	Nerūkantieji, sergantys alergine astma N=20	Rūkoriai, sergantys nealergine astma N=19	Nerūkantieji, sergantys nealergine astma N=26	„Sveiki“ rūkoriai N=10	Sveiki nerūkantieji N=15
Gauto BAL skysčio tūris (ml)	77,15±3,42*	75,8±1,48*	75,5±1,76*	70,83±2,06*	95,57±3,76	86,62±2,47
Ląstelių gyvybingumas (proc.)	82,72±7,43	88,82±6,86	83,60±5,28	87,14±4,75	90,56±1,29	87,95±1,91
Bendras ląstelių skaičius (x10 ⁶ /ml)	0,26±0,04	0,10±0,003	0,28±0,04	0,22±0,03	0,27±0,02	0,21 ±0,03

Duomenys pateikti vidurkis±SEM.

*p<0,05 palyginus su „sveikais“ rūkoriais ir sveikais nerūkančiaisiais.

„Sveikų“ rūkorių ir sveikų nerūkančiųjų gauto BAL skysčio tūris buvo reikšmingai didesnis nei astma sergančių pacientų. Mėginiai laikyti kokybiškais, jei ląstelių gyvybingumas buvo ne mažesnis nei 70 proc. Visų tiriamųjų BAL ląstelių gyvybingumas nesiskyrė. Reikšmingų skirtumų tarp visų tirtų grupių nebuvo ir vertinant bendrą ląstelių kiekį.

BAL skysčio ląstelių sudėtis absoliučiais skaičiais pateikta 6.2.3.2 lentelėje.

Alergine astma sergančių rūkorių BAL skystyje nustatėme didesnę neutrofilų bei mažesnę eozinofilų kiekį nei nerūkančiųjų, sergančių alergine astma, tačiau skirtumas buvo statistiškai nereikšmingas (p=0,08 ir p=0,14 atitinkamai).

Nealergine astma sergančių rūkorių BAL skystyje buvo daugiau eozinofilų nei „sveikų“ rūkorių ir sveikų nerūkančiųjų BAL skystyje (p=0,004 ir p=0,015 atitinkamai). Rūkorių, sergančių nealergine astma BAL skystyje nustatėme reikšmingai didesnę absoliutų neutrofilų ir limfocitų bei mažesnę makrofagų skaičių palyginus su nerūkančiųjų, sergančių nealergine astma grupe (p=0,012, p=0,026 ir p=0,03 atitinkamai).

„Sveikų“ rūkorių bei sveikų nerūkančiųjų absoliutūs BAL skysčio ląstelių kiekiai reikšmingai nesiskyrė.

6.2.3.2 lentelė. Bronchoalveolinio lavažo skysčio ląstelių sudėties ($\times 10^6/\text{ml}$) palyginimas.

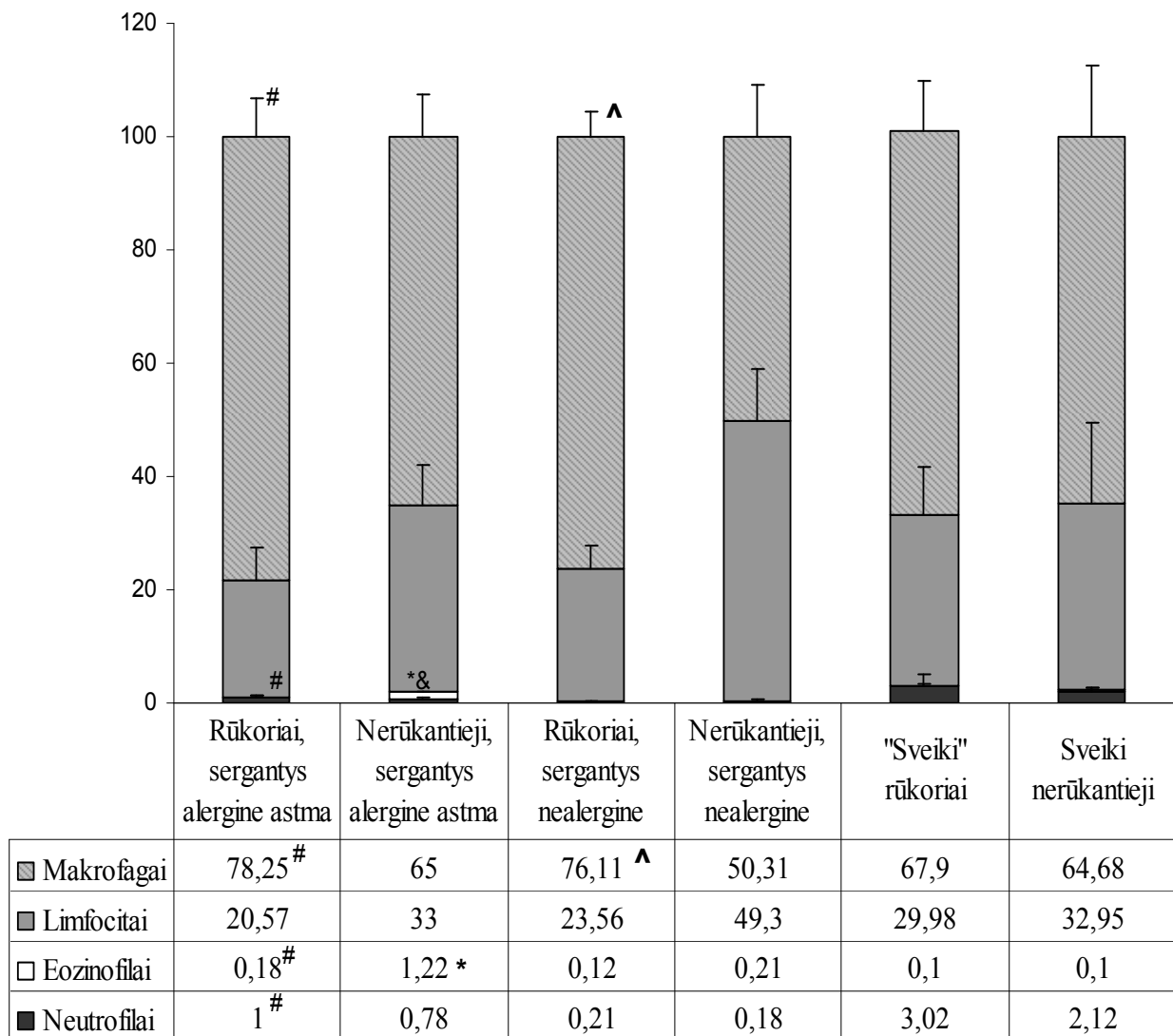
Ląstelės ($\times 10^9/\text{ml}$)	Rūkoriai, sergantys alergine astma	Nerūkantieji, sergantys alergine astma	Rūkoriai, sergantys nealergine astma	Nerūkantieji, sergantys nealergine astma	„Sveiki“ rūkoriai	Sveiki nerūkantieji
Neutrofilai	0,02±0,002	0,01±0,004	0,09±0,003 [#]	0,03±0,001	0,07±0,03	0,05±0,01
Eozinofilai	0,02±0,001	0,03±0,01	0,02±0,001	0,05±0,001*	0,01±0,001	0,01±0,001
Limfocitai	0,91±0,72	0,99±0,31	0,48±0,72 [#]	0,33±0,31	1,14±0,05	1,03±0,89
Makrofagai	1,02±0,44	1,49±0,32	1,58±0,06 [#]	1,32±0,26	1,43±0,40	1,55±1,79

* $p < 0,05$ palyginus su „sveikais“ rūkoriais ir sveikais nerūkančiaisiais

$p < 0,05$ palyginus su nerūkančiaisiais, sergančiais nealergine astma.

Procentinę BAL skysčio ląstelių sudėtį atspindi 23 paveikslas.

Alerginė astma sergančių rūkorių BAL skystyje buvo daugiau makrofagų (78,25±6,7 ir 65±7,54 proc. atitinkamai, $p=0,042$) ir neutrofilų (1±0,26 ir 0,78±0,2 proc. atitinkamai, $p=0,035$) kiekis nei nerūkančiųjų, sergančių alergine astma. Nerūkančiųjų, sergančių alergine astma BAL skystyje buvo didesnis eozinofilų kiekis nei rūkorių, sergančių alergine astma (1,22±0,16 ir 0,18±0,17 proc. atitinkamai, $p=0,041$). Nors visų astma sergančių pacientų BAL skystyje buvo didesnis eozinofilų kiekis nei sveikų asmenų, tačiau reikšmingas skirtumas nustatytas tik tarp nerūkančiųjų, sergančių alergine astma, „sveikų“ rūkorių ir sveikų nerūkančiųjų BAL skysčio eozinofilų (1,22±0,16; 0,1±0,1 ir 0,1±0,08 proc. atitinkamai, $p < 0,05$).



23 pav. Bronchoalveolinio lavažo skysčio ląstelių procentinės sudėties palyginimas.

Duomenys atspindi vidurkį.

#p<0,05 palyginus su nerūkančiais, sergančiais alergine astma;

& p<0,05 palyginus su rūkoriais, sergančiais alergine astma ;

* p<0,05 palyginus su "sveikais" rūkoriais ir sveikais nerūkančiais ;

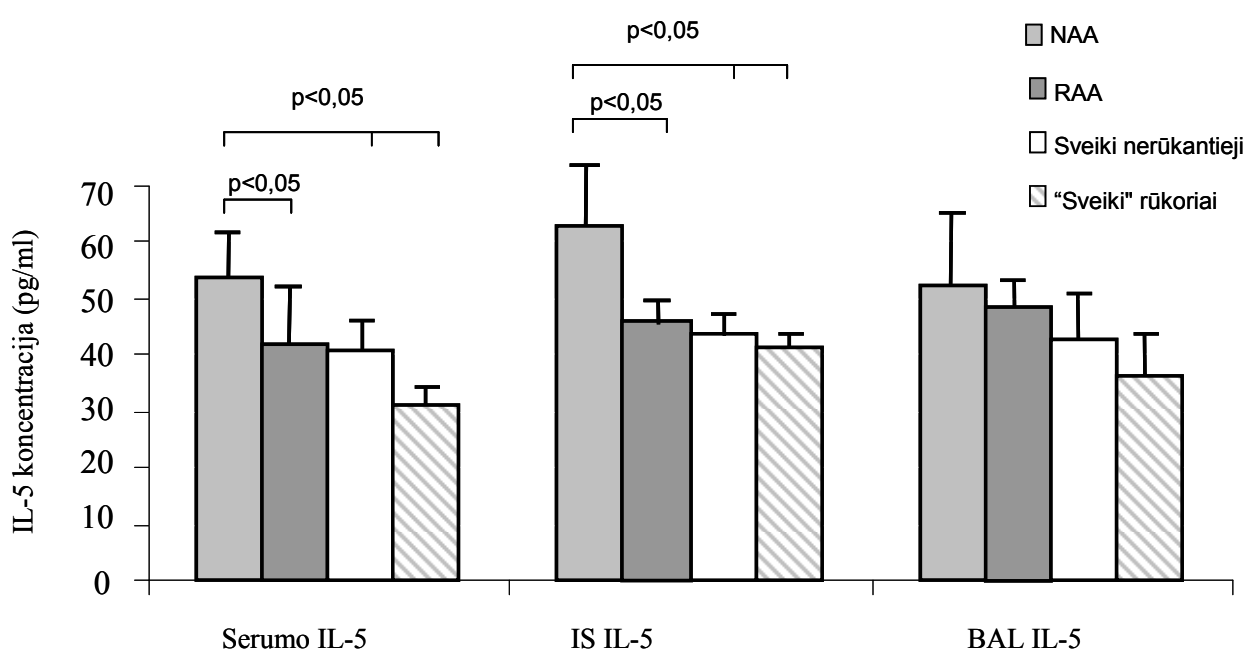
^ p<0,05 palyginus su nerūkančiais, sergančiais nealergine astma.

Nealergine astma sergančių rūkorių BAL skystyje buvo daugiau makrofagų nei nerūkančiųjų, sergančių nealergine astma (76,11±4,24 ir 50,31±9,29 proc. atitinkamai, p=0,028). Nealergine astma sergančių pacientų grupėje, panašiai kaip ir alergine astma sergančių pacientų tarpe, nustatėme, kad rūkančiųjų BAL skystyje buvo daugiau neutrofilų (0,21±0,13 ir 0,18±0,06 proc. atitinkamai, p=0,088) ir mažiau eozinofilų (0,12±0,09 ir 0,21±0,16 proc. atitinkamai, p=0,09) nei nerūkančiųjų, sergančių nealergine astma, tačiau skirtumas buvo statistiškai nereikšmingas.

„Sveikų“ rūkorių ir sveikų nerūkančiųjų BAL skysčio ląstelių procentinė sudėtis nesiskyrė.

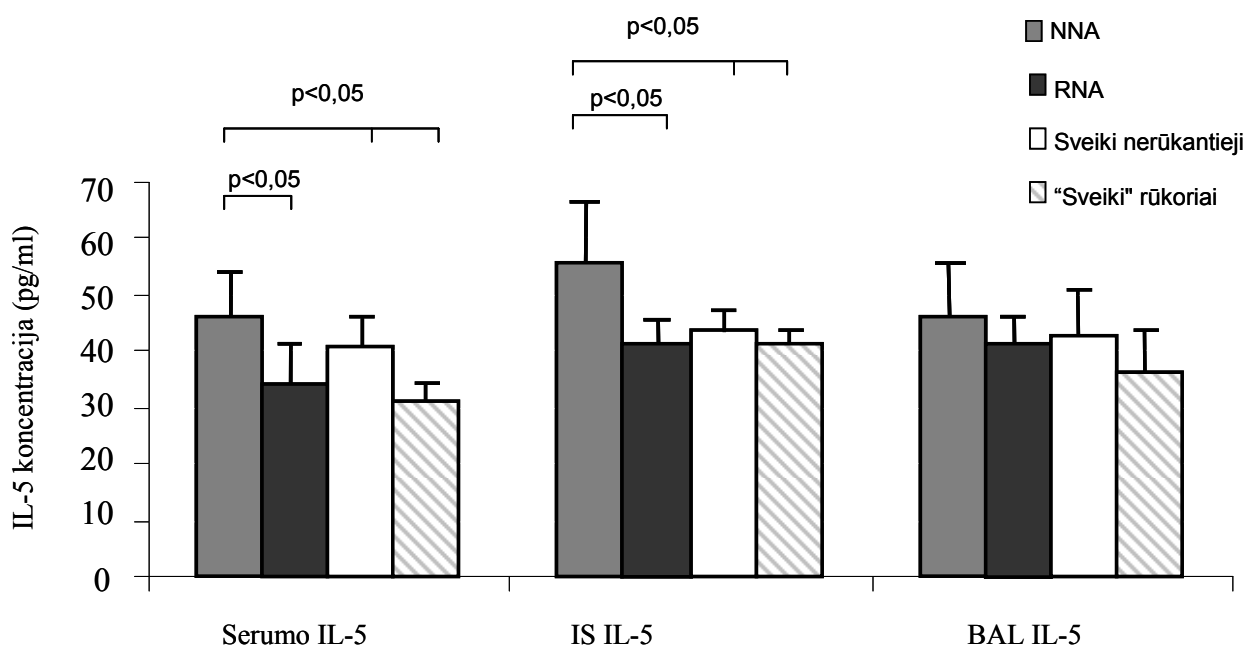
6.2.4 IL-5 koncentracijos kraujo serume, indukuotų skreplių supernatante ir BAL skystyje tyrimas

Rūkorių, sergančių alergine astma serume bei indukuotų skreplių supernatante buvo patikimai mažesnė IL-5 koncentracija palyginus su nerūkančiaisiais, sergančiais alergine astma bei abejomis sveikų asmenų grupėmis (24 pav.). Panašios tendencijos stebimos ir BAL, tačiau skirtumas statistiškai nepatikimas ($p=0,075$). „Sveikų“ rūkorių bei sveikų nerūkančiųjų IL-5 koncentracija kraujo serume nesiskyrė.



24 pav. IL-5 koncentracijų palyginimas kraujo serume, indukuotų skreplių supernatante ir BAL skystyje sergant alergine astma. Duomenys atspindi vidurkį ± standartinę vidurkio paklaidą. IS- indukuoti skrepliai; BAL- bronchoalveolinis lavažas; NAA- nerūkantieji, sergantys alergine astma; RAA- rūkoriai, sergantys alergine astma.

Nealergine astma sergančių rūkorių kraujo serume ir skrepliuose buvo reikšmingai mažiau IL-5 nei nerūkančiųjų, sergančių nealergine astma ir sveikų nerūkančiųjų (25 pav.). BAL skystyje nustatytos IL-5 koncentracijos rūkorių ir nerūkančiųjų, sergančių nealergine astma bei abejų sveikų asmenų grupėse reikšmingai nesiskyrė.



25 pav. IL-5 koncentracijų palyginimas kraujo serume, indukuotų skreplių supernatante ir BAL skystyje sergant nealergine astma. Duomenys atspindi vidurkį± standartinę vidurkio paklaidą. NNA- nerūkantieji, sergantys nealergine astma; RNA- rūkoriai, sergantys nealergine astma; IS- indukuoti skrepliai, BAL- bronchoalveolinis lavažas.

Alerginė ir nealerginė astma sergančių pacientų IL-9 koncentracijų serume, indukuotų skreplių supernatante bei BAL skystyje palyginimas pateiktas 6.2.4.1 lentelėje.

Serumo IL-5 koncentracija nerūkančiųjų, sergančių alergine astma grupėje buvo reikšmingai didesnė nei rūkorių, sergančių nealergine astma ir nerūkančiųjų, sergančių alergine astma ($p=0,001$ ir $p=0,041$ atitinkamai). Alerginė astma sergančių rūkorių serumo IL-5 koncentracija buvo didesnė nei rūkorių, sergančių nealergine astma serume ($p=0,039$).

