

Simona Avčn¹, Matej Jezernik²

Ocena tipa in aktivnosti vnetja pri bolnikih z obstruktivno pljučno boleznijo³

Type and Activity of Inflammation in Obstructive Lung Diseases

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: pljučne bolezni obstruktivne, sputum – citologija, vnetje, levkocitna elastaza – kri, eozinofilci

Vnetje v dihalnih poteh ima pomembno vlogo pri nastanku obstruktivne pljučne bolezni. S kliničnimi preiskavami prepoznavamo le spremembe delovanja, težko pa odkrijemo in ločimo vrsto vnetja. Izzvan izmeček (induciran sputum) je novejša, neinvazivna metoda, s katero ugotavljamo vrsto in aktivnost vnetnega dogajanja v dihalnih poteh. Želeli smo ugotoviti ali je izbrana metoda diagnostično uporabna za ugotavljanje vrste in aktivnosti vnetnega dogajanja pri bolnikih z astmo in kronično obstruktivno pljučno boleznijo. Zanimal nas je delež vnetnih celic in koncentracija topnih označevalcev vnetja. V raziskavo smo vključili 21 zdravih preiskovancev, 17 bolnikov z astmo in 6 bolnikov s kronično obstruktivno pljučno boleznijo v ustaljeni fazi bolezni. Z metodo izzivanja izmečka (induciranja sputuma) smo pridobili vzorce in v njih določili delež, vrsto vnetnih celic in koncentracijo eozinofilne kationske beljakovine in nevtrofilne elastaze. Merili smo tudi serumsko koncentracijo eozinofilne kationske beljakovine in nevtrofilne elastaze. Delež eozinofilcev je bil pri bolnikih z astmo ($8,2 \pm 10,8\%$) statistično značilno večji kot pri zdravih preiskovancih ($0,3 \pm 0,6\%$) ($p < 0,05$). Delež eozinofilcev pri bolnikih s KOPB je bil ($2,4 \pm 1,9\%$). Delež nevtrofilcev je bil pri bolnikih s kronično obstruktivno pljučno boleznijo ($89,5 \pm 2,0\%$) statistično značilno večji kot pri bolnikih z astmo ($65,8 \pm 23,7\%$) ($p < 0,05$). Koncentracija eozinofilne kationske beljakovine v izzvanem izmečku je bila pri bolnikih z astmo ($148 \pm 103,5 \mu\text{g/l}$) in pri bolnikih s kronično obstruktivno pljučno boleznijo ($112,7 \pm 122,2 \mu\text{g/l}$) statistično značilno višja kot pri zdravih preiskovancih ($48,3 \pm 36,8 \mu\text{g/l}$) ($p < 0,05$). Delež eozinofilcev in koncentracija eozinofilne kationske beljakovine v izzvanem izmečku sta diagnostično uporabna za razlikovanje bolnikov z astmo od zdrave populacije. Delež nevtrofilcev v izzvanem izmečku je primeren za razlikovanje bolnikov s kronično obstruktivno pljučno boleznijo od bolnikov z astmo. Merjenje koncentracije eozinofilne kationske beljakovine in nevtrofilne elastaze v izzvanem izmečku in serumu ne razlikuje bolnikov s kronično obstruktivno pljučno boleznijo in astmo.

ABSTRACT

KEY WORDS: lung diseases, obstructive, sputum – cytology, inflammation, leukocyte elastase – blood, eosinophils

Airway inflammation is fundamental to the persistence of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. The hypothesis that induced sputum cell counts and mediators could help discriminate between asthma and chronic obstructive pulmonary disease was tested. Cell counts and the concentration of ECP and PMN elastase were measured in induced sputum and serum of 21 healthy subjects, 17 patients with asthma and 6 with stable chronic

¹ Simona Avčn, dr. med., Klinični oddelek za pljučne bolezni in alergijo, Golnik 36, 4204 Golnik.

² Matej Jezernik, abs. med., Klinični oddelek za pljučne bolezni in alergijo, Golnik 36, 4204 Golnik.

³ Delo je bilo nagrajeno s fakultetnim Prešernovim priznanjem.

obstructive pulmonary disease. Induced sputum eosinophils were significantly higher in case of asthma ($8.2 \pm 10.8\%$) than in healthy subjects ($0.3 \pm 0.6\%$) ($p < 0.05$), but chronic obstructive pulmonary disease (2.4 ± 1.9). Neutrophil counts were significantly higher in patients with chronic obstructive pulmonary disease (89.5% , S. D. 2.0%) than in those with asthma (65.8% , S. D. 23.7%) ($p < 0.05$). Induced sputum ECP were higher in asthma ($148 \pm 104 \mu\text{g/l}$) and chronic obstructive pulmonary disease ($113 \pm 122 \mu\text{g/l}$) than in healthy subjects ($48 \pm 37 \mu\text{g/l}$) ($p < 0.05$). Eosinophil counts and ECP concentration in induced sputum could be used to discriminate between patients with asthma and healthy subjects. Neutrophil counts in induced sputum could be used to discriminate between patients with chronic obstructive pulmonary disease and asthma. However, measurement of ECP and PMN elastase concentration in induced sputum and serum would not discriminate between patients with chronic obstructive pulmonary disease and asthma.

