

PNEUMON • VOL. 23 • No 3 • JULY-SEPTEMBER 2010

ΠΝΕΥΜΟΝ • ΤΟΜΟΣ 23 • ΤΕΥΧΟΣ 3 • ΙΟΥΛΙΟΣ-ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2010

# ΠΝΕΥΜΟΝ

ΤΡΙΜΗΝΗ ΙΑΤΡΙΚΗ ΕΚΔΟΣΗ

ΕΛΛΗΝΙΚΗ  
ΒΡΟΓΧΟΛΟΓΙΚΗ ΕΤΑΙΡΕΙΑ  
GREEK BRONCHOLOGIC  
SOCIETY

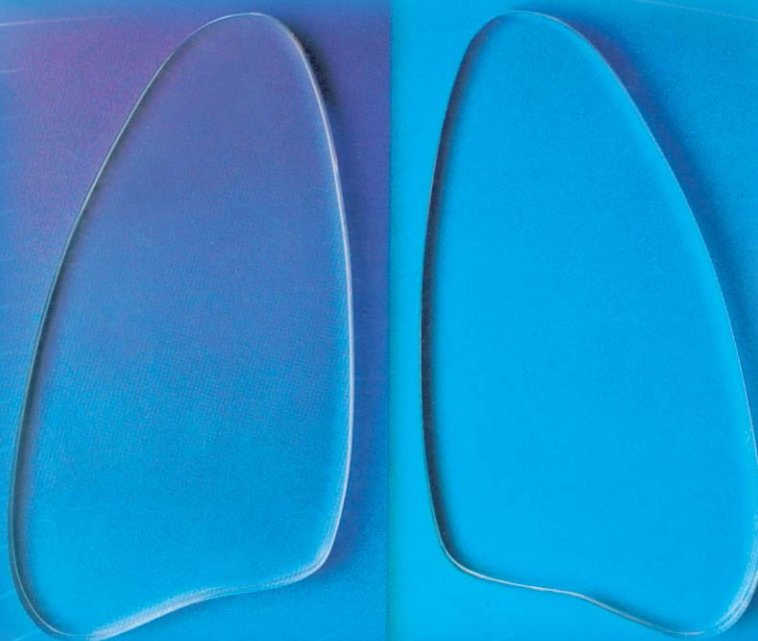
## PNEUMON

ΕΛΛΗΝΙΚΗ  
ΠΝΕΥΜΟΝΟΛΟΓΙΚΗ ΕΤΑΙΡΕΙΑ  
HELLENIC THORACIC  
SOCIETY

QUARTERLY MEDICAL JOURNAL

ISSN 1105-848X

e-ISSN 1791-4914



[www.pneumon.org](http://www.pneumon.org)

Cited in:

- **SCOPUS**
- EMBASE
- Copernicus Index
- Google Scholar

ΑΘΗΝΑ  
ATHENS

# ΠΝΕΥΜΩΝ

ΤΡΙΜΗΝΗ ΙΑΤΡΙΚΗ ΕΚΔΟΣΗ

ΕΛΛΗΝΙΚΗ  
ΒΡΟΓΧΟΛΟΓΙΚΗ ΕΤΑΙΡΕΙΑ  
GREEK BRONCHOLOGIC  
SOCIETY

## PNEUMON

ΕΛΛΗΝΙΚΗ  
ΠΝΕΥΜΟΝΟΛΟΓΙΚΗ ΕΤΑΙΡΕΙΑ  
HELLENIC THORACIC  
SOCIETY

QUARTERLY MEDICAL JOURNAL

ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ  
ΠΝΕΥΜΟΝΟΛΟΓΙΚΗΣ  
ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ



ΕΠΙΣΗΜΟ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΟΡΓΑΝΟ



ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ  
ΒΡΟΓΧΟΛΟΓΙΚΗΣ  
ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ

Ιδιοκτήτης: ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΡΟΓΧΟΛΟΓΙΚΗ ΕΤΑΙΡΕΙΑ

ISSN 1105-848X  
e-ISSN 1791-4914

www.pneumon.org  
www.mednet.gr/pneumon  
www.hts.org.gr  
www.indexcopernicus.com  
www.scopus.com  
www.embase.com  
scholar.google.gr

#### ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ

Περιοδικό ΠΝΕΥΜΩΝ  
Μεσογείων 152  
Αθήνα 11527  
Νοσοκομείο Νοσημάτων  
Θώρακος Αθηνών  
"Η Σωτηρία"  
Τηλ.: 210 7487723,  
e-mail: pneumon@hts.org.gr

#### FREE ONLINE ACCESS

#### ΕΤΗΣΙΕΣ ΣΥΝΔΡΟΜΕΣ

Εσωτερικού .....€ 20  
Μέλη ΕΠΕ - ΕΒΕ.....€ 20  
Ειδικευόμενοι - Φοιτητές.....€ 20  
Εταιρείες - Οργανισμοί.....€ 20  
Βιβλιοθήκες.....€ 20  
Εξωτερικού.....€ 50

Εκτύπωση:

#### ΤΕΧΝΟΓΡΑΜΜΑ

Μ. Αυγέρη 12, 153 43 Αγία Παρασκευή  
Τηλ: 210.6000.643, fax: 210.6002295  
e-mail: techn@hol.gr

Εκδότης: Μ. Στεφανάκης

#### ΣΥΝΤΑΚΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Διευθυντής Σύνταξης: Δημοσθένης Μπούρος

Βοηθοί σύνταξης: Μιχάλης Τουμπής  
Επαμεινώνδας Κοσμάς  
Κώστας Κωστίκας  
Στέλιος Λουκίδης

Πέτρος Μπακάκος  
Ιωάννης Πνευματικός  
Γεώργιος Σταθόπουλος

#### Διεθνής Συντακτική Επιτροπή

Philippe Astoul (France)  
Bruno Balbi (Italy)  
Robert Baughman (USA)  
Semra Bilaceroglou (Turkey)  
Christopher Bolliger (South Africa)  
Philippe Camus (France)  
John Catravas (USA)  
Carlos Robalo Cordeiro (Portugal)  
Ulrich Costabel (Germany)  
Claudio Donner (Italy)  
Elisabeth Fireman (Israel)  
Joanna Floros (USA)  
Patricia Haslam (UK)  
Talmadge King (USA)  
Richard Light (USA)  
Fernando Martinez (USA)  
Dario Olivieri (Italy)  
Paco Panadero (Spain)  
Panos Pantelidis (UK)  
Martin Petrek (CZ)  
Vesna Petrovic (Serbia)  
Udaya Prakash (USA)  
Ganesh Raghu (USA)  
Steven Rennard (USA)  
Paola Rotoli (Italy)  
Om Sharma (USA)  
Cuneyt Tetikkurt (Turkey)  
Theocharis Theocharides (USA)  
Argyris Theophilopoulos (USA)  
Athol Wells (UK)

#### Μέλη Εθνικής Συντακτικής Επιτροπής

Ουρανία Αναγνωστοπούλου (Αθήνα)  
Αντώνης Αντωνιάδης (Σέρρες)  
Νικόλαος Γαλάνης (Θεσ/νίκη)  
Δημήτριος Γεωργόπουλος (Ηράκλειο)  
Μίνα Γκάγκα (Αθήνα)  
Κώστας Γουργουλιάνης (Λάρισα)  
Γεώργιος Δημόπουλος (Αθήνα)  
Κώστας Ζαρογουλίδης (Θεσ/νίκη)  
Κωνσταντίνος Κατής (Αθήνα)  
Γεώργιος Κολιός (Αλεξανδρούπολη)  
Αντωνία Κουτσούκου (Αθήνα)  
Σταύρος Κωνσταντινίδης (Αλεξανδρούπολη)  
Κώστας Κωνσταντίνου (Αθήνα)  
Σταύρος Κωνσταντόπουλος (Ιωάννινα)  
Κατερίνα Μαλαγάρη (Αθήνα)  
Αργύρης Μιχαλόπουλος (Αθήνα)  
Γεώργιος Μπαλτόπουλος (Αθήνα)  
Παναγιώτης Μπεχράκης (Αθήνα)  
Γεώργιος Νάκος (Ιωάννινα)  
Δώρα Ορφανίδου (Αθήνα)  
Σπύρος Παπίρης (Αθήνα)  
Βλάσης Πολυχρονόπουλος (Αθήνα)  
Κώστας Πρίφτης (Αθήνα)  
Αντώνης Ρασιδάκης (Αθήνα)  
Νικόλαος Σιαφάκας (Ηράκλειο)  
Γεώργιος Τσελέπης (Αθήνα)  
Μάριος Φρουδαράκης (Αλεξανδρούπολη)

# ΠΝΕΥΜΩΝ

ΤΡΙΜΗΝΗ ΙΑΤΡΙΚΗ ΕΚΔΟΣΗ

ΕΛΛΗΝΙΚΗ  
ΒΡΟΓΧΟΛΟΓΙΚΗ ΕΤΑΙΡΕΙΑ  
GREEK BRONCHOLOGIC  
SOCIETY

# PNEUMON

ΕΛΛΗΝΙΚΗ  
ΠΝΕΥΜΟΝΟΛΟΓΙΚΗ ΕΤΑΙΡΕΙΑ  
HELLENIC THORACIC  
SOCIETY

QUARTERLY MEDICAL JOURNAL

THE HELLENIC  
THORACIC  
SOCIETY  
(HTS)



OFFICIAL JOURNAL



THE GREEK  
BRONCHOLOGIC  
SOCIETY  
(GBS)

Owner: GREEK BRONCHOLOGIC SOCIETY

ISSN 1105-848X  
e-ISSN 1791-4914

www.pneumon.org  
www.mednet.gr/pneumon  
www.hts.org.gr  
www.indexcopernicus.com  
www.scopus.com  
www.embase.com  
scholar.google.gr

ADDRESS:  
PNEUMON  
Medical Journal  
Athens Chest Hospital (Sotiria)  
152, Messogion Ave.  
Athens 11527 - Greece  
Tel.: 210-7487723  
e-mail: pneumon@hts.org.gr

## FREE ONLINE ACCESS

## ANNUAL SUBSCRIPTIONS

Inland .....€ 20  
Members of HTS and GBS.....€ 20  
Interns-Medical Students.....€ 20  
Medical Societies .....€ 20  
Medical Libraries .....€ 20  
Abroad.....€ 50

Publisher:

TECHNOGRAMMA

12 Markou Avgeri Str., 15343 Athens  
Tel: +30 210 6000643, Fax: +30 210 6002295  
e-mail: techn@hol.gr

## EDITORIAL BOARD

**Editor-in-Chief:** Demosthenes Bouros, MD, PhD, FCCP

**Associate Editors:** Michael Toubis, MD

Epaminontas Kosmas, MD, FCCP

Kostas Kostikas, MD, FCCP

Stelios Loukidis, MD, FCCP

Petros Bakakos, MD

Ioannis Pneumatikos, MD, FCCP

Georgios Stathopoulos, MD

### International Board

Philippe Astoul (France)  
Bruno Balbi (Italy)  
Robert Baughman (USA)  
Semra Bilaceroglou (Turkey)  
Christopher Bolliger (South Africa)  
Philippe Camus (France)  
John Catravas (USA)  
Carlos Robalo Cordeiro (Portugal)  
Ulrich Costabel (Germany)  
Claudio Donner (Italy)  
Elisabeth Fireman (Israel)  
Joanna Floros (USA)  
Patricia Haslam (UK)  
Talmadge King (USA)  
Richard Light (USA)  
Fernando J. Martinez (USA)  
Dario Olivieri (Italy)  
Paco Panadero (Spain)  
Panos Pantelidis (UK)  
Martin Petrek (CZ)  
Vesna Petrovic (Serbia)  
Udaya Prakash (USA)  
Ganesh Raghu (USA)  
Steven Rennard (USA)  
Paola Rotoli (Italy)  
Om Sharma (USA)  
Cuneyt Tetikkurt (Turkey)  
Theocharis Theocharides (USA)  
Argyris Theophilopoulos (USA)  
Athol Wells (UK)

### National Board

Ourania Anagnostopoulou (Athens)  
Antonis Antoniadis (Serres)  
George Baltopoulos (Athens)  
Panagiotis Behrakis (Athens)  
George Dimopoulos (Athens)  
Marios Froudarakis (Alexandroupolis)  
Mina Gaga (Athens)  
Nikolaos Galanis (Thessaloniki)  
Demetrios Georgopoulos (Heraklion)  
Kostas Gourgoulis (Larisa)  
Konstantinos Katis (Athens)  
George Kolios (Alexandroupolis)  
Stavros Konstantinidis (Alexandroupolis)  
Kostas Konstantinou (Athens)  
Stavros Konstantopoulos (Ioannina)  
Antonia Koutsoukou (Athens)  
Katerina Malagari (Athens)  
Argyris Michalopoulos (Athens)  
George Nakos (Ioannina)  
Dora Orfanidou (Athens)  
Spyros Papis (Athens)  
Vlasis Polychronopoulos (Athens)  
Kostas Priftis (Athens)  
Antonis Rassidakis (Athens)  
Nikolaos Siafakas (Heraklion)  
George Tselepis (Athens)  
Kostas Zarogoulidis (Thessaloniki)

# Περιεχόμενα

## ΠΡΩΤΟΤΥΠΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

- Ο ρόλος της τελομεράσης στην παθογένεια της ιδιοπαθούς πνευμονικής ίνωσης. Ένας σύνδεσμος της επιθηλιακή απόπτωσης και διαφοροποίησης  
Α. Τζουβελέκης, Α. Καραμέρης, Ε. Τσιάμπας, Α. Κουτσόπουλος, Ρ. Τριγγίδου, Μ. Φρουδαράκης, Δ. Μικρούλης, Γ. Ζαχαρή, Π. Στειρόπουλος, Ι. Μπαζιδιάρη, Κ. Τσαταλάς, Ι. Κοτσιανίδης, Δ. Μπούρος .....207

## ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΕΙΣ

- Τα Μορφοκλασματικά Σύνολα (Fractals) και ο δυναμικός νόμος στην Πνευμονολογία. Η σημασία τους για τον κλινικό ιατρό  
Β.Ε. Παπαϊωάννου, Ι. Πνευματικός .....240
- Σοβαρό άσθμα: Ορισμοί, παράγοντες κινδύνου και φαινότυποι  
Π. Μωραϊτάκη, Δ. Παπαμιχαήλ, Ν. Γεωργιάτου.....260

## ΒΡΑΧΕΙΑ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

- Πέρα από τις πνευμονοκονιώσεις: Νεοεμφανιζόμενες διάμεσες επαγγελματικές πνευμονοπάθειες  
Ε. Νένα, Π. Στειρόπουλος, Θ.Κ. Κωνσταντινίδης, Δ. Μπούρος .....293

## ΕΝΔΙΑΦΕΡΟΥΣΕΣ ΠΕΡΙΠΤΩΣΕΙΣ

- Bullectomy for “bong lung” in an 18 year-old male presenting with spontaneous pneumothorax  
R.K.A. Allen .....301

## ΕΙΔΙΚΟ ΑΡΘΡΟ

- Το sanatóριο της Αγίας Ελεούσας: Ένας σημαντικός σταθμός στην ιστορία της πνευμονολογίας στο νησί της Ρόδου  
Α.Ι. Παπαϊωάννου, Κ.Θ. Κωστίκας .....304

## ΚΡΙΤΙΚΗ ΒΙΒΛΙΩΝ

- Pleural Disease  
D. Bouros .....310
- Paediatric Bronchoscopy  
Κ.Ν. Priftis, Μ.Β. Anthracopoulos, Ε. Eber, Α.С. Koumbourlis, R.E. Wood .....314

# Contents

## ORIGINAL ARTICLE

- Telomerase in pulmonary fibrosis. A link to alveolar cell apoptosis and differentiation**  
A. Tzouveleakis, A. Karameris, E. Tsiambas, A. Koutsopoulos, R. Tringidou, M. Froudarakis, D. Mikroulis, V. Aidinis, P. Steiropoulos, I. Bazdiara, C. Tsatalas, I. Kotsianidis, I. Pneumatikos, D. Bouros .....224

## REVIEWS

- Fractals and power law in pulmonary medicine. Implications for the clinician**  
V.E. Papaioannou, I. Pneumatikos .....250
- Severe Asthma: Definitions, risk factors and phenotype characterization**  
P. Moraitaki, D. Papamichail, N. Georgatou .....276

## BRIEF REVIEW

- Beyond pneumoconiosis: Recently described occupational interstitial lung diseases**  
E. Nena, P. Steiropoulos, T.C. Constantinidis, D. Bouros .....297

## CASE REPORTS

- Bullectomy for "bong lung" in an 18 year-old male presenting with spontaneous pneumothorax**  
R.K.A. Allen .....301

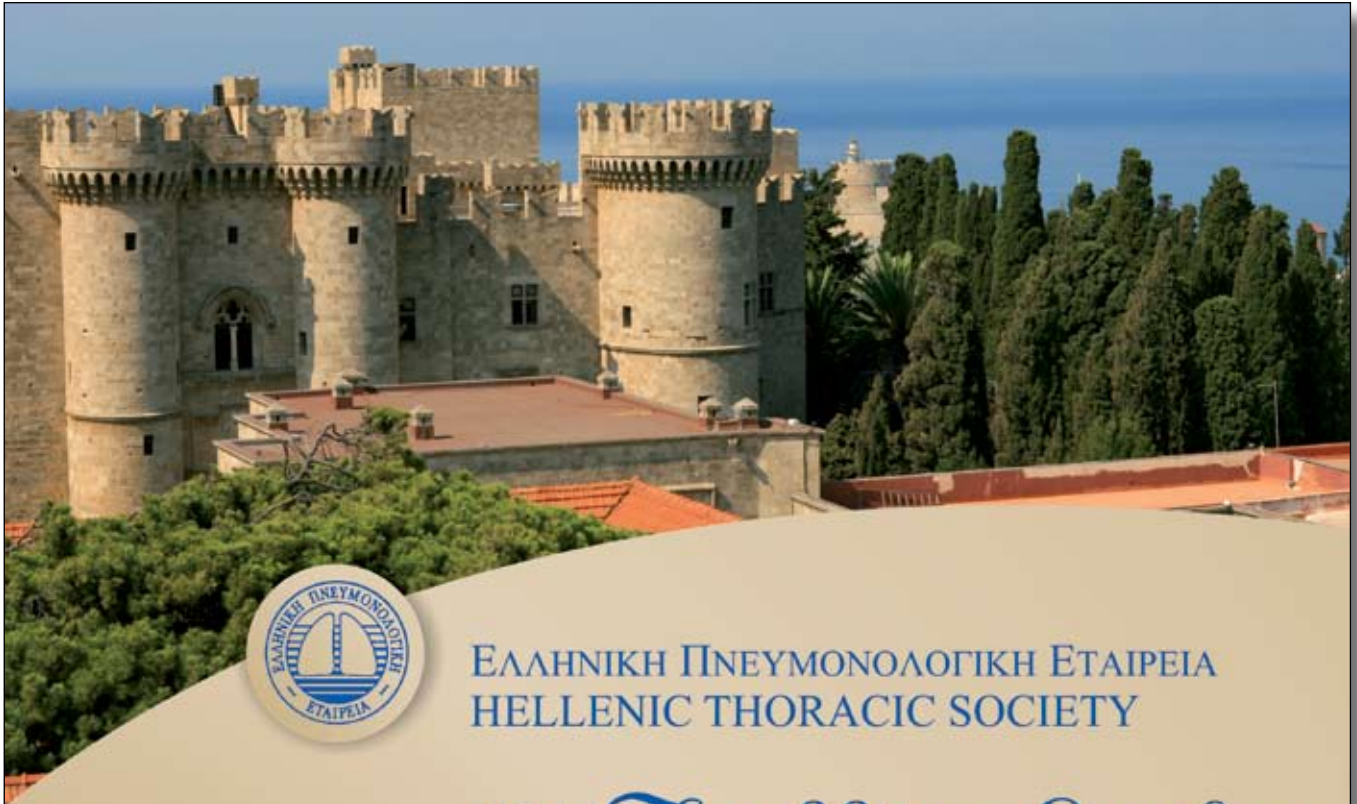
## SPECIAL ARTICLE

- The sanatorium of Saint Eleousa: An important part of the history of respiratory medicine on the island of Rhodes**  
A.I. Papaioannou, K.T. Kostikas .....307

## BOOK REVIEWS

- Pleural Disease**  
D. Bouros .....312
- Paediatric Bronchoscopy**  
K.N. Priftis, M.B. Anthracopoulos, E. Eber, A.C. Koumbourlis, R.E. Wood .....316





ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΠΝΕΥΜΟΝΟΛΟΓΙΚΗ ΕΤΑΙΡΕΙΑ  
HELLENIC THORACIC SOCIETY

# 19<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος

*Ρόδος • 21-24 Οκτωβρίου 2010*

*Ξενοδοχείο Rodos Palace*

ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΣΥΝΕΔΡΙΟΥ

**Goldair**  
congress



Πανεπιστημίου 15 105 64 Αθήνα,  
τηλ: 210 32 74 570 • φαξ: 210 33 11 021  
pneumo2010@goldair.gr • www.congress.goldair.gr

# Ο ρόλος της τελομεράσης στην παθογένεια της ιδιοπαθούς πνευμονικής ίνωσης

## Ένας σύνδεσμος της επιθηλιακή απόπτωσης και διαφοροποίησης

Αργύρης Τζουβελέκης<sup>1</sup>,  
Ανδρέας Καραμέρης<sup>2</sup>,  
Ευάγγελος Τσιάμπαζ<sup>2</sup>,  
Αναστάσιος Κουτσόπουλος<sup>3</sup>,  
Ροδούλα Τριγγίδου<sup>4</sup>,  
Μάριος Φρουδαράκης<sup>1</sup>,  
Δημήτριος Μικρούλης<sup>5</sup>,  
Γεώργιος Ζαχαρής<sup>1</sup>,  
Πασχάλης Στειρόπουλος<sup>1</sup>,  
Ιωάννα Μπαζιδιάρη<sup>6</sup>,  
Κωνσταντίνος Τσαταλάς<sup>6</sup>,  
Ιωάννης Κοτσιανίδης<sup>6</sup>,  
Δημοσθένης Μπούρος<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Πνευμονολογική Κλινική, Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Αλεξανδρούπολης, Ιατρική Σχολή Δημοκρίτειου Πανεπιστημίου Θράκης

<sup>2</sup>Παθολογοανατομικό τμήμα, Νοσοκομείο Ν.Ι.Μ.Τ.Σ, Αθήνα

<sup>3</sup>Παθολογοανατομικό τμήμα, Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ηρακλείου, Κρήτη

<sup>4</sup>Παθολογοανατομικό τμήμα, Γενικό Νοσοκομείο νοσημάτων Θώρακος «Σωτηρία», Αθήνα

<sup>5</sup>Χειρουργική Κλινική Νοσημάτων Θώρακος και Καρδιάς, Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Αλεξανδρούπολης, Ιατρική Σχολή Δημοκρίτειου Πανεπιστημίου Θράκης

<sup>6</sup>Αιματολογική Κλινική, Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Αλεξανδρούπολης, Ιατρική Σχολή Δημοκρίτειου Πανεπιστημίου Θράκης

### Λέξεις- Κλειδιά:

- τελομεράση
- παθογένεια
- ιδιοπαθείς πνευμονική ίνωση
- διάμεσες πνευμονοπάθειες

### Αλληλογραφία:

Αργύρης Τζουβελέκης, MD, Clinical Research Fellow, Ιατρική Σχολή, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης, Πνευμονολογική Κλινική, Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Αλεξανδρούπολης, Αλεξανδρούπολη 68100  
Τηλ.: +30 25510 75096  
E-mail: atzouvelekis@yahoo.gr

**ΠΕΡΙΛΗΨΗ.** Εισαγωγή: Εκτενείς μελέτες έχουν υπογραμμίσει τον κεντρικό ρόλο της τελομεράσης για την μακροβιότητα των κυττάρων, τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση και την έχουν συνδέσει με την κυτταρική αθανασία. Επομένως, μπορεί να είναι καθοριστικής σημασίας για την παθογένεια της ινωτικής εξεργασίας του πνεύμονα. Σκοπός της μελέτης μας ήταν να εμπλέξουμε την τελομεράση στην παθογένεια της ιδιοπαθούς διάμεσης πνευμονοπάθειας. **Ασθενείς και μέθοδοι:** Ο ρόλος της τελομεράσης διερευνήθηκε με μια σειρά ανοσοϊστοχημικών μελετών και φθορίζοντα in situ υβριδισμού (FISH) σε ιστικές μικροσυτοιχιές (tissue microarrays-TMAs) από αντιπροσωπευτικά ιστικά δείγματα ασθενών με δυο διαφορετικές μορφές πνευμονικής ίνωσης, της ιδιοπαθούς πνευμονικής ίνωσης (IPF) και της κρυπτογενούς οργανοποιού πνευμονίας (COP), καθώς και ασθενών της ομάδας ελέγχου. **Αποτελέσματα:** Παρατηρήσαμε σημαντική ελάττωση στην έκφραση της τελομεράσης τόσο σε πρωτεϊνικό επίπεδο όσο και σε mRNA στους ασθενείς με πνευμονική ίνωση συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου. Τόσο οι ανοσοϊστοχημικές μελέτες όσο και η FISH ανάλυση αποκάλυψαν δύο υποπληθυσμούς τύπου II πνευμονοκυττάρων με βάση τα επίπεδα έκφρασης της τελομεράσης: τα τελομεράση θετικά τύπου II πνευμονοκύτταρα, περιβάλλοντα περιοχές ενεργού ίνωσης και επιδεικνύοντας αυξημένα επίπεδα έκφρασης δεικτών διαφοροποίησης και τα τελομεράση αρνητικά κύτταρα κυρίως εντοπιζόμενα σε περιοχές εγκατεστημένης ίνωσης τα οποία χαρακτηρίζονταν από υψηλά επίπεδα απόπτωσης. **Συμπεράσματα:** Η ελαττωμένη έκφραση της τελομεράσης στην IPF δύναται να αναδεικνύει μια αιτιολογική συσχέτιση μεταξύ χαμηλής έκφρασης τελομεράσης και παθογένειας της ίνωσης. Η διαφορούμενη έκφραση της τελομεράσης στα προγονικά επιθηλιακά πνευμονοκύτταρα δείχνει ότι η τελομεράση ρυθμίζει τη μοίρα των κυψελιδικών επιθηλιακών κυττάρων είτε προς έναν αποπτωτικό ή προς έναν μεσεγχυματικό φαινότυπο συνεισφέροντας έτσι στην ινωτική εξεργασία. *Πνεύμων 2010, 23(3):207-223.*

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η τελομεράση είναι μια εκλεκτική ανάστροφη μεταγραφάση η οποία καταλύει την προσθήκη εξαμερών TTAGGG τελομερών DNA στις άκρες των χρωμοσωμάτων, αντιροπώντας έτσι στη διάβρωση των τελομερών που φυσιολογικά συμβαίνει μετά από κάθε κυτταρική διαίρεση και συνεισφέροντας στη σταθερότητα, τη λειτουργία και τον διπλασιασμό των χρωμοσωμάτων<sup>1,2</sup>. Αποτελείται από δυο βασικές υπομονάδες: την καταλυτική, ανάστροφη μεταγραφάση της τελομεράσης (h-TERT) και την RNA (hTR)<sup>3</sup> που λειτουργεί ως υπόστρωμα της καταλυτικής. Εκτενείς αναφορές έχουν δείξει ότι η τελομεράση κατέχει κεντρικό ρόλο στην κυτταρική μακροβιότητα, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση ενώ έχει συνδεθεί και με την κυτταρική αθανασία<sup>4</sup>. Επιπρόσθετα, μελέτες έχουν δείξει ότι η έκφραση ή η δραστηριότητα του ενζύμου δεν περιορίζεται μόνο σε καρκινικά ή μεταλλαγμένα κύτταρα αλλά σχετίζεται και με την ιστική βλάβη<sup>5</sup>. Παρά την πληθώρα όμως των δεδομένων σχετικά με την επαγωγή της δραστηριότητας της τελομεράσης και σε μη καρκινωμάτωδεις κυτταρικές σειρές<sup>6,7</sup> και τη συσχέτιση της με την ιστική βλάβη<sup>8</sup> και φλεγμονή<sup>9</sup>, ο ρόλος της στις μη καρκινωμάτωδεις εξεργασίες που χαρακτηρίζονται από αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και κύτταρα ανθεκτικά στην απόπτωση, παραμένει εν πολλοίς άγνωστος και ασαφής. Η ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση (IPF) αποτελεί μια τέτοια διεργασία που χαρακτηρίζεται από αυξημένη επιθηλιακή απόπτωση, συναθροίσεις γρήγορα πολλαπλασιαζόμενων «αθάντων» ινοβλαστών που καλούνται ινοβλαστικές εστίες (fibroblastic foci-FF) και συνθέτουν το παθολογοανατομικό πρότυπο της συνήθους διάμεσης πνευμονίας (usual interstitial pneumonia-UIP)<sup>10</sup>.

Πρόσφατα βιβλιογραφικά δεδομένα υποστηρίζουν την υπόθεση ότι η ενεργός ίνωση στην IPF αντανακλά την παθολογική ανταπόκριση του επιθηλίου σε συνεχή βλαπτικά ερεθίσματα ενώ έχουν επίσης αναφερθεί παραλληλισμοί μεταξύ της καρκινογένεσης και της ινογένεσης<sup>10-12</sup>. Αντίθετα με την IPF η οποία χαρακτηρίζεται από καταστροφή του πνευμονικού παρεγχύματος και μη αναστρέψιμη ίνωση, άλλες μορφές πνευμονικής ίνωσης όπως η κρυπτογενής οργανοποιός πνευμονία (COP) που χαρακτηρίζεται από ινομυξωμάτωδεις βλάβες που λέγονται σωμάτια Masson (MB) εμφανίζονται με ευνοϊκή πρόγνωση και κλινική πορεία<sup>13,14</sup>.

Πειραματικά δεδομένα έχουν δείξει αυξημένη δραστηριότητα τελομεράσης σε ινοβλάστες απομονωθέντες από πνεύμονες ποντικών μετά την έγχυση μπλεομυκίνης<sup>15-17</sup>.

Η τελευταία παρατήρηση ενισχύθηκε και από το εύρημα ότι η απώλεια της δραστηριότητας της τελομεράσης είναι στενά συσχετιζόμενη με τη διαφοροποίηση των ινοβλαστών σε μυοϊνοβλάστες και πιθανόν να δρα σαν πυροδοτικός παράγοντας αυτής της διαδικασίας<sup>18,19</sup>. Επιπλέον έχει αναφερθεί ότι η απώλεια έκφρασης της τελομεράσης οδηγεί σε απόπτωση των επιθηλιακών κυττάρων ποντικών μετά από έγχυση μπλεομυκίνης<sup>20</sup>, ενώ παράλληλα έχει περιγραφεί και η αιτιολογική συσχέτιση της έλλειψης τελομεράσης στους ινοβλάστες ποντικών με την επαγόμενη από μπλεομυκίνη πνευμονική ίνωση<sup>21</sup>. Ωστόσο, η ανθρώπινη τελομεράση διαφέρει πάρα πολύ από αυτήν του ποντικού τόσο στη λειτουργία όσο και στη ρύθμιση ενώ το πειραματικό μοντέλο της μπλεομυκίνης δεν είναι πλήρως αντιπροσωπευτικό της IPF<sup>21</sup>.

Για τους παραπάνω λοιπόν λόγους χρειάζεται μια ανθρώπινη μελέτη. Δυο πρόσφατα δημοσιευμένες μελέτες σε ασθενείς με οικογενή IPF<sup>15,22</sup> περιγράφουν έναν πρωτογενή ρόλο για τις μεταλλαγές στις υπομονάδες της τελομεράσης στην παθογένεια της IPF, προτείνοντας ότι η παρουσία βραχέων τελομερών στα κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα μπορεί να οδηγήσει στην απόπτωση τους και να πυροδοτήσει την ινωτική εξεργασία μέσω επιθηλιακών-μεσεγγυματικών αλληλεπιδράσεων. Παρά το γεγονός ότι η οικογενής IPF δεν διαφοροποιείται κλινικά από την σποραδική μορφή πλην της νεότερης ηλικίας έναρξης της νόσου (55 έτη vs. 67 έτη)<sup>23</sup>, ωστόσο δεν υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές που να συσχετίζουν την έκφραση και την κυτταρική εντόπιση του ενζύμου σε δείγματα πνεύμονα ασθενών με διαφορετικές μορφές πνευμονικής ίνωσης. Για να απαντήσουμε σε αυτό το ερώτημα, κατασκευάσαμε ιστικές μικροσυτοιχίες (TMAs) και δείξαμε ελαττωμένη έκφραση της τελομεράσης σε αντιπροσωπευτικά ιστικά δείγματα ασθενών με σποραδική IPF και COP συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου συσχετίζοντας έτσι την υποέκφραση του ενζύμου με την παθογένεια της ίνωσης. Το πιο σημαντικό όμως εύρημα της μελέτης μας ήταν ότι δείξαμε για πρώτη φορά την παρουσία δυο υποπληθυσμών τύπου II πνευμονοκυττάρων με βάση τα επίπεδα έκφρασης της τελομεράσης: τα τελομεράση θετικά τύπου II πνευμονοκύτταρα, περιβάλλοντα περιοχές ενεργού ίνωσης και επιδεικνύοντας αυξημένα επίπεδα έκφρασης δεικτών διαφοροποίησης και τα τελομεράση αρνητικά κύτταρα κυρίως εντοπιζόμενα σε περιοχές εγκατεστημένης ίνωσης τα οποία χαρακτηρίζονταν από υψηλά επίπεδα απόπτωσης. Μερικά από τα δεδομένα που αναφέρονται εδώ έχουν δημοσιευθεί με τη μορφή περίληψης στα πεπραγμένα ιατρικών συνεδρίων<sup>24,25</sup>.



## ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### Ασθενείς

Συνολικά, 45 πρωτοδιαγνωσμένοι ασθενείς με ιδιοπαθή διάμεση πνευμονία (IPs) δυο διαφορετικών παθολογοανατομικών προτύπων μεταξύ των οποίων 25 ασθενών με IPF/UIP και 20 με COP συμπεριλήφθησαν στη μελέτη μας. Η διάγνωση τέθηκε με βάση τη θέση ομοφωνίας της ATS/ERS (2002)<sup>26</sup>. Ιστικά δείγματα ελήφθησαν με ανοιχτή βιοψία ή video assisted thoracoscopic surgery-VATS από δυο διαφορετικές περιοχές κάθε ασθενούς και μονιμοποιήθηκαν σε παραφίνη. Όλοι οι ασθενείς ήταν πλήρως ενημερωμένοι και υπέγραψαν έντυπο συγκατάθεσης με το οποίο συμφωνούσαν στην ανώνυμη χρήση των δειγμάτων πνεύμονα για ερευνητικούς σκοπούς. Επιπλέον η μελέτη μας έτυχε της έγκρισης από την τοπική επιστημονική επιτροπή (Αριθμός πρωτοκόλλου: 1669). Είκοσι μπλόκ παραφίνης συλλέχθηκαν από τα αρχεία τριών παθογοανατομικών τμημάτων (Πίνακας 1).

### Ποσοτική αντίδραση ανάστροφης μεταγραφάσης πραγματικού χρόνου (quantitative Real-Time reverse transcriptase-chain reaction- qRT-PCR)

Η έκφραση του mRNA της h-TERT υπομονάδας εκτιμήθηκε ποσοτικά στους ασθενείς με IPF και στην ομάδα ελέγχου με τη χρήση qRT-PCR μεθόδου με SYBR-Green I QPCR Master Mix. Οι αλληλουχίες των εκκινητών ήταν οι ακόλουθες: για την h-TERT; Για 5'- TGA CAC CTC ACC TCA

**ΠΙΝΑΚΑΣ 1.** Δημογραφικά και σπυρομετρικά χαρακτηριστικά των ασθενών με IPF/UIP και COP και ατόμων της ομάδας ελέγχου. Οι τιμές εκφράζονται ως μέσες τιμές ± SD.

Χαρακτηριστικά	IPF/UIP	COP/OP	Ομάδα ελέγχου
Αριθμός	25	20	20
Φύλο: Άρρεν/Θήλυ	19/6	12/8	5/5
Ηλικία, median (έτη)	66 (43-72)	50 (38-62)	39 (26-60)
Καπνιστές/ Μη καπνιστές	20/5	6/14	5/15
FVC, % pred	71 ± 3	78 ± 4	104 ± 12
TLC, % pred	54 ± 4	72 ± 3	101 ± 11
K <sub>CO</sub> % pred	53 ± 5	68 ± 5	90 ± 6

Συντομογραφίες: COP/OP: κρυπτογενής οργανοποιός πνευμονία, FVC: Δυναμικά εκπνεόμενη χωρητικότητα, IPF/UIP: Ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση/συνήθης διάμεση πνευμονία, K<sub>CO</sub>: Διαχυτική ικανότητα μονοξειδίου του άνθρακος, TLC: Ολική ζωτική χωρητικότητα.

CCC AC-3' και hTERT REV: 5'- CAC TGT CTT CCG CAA GTT CAC -3' και για την GAPDH; για: 5'- GGA AGG TGA AGG TCG GAG TCA-3' και GAPDH REV: 5'-GTC ATT GAT GGC AAC AAT ATC CAC T-3'.

### Ενεργότητα της τελομεράσης

Η ενεργότητα της τελομεράσης εκτιμήθηκε σε 15 συνολικά δείγματα πνευμόνων (8 με IPF και 7 φυσιολογικών), χρησιμοποιώντας το πρωτόκολλο ανάλυσης TRAP (telomeric repeat amplification protocol) σε συμφωνία με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή (TeloTAGGG Telomerase PCR ELISA plus detection kit; Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany)<sup>27</sup>. Εν συντομία, 10 μg απομονωμένου ιστού τοποθετήθηκαν σε 30 μl μείγματος αντιδραστηρίου (που περιελάμβανε υπόστρωμα τελομεράσης συνδυασμένο με βιοτινικά κατάλοιπα, βελτιστοποιημένο εκκινητή, νουκλεοτίδια, Ταq πολυμεράση, και μια 216-bp καθορισμένη εσωτερική αλληλουχία DNA). Στο τελικό μείγμα διενεργήθηκε PCR. Η ενεργότητα της τελομεράσης ποσοτικοποιήθηκε μετρώντας την απορρόφηση των παραγώγων της PCR στα 450 nm. Τα επίπεδα ενεργότητας της τελομεράσης σε δεδομένο δείγμα καθορίστηκαν συγκρίνοντας το σήμα του δείγματος που θέλαμε να υπολογίσουμε, με το παρατηρούμενο σήμα δείγματος γνωστής ποσότητας του επιστρώματος ελέγχου. Βασισμένοι στα αρνητικά δείγματα ελέγχου, δείγματα με απορρόφηση λιγότερο από 0,2 θεωρήθηκαν αρνητικά.

### Κατασκευή της ιστικής μικροσυστοιχίας (TMA)

Για την κατασκευή της TMA χρησιμοποιήθηκαν 65 συνολικά ιστικά δείγματα από 25 IPF, 20 COP και 20 ασθενείς της ομάδας ελέγχου προερχόμενα από άτομα που υπεβλήθησαν σε χειρουργική επέμβαση για την αφαίρεση καλοήθους βλάβης του πνεύμονα. Τρεις αντιπροσωπευτικές περιοχές διαμέτρου 1.5 mm η κάθε μια εκφυτεύτηκαν από τους κύβους παραφίνης και επανεμφυτεύτηκαν με τη χρήση ειδικού οργάνου (TMA-100, Chemicon, USA) σε νέο κύβο παραφίνης κάτω από αυστηρές συντεταγμένες όπως έχει περιγραφεί σε άλλη μελέτη<sup>28</sup>. Τελικά κατασκευάσαμε 2 TMA μπλοκ αποτελούμενα από 100 ιστικούς πυρήνες το καθένα.

### Ανοσοϊστοχημική ανάλυση

Η ανοσοϊστοχημεία για το αντιγόνο της h-TERT πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ειδικού μονοκλωνικού αντισώματος (anti-h-TERT mouse monoclonal antibody- clone 44F12-Novocastra Laboratories Ltd, Newcastle United Kingdom). Για την περαιτέρω ανάλυση της κυτταρικής

εντόπισης της τελομεράσης στα τύπου I ή II πνευμονοκύτταρα και στους μυοϊνοβλάστες ή στους ινοβλάστες πραγματοποιήσαμε διπλή ανοσοϊστοχημική χρώση για την h-TERT και τον surfactant-SP-A ή για την h-TERT και την  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA), αντίστοιχα. Για να εκτιμήσουμε τη διαφοροποίηση των AECs στον IPF και COP πνεύμονα τα ιστικά δείγματα βάφτηκαν με ειδικό αντίσωμα έναντι της N-καντχερίνης (rabbit polyclonal antibody, GeneTex, GTX12221). Για την εκτίμηση της πολλαπλασιαστικής ικανότητας των ινοβλαστικών εστιών πραγματοποιήσαμε διπλή ανοσοϊστοχημική χρώση για τον παράγοντα ki-67 (ab8191, Abcam Limited Co) και για τον  $\alpha$ -SMA όπως και προηγουμένως.

### Προσδιορισμός της απόπτωσης

Η αποπτωτική δραστηριότητα εκτιμήθηκε με τη χρήση ειδικού αντισώματος έναντι του παράγοντα κατακερματισμού του DNA [DNA fragmentation factor (DFF)]<sup>29</sup> (Novocastra Laboratories Ltd, Newcastle United Kingdom).

### Φθορίζων *in situ* υβριδισμός (FISH) για προσδιορισμό της hTR υπομονάδας

Η εκτίμηση της έκφρασης της hTR υπομονάδας έγινε με τη χρήση FISH. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ειδικού hTR probe το οποίο υβριδίζει σε περιοχές εντός των 451 βάσεων της hTR υπομονάδας (DakoCytomation, Y1441). Τα επίπεδα του mRNA εκτιμήθηκαν αυτόματα με τη χρήση του υψηλής ευκρίνειας μικροσκοπίου DUET, BioView σύστημα σάρωσης για FISH, μορφολογία ανοσοϊστοχημικές εφαρμογές. Λάβαμε ως «αυξημένη έκφραση» την παρουσία >10 αντιγράφων mRNA ανά κύτταρο, ως «χαμηλή έκφραση» την παρουσία 6-10 αντιγράφων mRNA ανά κύτταρο και ως «καθόλου έκφραση» την παρουσία <6 αντιγράφων mRNA ανά κύτταρο.

### Εκτίμηση των αποτελεσμάτων της ανοσοϊστοχημείας με σύστημα υπολογιστικής ανάλυσης εικόνας (Computerized Image Analysis)

Προκειμένου να εκτιμήσουμε τα αποτελέσματα της ανοσοϊστοχημείας όχι ποιοτικά αλλά ποσοτικά και με ακρίβεια χρησιμοποιήσαμε ένα ημι-αυτόματο σύστημα υπολογιστικής ανάλυσης εικόνας (Matrox II Card Frame Grabber, Camera Microwave Systems, Microscope Olympus BX-50) το οποίο μας επέτρεψε να εκτιμήσουμε την χρωματική ένταση του σήματος σε μια κλίμακα 256-επιπέδων 0 (μαύρο)-255 (άσπρο). Στη συνέχεια οι τιμές

της χρωματικής έντασης μετατράπηκαν σε ανάστροφα % ποσοστά.

### ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος SPSS 13.0 software. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μέσες τιμές mean  $\pm$  SD, εκτός και αν υποδεικνύονταν διαφορετικά. Το unpaired t-test χρησιμοποιήθηκε για να συγκρίνουμε τη χρωματική ένταση των διαφορετικών υπό μελέτη παραγόντων μεταξύ των ασθενών με πνευμονική ίνωση και των ατόμων της ομάδας ελέγχου. Το paired t-test χρησιμοποιήθηκε για να συγκρίνουμε τη χρωματική ένταση στα επιθηλιακά κύτταρα, του ινοβλάστες και τους μυοϊνοβλάστες των ασθενών με IPF/UIP, COP και των ατόμων της ομάδας ελέγχου. Τιμή  $p < 0.05$  λήφθηκε ως στατιστικά σημαντική.

### ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Ελαττωμένη έκφραση τελομεράσης στους ινωτικούς πνεύμονες συγκριτικά με τον φυσιολογικό πνεύμονα

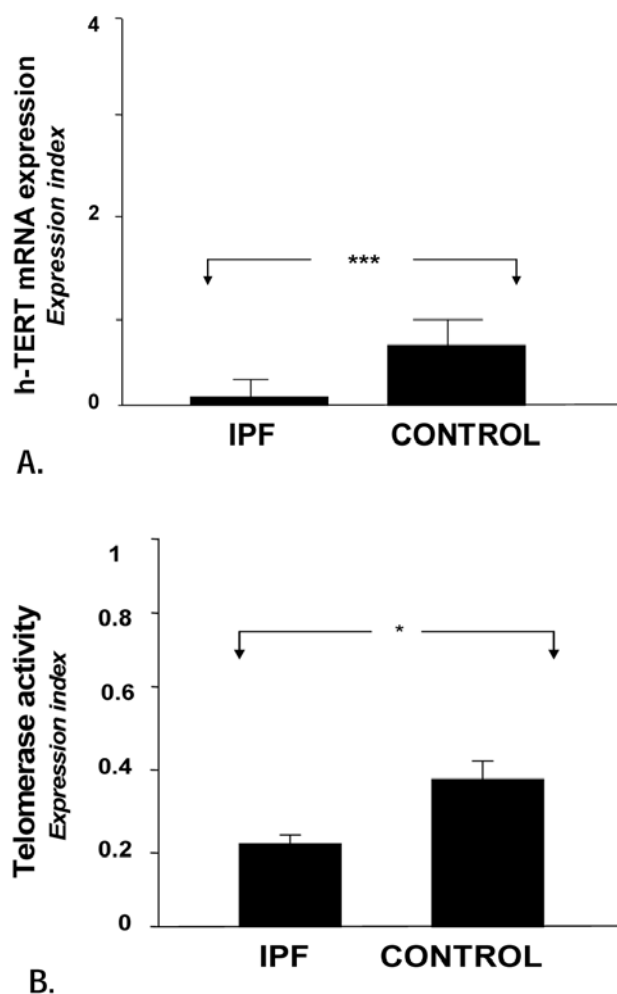
Επειδή δεν υπήρχε καμιά διαθέσιμη πληροφορία στη βιβλιογραφία σχετικά με την έκφραση της τελομεράσης σε ασθενείς με πνευμονική ίνωση υπολογίσαμε την έκφραση της τελομεράσης τόσο σε επίπεδο mRNA όσο και πρωτεΐνης με τη χρήση qRT-PCR, FISH και ανοσοϊστοχημικής ανάλυσης αντίστοιχα, σε ασθενείς με IPF, COP και σε ιστικά δείγματα της ομάδας ελέγχου.

Για να επισπεύσουμε και να στανταρτοποιήσουμε τις πειραματικές διαδικασίες κατασκευάσαμε δυο ιστικές μικροσυστοιχίες αποτελούμενες από 100 ιστικούς πυρήνες από 25 IPF, 20 COP και 20 ιστικά δείγματα της ομάδας ελέγχου. Οι ιστικές μικροσυστοιχίες βάφτηκαν με ειδικό μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της h-TERT υπομονάδας και τα αποτελέσματα αναλύθηκαν ποσοτικά με τη χρήση ειδικού προγράμματος υπολογιστικής ανάλυσης εικόνας, όπως περιγράφηκε παραπάνω. Όπως αναμενόταν, η qRT-PCR αποκάλυψε σημαντικά ελαττωμένη έκφραση της τελομεράσης στα δείγματα πνεύμονα ασθενών με IPF συγκριτικά με τα δείγματα φυσιολογικού πνεύμονα ( $p < 0.0001$ ) αναδεικνύοντας έτσι μια αιτιολογική σχέση μεταξύ της μειωμένης έκφρασης του ενζύμου και της πνευμονικής ίνωσης (Εικόνα 1). Επιπλέον, η ανοσοϊστοχημική ανάλυση έδειξε ελαττωμένη έκφραση τελομεράσης στους ινωτικούς πνεύμονες των ασθενών με IPF ( $p < 0.001$ ) και COP ( $p < 0.001$ ), συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου, εντοπιζόμενη κυρίως στο κυψελιδικό επιθήλιο

(Εικόνα 2).

### Υπερέκφραση τελομεράσης στα κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα περιβάλλοντα περιοχές ινοβλαστικής δραστηριότητας στον IPF πνεύμονα

Προκειμένου να αναλύσουμε περαιτέρω την κυτταρική εντόπιση της έκφρασης της τελομεράσης πραγματοποιήσαμε διπλή ανοσοϊστοχημική μελέτη και δείξαμε ότι

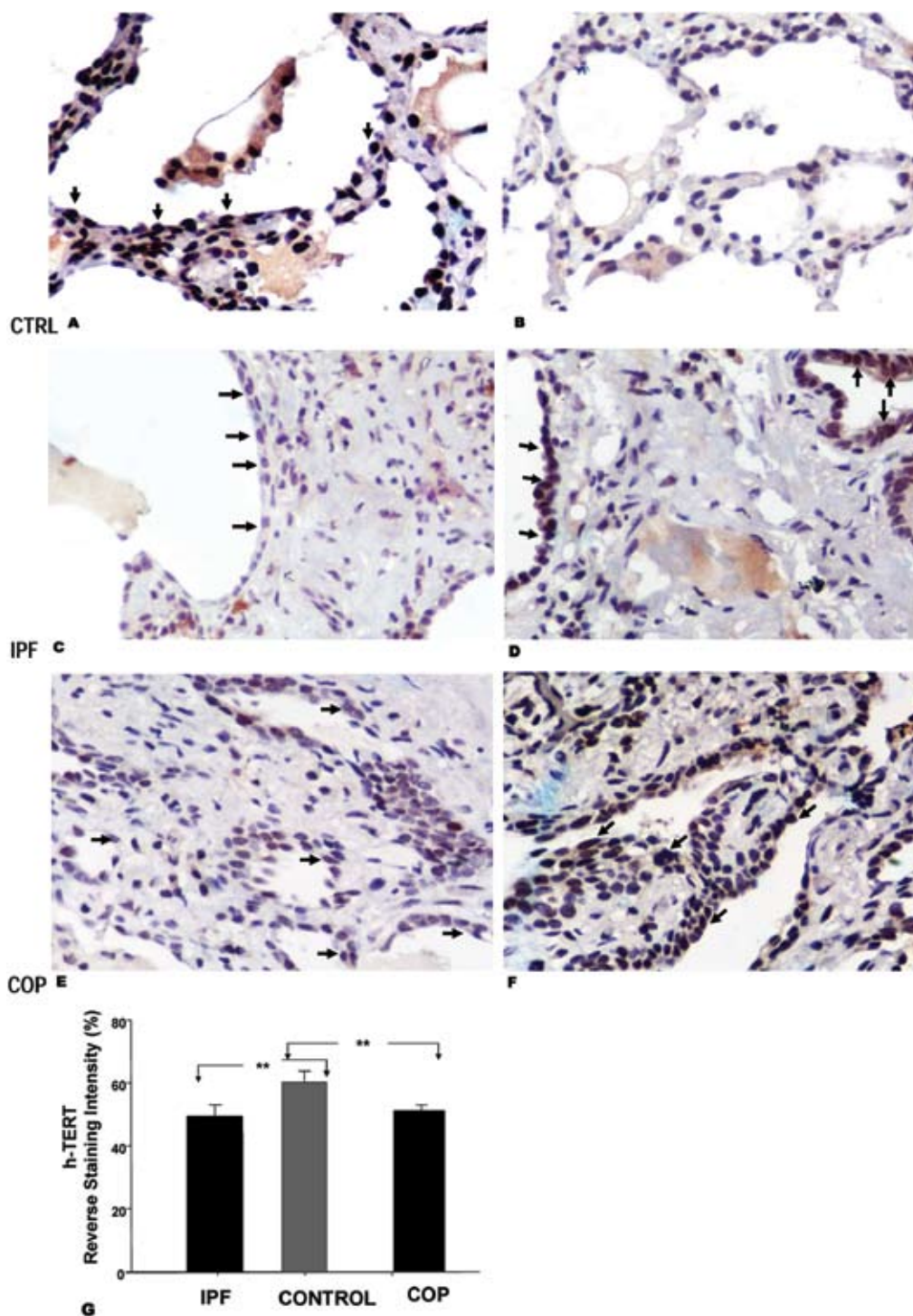


**ΕΙΚΟΝΑ 1. Μειωμένη έκφραση του mRNA της h-TERT υπομονάδας της τελομεράσης στα IPF δείγματα σε σύγκριση με τον φυσιολογικό πνεύμονα.** Η qRT-PCR πραγματικού χρόνου έδειξε στατιστικά σημαντική μειωμένη έκφραση της τελομεράσης στα δείγματα πνεύμονα των IPF ασθενών σε σύγκριση με τα άτομα της ομάδας ελέγχου (\*\* $p < 0.0001$ ). Ως συνέχεια αυτού, η μέση ποσοστιαία αναλογία ενεργότητας της τελομεράσης όπως αυτή εκτιμήθηκε από την ανάλυση TRAP φάνηκε μειωμένη στους ασθενείς με IPF συγκριτικά με τα φυσιολογικά δείγματα ( $p < 0.05$ ).

η ελαττωμένη έκφραση της τελομεράσης εντοπιζόταν κυρίως στα τύπου II κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα [τελομεράση (-) κύτταρα] τα οποία εντοπιζόταν κυρίως σε περιοχές καταστροφής του αρχιτεκτονικού παρεγχύματος και εγκατεστημένης ίνωσης (περιοχές με εικόνα δίκην μελισσοκηρύθρας) στον IPF πνεύμονα ( $p < 0.001$ ) (Εικόνα 3A-C). Αντίθετα παρατηρήσαμε αυξημένη έκφραση του ενζύμου στα πνευμονοκύτταρα τύπου II τα οποία περιέβαλλαν περιοχές επιθηλίου που τουλάχιστον μακροσκοπικά φαίνονταν φυσιολογικές, εντός του IPF πνεύμονα (Εικόνα 3G-H). Επιπρόσθετα στους ασθενείς με COP η πλειοψηφία των τύπου II πνευμονοκυττάρων των άμεσα γειτνιάζοντων με περιοχές οργανούμενης πνευμονία επιδείκνυαν ελαττωμένα επίπεδα έκφρασης (Εικόνα 3D-F). Το πιο όμως εντυπωσιακό εύρημα της μελέτης μας ήταν η αναγνώριση πνευμονοκυττάρων τύπου II με διαφορετική μορφολογία από ότι τα φυσιολογικά, δηλαδή επιπεδωμένων, μακρόστενων κυττάρων τα οποία περιέβαλλαν περιοχές ενεργού ίνωσης κυρίως στον IPF πνεύμονα ( $p < 0.001$ ) και σε λιγότερο βαθμό στον COP ( $p < 0.02$ ) πνεύμονα και χαρακτηρίζονταν από αυξημένα επίπεδα έκφρασης τελομεράσης [τελομεράση (+) κύτταρα]. Το παραπάνω εύρημα μπορεί να σημαίνει ότι τα κύτταρα αυτά λόγω της αυξημένης έκφρασης τελομεράσης να είναι ανθεκτικά στην απόπτωση και να χαρακτηρίζονται από υψηλή διαφοροποιητική και πολλαπλασιαστική ικανότητα. (Εικόνα 4). Σε συνάρτηση με τα αποτελέσματα της ανοσοϊστοχημείας η ανάλυση με FISH έδειξε περιοχές αυξημένης ενίσχυσης σήματος όχι μόνο στο επιθήλιο του φυσιολογικού πνεύμονα αλλά και σε περιοχές υπερπλαστικού επιθηλίου άμεσα γειτνιάζουσες με ινοβλαστικές εστίες εντός του IPF πνεύμονα στις 19 από τις 25 περιπτώσεις και περιοχές χαμηλής ενίσχυσης σήματος στους 15 από τους 20 ασθενείς με COP (Εικόνα 5).

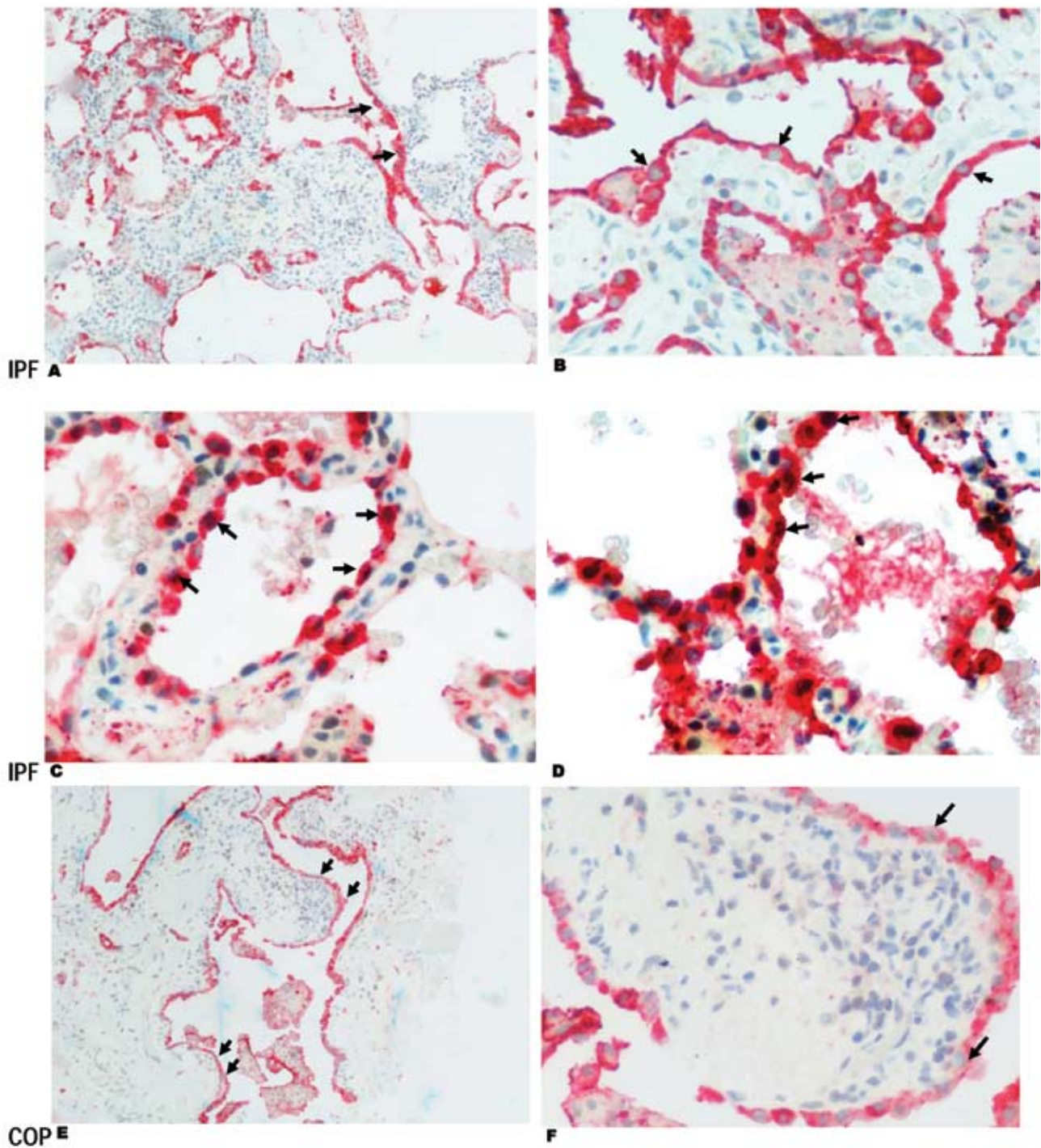
### Αυξημένη έκφραση τελομεράσης στις εστίες ινοβλαστών/μυοϊνοβλαστών στον IPF σε σύγκριση με τον COP πνεύμονα

Προκειμένου να αναγνωρίσουμε διακριτά εκφραστικά πρότυπα τελομεράσης μεταξύ των ινοβλαστικών εστιών στις δυο διαφορετικές μορφές πνευμονικής ίνωσης, πραγματοποιήσαμε διπλή ανοσοϊστοχημική χρώση και δείξαμε επαγωγή στην έκφραση του ενζύμου στις ινοβλαστικές/μυοϊνοβλαστικές εστίες στους IPF ασθενείς (Εικόνα 6A-B) σε σύγκριση με τα σωματίδια Masson που χαρακτηρίζουν το παθολογοανατομικό πρότυπο της οργανούμενης πνευμονίας (Εικόνα 6D-F) ( $p < 0.001$ ). Το



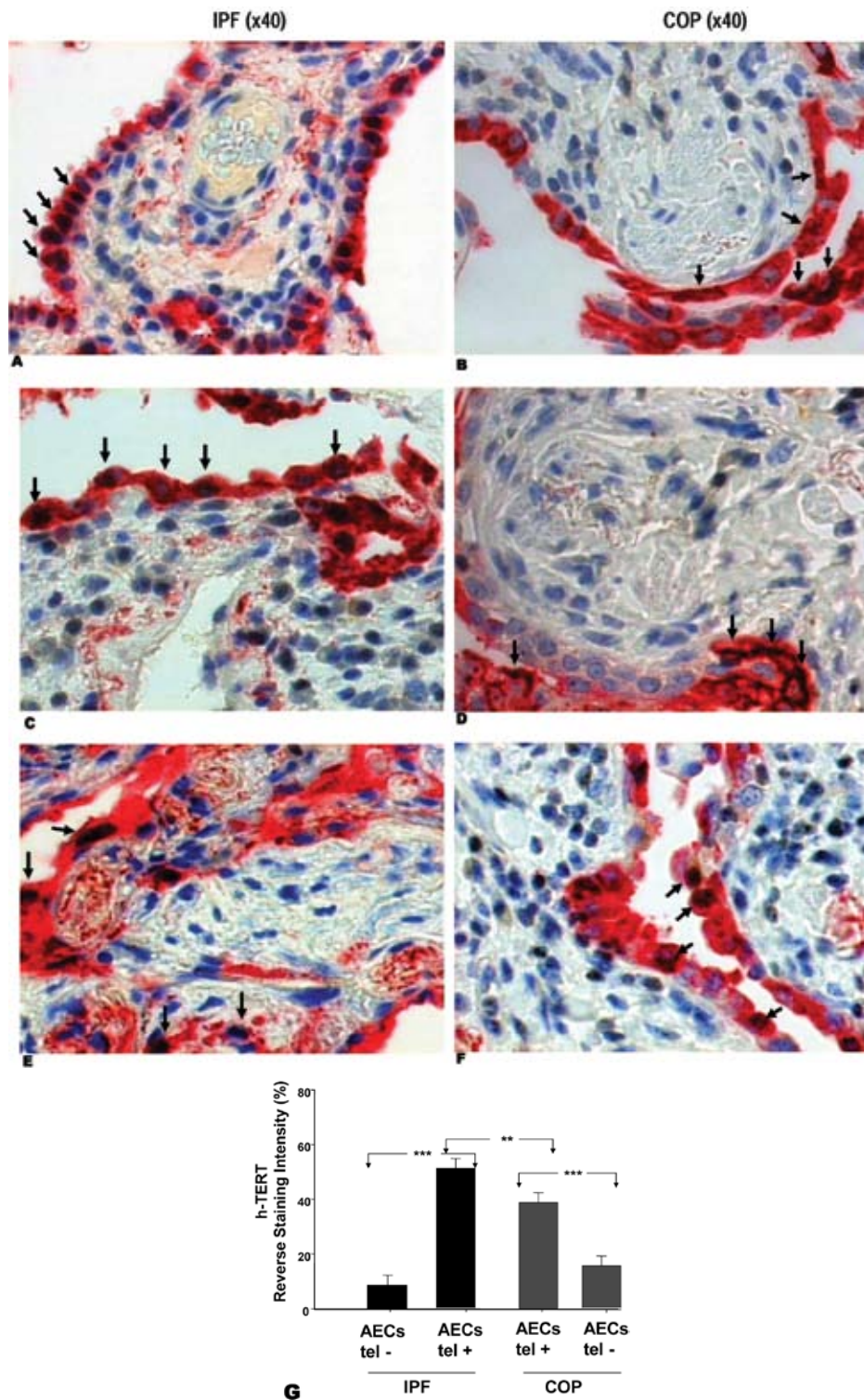
**ΕΙΚΟΝΑ 2. Μειωμένη έκφραση της τελομεράσης στους ινωτικούς πνεύμονες συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου.** Η ανοσοϊστοχημία για την h-TERT υπομονάδα αποκάλυψε θετική πυρηνική χρώση (βέλη) στον φυσιολογικό πνεύμονα (A) συγκριτικά τον αρνητικό ισότυπο (B), τον IPF (C και D) και τον COP πνεύμονα (E, F). Στον IPF πνεύμονα η τελομεράση εντοπίστηκε κυρίως στις περιοχές και στα πνευμονοκύτταρα που την περιβάλλουν (D), σε αντίθεση με τον COP πνεύμονα όπου βρισκόταν σε περιοχές κυψελιδικής πλήρωσης (F). Η ποσοτική ανάλυση της ανοσοϊστοχημικής χρωματικής έντασης (G) ανέδειξε σημαντικές διαφορές στην έκφραση της τελομεράσης μεταξύ των ινωτικών πνευμόνων και των δειγμάτων της ομάδας ελέγχου (\*\* $p < 0.001$ ). Πραγματικές μεγεθύνσεις: A - F: x40.