Indukuotų skreplių IL-5 koncentracija nerūkančiųjų, sergančių alergine astma grupėje buvo reikšmingai didesnė nei nealerginė astma sergančių rūkorių bei nerūkančiųjų skrepliuose ($p=0,022$ ir $p=0,031$ atitinkamai). Nealerginė astma sergančių rūkorių skrepliuose nustatėme mažesnę IL-5 koncentraciją nei nerūkančiųjų, sergančių alergine astma ($p=0,028$).

6.2.4.1 lentelė. Serumo, indukuotų skreplių ir BAL skysčio IL-5 koncentracijų palyginimas sergant alergine ir nealergine astma.

Citokino koncentracija	Rūkoriai, sergantys alergine astma	Nerūkantieji, sergantys alergine astma	Rūkoriai, sergantys nealergine astma	Nerūkantieji, sergantys nealergine astma
Serumo IL-5 pg/ml	41,54±10,16#	55,78±9,47*	32,43±6,78	45,65±12,70
Indukuotų skreplių IL-5 pg/ml	45,32±5,65#	61,43±9,68*	38,21±3,78	55,33±9,89
BAL skysčio IL-5 pg/ml	50,11±10,72&	53,99±5,31&	38,48±0,72	43,13±8,38

Duomenys atspindi vidurkį± standartinę vidurkio paklaidą.

*p<0,05 palyginus su rūkoriais, sergančiais nealergine astma ir nerūkančiais, sergančiais nealergine astma;

#p<0,05 palyginus su rūkoriais, sergančiais nealergine astma;

&p<0,05 palyginus su rūkoriais, sergančiais nealergine astma.

BAL skysčio IL-5 koncentracija rūkorių, sergančių nealergine astma grupėje buvo mažesnė nei alergine astma sergančių rūkorių bei nerūkančiųjų (p=0,037 ir p=0,012 atitinkamai). Tačiau nealergine astma sergančių nerūkančiųjų pacientų BAL skysčio IL-5 koncentracija reikšmingai nesiskyrė nuo abiejų alergine astma sergančių pacientų grupių.

6.2.5 IL-5 koncentracijų ir indukuotų skreplių bei BAL skysčio eozinofilų kiekio sąsajos

IL-5 koncentracijų ir indukuotų skreplių bei BAL eozinofilų kiekio sąsajos pateiktos 6.2.5.1 lentelėje.

Serumo IL-5 koncentracijos reikšmingai siejosi su indukuotų skreplių bei BAL eozinofilų kiekiu rūkorių, sergančių alergine astma ir nerūkančiųjų, sergančių nealergine astma grupėse. Alergine astma sergančių nerūkančiųjų grupėje sąsajų tarp serumo IL-5 koncentracijos ir eozinofilų kiekio kvėpavimo takų sekrete nenustatėme. Rūkorių, sergančių nealergine astma serumo IL-5 turėjo reikšmingą ryšį tik su BAL skysčio eozinofilų kiekiu.

6.2.5.1 lentelė. IL-5 koncentracijų sąsajos su eozinofilų kiekiu indukuotuose skrepliuose bei bronchoalveoliniame lavaže.

Tiriamųjų grupės	Serumo IL-5	IS IL-5	BAL IL-5
Rūkoriai, sergantys alergine astma			
IS eozinofilai (proc.)	r=0,32 ;p=0,039	r=0,77 ;p=0,021	
BAL eozinofilai (proc.)	r=0,45 ;p=0,003		r=0,72 ;p=0,046
Nerūkantieji, sergantys alergine astma			
IS eozinofilai (proc.)	r=0,22 ;p=0,08	r=0,52 ;p=0,035	
BAL eozinofilai (proc.)	r=0,12 ;p=0,67		r=0,67 ;p=0,041
Rūkoriai, sergantys nealergine astma			
IS eozinofilai (proc.)	r=0,12 ;p=0,07	r=0,38 ;p=0,045	
BAL eozinofilai (proc.)	r=0,38 ;p=0,047		r=0,44 ;p=0,032
Nerūkantieji, sergantys nealergine astma			
IS eozinofilai (proc.)	r=0,32 ;p=0,032	r=0,45 ;p=0,001	
BAL eozinofilai (proc.)	r=0,4 ;p=0,041		r=0,47 ;p=0,037

r- Spearmano koreliacijos koeficientas, p- reikšmingumo lygmuo.

Indukuotų skreplių IL-5 koncentracijos reikšmingai siejosi su eozinofilų kiekiu indukuotuose skrepliuose visose sergančiųjų astma grupėse.

Visose keturiose tiriamųjų grupėse nustatėme reikšmingas BAL IL-5 koncentracijos ir BAL eozinofilų kiekio sąsajas.

6.2.6 Eotaksino-1, eotaksino-2 ir eotaksino-3 koncentracijų tyrimas kraujo serume, indukuotų skreplių supernatante bei BAL skystyje

Eotaksino-1, eotaksino-2 ir eotaksino-3 koncentracijų vidurkiai kraujo serume, skreplių supernatante bei BAL skystyje pateikti 6.2.6.1 lentelėje.

Kraujo serumo eotaksino-1 koncentracijos buvo reikšmingai didesnės visose astma sergančių pacientų grupėse nei „sveikų“ rūkatorių ar sveikų nerūkančiųjų kraujyje. Rūkatorių, sergančių alergine astma, nerūkančiųjų, sergančių alergine astma bei rūkatorių, sergančių nealergine astma serume buvo didesnės eotaksino-2 koncentracijos nei nerūkančiųjų, sergančių nealergine astma ir sveikų nerūkančiųjų. Eotaksino-3 koncentracijos kraujo serume tarp grupių nesiskyrė. Rūkatorių, sergančių alergine astma serumo eotaksino-1 koncentracija buvo didesnė nei nerūkančiųjų, tačiau skirtumas buvo nereikšmingas ($p=0,12$). Panašios tendencijos stebėtos ir nealergine astma sergančių pacientų grupėse, tačiau ir čia skirtumas tarp vidurkių buvo statistiškai nereikšmingas ($p=0,08$).

6.2.6.1 lentelė. Serumo, indukuotų skreplių bei BAL skysčio eotaksino-1, eotaksino-2 ir eotaksino-3 koncentracijų palyginimas.

Chemokinių koncentracijos kraujo serume	Rūkoriai, sergantys alergine astma	Nerūkantieji, sergantys alergine astma	Rūkoriai, sergantys nealergine astma	Nerūkantieji, sergantys nealergine astma	„Sveiki“ rūkoriai	Sveiki nerūkantieji
Serumas						
CCL11 pg/ml	254,6±40,8*	176,4±25,6*	231,5±39,2*	190,1±21,5*	82,6±11,3	48,6±15,0
CCL24 pg/ml	987,6±64,3#	879,3±70,5#	959,4±76,0#^	524,3±68,4	693,4±230,1	490,4±68,5
CCL26 pg/ml	69,2±24,3	38,39±21,6	67,2±15,7	54,4±18,8	52,1±29,8	28,9±8,9
Indukuotų skreplių supernatantas						
CCL11 pg/ml	297,6±42,3*	288±37,5*	203,4±10,0*#	140,2±9,5*	45,4±20,0	40,1±11,0
CCL24 pg/ml	119,9±30,5*&	89,78±28,4	118,0±46,3*#	80,1±24,7	21,2±11,2	39,3±12,2
CCL26 pg/ml	-	-	-	-	-	-
BAL skystis						
CCL11 pg/ml	62,3±12,4	59,1±15,4	51,4±11,7	50,1±12,4	24,3±12,7	29,0±13,3
CCL24 pg/ml	379,4±54,3*	240,2±60,7*	347,8±79,6*	243,9±59,7*	162,5±67,9	118,8±29,4
CCL26 pg/ml	45,8±7,3	43,44±8,9	40,5±7,8	39,9±6,1	46,3±20,5	33,2±9,2

Duomenys pateikti vidurkis±SEM.

* $p<0,05$ palyginus su „sveikais“ rūkoriais ir sveikais nerūkančiaisiais;

$p<0,05$ palyginus su nerūkančiaisiais, sergančiais nealergine astma;

^ $p<0,05$ palyginus su sveikais nerūkančiaisiais;

& $p<0,05$ palyginus su nerūkančiaisiais, sergančiais alergine astma;

Indukuotų skreplių eotaksino-1 koncentracijos buvo reikšmingai didesnės visose astma sergančių pacientų grupėse palyginus su sveikais asmenimis. Rūkorių sergančių alergine ir nealergine astma skreplių supernatante eotaksino-2 koncentracija buvo patikimai didesnė nei sveikų tiriamųjų. Nealergine astma sergančių rūkorių skrepliuose nustatytas didesnis eotaksino-1 kiekis nei nerūkančiųjų, sergančių nealergine astma. Tokie pat reikšmingi skirtumai stebėti ir tarp alergine astma sergančių rūkorių ir nerūkančiųjų. Indukuotų skreplių supernatanto eotaksino-3 koncentracijos didžiojoje dalyje mėginių buvo žemiau ribinės reikšmės.

Visų astma sergančių pacientų BAL skystyje nustatyta reikšmingai didesnė eotaksino-2 koncentracija palyginus su sveikais asmenimis. Kitų tirtų BAL chemokinių koncentracijos tarp grupių nesiskyrė.

6.2.7 Eotaksinų sąsajos su indukuotų skreplių ir BAL skysčio ląstelėmis, plaučių funkcija bei bronchų reaktyvumu

Alergine astma sergančių nerūkančiųjų grupėje nustatytos reikšmingos neigiamos sąsajos tarp BAL eotaksino-2 koncentracijos ir forsuoto iškvėpimo tūrio per pirmąją sekundę (6.2.7.1 lentelė) bei Genslerio indekso ($r=-0,75$; $p=0,037$). Kitų reikšmingų sąsajų tarp eotaksinų ir bronchų reaktyvumo nenustatėme.

Rūkorių, sergančių alergine astma grupėje nenustatėme reikšmingų sąsajų tarp forsuoto iškvėpimo tūrio per pirmąją sekundę, bronchų reaktyvumo (išreikšto PD_{20}) ir serumo, indukuotų skreplių bei BAL skysčio eotaksinų koncentracijų. Indukuotų skreplių eotaksinas-2 turėjo reikšmingą neigiamą ryšį su Genslerio indeksu ($r=-0,55$; $p=0,003$).

6.2.7.1 lentelė. Alergine bei nealergine astma sergančių rūkorių ir nerūkančiųjų serumo, indukuotų skreplių bei BAL eotaksinų (CCL11, CCL24, CCL26) sąsajos su FEV₁ bei PD₂₀.

Chemokinai	FEV ₁ (proc. b.d.)	PD ₂₀ (mg metacholino)	FEV ₁ (proc. b.d.)	PD ₂₀ (mg metacholino)
	Nerūkantieji, sergantys alergine astma		Rūkoriai, sergantys alergine astma	
Serume CCL11 pg/ml CCL24 pg/ml CCL26 pg/ml	r= -0,04;p=0,93 r=-0,35 ;p=0,4 r=-0,54 ;p=0,17	r= -0,37;p=0,47 r=-0,37 ;p=0,46 r= -0,23;p=0,66	r=-0,12 ;p=0,67 r= -0,31;p=0,87 r=-0,23 ;p=0,45	r=-0,17 ;p=0,47 r=-0,21 ;p=0,6 r= -0,1;p=0,87
IS supernatante CCL11 pg/ml CCL24 pg/ml	r=0,67 ;p=0,22 r=0,67 ;p=0,22	r=0,67 ;p=0,22 r=0,21 ;p=0,74	r=-0,22 ;p=0,45 r=-0,3 ;p=0,20	r=0,25 ;p=0,9 r=0,32 ;p=0,45
BAL skystyje CCL11 pg/ml CCL24 pg/ml CCL26 pg/ml	r=-0,21 ;p=0,74 r=-0,67 ;p=0,005 r=0,52 ;p=0,37	r=0,09 ;p=0,9 r=-0,8 ;p=0,22 r=0,78 ;p=0,23	r=-0,41 ;p=0,32 r=0,11 ;p=0,43 r=-0,12 ;p=0,55	r=-0,34 ;p=0,76 r=-0,3 ;p=0,54 r= -0,18;p=0,45
Rūkoriai, sergantys nealergine astma			Nerūkantieji, sergantys nealergine astma	
Serume CCL11 pg/ml CCL24 pg/ml CCL26 pg/ml	r= -0,78;p=0,016 r=-0,72 ;p=0,27 r=-0,75 ;p=0,025	r= 0,14;p=0,86 r=0,24 ;p=0,76 r= 0,1;p=0,9	r= 0,42;p=0,9 r=-0,12 ;p=0,73 r=-0,54 ;p=0,17	r= -0,25;p=0,45 r=-0,07 ;p=0,93 r= -0,23;p=0,66
IS supernatante CCL11 pg/ml CCL24 pg/ml	r=0,54 ;p=0,62 r=0,5 ;p=0,66	r=-0,56 ;p=0,62 r=-0,41 ;p=0,68	r=0,13 ;p=0,73 r=0,14 ;p=0,87	r=-0,11 ;p=0,82 r=-0,48 ;p=0,27
BAL skystyje CCL11 pg/ml CCL24 pg/ml CCL26 pg/ml	r=-0,36 ;p=0,76 r=-0,34 ;p=0,15 r=-0,32 ;p=0,18	r=0,19 ;p=0,15 r=0,57;p=0,24 r=-0,28 ;p=0,71	r=0,46 ;p=0,85 r=-0,19 ;p=0,64 r=0,68 ;p=0,08	r=-0,11 ;p=0,98 r=-0,47 ;p=0,34 r=0,59 ;p=0,22

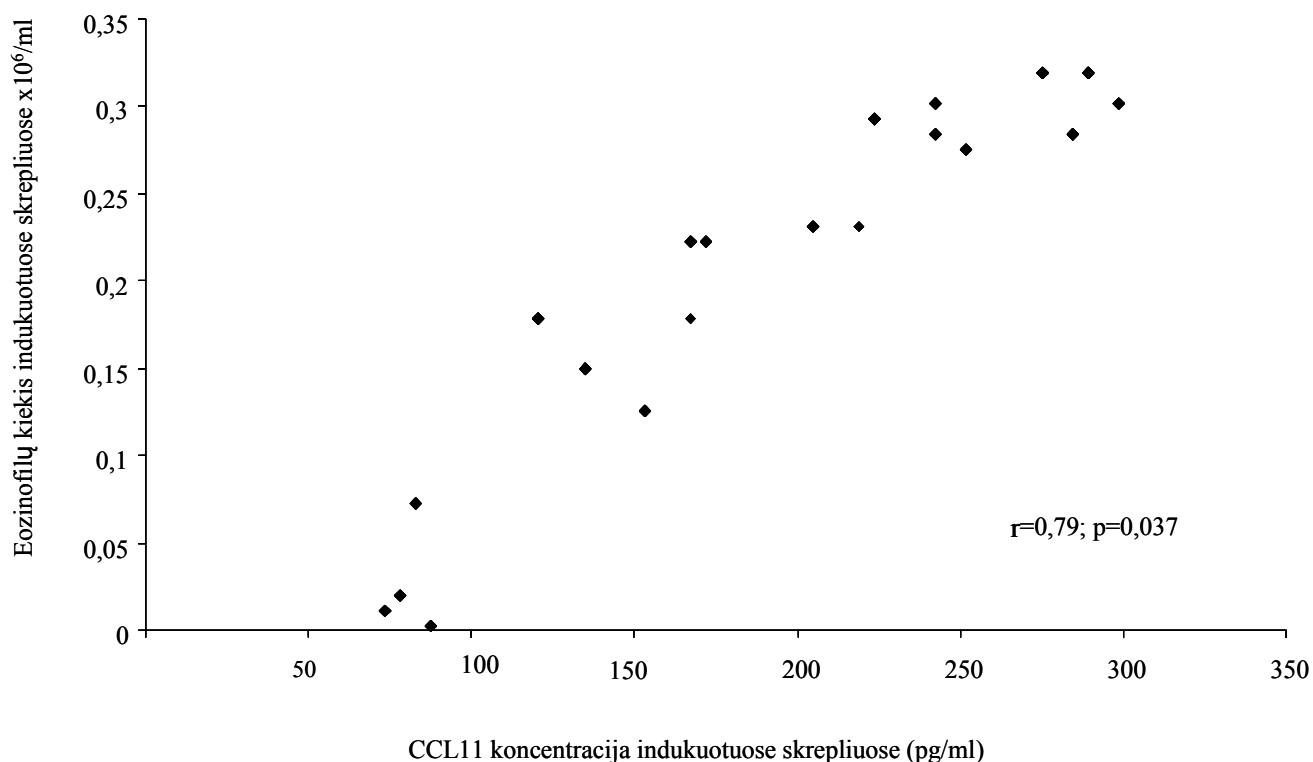
r- Spearmano koreliacijos koeficientas, p- reikšmingumo lygmuo; FEV₁- forsuoto iškvėpimo tūris per pirmąją sekundę; b.d.- būtinojo dydžio; PD₂₀- metacholino dozė, sumažinanti FEV₁ 20 proc.

Nealergine astma sergančių rūkorių grupėje nustatėme neigiamas serumo eotaksino-1, eotaksino-3 koncentracijų ir FEV₁ sąsajas (6.2.7.1 lentelė). Šių pacientų Genslerio indeksas neigiamai siejosi su indukuotų skreplių eotaksino-1 koncentracija (r=-0,45; p=0,025).

Nerūkančiųjų, sergančių nealergine astma BAL eotaksino-2 koncentracija neigiamai siejosi su Genslerio indeksu ($r=-0,45$; $p=0,047$). Kitų reikšmingų eotaksinų sąsajų su plaučių funkcijos rodikliais bei bronchų reaktyvumu šioje tiriamųjų grupėje nenustatėme.