UVOD

Za obstruktivne pljučne bolezni je značilna zožitev svetline ter povečanje upora v dihalnih poteh. Merilo za postavitev diagnoze je zmanjšanje razmerja FEV_1/VC (Tiffeneaujev indeks) pod 0,7 pri preiskavi pljučne funkcije.

Najpogostejši obstruktivni boleznj pljuč sta astma in kronična obstruktivna pljučna bolezen (KOPB). Kljub temu, da se razlikujeta glede na etiologijo, zdravljenje in napoved, ima približno 10% bolnikov z obstruktivno motnjo ventilacije klinične značilnosti tako astme kot KOPB (3, 4). Z uporabo običajnih diagnostičnih testov ne moremo zanesljivo postaviti diagnoze predvsem pri odkrivanju zgodnjih oblik KOPB ter pri ločevanju med napredovalo obliko KOPB in kronično trajno astmo (5).

KOPB je bolezen z napredovano obstruktivno motnjo ventilacije, ki je le delno povratna (6, 7). Poleg kroničnega vnetja, razraščanja veziva, hipertrofije gladkih mišičnih celic in povečanega izločanja sluzi v manjših bronhih in bronhiolih je prizadet tudi pljučni parenhim, ki se kaže z nastankom panlobularnaga emfizema (8). Od vnetnih celic prevladujejo nevtrofilci, ki hitro prehajajo skozi steno v svetlino dihalnih poti. Globlje v sluznici najdemo makrofage, citotoksične limfocite T (CD8+) in le majhno število nevtrofilcev. Delež eozinofilcev se lahko pomembno zviša ob poslabšanih boleznj (4). Nevtrofilci kažejo visoko stopnjo aktivnosti, medtem ko si rezultati raziskav glede aktivnosti eozinofilcev nasprotujejo (6, 9). Aktivnost posameznih vrst celic ugotavljamo z merjenjem koncentracij topnih označevalcev. Nevtrofilci izločajo mieloperoksidazo (MPO)

in nevtrofilno elastazo (EN), za eozinofilce je značilna eozinofilna kationska beljakovina (EKB) (10).

Pri astmi je obstruktivna motnja ventilacije povsem ali močno povratna po zdravljenju ali spontano. Značilen histološki izvid sluznice bronhov pokaže prisotnost številnih eozinofilcev (9). Delež teh celic, pri katerem lahko z gotovostjo trdimo, da gre za astmatsko vnetje, še ni natančno določen. Delež eozinofilcev pri zdravih osebah ne presega 2,4% (10, 11). Pri astmi vzdržujejo vnetno dogajanje limfociti T (CD4+) (9, 14). Preoblikovanje dihalnih poti je posledica kroničnega vnetja, poškodbe epitela zaradi delovanja EKB, razraščanja vezivnega tkiva ter hipertrofije gladkih mišičnih celic. Nezdravljena ali slabo vodena bolezen poslabša povratnost obstruktivne motnje in povzroči trajno zoženje svetline (8).

Izzvani izmeček (II) je preiskavna metoda, s katero spodbudimo naravno izločanje sluzi iz dihalnih poti. Preiskovanec vdihava aerosol izo- ali hipertonične raztopine, ki draži sluznico, sproži kašelj in izkašljevanje izmečka (19). V vzorcu II ugotavljamo prisotnost in aktivacijo vnetnih celic ter prisotnost topnih označevalcev vnetja (17,18). Največji delež izmečka izvira iz sapnika in večjih bronhov, medtem ko je delež iz perifernih dihalnih poti manjši (20-22). Z barvanjem citoloških preparatov ločimo vnetne celice med seboj in od celic dihalnega epitela (23). V supernatantu in usedlini vzorca lahko merimo koncentracije vnetnih beljakovin (24, 25).

Pomembna prednost II pred ostalimi preiskovalnimi metodami je neinvazivnost in dobra ponovljivost vzorcev (32). V spontanem izmeč-

ku je manj ohranjenih celic, kakovost preparatov je slabša (26), a pomembnih razlik pri številu celic in diferencialni sliki ni (27). Pri bronhovezikularnem izpiranju izvirajo vzorci predvsem iz perifernih dihalnih poti, kjer je več makrofagov in limfocitov (28). Pri II prevladujejo nevtrofilci in epitelne celice (29, 30). Z II je najbolj primerljivo bronhialno izpiranje, ker pri obeh preiskavah zbiramo vzorce iz večjih dihalnih poti (31).

Pri nekaterih bolnikih z obstruktivno motnjo ventilacije šele s prepoznavo tipa in aktivnosti vnetja postavimo diagnozo bolezni in predpišemo ustrezno zdravljenje. Rezultati kliničnih študij kažejo, da je II v teh primerih najbolj primerna preiskovalna metoda (31). Bolnike s KOPB lahko odkrijemo v zgodnji fazi bolezni, ko so klinični simptomi in obstrukcijska motnja še slabo izraženi (32). Pri bolnikih z astmo potrdimo diagnozo, še posebej, kadar so rezultati funkcionalnih preiskav v območju mejnih vrednosti. Metoda je uporabna tudi za spremljanje odziva na protivnetno zdravljenje in vnetnega dogajanja med poslabšanji (33).