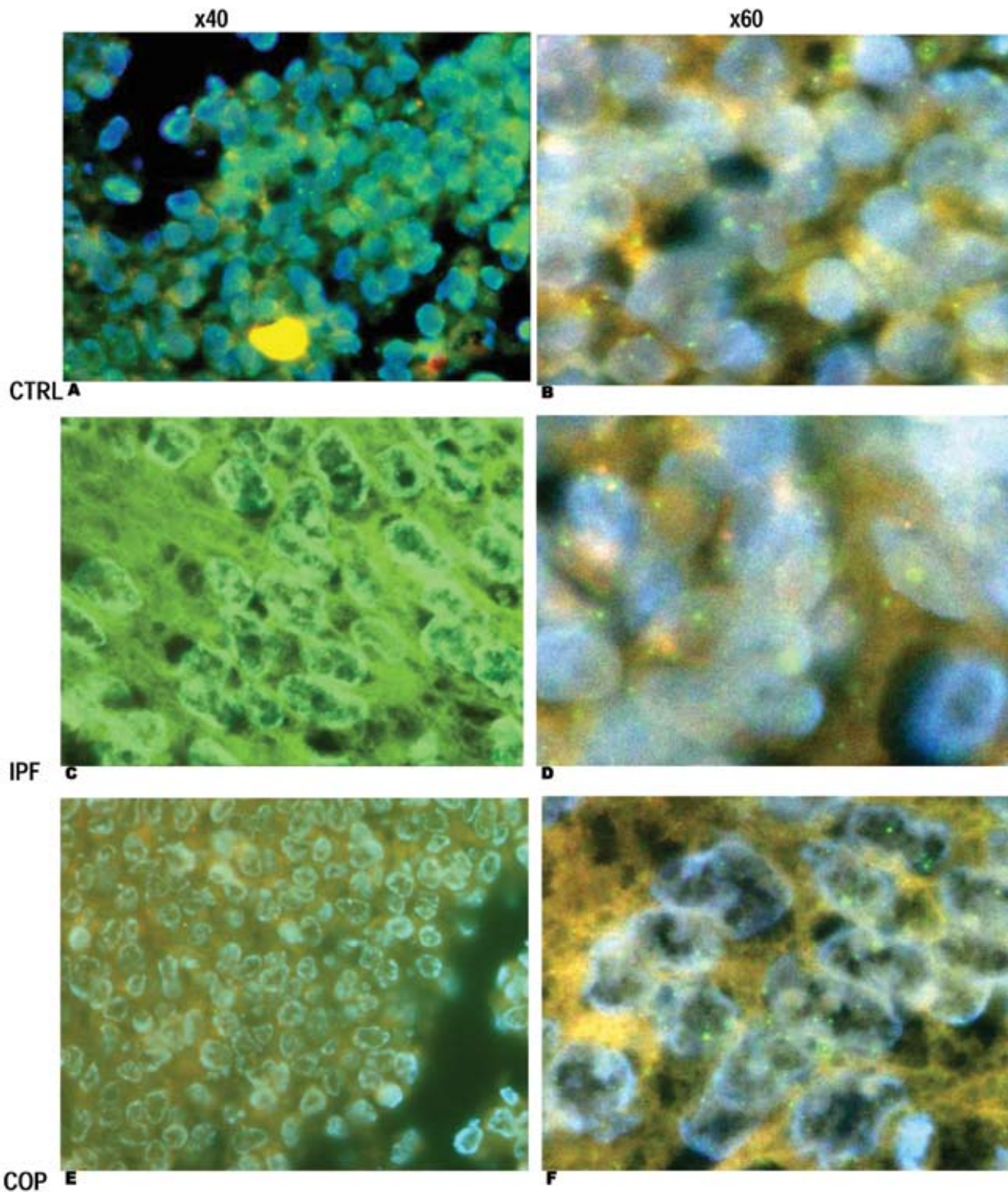


**ΕΙΚΟΝΑ 3. Απουσία έκφρασης της τελομεράσης στο κυψελιδικό επιθήλιο των περιοχών εγκατεστημένης ίνωσης του IPF πνεύμονα.** Διπλή ανοσοϊστοχημική ανάλυση για την h-TERT υπομονάδα και τον SP-A αποκάλυψε απουσία έκφρασης της τελομεράσης (λευκοί πυρήνες) από τα πνευμονοκύτταρα τύπου II (κόκκινο κυτταρόπλασμα) στις περιοχές της ακανόνιστης επανεπιθηλιοποίησης, εγκατεστημένης ίνωσης (κύστεις δίκην μελικηρύθρας) και καταστροφής της αρχιτεκτονικής του παρεγχύματος στον IPF πνεύμονα (A, B), ενώ αντιθέτως θετική πυρηνική χρώση (βέλη) παρουσιαζόταν σε περιοχές πνευμονοκυττάρων που ήταν ιστολογικά φυσιολογικές εντός του IPF πνεύμονα (C, D). Επιπρόσθετα στον COP πνεύμονα η πλειοψηφία των τύπου II κυψελιδικών κυττάρων που περιέβαλλαν περιοχές οργανωμένης πνευμονίας επέδειξε μειωμένα επίπεδα έκφρασης του (βέλη) (E, F). Πραγματικές μεγεθύνσεις: A και E: x20, B-D και F: x40.





**ΕΙΚΟΝΑ 4.** Συνεντόπιση της τελομεράσης με τα πνευμονοκύτταρα τύπου II περιβάλλοντα περιοχές ενεργού ίνωσης. Η υπολογιστική ανάλυση της χρωματικής έντασης της ανοσοϊστοχημικής χρώσης έδειξε αυξημένη έκφραση τελομεράσης (μαύροι πυρήνες) στα τύπου II πνευμονοκύτταρα (κόκκινο κυτταρόπλασμα) άμεσα γειτνιάζοντα με περιοχές ενεργού ίνωσης κυρίως στον IPF πνεύμονα (ινοβλαστικές εστίες) (A, C και E) και σε μικρότερο βαθμό στον COP πνεύμονα (σωμάτια Masson) (B, D και F) (\*\* $p < 0.001$ ). Πραγματικές μεγεθύνσεις: A-F: x40.



**ΕΙΚΟΝΑ 5.** Υψηλή ενίσχυση του σήματος της hTR υπομονάδας στα επιθηλιακά κύτταρα περιβάλλοντα ινοβλαστικές εστίες στον IPF πνεύμονα. Η ανάλυση FISH αποκάλυψε αυξημένη έκφραση της mRNA υπομονάδας (mRNA αντίγραφα υποδεικνύονται ως πράσινες ενδοκυττάρειες κουκίδες) στο φυσιολογικό κυψελιδικό επιθήλιο (A, B) συγκριτικά με του ινωτικού πνεύμονα (C-F). Περαιτέρω ανάλυση της κυτταρικής εντόπισης του σήματος ανέδειξε συναθροίσεις επιθηλιακών κυττάρων που υπερέκφραζαν την hTR υπομονάδα και τα οποία περιέβαλλαν περιοχές ενεργού ίνωσης κυρίως στον IPF πνεύμονα (D) και σε μικρότερο βαθμό στον COP πνεύμονα (E, F). Επιπλέον ενισχυμένο σήμα έκφρασης της τελομεράσης παρατηρήσαμε και στις ινοβλαστικές εστίες IPF πνεύμονα (D) σε αντίθεση με τα σωμάτια Masson του COP πνεύμονα (E). Πραγματικές μεγεθύνσεις: A, C και E: x40, B, D και F: x40.

προηγούμενο εύρημα ενισχύθηκε ακόμα περισσότερο με την FISH ανάλυση που αποκάλυψε περιοχές ενισχυμένου σήματος εντός του ινωτικού διάμεσου χώρου στον IPF πνεύμονα (17 από τις 25 περιπτώσεις) (Εικόνα 5D) συγκριτικά με τον COP πνεύμονα όπου ανιχνεύσαμε ινωτικές περιοχές χαμηλής ενίσχυσης σήματος στους 18 από τους 20 συνολικά ασθενείς (Εικόνα 5F). Τα αποτελέσματα αυτά μας παρέχουν σημαντικές πληροφορίες σχετικά με την παθογένεια της πνευμονικής ίνωσης και μπορούν να εξηγήσουν τις σημαντικές διαφορές τις οποίες εμφανίζουν οι δυο αυτές μορφές ιδιοπαθούς διάμεσης πνευμονίας όσον αφορά την προοδευτικότητα της νόσου και την ανταπόκριση στη θεραπεία. Επίσης δύναται να απαντήσουν στο ερώτημα γιατί οι βλάβες της COP υπόκεινται πλήρη ίαση μετά τη χορήγηση κορτικοειδών σε αντίθεση με τις ινοβλαστικές εστίες της IPF που είναι ανθεκτικές στην απόπτωση και εξελίσσονται ταχύτατα παρά τη θεραπευτική αγωγή.

### **Παρόμοια με την τελομεράση εκφραστικά πρότυπα απόπτωσης, διαφοροποίησης και κυτταρικού πολλαπλασιασμού στους ινωτικούς πνεύμονες**

Για να επιβεβαιώσουμε αν το προφίλ έκφρασης της τελομεράσης συνοδεύεται από παρόμοιο εκφραστικό πρότυπο απόπτωσης εκτιμήσαμε την έκφραση του επαγόμενου από την κασπάση παράγοντα κατακερματισμού του DNA [DNA fragmentation factor-DFF]. Σε συνάρτηση με το εκφραστικό πρότυπο της τελομεράσης παρατηρήσαμε αυξημένη απόπτωση στο κυψελιδικό επιθήλιο τόσο του IPF ( $p < 0.001$ ) όσο και του COP πνεύμονα ( $p < 0.02$ ) σε σύγκριση με το φυσιολογικό πνευμονικό ιστό (Εικόνα 7A-C). Επιπλέον, παρατηρήσαμε αυξημένη αποπτωτική δραστηριότητα στο κυψελιδικό επιθήλιο που περιέβαλλε περιοχές κατεστραμμένου πνεύμονα και εγκατεστημένης ίνωσης (περιοχές δίκην μελικηρύθρα), όπου κυριαρχούσαν τα τελομεράση (-) επιθηλιακά κύτταρα, υποδεικνύοντας ότι τα κύτταρα αυτά ήταν πιο πιθανό να υφίστανται απόπτωση λόγω της απουσίας έκφρασης της τελομεράσης. Περαιτέρω, αυξημένη απόπτωση σημειώθηκε και στις περιοχές ινοβλαστικής δραστηριότητας του COP πνεύμονα σε αντίθεση με τις αντίστοιχες του IPF όπου η απόπτωση ήταν ελάχιστη. Η παρατήρηση αυτή ενισχύει ακόμα περισσότερο τον ρόλο της τελομεράσης στο παράδοξο φαινόμενο της απόπτωσης που χαρακτηρίζει την IPF: προδιάθεση για απόπτωση από τα επιθηλιακά κύτταρα και ανθεκτικότητα στην απόπτωση από τους ινοβλάστες (Εικόνα 7A-D).

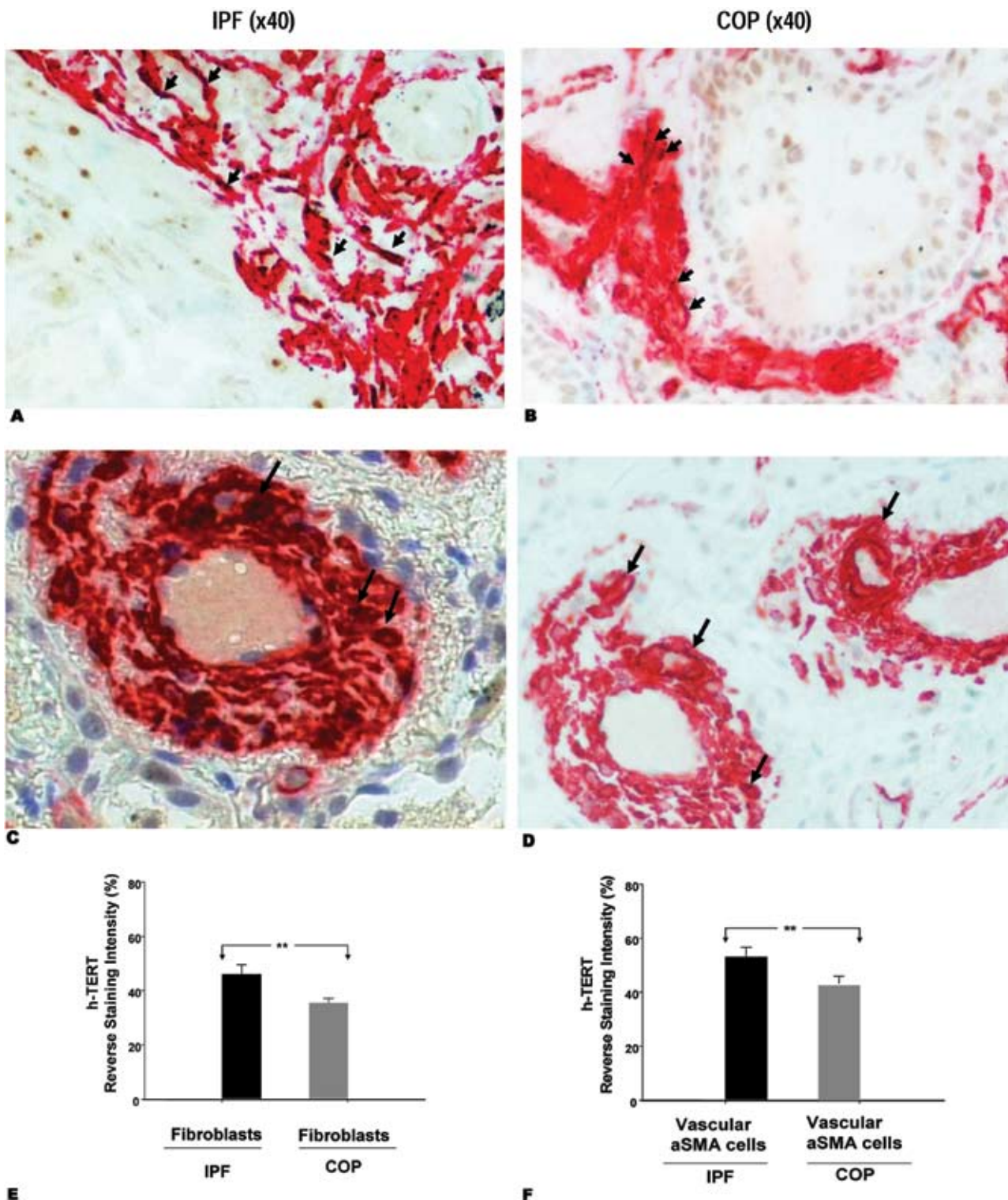
Τέλος, λόγω της έλλειψης δεδομένων που να υπο-

στηρίζουν εμπλοκή της τελομεράσης στην κυτταρική διαφοροποίηση εκτιμήσαμε το εκφραστικό πρότυπο ενός δείκτη μεσεγγυματικής διαφοροποίησης, της N-καντ-χερίνης και παρατηρήσαμε ότι αλληλεπικαλύπταν με αυτό της τελομεράσης. Πιο συγκεκριμένα παρατηρήσαμε αυξημένη έκφραση στα υπερπλαστικά, μορφολογικά διαφοροποιημένα επιθηλιακά κύτταρα (με φαινότυπο παρόμοιο με αυτόν των μεσεγγυματικών κυττάρων) ( $p < 0.01$ ) που περιέβαλλαν ινοβλαστικές εστίες και στα δυο πρότυπα πνευμονικής ίνωσης τονίζοντας ότι τα κύτταρα αυτά χρειάζονται αυξημένα επίπεδα τελομεράσης όχι μόνο για να είναι ανθεκτικά στην απόπτωση αλλά επιπλέον για να υφίστανται ένα είδος μεταπλασίας, την επιθηλιακή – μεσεγγυματική μετάπτωση (Εικόνα 7E-H).

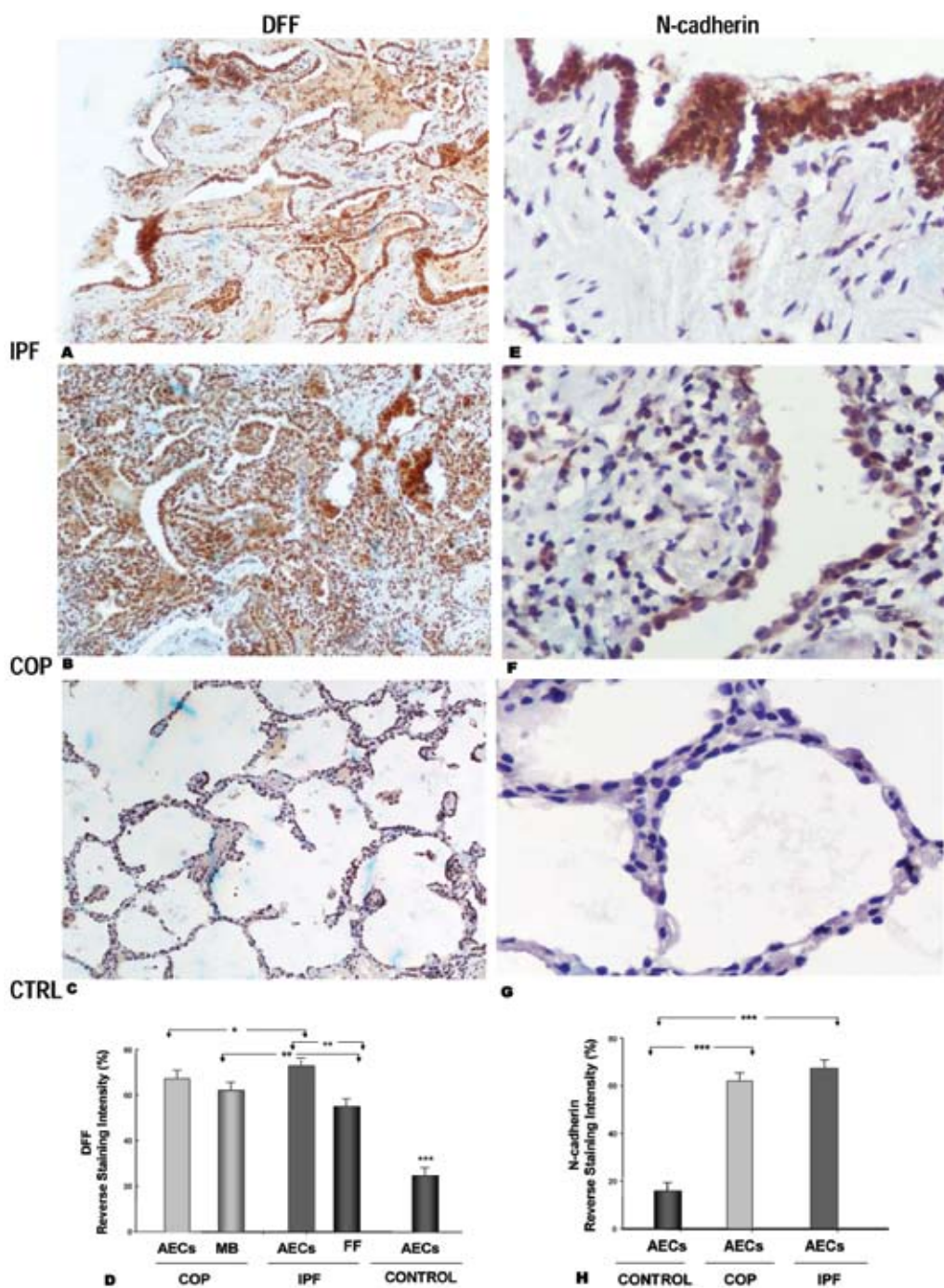
## **ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

Με βάση την τρέχουσα βιβλιογραφία η μελέτη μας αποτελεί την πρώτη αναφορά σχετικά με την έκφραση της τελομεράσης σε ασθενείς με ιδιοπαθή διάμεση πνευμονοπάθεια και τα ευρήματα αυτής υποστηρίζουν μια αιτιολογική συσχέτιση μεταξύ χαμηλής έκφρασης τελομεράσης και παθογένειας πνευμονικής ίνωσης, όπως ακριβώς έχει αποδειχθεί με τη συγγενή δυσκεράτωση (dyskeratosis congenital)<sup>30,31</sup>, ένα σπάνιο σύνδρομο που χαρακτηρίζεται από μεταλλαγές στο ενζυμικό σύμπλεγμα της τελομεράσης και πνευμονική ίνωση προσομοιάζουσα της IPF. Ο σχεδιασμός της μελέτης μας είχε ως εξής: Χρησιμοποιήσαμε qRT-PCR πραγματικού χρόνου και δείξαμε ελαττωμένη έκφραση τελομεράσης στους ασθενείς με IPF συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου. Επιπρόσθετα, κατασκευάσαμε δυο ιστικές μικροσυτοιχίες αποτελούμενες από 100 αντιπροσωπευτικά ιστικά δείγματα από ασθενείς με IPF και COP και από φυσιολογικό πνευμονικό ιστό της ομάδας ελέγχου. Η ανοσοϊστοχημική ανάλυση σε συνδυασμό με τη υπολογιστική ανάλυση της εικόνας αποκάλυψαν ελαττωμένη έκφραση του ενζύμου στους ινωτικούς πνεύμονες σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Στη συνέχεια επιλέξαμε να αναλύσουμε την κυτταρική εντόπιση της έκφρασης της τελομεράσης τόσο με διπλή ανοσοϊστοχημεία όσο και με FISH και δείξαμε μειωμένη έκφραση τελομεράσης στα πνευμονοκύτταρα τύπου II που περιέβαλλαν περιοχές κατεστραμμένου πνεύμονα και εγκατεστημένης ίνωσης εντός του IPF πνεύμονα. Ένα από τα πιο ενδιαφέροντα σημεία της μελέτης μας ήταν η ανίχνευση αυξημένων επιπέδων έκφρασης τελομεράσης όχι μόνο στο φυσιολογικό επιθήλιο του IPF πνεύμονα αλλά και στα αναγεννητικά μορφολογικά μεταλλαγμένα τύπου





**ΕΙΚΟΝΑ 6.** Συνέκφραση της τελομεράσης με τα λεία μυϊκά κύτταρα (α-SMA) κύτταρα στις ινοβλαστικές εστίες του IPF πνεύμονα. Η διπλή ανοσοϊστοχημική υπολογιστική ανάλυση εικόνας για την h-TERT υπομονάδα και τον παράγοντα α-SMA αποκάλυψε συνεντόπιση της τελομεράσης (μαύροι πυρήνες) στις περιοχές ενεργού ίνωσης (κόκκινο κυτταρόπλασμα) (βέλη) στον IPF (A) συγκριτικά με τον COP πνεύμονα (B). Η τελομεράση επίσης ήταν παρούσα στις λείες μυϊκές ίνες των αγγείων του πνεύμονα που εξέφραζαν αSMA στον IPF (C) συγκριτικά με τον COP πνεύμονα (D). Πραγματικές μεγεθύνσεις: A-D: x40.



**ΕΙΚΟΝΑ 7.** Παρόμοια με την τελομεράση εκφραστικά πρότυπα απόπτωσης, διαφοροποίησης και κυτταρικού πολλαπλασιασμού στους ινωτικούς πνεύμονες. Αυξημένη απόπτωση όπως εκτιμήθηκε με την ανοσοϊστοχημική ανάλυση του παράγοντα κατακερματισμού του DNA (DFF) παρατηρήθηκε στο υπερπλαστικό κυψελιδικό και βρογχικό επιθήλιο του IPF πνεύμονα (A) ενώ στον COP πνεύμονα θετική χρώση για τον DFF εντοπίστηκε και στις περιοχές οργανούμενης πνευμονίας και στα σωματίδια Masson (B). Επιπρόσθετα, έντονα θετική χρώση για την N-καντχερίνη παρατηρήθηκε στις περιοχές ακανόνιστης επαν επιθηλιοποίησης και βρογχιολιοποίησης (βέλη) που περιέβαλλαν τις ινοβλαστικές εστίες στον IPF πνεύμονα (E), ενώ στον COP πνεύμονα η N-καντχερίνη ήταν παρούσα στο επιθήλιο που περιέβαλλε περιοχές κυψελιδικής πλήρωσης και οργανούμενης πνευμονίας (F) στις οποίες ήταν έντονα θετική η χρώση για την τελομεράση. Αντίθετα παρατηρήσαμε ελάχιστη έκφραση του DFF (\*\* $p < 0.001$ ) και της N-καντχερίνης (\*\* $p < 0.001$ ), με βάση την ποσοτική ανάλυση της εικόνας στις περιοχές του φυσιολογικού επιθηλίου (C, G). Πραγματικές μεγεθύνσεις: A-C και E:  $\times 20$ , F και G:  $\times 40$ .



Η πνευμονοκύτταρα που γειτνιάζαν με περιοχές ενεργού ίνωσης, κυρίως στον IPF πνεύμονα και σε μικρότερο βαθμό στα COP ιστικά δείγματα. Ακόμα πιο εντυπωσιακά, η τοπική ετερογένεια στην έκφραση της τελομεράσης συνοδεύτηκε και από παρόμοια εκφραστικά πρότυπα δεικτών απόπτωσης, διαφοροποίησης και κυτταρικού πολλαπλασιασμού, όπως ακριβώς εκτιμήθηκαν με ανοσοϊστοχημικές αναλύσεις.

Στην IPF/UIP, συναθροίσεις ινοβλαστών και μυοϊνοβλαστών εντοπιζόμενες κυρίως στις υπούπεζωκοτικές ζώνες του διάμεσου χώρου αποτελούν το παθογενετικό ορόσημο και ένα από τα κριτήρια για την διάγνωση της νόσου<sup>10</sup>. Η εμμένουσα παραμονή των εστιών αυτών παρά τη λήψη θεραπείας όπως εκτιμάται από την μακροβιότητα και τον αυξημένο πολλαπλασιασμό των κυττάρων αυτών ίσως να αποτελεί τη βάση για την προοδευτική εξέλιξη και επιδείνωση της ινωτικής εξεργασίας. Ενώ όμως η κλινική πορεία των ασθενών με IPF είναι δυσμενής, εντούτοις ασθενείς πάσχοντες από άλλους τύπους πνευμονικής ίνωσης παρουσιάζονται με εξαιρετική πρόγνωση και άριστη ανταπόκριση στη θεραπεία με κορτικοειδή<sup>19</sup>. Εκτενείς μελέτες έχουν αποδώσει αυτές τις διαφορές στα διακριτά παθογενετικά πρότυπα που χαρακτηρίζουν τα δυο αυτά νοσήματα και τα οποία αντανakλώνται στα διαφορετικά αποπτωτικά<sup>32-34</sup> και αγγειογενετικά πρότυπα έκφρασης<sup>35-37</sup>. Επιπρόσθετα, ενώ το κυψελιδικό επιθήλιο θεωρούνταν επί δεκαετίες ως παθητικός παρατηρητής κατά τη διαδικασία της ινογένεσης, τα τελευταία χρόνια η άποψη ότι τα επαναλαμβανόμενα βλαπτικά ερεθίσματα επάγουν πλην της απόπτωσης και τη διαφοροποίηση των αναγεννητικών πνευμονοκυττάρων τύπου II με μια διαδικασία που λέγεται επιθηλιακή-μεσεγγυματική μετάπτωση (epithelial-mesenchymal transition-EMT) έχει συγκεντρώσει μεγάλο επιστημονικό ενδιαφέρον<sup>38-40</sup>.

Πρόσφατες μελέτες που επικέντρωσαν στην έκφραση της τελομεράσης σε ινοβλάστες απομονωθέντες από το πειραματικό μοντέλο της μπλεομυκίνης αποκάλυψαν ένα σημαντικό ρόλο της τελομεράσης στην κυτταρική διαφοροποίηση. Πιο συγκεκριμένα, ο Phan και οι συνεργάτες του πρότειναν ότι η επαγωγή της δραστηριότητας της τελομεράσης σε ινοβλάστες αρουραίου μπορεί να οφείλεται σε μεσολαβητές του πολλαπλασιασμού των ινοβλαστών ενώ αντίθετα η απώλεια έκφρασης του ενζύμου από ειδικούς αναστολείς πυροδοτεί τη διαφοροποίηση τους σε μυοϊνοβλάστες<sup>15,21-23</sup>. Επιπλέον, ο Fridlender και οι συνεργάτες του ενέπλεξαν την χαμηλή δραστηριότητα του ενζύμου στην εκσεσημασμένη απόπτωση των κυψελιδικών επιθηλιακών κυττάρων ποντικού μετά από έγχυση μπλεομυκίνης τονίζοντας περαιτέρω ότι η βαθ-

μιαία αύξηση της δραστηριότητας της τελομεράσης στα επιθηλιακά κύτταρα ίσως και να αντιπροσωπεύει έναν αμυντικό μηχανισμό ενάντια στις άμεσα προσκείμενες ινοβλαστικές εστίες που επάγουν την απόπτωση κατά την ινωτική εξεργασία<sup>24</sup>. Ωστόσο, η ανθρώπινη τελομεράση διαφέρει σημαντικά από εκείνη του ποντικού τόσο στις λειτουργικές όσο και στις ρυθμιστικές ιδιότητες ενώ και το πειραματικό μοντέλο της ίνωσης με μπλεομυκίνη δεν είναι πλήρως αντιπροσωπευτικό της IPF λόγω της αυτοϊώμενης φύσης του, της ταχύτητας ανάπτυξης του και της στενής σχέσης της φλεγμονής με την πνευμονική ίνωση<sup>21</sup>. Επιπρόσθετα, στο επίπεδο της ανθρώπινης νόσου είναι εν πολλοίς άγνωστη η σχέση μεταξύ της δράσης ή αναστολής της τελομεράσης και της ανάπτυξης και προοδευτικής εξέλιξης της πνευμονικής ίνωσης<sup>23</sup>.

Επομένως κρίνεται απαραίτητη η διενέργεια μιας ανθρώπινης μελέτης. Για το λόγο αυτό μελετήσαμε για πρώτη φορά στην τρέχουσα βιβλιογραφία, την έκφραση της τελομεράσης σε ιστικά δείγματα ασθενών με δυο διαφορετικές μορφές πνευμονικής ίνωσης, IPF και COP. Χρησιμοποιήσαμε την πρωτοποριακή τεχνολογία των ιστικών μικροσυστοιχιών η οποία μας επέτρεψε την ταυτόχρονη ανάλυση έως και 200 ιστικών κύβων παραφίνης σε ένα και μοναδικό πείραμα κάτω από αυστηρά τυποποιημένες συνθήκες, εννοώντας δηλαδή ότι όλα τα ιστικά δείγματα αναλύθηκαν με τον ίδιο, πανομοιότυπο τρόπο, χωρίς την παρέμβαση ανθρώπινου παράγοντα (unbiased fashion) με ελάχιστη καταστροφή του ιστού, χαμηλό κόστος, συντομότερο χρόνο και με τρόπο που διευκόλυνε όχι μόνο την ποσοτική ανάλυση της χρωματικής έντασης αλλά μας βοήθησε να επικεντρώσουμε και σε ειδικές κυτταρικές σειρές, όπως οι ινοβλάστες και τα κυψελιδικά κύτταρα, των οποίων ο ρόλος στην παθογένεια της νόσου είναι πολύ σημαντικός<sup>39</sup>. Η ανάλυση των δεδομένων αποκάλυψε μειωμένη έκφραση τελομεράσης τόσο σε επίπεδο mRNA όσο και σε επίπεδο πρωτεΐνης στους ασθενείς με πνευμονική ίνωση σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Τα αποτελέσματα της qRT-PCR και της TRAP ανάλυσης συμπληρώθηκαν από ανοσοϊστοχημικές μελέτες, σε συνδυασμό με το πρόγραμμα ημιποσοτικής ανάλυσης εικόνας (semi-quantitative image analysis) που εκτιμά την ένταση του ανιχνευόμενου σήματος της χρωστικής ουσίας του προς εξέταση παρασκευάσματος, με αμερόληπτο τρόπο σε μια κλίμακα 256 χρωμάτων (τα συμβατικά μικροσκόπια αναγνωρίζουν διαφορές του σήματος σε κλίμακα 30 χρωμάτων)<sup>41,42</sup> και έδειξαν ισχυρή πρόσληψη χρωστικής ουσίας του φυσιολογικού επιθηλίου σε αντίθεση με τις ινωτικές περιοχές. Αξιοσημείωτα, ανοσοϊστοχημικές μέθοδοι υποστηριζόμενες και από

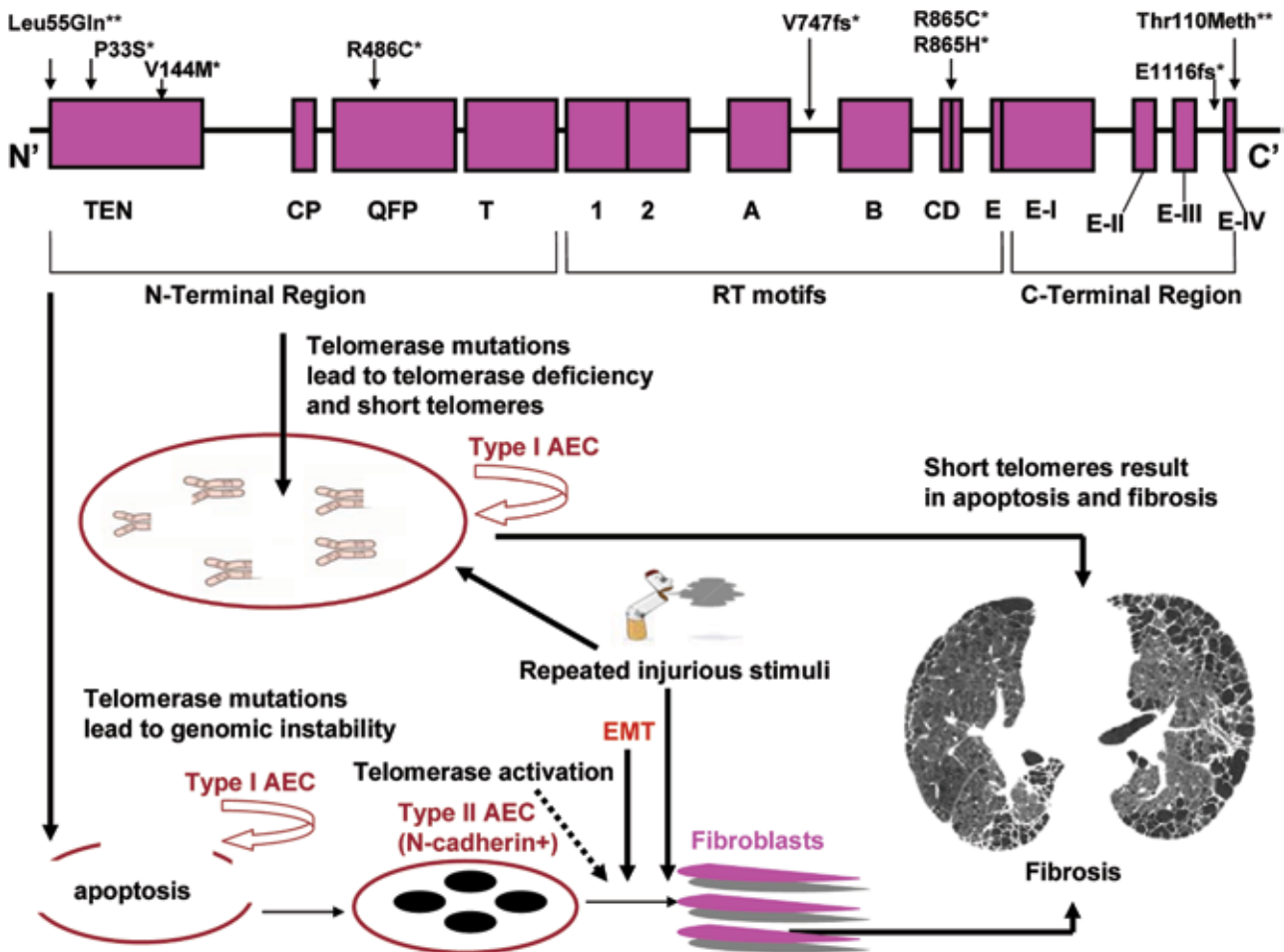
FISH ανάλυση, επεκτείνοντας πρωτοποριακές αναφορές<sup>40</sup>, ανακάλυψαν την ύπαρξη δυο διακριτών υποπληθυσμών τύπου II πνευμονοκυττάρων με βάση τα επίπεδα έκφρασης τελομεράσης; μορφολογικά μεταλλαγμένα τελομεράση θετικά κύτταρα άμεσα προσκείμενα σε περιοχές ενεργού ίνωσης τα οποία επιδείκνυαν υψηλά επίπεδα έκφρασης δεικτών μεσεγγυματικής διαφοροποίησης όπως η N-καντερίνη εντοπιζόμενα κυρίως στον IPF πνεύμονα και σε μικρότερο βαθμό στον COP πνεύμονα και τελομεράση αρνητικά κύτταρα τα οποία παρατηρήθηκαν κυρίως σε περιοχές κατεστραμμένου πνευμονικού παρεγχύματος και εγκατεστημένης ίνωσης στον IPF πνεύμονα και γύρω από περιοχές κυψελιδικής πλήρωσης και οργανώμενης πνευμονίας στα COP ιστικά δείγματα. Τα τελευταία κύτταρα φαίνεται ότι χαρακτηρίζονται από αυξημένη αποπτωτική δραστηριότητα όπως αυτή εκτιμήθηκε από τη θετική ανοσοϊστοχημική χρώση για τον παράγοντα κατακερματισμού του DNA. Περαιτέρω, παρατηρήσαμε αυξημένη έκφραση του ενζύμου και σε περιοχές κυψελιδικού επιθηλίου οι οποίες μακροσκοπικά τουλάχιστον φαινόταν φυσιολογικές, εντός του IPF πνεύμονα.

Η διττή αυτή έκφραση της τελομεράσης στα προγονικά πνευμονοκύτταρα τύπου II μας παρέχει σημαντικές πληροφορίες σχετικά με τον ρόλο της τελομεράσης στην παθογένεια της πνευμονικής ίνωσης. Μπορούμε επομένως να υποθέσουμε ότι αλλαγές στην έκφραση της τελομεράσης δύνανται να ρυθμίζουν την μοίρα των κυψελιδικών κυττάρων είτε προς έναν αποπτωτικό φαινότυπο ή προς ένα φαινότυπο μεσεγγυματικής διαφοροποίησης, συνεισφέροντας έτσι άμεσα στην ινωτική διαδικασία (εικόνα 8). Πρόσφατα δεδομένα από δυο ανεξάρτητες γενετικές μελέτες<sup>28,41</sup> συσχετίζουν τις μεταλλαγές στις υπομονάδες της τελομεράσης με την οικογενή IPF προτείνοντας ότι τα βραχέα, δυσλειτουργικά τελομερή στα επιθηλιακά κύτταρα μπορούν να οδηγήσουν σε απόπτωση τους και στη δημιουργία πολλαπλών ινωτικών βλαβών. Επίσης αναφέρουν ότι υπό την επίδραση πολλαπλών «επιθέσεων» το βρογχοκυψελιδικό επιθήλιο απαντά με συνεχή αναγέννηση η οποία είναι άμεσα εξαρτώμενη από τα τοπικά προγονικά κύτταρα τα οποία στην περίπτωση της ίνωσης χαρακτηρίζονται από χαμηλά επίπεδα βιοσιμότητας εξαιτίας της παρουσίας βραχέων τελομερών, προερχόμενων από τη μειωμένη έκφραση της τελομεράσης. Τα αποτελέσματα της μελέτης είναι σύμφωνα με αυτήν την υπόθεση.

Τα τελομεράση αρνητικά κύτταρα είναι πιο πιθανό να αποπίπτουν όπως φάνηκε άλλωστε και από την αυξημένη έκφραση του παράγοντα κατακερματισμού του DNA, συνεισφέροντας έτσι στην ακανόνιστη, χαο-

τική επανεπιθηλιοποίηση που χαρακτηρίζει τη νόσο. Σε συμφωνία με αυτό, η παρουσία αυξημένων επιπέδων έκφραση τελομεράσης στα μορφολογικά μεταλλαγμένα, επιπεδωμένα, προσομοιάζοντα με μεσεγγυματικά κύτταρα, προγονικά τύπου II πνευμονοκύτταρα τα οποία εξέφραζαν αυξημένα επίπεδα δεικτών διαφοροποίησης ίσως να σημαίνει ότι τα κύτταρα αυτά χρειάζονταν την τελομεράση για υποστούν ένα είδος μεταπλασίας, την επιθηλιακή-μεσεγγυματική μετάπτωση<sup>22,42,43</sup>. Η εντόπιση υψηλών επιπέδων τελομεράσης στο φυσιολογικό επιθήλιο εντός του IPF πνεύμονα ίσως να αντιπροσωπεύει ένα είδος αμυντικού μηχανισμού επιβίωσης των κυψελιδικών κυττάρων ενάντια στα επαναλαμβανόμενα ερεθίσματα ιστική βλάβης που οδηγούν τελικά στην ινογένεση ή ακόμα μια αντιρροπιστική απάντηση προκειμένου να ελαττώσουν την έκταση της ινωτικής εξεργασίας, όπως ακριβώς έχει αναφερθεί σε πειραματικά μοντέλα ίνωσης.

Επιπρόσθετα αξίζει να αναφερθεί, ότι η υπερέκφραση τελομεράσης σε περιοχές ινοβλαστικής δραστηριότητας περισσότερο στον IPF από ότι στον COP πνεύμονα υποδεικνύει ένα μηχανισμό μέσω του οποίου οι ινοβλάστες της IPF με μεταλλαγμένο φαινότυπο εξασκούν την ανθεκτικότητα τους στο φαινόμενο της απόπτωσης γεγονός που μπορεί να εξηγήσει την ύφεση των ινωτικών βλαβών της COP μετά από θεραπεία με κορτικοειδή και την παραμονή της ινωτικής εξεργασίας της IPF ανεξαρτήτου θεραπευτικής αγωγής<sup>38,44</sup>. Η άμετρη συστράτευση και παραμονή ινοβλαστών μεταλλαγμένου φαινότυπου σε συνδυασμό με το φαινόμενο της επιθηλιακής – μεσεγγυματικής μετάπτωσης προσομοιάζει με τη μεταπλασία και τη γενετική εξαλλαγή των καρκινικών κυττάρων. Το αν μεταλλαγές στις υπομονάδες της τελομεράσης είναι υπεύθυνες για τη ανεπαρκή δραστηριότητα του ενζύμου και τα βραχέα τελομερή οδηγώντας σε απώλεια των κυψελιδικών επιθηλιακών κυττάρων ή ακόμα και για την αυξημένη δράση του ενζύμου και την μεταπλασία του επιθηλίου είναι εν πολλοίς άγνωστο και διφορούμενο. Αυτό που σήμερα είναι ήδη γνωστό είναι πως μεταλλαγμένα συστατικά της τελομεράσης μπορεί να οδηγήσουν σε χρωματοσωμιακή αστάθεια, όπως συμβαίνει κατά τη μετάλλαξη ενός φυσιολογικού κυττάρου σε καρκινικό. Η ενεργοποίηση της τελομεράσης μετά την έναρξη της χρωματοσωμιακής αστάθειας σε συνδυασμό με το βεβλαμμένο προϊνώτικό μικροπεριβάλλον, προάγει τη συστράτευση μεταλλαγμένων κυττάρων μέσα από μια διαδικασία που ονομάζεται EMT (εικόνα 8). Δυο πρόσφατες, ανεξάρτητες μεταξύ τους κλινικές μελέτες<sup>22,23</sup> συσχέτισαν τα μεταλλαγμένα συστατικά της τελομεράσης με την οικογενή IPF, δείχνοντας ότι τα μικρά δυσλειτουργικά τελομερή μπορεί



**ΕΙΚΟΝΑ 8. Μεταλλαγές τελομεράσης, ενεργοποίηση τελομεράσης, επιθηλιακή-μεσεγχυματική μετάπτωση, απόπτωση και πνευμονική ίνωση.** Σχηματική αναπαράσταση των διατηρημένων περιοχών της hTERT με σημειακές μεταλλαγές, όπως αναδείχθηκαν από την ομάδα του Tsakiri K (23) (\*) και του Armanios M (22) (\*\*). Οι μεταλλαγές της καταλυτικής υπομονάδας της hTERT μπορεί να οδηγήσουν σε έλλειψη τελομεράσης και σε μικρά μη λειτουργικά τελομερή στα πνευμονοκύτταρα τύπου I. Τα τελευταία σε συνδυασμό με έκθεση σε επανειλημμένα βλαπτικά ερεθίσματα (π.χ. στον καπνό του τσιγάρου) ενδεχομένως προάγουν την απόπτωση των επιθηλιακών αναπνευστικών κυττάρων και την ανάπτυξη της ινογόνου διαδικασίας. Επιπρόσθετα, μεταλλαγμένα συστατικά της τελομεράσης μπορεί να οδηγήσουν σε χρωματοσωμιακή αστάθεια, όπως ακριβώς συμβαίνει κατά την πορεία εξέλιξης ενός φυσιολογικού κυττάρου σε καρκινικό. Η απόπτωση των πνευμονοκυττάρων τύπου I οδηγεί σε αντισταθμιστικό πολλαπλασιασμό των τύπου II πνευμονοκυττάρων. Η ενεργοποίηση της τελομεράσης μετά το ξεκίνημα της γονιδιακής αστάθειας σε συνδυασμό με ένα βεβλαμένο προ-ινοτικό μικροπεριβάλλον, προάγει την απόκτηση διαφοροποιημένων κυττάρων μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται επιθηλιο-μεσεγχυματική μετάπτωση. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας αυτής, τα πνευμονοκύτταρα τύπου II αντί να διαφοροποιούνται σε τύπου I, υφίστανται ένα είδος μεταπλασίας προς ένα μεσεγχυματικό φαινότυπο (N-cadherin+), συμβάλλοντας έτσι στην ανάπτυξη πνευμονικής ίνωσης, όπως αυτή αναδεικνύεται από αλλαγές τύπου κηρύθρας στην υψηλής ευκρίνειας υπολογιστική τομογραφία θώρακος (HRCT).

να οδηγήσουν σε απόπτωση των πνευμονοκυττάρων και δημιουργία πολλαπλών ινοτικών βλαβών. Οι παραπάνω μελέτες ανέφεραν επίσης ότι σε πολλαπλά «χτυπήματα», το βρογχοκυψελιδικό επιθήλιο αναγεννιέται γεγονός που αποδίδεται στα προγονικά κύτταρα που βρίσκονται τοπικά στην περιοχή. Τα ευρήματά μας είναι σύμφωνα με

την υπόθεση αυτή. Τα αρνητικά προγονικά κύτταρα της τελομεράσης είναι περισσότερο πιθανό οδηγηθούν στη απόπτωση όπως εκτιμάται από την αυξημένη έκφραση του παράγοντα αποδόμησης του DNA, συνεισφέροντας έτσι στη μη φυσιολογική επαναθηλιοποίηση που χαρακτηρίζει την παθογένεια της νόσου. Παράλληλα με αυτό,

η αυξημένη χρώση της τελομεράσης και η αραίωση των πνευμονοκυττάρων τύπου II (εικόνα 7B και 7E) που εκφράζουν δείκτες κυτταρικής διαφοροποίησης, μπορεί να δείχνουν την ανάγκη ενεργοποίησης της τελομεράσης να προάγει EMT<sup>38,44,45</sup>.

Επιπρόσθετα, η παρουσία τελομεράσης σε περιοχές κυττάρων αυξημένης πολλαπλασιαστικότητας όπως οι ινοβλάστες των ασθενών με IPF που συγκρίθηκαν με COP, δείχνει έναν μηχανισμό αντίστασης στην απόπτωση των IPF ινοβλαστών με αλλαγμένο φαινότυπο, γεγονός που μπορεί να ερμηνεύσει τη λύση των βλαβών στους ασθενείς με COP ως απάντηση στα κορτικοστεροειδή, εν αντιθέσει με την IPF που εξακολουθεί να έχει κακή πρόγνωση παρά τη θεραπεία<sup>46,47</sup>.

Η ανίχνευση μεταλλαγών της τελομεράσης σε επιθηλιακά κύτταρα και ινοβλάστες απομονωθέντα από ασθενείς με διαφορετικές μορφές πνευμονικής ίνωσης μπορεί να αποτελέσει ένα βήμα μπροστά και να βοηθήσει τους κλινικούς ιατρούς ώστε να αναγνωρίζουν πρώιμα, άτομα τα οποία είναι μάλλον απίθανο να ανταποκριθούν σε ανοσοκατασταλτικούς παράγοντες.

Επιπρόσθετα, η εντόπιση της τελομεράσης στα πνευμονικά αγγειακά κύτταρα που εκφράζουν αSMA στους πνεύμονες με IPF μπορεί να εξηγήσει τον αυξημένο πολλαπλασιασμό και την αναδιαμόρφωση που χαρακτηρίζουν τα συγκεκριμένα κύτταρα και τα οποία εν τέλει οδηγούν αγγειοσύσπαση και σε ανάπτυξη δευτεροπαθούς πνευμονικής υπερτάσεως σε τελικού σταδίου πνευμονική ίνωση, μια από τις κυριότερες αιτίες θανάτου στους ασθενείς αυτούς παγκοσμίως<sup>48</sup>. Παρόλα ταύτα, περισσότερες μελέτες απαιτούνται για να τεκμηριώσουν την παραπάνω παρατήρηση.

Παρά τον σχετικό ενθουσιασμό που μπορεί να πηγάζει από τα παραπάνω αποτελέσματα και παρατηρήσεις, η μελέτη μας εμφανίζει μερικούς περιορισμούς οι οποίοι πρέπει να αντιμετωπιστούν προσεκτικά. Πρώτον, είναι ευρέως γνωστό ότι η IPF/UIP χαρακτηρίζεται από σημαντική τοπική και χρονική ετερογένεια βλαβών με την παρουσία περιοχών φυσιολογικού πνευμονικού παρεγχύματος, ενεργού ίνωσης και τελικού σταδίου ίνωση με καταστροφή του πνευμονικού ιστού. Η τεχνολογία των ιστικών μικροσυστοιχιών βασίζεται στην ανάλυση μικρών αντιπροσωπευτικών ετερογενών δειγμάτων και επομένως το πλέον εύλογο ερώτημα που γεννάται είναι το κατά πόσον μπορεί η μέθοδος αυτή να αποτυπώσει τις βιολογικές ιδιότητες μιας τόσο ετερογενούς νόσου. Το ερώτημα αυτό έχει διερευνηθεί από πληθώρα επιστημόνων οι οποίοι έχουν συγκρίνει χωρίς να δουν σημαντικές διαφορές αποτελέσματα μελετών με μεγάλες ιστικές

τομές και με ιστικές μικροσυστοιχίες. Επιπρόσθετα, άλλες μελέτες αποκάλυψαν ότι η πολλαπλή λήψη δειγμάτων από διαφορετικές περιοχές βλάβης ήταν επαρκής για να ανιχνεύσει κλινικοπαθολογοανατομικές συσχετίσεις χωρίς ταυτόχρονα να καταστρέψει τον ιστό. Ωστόσο είναι η πρώτη φορά που η τεχνολογία αυτή εφαρμόζεται στην έρευνα των διαμέσων πνευμονοπαθειών μιας και όλες αυτές οι μελέτες αναφέρονται σε καρκινικά δείγματα οπότε χρειάζεται αρκετός χρόνος ακόμα μέχρις ότου η τεχνολογία αυτή εγκατασταθεί στην καθημέρα ιατρική πράξη. Δεύτερον, με βάση την προσέγγιση μας δεν μπορούμε να είμαστε σίγουροι για το αν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ αυξημένης έκφραση τελομεράσης και διαφοροποίησης και χαμηλής έκφρασης και απόπτωσης. Παρά ταύτα η μελέτη μας αποτελεί ουσιαστικά την πρώτη προσπάθεια συσχέτισης της τελομεράσης με την επιθηλιακή απόπτωση και διαφοροποίηση καθώς και με τον αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό των ανθεκτικών στην απόπτωση ινοβλαστών. Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω μπορούμε να υποθέσουμε ότι οι καινούριες θεραπευτικές παρεμβάσεις που θα στοχεύουν στη διατήρηση των επιθηλιακών κυττάρων μέσω επαγωγής της έκφρασης της τελομεράσης μπορούν να αποδειχθούν σαφώς πιο αποτελεσματικές από τους τρέχοντες αντι-ινωτικούς ή ανοσοστροποιοητικούς παράγοντες<sup>49</sup>.

Συμπερασματικά θα μπορούσαμε να πούμε, ότι δείξαμε μια σημαντική ελάττωση στην έκφραση της τελομεράσης σε ασθενείς με δυο διαφορετικές μορφές πνευμονικής ίνωσης συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου εμπλέκοντας έτσι για πρώτη φορά την χαμηλή δραστηριότητα του ενζύμου με την παθογένεια της ινωτικής διεργασίας. Η υποέκφραση αυτή του ενζύμου που συνοδεύτηκε από αυξημένη απόπτωση ήταν περισσότερο έντονη στα επιθηλιακά κύτταρα που περιέβαλλαν τελικού σταδίου εγκατεστημένη ίνωση. Αξιοσημείωτα, η αύξηση των επιπέδων έκφρασης της τελομεράσης δεν ήταν μόνο παρούσα στις ινοβλαστικές εστίες όπου η απόπτωση ήταν ελάχιστη αλλά και σε περιοχές υπερπλαστικού επιθηλίου άμεσα προσκείμενο σε αυτές. Τα ευρήματα αυτά υπογραμμίζουν το γεγονός ότι η τελομεράση μπορεί να ρυθμίζει την μοίρα των επιθηλιακών κυττάρων είτε προς ένα αποπτωτικό φαινότυπο ή προς ένα φαινότυπο μεσεγχυματικής διαφοροποίησης, συνεισφέροντας έτσι άμεσα στην πνευμονική ίνωση. Τέλος τα διακριτά εκφραστικά πρότυπα της τελομεράσης μεταξύ των δυο μορφών πνευμονικής ίνωσης μπορούν να εξηγήσουν και διαφορές όσον αφορά την προοδευτικότητα της νόσου και την ανταπόκριση στη θεραπεία. Μελλοντικές μελέτες σε ασθενείς με διαφορετικές μορφές ιδιοπαθών διάμεσων

πνευμονιών σε συνδυασμό με πειραματικά δεδομένα από ποντίκια που δεν εκφράζουν τελομεράση (telomerase null mice) μπορούν να μας βοηθήσουν να αποσαφηνίσουμε τον ρόλο της τελομεράσης στην παθογένεια της IPF και να ανακαλύψουμε νέους θεραπευτικούς στόχους.

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Η μελέτη αυτή χρηματοδοτήθηκε εν μέρει από την Εταιρεία Πνευμονοπαθών και Βαρέων Πάσχοντων Ανατο-

λικής Μακεδονίας και Θράκης (ΑΤ, ΔΜ) και από υποτροφία της Ευρωπαϊκής Ένωσης QLRT-CT-2001-01407 (BA) και του Υπουργείου Ανάπτυξης GSRTPENED- 136 (BA). Ο ΑΤ είναι κάτοχος ετήσιας υποτροφίας της GlaxoSmithKline για τον χρόνο 2005-2006.

Ο Δ.Μ. είναι επισκέπτης καθηγητής της ERS στο Medical University of Vienna.

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

(Βλέπε αγγλικό κείμενο)



# Telomerase in pulmonary fibrosis

## A link to alveolar cell apoptosis and differentiation

Argyris Tzouveleakis<sup>1</sup>,  
 Andreas Karameris<sup>2</sup>,  
 Evangelos Tsiambas<sup>2</sup>,  
 Anastasios Koutsopoulos<sup>3</sup>,  
 Rodoula Tringidou<sup>4</sup>,  
 Marios Froudarakis<sup>1</sup>,  
 Dimitrios Mikroulis<sup>5</sup>,  
 George Zacharis<sup>1</sup>,  
 Paschalis Steiropoulos<sup>1</sup>,  
 Ioanna Bazdiara<sup>6</sup>,  
 Constantinos Tsatalas<sup>6</sup>,  
 Ioannis Kotsianidis<sup>6</sup>,  
 Demosthenes Bouras<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Pneumology, University Hospital of Alexandroupolis, Medical school, Democritus University of Thrace, Greece

<sup>2</sup>Department of Pathology, VA Hospital (N.I.M.T.S), Athens, Greece

<sup>3</sup>Department of Pathology, University Hospital of Heraklion, Crete

<sup>4</sup>Department of Pathology, Sotiria General Hospital, Athens, Greece

<sup>5</sup>Department of Cardiothoracic surgery, University Hospital of Alexandroupolis, Medical school, Democritus University of Thrace, Greece

<sup>6</sup>Department of Hematology, University Hospital of Alexandroupolis, Medical school, Democritus University of Thrace, Greece

### Key words:

- telomerase
- pulmonary fibrosis
- pathogenesis
- interstitial pulmonary fibrosis

### Correspondence to:

Argyris Tzouveleakis, MD, Clinical Research Fellow, Medical School, Democritus University of Thrace, Department of Pneumology, University Hospital of Alexandroupolis, Alexandroupolis 68100

Tel.: +30 25510 75096, Fax: +30 25510 76106

E-mail: atzouveleakis@yahoo.gr

**SUMMARY.** **Introduction:** Telomerase is crucial for extended life span and differentiation and is linked to immortality. Therefore, its role may be crucial in the pathogenesis of pulmonary fibrosis. Our objective was to implicate telomerase in the pathogenesis of idiopathic fibrotic lung disease. **Patients and Methods:** Assessment of telomerase activity and expression was carried out using TRAP detection kit and qRT-PCR. Experimental procedure was enhanced by a series of immunostainings and fluorescence in situ hybridization analysis in tissue microarrays constructed with tissue samples from patients with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) and cryptogenic organizing pneumonia (COP). **Results:** We demonstrated significant downregulation of telomerase expression and activity in patients with fibrotic lung disease compared to controls. Immunolocalization studies coupled by FISH analysis revealed the presence of two subpopulations of type II AECs based on their telomerase expression levels: telomerase positive type II AECs, mainly overlying areas of active fibrosis and telomerase negative type II AECs, mainly localized in areas of established fibrosis. **Conclusions:** Downregulation of telomerase expression and activity in IPF may indicate a causal relationship between low telomerase expression and disease pathogenesis. The duality phenomenon in telomerase expression suggests that telomerase may regulate the fate of AECs towards either an apoptotic or a mesenchymal phenotype contributing directly to fibrosis. *Pneumon 2010, 23(3):224-239.*

## INTRODUCTION

Telomerase is a specialized reverse transcriptase that synthesizes TTAGGG telomere DNA at the ends of eukaryotic chromosomes, compensating for telomere erosion that normally occurs with each cell division and contributing to the stability, function and replication of chromosomes<sup>1,2</sup>. It has two essential components: a catalytic one, telomerase reverse transcriptase (h-TERT) and an RNA component (hTR)<sup>3</sup>. Telomerase has been shown to be crucial for extended life span, cell proliferation and differentiation and

has been linked to immortality<sup>4</sup>. Studies have provided us with abundant evidence that expression or induction of telomerase activity is not restricted to immortalized cancerous or transformed cells and it is also associated with tissue injury<sup>5</sup>. Despite this compelling evidence for the inducibility of telomerase activity in noncancerous cells<sup>6,7</sup> and its association with injured<sup>8</sup> and inflamed tissues<sup>9</sup>, its role in noncancerous pathologic processes, characterized by increased proliferation or survival of cells, remains unclear. Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is one such process, which is characterized by increased alveolar cell apoptosis, clusters of highly proliferative and immortal fibroblasts called fibroblastic foci (FF) comprising the histopathologic pattern of usual interstitial pneumonia (UIP)<sup>10</sup>. Recent evidence supports the concept that active fibrosis of IPF mirrors the abnormal wound repair in response to multiple sites of ongoing alveolar epithelial injury whereas parallels between IPF and cancer biology have also been drawn<sup>10-12</sup>. While irreversible fibrosis is the hallmark of the disease other types of pulmonary fibrosis such as cryptogenic organizing pneumonia (COP) characterized by distinct fibromyxoid lesions called Masson bodies (MB) that are susceptible to even complete reversal present with excellent prognosis and clinical course<sup>13,14</sup>.