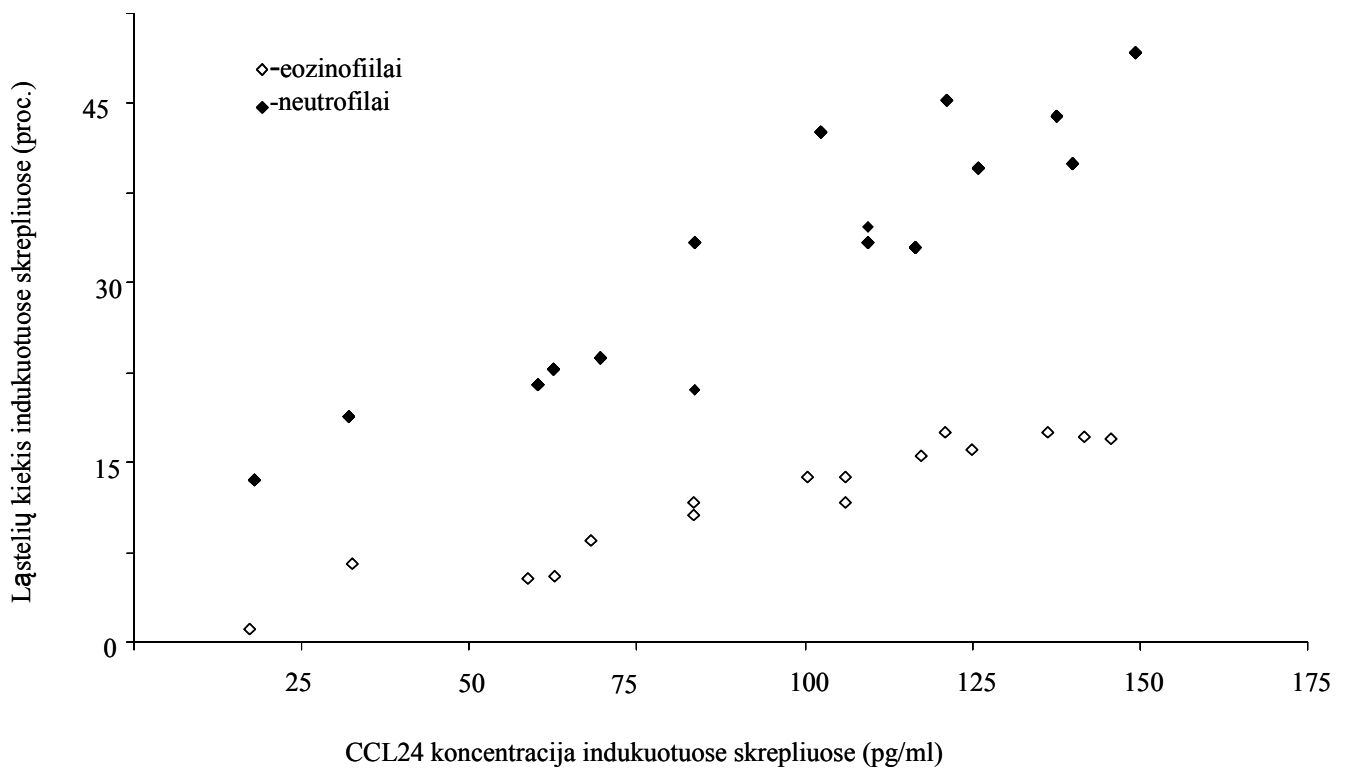
“Sveikų” rūkatorių bei sveikų nerūkančiųjų grupėse reikšmingų sąsajų tarp kraujo serumo, indukuotų skreplių supernatanto bei BAL skysčio chemokinių (CCL11, CCL24, CCL26) ir plaučių funkcijos rodiklių nenustatėme.

Nerūkančiųjų, sergančių alergine astma pacientų skreplių eotaksino-1 koncentracija reikšmingai siejosi su eozinofilų kiekiu indukuotuose skrepliuose (26 pav.). Šioje grupėje kitų sąsajų tarp uždegimo ląstelių ir chemokinių nenustatėme.



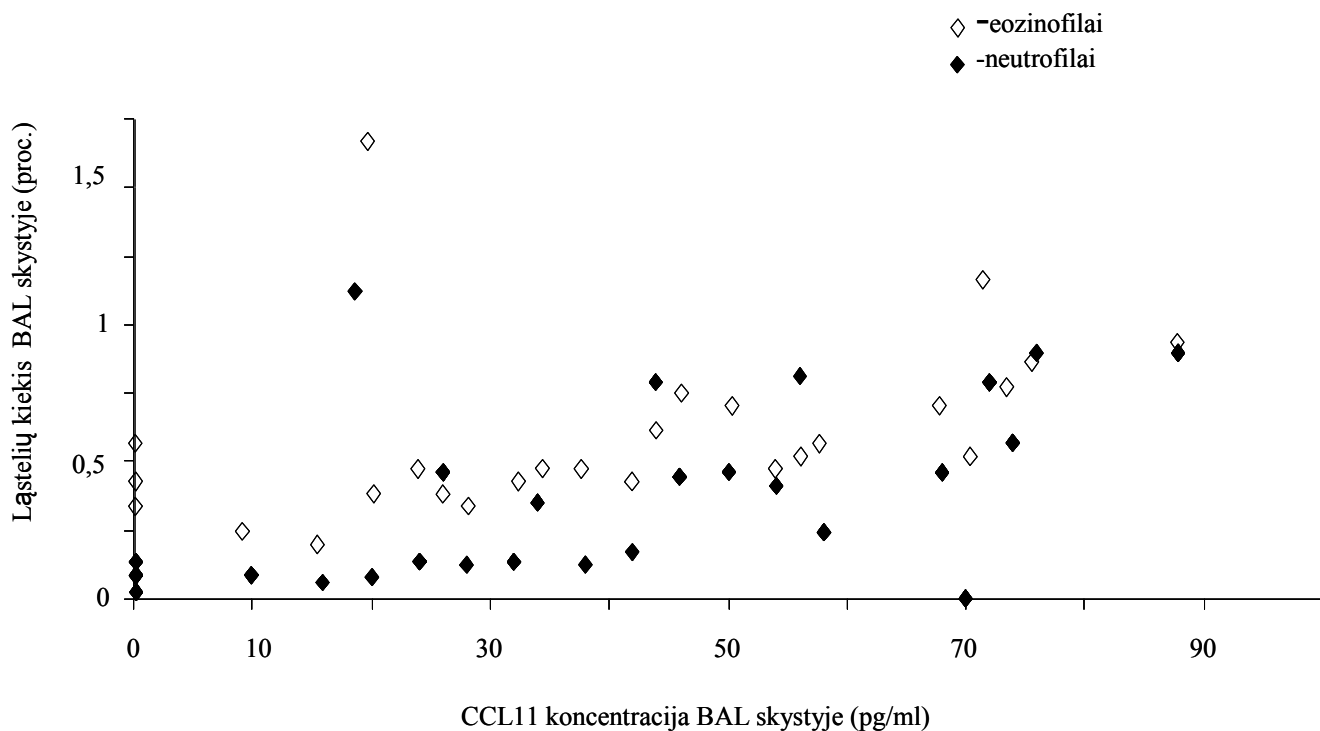
26 pav. Nerūkančiųjų, sergančių alergine astma indukuotų skreplių CCL11 koncentracijos sąsaja su eozinofilų kiekiu ($\times 10^6$ /ml) indukuotuose skrepliuose. r- Spearmano koreliacijos koeficientas; p- reikšmingumo lygmuo.

Alergine astma sergančių rūkatorių grupėje eotaksino-2 koncentracija reikšmingai siejosi su santykinu eozinofilų bei neutrofilų kiekiu indukuotuose skrepliuose (27 pav.). Šioje tiriamųjų grupėje kitų eotaksinų ir BAL skysčio bei indukuotų skreplių ląstelių sąsajų nenustatėme.



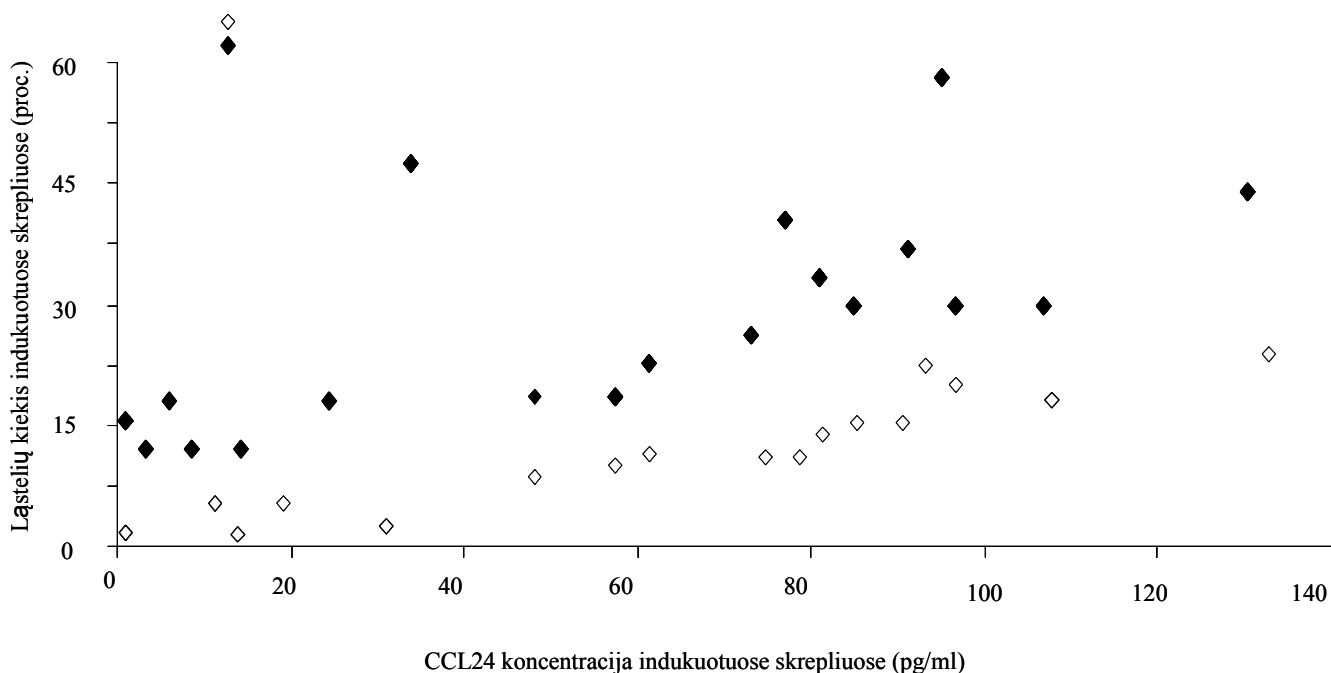
27 pav. Rūkorių, sergančių alergine astma indukuotų skreplių CCL24 koncentracijos sąsajos su eozinofilų ($r=0,62$; $p=0,043$) ir neutrofilų ($r=0,78$; $p=0,013$) kiekiu indukuotuose skrepliuose.
 r- Spearmano koreliacijos koeficientas; p- reikšmingumo lygmuo.

Nerūkančiųjų, sergančių nealergine astma pacientų BAL eotaksino-1 koncentracija turėjo reikšmingas sąsajas su santykinu eozinofilų nei neutrofilų kiekiu BAL skystyje (28 pav.)



28 pav. Nerūkančiųjų, sergančių nealergine astma BAL skysčio CCL11 koncentracijos sąsajos su eozinofilų ($r=0,737;p=0,001$) ir neutrofilų ($r=0,514;p=0,014$) kiekiu BAL skystyje. r -Spearmano koreliacijos koeficientas, p - reikšmingumo lygmuo.

Rūkorių, sergančių nealergine astma eotaksino-2 koncentracija turėjo patikimas sąsajas su santykinu eozinofilų bei neutrofilų skaičiumi indukuotuose skrepliuose (29 pav.).



29 pav. Rūkorių, sergančių nealergine astma indukuotų skreplių supernatanto CCL24 koncentracijos sąsajos su eozinofilų ($r=0,75;p=0,045$) ir neutrofilų ($r=0,58;p=0,043$) kiekiu indukuotuose skrepliuose. r- Spearmano koreliacijos koeficientas; p- reikšmingumo lygmuo.

Sveikų asmenų grupėse reikšmingų sąsajų tarp eotaksinų ir indukuotų skreplių bei BAL skysčio ląstelių nenustatėme.

6.2.8 Astmai būdingo lėtinio kvėpavimo takų uždegimo žymenų sąsajos su pacientų rūkymo įpročiais

Ištyrę alergine ir nealergine astma sergančių rūkorių kvėpavimo takų sekreto ląstelių sudėtį reikšmingų sąsajų tarp pacientų rūkymo trukmės (pakmečiais) ir indukuotų skreplių ar BAL skysčio ląstelių kiekio nenustatėme.

Eotaksinų ir IL-5 sąsajos su rūkymo trukme (pakmečiais) pateikiamos 6.2.8.1 lentelėje.

Abejose astma sergančių rūkorių grupėse nustatėme reikšmingas neigiamas pakmečių sąsajas su IL-5 koncentracija kraujo serume bei indukuotuose skrepliuose.

Rūkorių, sergančių alergine astma serumo ir skreplių eotaksino-2 koncentracijos patikimai siejosi su pacientų rūkymo trukme (pakmečiais).

Nealergine astma sergančių rūkorių grupėje nustatėme palmečių sąsajas su eotaksino-2 koncentracija indukuotuose skrepliuose.

6.2.8.1 lentelė. Eotaksinų ir IL-5 koncentracijų sąsajos su rūkymo trukme (pakmečiais) sergant alergine ir nealergine astma.

Eotaksinai IL-5	Rūkoriai, sergantys alergine astma Pakmečiai	Rūkoriai, sergantys nealergine astma Pakmečiai
	Serume	
CCL11 pg/ml	r= 0,18;p=0, 16	r= 0,22;p=0,87
CCL24 pg/ml	r=0,52 ;p=0,017	r=0,12 ;p=0,73
CCL26 pg/ml	r=0,36 ;p=0,85	r=0,31 ;p=0,19
IL-5 pg/ml	r=-0,35 ;p=0,037	r=-0,61 ;p=0,041
IS supernatante		
CCL11 pg/ml	r=0,44 ;p=0,12	r=0,33 ;p=0,12
CCL24 pg/ml	r=0,45 ;p=0,035	r=0,64 ;p=0,021
IL-5 pg/ml	r=-0,55 ;p=0,012	r=-0,45 ;p=0,001
BAL skystyje		
CCL11 pg/ml	r=0,20 ;p=0,16	r=0,26 ;p=0,13
CCL24 pg/ml	r=0,24 ;p=0,55	r=0,19 ;p=0,42
CCL26 pg/ml	r=0,12 ;p=0,22	r=0,18 ;p=0,23
IL-5 pg/ml	r=-0,15 ;p=0,22	r=-0,25 ;p=0,45

r- Spearmano koreliacijos koeficientas, p- reikšmingumo lygmuo.

7. REZULTATŲ APTARIMAS

7.1 Alerginės ir nealerginės astmos patomorfologiniai ypatumai

Tyrimo metu įvertinome alergine ir nealergine astma sergančių pacientų indukuotų skreplių ląstelių sudėtį, atspindinčią lėtinį neinfekcinį kvėpavimo takų uždegimą. Mūsų atlikto tyrimo duomenys rodo, kad patomorfologiškai astma nėra vienalytė liga, t.y. alerginė ir nealerginė astma tarpusavyje skiriasi persistuojančio uždegimo pobūdžiu.

Modeliuojant tyrimo eigą atkreipėme dėmesį į tai, kad iki devinto dešimtmečio atliktuose tyrimuose uždegimo mechanizmai astma sergantiems pacientams dažniausiai buvo tiriami naudojant invazinius tyrimo metodus- bronchoskopiją, bronchų gleivinės biopsiją ar bronchoalveolinį lavažą, todėl tai apribodavo galimybę ištirti vyresnius ir sunkesne astma sergančius pacientus. Šiame tyrime mes naudojome neinvazinio tyrimo- skreplių indukcijos metodą, kuris leido tirti vyresnio amžiaus pacientus. Įvertinę skreplių indukcijos eigą tyrimo metu, hipertominio NaCl tirpalo poveikį kvėpavimo funkcijai (FEV_1) ir gautų mėginių kokybę bei gautus duomenis palyginę su pasaulyje atliktų analogiškų tyrimų rezultatais [214, 215], galime teigti, kad indukuotų skreplių tyrimas yra saugus ir efektyvus vertinant astma sergančių pacientų uždegiminiuosius pokyčius kvėpavimo takuose nepriklausomai nuo tiriamųjų amžiaus.