NAMEN IN HIPOTEZA

Želeli smo ugotoviti, ali je II diagnostično uporabna metoda za ugotavljanje vrste in aktivnosti vnetnega dogajanja pri bolnikih z obstruktivnim sindromom.

Delovna hipoteza: Bolnike z astmo bomo ločili od bolnikov s KOPB in zdravih preiskovancev glede na delež posameznih vnetnih celic in koncentracijo topnih označevalcev vnetja.

PREISKOVANCI IN METODE DELA

Preiskovanci

Iz računalniškega sistema MEDO Bolnišnice Golnik, Kliničnega oddelka za pljučne bolezni in alergijo smo poiskali bolnike z glavno odpustno diagnozo astma (J49 po 10. mednarodni razvrstitvi bolezni MKB) in KOPB (J448 ali J449). Vsi bolniki so bili v ustaljeni fazi bolezni.

Večina preiskovanih bolnikov z astmo je redno uporabljala inhalacijske glukokortikoidne in simpatikomimetik v razpršilu. Nekateri

so ob tem prejeli tudi montelukast. Bolniki s KOPB so prejeli Berodual® za širjenje bronhov (kombinacija salbutamola in ipratropijevega bromida, Boehringer Ingelheim). Kot nadzorno skupino smo vključili zdrave prostovoljce.

Preiskovance smo razdelili v kadilce in nekadilce. Število pokajenih cigaret smo izrazili s produktom med številom zavojčkov (po 20 cigaret), pokajenih na dan, in številom let kajenja (zavojček/leto). Zabeležili smo prisotnost morebitnih drugih bolezni in prejetanje zdravil za druge bolezni. Preiskovanci so bili o namenu in ciljnih raziskave seznanjeni in so podpisali pristanek za sodelovanje v raziskavi. Raziskavo je odobrila Republiška komisija za medicinsko etiko pri Ministrstvu za zdravje (številka 79/02/02).

Odvzem krvi

Na začetku smo preiskovancem odvzeli vzorec krvi, pustili, da se strdi pri sobni temperaturi eno uro, ga nato centrifugirali in serum shranili pri temperaturi -20°C .

Meritev pljučne funkcije

Pljučno funkcijo smo merili pred izzivanjem izmečka in po njem. Z vitalografom (Vitalograph 2160, Vitalograph, Ennis, Velika Britanija) smo izmerili FEV_1 ter vitalno kapaciteto (VC) in izračunali razmerje FEV_1/VC . Če se je FEV_1 po izzivanju izmečka zmanjšal za več kot 15%, je preiskovanec prejel 4 vpihe po 100 μg hitro delujočega salbutamola za širjenje bronhov v obliki razpršila (Ventolin®, GlaxoWellcome). Pljučno funkcijo smo izmerili tudi med samim izzivanjem izmečka, če je preiskovanec začel težje dihati ali je imel občutek tiščanja v prsnem košu.

Izzivanje izmečka

Za izzivanje izmečka smo uporabili PariMaster vlažilnik s Pari LL uparjalnikom, pretok 0,48 ml/min, srednji premer delcev 3,6 μm in 65% vseh delcev pod 5 μm (Pari GmbH, Starnberg, Nemčija). Meritve smo opravili v dopoldanskem času med 8. in 12. uro. Preiskovanec je 15 minut vdihaval aerosol 4,5% raztopine natrijevega klorida.

Obdelava II

II smo takoj laboratorijsko obdelali. Dodali smo enako količino 10% raztopine ditiotreitoloma (DTT) (Sputolysin® Reagent, Calbiochem-Novabiochem Corporation, San Diego, Kalifornija, Združene države Amerike) v raztopini fosfatnega pufru in čez 15 minut vzorec prefiltrirali. Za štetje celic v Neubauerjevi komori (Neubauer Fein-optik, Bad Blankenburg, Nemčija) smo odvzeli 25 µl vzorca, preostali vzorec smo 10 minut centrifugirali pri 2500 vrtljajih/min. Supernatant smo shranili pri temperaturi -20 °C za kasnejše določanje koncentracije EKB in EN. Usedlino smo citocentrifugirali na objektna stekelca s citocentrifugo Cytospin 3 (Shandon Southern Products Limited, Velika Britanija) 5 minut pri 1250 vrtljajih/min. En preparat smo utrdili v metanolu in barvali po Papanicolau (PAP) po vpeljanem postopku. Tri preparate smo posušili na zraku, dva od teh smo barvali po metodi May-Grunwald-Giemsma (MGG) in enega s Toluidinskim modrilom.

Štetje in določanje celic

Šteli smo do 200 vnetnih celic in razlikovali med nevtrofilci, eozinofilci, makrofagi in limfociti. Mononuklearne celice smo šteli kot limfocite. Celic ploščatega in dihalnega epitela nismo šteli. Število prešteti celic posamezne vrste smo prikazali kot delež te vrste celic v II. Pri štetju celic smo uporabili enosmerno slepo metodo.

Določanje koncentracije EKB in EN

Koncentracijo EKB v supernatantu II in serumu smo izmerili z uporabo komercialnega fluores-

cenčno encimsko imunskega testa Pharmacia UniCAP FEIA po navodilu proizvajalca (Pharmacia and Upjohn Diagnostics AB, Uppsala, Švedska). Koncentracijo EN v supernatantu II in serumu smo izmerili z uporabo encimsko imunskega prodajnega seta Milenia PMN elastaza EIA po navodilu proizvajalca (DPC Biermann GmbH, Bad Nauheim, Nemčija).