Experimental findings have demonstrated that telomerase activity was selectively induced in fibroblasts isolated from bleomycin (BLM) -injured rat lungs presumably before their differentiation to myofibroblasts<sup>15-17</sup>. The latter observation was further supported by the evidence that the loss of telomerase activity is closely associated with myofibroblast differentiation and possibly functions as trigger for this procedure<sup>18,19</sup>. Furthermore a dismal effect of low telomerase activity in bleomycin-induced alveolar cell apoptosis has been recently reported<sup>20</sup> while a causal effect-relationship between telomerase deficiency in murine lung fibroblasts and BLM-induced PF has also been demonstrated<sup>21</sup>. However, human and mouse telomerases are reported to differ in both their functional properties and their regulation whereas bleomycin-animal model is not fully representative of IPF<sup>15</sup>.

Hence a human study is sorely needed. Recently published genetic association studies in patients with familial IPF<sup>22,23</sup> described a primary role for mutant telomerase components in the pathogenesis of IPF suggesting that the presence of short telomeres in alveolar epithelial cells (AECs) may lead to cell apoptosis and trigger the fibrogenic process through epithelial-mesenchymal interactions. Although, familial IPF is clinically indistinguishable from

sporadic IPF except earlier age of onset (55 years vs. 67 years)<sup>24</sup>, however there are no reports in the literature assessing telomerase activity, expression and localization in lung samples from patients with various forms of pulmonary fibrosis. To address this issue, we constructed tissue microarrays (TMAs) and demonstrated downregulation of telomerase in representative tissue samples from patients with sporadic IPF and COP compared to control subjects indicating a causal relationship between low telomerase activity and expression and pulmonary fibrosis. Most intriguingly, immunolocalization studies revealed for the first time the presence of two subpopulations of type II AECs based on their telomerase expression levels: telomerase positive type II AECs, mainly overlying areas of active fibrosis and exhibiting high levels of differentiation markers and telomerase negative type II AECs mainly localized in areas of established fibrosis and characterized by increased levels of apoptotic activity. Some of our results reported here have previously been reported in the form of abstracts<sup>25,26</sup>.

## MATERIALS AND METHODS

### Subjects

In total, 45 newly diagnosed patients with idiopathic interstitial pneumonias (IIPs) of two different histopathologic patterns including 25 patients with IPF/UIP and 20 with COP were recruited in our study. The diagnosis was based on the consensus statement of the ATS/ERS (2002)<sup>13</sup>. Paraffin-embedded surgical lung specimens (open lung biopsy or by video assisted thoracoscopic surgery-VATS) from two different fibrotic regions of each individual were sampled. All patients were fully informed and signed an informed consent form where they agreed to the anonymous usage of their lung and blood samples for research purposes. All information from the patients' record was handled with the appropriate care to ensure that medical confidentiality was observed. Approval by the local ethical committee was also obtained (Protocol number: 1669). Twenty control paraffin blocks obtained from the normal part of lungs removed for benign lesions were collected from the archives of the Department of Pathology of three different institutions (Table 1).

### Quantitative Real-Time reverse transcriptase-chain reaction (qRT-PCR)

h-TERT mRNA expression in 20 IPF and 10 control whole lung samples was measured using a quantitative

**TABLE 1.** Demographic and spirometric characteristics of patients with idiopathic pulmonary fibrosis/usual interstitial pneumonia (IPF/UIP) and cryptogenic organizing pneumonia (COP) and control subjects. Values are expressed as mean  $\pm$  SD, and age as median (range).

Characteristics	IPF/UIP	COP/OP	Control subjects
Number	25	20	20
Sex: Male/Female	19/6	12/8	10/10
Age: median (yr)	66 (43-72)	50 (38-62)	39 (26-60)
Smokers/non smokers	20/5	6/14	13/7
FVC: % predicted	71 $\pm$ 3 **	78 $\pm$ 4 **	104 $\pm$ 12
TLC: % predicted	54 $\pm$ 4 **	72 $\pm$ 3 **	101 $\pm$ 11
K <sub>co</sub> % predicted	53 $\pm$ 5 **	68 $\pm$ 5 **	90 $\pm$ 6

Abbreviations: COP/OP: Cryptogenic organizing pneumonia/organizing pneumonia, FVC: Forced Vital Capacity, IPF/UIP: Idiopathic pulmonary fibrosis/Usual interstitial pneumonia, K<sub>co</sub>: Carbon monoxide transfer coefficient, TLC: Total Lung Capacity, \*p<0.05, \*\*p<0.001.

real-time RT-PCR assay with SYBR-Green I QPCR Master Mix. Primer sequences were as follows: for h-TERT; for: 5'- TGA CAC CTC ACC TCA CCC AC-3' and hTERT REV: 5'- CAC TGT CTT CCG CAA GTT CAC -3' and for 18S rRNA; 5'-TGC GAA TGG CTC ATT AAA TCA GTT 3' and 18S rRNA REV: 5'-CCG TCG GCA TGT ATT AGC TCT AG 3' (see online supplement for details).

### Telomerase Activity

Telomerase activity was assayed in a total of 15 lung samples (8 IPF and 7 control) using a telomeric repeat amplification protocol (TRAP) assay in accordance with the manufacturer's protocol (TeloTAGGG Telomerase PCR ELISA plus detection kit; Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany)<sup>27</sup>. Briefly, 10  $\mu$ g of tissue extract was suspended in 30  $\mu$ l of reaction mixture (containing biotinylated telomerase substrate, optimized anchor primer, nucleotides, Taq polymerase, and a 216-bp internal standard DNA). The resulting mixture was subjected to polymerase chain reaction (PCR). Telomerase activity was quantified by measuring the absorbance of the PCR products at 450 nm. The level of telomerase activity in a given sample was determined by comparing the signal from the sample to the signal obtained using a known amount of control template. Based on the negative controls, samples with absorbance less than 0.2 were considered negative. Details on this methodology can be found in an online supplement.

### Tissue microarray (TMA) construction

A total of 65 tissue samples consisting of 25 IPF, 20 COP and 20 control lung specimens derived from the normal part of lungs removed for benign lesions were used for TMA construction. Three representative areas of 1.5 mm in diameter each were identified and punched-out from each paraffin block by using a precision instrument (TMA-100, Chemicon, USA) and re-embedded into a new paraffin block as previously described<sup>28</sup>. Ultimately we constructed two TMA blocks comprising of 100 tissue elements each. Details on this methodology can be found in an online supplement.

### Immunohistochemistry analysis

Immunohistochemistry for h-TERT antigen was carried out on using the anti-h-TERT mouse monoclonal antibody (clone 44F12-Novocastra Laboratories Ltd, Newcastle United Kingdom). To further analyze the cellular localization of telomerase expression in type I and II AECs and vis- $\ddot{u}$ -vis myofibroblast phenotype, double immunohistochemistry analysis for h-TERT and SP-A or  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA), respectively, was undertaken. To assess differentiation of AECs in IPF and COP lung TMAs were immunostained with specific antibodies against N-cadherin (rabbit polyclonal antibody, GeneTex, GTX12221). Details on these methodologies can be found in an online supplement.

### Determination of apoptosis

Apoptosis was assessed by immunohistochemistry analysis using specific antibody against DNA fragmentation factor of (DFF)<sup>29</sup> (Novocastra Laboratories Ltd, Newcastle United Kingdom) (see online supplement for details).

### Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) for telomerase messenger RNA expression

Detection of telomerase messenger RNA (mRNA) expression was undertaken using FISH. This was carried out using specific hTR probe which hybridizes to regions within the 451 base hTR component (DakoCytomation, Y1441). Levels of mRNA expression were automatically assessed by using the high-resolution DUET, BioView scanning system for FISH, morphology and immunocytochemistry applications. Interpretation of telomerase mRNA signal results was based on Zymed's Evaluation Chart for FISH. According to this guide, two mRNA copies per nucleus demonstrate normal telomerase gene pattern,

whereas 6–10 or small clusters characterize a low-level gene amplification. Finally, high gene amplification level is characterized by the presence of more than 10 mRNA copies or large clusters of them per nucleus in more than 50% of the examined cells (see online supplement for details).

### Evaluation of results by Computerized Image Analysis

In order to evaluate the immunohistochemistry results not in a qualitative way but in a more accurate and reliable way, we performed computerized image analysis by using a semi-automated system (Matrox II Card Frame Grabber, Camera Microwave Systems, Microscope Olympus BX-50) allowing us to assess staining intensity in a 256 level scale - 0 (black)-255(white). Staining intensity values were then converted to reverse percentages {reverse staining intensity=  $(1 - \text{staining intensity}/256) \times 100$ } (see online supplement for details).

### STATISTICAL ANALYSIS

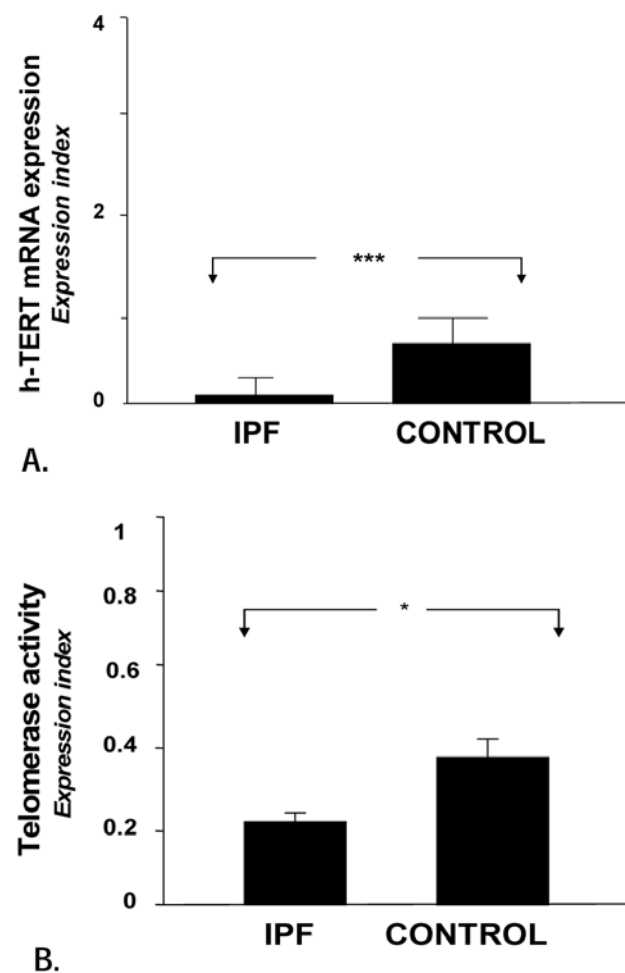
Statistical analysis was carried out using SPSS 13.0 software. Results are expressed as mean  $\pm$  SD, or median (range), unless otherwise indicated. The unpaired t-test was used to compare the staining intensity of different immunostained factors between different forms of pulmonary fibrosis and between patients and controls. The paired t-test was used to compare staining intensity in epithelial cells, fibroblasts and myofibroblasts in IPF/UIP, COP and control samples. A p-value of <0.05 was considered as statistically significant.

## RESULTS

### Decreased telomerase expression and activity in fibrotic lungs compared to control samples

Because no information is available as to the expression of telomerase in human pulmonary fibrosis we assessed telomerase expression in mRNA and protein level using qRT-PCR, FISH and immunohistochemistry analysis in IPF, COP patients and control lung samples, respectively. Experimental procedure was further extended by assessing telomerase activity in IPF and control frozen lung samples, using a PCR ELISA detection kit. To expedite and standardize experimental procedures we constructed two TMA blocks consisting of 100 tissue cores each from 25 IPF, 20 COP and 20 control lung samples. TMA blocks were immunostained with anti-h-TERT antibody and

analyzed quantitatively by computerized image analysis as described above. As expected, qRT-PCR showed a significant downregulation of telomerase expression in whole lung samples from IPF patients compared to controls ( $p < 0.0001$ ) indicating an association of low telomerase activity with pulmonary fibrosis (Figure 1A). In accordance with this, assessment of telomerase activity revealed almost undetectable enzymatic activity in lung extracts derived from IPF patients compared to control lung samples. Moreover, immunohistochemical studies coupled with semi-quantitative image analysis showed strong positive staining in the alveolar epithelium of

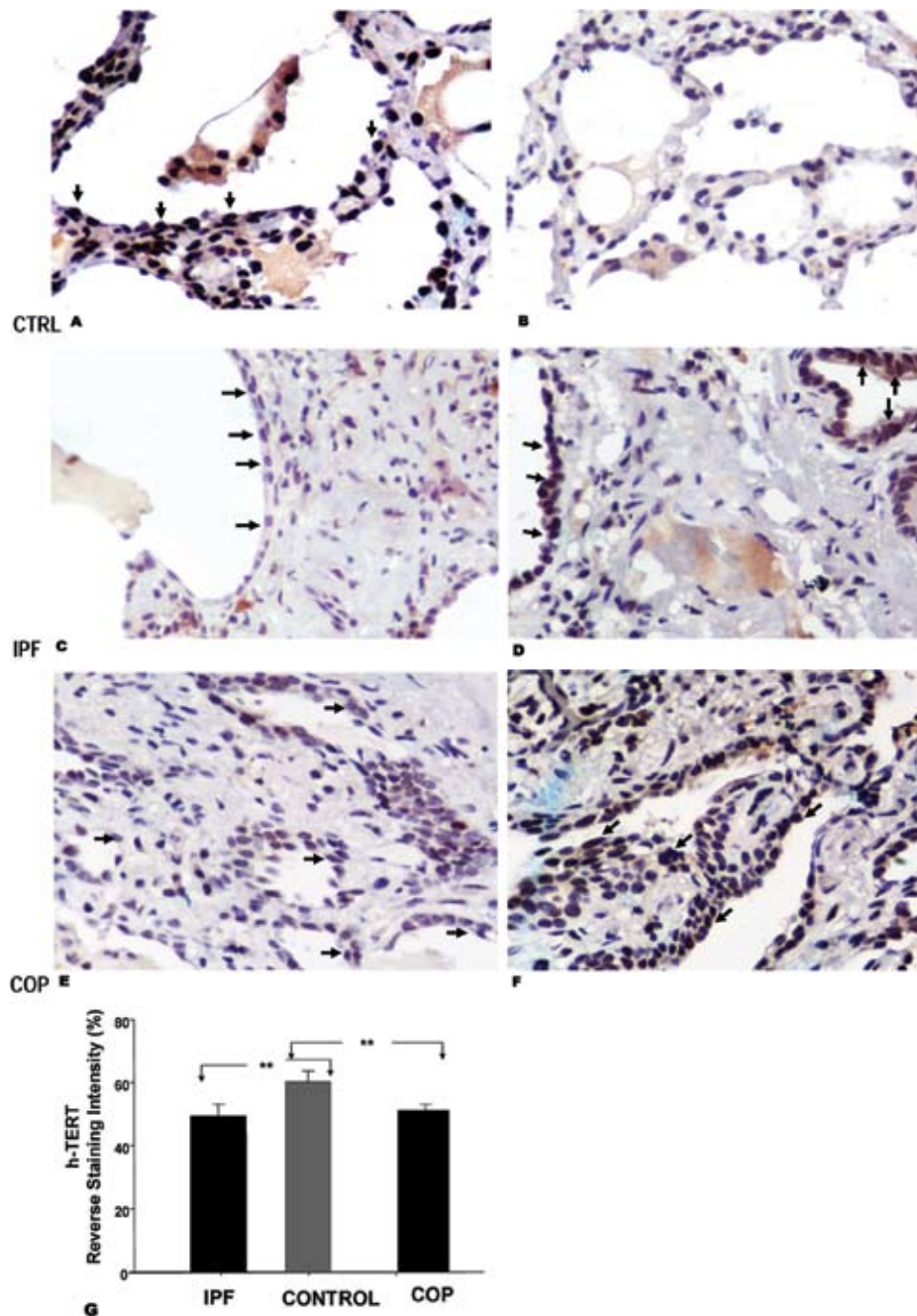


**FIGURE 1. Decreased telomerase expression and activity in IPF compared to control lung samples.** Real time qRT-PCR demonstrated statistically significant downregulation of telomerase expression in whole lung samples from IPF patients compared to control subjects (\*\*\*)  $p < 0.0001$ ). In line with this, mean telomerase activity percentage, as assessed by TRAP assay, was found to be downregulated in IPF compared to control lung samples (\* $p < 0.05$ ).

control lung compared to the fibrotic lungs of two different histopathologic patterns, IPF ( $p < 0.001$ ) and COP ( $p < 0.001$ ) (Figure 2).

Telomerase is present in AECs surrounding areas of active fibrosis in IPF lung

To further analyze the cellular localization of tel-



**FIGURE 2. Decreased telomerase expression in fibrotic lungs compared to normal lung samples.** Immunohistochemistry for h-TERT revealed positive nuclear staining (black arrows) in control lung (A) compared to isotype negative control (B), IPF (C, D) and COP lung (E, F). In IPF lung telomerase was mainly localized within areas of active fibrosis and in the alveolar epithelium surrounding them (D) whereas in COP lung positive staining was present within areas of alveolar filling (F). Semi-quantitative computerized immunohistochemical analysis (G) demonstrated significant differences in telomerase expression between fibrotic lungs and control samples (\*\* $p < 0.001$ ). Original magnifications: A-F:  $\times 40$ .



omerase expression we performed dual immunostaining analyses and demonstrated absence of telomerase expression in type II AECs [telomerase negative (tel-) AECs] mainly overlying areas of established fibrosis and architectural distortion in IPF lung ( $p < 0.001$ ). In addition in COP lung the majority of type II AECs surrounding areas of organizing pneumonia showed minimal telomerase expression (Figure 3). Surprisingly, we identified clusters of type II AECs surrounding areas of active fibrosis mainly in IPF ( $p < 0.001$ ) and to a lesser extent in COP lung ( $p < 0.02$ ) which exhibited high telomerase staining [telomerase positive- (tel+) AECs], suggesting that these cells may represent a subpopulation of type II AECs that are resistant to apoptosis and cell damage and exhibit high proliferative and differentiative activity (Figure 4). In line with this, FISH analysis showed high amplification of telomerase expression not only within normal epithelium but also in areas of epithelium immediately adjacent to fibroblastic-like cells within the IPF lung in 19 of 25 cases whereas low amplification was seen in alveolar cells in 15 of 20 COP patients (Figure 5).

### Increased telomerase expression in fibroblasts/myofibroblasts in IPF compared to COP lung

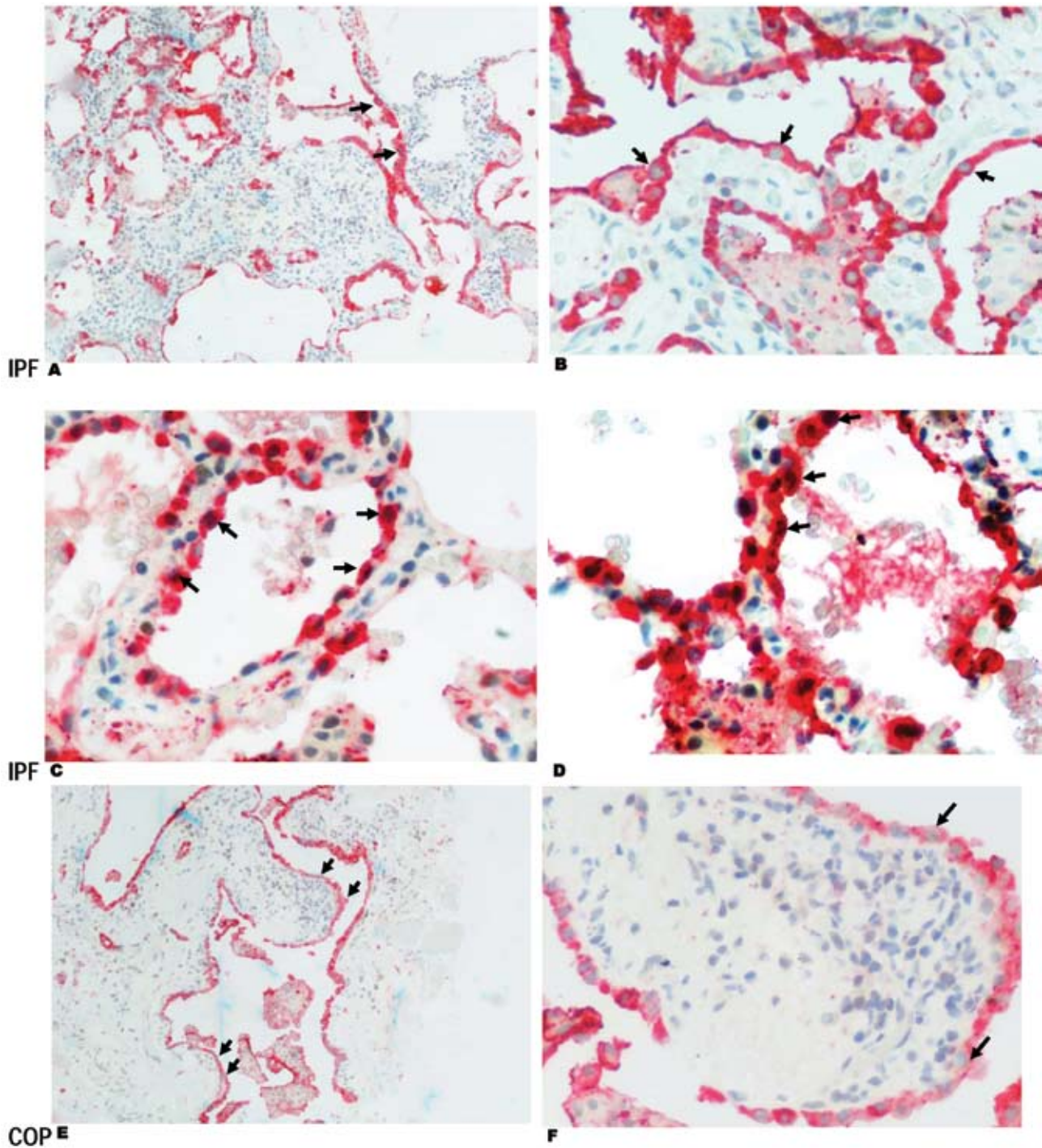
To identify potential differences in the telomerase expression profiles exhibited by fibroblastic-like cells in patients with two different histopathologic patterns of pulmonary fibrosis we performed double immunohistochemistry analysis and demonstrated enhanced telomerase staining in fibroblastic/myofibroblastic foci within the IPF lung compared to Masson bodies that characterize the pattern of COP (Figure 6) ( $p < 0.001$ ). Furthermore, telomerase was also visualized within nuclei of pulmonary vascular cells that expressed  $\alpha$ SMA in the IPF lung compared to COP subjects. Immunohistochemistry data was further extended by FISH analysis which revealed areas of high telomerase amplification within the fibrotic interstitium in IPF lung (17 of 25 cases) (Figure 5C) compared to COP patients where we detected low amplification of telomerase RNA component (18 of 20 cases) (Figure 5D). These findings may provide us with useful insights regarding differences between IPF and COP patients in disease progressiveness and treatment responsiveness and explain the resolution of lesions in COP lung in response to corticosteroids and the maintenance of fibroblastic foci despite of treatment.

### Expression pattern of apoptosis and differentiation overlaps that seen for telomerase within fibrotic lungs

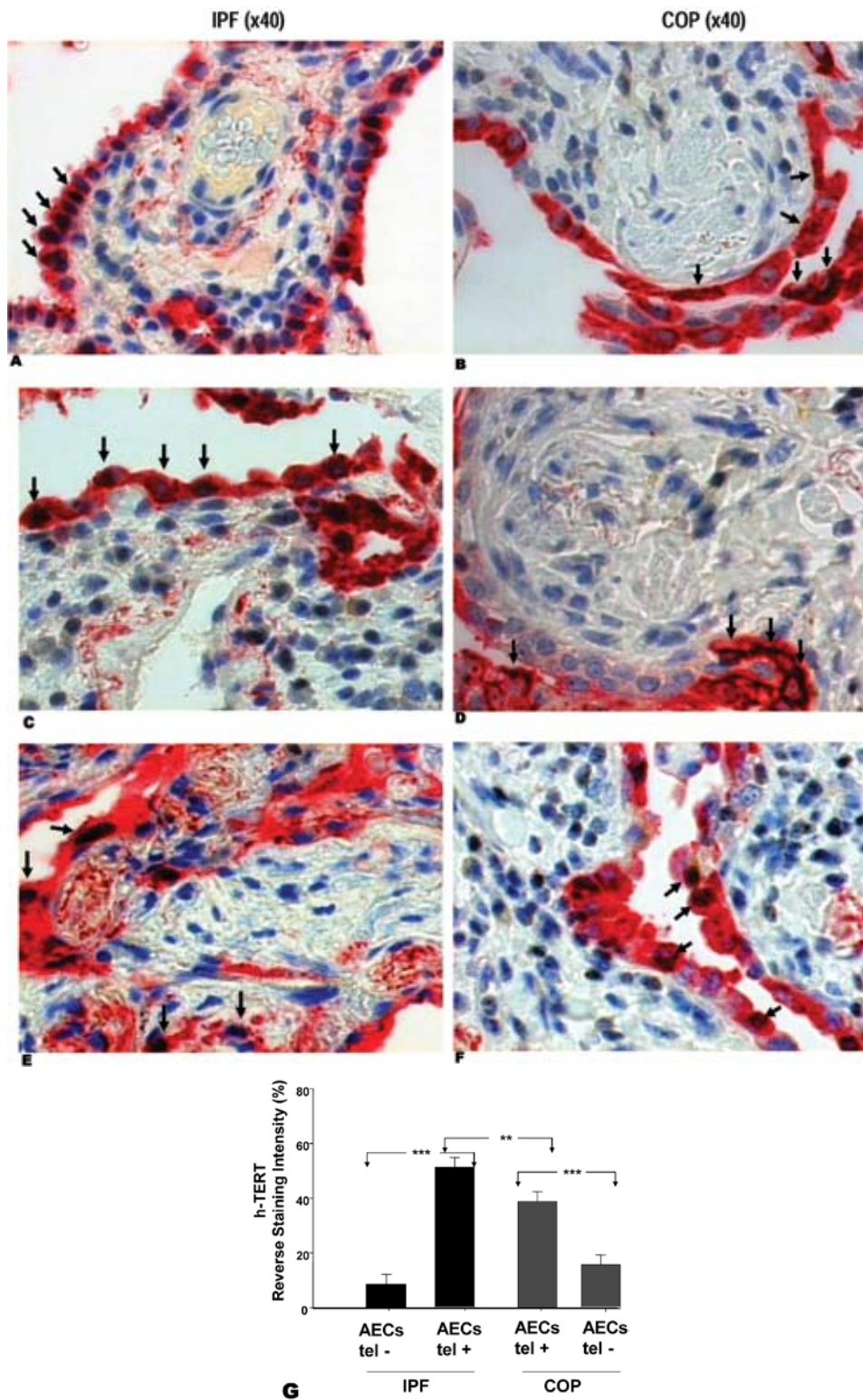
To confirm whether telomerase expression profile is followed by a similar apoptotic pattern the expression pattern of caspase-activated DNA fragmentation factor (DFF or caspase activated DNase-CAD) was determined. Enhanced apoptosis was clearly observed in the alveolar epithelium in IPF ( $p < 0.001$ ) and COP patients ( $p < 0.02$ ) compared to control subjects. In addition, as previously observed with telomerase negative AECs, we noticed strong positive staining in AECs surrounding areas of established fibrosis and architectural distortion (honeycomb cysts) suggesting that these cells were more likely to undergo apoptosis due to lack of telomerase expression. Finally increased apoptosis was also visualized within the fibrotic interstitium in COP lung compared to fibroblastic foci in IPF patients where apoptosis was minimal, further implicating telomerase in the "apoptotic paradox" characterizing IPF: apoptosis susceptibility in epithelial cells and apoptosis resistance of fibroblastic-like cells (Figure 7A-D). Since experimental data support a role of telomerase in cell differentiation we assessed whether the pattern of N-cadherin staining, a marker of mesenchymal differentiation, in the hyperplastic epithelium in IPF and COP lung overlaps that seen with telomerase. Intriguingly, N-cadherin was mainly localized in AECs ( $p < 0.01$ ) of morphologically altered phenotype immediately adjacent to fibroblastic foci suggesting that telomerase positive type II AECs need telomerase activity not only to resist to apoptosis but also to undergo a type of metaplasia, the epithelial – mesenchymal transition (Figure 7E-H).

### DISCUSSION

To the best of our knowledge this is the first study in the literature investigating telomerase expression and activity in patients with idiopathic fibrotic lung disease and suggesting a causal relationship between low telomerase expression and pulmonary fibrosis as it happens with the phenotype in dyskeratosis congenita<sup>30,31</sup>, a rare syndrome characterized by mutations in the telomerase complex and pulmonary fibrosis resembling IPF. Our study design was as follows: We used real time qRT-PCR and showed downregulation of telomerase expression in IPF lung compared to control samples. The latter was further supported by TRAP assay findings which revealed almost undetectable telomerase activity in IPF compared to control lung samples. In addition, we constructed two TMA

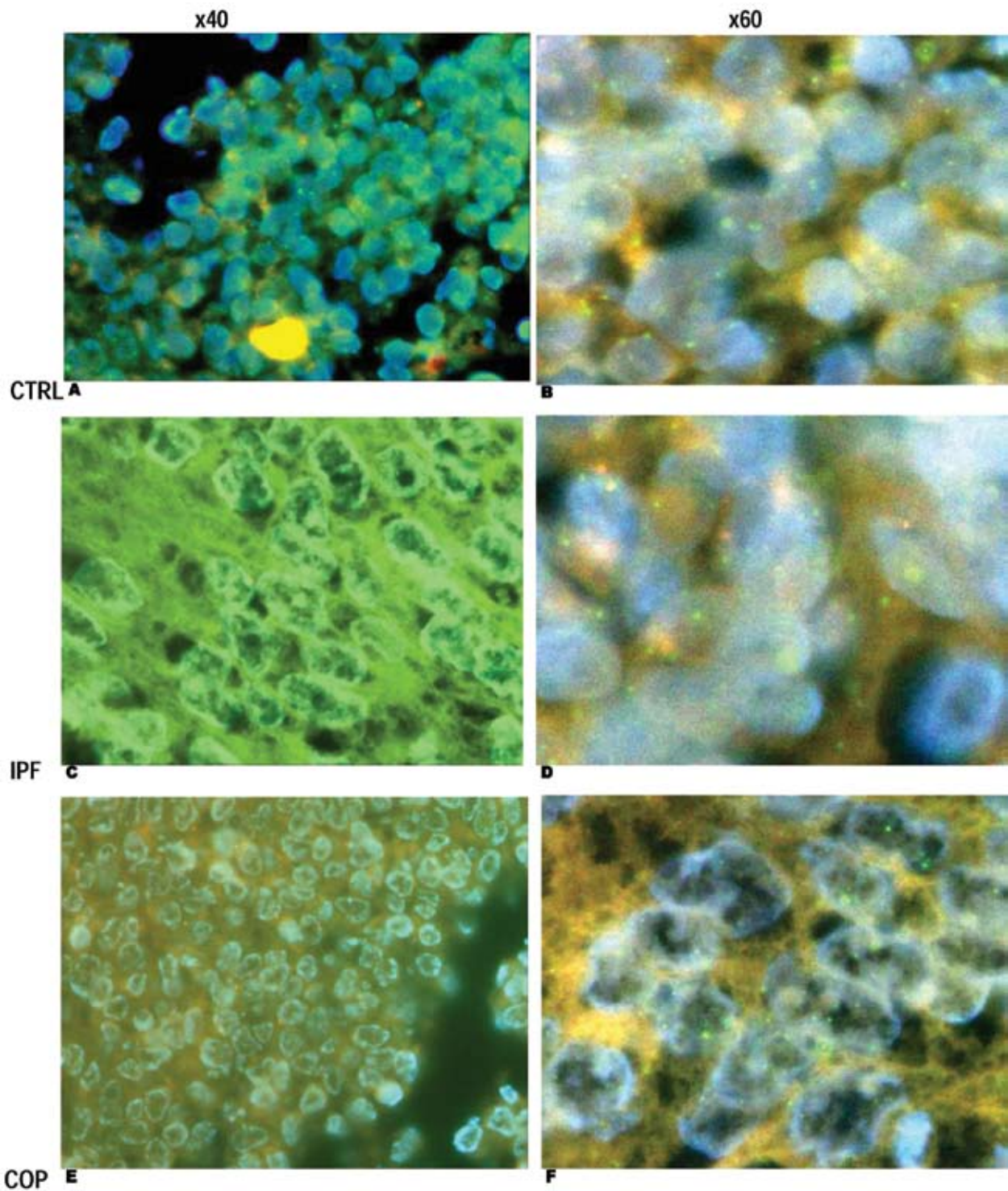


**FIGURE 3. Telomerase was absent in the alveolar epithelium surrounding areas of established fibrosis in IPF lung.** Dual immunostaining analysis for h-TERT and SP-A revealed absence of telomerase (white nuclei) from type II AECs (red cytoplasm) in areas of chaotic reepithelization and established fibrosis in IPF lung (A, B) whereas positive nuclear staining (arrows) was present in areas of alveolar epithelium that appeared histologically normal within the IPF lung (C, D). In addition in COP lung the majority of type II AECs surrounding areas of organizing pneumonia showed minimal telomerase expression (black arrows) (E, F). Original magnifications: A and E:  $\times 20$ , B-D and F:  $\times 40$ .



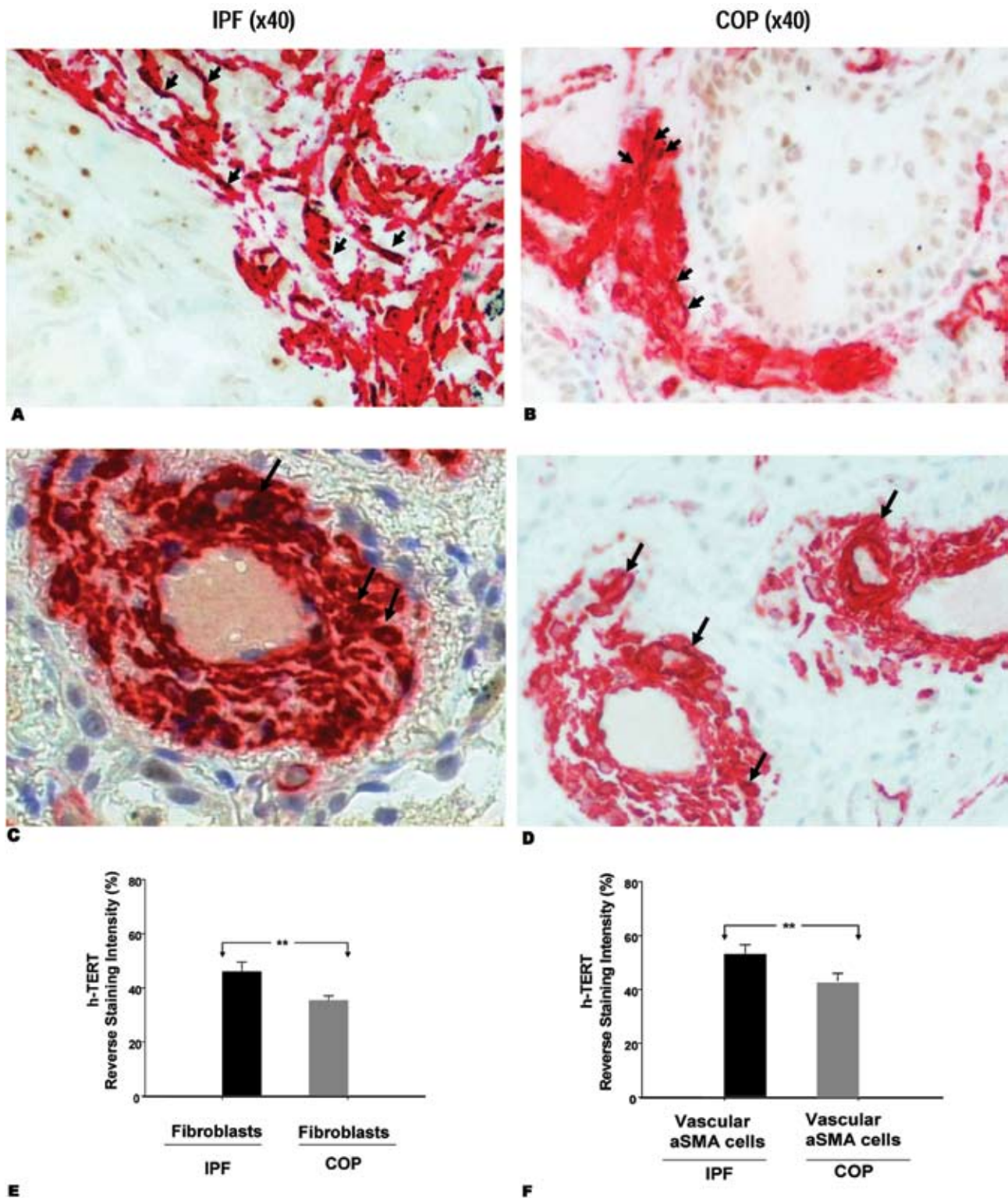
**FIGURE 4. Telomerase co-localized with type II AECs overlying areas of active fibrosis within fibrotic lungs.** Dual immunohistochemistry coupled with semi-quantitative image analysis revealed co-localization of telomerase (black nuclei) with type II AECs (red cytoplasm) immediately adjacent to areas of active fibrosis mainly in IPF lung (fibroblastic foci) (A, C and E) and to a lesser extent in COP lung (Masson bodies) (B, D and F) (\*\*p<0.001). Original magnifications: A-F: x40.



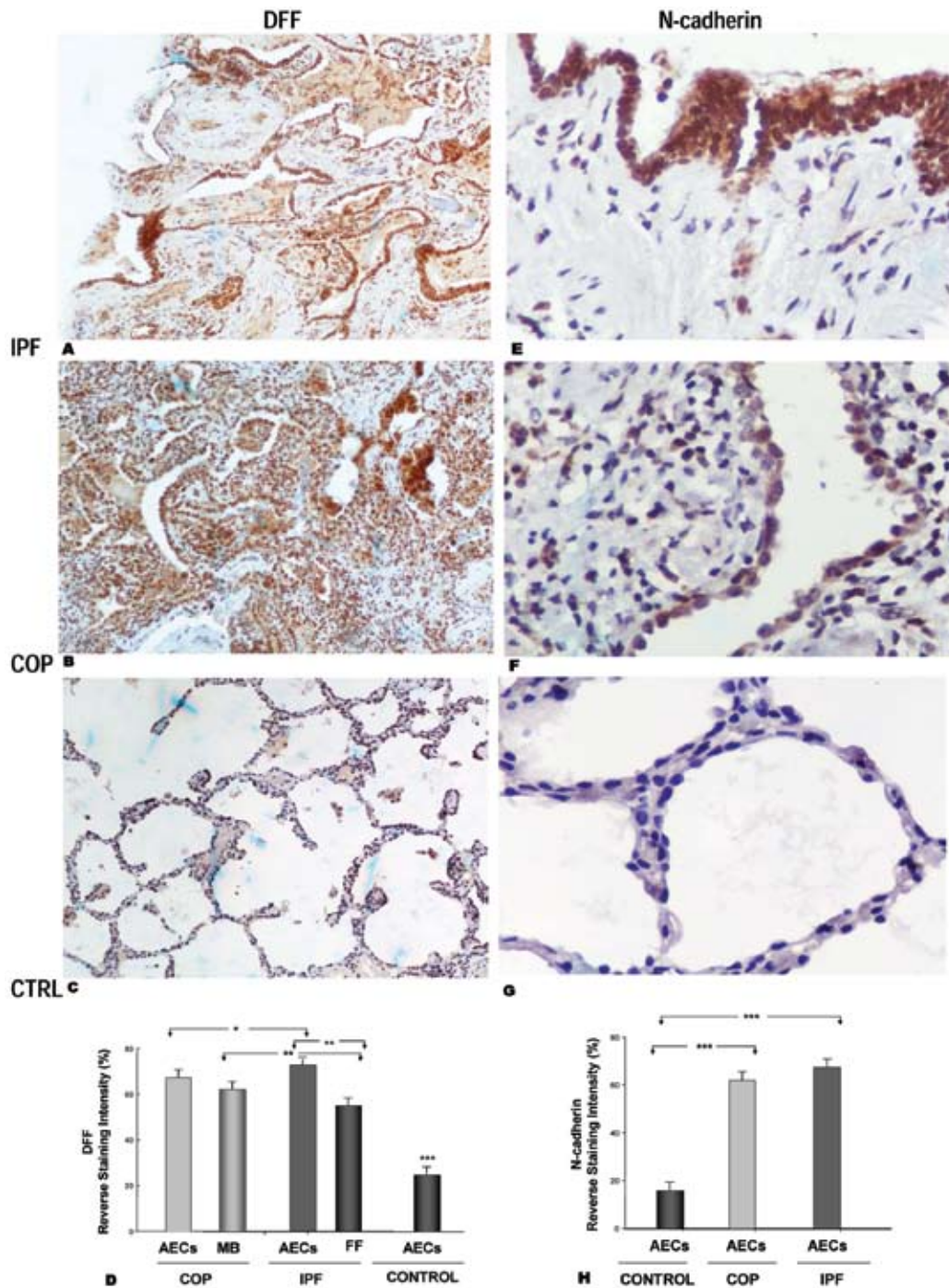


**FIGURE 5.** High amplification of telomerase mRNA expression in AECs overlying fibroblastic foci in IPF lung. FISH analysis revealed increased telomerase expression (mRNA copies indicated as green intracellular dots) in the alveolar epithelium of normal lung (A, B) compared to the fibrotic lung (C-F). Localization analyses revealed clusters of AECs immediately adjacent to areas of active fibrosis overexpressing telomerase mRNA mainly in IPF (D) and to a lesser extent in COP lung (E, F). Telomerase mRNA was also present in fibroblasts within the IPF lung (D) whereas low amplification was noticed within Masson bodies in COP lung (E). Original magnification: A, C and E:  $\times 40$ , B, D and F:  $\times 60$ .





**FIGURE 6. Telomerase co-localizes with a-smooth muscle actin (a-SMA) in fibroblastic foci in IPF lung.** Dual immunostaining computerized image analysis for h-TERT and a-SMA revealed telomerase co-localization (black nuclei) within areas of active fibrosis (red cytoplasm) (arrows) in IPF (A) compared to COP lung (B). Telomerase was also present in pulmonary vascular smooth muscle cells that expressed aSMA in IPF (C) compared to COP lung (D). Original magnifications: A-D: x40.



**FIGURE 7. Expression pattern of apoptosis and differentiation overlaps that seen for telomerase within fibrotic lungs.**

Increased apoptosis as assessed by positive DFF immunostaining was observed in the hyperplastic alveolar and bronchiolar epithelium within the IPF lung (A) whereas in COP lung DFF was also visualized in areas of organizing pneumonia and Masson bodies (B). Moreover, intense staining for N-cadherin was present and most prominent in areas of abnormal reepithelization and broncholization (arrows) surrounding fibroblastic foci in the IPF lung (E), while in COP lung N-cadherin was in the epithelium overlying areas of alveolar filling and organizing pneumonia (F), areas that stained intensely for telomerase. No staining for DFF (\*\* $p < 0.001$ ) and N-cadherin (\*\* $p < 0.001$ ), as assessed by computerized image analysis was visualized within intact, normal alveolar structures (C, G). Original magnifications A-C and E:  $\times 20$ , F and G:  $\times 40$ .

blocks comprising of 100 representative tissue samples from patients with IPF and COP and control subjects. Immunostaining studies coupled with computerized image analysis revealed decreased telomerase expression in IPF and COP lung samples compared to controls. We then chose to analyze the cellular localization of telomerase expression both by dual immunohistochemistry and FISH which absence of telomerase in type II AECs surrounding areas of established fibrosis and architectural distortion within the IPF lung. Interestingly, we found strong nuclear staining not only within areas of active fibrosis but also in regenerative type II AECs immediately adjacent to them, as well as in pulmonary vascular cells, mainly in IPF lung and to a lesser extent in COP samples. Most intriguingly, regional heterogeneity in telomerase expression, in both fibrotic lungs, resulted in similar expression patterns of apoptotic and differentiation markers, as assessed by immunolocalization analyses.

In IPF/UIP, areas of accumulated fibroblasts and myofibroblasts mainly distributed in subepithelial areas of the intersitium represent the pathogenetic hallmark of fibrogenesis and have been used as part of the histopathologic criteria for the diagnosis of UIP<sup>10</sup>. The presumed persistence as assessed by prolonged survival and increased proliferation, of these cells can potentially be the basis for progressive fibrosis instead of resolution. While IPF clinical course seems to be unfavorable other members of the same disease group such as COP present with excellent prognosis and treatment responsiveness<sup>19</sup>. Several studies have attributed these differences to distinct pathogenetic characteristics reflected by regional differences in apoptotic<sup>32-34</sup> and angiogenic profiles<sup>35-37</sup>. Moreover, while the alveolar epithelium has been thought as a passive bystander in the process of pulmonary fibrosis, the past few years the notion that repeated epithelial injury induces regenerative AECs to transition to a mesenchymal phenotype (epithelial-mesenchymal transition-EMT), thus contributing directly to fibrogenesis, has dragged much of attention<sup>38-40</sup>.

Recent studies focusing on telomerase expression in fibroblasts derived from experimental models of pulmonary fibrosis revealed a role of telomerase activity in cell differentiation. In particular, Phan et al. suggested that induction of telomerase activity in rat lung fibroblasts may be due to mediators of their proliferation while its loss by inhibitory molecules triggers their differentiation to myofibroblasts<sup>15,21-23</sup>. In addition, Fridlender et al. implicated low telomerase activity in robust apoptosis of AECs isolated from mice lungs after treatment with

bleomycin further suggesting that the transient elevation of telomerase activity in lung epithelial cells in vivo may represent an active defense mechanism against immediately adjacent fibroblastic/myofibroblastic foci that may promote AECs apoptosis as part of the fibrotic process<sup>24</sup>. Finally and more recently, a causal-effect relationship between low telomerase activity and pulmonary fibrosis was reported by Liu et al. who demonstrated in TERT-deficient mice reduced lung fibrosis accompanied by decreased fibroblast proliferation and increased apoptosis. Conversely, restoration of telomerase activity in BLM-injured lungs was associated with increased survival of lung fibroblasts favouring the development of lung fibrosis<sup>21</sup>. However, human and mouse telomerases are reported to differ in both their functional properties and their regulation and additionally bleomycin-animal model is not fully representative of IPF due to its self-limiting nature, rapidity of its development and the close association with inflammation that accompanies the lung injury. In addition, at the disease level the net effects of telomerase activity versus inhibition on the development and progression of human pulmonary fibrosis are so far largely unknown<sup>23</sup>.

Therefore, we investigated for the first time in the literature, telomerase expression and activity in tissue samples from patients with two different forms of fibrotic lung disorders, IPF and COP. We used the pioneering technology of tissue microarrays, which allowed us the simultaneous analysis of up to 200 tissue blocks in a single experiment under highly standardized conditions, meaning all tissue specimens were analyzed in an identical, unbiased fashion, with minimal tissue damage, less cost and precise positioning of arrayed samples which facilitates manual interpretation of the staining<sup>28</sup> and serves as an ideal basis for automated analysis of specific cell lines. Data interpretation revealed reduced telomerase expression and activity in IPF compared to control lung samples suggesting a causal relationship between low telomerase expression and human pulmonary fibrosis. Results from qRT-PCR and TRAP assay were extended by immunohistochemical studies coupled with semi-quantitative image analysis which evaluated signal staining intensity in an unbiased fashion and in a 256-level scale (conventional microscopes identify signal differences in a 30-level scale)<sup>41,42</sup> and showed strong positive staining in normal epithelium compared to the fibrotic one. Most intriguingly, immunolocalization studies coupled by FISH analysis further supporting seminal observations<sup>43</sup>, demonstrated two distinct subpopulations of type II AECs



based on their telomerase expression levels; morphologically altered telomerase positive cells overlying clusters of active fibrosis and exhibiting increased levels of differentiation markers such as N-cadherin mainly within the IPF lung and to a lesser extent in COP lung and telomerase negative cells visualized in areas of architectural distortion in IPF lung and immediately adjacent to areas of organizing pneumonia in COP tissue samples. The latter cells seem to exhibit increased apoptotic activity as can be supported by similar expression patterns between telomerase and DNA fragmentation factor. Moreover, increased telomerase expression was also observed in areas of alveolar epithelium that appeared histologically normal within the IPF lung.

The duality phenomenon in telomerase expression in regenerative type II AECs provides us with useful pathogenetic insights regarding the role of telomerase in pulmonary fibrosis. It is therefore tempting to speculate that changes in telomerase activity may regulate the fate of AECs towards either an apoptotic or a mesenchymal phenotype, thus contributing directly to fibrosis (Figure 8). Recent evidence by two independent studies<sup>22,23</sup> associate mutant telomerase components with familial IPF suggesting that short dysfunctional telomeres may lead to alveolar cell apoptosis and generation of multiple fibrotic lesions. They also report that under multiple attacks bronchoalveolar epithelium responds with constant regeneration and this process relies on local progenitor cells that exhibit low survival rates due to short telomeres resulting from low telomerase activity. Our findings are consistent with this hypothesis. Telomerase negative progenitor cells are more likely to undergo apoptosis as assessed by increased expression of DNA fragmentation factor, thus contributing to the abnormal reepithelization characterizing disease pathogenesis. In line with this, the presence of increased telomerase staining in flattened, attenuated type II AECs (Figures 7B and 7E) expressing markers of cell differentiation may suggest a need for telomerase activity to promote EMT<sup>38,44,45</sup>.

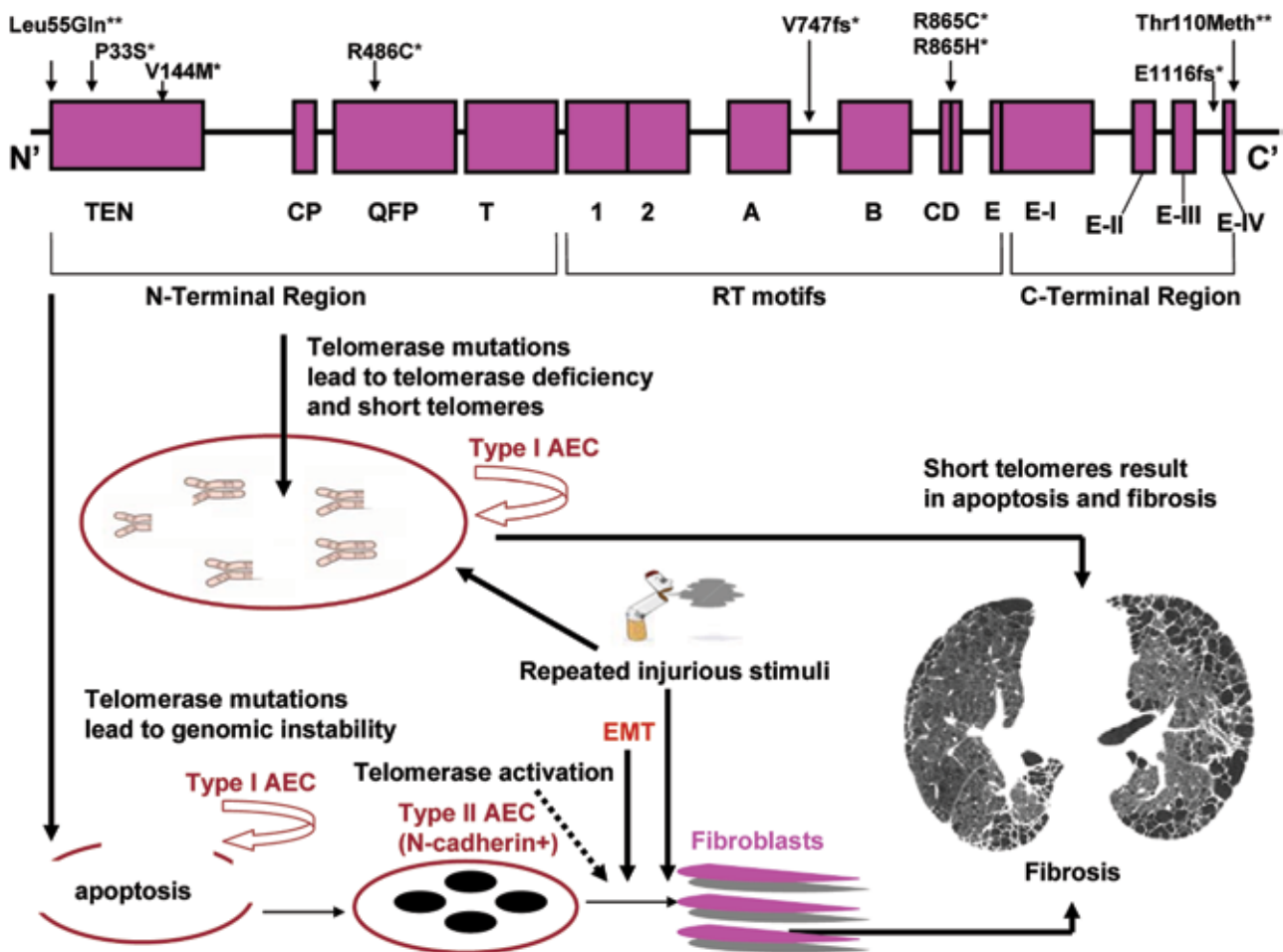
In addition, telomerase presence within clusters of highly proliferative fibroblastic-like cells in IPF compared to COP samples indicates a mechanism through which IPF fibroblasts of altered phenotype exert their resistance to apoptosis and may potentially explain the resolution of lesions in COP lung in response to corticosteroids and the maintenance of FF resulting in dismal prognosis despite of treatment<sup>46,47</sup>. The unremitting recruitment and maintenance of the altered fibroblast phenotype with generation and proliferation of immortal fibroblasts cou-

pled with the EMT phenomenon is reminiscent with the transformation of cancer cells and metaplasia. Whether mutations in telomerase genes are responsible either for reduced telomerase expression and shorten telomeres resulting in loss of AECs or increased expression leading to hyperplasia and transition to a mesenchymal phenotype, a form of metaplasia, is so far largely unknown. What is already known is that mutated telomerase components may lead to genomic instability, as it happens during the stepwise progression of normal cells into cancer cells. Telomerase activation after onset of genomic instability coupled with an injurious pro-fibrotic microenvironment, promotes acquisition of transformed cells through a process known EMT (Figure 8). Searching for telomerase mutations in AECs and fibroblasts isolated from patients with different forms of pulmonary fibrosis at different disease stages may provide a way forward and help clinicians to identify high-risk groups that are unlikely to respond to immunosuppressive agents.

In addition, localization of telomerase within pulmonary vascular cells expressing  $\alpha$ SMA in IPF lung may explain the increase proliferation and remodeling characterizing these cells leading ultimately to major vasoconstriction and the development of pulmonary hypertension secondary to end-stage fibrosis, one leading cause of death in IPF patients worldwide<sup>48</sup>. However, future studies are required to corroborate this observation.

Despite relative enthusiasm arising from the above data, our study exhibits a number of limitations that should be addressed with caution. Firstly, based on semi-quantitative immunohistochemical analysis it is not definitive whether there is a correlation between telomerase staining and telomerase expression. However, immunohistochemistry data was supported by quantitative FISH analysis and corroborated results from qRT-PCR and TRAP assay. Therefore, it is conceivable that strong associations using different techniques can be supportive of our hypothesis. Secondly, based on our approach it is rather unclear whether there is an association between loss of telomerase expression and activity and apoptosis or induction and differentiation of epithelial cells to mesenchymal phenotypes. Nevertheless, our study represents the first attempt to correlate telomerase with alveolar cell apoptosis, differentiation and increased proliferation of immortalized fibroblasts in the pathogenetic model of pulmonary fibrosis. Taken together, we can assume that novel therapeutic approaches aiming at preventing loss of alveolar cells through induction of telomerase activity may be proven more beneficial than current anti-fibrotic





**FIGURE 8. Telomerase mutations, telomerase activation, epithelial-mesenchymal transition, apoptosis and pulmonary fibrosis.** Schematic representation of the conserved domains of hTERT with missense mutations, as indicated by Tsakiri K et al. (23) (\*) and Armanios M (22) et al. (\*\*). Mutations of hTERT catalytic subunit may lead to telomerase deficiency and short dysfunctional telomeres in type I alveolar epithelial cells (AECs). The latter coupled with repeated injurious stimuli (i.e. cigarette smoke) could potentially promote AEC apoptosis triggering the fibrogenic process. Furthermore, mutated telomerase components may lead to genomic instability, as it happens during the stepwise progression of normal cells into cancer cells. Apoptosis of type I AECs leads to compensatory proliferation of type II AECs. Telomerase activation after onset of genomic instability coupled with an injurious pro-fibrotic microenvironment, promotes acquisition of transformed cells through a process known as epithelial – mesenchymal transition (EMT). During this process, type II AECs instead of differentiating to type I AECs, undergo a form of metaplasia towards a mesenchymal phenotype (N-cadherin+), thus contributing directly to pulmonary fibrosis, as indicated by honeycombing changes in high resolution computed tomography (HRCT).

or immunomodulatory agents<sup>49</sup>.

In conclusion, we have shown reduced telomerase expression in idiopathic fibrotic lung disorders compared to control samples implicating low telomerase activity in the pathogenesis of pulmonary fibrosis. This downregulation of telomerase expression that was followed by similar expression patterns of apoptosis was marked in AECs surrounding areas of end-stage lung disease. Surprisingly

elevated telomerase staining was not only present within highly proliferative fibroblastic/myofibroblastic foci where detection of apoptosis was minimal but also within areas of hyperplastic epithelium surrounding them indicating that telomerase may regulate the fate of alveolar cells towards either an apoptotic or a differentiative - mesenchymal phenotype, thus contributing directly to fibrosis. Finally differential telomerase expression profiles in IPF and

COP may explain differences in disease progressiveness and treatment responsiveness. Future studies in patients with different forms of interstitial pneumonias coupled with experimental data potentially using telomerase null mice may help us to elucidate the role of telomerase in IPF and highlight novel therapeutic targets.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was partly supported by the Society for Respiratory Research and Treatment of Eastern Macedonia and Thrace (AT, DB) and a European Commission Network of Excellence grant QLRT-CT-2001-01407 (V.A.) and a Hellenic Ministry for Development grant GSRTPENED- 136 (V.A.). AT is a recipient of an annual research grant in respiratory medicine provided by GlaxoSmithKline for the year 2005-2006. We are also grateful to Vassileios Vasdekis (Department of Economics and Business, Kapodistrian University of Athens, Greece) for carrying out the statistical analysis of our manuscript.

## REFERENCE

- Greider CW. Telomeres, telomerase and senescence. *Bioessays* 1990;12:363-369.
- Greider CW, Blackburn EH. A telomeric sequence in the RNA of *Tetrahymena* telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature* 1989;337:331-337.
- Nakamura TM, Morin GB, Chapman KB, et al. Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science* 1997;277:955-959.
- Harley CB. Human ageing and telomeres. *Ciba Found Symp* 1997;211:129-39.
- Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 1990;345:458-460.
- Satoh H, Hiyama K, Takeda M, et al. Telomere shortening in peripheral blood cells was related with aging but not with white blood cell count. *Jpn J Hum Genet* 1996;41: 413-417.
- Hiyama K, Hirai Y, Kyoizumi S, et al. Activation of telomerase in human lymphocytes and hematopoietic progenitor cells. *J Immunol* 1995;155:3711-3715.
- Funk WD, Wang CK, Shelton DN, et al. Telomerase expression restores dermal integrity to in vitro-aged fibroblasts in a reconstituted skin model. *Exp Cell Res* 2000;258:270-278.
- Nakayama J, Tahara H, Tahara E, et al. Telomerase activation by hTERT in human normal fibroblasts and hepatocellular carcinomas. *Nat Genet* 1998;18:65-68.
- American Thoracic Society. Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and treatment. International consensus statement. American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS). *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:646-664.
- Demedts M, Thomeer M. New classifications and concepts of pathogenesis and management of diffuse interstitial lung diseases. *Verh K Acad Geneeskd Belg* 2003;65:337-350.
- Selman M, King TE, Pardo A. Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. *Ann Intern Med* 2001;134:136-151.
- American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. This joint statement of the American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS) was adopted by the ATS board of directors, June 2001 and by the ERS Executive Committee, June 2001. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165:277-304.
- Lappi-Blanco E, Kaarteenaho-Wiik R, Salo S, et al. Laminin-5 gamma2 chain in cryptogenic organizing pneumonia and idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;169:27-33.
- Phan SH. Fibroblast phenotypes in pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003;29(3 Suppl):S87-92.
- Liu T, Nozaki Y, Phan SH. Regulation of telomerase activity in rat lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002;26:534-540.
- Nozaki Y, Liu T, Hatano K, et al. Induction of telomerase activity in fibroblasts from bleomycin-injured lungs. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000;23:p. 460-5.
- Schissel SL, Layne MD. Telomerase, myofibroblasts, and pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006;34:520-522.
- Liu T, Hu B, Chung MJ, et al. Telomerase regulation of myofibroblast differentiation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006;34:625-633.
- Fridlender ZG, Cohen PY, Golan O, et al. Telomerase activity in bleomycin-induced epithelial cell apoptosis and lung fibrosis. *Eur Respir J* 2007;30:205-213.
- Liu T, Chung MJ, Ullenbruch M, et al. Telomerase activity is required for bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *J Clin Invest* 2007;117:3800-3809.
- Armanios MY, Chen JJ, Cogan JD, et al. Telomerase mutations in families with idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 2007;356:1317-1326.
- Tsakiri KD, Cronkhite JT, Kuan PJ, et al. Adult-onset pulmonary fibrosis caused by mutations in telomerase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:7552-7557.
- Marshall RP, Puddicombe A, Cookson WO, et al. Adult familial cryptogenic fibrosing alveolitis in the United Kingdom. *Thorax* 2000;55:143-146.
- Tzouveleki A, Karameris A, Bouros D, et al. Morphometric study of telomerase activity in patients with idiopathic pulmonary fibrosis with the use of tissue microarrays. *Eur Respir J* 2006.
- Tzouveleki A, Tsiambas E, Karameris A, et al. Induction of Telomerase Expression in Alveolar Type II Epithelial Cells in Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis and Cryptogenic Organizing Pneumonia. A Tissue Microarray Study. *Am J Respir Crit Care Med*, 2007.
- Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 1994;266:2011-2015.

28. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med* 1998;4:844-847.
29. Liu X, Zou H, Slaughter C, et al. DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* 1997;89:175-184.
30. Utz JP, Ryu JH, Myers JL, et al. Usual interstitial pneumonia complicating dyskeratosis congenita. *Mayo Clin Proc* 2005;80:817-821.
31. Armanios M, Chen JL, Chang YP, et al. Haploinsufficiency of telomerase reverse transcriptase leads to anticipation in autosomal dominant dyskeratosis congenita. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:15960-15964.
32. Golan-Gerstl R, Wallach-Dayana SB, Amir G, et al. Epithelial cell apoptosis by fas ligand-positive myofibroblasts in lung fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007;36:270-275.
33. Thannickal VJ, Horowitz JC. Evolving concepts of apoptosis in idiopathic pulmonary fibrosis. *Proc Am Thorac Soc* 2006;3:350-356.
34. Uhal BD, Joshi I, True AL, et al. Fibroblasts isolated after fibrotic lung injury induce apoptosis of alveolar epithelial cells in vitro. *Am J Physiol* 1995;269:L819-828.
35. Lappi-Blanco E, Soini Y, Kinnula V, et al. VEGF and bFGF are highly expressed in intraluminal fibromyxoid lesions in bronchiolitis obliterans organizing pneumonia. *J Pathol* 2002;196:220-227.
36. Lappi-Blanco E, Kaarteenaho-Wiik R, Soini Y, et al. Intraluminal fibromyxoid lesions in bronchiolitis obliterans organizing pneumonia are highly capillarized. *Hum Pathol* 1999;30:1192-1196.
37. Tzouvelekis A, Anevlavis S, Bouros D. Angiogenesis in interstitial lung diseases: a pathogenetic hallmark or a bystander? *Respir Res* 2006;7:82.
38. Selman M, Pardo A. Role of epithelial cells in idiopathic pulmonary fibrosis: from innocent targets to serial killers. *Proc Am Thorac Soc* 2006;3:364-372.
39. Strieter RM. Pathogenesis and natural history of usual interstitial pneumonia: the whole story or the last chapter of a long novel. *Chest* 2005;128(5 Suppl 1):526S-532S.
40. Kim KK, Kugler MC, Wolters PJ, et al. Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:13180-13185.
41. Tzouvelekis A, Harokopos V, Paparountas T, et al. Comparative expression profiling in pulmonary fibrosis suggests a role of hypoxia-inducible factor-1alpha in disease pathogenesis. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;176:1108-1119.
42. Tsiambas E, Stamatelopoulos A, Baltayiannis N, et al. Evaluation of combined telomerase and c-myc expression in non-small cell lung carcinomas using tissue microarrays and computerized image analysis. *J Buon* 2005;10:533-539.
43. Reddy R, Buckley S, Doerken M, et al. Isolation of a putative progenitor subpopulation of alveolar epithelial type 2 cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004;286:15.
44. Selman M, Pardo A. Idiopathic pulmonary fibrosis: misunderstandings between epithelial cells and fibroblasts? *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 2004;21:165-72.
45. Selman M, Pardo A. The epithelial/fibroblastic pathway in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003;29(3 Suppl):S93-97.
46. Antoniou KM, Nicholson AG, Dimadi M, et al. Long-term clinical effects of interferon gamma-1b and colchicine in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* 2006;28:496-504.
47. Bouros D, Antoniou KM. Current and future therapeutic approaches in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* 2005;26:693-702.
48. Nathan SD, Noble PW, Tuder RM. Idiopathic pulmonary fibrosis and pulmonary hypertension: connecting the dots. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;175:875-880.
49. Raghu G, Brown KK, Bradford WZ, et al. A placebo-controlled trial of interferon gamma-1b in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 2004;350:125-133.

# Τα Μορφοκλασματικά Σύνολα (Fractals) και ο δυναμικός νόμος στην Πνευμονολογία Η σημασία τους για τον κλινικό ιατρό

**Βασίλειος Ε. Παπαϊωάννου MD, MSc, PhD<sup>1</sup>,  
Ιωάννης Πνευματικός MD, PhD, FCCP<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Λέκτορας Εντατικής Θεραπείας,  
Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης,  
Κλινική Εντατικής Θεραπείας,  
Π.Γ.Ν Αλεξανδρούπολης  
<sup>2</sup>Καθηγητής Εντατικής Θεραπείας,  
Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης,  
Κλινική Εντατικής Θεραπείας,  
Π.Γ.Ν. Αλεξανδρούπολης

#### Λέξεις- Κλειδιά:

- πολυπλοκότητα
- δυναμικός νόμος
- fractal
- διάσταση fractal
- παθολογία άσθματος
- διάνοιξη αεραγωγών
- χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια.

#### Αλληλογραφία:

Βασίλειος Παπαϊωάννου  
Πολυβίου 6-8, 55132, Θεσσαλονίκη  
Τηλ.: +30 6942 551414  
e-mail: vapapa@med.duth.gr

**ΠΕΡΙΛΗΨΗ.** Τα δεδομένα από διάφορες φυσιολογικές κυματομορφές συχνά εμφανίζουν διακυμάνσεις, οι οποίες έχουν, παραδοσιακά, θεωρηθεί ότι αποτελούν ένα είδος «θόρυβου». Εντούτοις, όπως έχει τονίσει και ο Goldberger, τα βιολογικά συστήματα είναι ντετερμινιστικά συστήματα με θόρυβο. Αυτός ο θόρυβος αντανάκλα την εγγενή τους δυναμική και είναι υπεύθυνος για την προσαρμογή του οργανισμού στο μεταβαλλόμενο περιβάλλον. Διαφορετικές τεχνικές από τη στατιστική φυσική έχουν ήδη χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη των βιολογικών σημάτων, ιδιαίτερα στο πεδίο της καρδιολογίας, και έχουν καταφέρει να αποκρυπτογραφήσουν διάφορους παθολογικούς μηχανισμούς των νοσημάτων βοηθώντας έτσι στη δημιουργία προγνωστικών μοντέλων με αυξημένη ακρίβεια. Πρόσφατα, διάφορες ερευνητικές ομάδες έχουν προσπαθήσει να μελετήσουν τη μεταβλητότητα και την πολυπλοκότητα του αναπνευστικού συστήματος αναφορικά τόσο με τη δομή όσο και με τη λειτουργία του. Λίγες κλινικές μελέτες, κυρίως με ασθενείς που πάσχουν από βρογχικό άσθμα και χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια, έχουν καταδείξει ότι η απώλεια της πολυπλοκότητας των αναπνευστικών σημάτων έχει τόσο διαγνωστική όσο και θεραπευτική σημασία ως εργαλείο καλύτερης παρακολούθησης της αντίστοιχης θεραπείας. Σε αυτό το άρθρο, θα προσπαθήσουμε να περιγράψουμε τα αποτελέσματα αυτών των μελετών, καθώς επίσης και τις βασικές μεθόδους υπολογισμού της πολύπλοκης δυναμικής που διέπει την αναπνευστική φυσιολογία, σε φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις. *Πνεύμων 2010, 23(3):240-249.*

*«Εμείς οι ζωντανοί οργανισμοί βρισκόμαστε σε μία περίπλοκη κατάσταση στη φάση μετάβασης μεταξύ της τάξης και του χάους. Βρισκόμαστε εκεί, επειδή είναι το μόνο μέρος όπου μπορούμε να είμαστε ταυτόχρονα σταθεροί αλλά και*



*προσαρμοστικοί, ικανοί να εξελιχθούμε... Πιστεύω ότι βρισκόμαστε σε μία κρίσιμη καμπή για την ανάπτυξη μίας νέας θεωρίας των νοσημάτων που θα εδράζεται στις επιπτώσεις της ύπαρξης της ζωής σε μία φάση μετάβασης.»*

*Peter Macklem 2006*

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα φυσιολογικά δεδομένα που καταγράφονται στην κλίση του ασθενή συχνά εμφανίζουν διακυμάνσεις σε κλίμακες διαφόρων μεγεθών. Αυτές οι διακυμάνσεις είναι εξαιρετικά ανομοιογενείς και εμφανίζουν ανώμαλη και πολύπλοκη μορφολογία, ενώ στην ιατρική βιβλιογραφία συχνά χαρακτηρίζονται ως θόρυβος και αγνοούνται. Εντούτοις, μπορεί να περιέχουν σημαντικές πληροφορίες σχετικά με την υποκείμενη δομή ή λειτουργία του καρδιακού και του αναπνευστικού συστήματος. Αντίστοιχα παραδείγματα περιλαμβάνουν τις διακυμάνσεις στην καρδιακή συχνότητα, στην αναπνευστική συχνότητα, στον αναπνεόμενο όγκο και στην αιματική ροή.<sup>1</sup>

Ο κύριος στόχος της στατιστικής φυσικής είναι η επεξεργασία των μακροσκοπικών φαινομένων που προέρχονται από τη συνεχή αλληλεπίδραση πολλών και διαφορετικών μικροσκοπικών υποσυστημάτων. Ιδιαίτερα το καρδιαγγειακό και το αναπνευστικό σύστημα αποτελούν ιδανικό υλικό για μελέτη με τη χρήση αυτών των μεθόδων καθώς αποτελούνται από πολλά υποσύνολα που υφίστανται διαρκώς τις επιδράσεις του αυτόνομου νευρικού συστήματος. Η ανάλυση των μορφοκλασμάτων ή μορφοκλασματικών συνόλων, όπως αποδίδεται στην ελληνική βιβλιογραφία ο όρος fractal, αποτελεί μία από τις υπάρχουσες τεχνικές που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για αυτό τον σκοπό.

## ΤΑ ΜΟΡΦΟΚΛΑΣΜΑΤΙΚΑ ΣΥΝΟΛΑ ΚΑΙ Ο ΔΥΝΑΜΙΚΟΣ ΝΟΜΟΣ: ΒΑΣΙΚΕΣ ΕΝΝΟΙΕΣ ΚΑΙ ΟΡΙΣΜΟΙ

Οι διακυμάνσεις μίας μεταβλητής μπορούν να περιγραφούν από τη μελέτη της κατανομής πιθανότητας. Ένας τρόπος εκτίμησης των ιδιοτήτων της είναι η δημιουργία ενός ιστογράμματος και η ακόλουθη «κανονικοποίησή» του (normalization), ούτως ώστε η επιφάνεια που περιβάλλεται από την καμπύλη της κατανομής να ισούται με 1. Συχνά, αυτή η κατανομή  $N(x)$  της μεταβλητής  $x$  συμπεριφέρεται με βάση τον λεγόμενο δυναμικό νόμο (power law), ο οποίος έχει τη μορφή:  $N(x) = x^{-d}$  που σημαίνει ότι η σχετική συχνότητα μίας τιμής  $x$  είναι ανάλογη με την

τιμή  $x$  υψωμένη στη δύναμη του  $-d$ . Αν σχηματίσουμε ένα λογαριθμικό διάγραμμα αυτής της σχέσης [ $\log(x)$  και  $\log(d)$ ] θα έχουμε τη γραμμική εξίσωση:  $\log(N) = -d \cdot \log(x)$ , όπου η παράμετρος  $d$  αντιστοιχεί στην αρνητική κλίση μίας ευθείας γραμμής που προκύπτει από την εφαρμογή γραμμικής παλινδρόμησης στις τιμές της  $N(x)$ .<sup>2</sup>

Η κατανομή σύμφωνα με τον δυναμικό νόμο συμπεριφέρεται διαφορετικά από την αντίστοιχη κανονική ή κατανομή Gauss. Οι ουρές της (tails) είναι πολύ μεγάλες (κατανομή με μεγάλες ουρές), αντανακλώντας την αυξημένη σχετική συχνότητα εμφάνισης μεγάλων γεγονότων. Αυτό σημαίνει ότι η πιθανότητα μεγάλων ή σπάνιων μεταβολών είναι πολύ αυξημένη συγκριτικά με την κανονική κατανομή. Ο δυναμικός νόμος περιγράφει δυναμικές καταστάσεις που έχουν παρόμοιο είδος μεταβολών σε διαφορετικές κλίμακες και αποκαλούνται «ανεξάρτητες κλίμακας» (scale invariant) μεταβολές. Αντιθέτως, οι κανονικές κατανομές χαρακτηρίζονται από τυπικές κλίμακες τιμών, όπως αυτές που αντιστοιχούν στην κορυφή της καμπύλης.<sup>3</sup> Επιπλέον, ο δυναμικός νόμος περιγράφει χρονοσειρές (time series) ή κυματομορφές με πολλές μικρές διακυμάνσεις και διαρκώς μειούμενες μεγάλες διακυμάνσεις, ενώ η μορφή τους παραμένει στατιστικά παρόμοια ανεξαρτήτως του μεγέθους. Η μεγέθυνση ή η σμίκρυνση της κλίμακας ενός σήματος αποκαλύπτει τις ίδιες σχέσεις, μία ιδιότητα που έχει ονομαστεί «αυτοομοιότητα» (self-similarity) και αποτελεί χαρακτηριστικό των μορφοκλασμάτων.<sup>2,4</sup>

Τα μορφοκλασματικά σύνολα αποτελούν αντικείμενα που χαρακτηρίζονται από την ιδιότητα της αυτο-ομοιότητας, καθώς μικρά τμήματα της δομής σε μεγέθυνση εμφανίζονται παρόμοια με το όλο σχήμα. Αντίστοιχα με το παράδειγμα μίας ακτής, τα μορφοκλάσματα αναπαριστούν δομές που στερούνται ενός καθορισμένου σχήματος, καθώς αυτό αυξάνεται με την αύξηση της μεγέθυνσης της μέτρησης. Αυτός είναι ο λόγος που τα fractals διαθέτουν μη ακέραιες διαστάσεις που αποκαλούνται διαστάσεις fractal (fractal dimension-FD).<sup>2,5</sup>

Η έννοια των μορφοκλασματικών συνόλων μπορεί να εφαρμοστεί εκτός από δομές που στερούνται μιας χαρακτηριστικής κλίμακας μεγέθους, σε χρονοσειρές-σήματα που στερούνται μιας αντίστοιχης χρονικής κλίμακας παρακολούθησης. Σε αυτήν την περίπτωση, η σχέση ανάμεσα στις στατιστικές ιδιότητες των διακυμάνσεων του σήματος και στο χρονικό παράθυρο της παρατήρησης ακολουθεί τον δυναμικό νόμο. Η σημασία μιας τέτοιας συμπεριφοράς έγκειται στο ότι οι μελλοντικές τιμές ενός σήματος εξαρτώνται από τις προηγούμενες, εμφανίζοντας συσχετίσεις μεταξύ τους με την πάροδο του χρόνου, ενώ

το σύστημα-δομή που παράγει την αντίστοιχη χρονοσειρά εμφανίζει ένα είδος μνήμης.<sup>2-6</sup>

Προκειμένου να εκτιμήσουμε αν η δυναμική ενός σήματος ακολουθεί τον δυναμικό νόμο είναι απαραίτητο να υπολογίσουμε το λεγόμενο φάσμα ισχύος (power spectrum). Για αυτό το λόγο, εφαρμόζουμε ταχύ μετασχηματισμό Fourier (FFT) προκειμένου να προσδιορίσουμε τις συχνότητες που εμπεριέχονται στο σήμα. Κάθε χρονοσειρά, μπορεί να θεωρηθεί ότι είναι ένα άθροισμα ημιτονοειδών ταλαντώσεων με διαφορετικές συχνότητες. Ο μετασχηματισμός Fourier μετατρέπει το σήμα σε ένα άθροισμα ημιτονοειδών και συνημιτονοειδών ταλαντώσεων των οποίων τα πλάτη αντανakλούν την κατανομή τους σε όλο το σήμα. Αυτή η ανάλυση συχνοτήτων παρουσιάζει τη συνεισφορά κάθε ημιτονοειδούς ταλάντωσης ως συνάρτηση της συχνότητάς της, ενώ η ανύψωση στο τετράγωνο των τιμών της αποτελεί τη λεγόμενη ισχύ (power) της εν λόγω συχνότητας σε ολόκληρο το φάσμα της χρονοσειράς. Η συνολική ισχύς της φασματικής ανάλυσης (η επιφάνεια που βρίσκεται κάτω από την καμπύλη της φασματικής ισχύος) είναι ίση με τη μεταβλητότητα που διέπει το υπό εξέταση σήμα.<sup>4</sup> Η αυξημένη μεταβλητότητα/πολυπλοκότητα αποτελεί χαρακτηριστικό της φυσιολογίας, ενώ μεγάλες πολυκεντρικές μελέτες στην καρδιολογία έχουν αποδείξει ότι η απώλεια της μεταβλητότητας των καρδιαγγειακών σημάτων σχετίζεται με την εμφάνιση αιφνίδιου καρδιακού θανάτου, μετεμφραγματικής καρδιακής ανεπάρκειας και κοιλιακής μαρμαρυγής.<sup>7</sup>

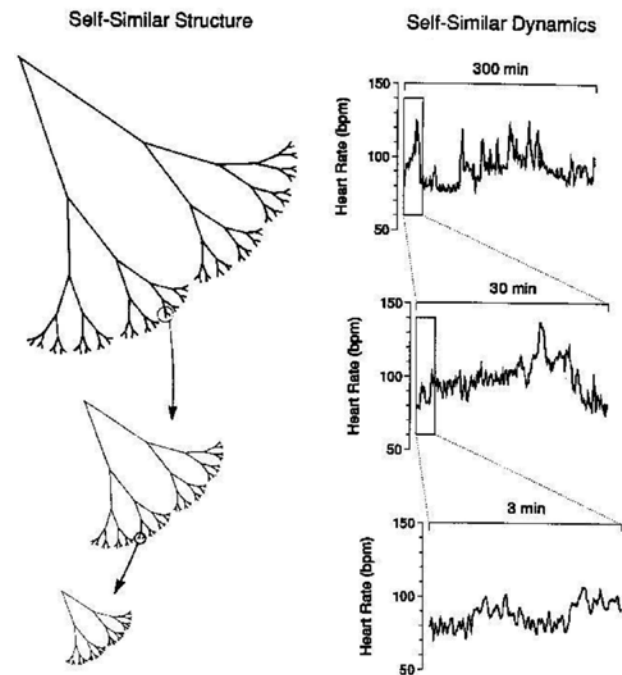
Στην περίπτωση κατανομής που ακολουθεί τον δυναμικό νόμο, η λογαριθμική αναπαράσταση της φασματικής ισχύος (λογάριθμος ισχύος έναντι λογαρίθμου συχνότητας) οδηγεί σε μία ευθεία γραμμή με κλίση περίπου -1. Όσο η συχνότητα αυξάνεται, το μέγεθος της διακύμανσης μικραίνει στον ίδιο βαθμό (scale invariance).

Οι τιμές της κλίσης ή  $\beta$  κλίσης ή εκθέτη όπως συχνά αποκαλείται, μπορούν να δώσουν πληροφορίες σχετικά με την εγγενή δυναμική του υπό εξέταση συστήματος. Τιμές κοντά στο 1 υποτίθεται ότι αντανakλούν μία πολύπλοκη τύπου fractal συμπεριφορά, ενώ τιμές μικρότερες από 0.5 αφορούν συστήματα όπου απουσιάζουν συσχετίσεις των τιμών στο χρόνο, χωρίς μνήμη και τελικά, με χαοτική και μη προβλέψιμη συμπεριφορά (λευκός θόρυβος). Αντιθέτως, τιμές της κλίσης  $\beta$  μεγαλύτερες από 1 ή σχεδόν 1.5 περιγράφουν συστήματα με ισχυρές συσχετίσεις των τιμών τους στο χρόνο και προβλέψιμη ή σχεδόν περιοδική συμπεριφορά (θόρυβος Brown).<sup>4,5</sup> Ο Ary Goldberger μελέτησε τη δυναμική του καρδιαγγειακού συστήματος σε υγιείς και παθολογικές καταστάσεις και απέδειξε ότι

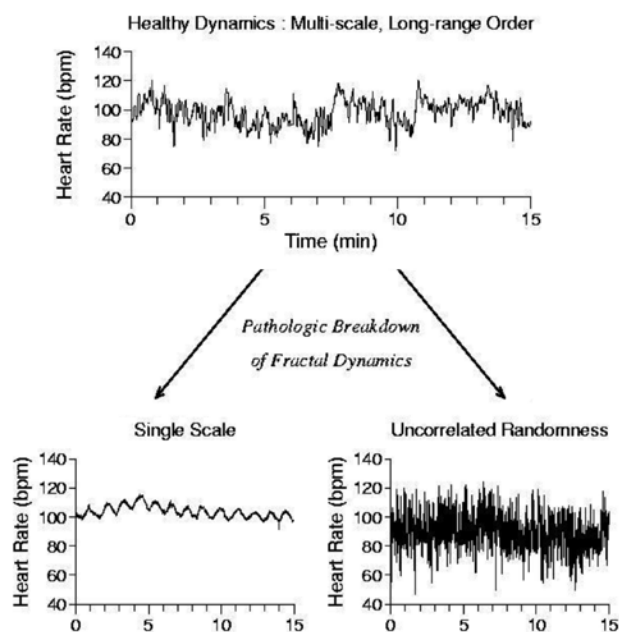
τόσο η τυχαία και μη προβλέψιμη συμπεριφορά όσο και η αντίστοιχη περιοδική αναπαριστούν απώλεια της φυσιολογικής λειτουργίας και συσχετίζονται με απώλεια των μορφοκλασματικών χαρακτηριστικών των καρδιαγγειακών σημάτων.<sup>8</sup> Παρόμοια αποτελέσματα έχουν προκύψει και σε ασθενείς με σοβαρή σήψη και σηπτικό shock<sup>4</sup> (Εικόνες 1-3).

## ΤΑ ΜΟΡΦΟΚΛΑΣΜΑΤΙΚΑ ΣΥΝΟΛΑ ΚΑΙ Ο ΔΥΝΑΜΙΚΟΣ ΝΟΜΟΣ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΗ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ

Πολλά όργανα διαφόρων βιολογικών συστημάτων εμφανίζουν δομή με μορφοκλασματικά χαρακτηριστικά.



**ΕΙΚΟΝΑ 1.** Αριστερά διακρίνεται ένα σχήμα δέντρου με χαρακτηριστικά fractal καθώς διαθέτει διακλαδώσεις που διέπονται από το φαινόμενο της αυτο-ομοιότητας, με αποτέλεσμα το σχήμα σε μικρή κλίμακα (μεγέθυνση) να μοιάζει με το όλο σχήμα σε μεγάλη κλίμακα. Δεξιά διαγράφεται μία χρονοσειρά με χαρακτηριστικά fractal, όπως π.χ η καρδιακή ή η αναπνευστική συχνότητα, η οποία περιέχει διακυμάνσεις σε διαφορετικές χρονικές κλίμακες, που διαθέτουν στατιστικές ιδιότητες που διέπονται από το φαινόμενο της αυτο-ομοιότητας. [Από την αναφορά: Goldberger AL. Non-linear dynamics for clinicians: chaos theory, fractals, and complexity at the bedside. Lancet 1996; 347:1312-1314, ελεύθερα διαθέσιμο από την ιστοσελίδα [physionet, www.physionet.org](http://www.physionet.org)].



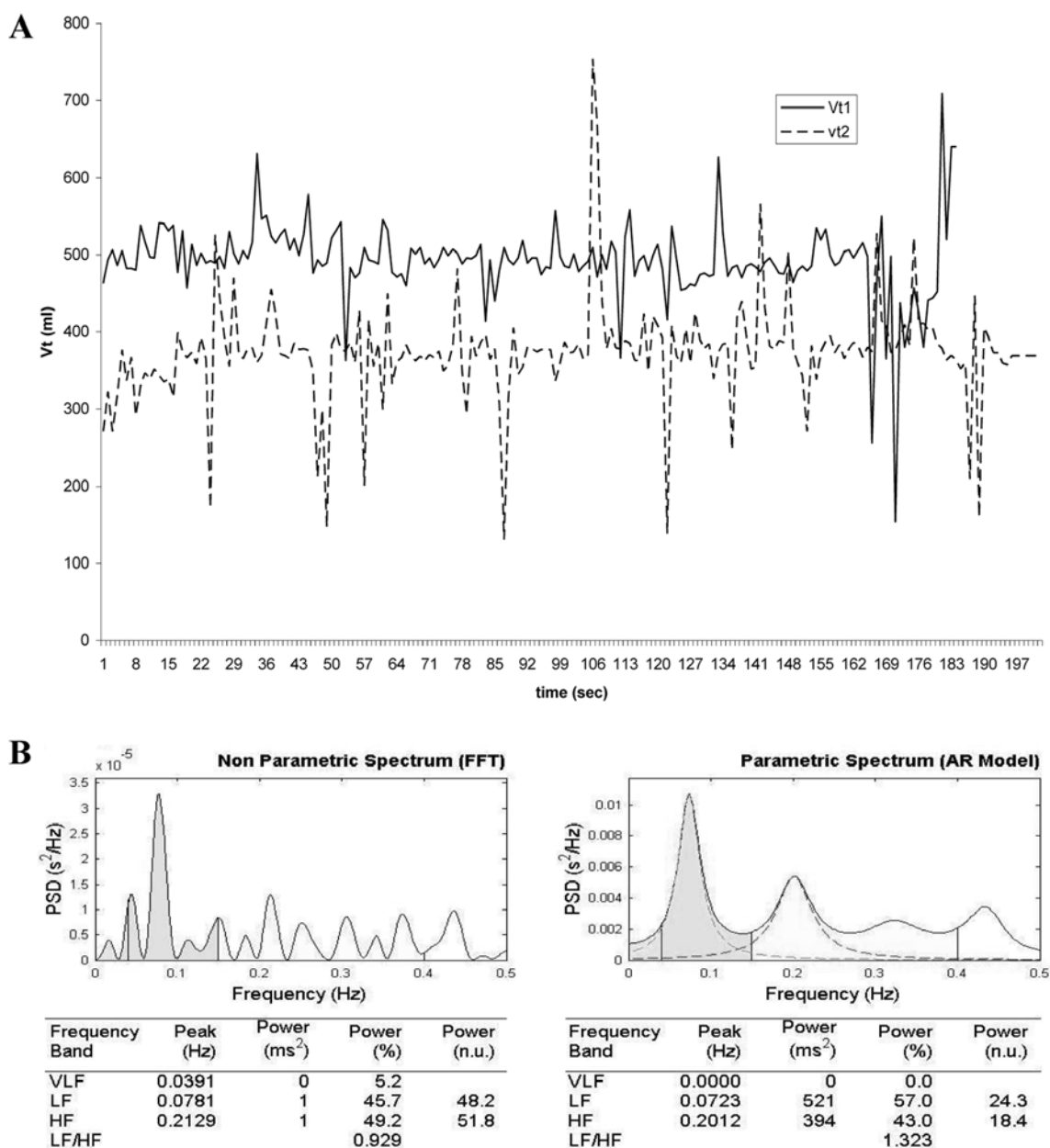
**ΕΙΚΟΝΑ 2.** Η πολυπλοκότητα fractal φυσιολογικών σημάτων (πχ. καρδιακή ή αναπνευστική συχνότητα) μπορεί να μειωθεί κατά την γήρανση και σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις. Ο τύπος των μεταβολών μπορεί να ακολουθεί είτε μία εντελώς περιοδική διαδικασία (κάτω αριστερό σχήμα) είτε μία τυχαία εξέλιξη (χαοτική δυναμική, κάτω δεξιό σχήμα). [Από την αναφορά: Goldberger AL. Non-linear dynamics for clinicians: chaos theory, fractals, and complexity at the bedside. *Lancet* 1996; 347:1312-1314, ελεύθερα διαθέσιμο από την ιστοσελίδα [physionet, www. physionet.org](http://physionet.org)].

Η fractal-κλασμοειδής διακλάδωση μειώνει τις αποστάσεις που πρέπει να διανύσουν διάφορες ουσίες, όπως τα συστατικά της τροφής, με αποτέλεσμα περισσότερο γρήγορη και επαρκή απόδοσή τους στους ιστούς.<sup>9</sup> Ο πνεύμονας προσφέρει πολλά παραδείγματα συμπεριφοράς που διέπονται από το φαινόμενο της αυτο-ομοιότητας. Οι Weibel και Gomez μέτρησαν για πρώτη φορά τη μορφολογία των ανθρώπινων αεραγωγών και βρήκαν μια εκθετική σχέση ανάμεσα στη διάμετρο και στη γενεά των μεγάλων αεραγωγών.<sup>10</sup> Ο Mandelbrot, που πρώτος εισήγαγε την έννοια των fractals-μορφοκλασμάτων στη διεθνή βιβλιογραφία, ανακάλυψε έναν ενοποιητικό τρόπο κλιμάκωσης των αεραγωγών στον πνεύμονα. Η αυξημένη διάσταση fractal αντιστοιχεί σε μια περισσότερο πολύπλοκη διακλάδωση, ενώ μία χαμηλότερη τιμή αντανάκλα μία περισσότερο ομοιογενή δομή.<sup>11</sup> Επιπλέον, η τοπική πνευμονική αιματική ροή έχει αποδειχθεί από τον Glenny ότι χαρακτηρίζεται από μορφοκλασματικές ιδιότητες στο χώρο και στο χρόνο.<sup>12</sup> Η δομή της κυψελιδικής επιφάνειας

έχει, επίσης, αποδειχθεί ότι μπορεί να περιγραφεί με ακρίβεια χρησιμοποιώντας τον δυναμικό νόμο, αντανάκλωντας ανεξαρτησία κλίμακας.<sup>13</sup> Η κατανομή πιθανότητας της διάνοιας των αεραγωγών κατά τη διάρκεια της εισπνοής ακολουθεί επίσης το δυναμικό νόμο.<sup>14</sup>

Μια άλλη ιδιότητα των μορφοκλασμάτων και του δυναμικού νόμου στην αναπνευστική φυσιολογία είναι η αντοχή στην εμφάνιση σφαλμάτων στη διάρκεια ανάπτυξης του οργανισμού. Σε μοντέλα προσομοίωσης της μορφογένεσης των αεραγωγών κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του πνεύμονα, ο West συνέκρινε τη διακλάδωσή τους αφ' ενός σύμφωνα με τον δυναμικό νόμο και αφ' ετέρου, ακολουθώντας εκθετική μείωση της διαμέτρου. Αναλύοντας τα δεδομένα, κατέληξε στο ότι στην πρώτη περίπτωση, το σύστημα ήταν λιγότερο επιρρεπές σε λάθη που εισάγονταν στο μοντέλο κατά τη διαδικασία διακλάδωσης των αεραγωγών.<sup>15</sup> Αυτές οι ιδιότητες ερμηνεύονται από το ότι οι ζωντανοί οργανισμοί είναι ικανοί να λειτουργούν φυσιολογικά σε διάφορες κλίμακες, δηλαδή όποτε οι συνθήκες του περιβάλλοντος αλλάζουν, αυτοί μπορούν και προσαρμόζονται εύκολα και με σχετική αποτελεσματικότητα.

Οι Lipsitz και Goldberger έχουν δείξει ότι το φαινόμενο της γήρανσης σχετίζεται σημαντικά με την απώλεια της πολυπλοκότητας των φυσιολογικών σημάτων, υποδηλώνοντας τη μειωμένη προσαρμοστικότητα του οργανισμού στα διάφορα εξωτερικά ερεθίσματα. Χρησιμοποιώντας διάφορους αλγόριθμους για τον υπολογισμό των μορφοκλασματικών ιδιοτήτων και της κατανομής σύμφωνα με τον δυναμικό νόμο των καρδιαγγειακών σημάτων, οι συγγραφείς βρήκαν ότι η κλίση  $\beta$  σε ηλικιωμένους ήταν είτε ελαττωμένη ( $<1$ ) είτε αυξημένη ( $>1$ ) σε σχέση με νεότερους ενήλικες, υποδηλώνοντας χαοτική ή περιοδική δυναμική αντίστοιχα.<sup>8</sup> Ο Peng και οι συνεργάτες του απέδειξαν ότι η γήρανση σχετίζεται με μία κατάρρευση της fractal δυναμικής των αναπνευστικών σημάτων μέσω μίας μείωσης της κλίσης  $\beta$  προς το 0.5 (τυχειότητα).<sup>16</sup> Αναφορικά με τα πρώιμα στάδια της ανάπτυξης στους ανθρώπους, μία μελέτη βρήκε ότι διάφορα υπερηχογραφικά χαρακτηριστικά της ωρίμανσης των πνευμόνων εμφάνιζαν μορφοκλασματικές ιδιότητες και ακολουθούσαν το δυναμικό νόμο. Επιπλέον, η κλίση  $\beta$  αυξάνονταν με την ηλικία κύησης από τις 28 στις 38 εβδομάδες.<sup>17</sup> Οι Szeto και συνεργάτες υπολόγισαν τις κλίσεις  $\beta$  διαφόρων αναπνευστικών σημάτων σε ανθρώπινα έμβρυα και απέδειξαν τη μετατόπισή τους από την τυχειότητα προς μία fractal συμπεριφορά κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης.<sup>18</sup> Συμπερασματικά, φαίνεται ότι υπάρχει μεγάλη μεταβλητότητα και πολυπλοκότητα των



**ΕΙΚΟΝΑ 3.** Στην εικόνα 3Α καταγράφεται η κατανομή του αναπνεόμενου όγκου ( $V_{t1}$ ) πριν και κατά τη διάρκεια εκτέλεσης μίας αυτόματης αναπνευστικής δοκιμασίας ( $V_{t2}$ ), εκδηλώνοντας μία εγγενή μεταβλητότητα των τιμών. Η εικόνα 3B παρουσιάζει την ανάλυση Fourier (FFT) του πρώτου σήματος της εικόνας 3A (καταγραφές από ασθενή της Κλινικής μας). Το software (Kubios HRV) παρουσιάζει τις διαφορετικές συχνότητες (LF: low frequency-χαμηλή συχνότητα, HF: high frequency-υψηλή συχνότητα and VLF: very low frequency-πολύ χαμηλή συχνότητα).

αναπνευστικών σημάτων στα πρώιμα στάδια της ζωής, ενώ ακολούθως αυτή ελαττώνεται με την ωρίμανση και τελικά, τη γήρανση του οργανισμού.

### ΟΙ ΜΟΡΦΟΚΛΑΣΜΑΤΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ ΣΕ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ: ΕΥΡΗΜΑΤΑ ΑΠΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ

Οι μεταβολές των μορφοκλασματικών χαρακτηριστι-



κών σχετίζονται με διάφορες παθολογικές καταστάσεις και μπορεί να έχουν ιδιαίτερη σημασία για τη διάγνωση και θεραπεία τους. Οι φυσιολογικές χρονοσειρές, όπως τα καρδιακά και αναπνευστικά σήματα, εμφανίζουν παρόμοιες μεταβολές της δυναμικής τους σε διαφορετικά νοσήματα. Οι Mackey και Glass εισήγαγαν τον όρο «δυναμικές νόσοι» προκειμένου να περιγράψουν καταστάσεις με απώλεια των μορφοκλασματικών ιδιοτήτων των οργάνων και της συμπεριφοράς των σημάτων που προέρχονται από αυτά (μη εφαρμογή του δυναμικού νόμου).<sup>19</sup> Για παράδειγμα, η απώλεια της μεταβλητότητας της καρδιακής συχνότητας, δηλαδή η μεταβολή του διαστήματος R-R στο ηλεκτροκαρδιογράφημα, έχει παρατηρηθεί σε ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια,<sup>20</sup> κολπική μαρμαρυγή,<sup>21</sup> σπητικό shock και πολυοργανική ανεπάρκεια.<sup>22</sup> Στα αναπνευστικά νοσήματα, κλασικό παράδειγμα αποτελεί η έντονη περιοδική διακύμανση της αναπνευστικής συχνότητας που εμφανίζεται στην αναπνοή Cheyne-Stokes. Ο Penzel παρατήρησε απώλεια των μορφοκλασματικών ιδιοτήτων της καρδιακής συχνότητας κατά τη διάρκεια επεισοδίων αποφρακτικής άπνοιας στον ύπνο.<sup>23</sup>

Ο Macklem ήταν ο πρώτος που έθεσε την ερώτηση αν η λειτουργία των αεραγωγών μπορεί να μελετηθεί με τη χρήση μεθοδολογικών εργαλείων από τη θεωρία του χάους και με βάση το παράδειγμα των πολύπλοκων συστημάτων.<sup>24</sup> Οι Que και συνεργάτες μελέτησαν την κατανομή της προκλητής μεταβαλλόμενης αντίστασης (forced oscillatory resistance) σε ασθματικούς ασθενείς και απέδειξαν ότι η λειτουργία του πνεύμονα δεν διέπεται από τον δυναμικό νόμο κατά τη διάρκεια σοβαρών ασθματικών προσβολών.<sup>25</sup> Ο Frey και συνεργάτες εφάρμοσαν μεθόδους από τη θεωρία των μορφοκλασμάτων, δύο φορές καθημερινά στη χρονοσειρά της μέγιστης εκπνευστικής ροής (peak expiratory flow-PEF) σε ασθματικούς ασθενείς και απέδειξαν ότι η κλίση β ελαττώνονταν. Επιπρόσθετα, η κλίση αυξάνονταν με την κλασική θεραπεία με μακράς διάρκειας β2 αγωνιστές ενώ ελαττώνονταν (περισσότερο τυχαία δυναμική) με τη χρήση βραχείας διάρκειας β2 αγωνιστές. Τέλος, οι συγγραφείς κατάφεραν να αποδείξουν ότι όσο μεγαλύτερη ήταν η κλίση β όταν οι ασθενείς δεν έπαιρναν καμία αγωγή, τόσο μεγαλύτερη ήταν η βελτίωση των συμπτωμάτων τους μετά από χορήγηση μακράς διάρκειας β2 αγωνιστών.<sup>26</sup>

Σε μία άλλη μελέτη, ο Suki υπολόγισε τη δυναμική της διάνοιξης των αεραγωγών και την αντίστοιχη δυναμική των μουσικών ρόγγων (crackles) χρησιμοποιώντας ένα απλό μαθηματικό μοντέλο της περιφέρειας του τραχειοβρογχικού δέντρου.<sup>27</sup> Ο Forgacs ήταν ο πρώτος που πρότεινε ότι οι μουσικοί ρόγγοι κατά την ακρόαση των

πνευμόνων οφείλονται στο αιφνίδιο άνοιγμα των κλειστών αεραγωγών.<sup>28</sup> Ο Suki απέδειξε ότι η δυναμική των χρονοσειρών των μουσικών ρόγγων που μεταδίδονταν κατά τη διάρκεια της διάνοιξης των αεραγωγών ακολουθεί το δυναμικό νόμο. Επιπλέον, καθώς οι ήχοι μεταδίδονται, η έντασή τους μειώνεται στις διαδοχικές διακλαδώσεις, ενώ η κατανομή αυτής της μείωσης συμπεριφέρεται ομοίως σύμφωνα με τον δυναμικό νόμο. Αντίστοιχα ευρήματα προέκυψαν για τα χρονικά διαστήματα των ξαφνικών μεταβολών (jumps) της ελάττωσης της αντίστασης των αεραγωγών κατόπιν διάτασης των πνευμόνων με αερισμό σταθερής ροής. Σε μία μελέτη των Bosei και συνεργατών, υπολογίστηκε η διάσταση fractal των αεραγωγών χρησιμοποιώντας ιστολογικό υλικό από τρεις ομάδες ασθενών: ασθενείς με θανατηφόρο άσθμα, σχεδόν θανατηφόρο και μη θανατηφόρο αντίστοιχα. Οι συγγραφείς απέδειξαν ότι ο μέσος όρος της fractal διάστασης των δύο πρώτων ομάδων (1.72 και 1.76 αντίστοιχα) ήταν σημαντικά μικρότερος από εκείνον της τρίτης ομάδας (1.83,  $p < 0.05$ ), ενώ η χαμηλή διάσταση fractal σχετίζονταν με μειωμένη συνολική πολυπλοκότητα της δομής του τραχειοβρογχικού δέντρου και με αυξημένη βαρύτητα της νόσου.<sup>29</sup>

Ο Venegas και συνεργάτες, χρησιμοποιώντας απεικόνιση με τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων (positron emission tomography-PET) και υπολογιστικά μοντέλα απέδειξαν ότι σε περιπτώσεις βρογχόσπασμου και όταν η σύσπαση των λείων μυϊκών ινών προσεγγίσει ένα κρίσιμο σημείο, μπορούν ν' αναπτυχθούν αιφνίδια και τοπικά συσσωματώσεις (clusters) φτωχά αεριζόμενων περιοχών του πνεύμονα, με διακριτά βήματα.<sup>30</sup> Αυτά τα στάδια δημιουργίας ονομάζονται *avalanches* (χιονοστιβάδες) και μπορούν να οδηγήσουν σε νέες καταστάσεις ισορροπίας. Εξαιτίας της μορφοκλασματικής δομής των αεραγωγών, μικρές αρχικές ανομοιογένειες που υπάρχουν υπό φυσιολογικές συνθήκες και ιδιαίτερα σε παθολογικούς πνεύμονες, μπορούν να ενισχυθούν οδηγώντας αιφνιδιαστικά στη δημιουργία φτωχά αεριζόμενων πνευμονικών περιοχών. Ένα άλλο συμπέρασμα που προκύπτει από την παραπάνω μελέτη είναι ότι, εφόσον οι αεραγωγοί είναι οργανωμένοι σε ένα δίκτυο με μορφοκλασματικά χαρακτηριστικά που αλληλεπιδρά με το ελαστικό παρέγχυμα, η σύσπαση ενός αεραγωγού μπορεί να μεταδοθεί και να προκαλέσει μία γενικευμένη αντίστοιχη σύσπαση τύπου *avalanche* σε μεγάλα τμήματα των πνευμόνων. Το ίδιο φυσικά ισχύει και στην αντίθετη διαδικασία, όπου η διάνοιξη των αεραγωγών κατά τη διάρκεια της εισπνοής λαμβάνει χώρα με ξεχωριστά διακριτά βήματα.<sup>31,32</sup>

Ο Suki απέδειξε ότι η διάνοιξη των αεραγωγών κατά τη διάρκεια εμφύσησης με σταθερή ροή λαμβάνει χώρα

με τη μορφή των avalanches και εμφανίζει κατανομή που υπακούει στον δυναμικό νόμο, τόσο όσον αφορά το μέγεθος όσο και τα χρονικά διαστήματα μεταξύ τους.<sup>27</sup> Η σημασία αυτών των ευρημάτων έγκειται στο ότι η πιθανότητα ανεύρεσης ενός μεγάλου avalanche είναι πολύ μεγαλύτερη από ότι θα συνέβαινε αν η κατανομή της διάνοξης ήταν κανονική ή εκθετική. Οπότε, τόσο το μέγεθος όσο και η χρονική στιγμή της εφαρμογής θετικής πίεσης στους αεραγωγούς (π.χ. κατά τη χρήση μηχανικού αερισμού θετικών πιέσεων) μπορεί να είναι εξίσου σημαντικά στην πρόκληση της διαδικασίας avalanche για την επιστράτευση των κυψελίδων.<sup>2,32</sup>

Συμπερασματικά, αυτές οι μελέτες στο βρογχικό άσθμα δείχνουν ότι όταν οι αεραγωγοί προσεγγίζουν την κριτική τιμή σύγκλεισης, ένα μικρό ερέθισμα μπορεί να προκαλέσει μία καταστροφική αλυσίδα γεγονότων που αφορούν τη σύγκλειση των αεραγωγών. Για αυτό το λόγο, υπάρχει τόσο φτωχή συσχέτιση ανάμεσα στο ερέθισμα και στην έκβαση των ασθματικών ασθενών. Επιπλέον, το ιστορικό των διακυμάνσεων των συμπτωμάτων φαίνεται να σχετίζεται με τις δομικές μεταβολές του τραχειοβρογχικού δέντρου (κατανομή δυναμικού νόμου της διαμέτρου των αεραγωγών).<sup>32</sup>

Η επιστράτευση των αεραγωγών μπορεί να επηρεάσει αντίστοιχα και εκείνη των κυψελίδων. Ο Sujeer και συνεργάτες βρήκαν σε μαθηματικά μοντέλα ότι οι επιστρατευόμενοι αναπνεόμενοι όγκοι κατόπιν εμφύσησης αέρα με σταθερή ροή ακολουθούν τον δυναμικό νόμο με κλίση β ίση με 2.<sup>33</sup> Από αυτά τα ευρήματα μπορεί να υποτεθεί ότι εφόσον η κυψελιδική επιστράτευση επηρεάζεται από τη δομή των αεραγωγών, τότε η καμπύλη πίεσεως-όγκου του αναπνευστικού συστήματος μπορεί να παρέχει πληροφορίες αναφορικά με το τραχειοβρογχικό δέντρο.<sup>2</sup> Αν τέτοια μοντέλα έχουν κάποια αξία στη μελέτη του συνδρόμου οξείας πνευμονικής βλάβης (acute lung injury-ALI) είναι αβέβαιο. Σε αυτό το σύνδρομο έχει βρεθεί ότι η κατανομή των πιέσεων διάνοξης των κυψελίδων δεν είναι πάντα κανονική, κάτι που θεωρείται προϋπόθεση στο μοντέλο των avalanches.<sup>34</sup> Περισσότερες μελέτες απαιτούνται προκειμένου να διερευνηθεί ο τρόπος της κυψελιδικής επιστράτευσης στο ALI, ειδικά στις περιπτώσεις διαταραχών της σχέσης αερισμού/αιμάτωσης λόγω της βαρύτητας στο κυψελιδικό επίπεδο.<sup>35</sup>

Η εφαρμογή της μορφοκλασματικής ανάλυσης έχει επίσης βοηθήσει στη μελέτη της μορφολογίας των πνευμόνων σε περιπτώσεις εμφυσήματος. Η υπολογιστική τομογραφία (computed tomography-CT) είναι μία ευαίσθητη μέθοδος για την εκτίμηση της δομής του πνεύμονα σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις. Γενικά, συσσωματώ-

σεις χαμηλού σήματος απορρόφησης (low attenuation area-LAA) εμφανίζονται στα pixels της οθόνης με πυκνότητα μικρότερη από 950 μονάδες Hounsfield. Αυτές οι περιοχές περιλαμβάνουν κυρίως αέρα και λαμβάνουν τη τιμή 1, ενώ αντίθετα, περιοχές με πυκνότητα απορρόφησης μεγαλύτερη από 950 μονάδες αντιστοιχούν πρωτίστως σε πνευμονικό ιστό και λαμβάνουν την τιμή 0. Το άθροισμα του αριθμού των pixels σε μία αντίστοιχη περιοχή (cluster) παρέχει το μέγεθός της. Με αυτό τον τρόπο, μπορεί να κατασκευαστεί ένας δυαδικός (binary) χάρτης του πνεύμονα, που σε φυσιολογικές συνθήκες, όπως προκύπτει από κάποιες μελέτες, είναι ιδιαίτερα ανομοιομορφος και ετερογενής.<sup>2</sup> Ο Mishima και συνεργάτες βρήκαν ότι η κατανομή πιθανότητας των LAA συσσωματώσεων ακολουθεί τον δυναμικό νόμο τόσο σε υγιείς όσο και σε ασθενείς με χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ). Εντούτοις, οι ασθενείς εμφάνισαν σημαντικά μικρότερες κλίσεις β, οι οποίες δεν σχετίζονταν με τα tests λειτουργικότητας της αναπνευστικής λειτουργίας, με εξαίρεση την ικανότητα διάχυσης του πνεύμονα. Οι συγγραφείς υπέθεσαν ότι οι γειτονικές μικρές LAA συσσωματώσεις τείνουν να ενωθούν και να σχηματίσουν μεγαλύτερες, καθώς οι ασθενείς ελαστικές ίνες που τις διαχωρίζουν διαρηγνύονται.<sup>36</sup> Αυτή η διαδικασία δεν επηρεάζει το % ποσοστό των LAA αλλά ελαττώνει τον αριθμό των μικρών συσσωματώσεων έναντι των μεγάλων, κάτι που προκαλεί μείωση της β κλίσης. Μία άλλη υπόθεση, που συνάγεται από αυτή τη μελέτη, είναι ότι η πιθανότητα ανεύρεσης μεγάλων LAA συσσωματώσεων είναι πολύ αυξημένη σε ασθενείς με ΧΑΠ σε σχέση με φυσιολογικούς ενήλικες.<sup>32</sup>

Μία άλλη δυνητική εφαρμογή των μορφοκλασματικών συνόλων στην πνευμονολογία φαίνεται να αφορά στην εφαρμογή μηχανικού αερισμού στους βαρέως πάσχοντες ασθενείς. Σε ένα πειραματικό μοντέλο πνευμονικής βλάβης με χορήγηση ολεϊκού οξέος, οι Mutch και συνεργάτες εισήγαγαν διακυμάνσεις στον μηχανικό αερισμό με βάση έναν αλγόριθμο (βιολογικά μεταβαλλόμενος αναπνεόμενος όγκος και αναπνευστική συχνότητα ανάλογη του απαιτούμενου κατά λεπτού αερισμού). Σε σύγκριση με τον συμβατικό αερισμό (με τον ίδιο κατά λεπτό αερισμό), αυτή η μέθοδος αύξησε την αναπνευστική αρρυθμία και την οξυγόνωση και ελάττωσε το νεκρό χώρο.<sup>37</sup> Σύμφωνα με τον Suki, όταν προστίθενται διακυμάνσεις με τη μορφή συμμετρικά κατανεμημένου τυχαίου θορύβου στις μέγιστες πιέσεις των αεραγωγών (peak airway pressure), η μέση τιμή δεν μεταβάλλεται αλλά μεμονωμένες τιμές μπορεί να αυξηθούν σημαντικά, οδηγώντας σε κυψελιδική επιστράτευση.<sup>2,38</sup> Σε ένα μαθηματικό μοντέλο, οι ίδιοι

συγγραφείς βρήκαν ότι ο όγκος του επιστρατευμένου πνεύμονα με τη χρήση βιολογικά μεταβαλλόμενου αερισμού μπορεί να αυξηθεί μέχρι και 200% σε σχέση με εκείνον στη διάρκεια του συμβατικού αερισμού. Επιπλέον, η τυπική απόκλιση του θορύβου μπορεί να τροποποιηθεί προκειμένου να επιτευχθεί καλύτερη οξυγόνωση, ένα φαινόμενο που αποκαλείται «στοχαστικός συντονισμός» (stochastic resonance) και η σημασία του έχει ήδη επιβεβαιωθεί σε πειραματικά μοντέλα με ALI.<sup>38</sup>

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ ΓΙΑ ΤΟ ΜΕΛΛΟΝ

Σύμφωνα με τον Macklem, υπάρχει ένα συνεχές των θερμοδυναμικών συστημάτων που δεν ακολουθούν το 2<sup>ο</sup> θερμοδυναμικό αξίωμα (νόμος της εντροπίας), καθώς ανταλλάσσουν διαρκώς ενέργεια με το περιβάλλον τους (ανοιχτά συστήματα): το ένα άκρο βρίσκεται κοντά στην ισορροπία όπως οι κρύσταλλοι, το άλλο άκρο μακριά από τη θερμοδυναμική ισορροπία, όπως ο καιρός. «Το ποσό της ενέργειας που καταναλώνεται από το σύστημα καθορίζει τη θέση του στο συνεχές. Ανάμεσα στους κρυστάλλους και στον καιρό, λαμβάνει χώρα μία μετάβαση φάσης, με μικρή κατανάλωση ενέργειας. Μόνο εκεί μπορεί η ζωή να αναπτυχθεί».<sup>39</sup> Από την παραπάνω δήλωση προκύπτει ότι τόσο η μειωμένη κατανάλωση ενέργειας όπως στη μυοκαρδιακή ισχαιμία, όσο και η αυξημένη, μπορούν να οδηγήσουν τον οργανισμό μακριά από την κατάσταση ισορροπίας, σηματοδοτώντας την έναρξη της «δυναμικής» νόσου. Ο Que απέδειξε ότι στο άσθμα, η τοπική αύξηση του μεταβολικού ρυθμού σχετίζεται με αυξημένη μεταβλητότητα της αντίστασης των αεραγωγών στη ροή.<sup>25</sup> Ο ίδιος συγγραφέας, πρότεινε τον όρο «ομοιοκίνηση» αντί του όρου «ομοιόσταση» ως βασική ιδιότητα των ζωντανών οργανισμών που «περιγράφει την ικανότητα ενός οργανισμού να χρησιμοποιήσει πηγές εξωτερικής ενέργειας προκειμένου να διατηρήσει μία υψηλού επιπέδου εσωτερική οργάνωση με διακυμάνσεις εντός αποδεκτών ορίων σε μία κατάσταση μακριά από τη θερμοδυναμική ισορροπία».<sup>25</sup>

Η μελέτη των φυσιολογικών σημάτων των ασθενών, όπως η καρδιακή και η αναπνευστική συχνότητα, μπορεί εύκολα να αποκρυπτογραφήσει την «κρυμμένη» πληροφορία που βρίσκεται σε αυτά και αφορά την εγγενή τους δυναμική αλλά και τη συνολική μεταβλητότητα σε

ολόκληρο το φάσμα της χρονοσειράς, Η αναγνώριση ότι οι φυσιολογικές κυματομορφές περιέχουν κρυμμένη πληροφορία σχετιζόμενη με μία αυξημένη πολυπλοκότητα, αμφισβητεί τις παραδοσιακές μηχανιστικές μεθόδους μελέτης που στηρίζονται σε κλασικές στατιστικές τεχνικές, ενώ έχει αυξήσει το ενδιαφέρον για την υιοθέτηση εργαλείων της στατιστικής φυσικής για τη μελέτη των βιολογικών συστημάτων. Μέσω αυτών των τεχνικών, διάφοροι δείκτες μπορούν να υπολογιστούν, ικανοποιώντας τις απαιτήσεις της σύγχρονης ιατρικής για καλύτερες και περισσότερο αξιόπιστες προβλέψεις, καθώς ο υπολογισμός τους στηρίζεται σε μετρήσεις υψηλής συχνότητας (συχνότητα δειγματοληψίας τουλάχιστον ίση με 250 Hz). Αυτή η προσπάθεια έχει ήδη βοηθήσει την έρευνα γύρω από τη δυναμική της καρδιακής συχνότητας και της αρτηριακής πίεσης μέσω προτυποποίησης διαφορετικών τεχνικών επεξεργασίας των ιατρικών σημάτων, συχνότητας και διάρκειας μετρήσεων και τεχνικών εκτίμησης ποιότητας των σημάτων. Επιπλέον, έχει ήδη συμβάλει στη δημιουργία περισσότερο αξιόπιστων διαγνωστικών και προγνωστικών δεικτών στα καρδιαγγειακά νοσήματα. Τέλος, έχει αναπτυχθεί ένας αριθμός διεθνών βάσεων δεδομένων καρδιακών σημάτων με ελεύθερη πρόσβαση από διαφορετικούς ερευνητές, όπως η ιστοσελίδα [www.physionet.org](http://www.physionet.org).<sup>40</sup>

Πιστεύουμε ότι αντίστοιχες προσπάθειες πρέπει να ευοδωθούν τόσο στο χώρο της Πνευμονολογίας, όσο και σε εκείνον της Εντατικής Θεραπείας, ιδιαίτερα όσον αφορά τη σοβαρή οξεία αναπνευστική ανεπάρκεια. Συμπερασματικά, προτείνουμε ότι η εφαρμογή της ανάλυσης των μορφοκλασματικών συνόλων-fractals στην αναπνευστική φυσιολογία θα οδηγήσει στην καλύτερη κατανόηση διαφορετικών και δυναμικών αλλαγών που λαμβάνουν χώρα σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις, ενώ η υψηλή προγνωστική τους αξία θα αυξήσει επιπλέον την κλινική τους χρησιμότητα. Οι κλινικοί ιατροί πρέπει ν' αρχίσουν να κατανοούν τις βασικές αρχές της θεωρίας των πολύπλοκων συστημάτων και να υποστηρίξουν μία πολυσυστηματική προσέγγιση από διαφορετικά πεδία των επιστημών, με στόχο την πιο ακριβή διάγνωση και την πιο αποτελεσματική θεραπεία των ασθενών τους.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(Βλέπε αγγλικό κείμενο)

**ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑ**

Αν και υπάρχουν διάφορες μέθοδοι για την εκτίμηση των ιδιοτήτων fractal ενός σήματος, ο Glenny πρότεινε τη χρήση μίας μεθόδου που αποκαλείται σχετική διασπορά (relative dispersion-RD), η οποία απαιτεί πολύ λιγότερους υπολογισμούς. Η χρήση αυτού του αλγόριθμου είναι πολύ εύκολη για κάποιον που θέλει να υπολογίσει τα fractal χαρακτηριστικά διαφόρων αναπνευστικών σημάτων, σε ένα EXCEL αρχείο. Το ακόλουθο παράδειγμα προέρχεται ελαφρά τροποποιημένο από την αναφορά 7. Το πρώτο αρχείο περιλαμβάνει την κατανομή του αναπνεόμενου όγκου (tidal volume-Vt) με τυχαίες τιμές στη

δεύτερη στήλη, τον μέσο όρο κάθε 2 τιμών στην τρίτη στήλη, το μέσο όρο κάθε 2 τιμών της τρίτης στήλης στην τέταρτη και ούτω καθ' εξής. Στο δεύτερο αρχείο έχουμε υπολογίσει τον μέσο όρο (mean), την τυπική απόκλιση (standard deviation-SD), το % RD (=100\*SD/mean), το νεπέριο λογάριθμο ln(%RD), την χρονική κλίμακα τ που περιγράφει πόσες φορές υπολογίζουμε τους μέσους όρους ανά δύο τιμές ανά στήλη και το νεπέριο λογάριθμο ln(τ), για κάθε στήλη του πρώτου αρχείου. Αν πάρουμε το λογαριθμικό διάγραμμα των τιμών ln(%RD) και ln(τ), έχουμε το διάγραμμα 1, όπου η εφαρμογή της θεωρίας των ελαχίστων τετραγώνων μας δίνει μία γραμμική εξίσωση που υπολογίζει την κλίση της ευθείας, η οποία αναπαριστά τη σχέση ln(%RD) και

**Αρχείο 1**

t	v(t)	t	v(t)
1	10.31	26	35.78
2	19.03	27	35.77
3	34.70	28	64.38
4	19.26	29	10.04
5	65.42	30	19.10
6	34.79	31	18.82
7	19.07	32	35.52
8	35.34	33	35.36
9	34.82	34	19.28
10	18.80	35	19.00
11	18.69	36	10.06
12	10.28	37	35.78
13	19.03	38	18.94
14	10.12	39	66.09
15	5.58	40	34.90
16	10.05	41	64.76
17	35.52	42	34.91
18	19.28	43	35.16
19	35.88	44	18.89
20	64.40	45	64.39
21	66.83	46	35.09
22	35.66	47	66.18
23	121.34	48	121.58
24	64.34	49	122.48
25	19.35	50	229.45

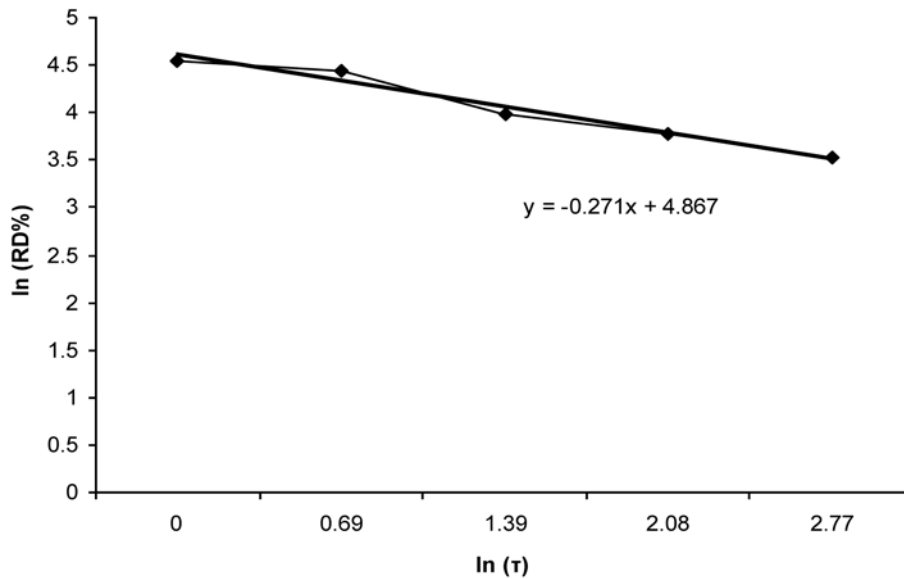
**Αρχείο 2**

mean	41.592	41.5936	35.99417	35.99333	37.32333
SD	39.01875	35.70512	19.43409	15.86818	12.7179
RD%	93.77	85.83	53.98	44.06	34.05
lnRD(%)	4.540845	4.452369	3.988614	3.785552	3.52783
τ	1	2	4	8	16
ln(τ)	0	0.69	1.39	2.08	2.77



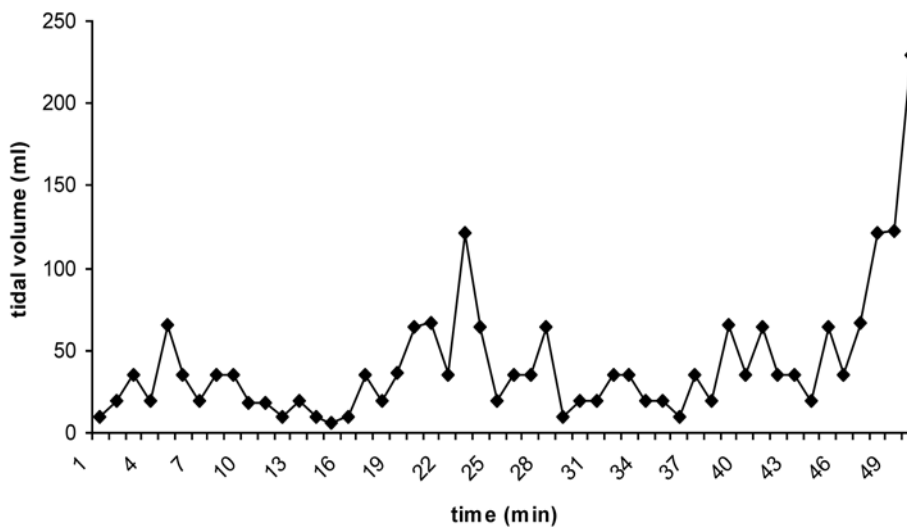
$\ln(\tau)$ . Σε αυτή την περίπτωση, η κλίση είναι  $-0.271$ . Η διάσταση fractal (fractal dimension-FD) του σήματος μπορεί να υπολογιστεί από την σχέση: κλίση =  $1-FD$  ή  $FD = 1 - (-0.271) = 1.271$ . Όταν οι τιμές της FD βρίσκονται μεταξύ 1 και 1.5 η υπό εξέταση διαδικασία ακολουθεί το δυναμικό νόμο και έχει χαρακτηριστι-

κά fractals. Η FD και η κλίση  $\beta$  σχετίζονται μεταξύ τους με την εξίσωση:  $\beta = 3-2*FD$ . Στο διάγραμμα 2, μπορούμε να δούμε το «θόρυβο» που υπάρχει στο σήμα του αναπνεόμενου όγκου, ο οποίος εμφανίζει αυξημένες διακυμάνσεις στο χρόνο.