Įvertinę alergine ir nealergine astma sergančių pacientų indukuotų skreplių ląstelių sudėtį, atspindinčią lėtinį neinfekcinį kvėpavimo takų uždegimą pastebėjome reikšmingus šių ligų patomorfologinius skirtumus. Nustatytas didesnis bendras ląstelių skaičius nealergine astma sergančiųjų indukuotuose skrepliuose leidžia manyti, kad šių tiriamųjų kvėpavimo takuose vyksta aktyvesnis lėtinis neinfekcinis uždegimas nei sergant alergine astma. Nors abiejų grupių tiriamųjų skrepliuose vyravo neutrofilai, tačiau nealergine astma sergančiųjų skrepliuose šių granulocitų buvo reikšmingai daugiau nei sergančiųjų alergine astma. Tyrimo rezultatai paneigia ilgą laiką medicinoje vyravusią nuostatą, kad astmai būdingas lėtinis neinfekcinis eozinofilų sukeltas kvėpavimo takų uždegimas [216, 217]. Daugelyje atliktų tyrimų eozinofilai sieti su astmos klinikiniu pasireiškimu [218], ligos paūmėjimais [219], padidėjusio bronchų reaktyvumo vystimusi ar negrįžtamais pakitimais (remodeliacija) plaučiuose [220]. Eozinofilų reikšme astmos patogenezėje suabejojo S.E.Wenzelis su bendraautoriais, 1997 metais paskelbęs savo tyrimų duomenis, rodančius, kad sunkia astma sergančių pacientų bronchų sekrete vyrauja ne eozinofilai, bet neutrofilai [221]. Šie rezultatai sukėlė daug mokslinių diskusijų, paskatino naujų tyrimų vystymą. Buvo įrodyta, kad neutrofilų kiekis bronchų sekrete didėja astmos paūmėjimo metu [222], bei esant sunkios eigos ligai [223]. Šie duomenys nesutampa su mūsų tyrimo rezultatais, gautais ištyrus stabilia lengva astma sergančius pacientus. Manome, kad svarbiausios šių nesutapimų

priežastys – skirtingi tiriamųjų atrankos kriterijai. Aukščiau aprašytų mokslinių tyrinėjimų autoriai neskirstė tiriamųjų pagal astmos klinikinį fenotipą, neatsižvelgė į jų įsijautrinimą aplinkos alergenams, nevertino galimos pacientų amžiau įtakos lėtinio neinfekcinio kvėpavimo takų uždegimo ypatumams. Šie svarbūs veiksniai įtakojo nepakankamai tikslų ir išsamų kvėpavimo takų sekreto ląstelių sudėties ištyrimą. Mūsų tyrime dalyvavę pacientai buvo vyresnio amžiaus, o tai galėjo įtakoti neutrofilų kiekio padidėjimą skrepliuose palyginus su kitų mokslininkų atliktais jaunesnių pacientų tyrimais [224]. Ne mažiau svarbus tiriamųjų suskirstymas pagal klinikinį astmos fenotipą, atskleidęs reikšmingą neutrofilinių granulocitų padidėjimą nealerginės ligos metu. Panašių išvadų priėjo ir Gibsono vadovaujami mokslininkai, pastebėję, kad ir lengvos eigos astmos metu indukuotuose skrepliuose gali vyrėti neutrofilai [225]. Tačiau kritikai skeptiškai vertino šių mokslininkų duomenų patikimumą, atkreipdami dėmesį į tai, kad tyrime dalyvavę astma sergantys pacientai buvo gydyti inhaliuojamais gliukokortikosteroidais, kurie, sumažindami neutrofilų apoptozę, galėjo netiesiogiai padidinti jų skaičių kvėpavimo takuose. O eksperimento autoriai negalėjo atmesti hipotezės, kad jų tiriamųjų bronchų sekrete rasta neutrofilija gali būti skirto gydymo pasekmė. Tuo tarpu mūsų tyrime pacientai nebuvo gydyti nei vietinio, nei sisteminio poveikio gliukokortikosteroidais, todėl šie vaistai negalėjo įtakoti indukuotų skreplių ląstelių sudėties.

Kaip ir tikėjomės, alergine astma sergančių pacientų indukuotuose skrepliuose buvo daugiau eozinofilų nei sergančiųjų nealergine astma. Tačiau limfocitų pagausėjimas nealergine ligos forma sergančiųjų skrepliuose buvo kiek netikėtas. Žinoma, kad Th2 tipo limfocitai- vieni svarbiausių ląstelių astmos patogenezėje. Jie gamina eilę citokinų bei chemokinių, dalyvaujančių lėtinio neinfekcinio uždegimo kvėpavimo takuose vystimesi. O Th1 tipo limfocitai, jų išskiriami mediatoriai ilgą laiką laikyti svarbiausiais alerginį uždegimą slopinančiais veiksniais [226]. Tačiau 2006 metais Belgijos mokslininkų atliktas tyrimas parodė, kad Th2 limfocitų citokinai svarbūs sergant tiek alergine, tiek nealergine astma, o štai Th1 limfocitų citokinas IFN γ , kuris anksčiau laikytas alerginį uždegimą slopinančiu baltymu, gausiau gaminamas sergančiųjų nealergine astma kvėpavimo takuose ir yra reikšmingai susijęs su sunkesne ligos eiga [227]. Taigi šie duomenys rodo, kad nealerginės astmos metu limfocitų kiekis gali būti padidėjęs Th1 tipo ląstelių sąskaita. Norėdami įsitikinti, ar sergant nealergine astma sumažėja Th2 limfocitų kiekis bei aktyvumas, įvertinome vieno svarbiausių šių ląstelių citokino- IL-9- raišką bei koncentraciją indukuotuose skrepliuose. Tyrimo metu nustatėme reikšmingai didesnę IL-9 koncentraciją sergančiųjų alergine astma kraujo serume ir skrepliuose. Taip pat šių tiriamųjų skrepliuose buvo daugiau IL-9 gaminančių ląstelių palyginus su sergančiais nealergine astma. Šie rezultatai patvirtino mūsų hipotezę, kad nealerginės astmos metu mažėja Th2 limfocitų aktyvumas ir galbūt skaičius.

Nustatę reikšmingus alerginės ir nealerginės astmos patomorfologinius skirtumus, siekėme įvertinti jų sąsajas su svarbiausiu patofiziologiniu šios ligos pasireiškimu- padidėjusiu bronchų reaktyvumu. Ilgą laiką astmos sunkumas, klinikinis pasireiškimas ir bronchų reaktyvumo vystimasis sietas su lėtiniu eozinofiliniu kvėpavimo takų uždegimu [228]. Sėkmingi eksperimentiniai tyrimai, parodę antikūnų prieš IL-5 efektą mažinant bronchų hiperreaktyvumą tik patvirtino neabejotiną eozinofilų reikšmę astmos patofiziologiniams procesams [229]. Imti kurti vaistai, blokuojantys IL-5, kurie, kaip tikėtasi, turėjo padaryti perversmą astmos gydyme. Tačiau viltys žlugo atlikus klinikinius tyrimus. Paaiškėjo, kad antikūnai prieš IL-5 žmogaus organizme sumažina eozinofilų kiekį audiniuose, tačiau neįtakoja padidėjusio bronchų reaktyvumo [230]. Tai buvo svarus argumentas abejoti, ar iš tiesų eozinofilai svarbūs kvėpavimo takų reaktyvumo išsivystymui. Iki šiol atliktų gausių klinikinių bei eksperimentinių tyrimų autoriai negali vienareikšmiai atsakyti, kas lemia bronchų hiperreaktyvumą astmos metu [231, 232]. Mūsų tyrimo metu nustatėme, kad alerginės ir nealerginės astmos atvejais skirtingi patomorfologiniai kvėpavimo takų pokyčiai nevienodai įtakoja padidėjusį bronchų reaktyvumą. Pastebėjome, kad sergant alergine astma indukuotų skreplių eozinofilai bei IL-9 reikšmingai siejasi su bronchų hiperreaktyvumu. Šie duomenys sutapo su Louis ir bendraautorių paskelbtomis tyrimo išvadomis, įrodančiomis patikimą ryšį tarp padidėjusio kvėpavimo takų reaktyvumo ir eozinofilų kiekio sergant alergine astma [233]. Eksperimentinių tyrimų su pelėmis, neturinčiomis IL-9 geno metu ROC kreivių pagalba įsitikinome, kad eozinofilų kiekis bei IL-9 koncentracija indukuotuose skrepliuose- specifiški ir jautrūs žymenys, prognozuojantys III^o padidėjusio bronchų reaktyvumo vystimąsi. Pastebėjome, kad IL-9 koncentracija kraujo serume, nors ir turi sąsają su PD₂₀, tačiau yra nereikšmingas žymuo prognozuojant didelio laipsnio bronchų reaktyvumo išsivystymą.

Skirtingai nei alergine astma sergančiųjų grupėje, nealergine astma sergančių pacientų bronchų reaktyvumas (PD₂₀) siejosi ne su eozinofilų, bet su limfocitų kiekiu indukuotuose skrepliuose. ROC kreivės parodė, kad skreplių limfocitai- specifiškas žymuo prognozuojant III^o bronchų reaktyvumo vystimąsi nealerginės astmos metu. Kokio tipo limfocitai lemia svarbius patofiziologinius pakitimus kvėpavimo takuose kol kas nėra aišku. Žinome, kad Th2 tipo ląstelės koordinuoja patologinius mechanizmus vykstančius lėtinio alerginio uždegimo metu. Jų aktyvumą netiesiogiai atspindi gaminamos biologiškai aktyvios medžiagos, tokios kaip IL-9. Mūsų nustatytos reikšmingos sąsajos tarp PD₂₀ ir indukuotų skreplių IL-9 koncentracijos patvirtina, kad II tipo T limfocitai pagalbininkai svarbūs bronchų hiperreaktyvumo išsivystymui sergant alergine astma. Tačiau nealergine astma sergančiųjų grupėje tokių sąsajų nebuvo, todėl galime manyti, kad Th2 limfocitai nėra labai reikšmingi kvėpavimo takų reaktyvumo patogenezėje nealerginės astmos metu. Pastarųjų metų tyrimai su gyvūnais atskleidė sąsajas tarp kvėpavimo takų reaktyvumo ir 1 tipo T limfocitų pagalbininkų [234]. Įrodyta, kad eksperimentinės nealerginės astmos metu, stimuliuojant

genetiškai modifikuotas peles bakterijų lipopolisacharidu bei IL-18, Th1 tipo limfocitai sukelia neutrofilų susikaupimą kvėpavimo takuose, bronchų fibrozę bei hiperreaktyvumą [235]. Mūsų tirtų nealergine astma sergančių pacientų duomenys taip pat parodė padidėjusį neutrofilų kiekį indukuotuose skrepliuose, o tai sustiprina mūsų hipotezę, kad I tipo T limfocitai svarbūs padidėjusio bronchų reaktyvumo vystymuisi sergant nealergine astma.

7.2 Rūkymo sąlygoti eotaksino-1, eotaksino-2, eotaksino-3 koncentracijos skirtumai sergant alergine ir nealergine astma

Šio tyrimo metu parodėme, kad rūkorių sergančių alergine astma skrepliuose yra didesnis eotaksino-2 kiekis nei nerūkančiųjų. Taip pat ir nealergine astma sergantiems rūkoriais būdingos padidėjusios serumo eotaksino-2 bei indukuotų skreplių eotaksino-1 ir eotaksino-2 koncentracijos, palyginus su nerūkančiaisiais, nealergine astma sergančiais pacientais.

Pradėdami tyrimą mes iškėlėme hipotezę, kad rūkymas gali turėti įtakos lėtiniam neinfekciniam kvėpavimo takų uždegimui, šį uždegimą sukeliančių ląstelių susikaupimui plaučių audinyje bei chemokinių gamybai. Be to norėjome įsitikinti, ar rūkymas vienodai veikia fenotipiškai skirtingas ligos formas. Šios hipotezės patvirtinimui ar atmetimui ištyrėme pacientus, suskirstytus į grupes pagal astmos klinikinį fenotipą bei rūkymo įpročius. Gautus duomenis lyginome su kontroline sveikų asmenų grupe. Tyrimo metu dėmesį sutelkėme į uždegimo ląstelių pokyčių kvėpavimo takuose vertinimą bei eozinofilams specifinių chemokinių (CCL11, CCL24, CCL26) koncentracijų nustatymą. Norėdami tiksliau įvertinti vietinių bei sisteminių imuninių žymenų (chemokinių, eotaksinų) skirtumus tarp tiriamų grupių, naudojome skirtingus organizmo skysčius: kraujo serumą, indukuotų skreplių supernatantą bei BAL skystį. Kartu vertintas ir uždegimo proksimaliniuose bei distaliniuose kvėpavimo takuose pobūdis, nustatant indukuotų skreplių bei BAL skysčio ląstelių sudėtį [236]. Šio tyrimo metu norėjome tiksliau įvertinti pokyčius, vykstančius kvėpavimo takuose, todėl greta neinvazinio tyrimo metodo- skreplių indukcijos, naudojome ir bronchoskopijos pagalba atliktą bronchoalveolinį lavažą. Nustatyta, kad indukuotų skreplių ląstelės bei uždegime dalyvaujantys baltymai atspindi patomorfologinius stambiųjų kvėpavimo takų mechanizmus [237], tačiau astmos metu pažeidžiami ir smulkieji bronchai. Be to seilių bei gleivių priemaišos skrepliuose gali iškreipti ar sumažinti tyrimo duomenų tikslumą [238]. Todėl bronchoskopija ir bronchoalveolinis lavažas vis dar naudojami moksliniuose tyrimuose kaip

svarbūs ir informatyvūs tyrimai, įvertinantys uždegimo sukeltus pokyčius distaliniuose kvėpavimo takuose.

Tyrimo metu parodėme, kad eozinofilas- dominuojanti ląstelė sergančiųjų astma kvėpavimo takuose, nepriklausomai nuo pacientų rūkymo įpročių. Tačiau palyginus tarpusavyje rūkorus ir nerūkančius astma sergančius pacientus pastebėjome, kad skreplių bei BAL skystyje esantis eozinofilų kiekis reikšmingai mažesnis rūkorių grupėse. Kaip jau buvo minėta [239], astma apibūdinama kaip lėtinio neinfekcinio uždegimo sukelta liga, kurios patogenezėje vieną svarbiausių vaidmenų vaidina eozinofilai. Tačiau ši nusistovėjusi supratimą apie tik astmai būdingą eozinofilinio uždegimo egzistavimą paneigia moksliniai tyrimai, rodantys, kad aplinkos veiksniai (tokie kaip rūkymas, oro tarša) gali neatpažįstamai pakeisti bronchų gleivinėje vykstančius patologinius procesus. Pastebėta, kad rūkymo sukeltas neutrofilų susikaupimas kvėpavimo takuose lemia sunkesnę klinikinę astmos eigą bei blogą atsaką į skiriamą gydymą inhaliuojamaisiais gliukokortikosteroidais [240, 241]. Mūsų tyrimo duomenys patvirtino, kad astma sergančių rūkorių kvėpavimo takų sekrete yra padidėjęs neutrofilų kiekis palyginus su nerūkančiais. Įvertinę šiuos rezultatus galime teigti, kad neutrofilų susikaupimą bronchuose sukelia visa kaskada patologinių procesų, kuriems pradžia duoda įvairūs veiksniai, taip pat ir tabako dūmai. Įdomu tai, kad neutrofilų kiekio padidėjimą indukuotuose skrepliuose nustatėme tik alergine astma sergantiems rūkoriams. Tai patvirtina mūsų keltą hipotezę, kad rūkymas nevienodai veikia kvėpavimo takų uždegimą pacientams, sergantiems fenotipiškai skirtingomis astmos formomis. Tikslūs šio poveikio mechanizmai nėra aiškūs, tačiau galima manyti, kad dėl chemokinių, citokinių ir uždegimo ląstelių aktyvinimo, rūkorių bronchuose stebimi skirtingi patomorfologiniai pokyčiai palyginus su nerūkančiais pacientais [242]. Rūkorių, sergančių tiek alergine tiek ir nealergine astma BAL skystyje nustatytas padidėjęs makrofagų kiekis kelia nerimą. Eksperimentinių tyrimų metu nustatyta, kad rūkymas aktyvuoja alveolinius makrofagus ir skatina juos gaminti proteolitinius baltymus. Tokiu būdu plaučių audinyje vystosi negrįžtami pakitimai- emfizema. Nors nė vienam iš mūsų tyrime dalyvavusių pacientų klinikinių bei radiologinių plaučių emfizemos požymių nebuvo, tačiau nustatytas padidėjęs makrofagų kiekis BAL skystyje gali tapti svariu argumentu skatinant pacientus atsisakyti rūkymo.

Įvertinę eotaksinų koncentracijas kvėpavimo takų sekrete, kiek netikėtai pastebėjome, kad rūkorių serume ir indukuotų skreplių supernatante buvo didesnė eotaksino-2 ir eotaksino-1 koncentracija nei nerūkančiųjų, astma sergančių pacientų. Tai prieštarauja kai kurių autorių paskelbtiems tyrimų rezultatams. Štai Oltmanns su bendraautoriais, atlikęs eksperimentinį tyrimą su kvėpavimo takų lygiaisiais raumenimis, nustatė, kad rūkymas slopina eotaksino gamybą lygiuosiuose raumenyse [243]. Kito eksperimento metu pastebėta, kad pakartotinai veikiant jūros

kiaulytes tabako dūmais, reikšmingai sumažėja eotaksino koncentracija gyvūnų bronchoalveoliniame lavaže bei kraujo serume [244]. Tačiau priešingai šių tyrimų duomenims, Yamamoto su bendraautorais pastebėjo padidėjusią eotaksino koncentraciją sveikų rūkorių ir astma sergančių pacientų serume bei skrepliuose, palyginus su nerūkančiais, sveikais asmenimis [245]. Mes taip pat kaip ir šio tyrimo autoriai nustatėme padidėjusią eotaksino-1 koncentraciją rūkorių, sergančių nealergine astma skrepliuose. Šį kiekio didėjimą galima būtų paaiškinti rūkymo sąlygota spartesne IL-4 raiška, skatinančia eotaksino-1 ir eotaksino-2 gamybą bronchų epitelio cituose [246]. Be to, rūkymas, pažeisdamas bronchų epitelio ląstelių diferenciaciją, skatina eotaksino-2 ir eotaksino-3 išsiskyrimą [247]. Taip pat eksperimentinių tyrimų metu buvo nustatytas neigiamas sinergistinis alergenų bei rūkymo poveikis kvėpavimo takų gleivinei. Pastebėta, kad veikiant peles OVA bei tabako ekstraktu, gyvūnų kvėpavimo takuose sustiprėja alerginis uždegimas bei aktyvinami remodeliacijos procesai [248]. Tabako dūmų paveiktų pelių bronchų epitelyje sustiprėja eotaksino-1 gamyba, skatinanti eozinofilų susikaupimą bronchų gleivinėje ir pogleivyje [249]. Todėl galima būtų manyti, kad rūkymas sukelia ryškesnius ir negrįžtamus pokyčius pacientams sergantiems alergine astma, o nealerginės astmos atveju šis poveikis būna silpnesnis. Peržvelgus mūsų tirtų pacientų duomenis taip pat pastebėjome, kad rūkorių, sergančių alergine astma skrepliuose buvo daugiau neutrofilų, eozinofilų ir makrofagų, nei nealergine astma sergančių rūkorių. Panašios tendencijos stebėtos ir BAL skystyje. Taip pat kraujo serume ir skrepliuose eotaksino-1 koncentracija buvo nors ir statistiškai nepatikimai, bet didesnė alergine astma sergančiųjų grupėje nei rūkorių, sergančių nealergine astma. Pagal šiuos kriterijus galėtume patvirtinti anksčiau aprašyto eksperimentinio tyrimo rezultatus, teigiančius, kad rūkymas ir atopija-derinys, sukeliantis aktyvesnę astmai būdingą lėtinį kvėpavimo takų uždegimą.