Preiskave smo opravili na Oddelku za respiratorno fiziologijo in patofiziologijo, v Laboratoriju za citopatologijo in Imunološkem laboratoriju Bolnišnice Golnik, Kliničnega oddelka za pljučne bolezni in alergijo v času od marca do avgusta 2002.

Statistične metode

Podatke smo prikazali s povprečno vrednostjo in standardnim odklonom. Za preverjanje ničelnih hipotez smo uporabili Wilcoxonov test z vsoto rangov, test hi-kvadrat in koeficient korelacije po Pearsonu. Ničelne hipoteze smo zavrnilo s 5% tveganjem ($p < 0,05$).

REZULTATI

Demografski podatki za vse preiskovance so prikazani v tabeli 1. Bolniki s KOPB so bili statistično značilno starejši od bolnikov z astmo in od zdravih preiskovancev. Vse tri skupine so se med seboj statistično značilno razlikovale v deležu (%) FEV₁. Rezultat FEV₁ na kontrolnem pregledu največ šest mesecev pred preiskavo pri nobenem od bolnikov ni odstopal za več kot 100 ml.

Preiskovanci med izzivanjem izmečka niso navajali izrazitih osebnih težav, le nekateri so tožili nad pekočim občutkom v grlu. Vsi zdravi preiskovanci in bolniki z astmo so

Tabela 1. Osnovni demografski podatki za zdrave preiskovance, bolnike z astmo in KOPB. Statistično pomembne razlike med skupinami ($p < 0,05$) so označene s * in +. Legenda: Ž – ženske in M – moški. Rezultati so prikazani s srednjo vrednostjo in standardnim odklonom. FEV₁ je volumen izdihanega zraka v prvi sekundi forsiranega izdih pred II. Število pokajenih zavojevček/leto prikazuje število let, v katerih je preiskovanec pokadil 20 cigaret (en zavojevček) na dan.

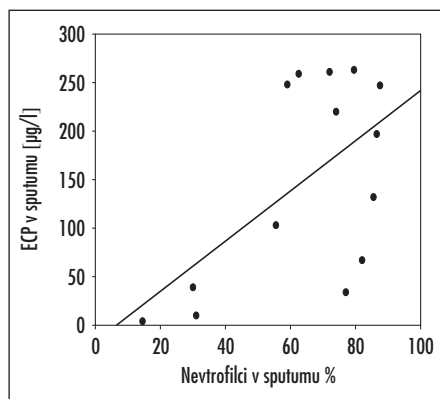
	Zdravi	Astma	KOPB
Število preiskovancev	21 (9 Ž, 12 M)	17 (10 Ž, 7 M)	6 (1 Ž, 5 M)
Kadilci	5 (1 Ž, 4 M)	6 (2 Ž, 4 M)	6 (1 Ž, 5 M)
Glukokortikoidi	0	12 (6 Ž, 6 M)	0
Starost (leta)*	42,7 ± 15,5	51,0 ± 18,3	70,2 ± 11,1*
FEV ₁ (%)+	100,7 ± 9,1+	74,9 ± 26,7+	42,5 ± 11,3+
Število pokajenih zavojevček/leto	16,0 ± 12,0	32,8 ± 16,9	43,0 ± 22,9

Tabela 2. Volumen in koncentracija celic v II pri zdravih preiskovancih, bolnikih z astmo in KOPB. Rezultati so prikazani s srednjo vrednostjo in standardnim odklonom. Statistično pomembne razlike med skupinami ($p < 0,05$) so označene s * in ⁺. Legenda: II – izzvani izmeček.

	Zdravi	Astma	KOPB
Volumen izmečka [ml]	3,7 ± 2,0	4,3 ± 3,5	4,4 ± 3,1
Število celic v μ l II	183,2 ± 99,4*	613 ± 553* ⁺	183,0 ± 99,1 ⁺

II izkašljali v zadnjih minutah ali nekaj minut po preiskavi. Bolniki s KOPB so izkašljevali že po prvih minutah preiskave. Po vdihavanju hipertonične raztopine se je 35 % bolnikom z astmo in 66 % bolnikom s KOPB FEV₁ zmanjšal za več kot 15 %, kar pri zdravih preiskovancih nismo opazili. Dva bolnika z astmo nista uspela izkašljati II. Skupine preiskovancev se po volumnu II niso statistično značilno razlikovale med seboj, so pa bolniki z astmo imeli statistično značilno več celic v II kot bolniki s KOPB in zdravi preiskovanci ($p < 0,05$) (tabela 2).