**Διάγραμμα 1.**

Tidal volume distribution



**Διάγραμμα 2.**

# Fractals and power law in pulmonary medicine. Implications for the clinician

Vasilios E. Papaioannou MD, MSc, PhD<sup>1</sup>,  
Ioannis Pneumatikos MD, PhD, FCCP<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Lecturer in Intensive Care Medicine,  
Democritus University of Thrace,  
Alexandroupolis University Hospital,  
Intensive Care Unit, Greece

<sup>2</sup>Professor of Intensive Care Medicine,  
Democritus University of Thrace,  
Alexandroupolis University Hospital,  
Intensive Care Unit, Greece

## Key words:

- complexity
- power law
- fractal
- fractal dimension
- asthma pathology
- airway opening
- chronic obstructive pulmonary disease

**SUMMARY.** Physiological data often display fluctuations, which have been traditionally considered as noise. However, as Goldberger has emphasized, biological systems are deterministic systems with noise. This noise reflects inherent dynamics and is responsible for the adaptation of the organism to its surroundings. Various techniques derived from statistical physics have already been applied to biological signals, especially in the field of cardiovascular medicine, unravelling potential pathogenetic mechanisms of disease and leading to the construction of more accurate prediction models. Recently, considerable effort has been devoted by several research groups to the assessment of the inherent variability and complexity of the respiratory system, concerning both structure and function. A few clinical studies, mainly involving patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease (COPD), have demonstrated that identification of loss of complexity of respiratory signals can be of significant value in both diagnosis of disease and monitoring of therapy. This review presents results from these studies and describes the basic methods for the assessment of dynamics that govern respiratory physiology in health and disease. *Pneumon 2010, 23(3):250-259.*

*'We the living exist in a complex regimen in the phase transition between order and chaos. We are there because that is the only place we can be both ordered but adaptable, stable but able to evolve...I believe we are on the threshold of a new theory of disease based on the consequences of living in a phase transition'.*

*Peter Macklem 2006*

## Correspondence to:

Vasilios Papaioannou  
Polyviou 6-8, 55132, Thessaloniki, Greece  
Tel: +30 6942 551414  
E-mail: vapapa@med.duth.gr

## INTRODUCTION

Physiological data measured at the bedside often display fluctuations at scales spanning several orders of magnitude. These fluctuations are extremely inhomogeneous and appear irregular and complex, whereas in

the medical literature, they are often regarded as noise and are therefore neglected. They may, however, carry information, for example, about the underlying structure or function of the heart and lungs. Examples include fluctuations in heart rate, respiratory rate, lung volume and blood flow.<sup>1</sup>

The central task of statistical physics is to study macroscopic phenomena that result from continuous microscopic interactions among many different components. Specific physiological systems, such as the cardiovascular and respiratory systems, are good candidates for such an approach, since they include multiple components and are affected by varying neuro-autonomic inputs, continuously over time. Fractal analysis constitutes a subset of such complex methods.

## FRACTALS AND POWER LAW: BASIC CONCEPTS

Fluctuations of a variable can be characterized by its probability density distribution. A way of estimating its characteristics is the construction of a histogram after normalization, so that the area under it will be equal to one. Often, this distribution  $N(x)$  of a variable  $x$  follows the so called power law form:  $N(x) = x^{-d}$  meaning that the relative frequency of a value  $x$  is proportional to  $x$  raised to the power of  $-d$ . If we plot the logarithms of this relationship we have a linear equation:  $\log(N) = -d \cdot \log(x)$ , whereas  $d$  is the negative slope of a straight line fit to  $N$ .<sup>2</sup> This slope is frequently called  $\beta$  slope or exponent.

Power law distribution behaves differently from Gaussian distributions. Its tails are very long (long-tail distribution), representing the relative frequency of occurrence of large events. This means that the probability of large or rare events is much higher than in a Gaussian distribution. Power laws describe dynamics that have a similar pattern of change at different scales and they are called 'scale invariant'. Conversely, Gaussian distributions are characterized by typical values, such as those corresponding to their peaks.<sup>3</sup> The power law describes a time series with many small variations and fewer and fewer large ones, while the pattern of variation is statistically similar regardless of its size. Magnification or shrinkage of the scale of the signal reveals the same relationship, a property that has been called 'self-similarity' and is a fundamental characteristic of fractals.<sup>2,4</sup>

Fractals are self similar objects because small parts of the structure at increasing magnification appear similar to the entire object. Akin to a coastline, fractals represent structures that have no fixed length, since they increase

with increased magnification of measurement. This is why all fractals have noninteger dimensions, the so called fractal dimensions (FDs).<sup>2,5</sup>

The concept of fractals can be applied not only to structures that lack a characteristic length scale, but also to signals that lack a characteristic time scale. In this case, the relationship between the statistical properties of the fluctuations of the signal and the time window of observation follows the power law. The meaning of such behaviour is that future values in a time series are dependent on the past, displaying correlations over time, while the system that produces the signal exhibits a kind of memory.<sup>2-6</sup>

In order to evaluate the power law of a signal it is necessary to compute the so called power spectrum. For this reason, a fast Fourier transformation (FFT) is applied to the signal in order to decompose it into different frequency components that are included within the time series. Every time series can be considered as a sum of sinusoid oscillations with different frequencies. The FFT transforms a signal to a sum of cosine and sine oscillations whose amplitudes determine their contribution to the whole signal. This frequency domain analysis displays the contribution of each sine wave as a function of its frequency, while its square is the power of that frequency in the whole spectrum of the signal. The total power of spectral analysis (the area under the curve of the power spectrum) is equal to the variability within the signal.<sup>4</sup> Increased variability/complexity is a hallmark of health, whereas many large clinical studies in cardiovascular medicine have shown that loss of variability is associated with sudden cardiac death, post-myocardial infarction (MI) heart failure and ventricular fibrillation.<sup>7</sup>

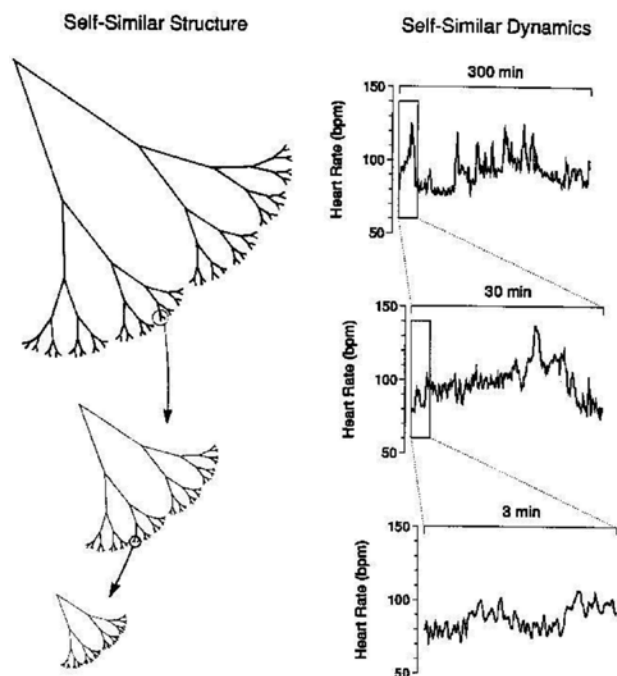
In the case of power law calculation, the plot of the log-log representation of the power spectrum (log power versus log frequency) gives rise to a straight line with a slope of approximately  $-1$ . As the frequency increases the size of variation drops by the same factor (scale invariance).

The values of the  $\beta$  slope/exponent can reflect the inherent dynamics of a system. Values near 1 are supposed to reflect fractal-like behaviour, whereas values lower than 0.5 represent a system without any correlations, lack of memory and finally chaotic-like and unpredictable evolution in time (white noise). Conversely, values of  $\beta$  slope higher than 1 or even near 1.5 characterize strong correlations within the signal and a highly predictable and almost periodic evolution in time (brown noise).<sup>4,5</sup> Ary Goldberger has studied cardiovascular dynamics in

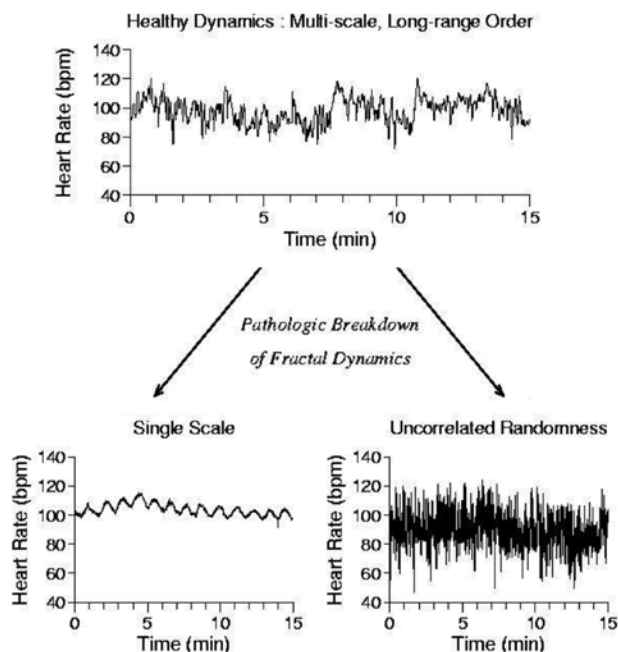
health and disease and found that both unpredictable (random-walk) and periodic behaviours represent loss of physiological function and correlate with lack of fractal properties of heart rate signals in patients with cardiovascular disease.<sup>8</sup> Similar findings have been demonstrated in critically ill patients with severe sepsis and septic shock (Figures 1-3).<sup>4</sup>

## FRACTALS AND POWER LAW IN PULMONARY PHYSIOLOGY

Many organs in different biological systems have a fractal structure. Fractal branching reduces the distances over which materials are transported, providing rapid and efficient delivery of nutrients.<sup>9</sup> The lung offers many examples of self-similarity properties. Weibel and Gomez first measured the morphology of human airways and found an exponential relationship between the diameter



**FIGURE 1.** Left: the schematic of a tree-like fractal has self-similar branchings such that the small scale (magnified) structure resembles the large scale form. Right: a fractal process such as heart or respiratory rate regulation generates fluctuations on different time scales (temporal “magnifications”) that are statistically self-similar. [Adapted from Goldberger AL. Non-linear dynamics for clinicians: chaos theory, fractals, and complexity at the bedside. *Lancet* 1996; 347:1312-1314, free downloaded from the website [physionet \(www.physionet.org\)](http://www.physionet.org)].

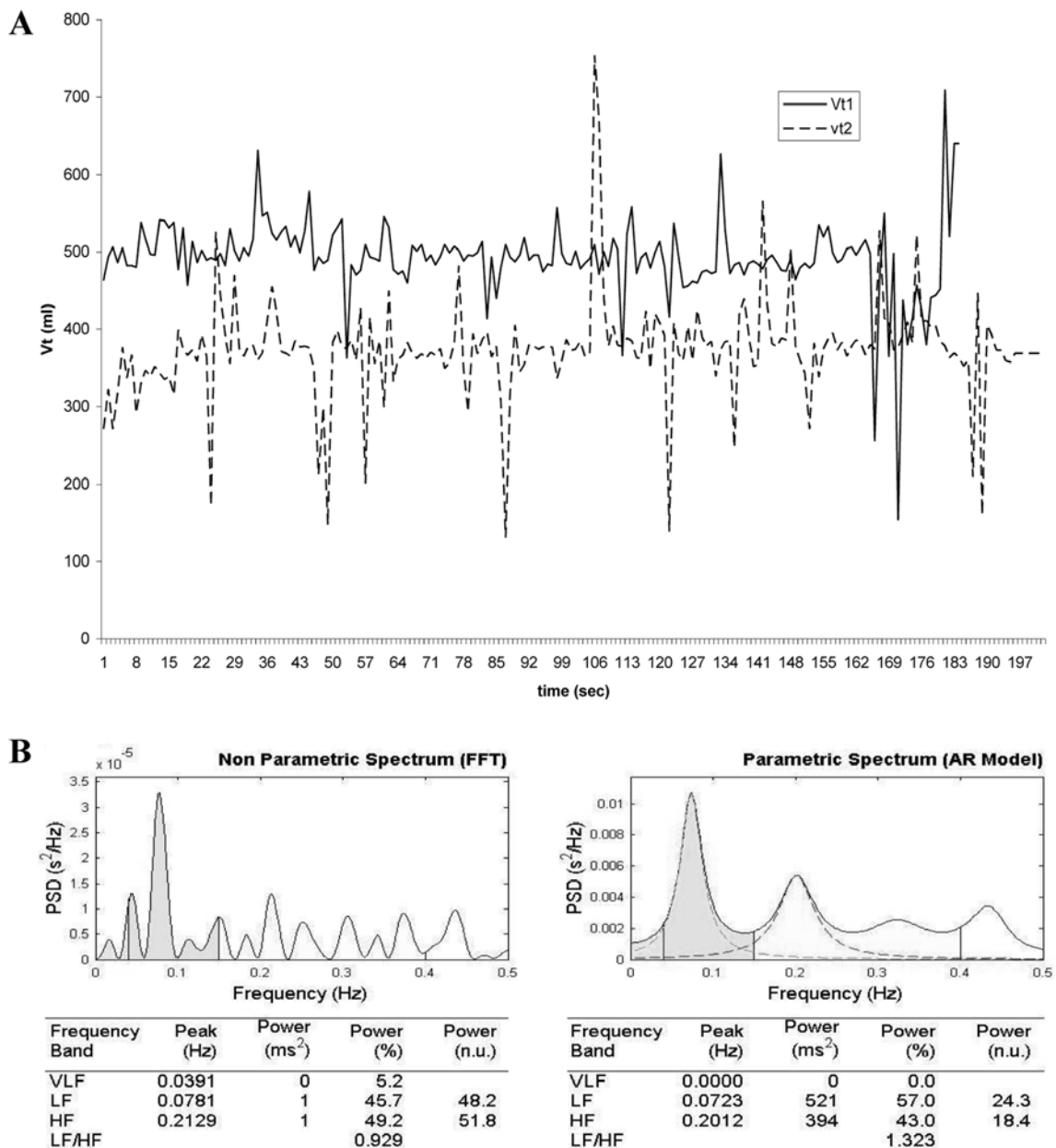


**FIGURE 2.** Fractal complexity of physiological signals (i.e., heart or respiratory rate) can be lost during aging and disease. The pattern of change can be either a totally periodic process (left down panel) or a random process (right down panel: chaotic). [Adapted from Goldberger AL. Non-linear dynamics for clinicians: chaos theory, fractals, and complexity at the bedside. *Lancet* 1996; 347: 1312-1314, free downloaded from the website [physionet \(www.physionet.org\)](http://www.physionet.org)].

and the generation number of the conducting airways.<sup>10</sup> Mandelbrot, who first introduced the term fractals, discovered a unifying scaling pattern of the branching in the lung. A higher fractal dimension corresponds to a more complex branching, whereas a lower fractal reflects a more homogeneous structure.<sup>11</sup> Moreover, regional pulmonary blood flow has been shown by Glenny to exhibit spatial and temporal fractal patterns.<sup>12</sup> The structure of the alveolar surface has also been found to be well described by power laws, reflecting scale invariance.<sup>13</sup> The probability distribution of airway opening during inspiration also behaves according to the power law.<sup>14</sup>

Another property of fractals and power laws in pulmonary physiology is error tolerance during development. In simulations of airway morphogenesis during lung development, West compared a power law branching rule with an exponential decaying one and found that in the first case, the system was less susceptible to errors introduced into the branching process.<sup>15</sup> These properties suggest that living systems are capable of operating





**FIGURE 3.** 3A: Recordings from a patient in the clinic - distribution of tidal volume before (Vt1) and during the performance of a spontaneous breathing trial (Vt2), exhibiting inherent variability. 3B: The FFT of the first signal of 3A (The software (Kubios HRV) displays the different frequency components (LF: low frequency, HF: high frequency and VLF: very low frequency) of the signal.

similarly at different scales, meaning that when environmental conditions change they can adapt more easily to their surroundings.

Aging has been proved by Lipsitz and Goldberger to be significantly associated with loss of complexity of physiological signals, leading to decreased ability to adapt to different physiological insults. Using different algorithms for estimating fractal properties and power

law behaviour, these authors found that the  $\beta$  slope of different signals in elderly was either reduced (decreased to lower than 1) or augmented (increased to higher than 1) compared to younger adults, indicating chaotic or periodic behaviour, respectively.<sup>8</sup> Peng and co-workers showed that aging was associated with a breakdown of fractal dynamics of respiratory signals via a decrease in the  $\beta$  slope towards 0.5 (randomness).<sup>16</sup> Concerning

the early stages of development in humans, one study found that ultrasonographic (US) patterns for assessment lung maturity showed fractal properties with a power law behaviour. In addition, the  $\beta$  slope increased with gestational age from 28 to 38 weeks.<sup>17</sup> Szeto and co-workers, calculated  $\beta$  slopes of different respiratory signals in the human foetus and showed its movement from randomness towards fractal behaviour with increasing gestational age.<sup>18</sup> In conclusion, it appears that there is great variability in complexity according to age in early life, after which complexity decreases with aging.

### FRactal PROPERTIES OF THE LUNG IN DISEASE: DATA FROM CLINICAL AND EXPERIMENTAL STUDIES

Alterations to fractal properties are related to different types of pathology and could have clinical implications for diagnosis and treatment. Physiological time series of such characteristics as heart and respiratory signals show similar alterations in their power law behaviour in different disease states. Mackey and Glass have introduced the term 'dynamic diseases' to describe states with loss of fractal properties of organs and power law dynamics of these signals.<sup>19</sup> For example, loss of heart rate variability (HRV), that is the variability of the R-R in the electro-cardiogram, has been found in patients with heart failure,<sup>20</sup> atrial fibrillation,<sup>21</sup> septic shock and multiple organ dysfunction syndrome (MODS).<sup>22</sup> In respiratory disorders, a classical example is the highly periodic variation in respiratory frequency, seen in Cheyne-Stokes respiration. Penzel has observed loss of fractal properties of heart rate signals during episodes of obstructive sleep apnoea.<sup>23</sup>

Macklem was the first to raise the question of whether airway function can be studied using tools from chaos theory and the paradigm of complex systems.<sup>24</sup> Que and co-workers studied the distribution of forced oscillatory resistance in patients with asthma and demonstrated that lung function exhibits loss of fractal properties during severe asthma.<sup>25</sup> Frey and colleagues applied fractal methods to twice-daily measurements of peak expiratory flow (PEF) in patients with asthmatic and showed a reduced  $\beta$  slope which become more regular with standard long-acting  $\beta$ 2-agonist treatment and more random with short-acting  $\beta$ 2-agonist treatment. They were able to demonstrate that the higher the  $\beta$  exponent when a patient was not on treatment, the larger the improvement of the condition on administration of long-acting

$\beta$ 2-agonist therapy.<sup>26</sup>

Suki and co-workers studied the dynamics of airway opening and crackles, using a simple mathematic model of the periphery of airway tree.<sup>27</sup> Forgacs was the first to propose that crackles are associated with sudden opening of closed airways.<sup>28</sup> Suki found that the time series of crackles emitted during airway opening follows a power law distribution. Additionally, as the crackles propagate up the respiratory tree, the sound amplitude is attenuated at successive bifurcations, while its distribution follows the power law. The same phenomenon has been found for the time intervals of the 'jumps' by which airway resistance decreases upon lung inflation by a constant flow. In a study of Boser and colleagues, the fractal dimension of airways was computed using autopsy material from three groups: fatal asthma, non-fatal asthma and non asthma control subjects. The authors were able to show that the average FD of both the fatal (1.72) and non-fatal asthma groups (1.76) were significantly lower than that of the non asthma control group (1.83,  $p < 0.05$ ), while the lower fractal dimension correlated with decreased overall structural complexity and the pathological severity of disease.<sup>29</sup>

Venegas and colleagues, using positron emission tomography (PET) imaging and computer modeling, showed that in cases of bronchoconstriction and when smooth muscle activation reaches a critical level, localized clusters of poorly ventilated lung regions can develop abruptly in discrete steps.<sup>30</sup> These steps are called *avalanches* and can lead to new stable conditions. Because of the fractal structure of the airways, small initial heterogeneities that are always present, particularly in the diseased lung, can be amplified, leading to sudden patches of poorly ventilated lung regions. Another implication is that since the airways are organized into a fractal network embedded in the elastic parenchyma, the constriction of one airway can propagate and cause an avalanche-like constriction in large parts of the lung. The same holds true for the opposite process, where opening of airways during inhalation takes place in discrete steps.<sup>31,32</sup>

Suki has also demonstrated that airway opening upon inflation occurs in avalanches with power law distribution of both the size and time intervals between them.<sup>27</sup> The significance of these findings is that the probability of a large avalanche occurring is much higher than it would be if the distribution were Gaussian or exponential, so both the magnitude and timing of pressure excursions applied to the airways (i.e., using mechanical ventilation) may be critical in triggering the avalanche process of

alveolar recruitment.<sup>2,32</sup>

In conclusion, these studies in asthma show that when the airways are likely to approach their critical closing threshold pressure, a small stimulus can provoke a catastrophic cascade of airway closure and this is reason why there is such poor correlation between the trigger and the outcome in patients with asthmatics. Moreover, the history of symptom fluctuations appears to be related to the structural changes of the airway tree (power law distribution of airway diameter).<sup>32</sup>

Airway recruitment may affect alveolar recruitment. Sujeer and co-workers found in mathematical models that the recruited volumes upon inflation with constant flow are distributed according to a power law with a  $\beta$  slope equal to 2.<sup>33</sup> Based on these findings it can be supposed that since alveolar recruitment is influenced by airway structure, then the pressure-volume curve may carry information about the airway tree.<sup>2</sup> Whether such models have any value in acute lung injury (ALI) is unclear. In this syndrome, it has been found that the opening pressure distribution does not always appear to have a Gaussian distribution, something that is assumed to be the case in the avalanche model.<sup>34</sup> Further studies are needed to investigate the pattern of recruitment in ALI, particularly in the case of the effect of gravity on ventilation-perfusion mismatch at the alveolar level.<sup>35</sup>

The application of fractal analysis has also shed light on the morphology of the lung in cases of emphysema. Computed tomography (CT) is a sensitive method for assessing lung structure in different forms of pathology. In general, low attenuation area (LAA) clusters are depicted in pixels with density of less than 950 Hounsfield units. These areas incorporate mostly air and are assigned a value of 1, whereas pixels with a density of higher than 950 include tissue with a value 0. Summing the number of pixels in a cluster gives the cluster size. In that way, a binary map of the lung can be constructed and a few studies have shown that in normal conditions, this map is highly heterogeneous.<sup>2</sup> Mishima and colleagues found that the probability distribution of LAA clusters follows a power law for both normal subjects and patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). However, patients exhibited significantly smaller  $\beta$  slopes or exponents, which did not correlate with pulmonary function tests except for the diffusion capacity of the lung. The authors suggested that the neighbouring smaller LAA clusters tend to coalesce and form larger clusters as the weak elastic fibres separating them break under tension.<sup>36</sup> This process does not change the % LAA, but it decreases

the number of small clusters in favour of larger ones, which result in a reduction of the  $\beta$  slope. Another assumption derived from this study is that the likelihood of finding large LAA clusters is much higher in COPD patients than in normal control subjects.<sup>32</sup>

Another possible application of fractals in pulmonary medicine includes the mechanical ventilation of critically ill patients. In an oleic acid injury animal model, Mutch and colleagues introduced fluctuations according to an algorithm, to mechanical ventilation (biological variable tidal volume and respiratory frequency proportional to pre-defined minute ventilation values). Compared with conventional ventilation (with similar minute ventilation), this approach increased respiratory arrhythmia and oxygenation and decreased dead space.<sup>37</sup> According to Suki, when fluctuations in the form of symmetrically distributed random noise are added to peak airway pressures (noisy ventilation), the mean does not change, but isolated values can be augmented, leading to significant alveolar recruitment.<sup>2,38</sup> In a mathematical model, the authors found that the recruited lung can be 200% larger in the case of biological variable ventilation than during conventional ventilation. Moreover, the standard deviation (SD) of the noise can be manipulated in order to achieve better oxygenation (system's output), a phenomenon called 'stochastic resonance', which has already been confirmed in animal models of ALI.<sup>38</sup>

## CONCLUSIONS AND FUTURE SUGGESTIONS

According to Macklem, there is a continuum of thermodynamic systems that do not follow the 2<sup>nd</sup> thermodynamic axiom (increase in entropy), since they exchange energy with their environment (open systems): from near to equilibrium, such as crystals to far from equilibrium systems, such as the weather. 'The amount of energy dissipated determines where the system is situated along the continuum. Between the crystals and weather a sudden phase transition occurs over a small range of energy consumption. It is only there where life can flourish'.<sup>39</sup> From the above statement it is concluded that both a decrease in energy consumption, i.e., during myocardial ischaemia, or an increase, may contribute to a shift away from stable state. It has been shown by Que that during asthma, the local increase in metabolic rate is associated with increased variability of respiratory impedance to flow.<sup>25</sup> Que has proposed the term 'homeokinesis' instead of homeostasis, as a basic property of living systems that 'describes the ability of an organism to utilize external

energy sources to maintain a highly organized internal environment fluctuating within acceptable limits in a far from equilibrium state'.<sup>25</sup>

The study of physiological signals of patients, such as heart and respiratory rate can easily lead to the identification of 'hidden' information concerning inherent dynamics and overall variability within time series. Recognition that physiological time series contain hidden information related to the extraordinary complexity that characterizes physiological systems defies the traditional mechanistic approaches based on conventional biostatistical methodologies, and has fueled growing interest in applying techniques from statistical physics to the study of living organisms. Through these techniques various different 'physio-markers' can be estimated that fulfill the requirements of contemporary medicine for better and more accurate early warning signs, since they are based on high-frequency measurements (sampling rate at least 250 Hz). These efforts have already boosted research on heart rate and blood pressure dynamics through standardization of signal processing techniques, frequency and duration of measurements and signal quality assessment, and has stimulated the development of more accurate diagnostic and prognostic indices in cardiovascular disease. A number of international databases of heart rate signals have been developed with free access by various investigators, such as the Web Site Physionet ([www.physionet.org](http://www.physionet.org)).<sup>40</sup>

We believe that such efforts must also be undertaken by pulmonary physicians and those who treat patients with severe respiratory diseases, such as Intensive Care specialists. In conclusion, we suggest that implementation of fractal analysis in respiratory physiology will result in better understanding of the different dynamic changes that occur during various pathological states, while its impact upon the prediction of severe complications will add value to these methods. Clinicians must start to understand the basic principles of complex systems theory and support an interdisciplinary approach for understanding pulmonary diseases, in order to be in a position to treat their patients more effectively.

## REFERENCES

1. Suki B, Alencar AM. Fluctuations, noise and scaling in the cardio-pulmonary system. *Fluctuations and Noise Letters*. 2003; 3 (1): R1-R25.
2. Suki B. Fluctuations and power laws in pulmonary physiology. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166: 133-137.
3. West BJ, Goldberger AL. Physiology in fractal dimensions. *Am Sci* 1987; 75: 354-365.
4. Seeley A, Macklem P. Complex systems and the technology of variability analysis. *Critical Care* 2004; 8: R367-R384 (doi: 10.1186/cc2948).
5. Goldberger AL. Non-linear dynamics for clinicians: chaos theory. *Fractals and complexity at the bedside*. *Lancet* 1996; 347: 1312-1314.
6. Thamrin C, Stern G, Frey U. Fractals for physicians. *Ped Respir Review* 2010; 11: 123-131.
7. Glenny RW, Robertson HT, Yamashiro S, Bassingthwaite JB. Applications of fractal analysis to physiology. *J Appl Physiol* 1991; 70: 2351-2367.
8. Goldberger AL, Peng CK, Lipsitz LA. What is physiologic complexity and how does it change with aging and disease? *Neurobiology of aging* 2002; 23: 23-26.
9. West GB, Brown JH, Enquist BJ. The fourth dimension of life: fractal geometry and allometric scaling of organisms. *Science* 1999; 284: 1677-1679.
10. Weibel ER, Gomez DM. Architecture of the human lung. Use of quantitative methods establishes fundamental relations between size and number of lung structures. *Science* 1962; 137: 577-585.
11. Mandelbrot BB. *The fractal geometry of nature*. New York: W.H. Freeman; 1977.
12. Glenny RW, Polissar NL, Mckinney S, Robertson HT. Temporal heterogeneity of regional pulmonary perfusion is spatially clustered. *J Appl Physiol* 1995; 79: 986-1001.
13. Rigaut JP. An empirical formulation relating boundary lengths to resolution in specimens showing 'non-ideally fractal' dimensions. *J Microsc* 1984; 133: 41-54.
14. Suki B, Barabasi AL, Hantos Z, Petak F, Stanley HE. Avalanches and power-law behaviour in lung inflation. *Nature* 1994; 368: 615-618.
15. West BJ. Physiology in fractal dimensions: error tolerance. *Ann Biomed Eng* 1990; 18: 135-149.
16. Peng CK, Mietus JE, Liu Y, et al. Quantifying fractal dynamics of human respiration: age and gender effects. *Ann Biomed Eng* 2002; 30: 683-692.
17. Prakash KN, Ramakrishnan AG, Suresh S, Chow TW. Fetal lung maturity analysis using ultrasound image features. *IEEE Trans Inf Technol Biomed* 2002; 6: 38-45.
18. Szeto HH, Cheng PY, Decena JA, Cheng Y, Wu DL, Dwyer G. Fractal properties in fetal breathing dynamics. *Am J Physiol* 1992; 263: 141-147.
19. Mackey MC, Glass L. Oscillation and chaos in physiological control systems. *Science* 1977; 197: 287-289.
20. Peng CK, Havlin S, Stanley HE, Goldberger AL. Quantification of scaling exponents and crossover phenomena in nonstationary heartbeat time series. *Chaos* 1995; 5: 82-87.
21. Goldberger AL, Amaral LAN, Hausdorff JM, Ivanov PC, Peng CK, Stanley HE. Fractal dynamics in physiology: Alterations with disease and aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 2466-2472.
22. Seely AJE, Christou NV. Multiple organ dysfunction syndrome: exploring the paradigm of complex nonlinear systems. *Crit Care Med* 2000; 28: 2193-2200.



23. Penzel T, Kantelhardt JW, Grote L, Peter JH, Bunde A. Comparison of detrended fluctuation analysis and spectral analysis for heart rate variability in sleep and sleep apnea. *IEEE Trans Biomed Eng* 2003; 50: 1143-1151.
24. Macklem PT. Can airway function be predicted? *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153: 19-20.
25. Que CL, Kenyon CM, Olivenstein R, Macklem PT, Maksym GN. Homeokinesis and short-term variability of human airway caliber. *J Appl Physiol* 2001; 91: 1131-1141.
26. Frey U, Brodbeck T, Majumdar A, et al. Risk of severe asthma episodes predicted from fluctuation analysis of airway function. *Nature* 2005; 438: 667-670.
27. Suki B, Barabasi AL, Hantos Z, Petak F, Stanley HE. Avalanches and power law behaviour in lung inflation. *Nature* 1994; 368: 615-618.
28. Forgacs P. Crackles and wheezes. *Lancet* 1967; 2: 203-205.
29. Boser S, Park H, Perry S, Menache M, Green F. Fractal geometry of airway remodelling in human asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172: 817-823.
30. Venegas JG, Schroeder T, Harris S, Winkler RT, Melo MF. The distribution of ventilation during bronchoconstriction is patchy and bimodal: a PET imaging study. *Respir Physiol Neurobiol* 2005; 148: 57-64.
31. Venegas JG, Winkler T, Musch G. Self-organized patchiness in asthma as a prelude to catastrophic shifts. *Nature* 2005; 434: 777-782.
32. Frey U, Suki B. Complexity of chronic asthma and chronic obstructive pulmonary disease: implications for risk assessment, and disease progression and control. *Lancet* 2008; 372: 1088-1099.
33. Sujeer MK, Buldyrev SV, Zapperi S, Andrade JS, Stanley HE, Suki B. Volume distributions of avalanches in lung inflation: a statistical mechanical approach. *Phys Rev E* 1997; 56: 3385-3394.
34. Martynowicz MA, Walters BJ, Hubmayr RD. Mechanisms of recruitment in oleic-acid injured lungs. *J Appl Physiol* 2001; 90: 1744-1753.
35. Gattinoni L, Dandrea L, Pelosi P, Vitale G, Pesenti A, Fumagalli R. Regional effects and mechanism of positive end-expiratory pressure in early adult respiratory distress syndrome. *JAMA* 1993; 269: 2122-2127.
36. Mishima M, Hirai T, Itoh H, et al. Complexity of terminal airspace geometry assessed by lung computed tomography in normal subjects and patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Natl Acad USA* 1999; 96: 8829-8834.
37. Mutch WA, Harms S, Ruth Graham M, Kowalski SE, Girling LG, Lefevre GR. Biologically variable or naturally noisy mechanical ventilation recruits atelectatic lung. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 319-323.
38. Suki B, Alencar AM, Sujeer MK, et al. Life-support system benefits from noise. *Nature* 1998; 393: 127-128.
39. Macklem PT. Emergent phenomena and the secrets of life. *J Appl Physiol* 2008; 104: 1844-1846.
40. Goldberger AL, Amaral LAN, Glass L, et al. PhysioBank, PhysioToolkit, and PhysioNet: Components of a new research resource for complex physiologic signals. *Circulation* 2000; 101: 215-220.

**APPENDIX**

Although there are different methods for the assessment of fractal properties of a signal, Glenny has proposed the use of a method that is called relative dispersion analysis (RD), which needs much less computational load. Using this algorithm it is very easy to perform calculations of fractal properties of different respiratory signals, in an EXCEL file. The following paradigm is modified from reference 7. The first file includes the distribution of the random values of the tidal volume in the second column, the average of every 2 values in the third,

the average of every 2 values of the third column in the fourth, every 2 of the fourth column in the fifth and every 2 of the fifth in the sixth column, respectively. In the second file calculation has been made of the mean, the standard deviation (SD), the RD% ( $= 100 \cdot SD / \text{mean}$ ), its natural logarithm ( $\ln$ ), and the scale of time interval ( $\tau$ ) that describes how many times averaging is performed, and its natural logarithm  $\ln(\tau)$ , for every column of the first file. If the  $\ln(\text{RD} \%)$  is plotted against the  $\ln(\tau)$ , this gives diagram 1, while the application of a least square linear fit of data gives an equation that calculates the slope of the line. In

**File 1**

t	v(t)				t	v(t)			
1	10.31				26	35.78	27.57		
2	19.03	14.67			27	35.77			
3	34.70				28	64.38	50.08	38.82	
4	19.26	26.98	20.83		29	10.04			
5	65.42				30	19.10	14.57		
6	34.79	50.11			31	18.82			
7	19.07				32	35.52	27.17	20.87	29.85
8	35.34	27.21	38.66	29.74	33	35.36			
9	34.82				34	19.28	27.32		
10	18.80	26.81			35	19.00			
11	18.69				36	10.06	14.53	20.93	
12	10.28	14.49	20.65		37	35.78			
13	19.03				38	18.94	27.36		
14	10.12	14.58			39	66.09			
15	5.58				40	34.90	50.5	38.93	29.93
16	10.05	7.83	11.2	15.92	41	64.76			
17	35.52				42	34.91	49.84		
18	19.28	27.4			43	35.16			
19	35.88				44	18.89	27.03	38.43	
20	64.40	50.14	38.77		45	64.39			
21	66.83				46	35.09	49.74		
22	35.66	51.22			47	66.18			
23	121.34				48	121.58	93.88	71.81	55.12
24	64.34	92.84	72.03	55.4	49	122.48			
25	19.35				50	229.45	175.97		

**File 2**

mean	41.592	41.5936	35.99417	35.99333	37.32333
SD	39.01875	35.70512	19.43409	15.86818	12.7179
RD%	93.77	85.83	53.98	44.06	34.05
$\ln(\text{RD}(\%))$	4.540845	4.452369	3.988614	3.785552	3.52783
$\tau$	1	2	4	8	16
$\ln(\tau)$	0	0.69	1.39	2.08	2.77

this case, the slope is -0.271. The fractal dimension (FD) of the signal can be calculated as: slope = 1-FD or FD = 1- (-0.271) = 1.271. When FD values range between 1 and 1.5, the studied process is considered to have fractal-like properties. The FD and

the  $\beta$  slope are related between each other with the equation:  $\beta = 3-2*FD$ . In diagram 2, the 'noise' that exists in the signal of tidal volume can be seen, which displays increased fluctuations over time.

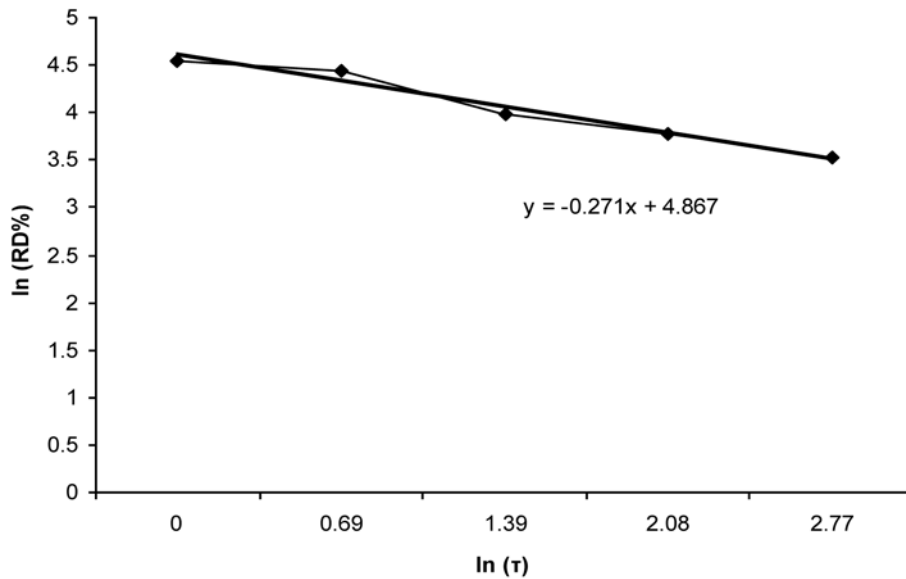


Diagram 1.

Tidal volume distribution

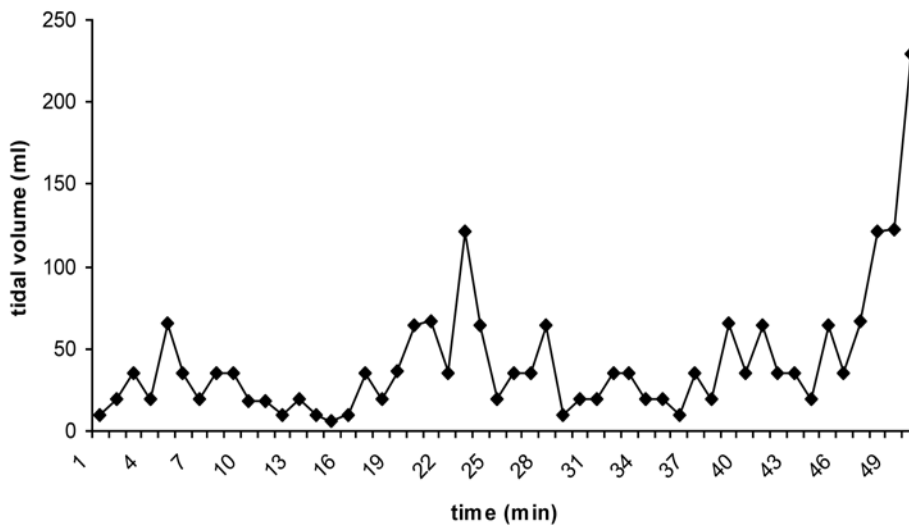


Diagram 2.

# Σοβαρό άσθμα: Ορισμοί, παράγοντες κινδύνου και φαινότυποι

Πέννυ Μωραϊτάκη,  
Δέσποινα Παπαμιχαήλ,  
Νίκη Γεωργάτου

5<sup>η</sup> Πνευμονολογική Κλινική, Νοσοκομείο  
Νοσημάτων Θώρακα «Σωτηρία», Αθήνα

#### Λέξεις- Κλειδιά:

- άσθμα
- φαινότυποι
- σοβαρό άσθμα

**ΠΕΡΙΛΗΨΗ.** Η σωστή διάγνωση του άσθματος γίνεται συνήθως εύκολα και οι περισσότεροι ασθενείς ανταποκρίνονται στη θεραπευτική αγωγή. Όμως, περίπου το 5-10% των ασθενών παρουσιάζει δυσκολία στον έλεγχο της νόσου παρά τη χορήγηση εισπνεόμενης αγωγής σε μέγιστη δόση. Φαίνεται ότι το άσθμα είναι μια ετερογενής διαταραχή, που εκδηλώνεται όχι ως μια ενιαία νοσολογική οντότητα, αλλά μάλλον ως ένα σύμπλεγμα πολλαπλών διακριτών φαινοτύπων, οι οποίοι αλληλεπικαλύπτονται. Παρά το γεγονός ότι διάφοροι ασθματικοί φαινότυποι έχουν αναγνωριστεί προ πολλού, εν τούτοις δεν έχουν μελετηθεί επαρκώς. Η βελτίωση των γνώσεών μας τόσο για τον χαρακτήρα όσο και για την υποκείμενη παθοβιολογία του κάθε φαινότυπου, είναι απαραίτητη για τη σύνδεση συγκεκριμένων φαινοτύπων με την εκδήλωση κλινικών συμπτωμάτων της νόσου. Αποτελεί επίσης απαραίτητη προϋπόθεση για πιθανή ανάπτυξη βιολογικών δεικτών της νόσου, όσο και για τη μελλοντική σχεδίαση και εφαρμογή νέων θεραπειών κατά του άσθματος με εξειδικευμένη φαινοτυπική στόχευση. Η παρούσα ανασκόπηση παρουσιάζει τους μέχρι σήμερα καλύτερα μελετημένους ασθματικούς φαινότυπους και αναλύει μερικές από τις μεθόδους που έχουν χρησιμοποιηθεί για τον καθορισμό τους. *Πνεύμων 2010, 23(3):260-275.*

#### ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το άσθμα είναι μια χρόνια φλεγμονώδης νόσος των αεραγωγών, που χαρακτηρίζεται από υποτροπιάζοντα επεισόδια συμπτωματικής απόφραξης της ροής αέρα και από διάφορου βαθμού υπεραντιδραστικότητα των αεροφόρων οδών σε μη ειδικά ερεθίσματα. Η αναγνώριση ότι αυτή η νόσος εμπεριέχει το στοιχείο της χρόνιας φλεγμονής, έχει οδηγήσει τις θεραπευτικές της προσεγγίσεις προς την πρώιμη χρήση εισπνεόμενων κορτικοειδών, τα οποία προκαλούν σημαντική μείωση των φλεγμονωδών παραγόντων, ενώ βελτιώνουν αισθητά την πνευμονική λειτουργία. Εν τούτοις, υπάρχει ένα ποσοστό ασθενών (5 - 10%) με σοβαρή ή ανθεκτική μορφή άσθματος<sup>1</sup>, που δεν ανταποκρίνεται στα γλυκοκορτικοειδή. Αυτοί οι

#### Αλληλογραφία:

Πέννυ Μωραϊτάκη, ειδικ. Πνευμονολογίας  
5η Πνευμονολογική Κλινική,  
Νοσοκομείο Νοσημάτων Θώρακα «Σωτηρία»,  
Μεσογείων 152, Αθήνα  
e-mail: pmoraitaki@gmail.com



ασθενείς ευθύνονται για το 40% με 50% του κόστους του άσθματος, στην οικονομία της υγείας, ενώ παρουσιάζουν πολύ μεγαλύτερα ποσοστά νοσηρότητας και σημαντική μείωση του επιπέδου ποιότητας της ζωής τους<sup>2,3</sup>.

Ως φαινότυπος ορίζεται «το σύνολο των εμφανών χαρακτηριστικών ενός οργανισμού, που προκύπτουν από την αλληλεπίδραση μεταξύ της γενετικής του σύστασης και του περιβάλλοντος». Το άσθμα φαίνεται να αποτελεί περισσότερο μια συλλογή διαφόρων φαινοτύπων παρά μια απλή νόσο. Αυτοί οι φαινότυποι μπορούν σε γενικές γραμμές να κατηγοριοποιηθούν ως «άσθμα» επειδή πληρούν τα απλά κριτήρια που υπάρχουν για την κλινική διάγνωση αυτής της νόσου. Πολλές μελέτες πλέον δείχνουν ότι η αναγνώριση του φαινοτύπου ενός ασθματικού ασθενούς μπορεί να βοηθήσει στη διαχείριση και τη θεραπεία του. Η καλύτερη κατανόηση ενός φαινοτύπου φαίνεται ότι σχετίζεται με τη βελτίωση των γνώσεων μας πάνω στους γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες που εμπλέκονται στη παθογένεια σύνθετων νοσημάτων, όπως το άσθμα. Στόχος της παρούσας ανασκόπησης είναι να προσδιορίσει νέα σημεία στο άσθμα, μέσω καθορισμού των φαινοτύπων, έτσι ώστε να δοθεί η δυνατότητα πιο στοχευμένης ανοσολογικής και φαρμακολογικής παρέμβασης στη θεραπεία του άσθματος.

## ΟΡΙΣΜΟΙ ΣΟΒΑΡΟΥ ΑΣΘΜΑΤΟΣ

Το σοβαρό άσθμα αντιστοιχεί σε ένα μικρό αλλά κλινικά σημαντικό ποσοστό των ασθματικών ασθενών, ενώ επιβαρύνει ιδιαίτερα και τα οικονομικά μεγέθη της νόσου. Οι ασθενείς με σοβαρό άσθμα βιώνουν σχεδόν καθημερινά συμπτώματα, που περιορίζουν σημαντικά τις καθημερινές τους δραστηριότητες, και έχουν συχνές παροξύνσεις και εισαγωγές σε νοσοκομεία. Επιπρόσθετα, σε αυτούς προσμετράται περισσότερο από το 50% του κόστους καθώς και το μεγαλύτερο ποσοστό θνητότητας της ασθματικής νόσου<sup>4,5</sup>. Σύμφωνα με τον ορισμό που έδωσε η GINA (Global Initiative for Asthma), ασθενείς που έχουν καθημερινά συμπτώματα, συχνές παροξύνσεις, συχνά νυχτερινά συμπτώματα, περιορισμό της φυσικής δραστηριότητας,  $FEV_1$  ή  $PEF \leq 60\%$  της προβλεπόμενης και διακύμανση των  $FEV_1$  ή  $PEF \geq 30\%$  πριν την έναρξη της θεραπείας, θα πρέπει να κατατάσσονται στους ασθενείς με σοβαρό εμμένον άσθμα<sup>4,5</sup>. Ο ορισμός αυτός της GINA για το σοβαρό άσθμα δεν είναι ιδιαίτερα ακριβής όταν πρόκειται για ερευνητικές μελέτες, καθιστώντας έτσι αυτές τις οδηγίες μη χρήσιμες. Κατά συνέπεια, ερευνητές ανέπτυξαν και καθόρισαν αυστηρά κριτήρια και ορισμούς για το σοβαρό άσθμα, με σκοπό να μπορούν να χρησιμο-

ποιηθούν σε ερευνητικές εργασίες με κοινή αποδοχή, με αξιοπιστία, εγκυρότητα και στατιστική δύναμη. Οι ορισμοί που έχουν δημοσιευτεί πρόσφατα σχετικά με το σοβαρό άσθμα είναι αρκετοί<sup>6</sup>.

Η ATS (American Thoracic Society), το 2000 παρουσίασε τις θέσεις ομοφωνίας ως προς τον ορισμό του σοβαρού άσθματος (Πίνακας 1)<sup>7,8</sup>. Ο ορισμός αυτός δεν είναι τέλειος αλλά ήταν και παραμένει εξαιρετικά σημαντικός και χρήσιμος. Σύμφωνα με τα κριτήρια της ATS, περίπου 10% των ασθματικών ασθενών μπορεί να πάσχει από σοβαρό άσθμα

Μια άλλη μελέτη, η TENOR<sup>9</sup> ασχολήθηκε με την ανάπτυξη ορισμού για το σοβαρό άσθμα. Στη μελέτη αυτή συμπεριελήφθησαν ασθενείς με σοβαρό ή δύσκολο στη θεραπεία άσθμα σύμφωνα με τη διάγνωση του θεράποντος ιατρού τους. Στη μελέτη μπορούσαν να λάβουν μέρος ακόμα και ασθενείς που είχαν ήπιο ή μέτριας βαρύτητας άσθμα, αν ο γιατρός τους θεωρούσε την πάθηση δύσκολη στη θεραπεία και εφόσον επληρούντο τα υπόλοιπα κριτήρια που έθετε η μελέτη τα οποία περιελάμβαναν την αντιμετώπιση για τουλάχιστον 1 χρόνο, επισκέψεις στις υπηρεσίες υγείας για το άσθμα τους εκτάκτως ή ανάγκη από του στόματος 2 ή περισσότερων κύκλων στεροειδών

**ΠΙΝΑΚΑΣ 1.** Ορισμός σοβαρού/ανθεκτικού άσθματος σύμφωνα με την ATS

### Μείζονα κριτήρια

- Συνεχής ή σχεδόν συνεχής ( $\geq 50\%$  του έτους) θεραπεία με κορτικοειδή από το στόμα
- Ανάγκη για θεραπεία με υψηλές δόσεις εισπνεόμενων κορτικοειδών

### Ελάσσονα κριτήρια

- Ανάγκη επιπρόσθετης καθημερινής αγωγής για τον έλεγχο των συμπτωμάτων
- Συμπτώματα άσθματος που απαιτούν βραχείας δράσης β-αγωνιστές καθημερινά ή σχεδόν καθημερινά
- Εμμένουσα απόφραξη αεραγωγών ( $FEV_1 < 80\%$ , καθημερινή διακύμανση  $PEF > 20\%$ )
- Μια ή περισσότερες επείγουσες επισκέψεις στο νοσοκομείο ανά έτος
- Ανάγκη για χορήγηση στεροειδών από το στόμα τρεις ή περισσότερες φορές ανά έτος
- Άμεση επιδείνωση με  $\leq 25\%$  μείωση της δόσης των εισπνεόμενων ή από του στόματος κορτικοστεροειδών
- Τουλάχιστον ένα άμεσα απειλητικό για τη ζωή επεισόδιο άσθματος στο παρελθόν

Για τη διάγνωση σοβαρού άσθματος απαιτούνται το ένα ή και τα δύο μείζονα κριτήρια και τουλάχιστον δύο ελάσσονα κριτήρια.

το χρόνο για τον έλεγχο ασθματικού παροξυσμού ή χρήση 3 ή περισσότερων ειδών αντιασθματικής αγωγής, υψηλές δόσεις κορτικοειδών ή από του στόματος πρεδνιζολόνη >5mg/ημέρα για τον καθημερινό έλεγχο του άσθματος τους. Φαίνεται ότι αυτή η προσέγγιση είναι πιο κοντά στη κλινική πρακτική, αλλά αυτός ο ορισμός που προσπαθεί να δημιουργήσει η μελέτη TENOR έχει το μειονέκτημα της μεταβλητότητας και της ανακολουθίας κατά την εφαρμογή του. Παρά τους περιορισμούς αυτούς, η μελέτη αυτή έδειξε ότι μεταξύ των ασθματικών ασθενών η χρήση υπηρεσιών υγείας ήταν ιδιαίτερα υψηλή στους ασθενείς με σοβαρό άσθμα. Έτσι, η μελέτη κατέληξε ότι η προσθήκη της παραμέτρου που αφορά στη χρήση υπηρεσιών υγείας θα αυξήσει περαιτέρω την κατανόηση της δραστηριότητας της πάθησης.

Στη μελέτη ENFUMOSA<sup>10</sup>, ο ορισμός του σοβαρού άσθματος βασίστηκε στα εξής: τη θεραπεία με υψηλές δόσεις κορτικοστεροειδών και την παρουσία μιας ή περισσότερων παροξύνσεων τον τελευταίο χρόνο. Σε αυτό τον ορισμό δεν εμπεριέχονται ούτε οι συμπληρωματικές θεραπείες, ούτε η παθολογική πνευμονική λειτουργία, ούτε και τα καθημερινώς απαραίτητα μέτρα που λαμβάνονται για τον έλεγχο του άσθματος. Συνεπώς, οι πληθυσμοί των ασθενών με σοβαρό άσθμα, που συμμετείχαν στις μελέτες ENFUMOSA και TENOR, παρά το γεγονός ότι ήταν παρόμοιοι σχετικά με τις ανάγκες σε κορτικοειδή, εν τούτοις ήταν εντελώς διαφορετικοί όσον αφορά στις υπόλοιπες παραμέτρους που χρησιμοποιήθηκαν για την είσοδο των ασθενών σε κάθε μελέτη.

Φαίνεται λοιπόν επί του παρόντος, ότι ο δρόμος προς τη διάγνωση του «σοβαρού άσθματος» ή του «σοβαρού ανθεκτικού στη θεραπεία άσθματος» είναι αρκετά δύσβατος. Μέχρι στιγμής δεν υπάρχει κάποια μεμονωμένη μέτρηση ή μεταβλητή, που από μόνη της να θέτει με ακρίβεια τη διάγνωση του σοβαρού άσθματος. Ακόμη και δύο ή τρεις μεταβλητές μαζί αποτυγχάνουν να διαφοροποιήσουν το μέτριο από το σοβαρό άσθμα. Ο πιο πρόσφατος ορισμός δόθηκε πριν 2 χρόνια και αναφέρει ότι: *“το σοβαρό άσθμα διαγιγνώσκεται σε ασθενείς με ανθεκτικό άσθμα, το οποίο παραμένει δύσκολο να ελεγχθεί παρά το λεπτομερή και ενδελεχή επανέλεγχο της διάγνωσης και οπωσδήποτε μετά από περισσότερο από 6 μήνες στενή παρακολούθηση του ασθενούς από εξειδικευμένο στο άσθμα πνευμονολόγο»*<sup>11</sup>.

Πρόσφατα, οι κατευθυντήριες οδηγίες άρχισαν να απομακρύνονται από τη φιλοσοφία της σοβαρότητας του άσθματος και να επικεντρώνονται στη παρακολούθηση και τη θεραπεία της νόσου μέσω «επιπέδων ελέγχου». Ο έλεγχος αντιπροσωπεύει το βαθμό στον οποίο οι κλινικές

εκδηλώσεις του άσθματος έχουν εξαλειφθεί ή μειωθεί με τη θεραπεία. Αντίθετα, η σοβαρότητα του άσθματος προσδιορίζεται από το πόσο ισχυρή πρέπει να είναι η θεραπευτική αγωγή έτσι ώστε να επιτευχθεί καλός έλεγχος του άσθματος και επομένως, η σοβαρότητα αξιολογείται μόνο κατά τη διάρκεια της θεραπείας<sup>5</sup>.

## ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΣΤΟ ΣΟΒΑΡΟ ΑΣΘΜΑ

Διάφορες επιδημιολογικές μελέτες έχουν εξετάσει τη σχέση μεταξύ πιθανών παραγόντων κινδύνου και ανάπτυξης σοβαρού άσθματος. Η ομάδα του Leiden (A. ten Brinke et al)<sup>12</sup> διεξήγαγε μια μελέτη, στην οποία 13 κλινικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες, δυνητικά συσχετιζόμενοι με υποτροπιάζουσες παροξύνσεις άσθματος, μελετήθηκαν επισταμένως σε 136 ασθενείς με σοβαρό άσθμα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι συχνές παροξύνσεις στο σοβαρό άσθμα σχετίζονται έντονα με ψυχολογικές διαταραχές (OR 10.8), με υποτροπιάζουσες λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος (OR 6.9), με γαστροοισοφαγική παλινδρόμηση (OR 4.9), με σοβαρές παραρρινοκολπίτιδες (OR 3.7) και με αποφρακτική άπνοια στον ύπνο (OR 3.4). Επιπρόσθετα, οι συγγραφείς ανακάλυψαν ότι οι ατοπικοί ασθενείς, και ιδιαίτερα εκείνοι με αύξηση της ειδικής IgE στα ακάρεα της οικιακής σκόνης ή τις κατσαρίδες, είχαν δέκα φορές μεγαλύτερη πιθανότητα ανάπτυξης συχνών παροξύνσεων συγκρινόμενοι με τους μη ατοπικούς ασθενείς. Η ταυτοποίηση και η θεραπεία αυτών των ειδικών παραγόντων είναι δυνατόν να έχουν ως αποτέλεσμα τη μείωση του ρυθμού των εξάρσεων, τη βελτίωση της ποιότητας της ζωής των ασθενών και το βελτιωμένο έλεγχο του άσθματος.

Η μελέτη ENFUMOSA έδειξε ότι το γυναικείο φύλο, η παχυσαρκία και η έλλειψη ατοπίας συσχετίζονταν με περισσότερο σοβαρό άσθμα, ενώ δεν εντοπίστηκε κανένας παράγων κινδύνου από την παιδική ηλικία<sup>10,13</sup>. Τελευταία δεδομένα από τη μελέτη TENOR έδειξαν ότι παράγοντες που συνδέονται με αυξημένο κίνδυνο εξάρσεων και εισαγωγών στο νοσοκομείο ήταν η νεαρή ηλικία, το γυναικείο φύλο, οι έγχρωμες φυλές, δείκτης μάζας σώματος (BMI)  $\geq 35$  kg/m<sup>2</sup>, FEV1 μετά βρογχοδιαστολή  $\leq 70\%$  της αναμενόμενης τιμής, το ιστορικό πνευμονίας, σακχαρώδους διαβήτη, διασωλήνωσης για άσθμα και 3 ή/και περισσότερων κύκλων κορτικοειδών εντός των τελευταίων 3 μηνών<sup>14</sup>. Το τελικό αποτέλεσμα μετά από τη στατιστική ανάλυση (logistic regression model) των δεδομένων αυτής της ομάδας ήταν ένας δείκτης μεταξύ 0-18 που θεωρήθηκε ιδιαίτερα προγνωστικός για εισαγωγή στο νοσοκομείο ή για επείγουσες επισκέψεις. Δείκτης 0-4

αντιπροσώπευε χαμηλό κίνδυνο, 5-7 μέτριο και  $\geq 8$  υψηλό κίνδυνο<sup>15</sup> (Πίνακας 2).

Αντίθετα με τα αποτελέσματα της ENFUMOSA, η μελέτη TENOR έδειξε αυξημένη συχνότητα θετικών δερματικών δοκιμασιών<sup>16</sup> ενώ, υψηλά επίπεδα IgE ήταν ενδεικτικά αυξημένης βαρύτητας άσθματος ανάμεσα στους νεότερους ασθενείς<sup>17</sup>. Στα παιδιά και στους εφήβους το αυξημένο σωματικό βάρος συσχετιζόταν με αυξημένη βαρύτητα άσθματος στις νέες γυναίκες<sup>18</sup>.