Ne mažiau įdomu tai, kad tyrimo eigoje stebėjome reikšmingas sąsajas tarp eotaksinų ir neutrofilų. Nustatyti ryšiai tarp eozinofilų ir chemokinių nenustebino- juk eotaksinai yra specifiniai šių granulocitų chemotaksio veiksniai. Tačiau ar gali eotaksinai įtakoti neutrofilų kiekį kvėpavimo takuose? Mums žinomi du iki šiol atlikti tyrimai, atskleidę ryšį tarp eotaksinų ir neutrofilų. Menies-Gow su bendraautorais pastebėjo, kad suleidus eotaksino-1 ir eotaksino-2 į sveikų žmonių odą, poodyje susikaupia ne tik eozinofilai, bet ir neutrofilai [250]. Kito tyrimo metu pacientams buvo duota įkvėpti eotaksino, o jo poveikis vertintas ištyrus indukuotų skreplių ląstelių sudėtį [251]. Šio eksperimento autoriai taip pat nustatė eotaksino sukeltą neutrofilų kiekio padidėjimą skrepliuose. Šie tyrimų rezultatai atskleidžia eotaksinų svarbą pritraukiant į uždegimo židinių įvairias ląsteles (tokias kaip eozinofilus, neutrofilus). Tačiau tikslus mechanizmas, kaip vyksta neutrofilų judėjimas veikiant eotaksinams dar nėra žinomas. Šių ląstelių susikaupimą gali lemti tiesioginis chemotaktinis

signalas, ar neutrofilams specifinių chemotaksio veiksnių, išsiskyrusių eotaksinų sukeltos putliųjų ląstelių degranuliacijos pasekoje, veikimas.

Taigi, šie duomenys rodo, kad rūkymas skatina eotaksinų išsiskyrimą kvėpavimo takuose. Nustatę reikšmingas eotaksinų ir kvėpavimo takų sekreto eozinofilų sąsajas galėjome tikėtis rasti didesnį eozinofilų skaičių astma sergančių rūkatorių skrepliuose bei BAL skystyje. Tačiau palyginus su nerūkančiais, astma sergančiais pacientais, rūkatorių kvėpavimo takų sekrete eozinofilijos nebuvo. Norėdami rasti atsakymą, kodėl nesiskyrė rūkatorių ir nerūkančiųjų skreplių bei BAL skysčio eozinofilų kiekis, nusprendėme įvertinti eozinofilų brendimui svarbaus citokino IL-5 koncentraciją kraujo serume, indukuotų skreplių supernatante ir BAL skystyje.

7.3 Rūkymo sąlygoti IL-5 koncentracijos skirtumai sergant alergine ir nealergine astma

Atlikto tyrimo rezultatai parodė, kad rūkymas susijęs su IL-5 koncentracijos bei skreplių ir BAL ląstelių sudėties skirtumais sergant alergine ir nealergine astma. Mūsų žiniomis, tai pirmas tyrimas, įvertinęs rūkymo sąsajas su IL-5 koncentracijos pokyčiais sergant alergine ir nealergine astma.

IL-5- svarbus citokinas, koordinuojantis ir skatinantis eozinofilų brendimą, chemotaksį, aktyvumą bei slopinantis jų apoptozę [252]. IL-5, sinergistiškai veikdamas su eotaksinais, lemia eozinofilų sukulto uždegimo išsivystymą [253]. Eksperimentiniai tyrimai su OVA įjautrintomis BALB/c pelėmis parodė padidėjusią IL-5 gamybą, paveikus gyvūnus tabako dūmais [254]. Įvertinę IL-5 svarbų vaidmenį eozinofilijos atsiradimui, mes iškėlėme hipotezę, kad tabakas, slopindamas šio citokino sintezę, slopina eozinofilų gamybą ir susikaupimą kvėpavimo takuose. Ištyrus rūkorius ir nerūkančiuosius astma sergančius pacientus paaiškėjo, kad abejose rūkatorių grupėse buvo reikšmingai mažesnė serumo ir skreplių IL-5 koncentracija palyginus su nerūkančiais pacientais ar sveikais asmenimis. Peržvelgus mokslinius tyrimus, vertinusius rūkymo sukeltus pokyčius kvėpavimo takuose, pastebėjome, kad publikuoti duomenys labai skirtingi. Kanados mokslininkai, ištyrę IL-5 raišką bronchų biopsinėje medžiagoje, nenustatė reikšmingų skirtumų tarp nerūkančiųjų ir rūkančių astma sergančių pacientų [255]. Tačiau tais pačiais metais paskelbto eksperimentinio tyrimo duomenys parodė priešingai, kad tabakas, slopindamas T limfocitus, sumažina IL-5 gamybą ovalbuminu įjautrintų pelių bronchų gleivinėje [256]. Šie duomenys leidžia teigti, kad rūkymas slopina IL-5 gamybą. Panašius rezultatus paskelbė ir Kubo su bendraautoriais, aprašęs susilpnėjusią IL-5 raišką jūros kiaulyčių bronchoalveoliniame lavaže, paveikus jas tabako dūmais [244]. Šie rezultatai sutampa su mūsų nustatytais pokyčiais sergant alergine astma. Tačiau iki šiol nebuvo

paskelbtų tyrimų, nagrinėjančių rūkymo sukeltus IL-5 koncentracijos pakitimus sergant nealergine astma .

Taigi, visi aprašyti eksperimentų duomenys paaiškina, kodėl astma sergančių rūkorių skrepliuose bei bronchoalveoliniame lavaže nenustatėme didesnio eozinofilų kiekio nei nerūkančiųjų, nežiūrint į tai, kad eozinofilams specifinių chemokinių- eotaksino-1 ir eotaksino-2 koncentracija buvo padidėjusi. Apibendrinus galime teigti, kad rūkymas gali slopinti IL-5 išsiskyrimą ir skatinti eotaksinų gamybą- tokiu būdu įtakoti astmai būdingo lėtinio kvėpavimo takų uždegimo pobūdį.

Mūsų atlikto tyrimo duomenys rodo, kad astma nėra vienalytė liga, t.y. alerginė ir nealerginė astma tarpusavyje skiriasi persistuojančio uždegimo pobūdžiu. Manome, kad būtent patomorfologiniai astmos fenotipų skirtumai lemia skirtingus rūkymo sukeltus pakitimus kvėpavimo takų gleivinėje.

8. IŠVADOS

1. Sergančiųjų alergine astma skrepliuose vyrauja eozinofilai, o jų skaičius reikšmingai siejasi su padidėjusiu bronchų reaktyvumu (PD₂₀). Skirtingai, nealergine astma sergančių pacientų skrepliuose nustatytas didesnis bendras ląstelių kiekis, dominuojant neutrofilams bei limfocitams, kurių kiekis siejasi su padidėjusiu bronchų reaktyvumu (PD₂₀).
2. IL-9 raiška ženklėsnė sergančiųjų alergine astma skreplių ląstelėse, palyginus su nealergine astma. Tik sergant alergine astma nustatyta sąsaja tarp indukuotų skreplių IL-9 koncentracijos ir bronchų reaktyvumo (PD₂₀).
3. Prognozuojant III^o padidėjusio bronchų reaktyvumo pasireiškimą alerginės astmos metu specifėski žymenys yra skreplių eozinofilų kiekis bei IL-9 koncentracija, o nealerginės astmos atveju- limfocitų kiekis indukuotuose skrepliuose.
4. Rūkorių, sergančiųjų alergine astma skrepliuose nustatytas mažesnis eozinofilų ir limfocitų, bei didesnis neutrofilų kiekis palyginus su nerūkančiaisiais alergine astma sergančiais pacientais. O rūkorių, sergančiųjų nealergine astma skrepliuose buvo mažiau eozinofilų ir daugiau makrofagų nei nerūkančiųjų, sergančiųjų nealergine astma asmenų skrepliuose.
5. Alergine astma sergančiųjų rūkorių kraujo serume bei skrepliuose nustatyta mažesnė IL-5 koncentracija palyginus su nerūkančiaisiais, o eotaksino-2 koncentracija rūkorių, sergančiųjų alergine astma skrepliuose buvo didesnė nei nerūkančiųjų.
Nealergine astma sergančiųjų rūkorių serume bei BAL skystyje IL-5 koncentracija buvo mažesnė nei nerūkančiųjų, o eotaksino-2 koncentracija rūkorių, sergančiųjų nealergine astma indukuotų skreplių supernatante buvo didesnė palyginus su nerūkančiųjų tyrimo duomenimis.
6. Rūkorių, sergančiųjų alergine ar nealergine astma kvėpavimo takų sekrete nustatytos reikšmingos eotaksino-2 koncentracijos sąsajos su eozinofilų ir neutrofilų kiekiu. Nerūkančiųjų alergine ar nealergine astma sergančiųjų pacientų kvėpavimo takų sekrete esantis eozinofilų skaičius siejosi su eotaksino-1 koncentracija.

7. 9. DARBO PRAKTINĖ REIKŠMĖ

Tyrimo metu parodėme, kad alerginė ir nealerginė astma skiriasi ne tik klinicine eiga ar simptomus provokuojančiais veiksniais, bet ir kvėpavimo takų sekreto ląstelių sudėtimi, lemiančia lėtinio kvėpavimo takų uždegimo pobūdį bei patofiziologines ligos savybes. Šie rezultatai rodo, kad planuojant eksperimentinius ar mokslinius tyrimus, būtina atsižvelgti į astma sergančių tiriamųjų klinikinę ligos variantą (pavyzdžiui alerginė ar nealerginė astma).

Nustatėme, kad panaudojus neinvazinį ir saugų tyrimo metodą- skreplių indukciją hipertonių NaCl tirpalu- galime įvertinti ne tik lėtinio kvėpavimo takų uždegimo pobūdį, bet ir numatyti klinikinėje praktikoje svarbaus III⁰ padidėjusio bronchų reaktyvumo pasireiškimo tikimybę. Tyrime dalyvavo vidutinio ir vyresnio amžiaus pacientai, kuriems skreplių indukcija nesukėlė reikšmingų komplikacijų ar pašalinių reiškinių. Todėl galime teigti, kad skreplių indukcija hipertonių NaCl tirpalu – saugus ir efektyvus tyrimas visoms astma sergančių pacientų amžiaus grupėms.

Astma sergančių rūkatorių imuniniai lėtinio kvėpavimo takų uždegimo žymenys skiriasi nuo nerūkančių tiriamųjų. Rūkymas susijęs su neutrofilų kiekio didėjimu kvėpavimo takų sekrete, eozinofilų brendimui svarbių citokinų gamybos slopinimu ir chemokinų išsiskyrimo skatinimu. Šie pokyčiai lemia sunkesnę astmos klinikinę eigą ir silpnesnį gydomąjį inhaliuojamųjų gliukokortikoidų poveikį. Todėl šio tyrimo duomenys galėtų būti svariu argumentu skatinant rūkorius, sergančius astma mesti rūkyti.

9. LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Global Strategy for Asthma Management and Prevention. NIH publication no. 02-3659. Global Initiative for Asthma. National institutes of Health. National Heart, Lung and Blood Institute, 2002 (updated 2007).
2. Ross Anderson, H, Gupta, R., Strachan, D. P, Limb, E. S. 50 years of asthma: UK trends from 1955 to 2004. *Thorax* 2007;62: 85-90.
3. Pavord ID, Jeffery PK, Qiu Y, Zhu J, Parker D, Carlsheimer A, Naya I, Barnes NC. Airway inflammation in patients with asthma with high-fixed or low-fixed plus as-needed budesonide/formoterol. *J Allergy Clin Immunol*. 2009. Epub ahead of print.
4. Doherty TA, Soroosh P, Broide DH, Croft M. CD4+ cells are required for chronic eosinophilic lung inflammation but not airway remodeling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2009 Feb;296(2):L229-35. Epub 2008.
5. Boyce JA, Broide D, Matsumoto K, Bochner BS. Advances in mechanisms of asthma, allergy, and immunology in 2008. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;123:569-74.
6. Knudsen TB, Thomsen SF, Nolte H, Backer V. A population-based clinical study of allergic and non-allergic asthma. *J Asthma*. 2009;46:91-4.
7. Moodley YP, Krishnan V, Lalloo UG. Neutrophils in induced sputum arise from central airways *Eur Respir J*. 2000;15:36-40.
8. Thomson NC, Chaudhuri R. Asthma in smokers: challenges and opportunities. *Curr Opin Pulm Med*. 2009;15:39-45.
9. Braman SS. The Global Burden of Asthma. *Chest*. 2006;130:4S-12S.
10. Masoli M, Fabian D, Holt S ir kt. Global Initiative for Asthma (GINA) program: the global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report. *Allergy* 2004;59:469-478.
11. Sawicki G, Vilc Y, Schatz M., Kleinman K, Abrams A, Gutierrez B, Madden J. Trends in Uncontrolled Asthma and Asthma-Related Costs Using Health Plan Data From 2002 to 2007. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2009;123:S271.
12. Huber HL, Koessler KK. The pathology of bronchial asthma. *Arch Intern Med* 1922;30:689-760.
13. Samster M. Asthma bronchiale und Histaminempfindlichkeit 1933. *Allergy Proc* 1989;10:375-377
14. Pasteur Valery-Radot 1934, www.allergyclinic.co.nz/guides/52.html
15. Dunnill MS. The pathology of asthma with special referente to changes in the bronchial mucosa. *J Clin Pathol* 1960;13:27-33

16. Bousquet J, Jeffery PK, Busse WW, Johnson M, Vignola AM. Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:1720–45.
17. Šitkauskienė B, Sakalauskas R. Bronchų astmos patofiziologija. Šiuolaikinė samprata.(Pathophysiology of asthma: contemporary comprehension). *Medicina* 2001;9:850-5
18. Zhang J, Pare PD, Sandford AJ. Recent advances in asthma genetics. *Respiratory Research* 2008;9:4.
19. Kay AB. The role of eosinophils in the pathogenesis of asthma. *Trends Mol Med* 2005;11:148-152
20. Kraft M, Martin RJ, Wilson S, Djukanovic R, Colgate ST. Lymphocyte and eosinophil influx into alveolar tissue in nocturnal asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159:228-234.
21. Haley KJ, Sunday ME, Wiggs BR et al. Inflammatory cell distribution within and along asthmatic airways. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158:565-572
22. Kay AB. Allergy and allergic diseases. Second of two parts. *N Engl J Med* 2001;344:109-113.
23. Beasley R, Pekkanen J, Pearce N. Has the role of atopy in the development of asthma been over-emphasized? *Pediatr Pulmon Suppl* 2001;23:149-150.
24. Holgate ST. Pathogenesis of asthma. *Clinical and Experimental Allergy* 2008;38:872-897.
25. Sahana S, Jaunmuktane Z, Asplund MS, Roomans GM. Ultrastructural investigation of epithelial damage in asthmatic and non-asthmatic nasal polyps. *Respir Med* 2006;100:2018-2028.
26. Palmer CN, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A, ir kt. Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Ant Genet* 2006;38:441-446
27. Contoli M, Message SD, Laza-Stanca V, ir kt. Role of deficient typr III interferon-lambda production in asthma exacerbations. *Ant Med* 2006;12:1023-1026
28. Comhair SA, Xu W, Ghosh S, ir kt. Superoxide dismutase inactivation in pathophysiology of asthmatic airway remodeling and reactivity. *Am J Pathol* 2005;166:663-674.
29. Quejeg D, Hidrai B, Bijani K, Shirdel H. Glutathione peroxidase activity and serum pelenium concentration in intrinsic asthmatic patients. *Clin Chem Lab Med* 2002;41:200-202

30. Morrison D, Rahman I, MacNee W. Permeability, inflammation and oxidant status in airspace epithelium exposed to ozone. *Respir Med* 2006;100:2227-2234
31. Eder W, Ege MJ, von Mutius E. The asthma epidemic. *N. Engl. J. Med.* 2006;355:2226-2235
32. Hammad H, Lambrecht BN. Recent progress in the biology of airway dendritic cells and implications for understanding the regulation of asthmatic inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2006;118:331-336
33. Smit JJ, Lukacs NW. A closer look at chemokines and their role in asthmatic response. *Eur J Pharmacol* 2006;533:277-288.
34. Colognato R, Slupsky JR, Jendrach M, Burysek L, Syrovets T, Simmet T. Differential expression and regulation of protease-activated receptors in human peripheral monocytes and monocyte-derived antigen-presenting cells. *Blood* 2003;102:2645-2652
35. Holgate ST. The airway epithelium is central to the pathogenesis of asthma. *Allergology International* 2008;57:1-10
36. Allakhverdi Z, Comeau MR, Jessup HK, Yoon BR, Brewer A, Chartier S, Paquette N, Siegler SF, Sarfati M, Delespesse G. Thymic stromal lymphopoietin is released by human epithelial cells in response to microbes, trauma, or inflammation and potently activates mast cells. *J Exp Med* 2007;204:253-258
37. Holgate ST. Rhinoviruses in the pathogenesis of asthma: the bronchial epithelium as a major disease target. *J Allergy Clin Immunol* 2006;118:587-590
38. Kato A, Favorito S Jr, Avila PC, Schleimer RP. TLR-3 and Th2 cytokine-dependent production of thymic stromal lymphopoietin in human airway epithelial cells. *J Immunol* 2007;179:1080-1087
39. Barnes J, editor. Adkinson: Middleton's allergy: Principles and practice, 6th ed. *Morsby Inc.*;2003
40. Medoff BD, Seddon YT, Luster AD. T cell trafficking in allergic asthma: the ins and outs. *Annu Rev Immunol* 2008;26:205-232
41. Stachan DP. Hay fever, hygiene and household size. *BMJ.* 1989;299:1259-1260.
42. Huang TJ, MacAry PA, Eynott P, Moussavi A, Daniel KC, et al. Allergen-specific Th1 cells counteract effector Th2 cell-dependent bronchial hyperresponsiveness and eosinophilic inflammation partly via IFN- γ . *J Immunol* 2001;166:207-217.
43. Randolph DA, Stephens R, Carruthers CJ, Chaplin DD. Cooperation between Th1 and Th2 cells in a murine model of eosinophilic airway inflammation. *J Clin Invest* 1999;104:1021-1029.