Delež eozinofilcev v II je bil največji pri bolnikih z astmo in se je statistično značilno razlikoval ($p < 0,05$) od skupine zdravih preiskovancev. Tudi pri bolnikih s KOPB je bil delež eozinofilcev v II značilno večji kot pri zdravih preiskovancih. Največji delež nevtrofilcev v II je imela skupina bolnikov s KOPB, ki smo jo lahko statistično značilno ločili



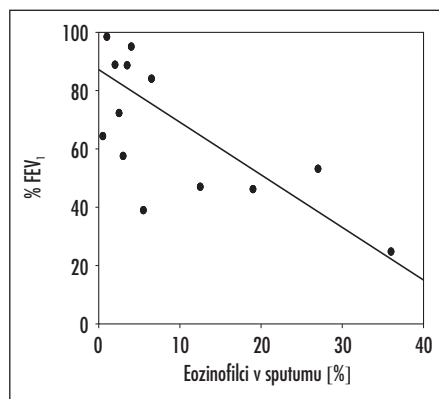
Slika 1. Odvisnost koncentracije EKB v II od deleža nevtrofilcev pri bolnikih z astmo ($r = 0,59$ in $p < 0,05$, test skladnosti rangov po Pearsonu).

Tabela 3. Delež in koncentracija posameznih vrst celic v II pri zdravih preiskovancih, bolnikih z astmo in KOPB. Rezultati so prikazani s srednjo vrednostjo in standardnim odklonom. Statistično pomembne razlike med skupinami ($p < 0,05$) so označene s * in ⁺.

	Zdravi	Astma	KOPB
Eozinofili [%]	0,3 ± 0,6* ⁺	8,2 ± 10,8*	2,4 ± 1,9 ⁺
Nevtrofili [%]	80,0 ± 19,6	65,8 ± 23,7*	89,5 ± 2*
Makrofagi [%]	19,3 ± 18,7*	25,1 ± 25,3 ⁺	7,4 ± 3,3* ⁺
Limfociti [%]	0,4 ± 0,4	0,9 ± 1,1	0,7 ± 1
Eozinofili/µl	0,8 ± 1,9* ⁺	48,1 ± 81,2*	3,8 ± 4,1 ⁺
Nevtrofili/µl	137,9 ± 57,0*	455,2 ± 483,3*	160,7 ± 98,4
Makrofagi/µl	43,8 ± 70,5*	106,7 ± 103,2*	13,0 ± 8,3
Limfociti/µl	0,9 ± 1,5	3,2 ± 4,4	2,1 ± 2,9

Tabela 4. Koncentracije EKB in EN v supernatantu II in serumu pri zdravih preiskovancih, bolnikih z astmo in KOPB. Rezultati so prikazani s srednjo vrednostjo in standardnim odklonom. Statistično pomembne razlike med skupinami ($p < 0,05$) so označene s * in ⁺ (test hi-kvadrat). Legenda: EKB – eozinofilna kationska beljakovina; EN – elastaza nevtrofilcev; II – izzvani izmeček.

	Zdravi	Astma	KOPB
EKB v II [µg/l]	48,3 ± 36,8* ⁺	148,9 ± 103,5*	112,7 ± 122,2 ⁺
EKB v serumu [µg/l]	8,2 ± 6,1	11,6 ± 8,4	13,5 ± 8,4
EN v II [ng/ml]	87,4 ± 78,7	193,6 ± 261,4	53,5 ± 33,2
EN v serumu [ng/ml]	314,3 ± 427,2	132,7 ± 119,7	266,5 ± 409,8



Slika 2. Odvisnost deleža FEV₁ od deleža eozinofilcev v II pri bolnikih z astmo ($r = -0,71$ in $p < 0,05$, test korelacije rangov po Pearsonu).

od skupine bolnikov z astmo. Največji delež makrofagov v II smo ugotovili pri bolnikih z astmo (tabela 3).

Najvišjo koncentracijo EKB v II smo izmerili pri bolnikih z astmo (tabela 4). Skupina bolnikov z astmo in skupina bolnikov s KOPB sta se v koncentraciji EKB v II statistično značilno razlikovali od zdravih preiskovancev ($p < 0,05$), ne pa tudi med seboj.

Pri bolnikih z astmo smo ugotovili statistično značilno povezavo med deležem nevtrofilcev in koncentracijo EKB v II (slika 1). Pomembne povezave med deležem eozinofilcev in EKB nismo ugotovili.

Pri bolnikih z astmo smo ugotovili statistično značilno povezavo med deležem eozinofilcev v II in vrednostjo FEV_1 , izmerjeno pred II (slika 2).

RAZPRAVA

Preiskovanci

Zdrave preiskovance smo izbrali po kliničnih merilih, ki na osnovi anamnestičnih podatkov niso imeli pljučne ali druge kronične bolezni. V raziskavo smo jih vključili z namenom, da bi ugotovili mejne vrednosti za deleže vnetnih celic v II ter koncentracijo EKB in EN v II in serumu ter na osnovi teh vrednosti ločili normalen in patološki laboratorijski izvid.

Pri bolnikih z astmo nismo upoštevali etiologije bolezni, saj je tip vnetja enak pri alergijski in nealergijski astmi. Vključili smo tudi bolnike, ki so prejemale inhalacijske glukokortikoide. Njihovi rezultati se niso bistveno razlikovali od rezultatov bolnikov z astmo, ki teh zdravil niso prejemale.