Βαθμολογία TENOR μεταξύ 5-7 αυξάνει την πιθανότητα επείγουσας εισαγωγής σε νοσοκομείο κατά 3,5 φορές σε σχέση με τους ασθενείς με χαμηλή βαθμολογία (0-4 βαθμούς). Μεγαλύτερη βαθμολογία (>8) αντιστοιχεί σε αύξηση του κινδύνου κατά 12 φορές.<sup>14</sup>

### ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΦΑΙΝΟΤΥΠΩΝ

Υπάρχουν αρκετές ταξινομήσεις του άσθματος που βασίζονται στην αιτία (αλλεργικό, μη αλλεργικό, επαγγελματικό) ή στον τύπο της φλεγμονής (ηωσινοφιλικό, μη ηωσινοφιλικό) ή ακόμα στη σοβαρότητα του άσθματος αλλά και σε λειτουργικές παραμέτρους (τύπου I ασταθές, τύπου II ασταθές).<sup>19</sup>

Το αλλεργικό και το μη αλλεργικό άσθμα είναι πιθανότατα οι πλέον γνωστοί και περισσότερο αναφερόμενοι φαινότυποι του άσθματος, παρόλα αυτά ο καθορισμός και άλλων φαινοτύπων άσθματος θεωρήθηκε πρόσφατα αναγκαίος για τον καλύτερο έλεγχο της νόσου. Οι φαινότυποι του άσθματος, οι οποίοι σχετίζονται με την ηλικία έναρξης της νόσου, τον τύπο της φλεγμονής, το βαθμό της σοβαρότητας της νόσου και πολλά άλλα κλινικά χαρακτηριστικά έχουν ήδη αναγνωριστεί και χρησιμοποιούνται στην κλινική πράξη. Ωστόσο τα κλινικά της χαρακτηριστικά δεν είναι πλήρως γνωστά και η υποκείμενη παθοφυσιολογία τους δεν έχει πλήρως αναλυθεί.

Υπάρχουν στη βιβλιογραφία πολλές πρωτότυπες μελέτες ή ανασκοπήσεις των τελευταίων ετών<sup>6,10,20-22</sup> οι οποίες καθορίζουν και αναλύουν τις κατηγορίες των ασθματικών φαινοτύπων. Μια ανασκόπηση της S. Wenzel προτείνει ταξινόμηση<sup>6,10,18-20</sup> των φαινοτύπων σε τρεις κατηγορίες: στους φαινοτύπους που προσδιορίζονται κλινικά ή με παραμέτρους πνευμονικής λειτουργίας, στους φαινοτύπους που σχετίζονται με περιβαλλοντικούς παράγοντες και στους φαινοτύπους που ορίζονται από την παθοφυσιολογία της. Η κατηγοριοποίηση αυτή σε κάθε περίπτωση δεν αποκλείει την ενεργό επικάλυψη η οποία υπάρχει μεταξύ των κατηγοριών αυτών. Αντιθέτως η επικάλυψη αυτή υπάρχει σε μεγάλο βαθμό και φαίνεται

**ΠΙΝΑΚΑΣ 2.** Βαθμολογία κινδύνου για την παρόξυνση σοβαρού άσθματος (TENOR).

Σύνολο βαθμών	Παράμετροι
<b>3</b>	<b>Ηλικία (έτη)</b>
0:	$\geq 60$
1:	50-59
2:	35-49
3:	18-34
<b>1</b>	<b>Φύλο</b>
0:	Άρρεν
1:	Θήλυ
<b>2</b>	<b>Φυλή/Εθνικότητα</b>
0:	Λευκή
2:	Μη λευκή
<b>1</b>	<b>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</b>
0:	<35
1:	>35
<b>2</b>	<b>Πνευμονική λειτουργία</b>
0:	Post % pred FVC >70
2:	Post % pred FVC <70
<b>1</b>	<b>Ιστορικό πνευμονίας</b>
0:	Χωρίς ιστορικό
1:	Με ιστορικό
<b>1</b>	<b>Ύπαρξη Σακχαρώδους Διαβήτη</b>
0:	Όχι
1:	Ναι
<b>1</b>	<b>Ύπαρξη καταρράκτη</b>
0:	Όχι
1:	Ναι
<b>1</b>	<b>Ιστορικό διασωλήνωσης</b>
0:	Όχι
1:	Ναι
<b>3</b>	<b>Χορήγηση στεροειδών τους τελευταίους 3 μήνες (φορές)</b>
0:	0
1:	1
2:	2
3:	>3
<b>1</b>	<b>Χρήση νεφελοποίησης με βρωμιούχο ιπρατρόπιο</b>
0:	Όχι
1:	Ναι
<b>1</b>	<b>Συστηματική χορήγηση κορτικοστεροειδών</b>
0:	Μειούμενη δόση
1:	Σταθερή δόση
<b>18</b>	<b>Συνολική Βαθμολογία</b>

BMI: body mass index; FVC: forced vital capacity.

στην κλινική εικόνα των ασθματικών ασθενών. Ο στόχος αυτής της εργασίας είναι να περιγράψει μερικά από τα

βασικά χαρακτηριστικά των φαινοτύπων του σοβαρού άσματος.

## ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ ΣΟΒΑΡΟΥ ΑΣΘΜΑΤΟΣ

Ορισμένες δημοσιεύσεις προτείνουν ότι ορισμοί φαινοτύπων άσματος οι οποίοι βασίζονται στις λειτουργικές δοκιμασίες των πνευμόνων, στα συμπτώματα και στη χρήση της φαρμακευτικής αγωγής, δεν είναι επαρκείς για να προβλέψουν την πορεία της νόσου, τον έλεγχο της ή την ανταπόκριση στη θεραπεία.<sup>24,25</sup> Η θεραπεία μπορεί να μειώσει τα συμπτώματα της νόσου σε ικανοποιητικό βαθμό. Ο όρος "σοβαρό/ανθεκτικό άσμα" χρησιμοποιείται στις περιπτώσεις που μια σωστή φαρμακευτική αγωγή δεν καταφέρνει να ελέγξει επαρκώς τα συμπτώματα του ασθενούς, μη επιτυγχάνοντας τον έλεγχο της ασθματικής νόσου. Η σοβαρότητα της νόσου θα πρέπει να αξιολογείται πάντα, τουλάχιστον 6 μήνες μετά από επαρκή θεραπεία, και οπωσδήποτε μετά τη θεραπεία πιθανών συνοδών νοσημάτων (ρινίτιδα, γαστροοισοφαγική παλινδρόμηση, ψυχοπαθολογία) και ασφαλώς μετά την απομάκρυνση παραγόντων που σχετίζονται με την πρόκληση κρίσεων άσματος (αλλεργικοί ή επαγγελματικοί παράγοντες)<sup>26</sup>. Η κακή συμμόρφωση στη θεραπεία αποτελεί επίσης έναν σημαντικό παράγοντα σε ασθενείς με ανθεκτικό άσμα, και θα πρέπει να λαμβάνεται σοβαρά υπόψη πριν το άσμα του ασθενούς χαρακτηριστεί "σοβαρό".

Η σοβαρότητα του άσματος μπορεί να επηρεαστεί από υποκείμενη νόσο του ασθενούς, καθώς και από τον ιδιαίτερο ασθματικό του φαινότυπο, παράγοντες που μπορούν να περιγραφούν περαιτέρω με τη χρήση παθολογικών και λειτουργικών δεικτών. Οι δείκτες αυτοί μπορούν να χρησιμοποιηθούν επίσης ως συμπληρωματικά δεδομένα για την πρόβλεψη μελλοντικών κρίσεων άσματος. Διάφοροι βιολογικοί δείκτες, όπως ο TGFβ, ο TNFα, η IL 11, και η IL 8 έχουν προταθεί για τη διάκριση του ήπιου από το σοβαρό άσμα. Όμως, πολλαπλές μελέτες απέτυχαν να αποδείξουν αυτή τους τη χρησιμότητα.<sup>27-32</sup> Αποτελέσματα από πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα ασθενών με άσμα μπορεί να ανιχνευθούν ποικίλοι και διαφορετικοί πληθυσμοί κυταροκινών, οι οποίοι μπορεί να προσφέρουν επιπλέον πληροφορίες έτσι ώστε να ταξινομηθεί ένας ασθματικός φαινότυπος αντικειμενικότερα. Παρόλα αυτά, τα ευρήματα αυτών των μελετών δε μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην παρούσα φάση στην ταξινόμηση των ασθματικών ασθενών και χρειάζονται περαιτέρω μελέτη. Παραμένει όμως σημαντικό το γεγονός ότι νέες διαγνωστικές και προγνωστικές πληροφορίες μπορούν να συγκεντρωθούν

από τις αναπνευστικές εκκρίσεις, παίζοντας πρωταγωνιστικό ρόλο στη μελλοντική ανάπτυξη της επιστήμης των βιολογικών δεικτών στην κλινική πράξη.

## ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ ΑΣΘΜΑΤΟΣ ΜΕ ΣΥΧΝΕΣ ΠΑΡΟΞΥΝΣΕΙΣ

Σχεδόν όλοι οι ασθενείς με άσμα παρουσιάζουν τουλάχιστον μία ήπια προς σοβαρή παρόξυνση, ενώ υπάρχουν και ασθενείς που εμφανίζουν συχνές, αρκετά σοβαρές παροξύνσεις. Αυτός ο ασθματικός φαινότυπος, που σχετίζεται με συχνές παροξύνσεις, υπολογίζεται στο 40% των ασθενών με σοβαρή νόσο όπως προκύπτει από τα δεδομένα του προγράμματος μελέτης άσματος SARP.<sup>33</sup> Ο φαινότυπος αυτός αποτελεί ένδειξη σοβαρής νόσου και κακής εξέλιξης και επομένως, είναι πολύ σημαντικός ο καθορισμός των ανοσοπαθολογικών δεικτών που διακρίνουν το συγκεκριμένο φαινότυπο. Στη μελέτη του SARP η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι οι παράγοντες που σχετίζονται με το φαινότυπο αυτό είναι η χαμηλή FEV1, η αφρικανική φυλή, η έναρξη του άσματος σε μικρή ηλικία, το ιστορικό παρόξυνσης μετά από λήψη ασπιρίνης ή ΜΣΑΦ ή πριν την έμμηνο ρύση.<sup>34</sup> Επιπλέον άλλοι ερευνητές πρότειναν και άλλες παθοφυσιολογικές οντότητες όπως η κατάθλιψη και η αγχώδης συνδρομή οι οποίες ενέχονται στη μη συμμόρφωση και επηρεάζουν έτσι τη συχνότητα των παροξύνσεων.<sup>35</sup> Ασθενείς με το φαινότυπο αυτό δεν αναγνωρίζουν τα πρόδρομα συμπτώματα της επιδεινούμενης απόφραξης γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε έντονη δύσπνοια λόγω καθυστέρησης στην αντιμετώπιση.<sup>36,37</sup> Αυτή η μη έγκαιρη αναγνώριση των συμπτωμάτων έχει συσχετιστεί με αύξηση της ηωσινοφιλικής φλεγμονής. Αντιθέτως άλλες μελέτες αναφέρουν ότι υψηλά ποσοστά ηωσινόφιλων στους αεραγωγούς, σε διαφορετικές χρονικές περιόδους σχετίζονται με αυξημένη ευαισθησία σε παροξύνσεις και αυξημένη βαρύτητα δύσπνοιας.<sup>38</sup>

Στη μελέτη της ten Brinke και συν.,<sup>12</sup> που είναι μια από τις σημαντικότερες μελέτες για το σοβαρό άσμα με συχνές παροξύνσεις, οι ασθενείς της ομάδας με επαναλαμβανόμενες παροξύνσεις σε σύγκριση με την ομάδα των ασθενών που είχαν μόνο μια παρόξυνση το έτος, παρουσίασαν 186 σοβαρές παροξύνσεις ενώ η ομάδα ελέγχου είχε μόνο 24 σοβαρές εξάρσεις, 37 εισαγωγές στο νοσοκομείο σε σύγκριση με 1 στην ομάδα ελέγχου, 335 ημέρες νοσηλείας σε σύγκριση με 10 και 69 επείγουσες επισκέψεις σε σύγκριση με 15 στην ομάδα ελέγχου τους τελευταίους 12 μήνες. Οι ασθενείς με τις συχνές παροξύνσεις ήταν γενικά νεότεροι σε ηλικία και η διάρκεια του άσματός των ήταν

μικρότερη (12 έναντι 24,5 έτη). Επίσης, αυτοί οι ασθενείς ανέφεραν σε μεγαλύτερο ποσοστό οικογενειακό ιστορικό άσθματος και ήταν σε μεγαλύτερη αναλογία ατοπικοί. Παρόλα αυτά, οι ασθενείς με τις συχνές παροξύνσεις δεν διέφεραν από τους ασθενείς με μόνο μια παροξύνση στην ημερήσια δόση εισπνεομένων κορτικοειδών ή στην καπνιστική συνήθεια. Η αναστρεψιμότητα κατά τη βρογχοδιαστολή καθώς και η βρογχική υπεραντιδραστικότητα ήταν αυξημένη στους ασθενείς με περισσότερες από 3 παροξύνσεις το έτος σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Φαίνεται όμως ότι η διαφορά αυτή δεν οφείλετο στη βαρύτητα του άσθματος δεδομένου ότι εξαφανίζετο μετά τη διόρθωση ως προς την ηλικία και τη διάρκεια του άσθματος των συγκεκριμένων ασθενών.

### ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ ΜΕ ΜΗ ΑΝΑΣΤΡΕΨΙΜΟ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟ ΡΟΗΣ (ΧΡΟΝΙΟΣ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΣ ΡΟΗΣ)

Μερικοί ασθενείς με άσθμα παρουσιάζουν μεγάλο περιορισμό ροής αλλά δεν εμφανίζουν νόσο με σοβαρά συμπτώματα ή συχνές παροξύνσεις. Το πρόγραμμα αντιμετώπισης του άσθματος στα παιδιά (CAMP) υπό την επίβλεψη του US National Heart, Lung, and Blood Institute έδειξε ότι μόνο ένα μέρος ασθματικών ασθενών με έναρξη νόσου στην παιδική ηλικία αναπτύσσουν προοδευτική απώλεια της πνευμονικής τους λειτουργίας εντός περιόδου 5 ετών.<sup>39</sup> Αυτά τα παιδιά είναι κυρίως αγόρια, λιγότερο αλλεργικά και λιγότερο ευαίσθητα σε παροξύνσεις σε σύγκριση με τα ασθματικά παιδιά που δεν εμφανίζουν έκπτωση της πνευμονικής τους λειτουργίας. Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν και από τη μελέτη TENOR.<sup>23</sup>

Οι δύο μελέτες CAMP και TENOR κατέληξαν ότι ο αλλεργικός χαρακτήρας του άσθματος σχετίζεται περισσότερο με το επιρρεπές σε παροξύνσεις και το ανθιστάμενο στην θεραπεία άσθμα, παρά με το συγκεκριμένο φαινότυπο που αφορά στον επιμέμοντα περιορισμό της ροής. Δεν είναι ακόμα απόλυτα σαφές αν οι αλλεργικοί μηχανισμοί προφυλάσσουν από τη σημαντική απώλεια της πνευμονικής λειτουργίας. Δεν υπάρχουν στοιχεία σε δημοσιευμένες μελέτες που να διαφοροποιούν τους ασθενείς με προοδευτική απώλεια της FEV<sub>1</sub> από τους ασθενείς χωρίς απώλεια της πνευμονικής τους λειτουργίας, ίσως εξαιτίας των λίγων πολυπληθών μελετών του άσθματος επί του θέματος της πνευμονικής λειτουργίας. Γενετικές μελέτες αναγνώρισαν μοναδικούς νουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς σε γονίδια όπως ADAM 33, IL4, IL4R, TGFβ που σχετίζονται με μικρότερη της κανονικής πνευμονική

λειτουργία. Νουκλεοτιδικός πολυμορφισμός στην IL-4 σχετίζεται επίσης με σχεδόν θανατηφόρες παροξύνσεις άσθματος.

Ο σοβαρός περιορισμός της ροής αποδίδεται στην αναδιαμόρφωση (remodeling) των αεραγωγών, μια διαδικασία η οποία περιλαμβάνει ίνωση της υποεπιθηλιακής βασικής μεμβράνης, υπερπλασία καλυκοειδών επιθηλιακών κυττάρων, αύξηση των αιμοφόρων αγγείων και πολλαπλασιασμό των αναπνευστικών λείων μυικών ινών μαζί με υπερπλασία και υπερτροφία της μάζας τους.<sup>40</sup> Η διαδικασία αυτή έχει συνδεθεί με το γονίδιο ADAM 33.<sup>41</sup> Από διάφορες έρευνες προκύπτει η παρουσία διαφόρων τύπων ινοβλαστών στους ασθματικούς αεραγωγούς.<sup>42</sup> Υπάρχει μια μεγάλη ομάδα ασθενών με σοβαρό άσθμα οι οποίοι εκδηλώνουν χρόνια αποφρακτική νόσο. Ο ακριβής ορισμός του χρόνου περιορισμού της ροής διαφέρει στη βιβλιογραφία. Για παράδειγμα η ομάδα Ten Brinke<sup>43</sup> πρότεινε ως κατώτατο όριο για τη μετα-βρογχοδιαστολή FEV<sub>1</sub> το 75% της αναμενόμενης, ενώ η ομάδα Bumbacea<sup>44</sup> πρότεινε ως όριο το 50% της αναμενόμενης. Εντούτοις και στις 2 μελέτες οι ασθενείς με χρόνιο περιορισμό της ροής ήταν μεγαλύτεροι σε ηλικία και με μεγαλύτερη διάρκεια νόσου. Οι ασθενείς αυτοί είχαν επίσης αυξημένους υπολειπόμενους όγκους, γεγονός που συνάδει σε παγίδευση αέρα, αλλά φυσιολογικές διαχυτικές χωρητικότητες, δεδομένο που το διαφοροποιεί από το εμφύσημα. Επιπλέον η πάχυνση του τοιχώματος των βρόγχων όπως απεικονίζεται σε υψηλής ευκρίνειας τομογραφίες σχετίζονταν με χρόνια απόφραξη αεραγωγών.

Ασθενείς με απόφραξη της ροής αέρα συχνά ομαδοποιούνται στην κατηγορία της χρόνιας αποφρακτικής πνευμονοπάθειας (ΧΑΠ), ενώ υπάρχουν και διεθνείς οδηγίες που προτείνουν και υποστηρίζουν μια τέτοια ταξινόμηση. Πράγματι, τόσο η ΧΑΠ (που προκαλείται από το κάπνισμα ή άλλους επιβλαβείς παράγοντες) όσο και το άσθμα μπορεί να σχετίζονται με μια εξασθένηση της πνευμονικής λειτουργίας, που προκαλεί απόφραξη της ροής του αέρα. Ασθενείς με ιστορικό άσθματος είχαν σημαντικά μεγαλύτερο αριθμό ηωσινοφίλων στο περιφερικό αίμα, στα πτύελα, στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (BAL), και στο βλεννογόνο των αεροφόρων οδών. Επίσης, είχαν λιγότερα ουδετερόφιλα στα πτύελα και το BAL, μεγαλύτερη αναλογία CD4+/CD8+ T λεμφοκυττάρων στον βλεννογόνο των αεραγωγών, και περισσότερο παχύ δικτυωτό στρώμα στην επιθηλιακή βασική μεμβράνη. Επιπρόσθετα, παρουσίαζαν σημαντικά μικρότερο υπολειπόμενο όγκο, μεγαλύτερη διαχυτική χωρητικότητα, υψηλότερη συγκέντρωση εκπνεόμενου NO, μικρότερη βαθμολογία στη κλίμακα εμφυσήματος (σε αξονική τομογραφία υψηλής



ανάλυσης), καθώς και μεγαλύτερη αναστρεψιμότητα των συμπτωμάτων με χορήγηση βρογχοδιασταλτικών και κορτικοστεροειδών. Κατα συνέπεια, παρά την ομοιότητα στην απόφραξη της ροής του αέρα, οι ασθενείς με ιστορικό άσθματος παρουσιάζουν ξεχωριστά χαρακτηριστικά συγκρινόμενοι με τους ασθενείς με ιστορικό ΧΑΠ, και για το λόγο αυτό θα πρέπει να αναγνωρίζονται και να λαμβάνουν την κατάλληλη αγωγή.<sup>45</sup>

## ΑΣΘΜΑ ΑΝΘΙΣΤΑΜΕΝΟ ΣΕ ΣΤΕΡΟΕΙΔΗ

Στους περισσότερους ασθματικούς ασθενείς η θεραπεία με γλυκοκορτικοειδή επιδρά ευεργετικά στα φλεγμονώδη και δομικά κύτταρα στοχεύοντας στην αιτία του περιορισμού της ροής, όπως η σύσπαση των λείων μυικών ινών, το οίδημα του βλεννογόνου, η φλεγμονή των αεραγωγών, η αυξημένη έκκριση βλέννης και η αναδιαμόρφωση των αεραγωγών. Παρόλα αυτά 10% περίπου των ασθματικών ασθενών ανταποκρίνεται ελάχιστα στη θεραπεία με γλυκοκορτικοειδή και παρουσιάζει συχνές παροξύνσεις και έκπτωση στην καθημερινή δραστηριότητα και ποιότητα ζωής.<sup>46</sup> Ανθιστάμενο ή ελάχιστα ανταποκρινόμενο στα κορτικοστεροειδή άσθμα είναι δυνατό να εκδηλώνεται σε όλα τα επίπεδα σοβαρότητας της νόσου, αλλά συνήθως αυτός ο ασθματικός φαινότυπος εκφράζεται σε σοβαρά πάσχοντες, αφού η βασική θεραπεία του άσθματος, τα κορτικοστεροειδή, δεν είναι αποτελεσματικά. Αυτός ο φαινότυπος θεωρείται αποτέλεσμα ανώμαλης απάντησης των ασθενών στα κορτικοστεροειδή με αποτέλεσμα μείωση των αντιφλεγμονωδών επιδράσεών τους. Ωστόσο όπως φάνηκε από πρόσφατες μελέτες, υπάρχουν πολλοί διαφορετικοί μηχανισμοί ανθεκτικότητας στα στεροειδή όπως μειωμένη πυκνότητα του υποδοχέα των στεροειδών, διαταραχή στη σύνδεση των στεροειδών με τον υποδοχέα τους, της χαμηλής δυνατότητας του υποδοχέα να συνδέεται με το DNA ή της αυξημένης έκφρασης φλεγμονωδών παραγόντων αντιγραφής όπως η NF-κβ και η AP1 οι οποίοι ανταγωνίζονται τα στεροειδή στη σύνδεση με το DNA.<sup>47</sup>

Αύξηση της γονιδιακής μεταγραφής σχετίζεται με αύξηση στην ακετυλίωση ιστόνης, που επάγεται από την ακετυλοτρανσφεράση των ιστονών (HDAC),<sup>48</sup> ενώ υπο-ακετυλίωση σχετίζεται με μείωση της μεταγραφικής δραστηριότητας των γονιδίων, και ελέγχεται από τις αποακετυλάσες των ιστονών (HDACs). Η αποακετυλίωση του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR), που επάγεται από την HDAC2, επιτρέπει τη σύνδεση του GR με το σύμπλοκο NF-κβ, με αποτέλεσμα να μειώνεται η μεταγραφή των φλεγμονωδών γονιδίων, που επάγονται από την NF-κβ.<sup>49</sup> Έλλειμμα στην

αποακετυλίωση του GR, που προκαλείται από διαταραχή στη λειτουργία της HDAC 2, έχει προταθεί ως μοριακός μηχανισμός που προκαλεί απώλεια της ευαισθησίας του οργανισμού στα γλυκοκορτικοειδή. Η απώλεια της HDAC2 δεν περιορίσε την πυρηνική μετάθεση του GR, ούτε τη δέσμευση του GR με το στοιχείο γλυκοκορτικοειδικής απάντησης (GRE) στο DNA, αλλά ανέστειλε τη σύνδεση μεταξύ GR και NF-κβ.<sup>50</sup> Η δραστηριότητα της HDAC και η έκφραση της HDAC2 μειώνονται στα μακροφάγα κύτταρα, που ελήφθησαν από τους πνεύμονες ασθενών με χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (COPD), μια νόσος σχετικά μη ευαίσθητη στα στεροειδή. Αυτή ακριβώς η μείωση σχετίζεται με τη σοβαρότητα της νόσου.<sup>51</sup> Στη μελέτη των Ito et al. 2006,<sup>50</sup> φάνηκε ότι η υπερέκφραση της HDAC2 ήταν ικανή να αποκαταστήσει την ευαισθησία του οργανισμού στα γλυκοκορτικοειδή, σε παθήσεις μη ευαίσθητες στα στεροειδή, όπως η COPD. Η θεοφυλλίνη έχει δείξει ότι αποκαθιστά τόσο τη δραστηριότητα της αποακετυλάσης της ιστόνης όσο και την ευαισθησία στα στεροειδή σε COPD.<sup>52</sup> Έχει επίσης διατυπωθεί η άποψη ότι οι κυτταροκίνες Th-2 παίζουν κάποιο ρόλο στο σοβαρό/ανθεκτικό στα κορτικοστεροειδή άσθμα. Πιο συγκεκριμένα, τα CD4+ T-λεμφοκύτταρα από ασθματικούς ασθενείς με σοβαρό/ανθεκτικό τύπο άσθματος είναι λιγότερο ικανά να παράγουν την αντι-φλεγμονώδη κυτταροκίνη IL-10 σαν απάντηση στη δεξαμεθαζόνη, σε σύγκριση με τα κύτταρα ασθενών που είναι ευαίσθητοι στα κορτικοστεροειδή.<sup>26</sup>

Πέραν των ανωτέρω υπάρχουν τύποι φλεγμονωδών κυττάρων στους αεραγωγούς ορισμένων ασθματικών που μπορούν να προβλέψουν την απάντηση στη θεραπεία με γλυκοκορτικοειδή.<sup>53</sup> Η απουσία ηωσινοφίλων ενδεικτικών φλεγμονής συνδέεται με φτωχή απάντηση στα κορτικοστεροειδή. Πολλαπλές μετα-αναλύσεις αποκάλυψαν ότι η ηωσινοφιλία στα πτύελα και η FEV<sub>1</sub> ήταν ανεξάρτητοι σημαντικοί προγνωστικοί παράγοντες της αύξησης της FEV<sub>1</sub> μετά τη θεραπεία. Αντιθέτως η FEV<sub>1</sub> και η PD20 των ασθματικών με χαμηλά ποσοστά ηωσινοφίλων στα πτύελα, φάνηκε να μην επηρεάζονται θετικά από τη θεραπεία με εισπνεόμενα στεροειδή. Σε αυτούς τους ασθενείς με τη χαμηλή ηωσινοφιλία τα ουδετερόφιλα ήταν περισσότερα, δηλαδή αυξημένη περιεκτικότητα ουδετεροφίλων στα πτύελα συνδέεται με φτωχή απάντηση στα στεροειδή. Αυτές οι μελέτες θα μπορούσαν πιθανότατα να εξηγήσουν το φαινόμενο της κακής απάντησης των ασθματικών καπνιστών στη θεραπεία με στεροειδή δεδομένου ότι οι καπνιστές εμφανίζονται με μεγαλύτερο ποσοστό ουδετεροφίλων στα πτύελα.<sup>54</sup> Επιπλέον τύποι κυττάρων που σχετίζονται με αντίσταση στα στεροειδή είναι τα

μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος (PBMCs) και τα κυψελιδικά μακροφάγα (AMs). Αυτά τα κύτταρα είναι λιγότερο ευαίσθητα στην αναστολή από δεξαμεθαζόνη της απελευθέρωσης των προφλεγμονωδών κυτοκινών σε σύγκριση με τα κύτταρα από ασθενείς με καλά ελεγχόμενο μη σοβαρό άσθμα.<sup>55,56</sup> Οι μηχανισμοί που ενέχονται στη μειωμένη απάντηση στα κορτικοστεροειδή στο σοβαρό άσθμα δεν είναι σαφείς αλλά τα AMs από ασθενείς με σοβαρή νόσο φαίνεται να εμφανίζουν ένα μεγαλύτερο βαθμό ενεργοποίησης των p38 πρωτεϊνικών κινάσων (p38 MARK). Η κινάση σερίνης – θρεονίνης ειδικότερα επιδρά σε πολλές βιολογικές διεργασίες, όπως σε αντιγραφικούς παράγοντες (NF-B, AP1) και έχει συμμετοχή στη φλεγμονή, στην κυτταρική διήθηση και στον κυτταρικό θάνατο, φαινόμενα βασικά στην παθοφυσιολογία του άσθματος.<sup>57</sup> Σχετικά πρόσφατα δεδομένα από μελέτες έδειξαν ότι οι anti-IgE θεραπείες πιθανώς να δρουν ευεργετικά στους ασθενείς με ανθιστάμενο στα στεροειδή άσθμα.<sup>58</sup> Αντίθετα, η χρήση anti-TNFα σε σοβαρό άσθμα έδωσε αντικρουόμενα αποτελέσματα,<sup>59</sup> ενώ μια πρόσφατη μελέτη των Wenzel et al.<sup>60</sup> έδειξε πολύ απογοητευτικά αποτελέσματα σχετικά με αυτόν τον τύπο άσθματος. Προκύπτει επομένως η ανάγκη για περαιτέρω έρευνα, η οποία θα οδηγήσει σε προσδιορισμό επιπρόσθετων και ίσως καλύτερων μη επεμβατικών βιολογικών δεικτών σχετικών με το συγκεκριμένο φαινότυπο, έτσι ώστε να επιτευχθεί περισσότερο στοχευμένη θεραπεία.

## ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΖΟΜΕΝΟΣ ΑΠΟ ΤΗΝ ΗΛΙΚΙΑ ΕΝΑΡΞΗΣ ΤΟΥ ΑΣΘΜΑΤΟΣ

Το πρώιμης ή όψιμης έναρξης άσθμα μπορεί να συσχετιστεί με το φαινότυπο των συχνών ασθματικών παροξύνσεων συμμετέχοντας έτσι στους παράγοντες κινδύνου ανάπτυξης σοβαρού άσθματος.<sup>61</sup> Το βρογχικό άσθμα μπορεί να εμφανιστεί σε οποιαδήποτε χρονική στιγμή της ζωής. Εντούτοις, πρόσφατα δεδομένα έδειξαν ότι οι περισσότεροι ασθενείς βιώνουν τα πρώτα συμπτώματα του άσθματός των πριν την ηλικία των 5 ετών. Επομένως η ηλικία κατά την οποία ο ασθενής εμφανίζει άσθμα αποτελεί σημείο διαφοροποίησης ασθματικών φαινοτύπων. Η προέλευση του παιδικού άσθματος εντοπίζεται σε συνδυασμό γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων που επηρεάζουν την ανάπτυξη του ανοσοποιητικού και αναπνευστικού συστήματος. Τα παιδιά με πρώιμη έναρξη της νόσου έχουν συνήθως οικογενειακό ιστορικό ατοπίας ή/και άσθματος και ιστορικό εκζέματος. Το μητρικό ιστορικό σχετίζεται σημαντικά με την ευαισθησία του παιδιού, υποδεικνύοντας τόσο τη γενετική όσο και την

περιβαλλοντική εξάρτηση.<sup>20</sup>

Η περιβαλλοντική έκθεση παίζει καθοριστικό ρόλο στον προσδιορισμό της ευαισθησίας στη νόσο. Το πρώιμης έναρξης άσθμα κατά κύριο λόγο ορίζεται ως η έναρξη νόσου πριν την ηλικία των 12 ετών, έχει ένα αλλεργικό στοιχείο και οι ασθενείς εμφανίζουν συμπτώματα μετά από έκθεση σε επιβαρυντικούς παράγοντες.<sup>62</sup> Αντιθέτως, ο μεγαλύτερος αριθμός των ενδογενών ασθματικών πιθανώς να εμφανίζεται με όψιμης έναρξης άσθμα.<sup>43</sup> Γενικά, το πρώιμης έναρξης άσθμα αποτελεί μια ομοιογενή νόσο σε σύγκριση με το όψιμης έναρξης άσθμα, το οποίο αποτελεί συμβολή αλλεργικών, λοιμωδών και άλλων παραγόντων.<sup>33,61</sup>

Σε πολλά παιδιά τα συμπτώματα άσθματος και η συρίττουσα αναπνοή βελτιώνονται με την πάροδο της ηλικίας, αλλά το 30% - 40% αυτών συνεχίζουν να εμφανίζουν παροξύνσεις της νόσου ως ενήλικες. Παρά τη μεγαλύτερη διάρκεια της νόσου, οι άνθρωποι με πρώιμη έναρξη άσθματος φαίνεται ότι παρουσιάζουν οριακά καλύτερη πνευμονική λειτουργία από αυτούς με όψιμη έναρξη. Η ομάδα των Miranda<sup>62</sup> δημοσίευσε δεδομένα σε ενήλικες ασθματικούς ασθενείς με όψιμη έναρξη, οι οποίοι είχαν χειρότερη πνευμονική λειτουργία από τους ασθενείς με πρώιμη έναρξη της πάθησης, παρ'όλη τη μικρότερη διάρκεια της νόσου. Στη μελέτη των Jenkins et al.<sup>63</sup> η βαρύτητα της πάθησης των παιδιών και των ενηλίκων με έναρξη άσθματος στην παιδική ηλικία επηρεάζεται από τη διάρκεια της νόσου, ενώ αυτό δεν ισχύει για τους ασθενείς που το άσθμα τους ξεκίνησε στην ενήλικη ζωή. Η ομάδα των Burrows et al.<sup>64</sup> έδειξε ότι οι ασθενείς με έναρξη νόσου στην ενήλικη ζωή σημειώνουν μια απότομη απώλεια της πνευμονικής τους λειτουργίας αμέσως μετά τη διάγνωση της νόσου που παραμένει σταθερή στη συνέχεια της ζωής τους. Οι μηχανισμοί οι οποίοι ευθύνονται για την απώλεια της πνευμονικής λειτουργίας στο όψιμης έναρξης άσθμα είναι άγνωστοι. Μια πιθανή εξήγηση είναι οι ασθενείς αυτοί να είχαν αδιάγνωστο άσθμα για πολλά χρόνια και η διάγνωση τελικά να έγινε μετά από σημαντικού βαθμού απώλεια της πνευμονικής λειτουργίας. Εναλλακτικά, σύμφωνα με την ομάδα των Jenkins et al.,<sup>63</sup> το όψιμης έναρξης άσθμα μπορεί να σχετίζεται με μεγαλύτερου βαθμού φλεγμονή των αεραγωγών οδηγώντας μέσω αυτού του μηχανισμού σε απότομη αναδιαμόρφωση αυτών. Η ομάδα των TenBrinke et al.<sup>43</sup> έδειξε ότι οι ασθματικοί με έναρξη στην ενήλικη ζωή παρουσίαζαν αυξημένο κίνδυνο για χρόνια απόφραξη των αεραγωγών (OR 3.3). Επιπλέον, οι ενήλικες ασθματικοί με καθυστερημένη έναρξη της νόσου ήταν λιγότερο ατοπικοί όπως φάνηκε από τις δερματικές δοκιμασίες, είχαν χαμηλότερα επίπεδα IgE

και λιγότερα συμπτώματα στην έκθεση σε αλλεργιογόνα. Όλα τα παραπάνω δεδομένα υποδεικνύουν την πιθανή ύπαρξη σημαντικών παθοφυσιολογικών και μηχανικών διαφορών μεταξύ των ασθενών με πρώιμη και αυτών με όψιμη έναρξη νόσου.

## ΑΛΛΕΡΓΙΚΟ ΑΣΘΜΑ

Η αλλεργική ευαισθητοποίηση είναι η βάση του αλλεργικού βρογχικού άσθματος και αποτελεί έναν από τους πιο γνωστούς ασθματικούς φαινοτύπους. Η παρουσία των αλλεργικών χαρακτηριστικών θα μπορούσε να συνδεθεί με καλύτερη πνευμονική λειτουργία, αλλά και με περισσότερες παροξύνσεις από το μη αλλεργικό άσθμα. Το αλλεργικό άσθμα είναι σύνηθες στην παιδική ηλικία αλλά και αρκετά συχνό στους ενήλικες.<sup>65</sup> Μέχρι την ηλικία των 10 ετών, το αλλεργικό άσθμα αποτελεί την κυρίαρχη μορφή της νόσου. Το οικογενειακό ιστορικό και η πρώιμη έκθεση σε αλλεργιογόνα είναι πιθανότατα πολύ σημαντικοί παράγοντες στην εκδήλωση αλλεργικού άσθματος, εντούτοις οι μηχανισμοί μέσω των οποίων μερικά παιδιά εμφανίζουν άσθμα ενώ άλλα δεν εκδηλώνουν αλλεργικά αναπνευστικά φαινόμενα δεν είναι πλήρως κατανοητοί<sup>66</sup>. Επιπλέον, η ηλικία έκθεσης σε αλλεργιογόνα είναι ίσως καθοριστική στη διαδικασία ανάπτυξης της πάθησης αργότερα στη ζωή. Συγκεκριμένα η πρώιμη έκθεση είναι πιο καθοριστική και κρίσιμη από την όψιμη έκθεση σε αλλεργιογόνα. Τα αποτελέσματα από μελέτες σχετικά με την έκθεση σε υψηλές συγκεντρώσεις αλλεργιογόνων γάτας μέχρι την ηλικία των 3 ετών υπέδειξαν ότι μια ανοσολογική απάντηση, μη σχετιζόμενη με τα συμπτώματα του άσθματος μπορεί να ενεργοποιηθεί και αυτή η κατάσταση θα μπορούσε να θεωρηθεί ως μια μορφή ανοχής στο συγκεκριμένο αλλεργιογόνο. Υπάρχουν δηλαδή ενδείξεις ότι παιδιά που μεγαλώνουν σε σπίτια με γάτα είναι λιγότερο πιθανό να αναπτύξουν ευαισθησία στα αλλεργιογόνα της γάτας ή να αναπτύξουν στο μέλλον άσθμα.<sup>67,68</sup> Επίσης, πρώιμη ευαισθητοποίηση στα αλλεργιογόνα της σκόνης είναι περισσότερο σημαντική σε ότι αφορά το άσθμα από την ευαισθητοποίηση μετά την ηλικία των 3 ετών.<sup>69,70</sup> Η πρώιμη φάση της αλλεργικής αντίδρασης ενεργοποιείται όταν ένας ατοπικός ασθενής έρχεται σε επαφή με ένα αλλεργιογόνο και χαρακτηρίζεται από απελευθέρωση προσχηματισμένων και στη συνέχεια νέο-σχηματιζόμενων μεσολαβητών από τη μεμβράνη των συμμετεχόντων κυττάρων, όπως η ισταμίνη, τα λευκοτριένια, οι προσταγλανδίνες, και κυτταροκινών, που προάγουν τη βρογχική σύσπαση και το οίδημα. Η καθυστερημένη αλλεργική αντίδραση χαρακτηρίζεται από

εισροή και ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων και άλλων φλεγμονωδών κυττάρων, τα οποία επίσης αυξάνουν την παραγωγή των προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών.

Η ανοσολογική απάντηση στο αλλεργικό και πιθανώς σε άλλους τύπους άσθματος φαίνεται ότι είναι ετερογενής, γεγονός που πιθανώς συμμετέχει στην ετερογένεια των κλινικών φαινοτύπων του άσθματος. Περαιτέρω, πάνω από 100 γονίδια εμπλέκονται στο αλλεργικό άσθμα, αλλά η γενετική εξάρτηση της συγκεκριμένης νόσου είναι πολυσύνθετη και ρυθμίζεται από τις περιβαλλοντικές επιδράσεις. Κανένα από τα γονίδια που έχουν βρεθεί φάνηκε να αποτελεί παράγοντα κινδύνου σε όλους τους πληθυσμούς.

Στοχευμένες θεραπείες, όπως η ανοσοθεραπεία και τα μονοκλωνικά αντισώματα, είναι διαθέσιμες στη θεραπευτική αντιμετώπιση του άσθματος. Στις μελέτες με το μονοκλωνικό αντίσωμα για την IgE, το omalizumab, ο κλινικός αλλεργικός ασθματικός φαινότυπος ορίζεται μόνο από την παρουσία ενός ειδικού IgE αλλεργιογόνου που προέκυπτε από δερματικές δοκιμασίες ή RAST.<sup>71,72</sup> Η ανάλυση όλων των μελετών όπως και η κλινική εμπειρία έδειξαν ότι όλοι οι ασθματικοί που κατηγοριοποιούνται σύμφωνα με τις δοκιμασίες που προαναφέρθηκαν, δεν ανταποκρίνονται στην αντι-IgE θεραπεία. Αν ένας καλύτερος ορισμός του αλλεργικού άσθματος ή των βιολογικών δεικτών του θα μπορούσε να επιτύχει πιο σαφή καθορισμό των ασθενών που θα ανταποκρίνονται στην anti-IgE θεραπεία, δεν είναι ακόμα γνωστό.

## ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΟ ΑΣΘΜΑ

Το επαγγελματικό άσθμα, ως κλινικός φαινότυπος, αποτελεί περίπου το 15% της όψιμης έναρξης άσθματος και μπορεί να προκαλέσει συχνές σοβαρές παροξύνσεις<sup>12</sup>. Το επαγγελματικό άσθμα δεν διαφέρει στους κλινικούς και παθολογικούς χαρακτήρες από το μη επαγγελματικό άσθμα, εντούτοις περιλαμβάνει υποφαινότυπους οι οποίοι προκύπτουν από ανοσολογικούς και μη ανοσολογικούς μηχανισμούς. Το ανοσολογικό σχετιζόμενο επαγγελματικό άσθμα εμφανίζεται μετά από μακρά περίοδο έκθεσης στον αιτιολογικό παράγοντα, απαραίτητης ώστε ο εργαζόμενος να εμφανίσει την ανοσολογική ευαισθητοποίηση στο συγκεκριμένο παράγοντα. Αυτός ο τύπος περιλαμβάνει τόσο το επαγγελματικό άσθμα το οποίο προάγεται από ένα IgE μηχανισμό στις περισσότερες υψηλού και μερικές χαμηλού μοριακού βάρους ουσίες, όσο και το επαγγελματικό άσθμα στο οποίο δεν συμμετέχει IgE μηχανισμός (χαμηλού μοριακού βάρους παράγοντες όπως δι-ισοκυανιούχα, δυτικός κόκκινος κέδρος, ακρυλικά). Το μη ανοσολογικά

σχετιζόμενο επαγγελματικό άσθμα χαρακτηρίζεται από την απουσία της μακράς περιόδου έκθεσης και εμφανίζεται μετά την τυχαία έκθεση σε υψηλές συγκεντρώσεις ερεθιστικών παραγόντων στο χώρο της δουλειάς. Αυτή η κλινική οντότητα έχει ορισθεί ως άσθμα παραγόμενο από ερεθιστικές ουσίες. Η πιο αντιπροσωπευτική μορφή αυτής της κατηγορίας είναι το RADS (σύνδρομο αντιδραστικής δυσλειτουργίας αεραγωγών), το οποίο εμφανίζεται μετά από μοναδική έκθεση σε υψηλά επίπεδα ερεθιστικού αερίου, υδρατμών ή καπνού. Πέραν των ανωτέρω, το επαγγελματικό άσθμα περιλαμβάνει ποικίλα σύνδρομα, όπως η ηωσινοφιλική βρογχιολίτιδα και τα συμπτώματα τύπου άσθματος που προκαλούνται από έκθεση σε οργανικές σκόνες.<sup>73</sup>

Η φλεγμονή των αεραγωγών στο ανοσολογικά σχετιζόμενο επαγγελματικό άσθμα χαρακτηρίζεται από την παρουσία ηωσινοφίλων, λεμφοκυττάρων, μαστοκυττάρων και πάχυνση της βασικής μεμβράνης του επιθηλίου<sup>74</sup>. Αντιθέτως, στο επαγγελματικό άσθμα που προκαλείται από ερεθιστικά χημικά, οι ιστολογικές αλλοιώσεις αφορούν στην ίνωση του τοιχώματος των βρόγχων, στην επιθηλιακή απογύμνωση και στην ινο-αιμορραγική εξοίδηση στην υποβλεννογόνια στοιβάδα, χωρίς ηωσινοφιλική φλεγμονή.<sup>75</sup> Αυτό το επαγγελματικό άσθμα μπορεί να υποχωρήσει εάν ο ασθενής διακόψει ταχέως την έκθεση στο βλαπτικό παράγοντα, ο ανοσολογικός κλινικός φαινότυπος επαγγελματικού άσθματος δύναται να εξακολουθεί να υφίσταται, εφόσον έχει ήδη καθιερωθεί η φλεγμονώδης διαδικασία, ανεξάρτητα από την έκθεση στο βλαπτικό παράγοντα.<sup>73</sup>

## ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΕΤΑΙ ΜΕ ΤΗ ΛΗΨΗ ΑΣΠΙΡΙΝΗΣ

Το άσθμα που προκαλείται από την ασπιρίνη και από άλλα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη (ΜΣΑΦ) είναι γνωστό ως άσθμα με ευαισθησία στην ασπιρίνη (Aspirin-induced -AS- asthma). Αποτελεί έναν από τους πιο εύκολα αναγνωρίσιμους κλινικούς φαινότυπους, εξαιτίας της ειδικότητας του αιτιολογικού παράγοντα. Οι εκτιμήσεις για το ποσοστό αυτού του φαινότυπου ποικίλουν, ωστόσο υπολογίζεται ότι πάσχουν περίπου 10-20% των ενήλικων ασθματικών ασθενών<sup>76</sup>. Οι ασθενείς που ανήκουν στο φαινότυπο αυτό φαίνεται ότι είναι κυρίως γυναίκες οι οποίες υποφέρουν από σοβαρότερο άσθμα. Επιπλέον, αυτός ο τύπος άσθματος σχετίζεται με λιγότερη ατοπία, με αυξημένα λευκοτριένια στους αεραγωγούς και υψηλό ποσοστό ηωσινοφίλων τόσο στους ιστούς όσο και αίμα.<sup>77</sup> Η πιο συχνή κλινική μορφή που σχετίζεται

με την ευαισθησία στην ασπιρίνη είναι η συνύπαρξη σοβαρής παραρρινοκολπίτιδας με ρινικούς πολύποδες και έναρξη της νόσου στην ενήλικη ζωή. Η ευαισθησία στα ΜΣΑΦ φαίνεται ότι δεν εξαρτάται από την IgE αλλά αντιθέτως συσχετίζεται με το διαταραγμένο μεταβολισμό των εικοσανοϊδίων οξέων όπως του αραχιδονικού οξέος στη μεμβράνη των κυττάρων. Αυξημένα επίπεδα των κυστεϊνυλικών λευκοτριενίων και αυξημένη έκφραση του γονιδίου CYSLTR1 αποτελούν χαρακτηριστικά ευρήματα σχετιζόμενα με το συγκεκριμένο φαινότυπο, δείχνοντας ότι η παθογένεια συνδέεται με εκσεσημασμένη φλεγμονώδη απάντηση εξαιτίας της υπερέκφρασης των λευκοτριενίων αυτών και του CYSLTR1<sup>78</sup>. Μολονότι αυτός ο κλινικός φαινότυπος είναι πολύ ευδιάκριτος κλινικά και παθολογικά, η υποκείμενη παθογένεια παραμένει ελάχιστα κατανοητή. Γενετικές μελέτες έδειξαν ότι μεταλλάξεις στη σύνθεση των λευκοτριενίων επηρεάζουν αυτόν το φαινότυπο. Ωστόσο τα ευρήματα αυτά δεν είναι αρκετά από μόνα τους για να εξηγήσουν την έναρξη της νόσου στην ενήλικη ζωή, γεγονός που πιθανώς υποδεικνύει συνέργεια και περιβαλλοντικών παραγόντων (όπως ιών) στην παθογένεια της νόσου<sup>23</sup>. Επιπρόσθετα, πρόσφατες μελέτες έδειξαν βλάβη του μεταβολισμού της κυκλοοξυγενάσης-2, προσταγλανδίνης-E2 και της λιποξίνης. Αναλυτικότερα, αναγνωρίστηκαν μονο-νουκλεοτιδιακοί πολυμορφισμοί (SNPs), της συνθέσεως C4 των λευκοτριενίων, της 5-λιποοξυγενάσης, του CYSLT1 και σε 2 γονίδια: στο TBX21, το οποίο αποκωδικοποιεί τη μεταγραφή του παράγοντα Tbet, και της προσταγλανδίνης E2<sup>78</sup>. Τα γονίδια των υποδοχέων της κυκλοοξυγενάσης-2 και της θρομβοξανθίνης A2 δεν φάνηκε να σχετίζονται με το AS άσθμα, αλλά ενδεχομένως προκαλούν λειτουργικές επιρροές.

Οι AS ασθματικοί ασθενείς παρουσιάζουν δυσκολία στον έλεγχο της νόσου γιατί συχνά δεν ανταποκρίνονται στη θεραπεία με κορτικοστεροειδή. Οι ανταγωνιστές των λευκοτριενίων μπορεί να αποδειχθούν αποτελεσματικοί θεραπευτικά, αν και όπως ισχύει και στους άλλους ασθματικούς φαινότυπους, δεν ανταποκρίνονται όλοι οι ασθενείς στην εν λόγω θεραπευτική επιλογή.

## ΑΣΘΜΑ ΠΕΡΙ ΤΗΝ ΕΜΜΗΝΟ ΡΥΣΗ

Γενικά δεν υπάρχει αποδεκτός ορισμός για τον τύπο αυτό και οι περισσότεροι συγγραφείς αναφέρονται σε μια κλινική οντότητα που περιλαμβάνει επιδείνωση των συμπτωμάτων του άσθματος περί την έμμηνο ρύση. Πρόσφατα ο εν λόγω κλινικός φαινότυπος αναφέρεται ως αύξηση των ασθματικών συμπτωμάτων ή μείωση της πνευμονικής λειτουργίας αμέσως πριν ή κατά τη

διάρκεια της εμμηνου ρύσεως του γυναικείου κύκλου. Ο συγκεκριμένος φαινότυπος έχει υπολογιστεί στο 30-40% των ασθματικών γυναικών<sup>79</sup>.

Μολονότι από καιρού θεωρείται ότι οι γυναικείες ορμόνες ενέχονται στην παθογένεια του άσθματος, ο πραγματικός ορμονικός μηχανισμός δεν είναι ξεκάθαρος. Ανάλογα με το περιβάλλον, τόσο τα οιστρογόνα όσο και η προγεστερόνη δύνανται να λειτουργήσουν είτε ως προφλεγμονώδεις ή αντιφλεγμονώδεις ορμόνες<sup>80</sup>. Οι γυναικείες ορμόνες ασκούν σημαντικές επιδράσεις σε διάφορους φλεγμονώδεις μεσολαβητές, στα ουδετερόφιλα, την χημειοκίνη IL-8 και τη χημειοτακτική πρωτεΐνη των μονοκυττάρων. Μια πιθανή εξήγηση για τις κυκλικές αλλαγές στη σοβαρότητα του άσθματος είναι ότι η λεμφοκυτταρική TH1-TH2 ισορροπία κατά την έμμηνο ρύση μετατοπίζεται περισσότερο προς τον TH2 τύπο στο περιφερικό αίμα<sup>79</sup>.

Έχει δείχθει ότι τα οιστρογόνα μεταβάλλουν σημαντικά την παραγωγή, την κάθαρση και το μεταβολισμό της κορτιζόλης. Ειδικότερα η προγεστερόνη ανταγωνίζεται την κορτιζόλη στους υποδοχείς των συνδεδεμένων με την κορτιζόλη σφαιρινών και η οιστραδιόλη αυξάνει την παραγωγή των συνδεδεμένων με την κορτιζόλη σφαιρινών. Επίσης, έχει παρατηρηθεί σημαντική διαφοροποίηση στα επίπεδα της θεοφυλλίνης εξαιτίας μεγαλύτερης κάθαρσης κατά τη διάρκεια της εμμηνου ρύσεως συγκριτικά με τη θυλακιάδη φάση<sup>79,81</sup>. Τα παρακάτω χαρακτηριστικά των ασθματικών ασθενών αφορούν στο συγκεκριμένο κλινικό φαινότυπο: 1) μεγαλύτερος καταμήνιος κύκλος, περισσότερη προεμμηνορρυσιακή ένταση και υψηλότερη παρουσία αλλεργικών, μολυσματικών και ψυχολογικών παραγόντων, 2) αυξημένη βαρύτητα άσθματος (περισσότερα συμπτώματα, φάρμακα γρήγορης ανακούφισης, χαμηλότερη PEF και FEV1), 3) περίπου τριπλάσιος αριθμός επειγουσών επισκέψεων για κρίση άσθματος από τους άνδρες, γεγονός που συνδέεται χρονικά με την έμμηνο ρύση, 4) συχνότερες εισαγωγές σε νοσοκομεία ακόμη και με μηχανικό αερισμό<sup>79,81</sup>.

## ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΕΙΣ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΙ

Η διαπίστωση της φλεγμονώδους φύσεως του άσθματος είναι ίσως το σημαντικότερο επίτευγμα στην κατανόηση της παθογένειας της νόσου και στον καθορισμό της φαρμακευτικής θεραπείας του άσθματος, γεγονός που οδήγησε στην εξάπλωση της χρήσης των εισπνεόμενων κορτικοστεροειδών και στην καθιέρωσή τους ως φαρμάκων εκλογής στη θεραπεία του άσθματος. Οι φλεγμονώδεις φαινότυποι μπορεί να χαρακτηρίζονται από επίμονη

ηωσινοφιλική και ουδετεροφιλική διήθηση, ενώ σε άλλες περιπτώσεις δεν παρατηρείται διήθηση φλεγμονωδών κυττάρων<sup>23</sup>. Αυτοί οι φαινότυποι όλο και περισσότερο συσχετίζονται με ιδιαίτερες κλινικές και φυσιολογικές φλεγμονώδεις και επανορθωτικές διαδικασίες<sup>15,38</sup>. Συνήθως τα φλεγμονώδη κύτταρα είναι παρόντα και ενεργοποιημένα στους αεραγωγούς ασθενών με σοβαρό άσθμα, παρά τη θεραπεία, αλλά η επίδραση τους στον έλεγχο και στη βαρύτητα της νόσου δεν είναι σαφής. Σε αυτή την κατηγορία κυττάρων ανήκουν, εκτός από τα ηωσινόφιλα και τα ουδετερόφιλα, και τα Τ-λεμφοκύτταρα, τα μαστοκύτταρα, τα μακροφάγα καθώς επίσης και τα δομικά κύτταρα που συμμετέχουν στις φλεγμονώδεις διαδικασίες και στην αναδιαμόρφωση στο άσθμα.

## ΗΩΣΙΝΟΦΙΛΙΚΟ ΑΣΘΜΑ

Το ηωσινοφιλικό άσθμα αποτελεί τον πιο μελετημένο παθολογικό ασθματικό φαινότυπο. Τα ηωσινόφιλα έχουν παρατηρηθεί σε διάφορα ποσοστά στα πτύελα, στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα και σε ενδοβρογχικές βιοψίες πολλών ασθματικών. Μελέτες οι οποίες έχουν αποκαλύψει ηωσινοφιλικό φαινότυπο από εξέταση πτυέλων ή βιοψία σε ασθενείς με ποικίλη βαρύτητα άσθματος, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι το 50% των ασθενών έχουν ηωσινοφιλική συμμετοχή<sup>38</sup>. Τα ηωσινόφιλα μπορεί να είναι ένας σημαντικός βιολογικός δείκτης για ορισμένα βασικά χαρακτηριστικά του σοβαρού άσθματος. Για παράδειγμα, η ομάδα των Bumbaccea et al.<sup>44</sup> συσχέτισε την παρουσία της χρόνιας απόφραξης των αεραγωγών με την ηωσινοφιλία, τόσο στα πτύελα (OR 7.7) όσο και στο αίμα (OR 6.3). Χρησιμοποιώντας κριτήρια που πρότειναν οι Wenzel και Busse<sup>7</sup>, το σοβαρό άσθμα μπορεί να χαρακτηριστεί ως θετικό ηωσινοφιλικό (Eos+) και ως αρνητικό ηωσινοφιλικό [Eos-] αντίστοιχα, σύμφωνα με την παρουσία ή μη ηωσινοφίλων στις ενδοβρογχικές βιοψίες. Οι Eos- βιοψίες τείνουν να είναι πλούσιες σε ουδετερόφιλα. Το ηωσινόφιλο κύτταρο, με την δυνατότητά του να απελευθερώνει φλεγμονώδεις μεσολαβητές, συχνά αποτελεί το κυρίαρχο κύτταρο που οδηγεί στην αναπνευστική δυσλειτουργία στο άσθμα. Μερικές μελέτες έχουν προτείνει ότι η ηωσινοφιλική φλεγμονή αυξάνει με τη σοβαρότητα της νόσου, αλλά πρόσφατα δεδομένα αμφισβητούν το βασικό ρόλο των ηωσινοφίλων στην παθογένεια του άσθματος<sup>82,83</sup>. Επίμονη ηωσινοφιλία και ενεργοποίηση Τ-κυττάρων σε συνδυασμό με χρήση κορτικοειδών, όπως έχει φανεί από μελέτες στο χρόνιο άσθμα,<sup>38,84,85</sup> υποδεικνύει ότι τα κορτικοειδή δεν μειώνουν επαρκώς τη φλεγμονώδη διαδικασία. Η μελέτη ENFUMOSA,<sup>10</sup> αν και δεν κατάφερε να αποδείξει σημαντικές



διαφορές στον πληθυσμό των ηωσινοφίλων μεταξύ των ομάδων των ασθματικών ασθενών, η επίμονη παρουσία των ηωσινοφίλων στα προκλητά πτύελα και η παρουσία αυξημένων επιπέδων LTE4 και EPX στα ούρα, παρά τη θεραπεία με κορτικοστεροειδή, δείχνει ότι η φλεγμονώδεις διεργασίες στο σοβαρό άσθμα δεν ελέγχονταν επαρκώς. Επίσης η ομάδα των Miranda et al.<sup>62</sup> έδειξαν ότι 2 στους 3 ασθματικούς με σοβαρή νόσο, εμφάνιζαν ηωσινόφιλα σε βιοψίες, παρά τη χρόνια θεραπεία με υψηλές δόσεις στεροειδών. Από αυτά και άλλα δεδομένα προκύπτει ένα σημαντικό χαρακτηριστικό του σοβαρού άσθματος: αντίσταση στις ευεργετικές επιδράσεις των εισπνεόμενων και συστηματικών στεροειδών.

Η επίμονη ηωσινοφιλική φλεγμονή στο σοβαρό άσθμα συχνά συσχετίζεται με έναρξη νόσου στην ενήλικη ζωή και ευαισθησία στην ασπιρίνη. Οι ασθενείς με ηωσινοφιλική φλεγμονή έχουν συχνά εντονότερα συμπτώματα, χειρότερο έλεγχο της νόσου και μεγαλύτερο κίνδυνο για παροξύνσεις σε σύγκριση με τους ασθενείς των άλλων φαινοτύπων<sup>25,86</sup>.

Οι μηχανισμοί της ηωσινοφιλικής φλεγμονής δεν είναι πλήρως γνωστοί. Η αναγνώριση ενός ηωσινοφιλικού φαινοτύπου γίνεται με την ανάλυση των πτυέλων και την ενδοβρογχική βιοψία. Επιπρόσθετα, η μέτρηση της συγκέντρωσης του εκπνεόμενου NO προτάθηκε ως εργαλείο στον προσδιορισμό των ασθενών με επίμονη ηωσινοφιλική φλεγμονή.<sup>87,88</sup> Γενικότερα η συγκέντρωση του εκπνεόμενου NO συνδέεται με τον αριθμό των ηωσινοφίλων στα πτύελα ή στα υλικά βιοψίας, ακόμη και σε ασθενείς που λαμβάνουν υψηλές δόσεις κορτικοστεροειδών.<sup>88</sup> Οι θεραπευτικές στρατηγικές που χρησιμοποίησαν το εκπνεόμενο NO για προσδιορισμό της θεραπευτικής δόσης των κορτικοειδών, ήταν μέχρι πρόσφατα αμφιλεγόμενες.<sup>89</sup> Ωστόσο, τελευταίες μελέτες παρέχουν θετικά αποτελέσματα από τη χρήση του NO ως οδηγού για την αποτελεσματικότερη θεραπεία του άσθματος.<sup>90,91</sup> Το κατά πόσο η ηωσινοφιλία αποτελεί μόνιμο φαινότυπο ή φαινότυπο εξαρτώμενο από μια συγκεκριμένη θεραπεία ή από συγκεκριμένο επίπεδο ελέγχου της νόσου, παραμένει αντικείμενο για περαιτέρω μελέτη. Παρ' όλη την αποδεδειγμένη παρουσία επίμονου ηωσινοφιλικού φαινοτύπου σε μια αναλογία ασθενών με μέτριο προς σοβαρό άσθμα, δυο μελέτες έδειξαν ότι η ηωσινοφιλική φλεγμονή μπορεί να υφίσταται σε μεγαλύτερη αναλογία ασθματικών ασθενών, σε σχέση με το τι ίσχυε μέχρι στιγμής, καθώς τώρα θεωρείται ότι ηωσινοφιλική φλεγμονή μπορεί να υπάρχει σε απομακρυσμένα σημεία του πνεύμονα, τα οποία δεν μπορούν να εκτιμηθούν με τις γνωστές υπάρχουσες μεθόδους. Σε μια μελέτη, περίπου το

50% των ασθενών με σοβαρό άσθμα, οι οποίοι ανήκαν σε μη ηωσινοφιλικό φαινότυπο, αποδείχθηκε αργότερα ότι εμφάνιζαν ηωσινοφιλική φλεγμονή σε απομακρυσμένα σημεία του πνεύμονα<sup>23,92</sup>.

Ίσως η σπουδαιότητα και αναγκαιότητα του προσδιορισμού ενός ασθματικού φαινοτύπου έγκειται στο ότι η εξειδικευμένη διαχείριση του κάθε φαινοτύπου βελτιώνει το αποτέλεσμα της θεραπείας. Υπάρχουν μελέτες, οι οποίες επέλεξαν ως στόχο το επίπεδο της ηωσινοφιλικής φλεγμονής στο σχεδιασμό τους και έδειξαν ότι ο προσδιορισμός και η διαχείριση της ηωσινοφιλικής φλεγμονής μπορεί να οδηγήσουν σε βελτιωμένα αποτελέσματα. Δύο, ευρείας κλίμακας μακροχρόνιες μελέτες έχουν συγκρίνει τις βασικές κατευθυντήριες οδηγίες θεραπείας με μια θεραπευτική προσέγγιση ανάλογα με τον αριθμό των ηωσινοφίλων στα πτύελα<sup>25,93</sup>. Στην πρώτη μελέτη, η οποία περιλάμβανε περίοδο θεραπείας ενός έτους, η θεραπευτική προσέγγιση αφορούσε στην μείωση του αριθμού των ηωσινοφίλων στα πτύελα σε ποσοστό μικρότερο του 3% του συνολικού πληθυσμού των φλεγμονωδών κυττάρων. Αυτό οδήγησε σε λιγότερες σοβαρές παροξύνσεις άσθματος, χωρίς ουσιώδη διαφορά της δοσολογίας των κορτικοστεροειδών συγκριτικά με την προσέγγιση σύμφωνα με τις βασικές κατευθυντήριες οδηγίες. Ίδια συμπεράσματα προέκυψαν και από τη δεύτερη ευρείας κλίμακας μελέτη.