44. Ordonez CL, Shaughnessy TE, Matthay MA, Fahy JV. Increased neutrophil numbers and IL-8 levels in airway secretions in acute severe asthma: clinical and biologic significance. *Am. J. Respir. Crit. Care Med* 2000;161: 1185-1190.
45. Wark PAB, Johnston SL, Moric I, Simpson JL, Hensley MJ, Gibson PG. Neutrophil degranulation and cell lysis is associated with clinical severity in virus-induced asthma. *Eur Respir J* 2001;19:68-75.
46. Anees W, Huggins V, Pavord ID, Robertson AS, Burge PS. Occupational asthma due to low molecular weight agents: eosinophilic and non-eosinophilic variants. *Thorax* 2002;57:231-236.
47. Sur S, Crotty TB, Kephart GM, Hyma BA, Colby TV, Reed CE, Hunt LW, Gleich GJ. Sudden-onset fatal asthma: a distinct entity with few eosinophils and relatively more neutrophils in the airway submucosa? *Am Rev Respir Dis* 1993;148:713-719.
48. Saffar AS, Alphose MP, Shan L, HayGlass KT, Simons FER, Gounni SA. IgE modulates neutrophil survival in asthma: role of mitochondrial pathway. *The Journal of Immunology* 2007;178: 2535-2541.
49. Lemiere C, Ernst P, Olivenstein R, et al. Airway inflammation assessed by invasive and noninvasive means in severe asthma: eosinophilic and noneosinophilic phenotypes. *J Allergy Clin Immunol* 2006;118:1031-1039.
50. Sehmi R, Dorman S, Baatjes A, et al. Allergen-induced fluctuation of chemokine receptor 3 expression on bone marrow CD34⁺ cells from asthmatic subjects: significance for mobilisation of haemopoietic progenitor cells in allergic inflammation. *Immunology* 2003;109:536-546.
51. Saito K, Nagata M, Kikuchi I, Sakamoto Y. Leukotriene D4 and eosinophil transendothelial migration, superoxide generation, and degranulation via beta2 integrin. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2004;93: 594-600.
52. Kariyawasam HH, Robinson DS. The eosinophil: The cell and its weapons, the cytokines, its location. *Semin Respir Crit Care Med.* 2006;35:26-33.
53. Bandeira-Melo C, Bozza P, Weller P. The cellular biology of eosinophil eicosanoid formation and function. *J Allergy Clin Immunol.* 2002;109: 393-400.
54. Kato Y, Fujisawa T, Nishimori H, Katsumata H, Atsuta J, Iguchi K, Kamiya H. Leukotriene D4 induces production of transforming growth factor-beta1 by eosinophils. *Int Arch Allergy Immunol.* 2005;137: 17-20.
55. Rothenberg M, Hogan S. The eosinophil. *Annu Rev Immunol.* 2006;24: 147-174.
56. Lee JJ, Dimina D, Macias MP, Ochkur SI, McGarry MP, O'Neill KR, Protheroe C, Pero R, Nguyen T, Cormier SA, Lenkiewicz E, Colbert D, Rinaldi L, Ackerman SJ, Irvin CG,

- Lee NA. Defining a link with asthma in mice congenitally deficient in eosinophils. *Science* 2004;264:1773-1776.
57. Zhang JY, Wenzel SE. Tissue and BAL based biomarkers in asthma. *Immunol Allergy Clin N Am* 2007;27:623-632.
 58. Fujimoto K, Kubo K, Matsuzawa Y, et al. Eosinophil cationic protein levels in induced sputum correlate with the severity of bronchial asthma. *Chest* 1997;112:1241-1247.
 59. Ronchi MC, Piragino C, Rosi E, et al. Do sputum eosinophils and ECP prelate to the severity of asthma? *Eur Respir J* 1997;10:1809-1813.
 60. Brinke A, Zwinderman AH, Sterk PJ, Rabe KF, Bel EH. Factors associated with persistent airflow limitation in severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:744-748.
 61. Virchow JC Jr, Holscher V, Virchow C. Sputum ECP levels correlate with parameters of airflow obstruction. *Am Rev respir Dis* 1992;146:604-606.
 62. Pizzini E, Pizzini MMM, Efthimiadis A, et al. Measuring airway inflammation in asthma; eosinophils and eosinophilic cationic protein in induced sputum compared with peripheral blood. *J Allergy Clin Immunol* 1997;99:539-544.
 63. Bartoli MI, Bacci E, Cornevali S, Cianchetti S, Dente FL, Giannini D, Taccola M, Vegaggini B, Paggiaro PL. Clinical assessment of asthma severity partially corresponds to sputum eosinophilic airway inflammation. *Respir Med* 2004;98:184-193.
 64. Vanto T, Koskinen P. Serum eosinophil cationic protein in the evaluation of asthma severity in children. *Allergy* 2007;53:415-419.
 65. Duncan CJA, Lawrie A, Blaylock MG, Douglas JG, Walsh GM. Reduced eosinophil apoptosis in induced sputum correlates with asthma severity. *Eur Respir J* 2003;22:484-490.
 66. Jang AS, Choi IS, Lee S, Seo JP, Yang SW, Park CS. Bcl-2 expression in sputum eosinophils in patients with acute asthma. *Thorax* 2000;55:370-374.
 67. Vignola AM, Chanaz P, Chiappara G, et al. Evaluation of apoptosis of eosinophils, macrophages and T lymphocytes in mucosal biopsy specimens of patients with asthma and chronic bronchitis. *J Allergy Clin Immunol* 1999;103:563-573.
 68. Pizzichini E, Pizzichini MMM, Efthimiadis A, Evans S, Morris MM, Squillace D, 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;154:308-17.
 69. Jatakanon A, Uasuf C, Maziak W, Lim S, Chung KF, Barnes PJ. Neutrophilic inflammation in severe persistent asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:1532-9.

70. Turner MO, Hussak P, Sears MR, et al. Exacerbation of asthma without eosinophilia. *Thorax* 1995;50:1057-1061.
71. The ENFUMOSA study group (investigators: Abraham B, Anto JM, Barreiro E, Bel EHD, Bosquet J, Castellsagud J, Chanez P, Dahien B, Dews N, Djukanovic R, Fabbri LM, Folkerts G, Gaga M, Gratziau C, Colgate ST, Howarth PH, Johnson SL, Kanniss F.) The ENFUMOSA cross-sectional European multicentre study of the clinical phenotype of chronic severe asthma. *Eur Respir J* 2003;22:470-477.
72. Jatakanon A, Lim S, Kharitonov A, Chung K, Barnes PJ. Correlation between exhaled nitric oxide, sputum eosinophils, and methacholine responsiveness in patients with mild asthma. *Thorax* 1998;53:91-5.
73. Spanevello A, Migliori GB, Sharara A, Ballardini L, Bridge P, Pisati P, et al. Induced sputum to assess airway inflammation: a study of reproducibility. *Clin Exp Allergy* 1997;27:1138-44.
74. Wardlaw AJ, Dunnette S, Gleich GJ, Collins JV, Kay AB. Eosinophils and mast cells in bronchoalveolar lavage in subjects with mild asthma. Relationship to bronchial hyperreactivity. *Am Rev Respir Dis* 1988; 137: 62-9.
75. Crimi E, Spanevello A, Neri M, Ind PW, Rossi GA, Brusasco V. Dissociation between airway inflammation and airway hyperresponsiveness in allergic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 4-9.
76. Warlaw AJ, Brightling C, Green R, Woltmann G, Pavord I. Eosinophils in asthma and other allergic diseases. *British medical bulletin* 2000;56:985-1003.
77. Yang E, Kim W, Kwon BC, Choi SY, Sohn MH, Kim KE. Relationship among pulmonary function, bronchial hyperresponsiveness, and atopy in children with clinically stable asthma. *Lung* 2006;184:73-79.
78. Hamelmann E, Oshiba A, Loader J, Larsen GL, Gleich G, Lee J, Gelfand EW. Antiinterleukin-5 antibody prevents airway hyperresponsiveness in a murine model of airway sensitization. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155:819-825.
79. O'Byrne PM, Inman MD, Parameswaran K. The trials and tribulations of IL-5, eosinophils, and allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2001;108:503-508.
80. Nomura N, Yoshikawa T, Kamoi H, Kanazawa H, Hirata K, Fujimoto S. Induced sputum analysis in young adults with bronchial hyperresponsiveness to methacholine. *Respirology* 2007;12:516-522.
81. Han DH, Kim SW, Cho SH, Kim DY, Lee CH, Kim SS, Rhee CS. Predictors in bronchial hyperresponsiveness in chronic rhinosinusitis with nasal polyp. *Allergy* 2009;64:118-122.

82. Barnes PJ. Corticosteroids: the drugs to beat. *Eur J Pharmacol* 2006;533:2-14.
83. Barnes PJ. Molecular mechanisms of corticosteroids in allergic diseases. *Allergy* 2001;56:928-936.
84. Fujimoto K, Yamaguchi S, Urushibata K, Hanaoka M, Koizumi T, Honda T, Kubo K. Characteristics of asthma resistant to moderate dose inhaled corticosteroid treatment on bronchial hyperresponsiveness. *Intern Med* 2006;45:843-849.
85. Martin RJ, Szeffler SJ, King TS, Kraft M, Boushey HA, Chinchilli VM, Craig TJ, Dimango EA, Deykin A, Fahy JV, Israel E, Lazarus SC, Lemanske RF Jr, Leone FT, Pesola GR, Peters SP, Sorkness CA, Szwejbka LA, Wechsler ME, the National Heart, Lung, and Blood Institute's Asthma Clinical Research Center. The predicting response to inhaled corticosteroid efficacy (PRICE) trial. *J Allergy Clin Immunol* 2007;119:73-80.
86. Green RH, Brightling CE, Woltmann G, Parker D, Wardlaw AJ, Pavord ID. Analysis of induced sputum in adults with asthma: identification of subgroup with isolated sputum neutrophilia and poor response to inhaled corticosteroids. *Thorax* 2002;57:875-879.
87. Pedersen SE, Bateman ED, Bousquet J, Busse WW, Yoxalls, Clark TJ, Gaining Optimal Asthma Control Steering Committee and Investigators. Determinants of response to fluticasone propionate and salmeterol/fluticasone propionate combination in the Gaining Optimal Asthma control study. *J Allergy Clin Immunol* 2007;120:1036-1042.
88. Bacci E, Cianchetti S, Bartoli ML, Dente FL, Di Franco A, Vagaggini B, Paggiaro P. Low sputum eosinophils predict the lack of response to beclomethasone in symptomatic asthmatic patients. *Chest* 2006; 129:565-572.
89. Katakanon A, Lim S, Barnes PJ. Changes in sputum eosinophils predict loss of asthma control. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:64-72.
90. Green RH, Brightling CE, McKenna S, Hargadon B, Parker D, Bradding P, Wardlaw AJ, Pavord ID. Asthma exacerbations and sputum eosinophil counts: a randomised controlled trial. *Lancet* 2002;360:1715-1721.
91. Malerba M, Magnoli B, Radaeli A, Tantucci C. Usefulness of exhaled nitric oxide and sputum eosinophils in the long-term control of eosinophilic asthma. *Chest* 2008;134:733-739.
92. Yutaro S, Hitomi A, Naokatsu H, Junichiro H, Tetsuya O, Michio Y. Intracellular IL-5 and T-lymphocyte subsets in atopic and nonatopic bronchial asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2002;2:294-298.
93. Miyajima A, Kitamura T, Harada N, Yokota T, Arai KI. Cytokine receptors and signal transduction. *Annu rev Immunol* 1992;10:295-331.

94. Greenfeder S, Umland SP, Cuss FM, Chapman RW, Egan RW. Th2 cytokines and asthma. The role of interleukin-5 in allergic eosinophilic disease. *Respir Res* 2001;2:71-79.
95. Takatsu K, Nakajima H. IL-5 and eosinophilia. *Curr Opin Immunol*. 2008;20:288-294.
96. Sitkauskiene B, Johansson AK, Sergejeva S, Lundan S, Sjöstrand M, Lötvall J. Regulation of Bone Marrow and Airway CD34⁺ Eosinophils by Interleukin-5. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2004;30:367-78.
97. Šitkauskienė B, Sakalauskas R. Antikūno prieš interleukiną-5 vaidmuo alerginiame uždegime. *Lietuvos Bendrosios Praktikos Gydytojas* 2002;4:267
98. Lilly CM, Chapman RW, Sehring SJ, Mauser PJ, Showell HJ, Egan RW, Drazen JM. Effects of interleukin 5-induced pulmonary eosinophilia on airway reactivity in the guinea pig. *Am J Physiol* 1996;270:L368-L275.
99. Mauser PJ, Ritman A, Witt A, Fernandez X, Zurcher J, Kung TT, Jones H, Watnick AS, Egan RW, Kreutner W, Adams III GK. Inhibitory effects of the TRFK-5 anti-IL-5 antibody in guinea pig model of asthma. *Am Rev Respir Dis* 1993;148:1623-1627.
100. Hakonarson H, Markeri N, Cartier C, Chuang S, Grunstein MM. Autorine interaction between IL-5 and IL-1 β mediates altered responsiveness of atopic asthmatic sensitized airway smooth muscle. *J Clin Invest* 1999;104:657-667.
101. Asquith KL, Ramshaw HS, Hansbro PM, Beagley KW, Lopez AF, Foster PS. The IL-3/IL-5/GM-CSF common β receptor plays a pivotal role in the regulation of Th2 immunity and allergic airway inflammation. *The Journal of Immunology* 2008;180: 199–1206.
102. Flood-Page PT, Menzies-Gow AN, Kay A B, Robinson DS. Eosinophil's role remains uncertain as anti-interleukin-5 only partially depletes numbers in asthmatic airway. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;167:199–204.
103. Cieslewicz G, Tomkinson A, Adler A, Duez C, Schwarze J, Takeda K, Larson KA, Lee JJ, Irvin CG, Gelfand EW. The late, but not early, asthmatic response is dependent on IL-5 and correlates with eosinophil infiltration. *J Clin Invest* 1999;104:301-308.
104. Kips JC. Cytokines in asthma. *Eur Resp J* 2001;18:24s-33s.
105. Liu LY, Sedgwick JB, Bates ME, Vrtis RF, Gern JE, Kita H, Jarjour NN, Busse WW, Kelly EAB. Decreased expression of membrane IL-5R α on human eosinophils. I. Loss of membrane IL-5 alpha on eosinophils and increased soluble IL-5R alpha in the airway after antigen Challenge. *J Immunol* 2002;169:6452-6458.
106. Liu LY, Sedgwick JB, Bates ME, Vrtis RF, Gern JE, Kita H, Jarjour NN, Busse WW, Kelly EAB. Decreased expression of membrane IL-5R α on human eosinophils. II. IL-5

107. Kajiyama Y, Umezu-Goto M, Kobayashi N, Takahashi K, Fukuchi Y, Mori A. IL-2-induced IL-9 production by allergen-specific human helper T-cell clones. *Int Arch Allergy Immunol* 2007;143:71-75.
108. Houssiau FA, Schandene L, Stevens M, Cambiaso C, Goldman M, van Snick J, Renauld JC. A cascade of cytokines is responsible for IL-9 expression in human T cells. Involvement of IL-2, IL-4, and IL-10. *The Journal of Immunology* 1995;6:2624-2630.
109. Louahed J, Zhou Y, Maloy WL, Rani PU, Weiss C, Tomer Y, et al. Interleukin 9 promotes influx and local maturation of eosinophils. *Blood* 2001;97:1035-1042.
110. Sitkauskienė B, Rådinger M, Bossios A, Johansson AK, Sakalauskas R, Lötvald J. Airway allergen exposure stimulates bone marrow eosinophilia partly via IL-9. *Respi Res* 2005;6:33.
111. Soussi Gounni A, Gregory B, Nutku E, Aris F, Latifa K, Minshall E, et al. Interleukin-9 enhances interleukin-5 receptor expression, differentiation, and survival of human eosinophils. *Blood* 2000;96:2163-71.
112. Poulin LF, Habran C, Stordeur P, Goldman M, McKenzie A, Van Snick J, Renauld JC, Braun MY. Interleukin-9 stimulates the production of interleukin-5 in CD4+ T cells. *Eur Cytokine Netw* 2005;16:233-239.
113. Fujisawa T, Katsumata H, Kato Y. House dust mite extract induces interleukin-9 expression in human eosinophils. *Allergology International* 2008;57:141-146.
114. Devos S, Cormont F, Vrtala S, Hooghe-Peters E, Pirson F, Snick J. Allergen-induced interleukin-9 production in vitro: correlation with atopy in human adults and comparison with interleukin-5 and interleukin-13. *Clin Exp Allergy* 2006;36:174-182.
115. Bdelilah SG, Nutku E, Koussih L, Aris F, Louahed J, Levitt RC, Nicolaides NC, Hamid Q. IL-9 expression by human eosinophils : Regulation by IL-1 β and TNF- α . *Journal of allergy and clinical immunology* 2000;3:460-466.
116. Nicolaides NC, Holroyd KJ, Ewart SL, et al. Interleukin 9: a candidate gene for asthma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:13175-13180.
117. Kung TT, Luo B, Crawley Y, Garlisi CG, Devito K, Minnicozzi M, Egan RW, Kreutner W, Chapman RW. Effect of anti-mIL-9 antibody on the development of pulmonary inflammation and airway hyperresponsiveness in allergic mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001;5:600-605.
118. McMillan SJ, Bishop B, Townsend MJ, McKenzie AN, Lloyd KM. The absence of interleukin 9 does not affect the development of allergen-induced pulmonary

- inflammation nor airway hyperreactivity. *The Journal of Experimental Medicine* 2002;1:51-57.
119. Van den Bruˆle S, Heymans J, Havaux X, Renauld J-C, Lison D, Huaux F, Denis O. Profibrotic effect of IL-9 overexpression in a model of airway remodeling. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007;37:202–209.
 120. Allwe SJ, Crown SE, Handel TM. Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. *Annu Rev Immunol* 2007;25:787-820.
 121. Bacon K, Baggiolini M, Broxmeyer H, Horuk R, Lindley I, ir kt. Chemokine/chemokine receptor nomenclature. *J Interferon Cytokine Res* 2002;22:1067-1068.
 122. Moser B. Chemokines: role in immune cell traffic. *Eur Cytokine Netw* 2003;14:204-210.
 123. Kunkel SL, Godessart N. Chemokines in autoimmunity: from pathology to therapeutics. *Autoimmun Rev* 2002;1:313-320.
 124. Balkwill F. Cancer and the chemokine network. *Ant Rev Cancer* 2004;4:540-550.
 125. Bandeira-Melo Ch, Herbst A, Weller PF. Eotaxins. Contributing to the diversity of eosinophil recruitment and activation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001; 24: 653-657.
 126. Jose PJ, Griffiths-Johnson DA, Collins PD, Walsh DT, Moqbel R, Totty NF, Troung O, Hsuan JJ, Williams TJ. Eotaxin: a potent eosinophil chemoattractant cytokine detected in a guinea pig model of allergic airways inflammation. *J Exp Med* 1994; 179: 881-887.
 127. Ponath PD, Qin S, Ringler DJ, Claek-Lewis I, Wang J, Kassam N, Smith H, Shl X, Gonzalo J-A, Newman W, ir kt. Cloning of the human eosinophil chemoattractant, eotaxin. Expression, receptor binding and functional properties suggest a mechanism for the selective recruitment of eosinophils. *J Clin Invest* 1996;97:8960-8964.
 128. Erin EM, Williams TJ, Barnes PJ, Hansel TT. Eotaxin receptor (CCR3) antagonism in asthma and allergic disease. *Current Drug Targets- Inflammation & Allergy* 2002;1:201-214.
 129. Patel VP, Kreider BL, Li Y, Li H, Leung K, Salcedo T, Nardelli B, Pippalla V, Gentz S, Thotakura R, Parmelee D, Gentz R, Garotta G. Molecular and functional characterization of two novel human C-C chemokines as inhibitors of two distinct classes of myeloid progenitors. *J Exp Med* 1997; 185:1163-1172.
 130. Palframan RT, Collins PD, Williams TJ, Rankin SM. Eotaxin induces a rapid release of eosinophils and their progenitors from the bone marrow. *Blood* 1998; 91: 2240-2248.