Bolniki z astmo so imeli v povprečju pred preiskavo manjšo vrednost FEV_1 od pričakovane, prav tako so imeli povečan delež eozinofilcev v dihalnih poteh. Statistično pomembna negativna povezava med deležem eozinofilcev v II in FEV_1 je skladna s podatki iz literature, da je pri bolnikih z astmo pljučna funkcija odvisna od aktivnosti vnetja v dihalnih poteh. Tudi z našo raziskavo ugotavljamo, da vnetje v dihalnih poteh v ustaljeni fazi astme vztraja kljub protivnetnemu zdravljenju (13, 14).

Izzivanje izmečka

Pri bolnikih s KOPB se je po preiskavi vrednost FEV_1 pri dveh tretjinah bolnikov zmanjšala

za več kot 15 %, vendar se je po uporabi hitro delujočega zdravila za širjenje bronhov čez nekaj minut vrnila na izhodno vrednost. 15 % zmanjšanje FEV_1 pri bolnikih s slabo pljučno funkcijo še ne pomeni hude bronhialne preodzivnosti. Upor se zaradi predhodno prisotne obstrukcije močno poveča že ob majhnem dodatnem zoženju svetline bronhov.

Tretjina bolnikov z astmo je imela po preiskavi FEV_1 manjši za več kot 15 %. Pri eni bolnici, zdravljeni z inhalacijskimi glukokortikoidi, se je vrednost FEV_1 zmanjšala za več kot 40 %. Sklepamo, da je vzrok temu močno vnetno dogajanje, ki je prisotno kljub zdravljenju.

Vdihavanje aerosola hipertonične raztopine lahko pri bolnikih s povečano odzivnostjo dihalnih poti sproži spastično zoženje bronhov. Zaradi tega morajo pred preiskavo prejeti inhalacijsko zdravilo za širjenje bronhov, ki preprečuje nastanek izrazitega zoženja bronhov, in po potrebi tudi med samim postopkom. Omogočeno naj bo tudi takojšnje merjenje pljučne funkcije. Na osnovi lastnih ugotovitev se pridružujemo mnenju večine avtorjev, da je preiskava pod navedenimi pogoji varna tudi pri bolnikih s slabo pljučno funkcijo in povečano odzivnostjo dihalnih poti (17, 21).

Pri zdravih preiskovancih navajajo tuji avtorji uspešnost izzivanja izmečka do 80 %, medtem ko je bila v naši raziskavi uspešnost 100 % (39). Dlje kot traja postopek izzivanja izmečka, večji je delež celic iz perifernih dihalnih poti (20). Tako se poveča delež makrofagov in zmanjša delež nevtrofilcev. Z namenom, da bi zmanjšali delež celic iz perifernih dihalnih poti, je postopek v naši raziskavi trajal 15 minut. V tem času je delež celic iz malih dihalnih poti zanemarljiv (33). Draženje sluznice spodbuja prihod nevtrofilcev v svetlino dihalne poti, zato II ne smemo ponoviti naslednji dan (34).

Štetje celic in določanje topnih označevalcev vnetja

Vsak laboratorij ima svoj protokol pridobivanja in obdelave vzorcev II, zato so absolutni rezultati med laboratoriji slabše primerljivi.

Delež eozinofilcev v II je bil značilno večji pri bolnikih z astmo kot pri zdravih preiskovancih. Šestinšestdeset odstotkov bolnikov z astmo je imelo delež eozinofilcev v II večji,

kot je bila mejna vrednost pri zdravih preiskovancih. Ta delež se je še povečal, če smo upoštevali absolutno koncentracijo celic v II. Na osnovi teh ugotovitev se pridružujemo mnenju večine ostalih avtorjev, da II je klinično uporabna metoda za ugotavljanje eozinofilije v dihalnih poteh (13,14). Kot smo omenili že prej, je bila prisotna eozinofilija v II tudi pri bolnikih z astmo, ki so prejeli inhalacijske glukokortikoide že nekaj mesecev pred preiskavo. Louis in sodelavci menijo, da je možen vzrok temu stalna izpostavljenost alergenom v okolju, pogoste virusne okužbe dihal ali pa je koncentracija inhalacijskega glukokortikoida v perifernih dihalnih poteh prenizka, da bi učinkovala na globlje plasti bronhialne stene (13). Poleg teh vzrokov navaajo možnost, da je pri nekaterih bolnikih protivnetni učinek glukokortikoidov omejen. Ugotovitev podpirajo s tem, da se delež eozinofilcev v II pri preiskovanih bolnikih ni bistveno spremenil kljub petkratnemu povišanju odmerka inhalacijskega glukokortikoida ali uvedbi sistemskega glukokortikoidnega zdravljenja.

Tudi v skupini bolnikov s KOPB je bil delež eozinofilcev povišan in se ni značilno razlikoval od deleža pri bolnikih z astmo. Statistična značilnost med skupinama bolnikov se je pokazala, če smo primerjali absolutno koncentracijo eozinofilcev v II. Tudi drugi avtorji ugotavljajo, da ima določena skupina bolnikov s KOPB pomemben delež eozinofilcev v bronhialni sluznici in obenem opažajo, da se le-ti bolniki odzovejo na zdravljenje z inhalacijskimi glukokortikoidi (7, 9). S pomočjo II bi tako lahko predvideli, ali se bo bolnik s KOPB odzval na zdravljenje z inhalacijskimi glukokortikoidi. Vzrok prisotnosti eozinofilcev v bronhialni sluznici pri bolnikih s KOPB še ni dokončno pojasnjen. Nekateri menijo, da pridejo v dihalne poti neselektivno. Lacoste in sodelavci pa menijo, da tudi pri bolnikih s KOPB nastajajo vnetne beljakovine, ki privabljajo eozinofilce v dihalne poti, a v veliko manjšem obsegu kot pri bolnikih z astmo (9). Vzroki za nevtrofilijo so bolje pojasnjeni. V dihalne poti jih privabljajo izločki iz aktiviranih makrofagov. Dražljaj za aktivacijo je najpogosteje cigaretni dim. Aktivirani makrofagi privabijo v bronhialno steno najprej citotoksične limfocite T. Vnetni proces se