Οι μηχανισμοί της ηωσινοφιλικής φλεγμονής δεν είναι επαρκώς κατανοητοί. Μολονότι η IL-5 και η εοταξίνη αποτελούν δύο παράγοντες με ηωσινοφιλικοτακτική δράση και έχουν βρεθεί αυξημένοι στο άσθμα, μελέτες έδειξαν ότι η στοχευμένη μείωση των προφλεγμονωδών αυτών μεσολαβητών δεν συνδυάστηκε με ανάλογη κλινική βελτίωση<sup>82,94</sup>. Εντούτοις, πρόσφατες μελέτες στοχευμένης θεραπείας με mepolizumab, ένα ανθρώπινο μονοκλωνικό αντίσωμα (mAb) με σοβαρές αντι-IL5 ιδιότητες, το οποίο δόθηκε σε ασθενείς με ηωσινοφιλικό άσθμα, έδειξαν ότι εκτός από μείωση των ηωσινοφίλων, παρατηρήθηκε και μείωση των παροξύνσεων<sup>95,96</sup>. Επομένως η θεραπεία με mepolizumab θα μπορούσε δυνητικά να αποτελέσει μια θεραπεία για την ηωσινοφιλική νόσο στο μέλλον.

## ΟΥΔΕΤΕΡΟΦΙΛΙΚΟ ΑΣΘΜΑ

Το σοβαρό άσθμα μπορεί, επίσης, να συνδέεται με ουδετεροφιλική φλεγμονή<sup>10,97</sup>, αλλά ο ακριβής ρόλος των ουδετεροφίλων παραμένει αδιευκρίνιστος. Πολλοί ασθενείς με ουδετεροφιλική φλεγμονή ενδέχεται να εμφανίζουν συνυπάρχουσα ηωσινοφιλική φλεγμονή, διαπιστωμένη σε βιοψία ιστού, ενώ ταυτόχρονα από την εξέταση των πτυέλων τους να προκύπτει υπεροχή ουδε-

τεροφίλων ή ηωσινοφίλων<sup>38</sup>. Το ουδετεροφιλικό άσθμα συναντάται συνήθως σε ασθενείς με σοβαρή πάθηση και έχει διαπιστωθεί σε νεκροτομές ασθενών, οι οποίοι πέθαναν αμέσως μετά από μια σοβαρή παρόξυνση<sup>98</sup>.

Η αιτία της ουδετεροφιλικής φλεγμονής στο άσθμα δεν είναι πλήρως κατανοητή. Η συσχέτιση με το σοβαρό άσθμα ίσως αποδίδεται στη θεραπεία με υψηλές δόσεις κορτικοστεροειδών, τα οποία μειώνουν την απόπτωση των ουδετεροφίλων *in vitro*<sup>99</sup>. Η ουδετεροφιλία μπορεί να εμφανίζεται ως μια αδιάκοπη διήθηση κυττάρων από την αιματική κυκλοφορία εξαιτίας του συνεχούς αντιγονικού ερεθισμού των βρόγχων ή εξαιτίας των υψηλών συγκεντρώσεων των στεροειδών. Ορισμένοι μεσολαβητές, συνδεδεμένοι με τα ουδετερόφιλα (λευκοτριένιο (LT)B<sub>4</sub>, ιντερλευκίνη (IL)8, ενεργοποιηός πρωτεΐνη (AP)1a, TNFα) φαίνεται ότι είναι αυξημένοι στο σοβαρό άσθμα<sup>97</sup>. Οι μεσολαβητές αυτοί προκαλούν χημειοταξία, ενεργοποίηση, αύξηση της επιβίωσης ουδετεροφίλων και ενεργοποίηση των μορίων ενδοθηλιακής προσκόλλησης. Ο υποδοχέας του επιθηλιακού αυξητικού παράγοντα (EGFR), ένας δείκτης της επιθηλιακής βλάβης, είναι αυξημένος αναλογικά με τη βαρύτητα της νόσου. Η έκφραση του EGFR στο βρογχικό επιθήλιο συνδέεται με την IL8, υποδεικνύοντας έτσι ότι ο EGFR μπορεί να συνεισφέρει στη διατήρηση της ουδετεροφιλικής φλεγμονής<sup>100</sup>.

Ο ουδετεροφιλικός φαινότυπος φαίνεται να ανταποκρίνεται λιγότερο στα κορτικοστεροειδή, από τον ηωσινοφιλικό φαινότυπο<sup>101</sup>. Αντι-ουδετεροφιλικές θεραπείες δεν έχουν συστηματικά μελετηθεί, επομένως δεν υπάρχουν μελέτες που επιτυχημένα στοχεύουν στη θεραπεία του συγκεκριμένου φαινότυπου.

## ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ ΑΣΘΜΑΤΟΣ ΜΕ ΑΠΟΥΣΙΑ ΑΥΞΗΣΗΣ ΚΟΚΚΙΟΚΥΤΤΑΡΩΝ

Το άσθμα από 30ετίας τουλάχιστον, θεωρείται ως φλεγμονώδης πάθηση, όμως πολλές μελέτες δείχνουν ότι υφίσταται ασθματική κατάσταση με απουσία αναγνωρισμένης εισροής φλεγμονωδών κυττάρων όπως ηωσινοφίλων, ουδετεροφίλων ή λεμφοκυττάρων<sup>38</sup>. Η φλεγμονή μπορεί να εμφανίζεται με λιγότερο συνήθεις χαρακτήρες, πιθανώς, λόγω ενεργοποίησης των ενδογενών κυττάρων του πνεύμονα όπως των μαστοκυττάρων, επιθηλιακών ή μυϊκών κυττάρων. Δυστυχώς, για το φαινότυπο αυτό του άσθματος, δεν έχουν προσδιορισθεί βιολογικοί δείκτες. Φαίνεται από μερικές μελέτες ότι οι ασθενείς αυτού του τύπου δεν ανταποκρίνονται στα κορτικοειδή και αντίθετα, η μείωση των κορτικοειδών μπορεί να είναι αποτελε-

σματικότερη<sup>102</sup>. Οπωσδήποτε όμως, πρέπει να υφίσταται αύξηση της φλεγμονής στους ασθενείς αυτούς κατά τη διάρκεια ενός ασθματικού παροξυσμού ή ως απάντηση στη μείωση των κορτικοειδών έτσι ώστε, τελικά, αυτοί οι ασθενείς να παρουσιάσουν αργότερα αύξηση των κοκκιοκυττάρων τους.

## ΓΟΝΙΔΙΑ ΚΑΙ ΑΣΘΜΑ

Ορισμένα γονίδια που ήδη έχουν αναγνωρισθεί, περιέχουν πολυμορφισμούς που επηρεάζουν την ανάπτυξη του ανοσοποιητικού και αναπνευστικού συστήματος καθώς και την απάντηση στην έκθεση σε περιβαλλοντικούς παράγοντες, αυξάνοντας έτσι τον κίνδυνο ανάπτυξης άσθματος. Πάνω από 100 γονίδια έχουν αναφερθεί να συνδέονται με το άσθμα και σχετικούς φαινοτύπους όπως π.χ. τα NOS3, FCER1B, IL4RA, ADAM33, GRPA, SPINK5, ORMFL3, MYLK, ECP, CYLTR1, CD14 και μερικοί από τους Toll-like υποδοχείς.<sup>103-107</sup> Το 2006-2007 μόνο, υπήρχαν 53 υποψήφιοι συνδυασμοί γονιδίων στη βιβλιογραφία<sup>108</sup>. Στις μελέτες προτείνονται συγκεκριμένοι γονότυποι που ενδέχεται να σχετίζονται με το άσθμα που εμμένει στην ενήλικη ζωή. Μια μελέτη έδειξε ότι ασθματικοί ασθενείς ομοζυγώτες Arg16-Gly27 είχαν τάση να εμφανίζουν επαναλαμβανόμενα επεισόδια στυρίπτουσας αναπνοής ως ενήλικες. Εντούτοις, αυτός ο τύπος παρουσιάζει μικρή συχνότητα (3%) στους ασθματικούς ενήλικες<sup>109</sup>. Επιπλέον ο τύπος του γονιδίου του αδρενεργικού υποδοχέα β2 επηρεάζει τη μακροχρόνια απάντηση στους β2 διεγέρτες και οι ασθενείς που είναι ομοζυγώτες στις μεταλλάξεις Arg-Arg, ίσως θα έπρεπε να αποφεύγουν τους β2 διεγέρτες στη θεραπεία του άσθματός τους<sup>110</sup>.

Η γενετική διερεύνηση της προδιάθεσης άσθματος είναι σύνθετη. Μερικές φορές ο ίδιος γονότυπος ευθύνεται για προστασία ή κίνδυνο άσθματος, ανάλογα με τις εκάστοτε περιβαλλοντικές επιδράσεις.

## ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΚΑΘΟΡΙΣΜΟΣ ΦΑΙΝΟΤΥΠΩΝ ΤΟΥ ΣΟΒΑΡΟΥ ΑΣΘΜΑΤΟΣ

Έχει ήδη αναφερθεί παραπάνω ότι τουλάχιστον μερικοί ασθενείς με σοβαρό άσθμα χαρακτηρίζονται κατά κύριο λόγο είτε από ουδετεροφιλική είτε από ηωσινοφιλική φλεγμονή στις ενδοβρογχικές βιοψίες<sup>15,38</sup>. Οι ασθενείς με ηωσινοφιλικό άσθμα, ειδικότερα αυτοί με πρώιμη έναρξη νόσου και σχετική αναδιαμόρφωση αεραγωγών, εμφανίζουν αυξημένη επίπτωση σχεδόν θανατηφόρων συμβαμάτων. Ωστόσο, είναι δυνατόν να μην υπάρχουν

διαφορές μεταξύ των ηωσινοφιλικών και των μη ηωσινοφιλικών φαινοτύπων<sup>23</sup>. Συνδυαζόμενες αυτές οι παρατηρήσεις υποδηλώνουν ότι το σοβαρό άσθμα είναι μια ιστολογικά ετερογενής διαταραχή για την οποία δεν έχει βρεθεί ακόμη μια αντικειμενική μέθοδος διαφοροποίησης των σημαντικών κλινικών υποτύπων.

Οι ασθενείς με σοβαρό άσθμα δεν εμφανίζουν πάντοτε τις ίδιες φλεγμονώδεις διαδικασίες, γεγονός που υποδηλώνει ότι ίσως εκφράζουν και ιδιαίτερους τύπους κυτταροκινών στους αεραγωγούς τους, συγκρινόμενοι με ασθενείς με μη σοβαρό άσθμα. Η ομάδα των Brasier et al.<sup>22</sup> ερεύνησε την υπόθεση αυτή συγκρίνοντας με εξειδικευμένες μεθόδους την έκφραση των χαρακτήρων των κυτταροκινών των αεραγωγών στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (BAL) δυο ισοδύναμων ομάδων ασθενών με σοβαρό και μη σοβαρό άσθμα. Η τελική πρόθεση των ερευνητών ήταν να καθορίσουν επαρκώς τους ασθματικούς φαινότυπους επί τη βάση των μοριακών χαρακτήρων τους. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι 4, ανεξάρτητες θεραπείες, ομάδες (G1-G4) ασθματικών φαινοτύπων μπορούσαν να αναγνωριστούν στατιστικά. Η σύγκριση των ομάδων αυτών μεταξύ τους έδειξε ότι οι ομάδες διέφεραν σε περισσότερες από 15 μεταβλητές με σημαντικότερες τον κυτταρικό πληθυσμό του BAL (ηωσινόφιλα, κυψελιδικά μακροφάγα) και τις μετρήσεις της πνευμονικής λειτουργίας. Η ομάδα G1 περιελάμβανε ασθενείς με σημαντικά μειωμένη FEV1, FVC και αναστρεψιμότητα με τη βρογχοδιαστολή καθώς και υψηλές τιμές IL2 που καθορίστηκαν ως ασθενείς με σοβαρό άσθμα σύμφωνα με τα κριτήρια της ATS. Αντίθετα, η ομάδα G2 περιείχε ασθενείς με τις καλλίτερες τιμές πνευμονικής λειτουργίας και υψηλές τιμές IL-1Ra που καθορίστηκαν ως ασθενείς με μη σοβαρό άσθμα σύμφωνα με τα κριτήρια ATS. Η ομάδα G3 είχε ασθενείς με υψηλές τιμές IL10 ενώ η ομάδα G4 είχε ασθενείς με αυξημένα επίπεδα IL-2R και άλλες κυτταροκίνες. Ως προγνωστικοί παράγοντες της για την ομάδα του σοβαρού άσθματος (G1) αναγνωρίστηκαν από τη μελέτη των Brasier et al. δέκα κυτταροκίνες που είναι οι παρακάτω ανάλογα με τη σημαντικότητά τους: IL-1Ra, MIP-1a, MIG, IL-15, IL-2R, IP-10, IL-4, IL-6, MCP-1 και IL-2. Επίσης, στη μελέτη αυτή, η στατιστική διερεύνηση έδειξε ότι πρόγνωση της αυξημένης απάντησης στη μεταχολίνη μπορούσε να γίνει με 88% ακρίβεια. Οι κυτταροκίνες οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν στο μοντέλο αυτό ήταν οι IL2, IL4 και IL5. Βάσει αυτής της ταξινόμησης, 3 ξεχωριστές ομάδες με αυξημένη απάντηση στη μεταχολίνη, εμφάνισαν διαφορές στον ηωσινοφιλικό πληθυσμό του BAL και στη PC20 μεταχολίνης.

Αυτή η μελέτη παρείχε την πρώτη απόδειξη ότι συ-

γκεκριμένοι τύποι κυτταροκινών μπορούν να ανιχνευτούν και να ερμηνευτούν στο BAL ασθματικών ασθενών και να συνεισφέρουν έτσι αντικειμενικότερα στην ταξινόμηση της πάθησης. Οι συγγραφείς ερμήνευσαν αυτά τα αποτελέσματα προτείνοντας οι ασθενείς με παρόμοια κλινικά χαρακτηριστικά να αποτελούν σύμπλεγμα ετερογενών υποτύπων οι οποίοι μπορούν να διαχωριστούν περαιτέρω επί τη βάση των χαρακτήρων των κυτταροκινών του BAL. Φαίνεται επομένως, ότι στις αναπνευστικές εκκρίσεις αναγνωρίζονται νέες σημαντικές διαγνωστικές και προγνωστικές πληροφορίες που δείχνουν ότι η μελλοντική έρευνα για την καλύτερη ταυτοποίηση των βιολογικών δεικτών θα είναι εξαιρετικά βοηθητική.

## ΣΥΜΠΛΕΓΜΑΤΑ ΦΑΙΝΟΤΥΠΩΝ

Οι ασθενείς που πάσχουν από άσθμα εμφανίζουν χαρακτηριστικά διαφόρων φαινοτύπων, γεγονός που δημιουργεί δυσκολίες στην απόλυτη επιλογή ασθενών για συμμετοχή σε επιδημιολογικές ή ερευνητικές μελέτες αφενός, και στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων των μελετών αυτών, αφετέρου. Πρόσφατες περιγραφές των ασθματικών φαινοτύπων περιορίζονται από υποκειμενικότητα και πτωχή συνοχή. Επιβάλλεται λοιπόν η δημιουργία ενός συγκροτημένου συστήματος ταξινόμησης που να αξιολογεί την πολυδιάστατη φύση του άσθματος έτσι ώστε να προσδιορίζει υποομάδες ασθενών με τα ίδια χαρακτηριστικά νόσου<sup>11</sup>. Μια σημαντική μελέτη από τους Haldar και συνεργάτες<sup>12</sup>, έχει προτείνει την ανάλυση των ασθματικών πληθυσμών σύμφωνα με συμπλέγματα φαινοτύπων (clusters) που περιλαμβάνουν υποομάδες διαφόρων χαρακτηριστικών του άσθματος, με σκοπό την αρτιότερη ερμηνεία των διαφορών που παρατηρούνται στα αποτελέσματα της θεραπείας του άσθματος. Σ' αυτήν τη μελέτη, ομάδες ασθενών με καθ'υπεροχή ήπια προς μέτρια νόσο, οι οποίες παρακολουθούνταν στη πρωτοβάθμια φροντίδα υγείας, συγκρίθηκαν με ασθενείς με δύσκολο στη θεραπεία άσθμα που αντιμετώπιζονταν στη δευτεροβάθμια φροντίδα υγείας. Συμπληρωματικά οι συγγραφείς αυτής της μελέτης, συνέκριναν διαφορές σε παραμέτρους του άσθματος (συχνότητα παροξύνσεων και μεταβολές στη δόση των κορτικοστεροειδών σε 12 μήνες) σε μια άλλη ομάδα ασθενών με δύσκολο άσθμα, είτε ελαχιστοποιώντας την ηωσινοφιλική φλεγμονή στα πτύελα (στρατηγική θεραπείας καθοδηγούμενη από την φλεγμονή) είτε με την κλασική κλινική αντιμετώπιση της νόσου. Σύμφωνα με τη μελέτη, 2 φαινότυποι (συμπλέγματα χαρακτηριστικών - clusters), το πρώιμης έναρξης ατοπικό άσθμα και το άσθμα παχύσαρκων ασθενών με απουσία

ηωσινοφίλων ήταν κοινά και στους πληθυσμούς με ήπιο ή/και μέτριο άσθμα και στην ομάδα του δύσκολου στη θεραπεία άσθματος με τη διαφορά ότι η βαρύτητα των χαρακτηριστικών του άσθματος κάθε ομάδας ήταν ανάλογη της βαρύτητας του άσθματος. Αντίθετα, δύο άλλοι φαινότυποι (clusters) που χαρακτηρίζονταν από σημαντική ασυμφωνία ανάμεσα στην έκφραση των συμπτωμάτων και στην ηωσινοφιλική φλεγμονή των αεραγωγών, όπως είναι το πρώιμης έναρξης ατοπικό άσθμα και το καθυστερημένης έναρξης άσθμα με υπεροχή της φλεγμονής των αεραγωγών, ήταν ειδικό για το δύσκολο άσθμα. Η καθοδηγούμενη από τη φλεγμονή στρατηγική αντιμετώπισης ήταν αποτελεσματικότερη και στους δύο αυτούς τύπους άσθματος: μείωση της συχνότητας των παροξυσμών στο άσθμα με αυξημένη φλεγμονή των αεραγωγών και μείωση της δόσης των κορτικοστεροειδών στο άσθμα με υπεροχή των συμπτωμάτων.

Για παράδειγμα, χρησιμοποιώντας μια προσέγγιση της νόσου καθοδηγούμενη από την ύπαρξη φλεγμονωδών κυττάρων στα πτύελα, στην περίπτωση του παχύσαρκου μη ηωσινοφιλικού φαινότυπου, ο οποίος στη μελέτη των Haldar et al. ήταν κοινός και στους δύο πληθυσμούς του ήπιου προς μέτριο άσθμα και του σοβαρού άσθματος, τα συμπτώματα δεν συσχετιζόνταν με την ηωσινοφιλική φλεγμονή των αεραγωγών. Δεδομένης της αναγνωρισμένης συσχέτισης μεταξύ της ηωσινοφιλικής φλεγμονής και της ανταπόκρισης στα στεροειδή στο άσθμα, η αναφερόμενη αντίσταση στα στεροειδή στους παχύσαρκους ασθενείς<sup>113</sup> μπορεί εν μέρει να εξηγηθεί από τη μη ύπαρξη ηωσινοφίλων στα πτύελα. Επομένως, χρησιμοποιώντας τη συμβατική κλινική στρατηγική αντιμετώπισης του άσθματος, χωρίς έλεγχο του τύπου της φλεγμονής των αεραγωγών, μπορεί να υπάρξει αυξημένη χρήση κορτικοστεροειδών για την αντιμετώπιση της πάθησης χωρίς ουσιαστική βελτίωση των συμπτωμάτων ενώ, πιθανώς, στρατηγικές που βελτιώνουν τη συμμόρφωση στη θεραπεία θα μπορούσαν να έχουν καλύτερο αποτέλεσμα.

Το ακόλουθο κεφάλαιο: "Χαρακτηριστικά ασθενών" θα μπορούσε πιθανότατα να εξηγηθεί από την παραπάνω ταξινόμηση των ασθματικών ασθενών και διαφορετικοί τρόποι αντιμετώπισης θα μπορούσαν να δημιουργήσουν μεγαλύτερο θεραπευτικό αποτέλεσμα. Περαιτέρω έρευνα απαιτείται για να φωτισθούν οι δυσκολίες στον προσδιορισμό των φαινοτύπων.

## ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΣΘΕΝΩΝ

Οι περισσότεροι ασθματικοί ασθενείς δεν ακολουθούν τα χαρακτηριστικά ενός και μόνον φαινότυπου αλλά

περισσότερο ταιριάζουν με πολλούς φαινότυπους. Δυο περιπτώσεις ασθενών από την προσωπική μας εμπειρία αναδεικνύουν αυτή την αλληλεξάρτηση φαινοτύπων.

Η πρώτη περίπτωση είναι μια Ελληνίδα που γεννήθηκε πρόωρα το 1964 με μικρό βάρος κατά τη γέννηση (1,5kg). Έχει μια μονοζυγωτική αδελφή με άσθμα. Δεν κάπνισε ποτέ και έχει μη ατοπικό άσθμα και ρινίτιδα από τη πολύ αρχική παιδική ηλικία. Η ασθενής εργάστηκε επί 15 χρόνια σε εργοστάσιο επεξεργασίας βάμβακος από όπου σταμάτησε το 2000 λόγω έντονης δύσπνοιας. Υπάρχουν στο ιστορικό της και συνεχίζουν οι συχνές εισαγωγές στο νοσοκομείο και οι επείγουσες επισκέψεις για σοβαρούς ασθματικούς παροξυσμούς, χωρίς, όμως, ποτέ να έχει διασωληνωθεί. Παρουσιάζει καθημερινά ασθματικά συμπτώματα με συρίττουσα αναπνοή, βήχα και σφίξιμο στο στήθος που γίνονται εντονότερα κατά την εισπνοή κρύου αέρα, καπνών ή κατά την εποχή της ζέστης καθώς επίσης και με τις αναπνευστικές λοιμώξεις. Με την πάροδο του χρόνου ανέπτυξε γαστροοισοφαγική παλινδρόμηση και αποφρακτική άπνοια στον ύπνο, αυξήθηκε το βάρος της και από το 2002 διαπιστώθηκαν ρινικοί πολύποδες και ιγμορίτιδα. Δεν μπορεί να μειώσει τη μεθυλπρεδνιζολόνη κάτω από 24mg/ημέρα χωρίς να πάθει πιο συχνούς ασθματικούς παροξυσμούς. Εκτός από τη μεθυλπρεδνιζολόνη, η θεραπεία της περιλαμβάνει υψηλές δόσεις συνδυασμού κορτικοειδούς και β2 διεγερτών μακράς δράσης, β2 ταχείας δράσης κατ'επίκληση, αντι-λευκοτριενικό, ομепραζόλη και ασβέστιο. Τα εισπνεόμενα και συστηματικά στεροειδή ξεκίνησαν τουλάχιστον 30 χρόνια μετά την έναρξη του άσθματός της. Το 2005 έμεινε 2 φορές έγκυος αλλά με αποτέλεσμα παλίνδρομο κύηση οφειλόμενη σε χαμηλό PO<sub>2</sub> και κορεσμό HbSO<sub>2</sub>. Η IgE της είναι χαμηλή, και έτσι δεν μπορεί να λάβει αντι-IgE θεραπεία. Το 2006 παρουσίασε υπερθυρεοειδισμό, ο οποίος αντιμετωπίζεται αποτελεσματικά με θυροξίνη, και κατάθλιψη για την οποία δεν δέχεται να πάρει τακτική αγωγή. Στα εξωτερικά ιατρεία ελέγχεται ανά εβδομάδα ή μηνιαίως.

Η εξέταση έδειξε ένα ήπιο cushing προσώπιο. Η αξονική θώρακος δείχνει βρογχεκτασίες, δεν έχει αλλεργική βρογχοπνευμονική ασπεργίλλωση (RAST για ασπέργιλλο αρνητικό, αντισώματα αρνητικά) και δεν έχει, επίσης, σύνδρομο Churge-Strauss. Πρόσφατα, η σπιρομέτρηση δείχνει αποφρακτικό σύνδρομο με FEV<sub>1</sub>/FVC 62% της αναμενομένης και FEV<sub>1</sub>/FVC 62% της αναμενομένης τιμής χωρίς απάντηση στη βρογχοδιαστολή. Η PO<sub>2</sub> είναι 58mmHg και η PCO<sub>2</sub> αυξάνει σε 50mmHg (6.7 kPa). Χρησιμοποιεί O<sub>2</sub> καθημερινά. Δεν μπορεί να εκτελεί εύκολα τις καθημερινές της δραστηριότητες, έχει σοβαρή ιγμορίτιδα

και πυώδη απόχρεμψη στην οποία έχει καλλιεργηθεί στρεπτόκοκκος ή αιμόφιλος και νοσηλεύεται 3 φορές το χρόνο.

Το άσθμα αυτής της ασθενούς είναι κορτικοεξαρτώμενο που απαιτεί υψηλές δόσεις κορτικοειδών από το στόμα αν και έλεγχος του άσθματος δεν επιτυγχάνεται ποτέ πλήρως. Δεν έχει αυξημένα ηωσινόφιλα στο αίμα της, η οποιαδήποτε, όμως, προσπάθεια μείωσης των κορτικοειδών δεν είχε επιτυχία. Επιπλέον, το άσθμα αυτής της ασθενούς παρουσιάζει χαρακτηριστικά και άλλων φαινοτύπων όπως του φαινοτύπου με συχνές παροξύνσεις ή με μόνιμο περιορισμό της ροής καθώς και επαγγελματική έκθεση σε ενδοτοξίνη της σκόνης του βάμβακος που πιθανώτατα επιδείνωσε τα συμπτώματά της. Οι εργαζόμενοι σε επεξεργασία βάμβακος επί περισσότερα από 10 χρόνια παρουσιάζουν μακροχρόνια απώλεια της πνευμονικής λειτουργίας και πιθανώς μόνιμη σοβαρή αναπνευστική ανεπάρκεια<sup>114,115</sup>. Η ασθενής αυτή είναι σοβαρά καταθλιπτική χωρίς κατάλληλη θεραπεία και όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η ψυχολογική δυσλειτουργία θεωρείται ένας από τους πλέον σημαντικούς επιβαρυντικούς παράγοντες για συχνές παροξύνσεις.

Παρ' όλα αυτά, δεν είναι όλοι οι ασθενείς με σοβαρό άσθμα στην ίδια κατάσταση. Ο δεύτερος ασθενής είναι Έλληνας άνδρας 53 ετών που παρουσιάστηκε σε μας με σοβαρό επιμένον άσθμα και ήθελε να λάβει μέρος σε ερευνητική μελέτη για το άσθμα. Δεν έχει καπνίσει ποτέ και το άσθμα του ξεκίνησε στην ηλικία των 40 χρόνων. Δεν διασωληνώθηκε ποτέ και παίρνει από του στόματος κορτικοειδή για έλεγχο του άσθματος από 4ετίας. Τελευταία αισθάνεται συρίττουσα αναπνοή και σφίξιμο στο στήθος ακόμα και με την ελάχιστη κόπωση. Η θεραπευτική του αγωγή περιλαμβάνει συνδυασμό υψηλών δόσεων στεροειδών ως θεραπεία συντήρησης και ανακούφισης. Η FEV1 είναι 0.70L (35% της αναμενομένης) και η FVC 1.4L (60% της αναμενομένης τιμής) χωρίς απάντηση στη βρογχοδιαστολή. Η διαχυτική ικανότης ήταν φυσιολογική. Ο ασθενής επίσης, παρουσιάζει αποφρακτική άπνοια στον ύπνο από το 2004 και χρησιμοποιεί C-PAP, η PO<sub>2</sub> είναι συνήθως περίπου 68mmHg χωρίς αύξηση PCO<sub>2</sub> και παρουσιάζει έναν βαρύ ασθματικό παροξυσμό ανά 2 έτη, περίπου.

Χρειάζεται καθημερινά στεροειδή από του στόματος για αποφυγή επιδείνωσης χωρίς όμως, να βελτιώνονται ούτε τα ημερήσια συμπτώματα ούτε η πνευμονική λειτουργία μετά μακροχρόνια χορήγηση. Επομένως, ο ασθενής ανήκει στο φαινότυπο με μόνιμη απόφραξη της ροής οφειλόμενη πιθανώς σε μερική αντίσταση στα κορτικοειδή και επιπλέον έχει άσθμα όψιμης έναρξης.

Ο ασθενής αυτός, αν και μοιράζεται κοινά χαρακτηριστικά με την προηγούμενη ασθενή, δεν έχει την επιβαρυντική επαγγελματική έκθεση και δεν είναι επιφορτισμένος ψυχολογικά. Αντίθετα, ζει μια σχεδόν φυσιολογική ζωή χωρίς σοβαρά επιβαρυνμένη ποιότητα.

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Πολλοί φαινότυποι του άσθματος έχουν περιγραφεί. Όμως αυτές οι περιγραφές δεν βασίζονται σε απόλυτη κατανόηση της παθοβιολογίας των φαινοτύπων. Συνήθως, είναι δύσκολο να συνδεθούν ή να συγκριθούν οι διάφορες μελέτες που περιλαμβάνουν φαινοτύπους άσθματος όχι καλά διαφοροποιημένους. Σημαντική πρόοδος έχει γίνει στο πρόσφατο παρελθόν σε σχέση με την κατανόηση της παθοβιολογίας του άσθματος. Με την ύπαρξη νέων θεραπειών σημαντική προσπάθεια πρέπει να γίνει προς την κατεύθυνση της αναγνώρισης της αποτελεσματικότητας κάθε θεραπευτικής προσέγγισης. Η πρόοδος της έρευνας επί της συσχέτισης γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων καθώς και η συσχέτιση γονοτύπων και φαινοτύπων ως προς την παθοβιολογία του άσθματος προσφέρει περισσότερα δεδομένα ώστε να προσδιορισθούν καλλίτερα οι διάφοροι φαινότυποι. Στη συνέχεια, αυτό θα οδηγήσει στην ταυτοποίηση βιολογικών δεικτών που θα προσφέρουν ακόμα μεγαλύτερη ακρίβεια στον προσδιορισμό των φαινοτύπων με τελικό αποτέλεσμα ασφαλέστερες και αποτελεσματικότερες θεραπείες για το άσθμα.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(Βλέπε αγγλικό κείμενο)



# Severe Asthma: Definitions, risk factors and phenotype characterization

Penny Moraitaki,  
Despina Papamichail,  
Niki Georgatou

5<sup>th</sup> Pneumology Department, Athens Chest Hospital "Sotiria"

**Key words:**

- asthma
- phenotypes
- severe asthma

**SUMMARY.** The correct diagnosis of asthma is usually made easily and most patients with asthma respond to therapy. Approximately 5-10% of patients with asthma, however, have disease that is difficult to control despite administration of maximal doses of inhaled medications. It appears that asthma is a heterogeneous disorder which presents not as a single disease but rather as a complex of multiple, separate syndromes that overlap. Although the various different phenotypes of asthma have been long recognized, they are still poorly characterized. Improved phenotypical characterization and understanding of the underlying pathobiology are necessary for linkage of specific genotypes with clinical disease manifestations, for possible development of biomarkers and for devising advanced, phenotype-targeted asthma treatment. This review reports on the asthma phenotypes that have been best described and analyses the methods used to define them. *Pneumon 2010, 23(3):276-292.*

## INTRODUCTION

Asthma is a chronic inflammatory disease of the airways characterized by recurrent episodes of symptomatic airflow obstruction and various degrees of hyperreactivity of the airways to non specific stimuli. The recognition that the disease has a chronic inflammatory component has directed treatment towards the early use of inhaled glucocorticoids, which typically produce significant reduction in inflammatory markers and improvement in pulmonary function. A subset of patients, however, in the range of 5% to 10%, with severe or refractory asthma<sup>1</sup> does not respond to glucocorticoid treatment. These patients account for 40% to 50% of the health costs of asthma and incur significant morbidity and decrement in their quality of life<sup>2,3</sup>.

A phenotype is defined as "the observable characteristics of an organism resulting from the interaction between its genetic make up and the environment". Asthma probably consists of a collection of different phenotypes, rather than one single disease. These phenotypes are all generally categorized under the broad umbrella of "asthma" because they meet the simple criteria for clinical diagnosis of this disease. Studies now suggest that identifica-

**Correspondence to:**

Penny Moraitaki M.D  
Resident in Pneumology  
5th Pneumology Clinic,  
Hospital for Diseases of the Chest "Sotiria"  
152 Mesogion Av.  
Athens 115 27, Greece  
E-mail: pmoraitaki@gmail.com

tion of the phenotype of asthma in a specific patient can assist in individualized management and treatment. The better understanding of a phenotype is accompanied by improved insight into the genetic and environmental factors involved in the presentation of complex diseases such as asthma. The objective of this review is to define, through characterization of phenotypes, novel points at which immunological and pharmacological interventions can be introduced in the treatment of asthma

## THE DEFINITION OF SEVERE ASTHMA

Severe asthma affects a small, but clinically and economically important, proportion of patients with asthma, who experience frequent and/or debilitating symptoms and limitation of their activities. These patients have frequent exacerbations and hospitalizations and account for over half of the costs of the disease and most of its mortality<sup>4,5</sup>. According to the definition of the Global Initiative for Asthma (GINA), patients should be classified as having severe persistent asthma when they experience daily symptoms, frequent exacerbations, frequent nocturnal asthma symptoms, limitation of physical activities, and forced expiratory volume in 1 sec (FEV<sub>1</sub>) or peak expiratory flow (PEF)  $\leq 60\%$  predicted and PEF or FEV<sub>1</sub> variability  $\geq 30\%$  before initiation of treatment<sup>4,5</sup>. The GINA definition of severe asthma is imprecise, rendering the guidelines not particularly useful for most research purposes, with the result that investigators have developed more rigorous working definitions for severe asthma that can be implemented consistently in clinical studies. Several different working definitions of severe asthma have been employed in recent studies<sup>6</sup>.

The American Thoracic Society (ATS) in 2000, through an expert workshop, developed a working consensus definition of severe asthma, which although not perfect, remains the "state of the art" in the field. According to the ATS recommendations, up to 10% of asthma patients may be classified as severe, based on the consensus definition of persistent symptoms, air-flow limitation, emergency care visits and treatment (Table 1)<sup>7,8</sup>.

The Epidemiology and Natural History of Asthma: Outcomes and Treatment Regimens (TENOR) study<sup>9</sup> used a working definition of difficult-to-control asthma. TENOR subjects were considered to have severe or difficult to treat asthma based on their physicians' diagnosis. Thus, even patients with mild or moderate asthma were eligible for inclusion in the study if their treating physicians considered their asthma difficult to treat and they met all the

**TABLE 1.** The American Thoracic Society workshop consensus for definition of severe/refractory asthma

### Major criteria

- Treatment with continuous or near-continuous ( $\geq 50\%$  of year) oral corticosteroids
- Requirement for treatment with high-dose inhaled corticosteroids

### Minor criteria

- Requirement for additional daily treatment with a controller medication,
- Asthma symptoms requiring short-acting  $\beta$ -agonist use on a daily or near-daily basis
- Persistent airway obstruction (FEV<sub>1</sub>  $< 80\%$  predicted; diurnal peak expiratory flow variability  $> 20\%$ )
- One or more urgent care visits for asthma per year
- Three or more oral steroid bursts per year
- Prompt deterioration with  $\leq 25\%$  reduction in oral or inhaled corticosteroid dose
- Near-fatal asthma event in the past

Severe asthma requires one or both major criteria and at least two minor criteria

other inclusion criteria, namely care from their physician or healthcare provider for at least 1 year and increased use of the healthcare system (i.e., 2 or more unscheduled care visits for asthma or 2 or more oral steroid bursts) and/or high use of antiasthma medication (i.e., currently requiring 3 or more medications to control asthma, the need for high doses of inhaled steroids or current use of oral prednisone  $> 5\text{mg/day}$ ) in the previous 12 months. This approach may have a closer link to the clinical practice of asthma management, but has the disadvantage of variation, or inconsistency in implementation. Despite this limitation, the TENOR study showed that healthcare resource utilization among patients with asthma patients was highest in those who had severe asthma, suggesting that by adding measures of healthcare utilization to the traditional measures of asthma severity, further understanding of disease activity will be achieved.

According to the ENFUMOSA study<sup>10</sup>, the definition of severe asthma was based on use of high-dose corticosteroid treatment and one or more exacerbations in the last year. Requirements for additional treatment, abnormal lung function, or specific measures of daily asthma control are not included in the definition. Consequently, the populations of patients with severe asthma enrolled according to the ENFUMOSA definition, although similar in steroid requirements, were different from those enrolled in studies according to the ATS consensus definition.

It is apparent that, at present, the picture of the diagnosis of "severe asthma" or "severe refractory asthma" is complex. No single measure is a valid discriminator and even two or three variables in combination fail to differentiate moderate from severe asthma. The latest definition, given 2 years ago, is as follows: "severe asthma is diagnosed in patients with refractory asthma that remain difficult to control despite a thorough re-evaluation of the diagnosis and after >6 months of close follow-up by a physician specializing in asthma"<sup>11</sup>.

Recently, guidelines have started to move away from the concept of severity of asthma and focus on monitoring and treatment according to levels of control. Asthma control represents the extent to which the clinical manifestations of asthma have been removed or reduced by treatment. Asthma severity is defined by the intensity of treatment required to achieve good asthma control and therefore should always be assessed only during treatment<sup>5</sup>.

### RISK FACTORS FOR SEVERE ASTHMA

Epidemiological studies have examined the relationship between possible risk factors and asthma severity. The Leiden Group (ten Brinke et al)<sup>12</sup>, conducted a study in which 13 clinical and environmental factors, all potentially associated with recurrent exacerbations, were investigated in 136 patients with severe asthma. The results showed that frequent exacerbations in difficult-to-treat asthma are strongly associated with psychological dysfunction (OR 10.8), recurrent respiratory tract infections (OR 6.9), gastro-oesophageal reflux (OR 4.9), severe paranasal sinus disease (OR 3.7) and obstructive sleep apnoea (OSA) (OR 3.4). It was also found that atopic patients, in particular those with specific IgE to house dust mite or cockroach, had >10-fold increased odds for frequent exacerbations compared with nonatopic patients. Identification and management of these specific factors might result in reduction of exacerbation rate, improved quality of life and better control of the disease.

The ENFUMOSA study showed that female sex, obesity and the lack of atopy were associated with more severe disease expression, while no childhood risk factors were identified<sup>10,13</sup>. More recently, data from the TENOR study showed that factors associated with increased risk of exacerbation and hospital admission were younger age, female sex, non-white race, BMI  $\geq 35$  kg/m<sup>2</sup>, post-bronchodilator FEV<sub>1</sub> <70% predicted, a history of pneumonia, diabetes, intubation for asthma and three or more steroid bursts

in the previous 3 months<sup>14</sup>. A final risk score ranging from 0–18 was derived from the logistic regression model in this cohort, which was highly predictive of hospitalization or emergency department (ED) visits. Scores of 0–4 represent low risk, scores of 5–7 moderate risk and a score of  $\geq 8$  represents high risk (Table II)<sup>15</sup>.

**TABLE II.** TENOR risk score for severe asthma exacerbations

Points	Variables
<b>3</b>	<b>Age yrs</b>
0:	$\geq 60$
1:	50–59
2:	35–49
3:	18–34
<b>1</b>	<b>Sex</b>
0:	Male
1:	Female
<b>2</b>	<b>Race/ethnicity</b>
0:	White
2:	Non-white
<b>1</b>	<b>BMI (kg/ m<sup>2</sup>)</b>
0:	<35
1:	>35
<b>2</b>	<b>Lung function</b>
0:	Post % pred FVC >70
2:	Post % pred FVC <70
<b>1</b>	<b>Previous history of pneumonia</b>
0:	No history
1:	Previous history
<b>1</b>	<b>Currently has diabetes</b>
0:	No
1:	Yes
<b>1</b>	<b>Currently has cataracts</b>
0:	No
1:	Yes
<b>1</b>	<b>Ever intubated</b>
0:	No
1:	Yes
<b>3</b>	<b>Steroid bursts in last 3 months</b>
0:	0 steroid bursts
1:	1 steroid bursts
2:	2 steroid bursts
3:	>3 steroid bursts
<b>1</b>	<b>Nebuliser ipratropium bromide</b>
0:	No
1:	Yes
<b>1</b>	<b>Systemic corticosteroids</b>
0:	Less than every other day
1:	At least every other day
<b>18</b>	<b>Total possible score</b>

BMI: body mass index; FVC: forced vital capacity.

In contrast to the ENFUMOSA patients, the TENOR cohort had a very high rate of skin test positivity for allergy<sup>16</sup>, and an association of IgE levels with asthma severity among younger patients<sup>17</sup>. In female children and adolescents, increased body weight was found to be associated with asthma severity<sup>18</sup>.

Compared with low risk scores (0–4 points), a TENOR risk score of moderate magnitude (5–7 points) reflects a 3.5-fold higher risk of an emergency department visit or hospitalization; a high value (>8 points) reflects a 12-fold higher risk<sup>14</sup>.

## PHENOTYPICAL CATEGORIES OF SEVERE ASTHMA

Numerous classifications of asthma have been made, based on cause (allergic, nonallergic, occupational), pathology (eosinophilic, noneosinophilic), severity and physiological parameters (type I brittle, type II brittle)<sup>19</sup>.

Allergic and non-allergic asthma are probably the best known and most commonly discussed phenotypes, but the determination of additional phenotypes has recently been considered necessary in asthma control. Asthma phenotypes based on age of onset, type of inflammation, pattern of severity and various other clinical characteristics have been recognized and used in clinical management, but they are poorly characterized and the underlying pathobiology is not well-defined.

A multiplicity of reviews or original studies have been published which report and analyse the broad categories of phenotypes<sup>6,10,20-22</sup>. A systematic review by S. Wenzel<sup>23</sup> proposes the classification of phenotypes into three categories: phenotypes defined by clinical or physiological criteria (severity-defined, exacerbation-prone, defined by chronic restriction, treatment-resistant, defined by age at onset), phenotypes related to specific triggers (aspirin or non-steroidal anti-inflammatory drugs, environmental allergens, occupational allergens or irritants, menses, exercise) and phenotypes defined by their pathobiology (eosinophilic, neutrophilic, pauci-granulocytic). This categorization is not intended to imply that there is no overlap between these groups; on the contrary, there is substantial interaction among the groups, as is shown from the common clinical picture of patients with asthma.

The aim of this review is to describe some of the characteristic features of the severe asthma phenotypes.

### Severity-defined asthma

It has been suggested that definitions of asthma

developed on the basis of lung function, symptoms and use of medication are not adequate for predicting either the course of asthma, the control of the disease or the response to treatment<sup>24,25</sup>. Treatment can significantly reduce asthma symptoms to a point where they are no longer troublesome. The term severe-refractory asthma is applied when there is inability of the appropriate treatment to reduce the symptoms to a sufficient degree for the patient to achieve good asthma control. For this reason, the severity of asthma must be evaluated only after at least six months of adequate treatment, but also after effective management of possible co-morbidities (rhinitis, gastro-oesophageal reflux, psychological dysfunction and others) and exacerbating environmental factors (allergens, occupational exposure)<sup>26</sup>. Poor compliance with treatment is also an important factor in patients with refractory asthma and must be taken into consideration before applying the phenotype of severe asthma to a specific patient.

Asthma severity may be influenced by the underlying disease activity and by the phenotype, both of which may be further described using pathological and physiological markers. These markers can also act as surrogate measures of future risk. Many biomarkers have been proposed for distinguishing between mild and severe asthma, but few have been confirmed by multiple studies. Such possible biomarkers include transforming growth factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ), interleukin (IL) 11, tumour necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), and IL-8<sup>27-32</sup>. Results from recent studies indicate that specific patterns of cytokines can be detected in bronchoalveolar lavage (BAL) from patients with asthma, which may in the future provide information for the more objective classification of asthma phenotypes, but this needs further investigation. This approach indicates that important new diagnostic and prognostic information is available in airway fluids and that future research in biomarker identification is likely to be fruitful.

### Exacerbation-prone asthma

Almost all patients with asthma will have at least one moderate-to-severe exacerbation, but some patients with asthma appear to be predisposed to frequent exacerbations, which can be very severe. This exacerbation-prone asthma phenotype accounts for more than 40% of the patients with severe asthma in the Severe Asthma Research Programme (SARP) Database sponsored by the US National Heart, Lung, and Blood Institute<sup>33</sup>. Since exacerbation-prone asthma is a hallmark of severe disease and poor outcome, the identification of immunopathological

factors that distinguish this phenotype is important. In studies from SARP, logistic regression analysis results suggested that several factors independently contribute to the severe exacerbating phenotype, including low FEV<sub>1</sub>, African race, early age at onset, and a history of exacerbation in response to aspirin or non-steroidal anti-inflammatory drugs, or before menses<sup>34</sup>. Other researchers have suggested that psychological disorders, including depression and anxiety, contribute to non-compliance and affect the frequency of exacerbations<sup>35</sup>. Patients with exacerbation-prone asthma appear to have a blunted dyspnoea response to worsening of airway obstruction, which can cause delayed recognition of symptoms<sup>36,37</sup>. This blunted dyspnoea response has been associated with an increase in eosinophilic inflammation, but conversely, other studies suggest that chronically high numbers of eosinophils in the airways are associated with increased susceptibility to exacerbations and with increased awareness of dyspnoea<sup>38</sup>.

In the study of ten Brinke et al.<sup>12</sup>, which was one of the most important studies on severe asthma with frequent exacerbations, the patients with frequent exacerbations experienced a total of 186 severe exacerbations, 37 hospital admissions, 335 hospitalized days and 69 emergency visits, in comparison with 24, 1, 10 and 15, respectively, in the control group with only one exacerbation in the last 12 months. The patients with frequent exacerbations were significantly younger (mean 38 years vs 47 years) and had shorter asthma duration (median 12 years vs 24.5 years), and more often had a positive family history for asthma and a positive atopic status. No significant difference was detected between the groups in the daily dose of inhaled corticosteroid or smoking history. Bronchodilator reversibility and airway hyperresponsiveness were increased in the patients with more than three exacerbations compared with the control group, but this difference disappeared after correction for age and asthma duration.

### **Fixed airflow limitation (chronic airflow restriction)**

Some patients with asthma present with marked airflow restriction but do not have serious symptoms or frequent exacerbations. Studies from the US National Heart, Lung, and Blood Institute Children's Asthma Management Program (CAMP) suggest that only a fraction of patients with childhood-onset asthma develops progressive loss of lung function over a 5-year period<sup>39</sup>. These children are more likely to be boys and are less allergic and less predisposed to exacerbations than the children with asthma who have no loss of lung function. Similar outcomes have

been seen in the TENOR study of more than 4,000 patients with severe or difficult to treat asthma<sup>24</sup>.

The findings of both CAMP and TENOR studies suggest that allergic features in asthma are more likely to be associated with exacerbation-prone or difficult to control asthma than with the phenotype associated with persistent severe airflow restriction. Whether or not allergic processes protect against profound loss of lung function is not known. No reported studies have differentiated patients with progressive loss of FEV<sub>1</sub> from those without, in terms of lung pathology, partly because there have been few longitudinal studies of asthma. Genetic studies have identified single nucleotide polymorphisms in ADAM33, IL-4, IL-4R and TGFβ1, each associated with lower than normal lung function. IL-4 single nucleotide polymorphisms have also been associated with near-fatal exacerbations of asthma.

Fixed airflow limitation is attributed to airway remodelling; a process that includes subepithelial basement membrane fibrosis, epithelial goblet cell hyperplasia, increase in blood vessels and proliferation of airway smooth muscle, along with increased mass because of hyperplasia and hypertrophy<sup>40</sup>, and has been associated with the ADAM33 gene<sup>41</sup>. Observations suggest the presence of heterogeneous fibroblast types in asthmatic airways and distal lung<sup>42</sup>.

A large subset has been identified of patients with severe asthma who manifest chronic airflow obstruction. The specific definition of chronic airflow obstruction varies, however; for example, ten Brinke et al<sup>43</sup> used a cutoff point of postbronchodilator FEV<sub>1</sub> <75% predicted, whereas Bumbacea et al<sup>44</sup> used a value of postbronchodilator FEV<sub>1</sub> <50% predicted. In both of these studies patients with chronic airflow limitation were older and had longer duration of disease. They also had elevated residual lung volumes consistent with air trapping, but normal diffusion capacity which is not suggestive of emphysema. Bronchial wall thickening seen on high-resolution computed tomography (CT) scan was associated with chronic airway obstruction. Patients with fixed airflow obstruction are often grouped under the heading of chronic obstructive pulmonary disease (COPD), and some international guidelines recommend classifying asthma with fixed airflow obstruction as COPD. Indeed, both COPD (induced by smoking or other noxious agents) and asthma may be associated with a decline in lung function that causes fixed airflow obstruction. Subjects with a history of asthma were found to have significantly more eosinophils in peripheral blood, sputum, BAL, and airway



mucosa; fewer neutrophils in sputum and BAL; a higher CD4+/CD8+ ratio of T cells infiltrating the airway mucosa, and a thicker reticular layer of the epithelial basement membrane. They also had significantly lower residual volume, higher diffusing capacity, higher exhaled nitric oxide (NO), a lower high-resolution CT scan emphysema score, and greater reversibility to bronchodilator and steroids. Thus, despite similar fixed airflow obstruction, subjects with a history of asthma have characteristics distinct from those with a history of COPD, and should be identified and treated<sup>45</sup>.

### Treatment (Steroid) resistant asthma

In most patients with asthma, glucocorticoid therapy influences inflammatory and structural cells beneficially, targeting sources of airflow limitation, including airway smooth muscle contraction, mucosal oedema, airway inflammation, increased mucus secretion and airway remodelling. Up to 10% of patients with asthma, however, demonstrate poor response to glucocorticoid therapy and experience frequent exacerbations and limitations of everyday activity and quality of life<sup>46</sup>. Corticosteroid-resistant or poorly-responsive asthma can be seen at all levels of asthma severity, but usually this phenotype of asthma is expressed in severe asthmatics, since the main treatment for asthma, the steroids, are not effective. Steroid resistant asthma was believed to be due to a defect in the response of the patient to corticosteroids that diminishes their anti-inflammatory effects. However, there are many different mechanisms for steroid resistance, as shown in recent studies, including decreased glucocorticoid receptor (GR) density, distorted affinity of ligand for the GR receptor, diminished capacity of the GR to bind with DNA, and increased expression of inflammatory transcription factors, e.g. NF- $\kappa$ B and activator protein-1, that compete for DNA binding<sup>47</sup>.

Increased gene transcription is associated with an increase in histone acetylation induced by histone acetyltransferase<sup>48</sup>, while hypo-acetylation is correlated with reduced transcription or gene silencing which is controlled by histone deacetylases (HDACs). HDAC2-mediated GR deacetylation enables GR binding to the NF- $\kappa$ B complex, thus reducing inflammatory gene transcription induced by NF- $\kappa$ B<sup>49</sup>. A defect of GR deacetylation caused by impaired HDAC 2 has been proposed as a molecular mechanism causing glucocorticoid insensitivity through NF- $\kappa$ B mediated gene expression. Loss of HDAC2 did not reduce GR nuclear translocation, GR binding to glucocorticoid response element (GRE) on DNA, or GR-induced DNA or

gene induction, but it inhibited the association between GR and NF- $\kappa$ B<sup>50</sup>. HDAC activity and HDAC2 expression are decreased in lung macrophages and peripheral lung tissue obtained from patients with COPD, a disease relatively insensitive to steroids, and this reduction correlates with disease severity<sup>51</sup>. Ito et al., in 2006<sup>50</sup> showed that overexpression of HDAC2 was able to restore glucocorticoid sensitivity in steroid insensitive diseases such as COPD. Theophylline has been shown to restore HDAC activity and reverse steroid insensitivity in COPD<sup>52</sup>. Th-2 cytokines have also been proposed to play a part in severe corticosteroid refractory asthma with CD4+ T-cells from Patients with refractory asthma being less able to produce the anti-inflammatory cytokine IL-10 in response to dexamethasone than cells from patients sensitive to corticosteroids<sup>26</sup>.

The types of inflammatory cells in the airways of some patients may predict responsiveness to glucocorticoid therapy<sup>53</sup>. The absence of eosinophils, as indicators of inflammation, predicts reduced response to corticosteroids. Multiple regression analysis revealed that sputum eosinophilia and FEV<sub>1</sub> were independent significant predictors of FEV<sub>1</sub> increase after treatment. Conversely, the FEV<sub>1</sub> and PD20 of asthmatics with low sputum eosinophilia were not positively affected by inhaled corticosteroid treatment. Neutrophil counts were higher in those patients with low baseline airway eosinophilia. Increased sputum neutrophils indicate poor response to steroids. These studies could possibly explain the poor response of people with asthma who smoke to corticosteroid therapy, since smokers are likely to have higher sputum neutrophil counts<sup>54</sup>. Other types of cells that are involved in steroid resistance are the peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and alveolar macrophages (AMs). These cells from patients with severe asthma are less sensitive to inhibition by dexamethasone of pro-inflammatory cytokines release, when compared with cells from patients with well-controlled non-severe asthma<sup>55,56</sup>. The mechanisms underlying this poor suppressive response to corticosteroids in severe asthma are unclear, but AMs from patients with severe asthma demonstrated a greater degree of activation of p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK). This serine-threonine kinase acts on a variety of substrates, including transcription factors, such as nuclear factor (NF)- $\kappa$ B and activator protein-1, and has been implicated in inflammation, cell proliferation and cell death relevant to asthma pathophysiology<sup>57</sup>. Recent findings suggest that anti-IgE might benefit patients with glucocorticoid-resistant asthma<sup>58</sup>. On the other hand, strategies using

anti-TNF $\alpha$  have produced conflicting results<sup>59</sup>, while a recent study by Wenzel et al<sup>60</sup> showed very disappointing results concerning this type of asthma. Further research is needed to identify additional and perhaps better non-invasive biomarkers related to this phenotype in order to move in the direction of targeted therapy.

### **Asthma defined by age at onset (occurrence through the lifespan)**

The age at which a patient develops asthma differentiates phenotypes. Early onset or late onset asthma can both be associated with exacerbation-prone asthma, thus participating in the group of risk factors for severe asthma<sup>61</sup>. Asthma can begin at anytime during life; however, recent evidence indicates that most patients with asthma experience their first symptoms before the age of 5 years.

The origins of childhood asthma lie in a complex interplay of genetics, environmental exposure and immune and pulmonary system development. Children with early onset asthma usually have a family history of atopy and/or asthma and a history of eczema. The maternal history is most strongly associated with susceptibility in the child, implying both genetic and environmental components<sup>20</sup>. Clearly, environmental exposures play a critical role in determining early disease susceptibility. Most 'early-onset' asthma, defined as onset before the age of 12 years, has an allergic component and patients develop symptoms after exposure to triggers<sup>62</sup>. Conversely, intrinsic asthmatics are probably a population with a great number of patients with late onset asthma<sup>43</sup>. Generally, early-onset asthma seems to be a more homogeneous disease than late-onset asthma, to which a mix of allergic, infectious and other factors contribute<sup>33,61</sup>.

In many children, symptoms of asthma and wheezing improve with age, but 30% - 40% continue to have recurrent episodes as adults. Despite their longer disease duration, people with early-onset asthma appear to have marginally better lung function than those with late-onset disease. Miranda et al<sup>62</sup> reported findings in adult patients with late onset asthma who showed marginally worse lung function than those with early onset disease, despite a shorter overall duration of disease. In the study by Jenkins et al<sup>63</sup>, the disease severity in children and adults whose onset of asthma occurred in childhood was related to disease duration, but this did not apply to patients with onset of asthma in adulthood. Burrows et al<sup>64</sup> noted that patients with adult-onset asthma display a steep loss in lung function soon after the diagnosis is

made, followed by relatively stable lung function thereafter. The mechanisms involved in the apparent rapid decline in lung function among the adult-onset asthma patients are presently not understood. It is possible that some of these patients may have had unrecognized asthma for years, the diagnosis being made only after a significant degree of lung function loss. Alternatively, according to Jenkins et al<sup>63</sup>, adult-onset asthma may be associated with a greater degree of airway inflammation and/or more repair processes, resulting in rapid airway remodelling. Ten Brinke et al<sup>43</sup> found that adult-onset asthma was a significant risk factor for chronic airway obstruction [odds ratio (OR) 3.3], and that patients whose asthma was late in onset were less likely to be atopic on skin testing, tended to have lower IgE levels, and had fewer symptoms with allergen exposure. These findings suggest that there may be significant pathophysiological, and perhaps mechanistic, differences between early-onset and late-onset asthma.

### **Allergic asthma**

Allergic sensitization is the basis of allergic asthma and is one of the most common asthma phenotypes. The presence of allergic characteristics can be associated with better overall lung function, but with more exacerbations than non-allergic asthma. It is particularly common in childhood asthma, but is also frequently found in adults<sup>65</sup>. By 10 years of age, allergic asthma is the dominant form of the disease. A family history of asthma and early exposure to allergens are probably important in the initiation of allergic asthma, but the mechanisms by which some children develop asthma, while others have non-respiratory allergic manifestations are not understood<sup>66</sup>. The age of exposure to specific allergens is possibly critical in the process of developing asthma later in life; early exposure could be more relevant than later exposure. The findings of studies on exposure to high concentrations of cat allergen up till the age of 3 years imply that an immune response, not associated with asthma symptoms, can be induced and this situation should be considered to be a form of tolerance. There is evidence that children raised in a house with a cat are less likely to become allergic to cat allergens or to the development of asthma<sup>67,68</sup>. Also, early sensitization to dust mite allergens is more significant in relation to asthma than sensitization after 3 years of age<sup>69,70</sup>.

The early phase of the response is triggered when an atopic individual encounters the allergen, and is characterized by release of both preformed and newly synthesized

mediators, such as leukotrienes (LT), histamine, prostaglandins and cytokines, which induce bronchoconstriction and oedema. The late phase is characterized by the influx and activation of lymphocytes and other inflammatory cells that, in turn, increase production of pro-inflammatory cytokines.

It appears that the immune response in allergic and, perhaps, in other forms of asthma, is heterogeneous, which probably contributes to heterogeneity in clinical phenotypes. Over 100 genes have been implicated in allergic asthma, but the genetics of the disorder are complex and are modulated by environmental exposures. None of the genes have been shown to contribute to risk in all populations.

Targeted therapies, such as immunotherapy or monoclonal antibody treatment, are available for the treatment of asthma. In studies of the IgE antibody, omalizumab, an allergic phenotype was defined only by the presence of allergen-specific IgE measured by skin-prick or serum testing<sup>71,63</sup>. Analysis of these and other trials, as well as clinical experience, suggests that not all people with allergic asthma diagnosed by these tests respond to anti-IgE therapy. Whether a better definition of allergic asthma or its biomarkers could enhance the ability to identify patients who will respond to this treatment, is not clear.

### Occupational asthma

The occupational asthma phenotype might account for up to 15% of adult-onset asthma and can cause frequent severe exacerbations<sup>12</sup>. Occupational asthma does not differ in its clinical and pathological features from non-occupational asthma, but it has several sub-phenotypes which result from both immunological and non-immunological mechanisms. Immunologically mediated occupational asthma appears after a latency period of exposure necessary for the worker to acquire immunological sensitization to the causal agent. This type encompasses both occupational asthma that is induced by an IgE mechanism (most high- and some low-molecular-weight agents), and occupational asthma in which an IgE mechanism has not been demonstrated consistently (low-molecular-weight agents, such as diisocyanates, western red cedar, and acrylates). Nonimmunological occupational asthma is characterized by the absence of a latency period. It occurs after accidental exposure to high concentrations of a workplace irritant. This clinical entity has been defined as irritant-induced asthma. The most definitive form of irritant-induced asthma is "reactive airway dysfunction syndrome" (RADS) which occurs

after a single exposure to high levels of an irritating vapour, fume, or smoke. In addition, work-related asthma encompasses variant syndromes, including eosinophilic bronchitis and asthma-like disorders caused by exposure to organic dusts<sup>73</sup>.

The airway inflammation in immunologically mediated occupational asthma is characterized by the presence of eosinophils, lymphocytes, mast cells and thickening of the reticular basement membrane<sup>74</sup>. In contrast, in occupational asthma caused by irritant chemicals, the pathological changes consist of fibrosis of the bronchial wall and epithelial denudation and fibrino-haemorrhagic exudates in the submucosa, without eosinophilic inflammation<sup>75</sup>. Although this type of occupational asthma can retreat if the patient promptly discontinues exposure to the offending agent, once the process is established, immunological phenotypes can continue independently of exposure<sup>73</sup>.

### Aspirin-induced asthma

Asthma that is induced by aspirin and other nonsteroid anti-inflammatory drugs is commonly referred to as aspirin-sensitive asthma (AS-asthma). It is among the most easily identified phenotypes because of the specificity of the trigger. Estimates vary, but prevalence is likely to be approximately 10–20% of the adult asthma population<sup>76</sup>. AS-asthma patients are likely to be female and suffer from more severe disease. It is associated with raised airway leukotrienes, and high numbers of eosinophils in both tissue and blood, but little evidence of atopy<sup>77</sup>. The most clinically distinctive patterns associated with aspirin sensitivity are severe rhinosinusitis and nasal polyps, and adult onset asthma. Nonsteroid anti-inflammatory drug sensitivity does not appear to be mediated by IgE, but is related to altered eicosanoid metabolism. Increased levels of cysteinyl LT and increased expression of CYSLTR1 are characteristic findings associated with this phenotype, suggesting that its pathogenesis may be related to an enhanced inflammatory response due to overexpression of cysteinyl LT and CYCLTR1<sup>78</sup>.