131. Ravensberg AJ, Ricciardolo FLM, van Schadewijk A, Rabe KF, Sterk PJ, Hiemstra PS, Mauad T. Eotaxin-2 and eotaxin-3 expression is associated with persistent eosinophilic bronchial inflammation in patients with asthma after allergen challenge. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115: 779-785.
132. Zimmermann N, Hogan SP, Mishra A, Brandt EB, Bodette TR, Pope SM, Finkelman FD, Rothenberg ME. Murine eotaxin-2: a constitutive eosinophil chemokine induced by allergen challenge and IL-4 overexpression. *J Immunol* 2000;165:5839-5846.
133. Shinkai A, Yoshisue H, Koike M, Shoji E, Nakagawa S, Saito A, Takeda T, Imabeppu S, Kato Y, Hanai N, Anazawa H, Kuga T, Nishi T. A novel human CC chemokine, eotaxin-3, which is expressed in IL-4-stimulated vascular endothelial cells, exhibits potent activity toward eosinophils. *J Immunol* 1999;163:1602-1610.
134. Kitaura M, Suzuki N, Imai T, Takagi S, Suzuki R, Nakajima T, Hirai K, Nomiyama H, Yoshie O. Molecular cloning of a novel human CC chemokine (Eotaxin-3) that is a functional ligand of CC chemokine receptor 3. *J Biol Chem* 1999;274:27975-80.
135. Pease J, Williams TJ. Eotaxin and asthma. *Current Opinion in Pharmacology* 2001;1:248-253.
136. Petkovic V, Moghini C, Paoletti S, Ugucioni M, Gerber B. Eotaxin-3/CCL26 is a natural antagonist for CC chemokine receptors 1 and 5. *The Journal of Biological Chemistry* 2004;22:23357-23363.
137. Dumbles AA, Conroy DM, Marleau S, Rankin SM, Palframan RT, Proudfoot AEI, Wells TNC, Li D, Jeffery PK, Griffiths-Johnson DA, Williams TJ, Jose PJ. Kinetics of eotaxin generation and its relationship to eosinophil accumulation in allergic airways disease: analysis in a guinea pig model in vivo. *J Exp Med* 1997;186:607-612.
138. Conroy DM, Williams TJ. Eotaxin and the attraction of eosinophils to the asthmatic lung. *Respir Res* 2001;2:150-156.
139. Huaux F, Gharaee-Kermani M, Liu T, Morel V, McGarry B, Ullenbruch M, Kunkel SL, Wang J, Xing Z, Phan H. Role of Eotaxin-1 (CCL11) and CC Chemokine Receptor 3 (CCR3) in Bleomycin-Induced Lung Injury and Fibrosis *American Journal of Pathology* 2005;167:1485-1496.
140. Hochstetter R, Dobos G, Kimmig D, Dulkys Y, Kapp A, Elsner J. The CC chemokine receptor 3 CCR3 is functionally expressed on eosinophils but not on neutrophils. *Eur J Immunol* 2000;30:2759-2764.
141. Cheng SS, Lai JJ, Lukacs NW, Kunkel SL: Granulocyte-macrophage colony stimulating factor up-regulates CCR1 in human neutrophils. *J Immunol* 2001, 166:1178-

- 1184Cheng SS, Lukacs NW, Kunkel SL: Eotaxin/CCL11 is a negative regulator of neutrophil recruitment in a murine model of endotoxemia. *Exp Mol Pathol* 2002, 73:1-8.
142. Badewa AP, Hudson CE, Heiman AS. Regulatory effects of eotaxin, eotaxin-2, and eotaxin-3 on eosinophil degranulation and superoxide anion generation. *Exp Biol Med* 2002;8:645-651.
143. Xu J, Jiang F, Nayeri F, Zetterström O. Apoptotic eosinophils in sputum from asthmatic patients correlate negatively with levels of IL-5 and eotaxin. *Resp Med* 2007;101:1447-1454.
144. Tateno H, Nakamura H, Minematsu N, Nakajima T, Takahashi S, Nakamura M, Fukunaga K, Asano K, Lilly CM, Yamaguchi K. Plasma eotaxin level and severity of asthma treated with corticosteroid. *Resp Med* 2004;98:782-790.
145. Gordon D, Chrustalleni H, Takahiro Y, Rachel H, ir kt. Contribution of eotaxin-1 to eosinophil chemotactic activity of moderate and severe asthmatic sputum. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;169:1110-1117.
146. E. Bel. Clinical phenotypes of asthma. *Curr Opin Pulm Med* 2003;10:44-50.
147. Amin K, Ludviksdottir D, Jonson C, Nettelblad O, Gudbjornsson E, Valtysdottir S, et al. Inflammation and structural changes in the airways of patients with atopic and nonatopic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:2295-300.
148. Krisiukėnienė A, Šitkauskienė B, Malakauskas K, Sakalauskas R. Indukuotų skreplių ląstelinės sudėties savybės sergant alergine ir nealergine astma. *Medicina*. 2005;3:196-202.
149. Rackeman FM. A working classification of asthma. *Am J Med* 1947;33:601-6.
150. Johansson SG, Hourihane JO, Bosquet J, Bruijnzeel-Koomen C, Dreborg S, Haahtela T, et al. Position paper. A revised nomenclature of allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. *Allergy* 2001;56:813-24.
151. Matsumoto K, Saito H. The role of eosinophils in asthma: Sarastro or the Queen of the night? *Int Arch Allergy Immunol* 2001;125:290-296.
152. Sitkauskiene B, Sakalauskas R, Malakauskas K, Lötvall J. Reversibility to a β_2 -agonist in COPD: relationship to atopy and neutrophil activation. *Respir Med* 2003;97:591-8.
153. Ownby DR, Joseph CLM. Should nonatopic asthma get equal attention? *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2007;120:1018-1020.
154. Wolley K, Gibson P, Carty K, Wilson A, Twaddell S, Wolley M. Eosinophil apoptosis and the resolution of airway inflammation in asthma. *Am J Respi Crit Care Med* 1996;154:237-43.

155. Kraneveld AD, van der Kleij HP, Kool M, van Houwelingen AH, Weitenberg AC, Redegeld FA et al. Key role of mast cells in nonatopic asthma. *The Journal of Immunology* 2002;169:2044-53.
156. Mochizuki H, Shigeta M, Tokuyama K, Morikawa A. Difference in airway reactivity in children with atopic vs nonatopic asthma. *Chest* 1999;116:619-624.
157. Ludvigsdottir D, Janson C, Högman M, Hedenström H, Björnsson E, Boman G. Exhaled nitric oxide and its relationships to airway responsiveness and atopy in asthma. *Respir Med* 1999;93:552-6.
158. Ludvigsdottir D, Janson C, Hedenström H, Björnsson E, Boman G, Stralenheim G et al. Different airway responsiveness profiles in atopic asthma, nonatopic asthma and Sjögren's syndrome. *Allergy* 2000;55:259-65.
159. Douwes J, Gibson P, Pekkanen J, Pearce N. Non-eosinophilic asthma: importance and possible mechanisms. *Thorax* 2002;57:643-648.
160. Romanet-Manent S, Charpin D, Magnan A, Lanteaume A, Vervloet D, EGEA Cooperative Group. Allergic vs nonallergic asthma: what makes the difference? *Allergy* 2002;57:607-613.
161. Ulric CS, Backer V, Dirksen A. A 10 year follow-up of 180 adults with bronchial asthma: factors important for the decline in lung function. *Thorax* 1992;47:14-18.
162. Siroux V, Pin I, Oryszczyn MP, Le Moual N, Kauffman F. Relationships of active smoking to asthma and asthma severity in the EGEA study. *Eur Respir J* 2000; 15: 470-7.
163. Plaschke P, Janson C, Norrman E, Björnsson E, Ellbjär S, Jarvholm B. Onset and remission of allergic rhinitis and asthma and the relationship with atopic sensitization and smoking. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 920-4.
164. Kim Y, Kim SH, Tak YJ, et al. High prevalence of current asthma and active smoking effect among the elderly. *Clin Exp Allergy* 2002; 32: 1706-12 Rasmussen FSHC, Lambrechtsen J, Hansen HS, Hansen NC. Impact of airway lability, atopy, and tobacco smoking on the development of asthma-like symptoms in asymptomatic teenagers. *Chest* 2000; 117: 1-9.
165. Vesterinen E, Kaprio J, Koskenvuo M. Prospective study of asthma in relation to smoking habits among 14729 adults. *Thorax* 1988; 43: 534-9.
166. Troisi R, Speizer F, Rosner B, Trichopoulos D, Willet W. Cigarette smoking and incidence of chronic bronchitis and asthma in women. *Chest* 1995; 108: 1557-61.
167. Althuis M, Sexton M, Prybylski D. Cigarette smoking and asthma symptom severity among adult asthmatics. *J Asthma* 1999; 36: 257-64.

168. Gallefoss F, Bakke P. Does smoking affect the outcome of patient education and self-management in asthmatics? *Patient Educ Couns* 2003; 49: 91–7.
169. Sippel JM, Pedula KL, Vollmer WM, Buist AS, Osborne ML. Associations of smoking with hospital-based care and quality of life in patients with obstructive airway disease. *Chest* 1999; 115: 691–6.
170. Floreani A, Rennard S. The role of cigarette smoke in the pathogenesis of asthma and as a trigger for acute symptoms. *Curr Opin Pulm Med* 1999; 5: 38–46.
171. Rahman I, McNee W. Oxidant/antioxidant imbalance in smokers and chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 1996; 51: 348-350.
172. Sitkauskiene B, Krisiukeniene A, Sakalauskas R. Difficult/therapy resistant asthma: Pathogenesis and possible relationship with tobacco smoke. *Current Respiratory Medicine Reviews* 2006; 2: 67-74.
173. Nazarus SC, Chinchilli VM, Rollings NJ, Boushey HA, Cherniack R et al. Smoking affects response to inhaled corticosteroids or leukotriene receptor antagonists in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;175:783-790.
174. Kennedy S, Elwood R, Wiggs B, Pare P, Hogg J. Increased airway mucosal permeability of smokers: relationship to airway reactivity. *Am Rev Respir Dis* 1984; 129: 143–8.
175. Ilowite J, Bennett W, Sheetz M, Groth M, Nierman D. Permeability of the bronchial mucosa to ^{99m}Tc-DTPA in asthma. *Am Rev Respir Dis* 1988; 139: 1139–43.
176. Shao MXG, Nakanaga T, Nadel JA. Cigarette smoke induces MUC5AC mucin overproduction via tumor necrosis factor- α converting enzyme in human airway epithelial (NCI-H292) cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004; L420-7.
177. Boulet LP, Lemiere C, Archambault F, Cartier G, Descary MC, Deschesnes F. Smoking and asthma: clinical and radiologic features, lung function, and airway inflammation. *Chest* 2006;129:661-668.
178. Sitkauskiene B, Krisiukeniene A, Malakauskas K, Sakalauskas R. Inflammatory cell counts in induced sputum from non-allergic asthmatics and COPD patients. *Eur Respir J* 2004; 24: P2019.
179. Nightingale JA, Rogers DF, Chung FK, Barnes PJ. No effect of inhaled budesonide on the response to inhaled ozone in normal subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 479-86.
180. Hattotuwa K, Gizycki M, Ansari T, Jeffrey P, Barnes N. The effects of inhaled fluticasone on airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165: 1592-6.

181. Sitkauskiene B, Sakalauskas R, Malakauskas K, Lotvall J. Reversibility to a β 2-agonist in COPD: relationship to atopy and neutrophil activation. *Respir Med* 2003; 97: 591-8.
182. Fasado JB. Asthma and smoking: an unfortunate combination. *Arch de Bronconeulogia* 2007;43:340-345.
183. Keatings V, Collins P, Scott D, Barnes P. Differences in interleukin-8 and tumour necrosis factor- α in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease and asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153: 530-4.
184. Churg A, Dai J, Changshi X, Wright J. Tumour necrosis factor- α is central to acute cigarette smoke-induced inflammation and connective tissue breakdown. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166: 849-54.
185. Irusen E, Matthews JG, Takahashi A, Barnes PJ, Chung KF, Adcock IM. p38 Mitogen-activated protein kinase-induced glucocorticoid receptor phosphorylation reduces its activity: role in steroid-insensitive asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 109: 649-57.
186. Hawrylowicz C, Richards D, Loke T-K, Corrigan C, Lee T. A defect in corticosteroid-induced IL-10 production in T lymphocytes from corticosteroid-resistant patients. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 109: 369-70.
187. McKay A, Komai-Koma M, MacLeod K, et al. Interleukin-18 levels in induced sputum are reduced in asthmatic and normal smokers. *Clin Exp Allergy* 2004; 34: 904-10.
188. Galigniana MD, Piwien-Pilipuk G, Assreuy J. Inhibition of glucocorticoid receptor binding by nitric oxide. *Mol Pharmacol* 1999; 55: 317-23.
189. Leung D, Bloom J. Update on glucocorticoid action and resistance. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111: 3-22.
190. Strickland I, Kisich K, Hauk PJ, et al. High constitutive glucocorticoid receptor beta in human neutrophils enables them to reduce their spontaneous rate of cell death in response to corticosteroids. *J Exp Med* 2001; 193: 585-94.
191. Schaaf M, Cidlowski J. Molecular mechanisms of glucocorticoid action and resistance. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2003; 83: 37-48.
192. DiStefano A, Caramori G, Oates T, et al. Increased expression of nuclear factor- κ B in bronchial biopsies from smokers and patients with COPD. *Eur Respir J* 2002; 20:556-63.
193. Ito K, Lim S, Caramori G, Chung K, Barnes P, Adcock I. Cigarette smoking reduces histone deacetylase 2 expression, enhances cytokine expression, and inhibits glucocorticoid actions in alveolar macrophages. *FASEB J* 2001; 15: 1110-2.

194. Mochida-Nishimura K, Surewicz K, Cross J, et al. Differential activation of MAPK signaling pathways and nuclear factor- κ B in bronchoalveolar cells of smokers and nonsmokers. *Mol Med* 2001; 7: 177-85.
195. Laustiola K, Lassilia R, Kaprio J, Koskenvuo M. Decreased beta-adrenergic receptor density and catecholamine response in male cigarette smokers: a study of monozygotic twin pairs discordant for smoking. *Circulation* 1988; 78: 1234-40.
196. Wang ZCC, Niu T, Wu D, et al. Association of asthma with beta2-adrenergic receptor gene polymorphism and cigarette smoking. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163: 1404-9.
197. Raheison C, Baldi I, Tunon De Lara J, Taytard A, Annesi-Maesano I. Asthma phenotypes according to the timing of smoking onset in young adults. *Int J Tuberc Lung Dis* 2003; 7: 84-92.
198. Lange P, Parner J, Vestbo J, Schnohr P, Jensen G. A 15 year follow-up study of ventilatory function in adults with asthma. *N Engl J Med* 1998; 339: 1194-200.
199. Chalmers GW, Macleod KJ, Little SA, Thomson LJ, McSharry CP, Thomson NC. Influence of cigarette smoking on inhaled corticosteroid treatment in mild asthma. *Thorax* 2002; 57: 226-30.
200. Chaudhuri R, Livingston E, McMahon AD, Thomson L, Borland W, Thomson NC. Cigarette smoking impairs the therapeutic response to oral corticosteroids in chronic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168: 1308-11.
201. Mukherjee S, Bakshi S. Noneosinophilic asthma. *Eur Respir J* 2003;22:188-189.
202. Britton J. Passive smoking and asthma exacerbation. *Thorax* 2005;60:794-795.
203. Barnes PJ. Reduced pistone deacetylase activity in COPD. Clinical implications. *Chest* 2006;129:151-155.
204. Deykin A, Belostotsky O, Hong C, Massaro AF, Lilly CM, Israel E. Exhaled Nitric Oxide following Leukotriene E₄ and Methacholine Inhalation in Patients with Asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000;5: 1685-1689.
205. Nightingale JA; Rogers DF; Barnes PJ. Effect of repeated sputum induction on cell counts in normal volunteers. *Thorax*. 1998;53:87-90.
206. Dubakienė R, Ėmužytė R, Leišytė P, Razgauskas E. Alergijos diagnostika in vivo. (Allergy diagnostics in vivo). *Metodinė mokomoji medžiaga*. Vilnius;1999.
207. Miller MR, Hankinson J, Brusasco V, et al. Standardisation of spirometry. Series “ATS/ERS Task Force: standardisation of lung function testing“. Edited by V. Brusasco, R. Crapo and G. Viegi. *Eur Respir J* 2005; 26:319-38.