nadaljuje s privabljanjem nevtrofilcev, ki hitro prehajajo v svetlino dihalne poti. To je tudi razlog, da v II bolnikov s KOPB prevladuje delež nevtrofilcev, medtem ko pri bronhialni biopsiji najdemo večinoma makrofage in limfocite (7). V naši raziskavi je bil delež nevtrofilcev največji pri bolnikih s KOPB in značilno večji kot pri bolnikih z astmo, vendar se statistično značilno ni razlikoval med bolniki s KOPB in zdravimi preiskovanci. Obeh skupin nismo mogli razlikovati niti, če smo upoštevali absolutno koncentracijo celic v II. Podatek nas je presenetil, saj ni primerljiv z rezultati ostalih raziskav, pri katerih je bila med bolniki s KOPB in zdravimi preiskovanci značilna razlika. Delež nevtrofilcev v II je bil pri bolnikih s KOPB zelo podoben ostalim raziskavam, medtem ko je bil pri zdravih preiskovancih prevelik. Možen razlog za odstopanje rezultata pri zdravih preiskovancih je vključitev kadilcev v skupino zdravih preiskovancev (39). Tudi brezsimptomatska virusna okužba dihal povzroča nevtrofilijo v dihalnih poteh (12).

Hoteli smo ugotoviti tudi povezavo med deležem eozinofilcev in koncentracijo EKB v II. Ker je razločevanje celic časovno zamuden postopek, nekateri avtorji predlagajo merjenje koncentracije EKB v supernatantu II, ki naj bi odražala število eozinofilcev v dihalnih poteh (24). Rezultati tujih študij so pokazali, da je omenjena povezava obsežna in še ne dokončno pojasnjena. Pri nekaterih bolnikih z astmo narašča koncentracija EKB sorazmerno z deležem eozinofilcev. Pri drugi skupini bolnikov z astmo je ob majhnem deležu eozinofilcev prisotna visoka koncentracija EKB (40). Enako so pokazali tudi naši rezultati. Sklepamo, da je merjenje koncentracije EKB klinično manj primerna metoda in slabo primerljiva z ugotavljanjem deleža eozinofilcev. Med bolniki z astmo in KOPB v koncentraciji EKB ni bilo značilnih razlik. Pridružujemo se mnenju, da merjenje koncentracije EKB manj zanesljivo razlikuje omenjeni skupini preiskovancev (41). Zanimive rezultate so pri svoji raziskavi dobili Šuškovič in sodelavci, ki pri bolnikih z astmo ugotavljajo značilno povezanost med deležem nevtrofilcev in koncentracijo EKB v II (42). Takšne rezultate ugotavlja tudi naša raziskava. Šuškovič in sodelavci menijo, da so vzrok

nevtrofilne proteaze, ki degranulirajo eozinofilce in sproščajo EKB (42).

Koncentracija EKB v serumu je bila pri vseh treh skupinah preiskovancev približno enaka in slabo povezana s koncentracijo v II ter neprimerna za ločevanje bolnikov z astmo od bolnikov s KOPB ali zdravih preiskovancev. EKB v krvi verjetno izvira predvsem iz krvnih eozinofilcev. Koncentracija EKB v serumu je manj natančna za ugotavljanje eozinofilije zaradi manjšega deleža in manjše aktivnosti eozinofilcev v krvi v primerjavi z bronhialno sluznico. Eozinofilija se v krvi pojavi tudi pri ostalih alergijskih boleznih, kar močno zmanjša specifičnost rezultata (12).

Merjenje EN v II in serumu se je izkazalo za neprimerno pri ločevanju med astmo in KOPB, saj se skupine preiskovancev med seboj niso statistično značilno razlikovale. V literaturi nismo zasledili raziskav, ki bi merile koncentracijo EN v II pri odraslih bolnikih. Čeprav smo najvišjo koncentracijo EN v II pričakovali pri bolnikih s KOPB, je bila ta najvišja pri bolnikih z astmo.

Zaradi majhnega števila vključenih bolnikov, predvsem bolnikov s KOPB, ne moremo podati trdnih sklepov. Kljub temu smo potrdili, da je II varna in enostavna preiskavna metoda za ugotavljanje vnetja v dihalnih poteh. Menimo, da najbolj zanesljivo bolnike z astmo ločimo od zdravih preiskovancev z ugotavljanjem deleža eozinofilcev v II. Za ločevanje bolnikov z astmo od bolnikov s KOPB je najprimernejša metoda primerjava tako deleža eozinofilcev kot nevtrofilcev, saj je eozinofilija lahko prisotna tudi pri bolnikih s KOPB. Merjenje koncentracije EKB je po našem mnenju manj primerna metoda kot razločevanje celic v citoloških preparatih. V nadaljnjih raziskavah bi morali bolje preučiti skupino bolnikov s KOPB z eozinofilijo in visoko koncentracijo EKB v II ter vpliv inhalacijskih glukokortikoidov na vrsto in aktivnost vnetja v dihalnih poteh bolnikov s KOPB.