208. Quanjer PH, Tammeling GJ, Cotes JE, Pedersen OF, Peslin R, Yernault JC. Lung volumes and forced ventilatory flows. Report working party. Standardization of lung function tests. European Community for Steel and Coal. Official statement of the European Respiratory Society. *Eur Respir J* 1993;6:5-40.
209. Malakauskas K, Bagdonas A, Ryškus L, Sakalauskas R. Spirometrija: atlikimo metodika ir klinikinė interpretacija. *Metodinės rekomendacijos*. Kaunas, 1998.
210. Chanez P, Holz O, Indz PW, Djukanovic R, Maestrelli P, Sterk PJ. Sputum induction. *Eur Respir J* 2002;20:3–8.
211. Popov TA, Pizzichini MM, Pizzichini E, Kolendowicz R, Punthakee Z, Dolovich J, Hargreave FE. Some technical factors influencing the induction of sputum for cell analysis. *Eur Resp J* 1995; 8: 559-565.
212. Di Stefano A, Capelli A, Lusuardi M, Balbo P, Vecchio C, Maestrelli P, Mapp CE, Fabbri LM, Donner CF, Sietta M. Severity of airflow limitation is associated with severity of airway inflammation in smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158: 1277–1285.
213. V. Čekanauskas, G. Murauskas. Statistika ir jos taikymai. 2003 Vilnius.
214. De la Fuente PT, Romagnoli M, Godard P, Bousquet J, Chanez P. Safety of inducing sputum in patients with asthma of varying severity. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:1127–30.
215. Brinke A, Lange C, Zwinderman AH, Rabe FR, Sterk PJ, Bel EH. Sputum induction in severe asthma by a standardized protocol. predictors of excessive bronchoconstriction. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:749–53.
216. Busse WW, Sedgwick JB. Eosinophils in asthma. *Ann Allergy* 1992;68:289-290.
217. Calhoun WJ, Sedgwick JB, Busse WW. The role of eosinophils in the pathophysiology of asthma. *Ann N Y Acad Sci* 1991;629:62-72.
218. Lieberman P. Objective measures of asthma control: sputum eosinophils, nitric oxide, and other inflammatory mediators. *Allergy Asthma Proc.* 2007;28:510-513.
219. Gibson P G, Dolovich J, Girgis-Gabardo A, Morris M M, Anderson M, Hargreave F E, Denburg J A. The inflammatory response in asthma exacerbation: changes in circulating eosinophils, basophils and their progenitors. *Clinical and experimental allergy* 1990;20:661-668.
220. Humbles AA, Lloyd CM, McMillan SJ, Friend DS, Xanthou G, McKenna EE, Ghiran S, Gerard NP, Yu C, Orkin SH, Gerard C. A critical role for eosinophils in allergic airways remodeling. *Science*. 2004;305:1776-9.

221. Wenzel SE, Szeffler SJ, Leung DY, Sloan SI, Rex MD, Martin RJ. Bronchoscopic evaluation of severe asthma: persistent inflammation associated with high dose glucocorticoids. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:737-43.
222. Ordonez CL, Shaughnessy TE, Matthay MA. Increased neutrophil numbers and IL-8 levels in airway secretions in acute severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:1185-90
223. Leung D, Nelson H, Szeffler S, Busse W. Neutrophils in severe asthma. Innocent bystanders or active participants? *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2003;6;1019-1019.
224. Thomas R A, Green RH, Brightling CE, Birring SS, Parker D, Wardlaw AJ, Pavord ID. The influence of age on induced sputum differential cell counts in normal subjects. *Chest* 2004;126:1811-1814.
225. Gibson PG, Simpson JL, Saltos N. Heterogeneity of airway inflammation in persistent asthma. Evidence of Neutrophilic inflammation and increased sputum interleukin-8. *Chest* 2001;119:1329-36.
226. Barry KA. The role of T lymphocytes in asthma. *Chem Immunol Allergy* 2006;91:59-75.
227. Truyen E, Coteur L, Dilissen E, Overbergh L, Dupont L J, Ceuppens J L, Bullens D M A. Evaluation of airway inflammation by quantitative Th1/Th2 cytokine mRNA measurement in sputum of asthma patients. *Thorax* 2006;61:202-208.
228. Pesola GR, Abdul-Waheed S, Daniel H. Monitoring disease activity in asthma . *The Internet Journal of Asthma, Allergy and Immunology*. 2005;4:2.
229. Nagai H; Yamaguchi S; Inagaki N; Tsuruoka N; Hitoshi Y; Takatsu K. Effect of anti-IL-5 monoclonal antibody on allergic bronchial eosinophilia and airway hyperresponsiveness in mice. *Life sciences* 1993;53:PL243-247.
230. Leckie MJ, Brinke A, Khan J, Diamant Z, O'Connor BJ, Walls CM, et. Al. Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyperresponsiveness, and the late asthmatic response. *Lancet* 2000;356:2144-2148.
231. Grootendorst DC, Rabe KF. Mechanisms of Bronchial Hyperreactivity in Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Proc Am Thorac Soc* 2004;1:77-87.
232. Iredale MJ, Wanklyn SAR, Philips IP, Krausz T, Ind PW. Noninvasive assessment of bronchial inflammation in asthma: no correlation between eosinophilia of induced sputum and bronchial responsiveness to inhaled hypertonic saline. *Clin Exp Allergy* 1994;24:940-5.

233. Louis R, Sele J, Henket M, Cataldo D, Bettiol J, Seiden L, Bartsch P. Sputum eosinophil count in a large population of patients with mild to moderate steroid-naive asthma: distribution and relationship with methacholine bronchial hyperresponsiveness. *Allergy* 2002;57:907–12.
234. Cui J, Pazdziorko S, Miyashiro JS, Thakker P, Pelker JW, Declercq C et al. A TH1-mediated airway hyperresponsiveness independent of neutrophilic inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115:309-15.
235. Hayashi N, Yoshimoto T, Izuhara K, Matsui K, Tanoka T, Nakanishi K. T helper 1 cells stimulated with ovalbumin and IL-18 induce airway hyperresponsiveness and lung fibrosis by INF- γ and IL-13 production. *PNAS* 2007;37:14765-14770.
236. Fahy JV, Boushey HA, Lazarus SC, Mauger EA, Cherniack RM, Chinchilli VM, Craig TJ, Drazen JM, Ford JG, Fish JE, Israel E, Kraft M, Lemanske RF, Martin RJ, McLean D, Peters SP, Sorkness C, Szeffler SJ. Safety and reproducibility of sputum induction in asthmatic subjects in a multicenter study. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163: 1470–1475.
237. Kips JC, Fahy JV, and Hargreave FE. Methods of sputum induction and analysis of induced sputum: a method for assessing airway inflammation in asthma. *Eur Resp J* 1998; 11: 9s-12s.
238. Keatings VM, Evans DJ, O'Connor BJ, Barnes PJ. Cellular profiles in asthmatic airways: a comparison of induced sputum, bronchial washings, and bronchoalveolar lavage fluid. *Thorax* 1997; 52: 372-374.
239. Bousquet J, Jeffery PK, Busse WW, Johnson M, Vignola A. Asthma. From bronchoconstriction to inflammation and remodeling. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 1720-1745.
240. Chalmers GW, MacLeod KJ, Thomson L, Little SA, McSharry C, Thomson NC. Smoking and airway inflammation in patients with mild asthma. *Chest* 2001;120:1917-1922.
241. Silverman RA, Boudreaux ED, Woodruff PG, Clark S, Camargo CA Jr. Cigarette smoking among asthmatic adults presenting to 64 emergency departments. *Chest* 2003;123:1472–1479.
242. Thomson NC, Chaudhuri R, Livingston E. Asthma and cigarette smoking. *Eur Respir J* 2004; 24: 822–833.
243. Oltmanns U, Chung KF, Salters M, John M, Mitchell JA. Cigarette smoke induces IL-8, but inhibits eotaxin and RANTES release from airway smooth muscle. *Respir Res* 2005; 6: 74-84.

244. Kubo S, Kobayashi M, Masunaga Y, Ishii H, Hirano Y, Takahashi K, Shimizu Y. Cytokine and chemokine expression in cigarette smoke-induced lung injury in guinea pigs. *Eur Respir J* 2005; 26: 993-1001.
245. Yamamoto K, Takanashi S, Hasegawa Y, Kanehira Y, Kaizuka M, Okumura K. Eotaxin level n induced sputum is increased in patients with bronchial asthma and in smokers. *Respiration* 2003; 70: 600-5.
246. Allen SJ, Crown SE, Handel TM. Chemokine: receptor structure, interactions and antagonism. *Annu Rev Immunol* 2007; 25: 787-820.
247. Van Wetering S, Zuyderduyn S, Ninaber DK, van Sterkenburg MA, Rabe KF, Hiemstra PS. Epithelial differentiation is a determinant in the production of eotaxin-2 and -3 by bronchial epithelial cells in response to IL-4 and IL-13. *Mol Immunol* 2007; 44: 803-811.
248. Min GM, Song DJ, Miller M, Cho JY, McElwain S, Ferguson P, Broide DH. Coexposure to environmental tobacco smoke increases levels of allergen-induced airway remodeling in mice. *The Journal of Immunology* 2007; 178: 5321-5328.
249. Moerloose KB, Pauwels A, Joos GF. Short-term cigarette smoke exposure enhances allergic airway inflammation in mice. *AM J Respir Crit Care Med* 2005; 172: 168-172.
250. Holgate ST. Pathogenesis of asthma. *Clin Exp Allergy* 2008; 38: 872-897.
251. Yang M, Hogan SP, Mahalingam S, Pope SM, Zimmermann N, Fulkerson P, Dent LA, Young I, Matthaei KI, Rothenberg ME, Foster PS. Eotaxin-2 and IL-5 cooperate in the lung to regulate IL-13 production and airway eosinophilia and hyperreactivity. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112: 935-943.
252. Moerloose KB, Robays LJ, Maes T, Brusselle GG, Tournoy KG, Joos GF. Cigarette smoke exposure facilitates allergic sensitization in mice. *Respir Res* 2006; 7: 49.
253. Menies-Gow A, Ying S, Sabroe I, Stulbs VL, Soler D, Williams TJ, Kay B A. Eotaxin (CCL11) and eotaxin-2 (CCL-24) induce recruitment of eosinophils, basophils, neutrophils and macrophages as following cutaneous injection in human atopic and non atopic volunteers. *The Journal of Immunology* 2002; 169: 2712-2718.
254. Bumbacea D, Scheerens J, Mann BS, Stirling RG, Chung KF. Failure of sputum eosinophilia after eotaxin inhalation in asthma. *Thorax* 2004; 59: 372-375.
255. St-Laurent J, Bergeron C, Pagé N, Couture C, Laviolette M, Boulet LP. Influence of smoking on airway inflammation and remodelling in asthma. *Clinical Experimental Allergy* 2008;38:1582-9.

256. Thatcher TH, Benson RP, Phipps RP, SimePJ. High-dose but not low-dose mainstream cigarette smoke suppresses allergic airway inflammation by inhibiting T cell function. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008;295: 412-421.

11. PUBLIKACIJOS DOKTORANTŪROS TEMA

Straipsnių disertacijos tema sąrašas:

1. Kriščiūnienė A, Šitkauskienė B, Malakauskas K, Sakalauskas R. Indukuotų skreplių ląstelinės sudėties savybės sergant alergine ir nealergine astma. *Medicina* 2005;3:196-202.
2. Šitkauskienė B, Kriščiūnienė A, Sakalauskas R. Difficult/Therapy-Resistant Asthma: Pathogenesis and Possible Relationship with Tobacco Smoke. *Current Respiratory Medicine Reviews* 2006;1:67-74.
3. Kriščiūnienė A, Babušytė A, Sakalauskas R, Šitkauskienė B. Rūkymo sąlygoti kvėpavimo takų uždegimo ypatumai sergant alergine ir nealergine astma. *Lietuvos bendrosios praktikos gydytojas* 2009;1:8-15.
4. Kriščiūnienė A, Babušytė A, Stravinskaitė K, Lotvall J, Sakalauskas R, Šitkauskienė B. Smoking affects eotaxin levels in asthma patients. *The Journal of Asthma* 2009. In press.

Kitos publikacijos:

1. Kriščiūnienė A, Babušytė A, Sakalauskas R, Šitkauskienė B. Sergančiųjų astma kūno masės įtaka eotaksino koncentracijai. *Pulmonologija, imunologija ir alergologija: mokslinės tezės*. 2008;1:54.
2. Babušytė A, Kriščiūnienė A, Jerock J, Sakalauskas R, Lotvall J, Šitkauskienė B. BAL MMP-12 expression in asthmatics comparing with COPD smokers and ex-smokers. *Allergy* 2007;62:469.
3. Kriščiūnienė A, Babušytė A, Ragaišienė S, Sakalauskas R, Šitkauskienė B. Overweight affects eotaxin levels in asthma patients. *WAO*, 2008; p. 96, no. 538.
4. Kriščiūnienė A, Babušytė A, Jakubanis I, Malakauskas K, Sakalauskas R, Šitkauskienė B. Rūkymo įtaka eotaksinų koncentracijai kraujo serume, skreplių supernatante bei bronchų ir alveolių išplovose (BAL) skystyje. *Pulmonologija, imunologija ir alergologija*. 2007;1:47.
5. Kriščiūnienė A, Babušytė A, Malakauskas K, Sakalauskas R, Šitkauskienė B. Tobacco smoke affects eotaxin levels in asthma and COPD patients. *Allergy*, 2007; 83:470.
6. Ragaišienė S, Kriščiūnienė A, Babušytė A, Malakauskas K, Sakalauskas R, Šitkauskienė B. Allergic asthmatics who are smokers have higher number of sputum neutrophils. *European Academy of Allergology and Clinical Immunology*, 2006; 351.

7. Babušytė A, Krišukėnienė A, Šitkauskienė B, Jeroch J, Malakauskas K, Sakalauskas R. Bronchų sekreto IL-9 raiškos analizė imunocitocheminiu ir imunof fermentiniu metodais. *Biochemija: mokslas ir žinių visuomenė*. 2006; 20.
8. Ragaišienė S, Krišukėnienė A, Babušytė A, Malakauskas K, Sakalauskas R, Šitkauskienė B. Rūkančių ir nerūkančių alergine astma sergančių pacientų indukuotų skreplių ląstelinės sudėties ypatumai // Konferencija "Pulmonologija, alergologija ir klinikinė imunologija 2006" : mokslinių darbų tezės. 2006:7.
9. Krišukėnienė A, Babušytė A, Sakalauskas R, Šitkauskienė B. Serum eotaxin-3 is associated with eosinophilia in asthma and COPD patients. *Basic Science in Allergology and Clinical Immunology, a Prerequisite for Improving Patient Care and 100 years of Allergy as defined by Clemens von Pirquet*. 2006;349.
10. Krišukėnienė A, Babušytė A, Šitkauskienė B, Malakauskas K, Sakalauskas R. Serumo eotaksino-3 sąsajos su eozinofilų kiekiu indukuotuose skrepliuose bei kraujyje sergant astma. Konferencija "Pulmonologija, alergologija ir klinikinė imunologija 2006" : mokslinių darbų tezės. 2006:4.
11. Krišukėnienė A, Šitkauskienė B, Babušytė A, Jučienė A, Sakalauskas R. Sunkios astmos klinikiniai fenotipai, diagnostikos bei gydymo ypatumai. *Lietuvos bendrosios praktikos gydytojas*: 2006;5:336-340.
12. Krišukėnienė A, Šitkauskienė B, Babušytė A, Malakauskas K, Sakalauskas R. Rūkančiųjų ir nerūkančiųjų pacientų, sergančių astma, indukuotų skreplių ląstelinės sudėties ypatumai. Konferencija "Pulmonologija. Alergologija ir klinikinė imunologija 2005".2005:4.
13. Krišukėnienė A, Šitkauskienė B, Malakauskas K, Sakalauskas R. Allergic vs non-allergic asthma: correlation between inflammatory cell counts and bronchial hyperresponsiveness. *ERS scientific seminar "The bronchial smooth muscle in bronchial responsiveness" : programme, [abstracts]*.2004.
14. Krišukėnienė, Algirda; Šitkauskienė, Brigita; Malakauskas, Kęstutis; Sakalauskas, Raimundas. Indukuotų skreplių ląstelinės sudėties palyginimas sergant LOPL ir nealergine astma / A. Krišukėnienė, B. Šitkauskienė, K. Malakauskas, R. Sakalauskas // Konferencija "Pulmonologija, alergologija ir klinikinė imunologija 2004".2004:32.
15. Krišukėnienė A, Šitkauskienė B, Malakauskas K, Sakalauskas R.. Indukuotų skreplių ląstelinės sudėties ypatumai sergant alergine ir nealergine astma .Konferencija "Pulmonologija, alergologija ir klinikinė imunologija 2004" : [konferencijos tezės], 2004 04 23, Kaunas. Kaunas, 2004. p. 33.

16. Sitkauskiene B, Kriškiūnienė A, Malakauskas K, Sakalauskas R. Inflammatory cell counts in induced sputum from non-allergic asthmatics and COPD patients. *The European respiratory journal*. 2004; 48:317.
17. Kriškiūnienė A, Sitkauskiene B, Malakauskas K, Sakalauskas. Peculiarities of induced sputum inflammatory cell counts in allergic vs intrinsic asthma. XXIII EAACI Congress : The young investigator at the frontiers of Allergy: abstracts book 2004:209.