ZAKLJUČKI

Delež, še bolj pa koncentracija eozinofilcev v II bolnikov dobro loči skupini bolnikov z astmo in KOPB od zdravih preiskovancev, ne pa tudi skupini bolnikov med sabo.

Delež eozinofilcev in koncentracija EKB v II sta diagnostično uporabna za ločevanje bolnikov z astmo od zdravih preiskovancev.

Delež nevtrofilcev je najvišji pri bolnikih s KOPB in je primeren za razlikovanje bolnikov s KOPB od bolnikov z astmo, ne pa tudi bolnikov s KOPB od zdravih preiskovancev.

Pri zdravih preiskovancih prevladuje delež nevtrofilcev, kar ni skladno s predpostavko, da prevladuje delež makrofagov.

Koncentracija EKB v II je povišana pri bolnikih z astmo in KOPB in ne loči teh dveh skupin med sabo, loči pa bolnike od zdravih preiskovancev.

Koncentracija EN v II ne loči med skupinama bolnikov niti bolnikov od zdravih preiskovancev in je celo najmanjša pri bolnikih s KOPB.

- Delež eozinofilcev v II ni povezan s koncentracijo EKB v II ali serumu.
- Delež nevtrofilcev v II ni povezan s koncentracijo EN v II ali serumu.
- Koncentracija EKB in EN v serumu ni povezana s koncentracijo EKB in EN v II.

ZAHVALA

Zahvaljujeva se najinemu mentorju doc. dr. Mitji Košniku za strokovno pomoč, nasvete in porabljen čas. Zahvaljujeva se tudi dr. Izidorju Kernu za veliko pomoč pri analizi citoloških preparatov, doc. dr. Matjažu Fležarju za svetovanje pri preiskavah pljučne funkcije in univ. dipl. ing. biol. Miri Šilar za pomoč pri imunološki obdelavi vzorcev. Za pomoč, nasvete in potrpežljivost bi se rada zahvalila tudi osebju Oddelka za respiratorno fiziologijo, Laboratorija za citopatologijo, Imunološkega laboratorija in Kliničnega oddelka 100. Še posebej se zahvaljujeva vsem preiskovancem in preiskovankam, ki so sodelovali v raziskavi.

LITERATURA

1. Ryu JH, Scanlon PD. Obstructive lung disease: COPD, asthma and many imitators. *Mayo Clin Proc.* 2001; 76 (11): 1144–53.
2. Siafakas NM, Vermeire P, Pride NB, Paoletti P, Gibson J, Howard P, Yernault JC, Decramer M, Higenbottam T, Postma DS, Rees J. Optimal assesement and management of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Eur Respir J* 1995; 8 (8): 1398–420.
3. Dow L. Asthma versus chronic obstructive pulmonary disease – exploring why »reversibility versus irreversibility« is no longer an appropriate approach. *Clin and Exp Allergy* 1999; 29 (6): 739–43.
4. Barnes P. Mechanisms in COPD Chest 2000: differences from asthma. *Chest.* 2000; 117 (2 Suppl): 10S–4S.
5. Hunter CJ, Brightling CE, Woltmann G, Wardlaw AJ, Pavord ID. A comparison of the validity of different diagnostic tests in adults with asthma. *Chest J* 2002; 121 (4): 1051–7.
6. Turato G, Zuin R, Saetta M. Pathogenesis and pathology of COPD. *Respiration* 2001; 68 (2): 117–28.
7. Barnes PJ. Chronic obstructive pulmonary disease. *The New Eng J of Med* 2000; 343 (4): 269–80.
8. Shaw RJ, Djukanović R, Tashkin DP, Millar AB., du Bois RM., Corris PA. The role of small airways in lung disease. *Resp Med* 2002; 96 (2): 67–80.
9. Lacoste J. Y, Bousquet J, Chanez P, Van Vyve T, Simony-Lafontaine J, Lequeu N, Vic P, Enander I, Godard P, Michel F. B. Eosinophilic and neutrophilic inflammation in asthma chronic bronchitis, and chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy and Clin Immunol* 1993; 92 (4): 537–48.
10. Grebski E, Graf C, Hinz G, Wüthrich B, Medici TC. Eosinophil cationic protein in dependent on tempertaure and time. *Eur Respir J* 1998; 11 (3): 734–7.
11. Spanavello A, Confalonieri M, Sulotto F, Romano F, Balzano G, Migliori GB, Bianchi A, Michetti G. Induced sputum cellularity. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162 (3 Pt 1): 11721–4.
12. Pizzichini E, Pizzichini MM, Efthimidias A, Dolovich J, Hargreave FE, Measurig airway inflammation in asthma: eosinphils and eosinophilic cationic protein in induced sputum compared with peripheral blood. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 99 (4): 539–44.

Prispelo 27. 5. 2005