Although this phenotype is very distinct clinically and pathologically, the underlying pathogenesis remains poorly understood. Genetic studies have shown that mutations in the LT synthesis pathway affect this phenotype, but these distinctions alone are not sufficient to explain the adult onset of the disease, which suggests an additional environmental (perhaps viral) element in its pathogenesis<sup>23</sup>. Recent studies have also suggested alterations in cyclooxygenase-2, prostaglandin E2 and

lipoxin metabolism. A number of single nucleotide polymorphisms (SNPs) have been identified in the leukotriene C4 synthase, 5-lipoxygenase, CYSLT1 and -2 genes, TBX21 (which encodes the transcription factor Tbet), and prostaglandin E2<sup>78</sup>. The cyclooxygenase-2 and thromboxane A2 receptor genes, while not associated with AS asthma per se, may all have functional effects.

The asthma in aspirin sensitive patients can be difficult to control, as it frequently does not respond well to corticosteroids. LT receptor antagonists can be helpful, but, as with other asthma phenotypes, not all patients respond well to this treatment option.

### Peri-menstrual asthma

Hormonal disturbance is a risk factor for frequent severe exacerbations. Menses-related asthma is the least well characterized of the trigger-induced subtypes. It probably only occurs in a small proportion of women with asthma, but it can be severe. There is no generally accepted definition of perimenstrual asthma (PMA) and most authors have generally relied on self-reported worsening of asthma symptoms in the perimenstrual phase. Currently, PMA is defined as an increase in asthma symptoms or a decrease in lung function immediately preceding or during the menstrual phase of the female cycle. Perimenstrual worsening of asthma has been documented in 30% to 40% of asthmatic women<sup>79</sup>.

Although a role of sex hormones in asthma pathogenesis has been assumed for some time, the actual hormonal mechanisms for these effects are not clear. Depending on the environment, both oestrogen and progesterone have the potential to act as proinflammatory or anti-inflammatory hormones.<sup>80</sup> Female sex hormones exert effects on several inflammatory mediators, on neutrophils, IL-8 and on monocyte chemotactic protein. An intriguing possible explanation for cyclic changes in the severity of asthma is that the TH1/TH2 balance varies with the menstrual phase, shifting more toward the TH2 profile in peripheral blood perimenstrually<sup>79</sup>.

Oestrogens have been shown to alter cortisol production, clearance and metabolism. Progesterone exerts a competitive action with cortisol for the binding site of the corticosteroid-binding globulins, and oestradiol enhances corticosteroid-binding globulin production. Significant variation in theophylline levels caused by higher clearance during the menstrual phase compared with that during the follicular phase has been demonstrated.<sup>79,81</sup>

The following patient characteristics are associated with PMA: 1) longer menstruation, more pronounced

premenstrual tension, and a higher incidence of allergic, infective and psychological factors, 2) increased severity of asthma (more symptoms, rescue medication, lower PEF and FEV<sub>1</sub>), 3) up to 3 times more frequent visits to emergency departments for their asthma than men, and this is linked to the perimenstrual phase of their cycle, and 4) PMA attacks have also been associated with frequent hospitalizations and even mechanical ventilation.<sup>79,81</sup>

### Inflammatory phenotypes

The understanding of asthmatic inflammation is perhaps the most important advance in elucidation of the pathogenesis of the disease and in deciding the appropriate treatment for asthma. This led to the widespread use of inhaled corticosteroids and their position as the gold-standard for asthma treatment. Inflammatory phenotypes of severe asthma can be characterized by persistence of eosinophilic or neutrophilic infiltration, although in some cases, no inflammatory infiltration is noted (paucigranulocytic).<sup>23</sup> These phenotypes are becoming increasingly associated with distinct clinical and physiological inflammatory and repair processes.<sup>15,38</sup>

Usually, inflammatory cells are present and activated in the airways of patients with severe asthma and persist despite treatment, but their relevance to the control and severity of the disease is largely unknown. These cells include not only eosinophils and neutrophils but T lymphocytes, mast cells and macrophages, while structural cells are also involved in the inflammatory reaction and remodelling in asthma.

### Eosinophilic asthma

Eosinophilic asthma is the best studied pathological phenotype. Eosinophils have been reported, in various numbers, in the sputum, BAL and endobronchial biopsies of many people with asthma. Studies that have defined an eosinophilic phenotype by sputum or biopsy testing in patients with varying severities of asthma consistently show that around 50% of patients have eosinophilic involvement.<sup>38</sup>

Eosinophils may be an important biomarker of some key features of severe asthma. For example, Bumbacea et al.<sup>43</sup> related the presence of chronic airway obstruction with an increase of eosinophils in both the sputum (>2%, OR=7.7) and the blood (OR=6.3). Using criteria initially suggested by Wenzel and Busse,<sup>7</sup> severe asthma can be characterized as eosinophil positive (EOS +) or negative (EOS -), according to the presence or absence of eosi-

nophils in endobronchial mucosal biopsy; EOS- biopsies tend to be neutrophils enriched. The eosinophil, with its capacity to release a range of inflammatory mediators, is often seen as the principal inflammatory cell linked to airway dysfunction in asthma. Some researchers have suggested that eosinophilic inflammation increases with the severity of disease, but recent findings question the pivotal role of the eosinophil in asthma pathogenesis.<sup>82,83</sup> Persistent airway eosinophilia and T-cell activation in the presence of corticosteroids has been found in studies of chronic asthma<sup>38,84,85</sup> implying that corticosteroids are not adequately suppressing the inflammatory process. The ENFUMOSA study,<sup>10</sup> although unable to demonstrate significant differences in the circulating eosinophil count between the patient groups, found that the persistence of eosinophils in induced sputum and the presence of increased urinary LTE4 and EPX, despite inhaled and oral corticosteroid treatment, show that the inflammatory response in severe asthma is inadequately controlled. Miranda et al.<sup>62</sup> showed that 2/3 of the severe asthmatic patients in their study had biopsy evidence of eosinophil infiltration, in spite of long-term high-dose oral corticosteroid treatment, which suggests resistance to the beneficial anti-inflammatory effects of inhaled and oral steroids.

Persistent eosinophilic inflammation in severe asthma is often associated with adult-onset disease and with aspirin sensitivity. Patients with eosinophilic inflammation frequently have more severe symptoms, worse disease control, and a greater risk of exacerbations than patients with other pathological phenotypes of asthma.<sup>25,86</sup>

The mechanisms of eosinophilic inflammation are not well defined. Identification of an eosinophilic phenotype has traditionally been made by sputum analysis or endobronchial biopsy. Additionally, exhaled NO concentration has been proposed as a tool for identifying patients with persistent eosinophilic inflammation.<sup>87,88</sup> Generally, the exhaled NO concentration correlates with the number of eosinophils in sputum or biopsy samples, even in patients on high doses of corticosteroids<sup>88</sup>. Treatment strategies that use exhaled NO to control steroid dosage have been controversial in the past<sup>89</sup>, but recent studies have produced satisfactory results on this issue<sup>90,91</sup>.

Whether eosinophilia is a permanent phenotype or one dependent on the current treatment and level of disease control remains to be seen. Despite the evidence in support of a persistent eosinophilic phenotype in a proportion of patients with moderate-to severe asthma, two studies suggest that eosinophilic inflammation might be present in a greater proportion of patients with asthma

than previously believed, since this inflammation could be present in a distal portion of the lung that is not assessed by standard methods. In one study, about 50% of patients with severe asthma that had previously been identified as non-eosinophilic were found to have eosinophilic inflammation in the distal lung<sup>23,92</sup>.

Perhaps the greatest validation of the importance of defining a specific phenotype is that phenotypic assessment improves treatment. Studies that selected an eosinophilic endpoint in their design support the idea that identification and modification of the level of eosinophilic inflammation can lead to improved outcomes. Two large-scale, long-term studies have compared a basic "guidelines" approach to therapy with an approach in which the sputum eosinophil count dictated which intervention was used.<sup>25,93</sup> In these studies, treatment was designed to lower the number of sputum eosinophils to less than 3% of the total inflammatory cells. This led to fewer severe exacerbations of asthma and no overall change in the corticosteroid dose compared with the "guidelines" approach.

The mechanisms of eosinophilic inflammation are not well defined. Although both IL-5 and the chemokine eotaxin, both of which have eosinophilotactic activity, have been reported to be increased in asthma, studies that aimed to inhibit these pro-eosinophilic mediators were not accompanied by clinical efficacy.<sup>82,94</sup> Recent studies of targeted therapy, however, such as those using Mepolizumab, a humanized monoclonal antibody (mAb) with potent IL-5 neutralizing effects, performed specifically in a cohort with eosinophilic asthma, showed that in addition to reduction of eosinophils, a reduction of the number of exacerbations has also occurred.<sup>95,96</sup> Mepolizumab therefore, could be a potential treatment for eosinophilic diseases.

## Neutrophilic asthma

Severe asthma may also be associated with neutrophilic inflammation,<sup>10,97</sup> but the precise role of neutrophils remains to be determined. Many patients with neutrophilic inflammation have concomitant eosinophilic inflammation seen on tissue biopsy, while sputum assessment might show a clear predominance of either neutrophils or eosinophils.<sup>38</sup> Neutrophilic asthma is seen most commonly in patients with severe disease and has been reported in autopsies of patients who died soon after the onset of a severe exacerbation.<sup>98</sup>

The cause of neutrophilic inflammation in asthma is not well understood. The association with severe asthma

could be caused by treatment with high doses of corticosteroids, which have been shown to decrease the apoptosis of neutrophils *in vitro*.<sup>99</sup> Neutrophilia may represent a continuous influx of cells from the bloodstream due to continuous antigenic stimulation of the bronchi, or it may be influenced by high levels of steroid treatment. Several mediators linked to neutrophil LT B4, IL-8, macrophage inflammatory protein-1a and TNF $\alpha$ ) have been shown to be increased in severe asthma<sup>97</sup>. They induce neutrophil chemotaxis, activation and survival and upregulate endothelial adhesion molecules. Epidermal growth factor receptor (EGFR), a marker of epithelial stress/damage, is increased in proportion to disease severity. EGFR expression in the bronchial epithelium correlates with IL-8 indicating that EGFR can also contribute to this sustained neutrophilic inflammation<sup>100</sup>.

This phenotype seems to be less responsive to corticosteroid therapy than eosinophilic asthma.<sup>101</sup> Anti-neutrophilic treatment has not been systematically studied. Thus no studies have successfully targeted treatment of this pathological phenotype.

### **Paucigranulocytic asthma**

Asthma has been thought of as an inflammatory disease for the past 20–30 years, yet studies suggest that asthma can present in the absence of an identifiable influx of inflammatory cells such as eosinophils, neutrophils, or lymphocytes<sup>38</sup>. Inflammation might take less traditional forms, perhaps caused by activation of resident cells, such as mast, epithelial, or smooth muscle cells. Unfortunately, no biological markers have been identified for this paucigranulocytic phenotype. Some studies suggest that these patients do not respond to corticosteroid therapy, and might benefit from reduction in their corticosteroid dose<sup>102</sup>, but the inflammation might increase during exacerbations in these patients or in response to corticosteroid dose reduction, resulting in the asthma becoming granulocytic in phenotype.

### **Genes and asthma**

A number of genes have been identified that contain polymorphisms which influence immune or pulmonary development and response to environmental exposures, perhaps increasing the risk for development of asthma. Over 100 genes have been reported to be associated with asthma or related phenotypes. Among these are: NOS3, FCER1B, IL4RA, ADAM33, GRPA, SPINK5, ORMFL3, MYLK, ECP, CYLTR1, CD14 and some of the Toll-like recep-

tors, among others.<sup>103-107</sup> In the period 2006-2007 alone, 53 novel candidate gene associations were reported<sup>108</sup>. It has been suggested that certain genotypes may be associated with asthma which persists into adulthood. One study found that Arg16–Gly27 homozygotes are more likely to have recurrent wheezing as adults; however, this genotype is of low frequency (3%) in wheezing adults<sup>109</sup>. Furthermore, the genotype of  $\beta$ 2 adrenergic receptor affects the long-term response of  $\beta$ 2 adrenergic agents and patients homozygotic to Arg-Arg mutations should possibly avoid  $\beta$ 2 agents for the treatment of their asthma<sup>110</sup>. The genetics of asthma susceptibility is complex, with the same genotype sometimes conferring protection and sometimes risk depending on the environmental exposures.

### **Molecular phenotyping of severe asthma**

It has already been mentioned above that at least some patients with severe asthma have been characterized by endobronchial biopsy as having either neutrophil-predominant inflammation or increased tissue eosinophils.<sup>15,38</sup> Eosinophil-positive patients, especially those with early-onset disease and associated airway remodelling, have been shown to have an increased incidence of near-fatal events, although other studies have found no clinical differences between the eosinophilic and non-eosinophilic phenotypes<sup>23</sup>. Together, these observations suggest that severe asthma is a pathologically heterogeneous disorder, and an objective method for distinguishing clinically significant subtypes is still lacking.

The findings that patients with severe asthma have distinct inflammatory processes suggest that they may also express distinct airway cytokine profiles compared with patients with responsive asthma. Brasier AR, et al<sup>22</sup> investigated this hypothesis by examination of airway cytokine expression patterns in BAL from a matched group of patients with non-severe and severe asthma by using bead-based multiplex cytokine arrays (Luminex xMAP). The final intent of the researchers was to accurately define the asthmatic phenotypes, based on molecular profiles that may facilitate clinical investigation on the pathogenesis and treatment of asthma. Statistical analysis identified 4 groups, labelled G1 to G4, that differed between each other in more than 15 variables. These variables included the cellular features of BAL (pulmonary eosinophils, alveolar macrophages) and lung function measurements (lung function values, FEV<sub>1</sub> response to bronchodilation and sensitivity to methacholine). Patients in G1 had a significantly reduced FEV<sub>1</sub>, FVC, and FEV<sub>1</sub> improvement after



bronchodilator therapy and high levels of IL-2 compared with the other groups, and a high proportion of asthma classified as severe by the ATS criteria. G2, the group with the best preservation of lung function was high in patients with non severe asthma according to ATS criteria and had high levels IL-1Ra. G3 had high levels of IP-10 and G4 had high levels of IL-2R and many other cytokines. The study by Brasier et al. identified 10 cytokines as being most important for identification of the G1 severe group. The rank order of these cytokines (from the most to the least informative) was IL-1Ra, MIP-1a, MIG, IL-15, IL-2R, IP-10, IL-4, IL-6, MCP-1, and IL-2. Classification methods for predicting methacholine sensitivity were developed, and hyperresponders could be predicted with 88% accuracy. The cytokines that contributed to this model were IL-2, IL-4, and IL-5. On the basis of this classifier, 3 distinct hyperresponder classes were identified that differed in BAL eosinophil count and PC20 methacholine.

This study provided a first proof of the concept that informative patterns of cytokines can be detected and interpreted in BAL from patients with asthma and may contribute to more objective classification of disease type. The authors' interpretation of these findings is that patients with asthma with apparently similar clinical characteristics are in fact composed of heterogeneous subtypes that can be further distinguished on the basis of BAL cytokine profiles. It appears that important new diagnostic and prognostic information is available in airway fluid, indicating that future research in biomarker identification will be informative.

### Clustering of Phenotypes

Each patient with asthma shows characteristics of different phenotypes; this creates difficulties in the accurately selection of patients for participation in epidemiological or investigational studies, and for interpretation of the effects of different therapeutic strategies. Current descriptions of asthma phenotypes are limited by subjectivity and poor coherence. A robust system of classification that incorporates the multidimensionality of asthma is needed to identify subgroups with consistent patterns of disease<sup>111</sup>. An important study by Haldar et al.<sup>112</sup> has suggested that cluster analysis of asthmatic populations explains better the differences seen in the effects of treatment. In this study, clusters of a population managed in primary care with predominantly mild to moderate disease, were compared with a refractory asthma population managed in secondary care. Differences in asthma outcomes (exacerbation frequency and change in corticosteroid

dose at 12 months) were compared between clusters in a third population with predominantly refractory asthma, either minimizing eosinophilic inflammation in the sputum (inflammation-guided strategy) or applying standard clinical care. According to this study, two clusters (early-onset atopic and obese, non-eosinophilic) were common to both refractory and mild to moderate asthma with greater severity of characteristics. Two other clusters characterized by marked discordance between symptom expression and eosinophilic airway inflammation (early-onset symptom predominant and late-onset inflammation predominant) were specific to refractory asthma. Inflammation-guided management was superior for both discordant subgroups, leading to a reduction in exacerbation frequency in the inflammation-predominant cluster and a dose reduction of inhaled corticosteroid in the symptom-predominant cluster. Using the sputum guided care, the obese, non-eosinophilic phenotype, for example, in the Haldar et al. study, common to populations of mild to moderate and refractory asthma, was characterized by symptoms that were not associated with eosinophilic airway inflammation. Given the recognized association between eosinophilic airway inflammation and steroid responsiveness in airway disease, the reported steroid resistance of asthma in obese patients may in part be explained by the lack of presence of eosinophils<sup>113</sup>. Using the conventional clinical strategy care, without examining the type of airway inflammation, overtreatment with corticosteroids for symptom improvement may be given, whereas, possible strategies for improving compliance could have a better effect.

The following section on specific patients' characteristics could possibly be explained by the above classification of asthmatic subjects and it is probable that different ways of management could have led to more effective treatment of asthma in these patients. Further investigation is needed for clarifying the difficulties in identification of phenotypes.

### Characteristics of individual patients

Most asthmatic patients do not follow the characteristics of a single phenotype, but fit into many phenotypes. Two case studies are presented to illustrate this phenotype interrelationship.

The first case is that of a Greek woman who was born preterm in 1964 with low birth weight (1.5kg). She has a monozygotic sister with mild asthma. She is a lifelong non-smoker with asthma and rhinitis since infancy. She worked in a cotton mill from 1985 to 2000 when she

stopped because of difficulty in breathing. Her course was notable for frequent hospitalizations and emergency room visits for severe asthma attacks, but she has never required intubation. She experiences typical asthma symptoms of wheezing, cough and chest tightness in response to cold air, hot weather, fumes, and upper respiratory infection. Over the years she has developed significant GERD, OSA and weight gain, and since 2002 she has had nasal polyps and sinusitis. She is unable to taper methylprednisolone below 20mg/d without having more frequent asthma attacks. Besides methylprednisolone, her medication includes high-dose combination of steroids with long-acting  $\beta_2$  agent, salbutamol, a LT modifier, omeprazole, and calcium. Inhaled or systematic steroids were introduced at least 30 years after the start of her asthma. In 2005 she had 2 pregnancies that terminated early with embryonic death due to low HbSO<sub>2</sub>. She has normal IgE, so anti-IgE therapy is not an option. In 2006 she developed hyperthyroidism which is managed with thyroxine tablets and she became depressed but did not accept regular medication. She is seen weekly to monthly.

On examination, she is mildly Cushingoid. Chest CT scan has shown bronchiectasis. She does not have the Churg-Strauss syndrome. Recent spirometry shows FEV<sub>1</sub> of 0.67 L (34% predicted) and FEV<sub>1</sub>/FVC 62%, with no bronchodilation response. Her PO<sub>2</sub> is 58 mmHg and PCO<sub>2</sub> rises to 50 mmHg (6.7 kPa). She uses O<sub>2</sub> every day. She is unable to perform everyday activities or walk freely, she has severe sinusitis and produces purulent sputum (culture shows *Haemophilus* and *Streptococcus*) and she is hospitalized 3 times /year.

This patient's asthma is corticosteroid-dependent, requiring high doses of oral corticosteroids, although control is never fully achieved, suggesting that she may have an element of corticosteroid resistance. Circulating eosinophils are not increased, but any effort to reduce steroids has been unsuccessful. This patient's asthma also belongs to the exacerbation-prone phenotype, as well as the fixed limitation of airflow phenotype and also, her occupational exposure to the endotoxin of cotton dust possibly aggravated her symptoms. Cotton work with long employment is associated with irreversible symptoms, longitudinal loss of lung function (decline of FEV<sub>1</sub> 32.3ml/year and of FVC 20.1ml/year) and possibly severe pulmonary disability.<sup>114,115</sup> This patient is seriously depressed, without appropriate medication and, as documented above, psychological dysfunction is considered as one of the most important risk factors for frequent severe exacerbations.

The second case is that of a 53yr-old caucasian man who presented with severe, persistent asthma asking to participate in a clinical research study on asthma. He is a lifelong non-smoker with asthma since the age of 40 years. He has never required intubation, but has required oral corticosteroids since 4 years ago to control his asthma. He currently complains of wheezing and chest tightness on minimal exertion. His medications included a combination of high dose steroids and LABA for maintenance and relief. Spirometry showed FEV<sub>1</sub> of 0.70 L (35% predicted) and FVC of 1.4 L (60% predicted). There was no response to bronchodilation. The diffusing capacity was normal. He also has OSA since 2004 and he is using CPAP, His PaO<sub>2</sub> was 68mmHg and he experiences serious exacerbations once a year. He requires daily oral steroids so as not to experience exacerbation, but after long term treatment with steroids there is no improvement in symptoms or change in lung function, suggesting a phenotype of fixed airflow obstruction due to asthma and possibly steroid resistance. This patient has late onset asthma, but shares many common characteristics with the previous female patient, although he had no aggravating occupational exposure, but he is not psychologically burdened or seriously depressed. He leads an almost normal life a quality not seriously impaired.

## CONCLUSIONS

A number of asthma phenotypes have been described; however, these descriptions are not based on a clear understanding of the pathobiology of these phenotypes and it is often difficult to combine or compare studies, due to lack of a common definition or well-characterized description of the phenotype being studied.

Considerable progress has been made in recent years to define and understand the pathophysiology of asthma. As new treatment modalities for asthma become available, substantial effort is needed to define and understand which patients will respond to which treatment. Ongoing research efforts provide more insight into the relationship between genetics, environment, genotype-phenotype relationships and the pathophysiology of asthma; thus it should be possible to define more precisely clinical phenotypes based on pathological mechanisms and genetics. Targeted approaches will aid in the identification of better biomarkers for certain phenotypes.

The description of pathological phenotypes of asthma is in its infancy. In the future, more phenotypes will be identified and characterized through specific biomarkers.

By identifying asthma phenotypes, the application of more appropriate, more effective, and safer forms of treatment of each phenotype of asthma will be possible.

## REFERENCES

- Moore WC, Peters SP. Severe asthma: an overview. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117:487-94.
- Godard P, Chanez P, Siraudin L, Nicoloyiannis N, Duru G. Costs of asthma are correlated with severity. *Eur Respir J* 2002; 19:61-7.
- Serra-Battles J, Plaza V, Morejon E, Comella A, Brugues J. Costs of asthma according to the degree of severity. *Eur Respir J* 1998; 12:1322-6.
- Bateman ED, Hurd SS, Barnes PJ, et al. Global Strategy For Asthma Management and Prevention: GINA Executive Summary. *Eur Respir J* 2008; 31:143-178.
- Taylor DR, Bateman ED, Boulet LP, et al. A new perspective on concepts of asthma severity and control. *Eur Respir J* 2008; 32:545-554.
- Ogawa Y, Calhoun WJ. Phenotypic characterization of severe asthma. *Curr Opin Pulm Med* 2010; 16:48-54.
- Wenzel SE, Busse WW, for the National Heart, Lung, and Blood Institute's Severe Asthma Research Program. Severe asthma: lessons from the Severe Asthma Research Program. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119:14-21.
- Moore WC, Bleecker ER, Curran-Everett D, et al, for the National Heart, Lung, and Blood Institute's Severe Asthma Research Program. Characterization of the severe asthma phenotype by the National Heart, Lung, and Blood Institute's Severe Asthma Research Program. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119:405-413.
- Miller MK, Johnson C, Miller DP, et al, for the TENOR study Group. Severity assessment in asthma: an evolving concept. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116:990-995.
- The ENFUMOSA cross-sectional European multicentre study of the clinical phenotype of chronic severe asthma. *Eur Respir J* 2003; 22:470-477.
- Chanez P, Wenzel SE, Anderson GP, et al. Severe asthma in adults: what are the important questions? *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119:1337-1348.
- ten Brinke A., Sterk PJ, Masclee AAM, et al. Risk factors of frequent exacerbations in difficult-to-treat asthma. *Eur Respir J* 2005; 26:812-818.
- Gaga M, Papageorgiou N, Yiourgioti G, et al. Risk factors and characteristics associated with severe and difficult to treat asthma phenotype: an analysis of the ENFUMOSA group of patients based on the ECRHS questionnaire. *Clin Exp Allergy* 2005; 35:954-959.
- Miller MK, Lee JH, Blank PD, et al. TENOR risk score predicts healthcare in adults with severe or difficult to treat asthma. *Eur Respir J* 2006; 28:1145-1155.
- Gaga M, Zervas E, Chanez P. Update on severe asthma: what we know and what we need. *Eur Respir Rev* 2009; 18:58-65
- Haselkorn T, Borish L, Miller DP, et al. High prevalence of skin test positivity in severe or difficult-to-treat asthma patients. *J Asthma* 2006; 43:745-752.
- Borish L, Chipps B, Deniz Y, et al. Total serum IgE levels in a large cohort of patients with severe or difficult-to-treat asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2005; 95:247-253.
- Chipps BE, Szeffler SJ, Simons FE, et al. Demographic and clinical characteristics of children and adolescents with severe or difficult -to-treat asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119:1156-1163.
- Green RH, Brightling CE, Bradding P. The reclassification of asthma based on subphenotypes. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2007; 7:43-50.
- Kiley J, Smith R, Noel P. Asthma phenotypes. *Curr Opin Pulm Med* 2007; 13:19-23.
- Bradding P, Green RH. Subclinical phenotypes of asthma. *Curr Opin Pulm Med* 2010; 10:54-59.
- Brasier AR, Victor S, Boetticher G, et al. Molecular phenotyping of severe asthma using pattern recognition of bronchoalveolar lavage-derived cytokines. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121:30-37.
- Wenzel SE. Asthma: defining of the persistent adult phenotypes. *Lancet* 2006; 368:804-813.
- Dolan CM, Fraher KE, Bleecker ER, et al. Design and baseline characteristics of the epidemiology and natural history of asthma: Outcomes and Treatment Regimens (TENOR) study: a large cohort of patients with severe or difficult-to-treat asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2004; 92(1):32-9.
- Green RH, Brightling CE, McKenna S, et al. Asthma exacerbations and sputum eosinophil counts: a randomised control trial. *Lancet* 2002; 360:1715-21.
- Holgate ST, Polosa R. The mechanisms, diagnosis, and management of severe asthma in adults. *Lancet* 2006; 368:780-93.
- Berry MA, Hargadon B, Shelley M, et al. Evidence of a role of tumor necrosis factor alpha in refractory asthma. *N Engl J Med* 2006; 354:697-708.
- Minshall E, Chakir J, Laviolette M, et al. IL-1 expression is increased in severe asthma: association with epithelial cells and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105:232-238
- Balzar S, Chu HW, Silkoff P, et al. Increased TGF-beta2 in severe asthma with eosinophilia. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115:110-117.
- Howarth PH, Babu KS, Arshad HS, et al. Tumor Necrosis Factor (TNFalpha) as a novel therapeutic target in symptomatic corticosteroid dependent asthma. *Thorax* 2005; 60:1012-18.
- Pepe C, Foley S, Shannon J, et al. Differences in airway remodelling between subjects with severe and moderate asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116:544-549.
- Jatakanon A, Uasuf C, Maziak W, et al. Neutrophilic inflammation in severe persistent asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160:1532-39.
- Moore W, Everett D, Busse WW, et al. Validation of the ATS definition of severe asthma in the Severe Asthma Research Program. American Thoracic Society Annual Meeting, San Diego, CA, USA, 2006. A473.
- Wenzel SE, Everett D, Murphy J. Factors associated with severe

- and very severe asthma exacerbations. American Thoracic Society Annual Meeting, San Diego, CA, USA, 2005. A676.
35. ten Brinke A, Ouwerkerk ME, Zwinderman AH, et al. Psychopathology in patients with severe asthma is associated with increased health care utilization. *Am Respir Crit Care Med* 2001; 163:1093-96.
  36. Kikuchi Y, Okabe S, Tamura G, et al. Chemosensitivity and perception of dyspnea in patients with a history of near-fatal asthma. *New Engl J Med* 1994; 330: 1329-34.
  37. Barreiro E, Gea J, Sanjuas C, Marcos R, Broquetas J, Milic-Emili J. Dyspnoea at rest and at the end of different exercises in patients with near-fatal asthma. *Eur Respir J* 2004; 24: 219-25.
  38. Wenzel SE, Schwartz LB, Langmack EL, et al. Evidence that severe asthma can be divided pathologically into two inflammatory subtypes with distinct physiologic and clinical characteristics. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: 1001-08.
  39. Covar RA, Spahn JD, Murphy JR, Szefer SJ. Progression of asthma measured by lung function in the childhood asthma management program. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170: 234-41.
  40. Canonica GW. Treating asthma as an inflammatory disease. *Chest* 2006; 130(Suppl):215-285.
  41. Lee JY, Park SW, Chang HK, et al. A disintegrin and metalloproteinase 33 protein in patients with asthma: relevance to airflow limitation. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 173:729-735.
  42. Kotaru C, Schoonover KJ, Trudeau JB, et al. Regional fibroblast heterogeneity in the lung-implications for remodelling. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 173:1208-1215.
  43. Ten Brinke A, Zwinderman AH, Sterk PJ, et al. Factors associated with persistent airflow limitation in severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164:744-748.
  44. Bumbacea D, Campbell D, Nguyen L, et al. Parameters associated with persistent airflow obstruction in chronic severe asthma. *Eur Respir J* 2004; 24:122-128.
  45. Fabri LM, Romagnoli M, Corbetta L, et al. Differences in airway inflammation in patients with fixed airflow obstruction due to asthma or chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;167:418-424.
  46. Welzer S. Physiologic and pathologic abnormalities in severe asthma. *Clin Chest Med* 2006; 27:29-40.
  47. Ito K, Chung KF, Adcock IM. Update on glucocorticoid action and resistance. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117:522-543.
  48. Adcock IM, Barnes PJ. Histone deacetylation: an important mechanism in inflammatory lung diseases. *COPD* 2005; 2(4):445-455.
  49. Adcock, IM, Ito K. Molecular mechanisms of corticosteroid actions. *Monaldi Arch Chest Dis* 2000; 55(3):256-266.
  50. Ito K, Yamamura S, e-Quaye SE, et al. Histone deacetylase 2- mediated deacetylation of the glucocorticoid receptor enables NF-κB suppression. *JEM* 2006; 203:7-13.
  51. Ito K, Ito M, Elliott WM, Cosio B, et al. Decreased histone deacetylase activity in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2005;352:1967-1976.
  52. Cosio BG, Tsaprouni L, Ito K, et al. Theophylline restores histone deacetylase activity and steroid responses in COPD macrophages. *J Exp Med* 2004;200:689-695.
  53. Bacci E, Cianchetti S, Bartola ML, et al. Low sputum eosinophils predict the lack of response to beclomethasone in symptomatic asthmatic patients. *Chest* 2006; 129:565-572.
  54. Cox G, Whitehead L, Dolovich M, Jordana M, Gauldie J, Newhouse MT. A randomised control trial on the effect of inhaled corticosteroids on airways inflammation in adult cigarette smokers. *Chest* 1999; 115:1271-77.
  55. Bhavsar P, Hew M, Khorasani N, et al. Relative corticosteroid insensitivity of alveolar macrophages in severe asthma compared with non-severe asthma. *Thorax* 2008;63:784-790.
  56. Hew M, Bhavsar P, Torrego A, et al. Relative corticosteroid insensitivity of peripheral blood mononuclear cells in severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;174:134-141.
  57. Adcock IM, Chung KF, Caramori G, et al. Kinase inhibitors and airway inflammation. *Eur J Pharmacol* 2006;533:118-132.
  58. Busse WW. Anti-immunoglobulin E (omalizumab) therapy in allergic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:S12-17.
  59. Russo C, Polosa R. TNF-α as a promising therapeutic target in chronic asthma: a lesson from rheumatoid arthritis. *Clinical Science* 2005; 109:135-142.
  60. Wenzel SE, Barnes PJ, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled study of tumor necrosis factor-alpha blockade in severe persistent asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2009 Apr 1;179(7):549-58.
  61. Moore W, Everett D, Busse WW et al. Identification of severe asthma subgroups based on age of onset. American Thoracic Society Annual Meeting, San Diego, CA, USA, 2006, A663.
  62. Miranda C, Busacker A, Balzar S, et al. Distinguishing severe asthma phenotypes: role of age at onset and eosinophilic inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113:101-108.
  63. Jenkins HA, Cherniack R, Szefer SJ, et al. A comparison of the clinical characteristics of children and adults with severe asthma. *Chest* 2003; 124:1318-1324.
  64. Burrows, B, Lebowitz, MD, Barbee, RA, et al. Findings before diagnosis of asthma among the elderly in a longitudinal study of a general population sample. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 88:870-877.
  65. Tang EA, Wiesch DG, Samet JM. Epidemiology of asthma and allergic disease. In: Elliott Middleton J, ed. *Allergy principles and practice*. Philadelphia: Mosby 2003; 1127-68.
  66. Braun-Fahrlander C, Riedler J, Hertz U, et al. Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. *N Engl J Med* 2002; 347:869-77.
  67. Platts-Mills TA, Vaughan JW, Blumenthal K, Woodfolk JA, Sporik RB. Decreased prevalence of asthma among children with high exposure to cat allergen: relevance of the modified Th2 response. *Mediators Inflamm* 2001; 10(6):288-291.
  68. Platts-Mills TA, Vaughan JW, Blumenthal K, Woodfolk JA, Sporik RB. Sensitisation, asthma, and a modified Th2 response in children exposed to cat allergen: a population-based cross-sectional study. *Lancet* 2001; 357:752-756.
  69. Lau S, Illi S, Sommerfeld C, et al. The Multicentre Allergy Study Group. Early exposure to house-dust mite and cat allergens and development of childhood asthma: a cohort study. *Lancet*

- 2000; 356:1392-1397.
70. Wahn U, Lau S, Bergmann R, et al. Indoor allergen exposure is a risk factor for sensitization during the first three years of life. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 99:763-769.
  71. Busse W, Corren J, Lanier BQ, et al. Omalizumab, anti-E recombinant humanized monoclonal antibody, for the treatment of severe allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108:184-90.
  72. Soler M, Matz J, Townley R, et al. The anti Ige-E antibody omalizumab reduces exacerbation and steroid requirement in allergic asthmatics. *Eur Respir J* 2001; 18:254-61.
  73. Mapp CE, Boschetto P, Maestrelli P, Fabbri LM. Occupational asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172:280-305.
  74. Saetta M, Di Stefano A, Maestrelli P, et al. Airway mucosal inflammation in occupational asthma induced by toluene diisocyanate. *Am Rev Respir Dis* 1992; 145:160-68.
  75. Lemiere C, Malo JL, Boutet M. Reactive airway dysfunction syndrome due to chlorine: sequential bronchial biopsies and functional assessment. *Eur Respir J* 1997; 10:24144.
  76. Szczeklik A, Sanak M. The broken balance in aspirin hypersensitivity. *Eur J Pharmacol* 2006; 533:145-155.
  77. Szczeklik A, Stevenson DD. Aspirin-induced asthma: advances in pathogenesis, diagnosis and management. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111:913-21.
  78. Kim S, Park H. Pathogenesis of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2006; 6:17-22.
  79. Murphy VE, Gibson PG. Premenstrual asthma: prevalence, cycle to cycle variability and relationship to oral contraceptive use and menstrual symptoms. *J Asthma* 2008 Oct; 45(45):696-704.
  80. Sunday LN, Tran MM, Krause DN, Duckles SP. Estrogen and progestagens differentially modulate vascular proinflammatory factors. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006. Published online Feb 21, 2006.
  81. Siroux V, Curt F, Oryszczyn MP, et al. Role of gender and hormone related events on Ige, atopy, and eosinophils in the Epidemiology study on the Genetics and Environment of Asthma, bronchial hyperresponsiveness and atopy. *J Allergy Clin Immunol* 2004 Sep; 114(3):491-8.
  82. Leckie MJ, Ten Brinke A, Khan J, et al. Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophiles, airway hyperresponsiveness and the response to allergen in patients with asthma. *Lancet* 2000; 356:2144-2148.
  83. Bryan SA, O'Connor BJ, Matti S, et al. Effects of recombinant human interleukin-12 on eosinophiles, airway hyperresponsiveness, and the late asthmatic response. *Lancet* 2000; 356:2149-2153.
  84. Wenzel SE, Szefer SJ, Leung DYM, Sloan SI, Rex MD, Martin RJ. Bronchoscopic evaluation of severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156:737-743.
  85. Kay A. The Role of T Lymphocytes in Asthma. *Allergy and Asthma in Modern Society: A Scientific Approach*. Chem Immunol Allergy. Basel, Cramer R (ed): Karger, 2006, vol 91, pp 59-75.
  86. Louis R, Lau LC, Bron AO, et al. The relationship between airway inflammation and asthma severity. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161:9-16.
  87. Berry MA, Shaw DE, Green RH, et al. The use of exhaled nitric oxide concentration to identify eosinophilic airway inflammation: an observational study in adults with asthma. *Clin Exp Allergy* 2005; 35:1175-79.
  88. Silkoff PE, Lent AM, Busacker AA, et al. Exhaled nitric oxide identifies the persistent eosinophilic phenotype in severe refractory asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116:1249-55.
  89. Smith AD, Cowan JO, Brassett KP, et al. Use of exhaled nitric oxide measurements to guide treatment in chronic asthma. *N Engl J Med* 2005; 352:2163-73.
  90. Malerba M, Ragnoli B, Radaeli A, Tantucci C. Usefulness of exhaled nitric oxide and sputum eosinophils in the long-term control of eosinophilic asthma. *Chest* 2008 Oct; 134(4):733-739.
  91. Bernstein JA, Davis B, Alvarez-Puebla MJ, Nguyen D, Levin L, Olaguibel JM. Is exhaled nitric oxide a useful adjunctive test for assessing asthma? *J Asthma* 2009 Nov; 46(9):955-60.
  92. Berry M, Hargadon B, Morgan A, et al. Alveolar nitric oxide in adults with asthma: evidence of distal lung inflammation in refractory asthma. *Eur Respir J* 2005; 25: 986-91.
  93. Jayaram L, Pizzichini MM, Cook RJ, et al. Determining asthma treatment by monitoring sputum cell counts: effect on exacerbations. *Eur Respir J* 2006; 27:483-94.
  94. Barnes JP. Cytokine modulators as novel therapies for asthma. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 2002; 42:81-98.
  95. Haldar P, Brightling C, Hargadon B, et al. Mepolizumab and Exacerbations of Refractory Eosinophilic Asthma. *NEJM* 2009; 360:973-984.
  96. Flood-Page P, Swenson C, Faiferman I, et al. A Study to Evaluate Safety and Efficacy of Mepolizumab in Patients with Moderate Persistent Asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 176:1062-1071.
  97. Gibson PG, Simpson JL, Saltos N. Heterogeneity of airway inflammation in persistent asthma: evidence of neutrophilic inflammation and increased sputum interleukin-8. *Chest* 2001; 119:1329-1336.
  98. James AL, Elliot JG, Abramson MJ, et al. Time to death, airway wall inflammation and remodelling in fatal asthma. *Eur Respir J* 2005; 26:429-34.
  99. Nguyen LT, Lim S, Oates T, et al. Increase in airway neutrophils after oral but not inhaled corticosteroid therapy in mild asthma. *Respir Med* 2005; 99:200-207.
  100. Hamilton LM, Torres-Lozano C, Puddicombe SM, et al. The role of the epidermal growth factor receptor in sustaining neutrophil inflammation in severe asthma. *Clin Exp Allergy* 2003; 33:233-240.
  101. Green RH, Brightling CE, Woltmann G, et al. Analysis of induced sputum in adults with asthma: identification of a subgroup with isolated sputum neutrophilia and poor response to inhaled corticosteroids. *Thorax* 2002; 57:875-79.
  102. Bacci E, Cianchetti S, Bartoli M, et al. Low Sputum eosinophils

- predict the lack of response to beclomethasone in symptomatic asthmatic patients. *Chest* 2006; 129:565-72.
103. Hoffjan S, Nicolae D, Ostrovnaya I, et al. Gene-environment interaction effects on the development of immune responses in the 1st year. *Am J Hum Genet* 2005; 76:696-704.
  104. Simpson A, Maniatis N, Jury F, et al. Polymorphisms in a disintegrin and metalloprotease 33 (ADAM##) predict impaired early-life lung function. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172:55-60.
  105. Holgate ST, Yang Y, Haitchi HM, et al. The genetics of asthma: ADAM33 as an example of a susceptibility gene. *Proc Am Thorac Soc* 2006; 3:440-443.
  106. Sackesen C, Karaaslan C, Keskin O, et al. The effect of polymorphisms at the CD14 promoter and the TLR4 gene on asthma phenotypes in Turkish children with asthma. *Allergy* 2005; 60:1485-1492.
  107. Koppelman G. Gene by environment interaction in asthma. *Curr Allergy Asthma Rep* 2006; 6:103-11.
  108. Zhang J, Pare PD, Sandford AJ. Recent advances in asthma genetics. *Respir Res* 2008 Jan 15;9:4.
  109. Hall IP, Blakey JD, Al Balushi KA, et al.  $\beta$ 2-Adrenoreceptor polymorphisms and asthma from childhood to middle age in the British 1958 birth cohort: a genetic association study. *Lancet* 2006; 368:771-779.
  110. Israel E, Chinchilli V, Ford J, et al. For the National Heart, Lung, and Blood Institute's Asthma Clinical Research Network. Use of regularly scheduled albuterol treatment in asthma: genotype-stratified, randomised, placebo-controlled cross-over trial. *The Lancet* 2004; 364:1505-1512.
  111. Wardlaw AJ, Silverman M, Siva R, Pavord ID, Green R. Multidimensional phenotyping: towards a new taxonomy for airway disease. *Clin Exp Allergy* 2005; 35:1254-1262.
  112. Haldar P, Pavord ID, Shaw DE, et al. Cluster Analysis and Clinical Asthma Phenotypes. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 178:218-24.
  113. Peters-Golden M, Swern A, Bird SS, Hustad CM, Grant E, Edelman JM. Influence of body mass index on the response to asthma controller agents. *Eur Respir J* 2006; 27:495-503.
  114. Christiani DC, Wang XR, Pan LD, et al. Longitudinal changes in pulmonary function and respiratory symptoms in cotton textile workers. A 15-yr follow-up study. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163(4):847-53.
  115. Bakirci N, Kalaca S, Francis H, et al. Natural History and Risk Factors of Early Respiratory Responses to Exposure to Cotton Dust in Newly Exposed Workers. *J Occ Environ Med* 2007; 49:853-861.



# Πέρα από τις πνευμονοκονιώσεις: Νεοεμφανιζόμενες διάμεσες επαγγελματικές πνευμονοπάθειες

Ευαγγελία Νένα<sup>1</sup>,  
Πασχάλης Στειρόπουλος<sup>2</sup>,  
Θεόδωρος Κ. Κωνσταντινίδης<sup>1</sup>,  
Δημοσθένης Μπούρος<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Εργαστήριο Υγιεινής και Προστασίας του Περιβάλλοντος, Τμήμα Ιατρικής, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης

<sup>2</sup>Πνευμονολογική Κλινική, Τμήμα Ιατρικής, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης

### Λέξεις- Κλειδιά:

- επαγγελματικές διάμεσες πνευμονοπάθειες
- επαγγελματικά νοσήματα

**ΠΕΡΙΛΗΨΗ.** Η ανάπτυξη της τεχνολογίας συνέβαλε στην ευρεία χρήση νέων ουσιών στις παραγωγικές διαδικασίες. Δυστυχώς, η άγνοια των επιδράσεων τους στην υγεία, σε συνδυασμό με την απουσία μέτρων ατομικής προστασίας, οδήγησε στην ανάπτυξη μεταξύ των εργαζομένων νόσων πέρα από τις «κλασικές» διάμεσες επαγγελματικές πνευμονοπάθειες. Η έκθεση σε διακετύλιο μπορεί να οδηγήσει στην πρόκληση αποφρακτικής βρογχολίτιδας («πνεύμονας pop-corn»), ενώ διάμεσες πνευμονοπάθειες μπορεί να προκληθούν ακόμη λόγω έκθεσης σε ίνες νάιλον, σε χρωστική Acramin-FWN (σύνδρομο Ardystil), σε οξειδίο ίνδιου-κασσίτερου καθώς και λόγω εναπόθεσης νανοσωματιδίων και καύσης βιομάζας. Επιπλέον, πνευμονίτιδα από υπερευαισθησία μπορεί να προκληθεί λόγω έκθεσης σε προσθετικά ζωοτροφών. Τέλος, γνωστοί παράγοντες κινδύνου μέσω νέων εφαρμογών μπορεί να προκαλέσουν επαγγελματικές διάμεσες πνευμονοπάθειες. *Πνεύμων 2010, 23(3):293-296.*

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο όρος «επαγγελματικές διάμεσες πνευμονοπάθειες» παραπέμπει στις γνωστές από τον προηγούμενο αιώνα πνευμονοκονιώσεις, οι οποίες αφορούν την πρόκληση διάμεσης πνευμονοπάθειας μετά από έκθεση σε ουσίες όπως ο αμιάντος, το πυρίτιο κ.ά. Η κατανόηση των βιολογικών επιπτώσεων της έκθεσης στους παράγοντες αυτούς οδήγησε στον προληπτικό έλεγχο των εργαζομένων και στην ταυτόχρονη λήψη μέτρων προστασίας (ατομικών και συλλογικών) στο χώρο εργασίας, και έφτασε στην απαγόρευση της χρήσης ουσιών (αμιάντος) εφόσον δεν έγινε εφικτή η προστασία των εκτιθέμενων ατόμων.

Ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν για πρώτη φορά τα τελευταία χρόνια, ή γνωστές ουσίες που βρήκαν νέες εφαρμογές, συνδέθηκαν με την πρόκληση διάμεσων πνευμονοπαθειών<sup>1</sup>. Τα πρώτα περιστατικά, πριν συσχετιστούν με

### Αλληλογραφία:

Ευαγγελία Νένα, MD, PhD  
Ιατρός Εργασίας

Εργαστήριο Υγιεινής και Προστασίας  
του Περιβάλλοντος

Τμήμα Ιατρικής, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης  
Δραγάνα, Αλεξανδρούπολη 68100

Τηλ.: +30 6944772364

E-mail: enena@med.duth.gr

την επαγγελματική έκθεση (εξαιτίας κυρίως της συρροής 'κρουσμάτων' στο ίδιο περιβάλλον εργασίας), θεωρήθηκαν ως ιδιοπαθείς διάμεσες πνευμονοπάθειες, γεγονός που τονίζει τη σημασία της λήψης καλού ιστορικού από τον κλινικό γιατρό, που πρέπει να περιλαμβάνει στοιχεία επαγγελματικής έκθεσης.

Στην παρούσα ανασκόπηση παρουσιάζονται οι διάμεσες πνευμονοπάθειες, που οφείλονται στη χρήση νέων ουσιών στην παραγωγή ή στην εισαγωγή νέων εφαρμογών σε γνωστούς παράγοντες κινδύνου, όπως παρουσιάστηκαν στη διεθνή βιβλιογραφία τα τελευταία έτη.

### 1. Αποφρακτική βρογχολίτιδα από διακετύλιο

Το διακετύλιο είναι μικρού μοριακού βάρους χημική ουσία, η οποία χρησιμοποιείται για να προσδώσει τεχνητά τη γεύση βουτύρου σε διάφορα τρόφιμα. Πρόσφατες αναφορές συνδέουν την έκθεση στο διακετύλιο με την πρόκληση αποφρακτικής βρογχολίτιδας, γνωστή και ως «πνεύμονας ποπ κορν» ("pop-corn lung"), επειδή η πρώτη περιγραφόμενη συρροή περιστατικών σημειώθηκε μεταξύ εργαζομένων στην ανάμιξη και συσκευασία του ποπκορν<sup>2</sup>, όμως περιστατικά πνευμονικής βλάβης διαπιστώθηκαν και σε άλλες κατηγορίες εργαζομένων, όπως για παράδειγμα στη ζαχαροπλαστική<sup>3,4</sup>. Η πορεία της νόσου διαφέρει από την εικόνα αποφρακτικής βρογχολίτιδας που περιγράφεται ως "silofillers' lung" και η οποία συνήθως ανταποκρίνεται στη χορήγηση στεροειδών. Σε αντίθεση, η αποφρακτική βρογχολίτιδα από διακετύλιο έχει πιο «ύπουλη» πορεία, και μπορεί να καταλήξει σε μόνιμη περιοριστικού τύπου πνευμονοπάθεια, απαιτώντας ακόμη και μεταμόσχευση πνευμόνων.

Πέρα από την έκθεση στο διακετύλιο πρόκληση αποφρακτικής βρογχολίτιδας αναφέρεται βιβλιογραφικά και μετά από περιβαλλοντική έκθεση στο βότανο Saururus<sup>5</sup>, καθώς και στη χρήση fiberglass στη βιομηχανία κατασκευής λέμβων<sup>6</sup>.

### 2. Διάμεση πνευμονοπάθεια από ίνες νάιλον

Η πρώτη αναφορά του συνδρόμου έγινε μεταξύ εργατών με έκθεση σε ίνες flock, δηλαδή πολύ κοντές συνθετικές ίνες νάιλον (nylon flock) που χρησιμοποιούνται στη κατασκευή υφασμάτων με υφή τσόχας ή βελούδου<sup>7</sup>. Στην πρώτη περιγραφή της νόσου έγινε λόγος για αποφολιδωτική πνευμονία<sup>8</sup> η οποία αποδόθηκε σε έκθεση σε απροσδιόριστη τοξίνη και όχι στις ίνες νάιλον. Με την περαιτέρω εμφάνιση νέων περιστατικών, τα παθολογοανατομικά ευρήματα χαρακτηρίστηκαν ως λεμφοκυτταρική βρογχολίτιδα και περιβρογχολίτιδα. Εκτός όμως

από τις ίνες νάιλον αναφορά για περιστατικά νόσου έχει γίνει και μετά από έκθεση σε ίνες από πολυαιθυλένιο, πολυπροπυλένιο και ρεγιόν<sup>9-11</sup>. Κοινός αιτιοπαθογενετικός μηχανισμός είναι το μικρό μήκος των συνθετικών ινών, ανεξάρτητα από τον τρόπο κοπής τους, και οι εργασίες που προκαλούν εισπνοή σωματιδίων (π.χ. καθαρισμός του υφάσματος με ηλεκτρική σκούπα).

Ο χρόνος εμφάνισης της νόσου κυμαίνεται από λίγους μήνες μέχρι αρκετά έτη από την έκθεση και εκδηλώνεται ως προοδευτικά επιδεινούμενη δύσπνοια, ξηρός βήχας και συστηματικά συμπτώματα. Σε κάποιους ασθενείς τα συμπτώματα επιδεινώνονται στο χώρο εργασίας, ειδικά στην αρχή<sup>7,12</sup>. Οι λειτουργικές δοκιμασίες είναι ενδεικτικές για περιοριστικού τύπου διαταραχή με ελαττωμένη διάχυση. Το πιο κοινό εύρημα στην HRCT θώρακα είναι διάχυτες πνευμονικές διηθήσεις τύπου ground glass και κεντρολοβιδιακά οζίδια (εικόνα αντίστοιχη της πνευμονίτιδας από υπερευαισθησία)<sup>13</sup>. Ως θεραπεία προτείνεται η απομάκρυνση από την έκθεση και η συστηματική χορήγηση κορτικοστεροειδών<sup>12-14</sup>.

### 3. Σύνδρομο Ardystil

Το σύνδρομο Ardystil είναι μία βαριά μορφή οργανομένης πνευμονίας που πρωτοεκδηλώθηκε σε εργάτες στην υφαντουργία οι οποίοι εκτέθηκαν σε βαφή που περιείχε την ουσία Acramin-FWN σε μορφή σπρέι<sup>15,16</sup>. Η συμπτωματολογία ξεκινάει 1 μήνα μέχρι 1 έτος από την έκθεση και περιλαμβάνει επίσταξη, δύσπνοια, βήχα και θωρακικό άλγος<sup>17,18</sup>. Η HRCT θώρακα έχει ευρήματα οργανομένης πνευμονίας. Η πορεία της νόσου μπορεί να είναι κακή παρά τη συστηματική λήψη κορτικοστεροειδών (έχουν αναφερθεί 6 θάνατοι από το σύνδρομο)<sup>17</sup>.

### 4. Διάμεση πνευμονοπάθεια από οξείδιο ίνδίου-κασσιτέρου

Η έκθεση σε οξείδιο ίνδίου-κασσιτέρου (indium-tin oxide-ITO), κράμα που χρησιμοποιείται για την κατασκευή οθονών υγρών κρυστάλλων ή οθονών plasma έχει συνδεθεί με κυψελιδίτιδα και πνευμονική ίνωση στους εργάτες παραγωγής<sup>19</sup>. Οι πρώτες περιγραφές περιστατικών έγιναν το 2003 και προέρχονται από την Ιαπωνία, όπου και βρίσκονται οι μεγάλες παραγωγικές μονάδες<sup>19,20</sup>, αλλά υπάρχει η περίπτωση να εκδηλωθούν αντίστοιχες βλάβες μετά από έκθεση κατά την ανακύκλωση των συσκευών αυτών. Παράλληλα, υπάρχει μία σχετικά πρόσφατη αναφορά από την Τουρκία περιστατικών διάμεσης πνευμονοπάθειας σε βιομηχανία επικάλυψης χάλκινων σκευών με κασσίτερο<sup>21</sup>. Παρά το γεγονός ότι η έκθεση σε κασσίτερο

συνοδεύεται από πνευμονοκονίωση, η συγκεκριμένη σειρά περιστατικών είχε ευρήματα στη HRCT θώρακα αντίστοιχα με αναπνευστική βρογχιολίτιδα [respiratory bronchiolitis- interstitial lung disease (RB-ILD)].

Η εμφάνιση της νόσου καθυστερεί κατά 1 με 5 έτη μετά την έκθεση και υπάρχει εμφανής σχέση δόσης έκθεσης- αποτελέσματος, καθώς η σοβαρή νόσος συνδέθηκε με μακροχρόνια έκθεση και υψηλότερα επίπεδα ινδίου στον ορό των ασθενών. Τα ευρήματα στην HRCT θώρακα περιλαμβάνουν αλλοιώσεις τύπου ground glass, κεντρολοβιδιακά οζίδια και εμφύσημα<sup>19,20,22</sup>. Παθολογοανατομικά, ανευρίσκεται περιβρογχική ίνωση, γιγαντοκύτταρα τύπου ξένου σώματος και ενδοκυψελιδική συγκέντρωση μακροφάγων που περιέχουν καστανόχρωμα σωματίδια με ίνδιο<sup>20,22</sup>.

### 5. Διάμεση πνευμονοπάθεια από νανοσωματίδια

Υπάρχει γενικότερη ανησυχία για τις πιθανές βλάβες στην υγεία από τη νανοτεχνολογία και ειδικότερα από τα νανοσωματίδια<sup>23</sup>, ιδιαίτερα μετά την εμφάνιση κρουσμάτων διάμεσης πνευμονοπάθειας που συνοδεύτηκε από υπεζωκοτική ή περικαρδιακή συλλογή και κοκκιωματώδη αντίδραση τύπου ξένου σώματος σε εργάτριες που εκτέθηκαν σε αερόλυμα μίγματος πολυακρυλικών και στις οποίες η παθολογοανατομική εξέταση έδειξε εναπόθεση νανοσωματιδίων στα επιθηλιακά και μεσοθηλιακά κύτταρα, αλλά και στο υπεζωκοτικό υγρό<sup>24</sup>.

### 6. Διάμεση πνευμονοπάθεια από καύση βιομάζας

Είναι γνωστή η συσχέτιση μεταξύ έκθεσης σε καύσιμα

βιομάζας και στην πρόκληση Χρόνιας Αποφρακτικής Πνευμονοπάθειας σε γυναίκες - μη καπνίστριες ή στην εμφάνιση λοιμώξεων κατώτερου αναπνευστικού σε μικρά παιδιά<sup>25</sup>. Υπάρχουν ωστόσο αναφορές για ανάπτυξη διάμεσης πνευμονοπάθειας δευτεροπαθώς μετά από έκθεση σε καύση βιομάζας με αποτέλεσμα την ανάπτυξη της παθολογικής κατάστασης, γνωστής και ως "hut lung" στη διεθνή βιβλιογραφία<sup>25,26</sup>. Παθολογιογνωμονικό χαρακτηριστικό είναι η ανεύρεση μεγάλου αριθμού κηλίδων άνθρακα στους αεραγωγούς κατά τη βρογχοσκόπηση (μακροσκοπικά), αλλά και στο διάμεσο ιστό (παθολογοανατομική εξέταση). Οι ασθενείς εμφανίζουν σταδιακά δύσπνοια και βήχα, ενώ οι αναπνευστικές δοκιμασίες του πνεύμονα δείχνουν διαταραχή μικτού τύπου<sup>27</sup>. Η ακτινογραφία θώρακα δείχνει δικτυοοζώδεις ή οζώδεις διηθήσεις χωρίς ελάττωση των πνευμονικών όγκων<sup>27</sup>. Στην HRCT θώρακα, οι όζοι έχουν κεντρολοβιδιακή κατανομή<sup>28</sup>. Σε προχωρημένη νόσο παρατηρείται ίνωση και πνευμονική καρδιά<sup>26,27</sup>.

### 7. Πνευμονίτιδα από υπερευαισθησία λόγω έκθεσης σε ζωοτροφές

Υπάρχει αναφορά στην πρόκληση πνευμονίτιδας από υπερευαισθησία λόγω έκθεσης στο phytoset, ένα σχετικά νέο προσθετικό στις ζωοτροφές<sup>29</sup>.

### 8. Νέες οδοί έκθεσης από γνωστούς παράγοντες κινδύνου

Ουσίες που έχουν ήδη ενοχοποιηθεί στην πρόκληση επαγγελματικών διάμεσων πνευμονοπαθειών φαίνεται

**ΠΙΝΑΚΑΣ Ι.** Νεοεμφανιζόμενες διάμεσες παθήσεις του πνεύμονα επαγγελματικής αιτιολογίας

Αίτιο	Νόσος	Κατηγορίες εργαζομένων
Διακετύλιο	Αποφρακτική βρογχιολίτιδα	Βιομηχανία τροφίμων- παρασκευή porcorn-ζαχαροπλαστική
Ίνες flock (νάιλον, πολυαιθυλενίου, πολυπροπυλενίου, ρεγίων)	Λεμφοκυτταρική βρογχιολίτιδα	Υφασματοποιία (τσόχα)
Acramin-FWN (συνθετική βαφή)	Οργανώμενη πνευμονία (Σύνδρομο Ardystil)	Υφαντουργία
Οξειδίο ινδίου- κασσίτερου	Κυψελιδίτιδα, πνευμονική ίνωση	Κατασκευή οθονών (υγρών κρυστάλλων ή plasma)
Νανοσωματίδια	Πνευμονική ίνωση με υπεζωκοτική συλλογή	Χρήση νανοτεχνολογίας
Καύση βιομάζας	Πνευμονική ίνωση	Οικιακή χρήση για θέρμανση, μαγειρική
Phytoset (Προσθετικό στις ζωοτροφές)	Πνευμονίτιδα από υπερευαισθησία	Εκτροφείς ζώων
Άμμος	Διάμεση πνευμονοπάθεια (Πυριτίαση)	Βιοτεχνίες ένδυσης "πετροπλυμένα" jeans

ότι βρίσκουν νέες εφαρμογές, εξακολουθώντας με τον τρόπο αυτό να προκαλούν κρούσματα, και μάλιστα σε μεγάλες σειρές εργαζομένων. Για παράδειγμα, παρ' όλο που η πυριτίαση είναι γνωστή νόσος και θεωρείται ότι μπορεί πλέον να προληφθεί πλήρως, δημοσιεύτηκε πρόσφατα μία σειρά νέων περιστατικών σε εργαζομένους στη βιομηχανία ένδυσης στην Τουρκία που ασχολούνταν στο πλύσιμο με άμμο των παντελονιών τζιν ώστε να τους δώσουν το χαρακτηριστικό χρώμα και υφή<sup>30</sup>.

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Η εμφάνιση μίας διάμεσης πνευμονοπάθειας μπορεί να οφείλεται σε έκθεση σε νέους, όχι ακόμη ευρέως γνωστούς

παράγοντες κινδύνου στο χώρο εργασίας. Η διάγνωση επομένως απαιτεί υψηλό βαθμό κλινικής υποψίας, αλλά και λήψη λεπτομερούς ιστορικού επαγγελματικής και περιβαλλοντικής έκθεσης. Οι θεραπευτικές επιλογές δεν διαφέρουν συνήθως από αυτές των ιδιοπαθών διάμεσων πνευμονοπαθειών, αλλά συμπεριλαμβάνουν απαραίτητα και την απομάκρυνση από την πηγή έκθεσης. Σημαντικότερη είναι, ωστόσο, η πρωτογενής και δευτερογενής πρόληψη, ώστε να αποτραπεί η εμφάνιση κρουσμάτων μεταξύ των εργαζομένων.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(Βλέπε αγγλικό κείμενο)

# Beyond pneumoconiosis: Recently described occupational interstitial lung diseases

**Evangelia Nena<sup>1</sup>,  
Paschalis Steiropoulos<sup>2</sup>,  
Theodoros C. Constantinidis<sup>1</sup>,  
Demosthenes Bouros<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Laboratory of Hygiene and Environmental Protection, Medical School, Democritus University of Thrace, Alexandroupolis, Greece  
<sup>2</sup>Department of Pneumology, Medical School, Democritus University of Thrace, Alexandroupolis, Greece

### Key words:

- occupational interstitial lung disease
- work-related pulmonary fibrosis

### Correspondence to:

Evangelia Nena, MD, PhD  
Occupational Physician, Laboratory of Hygiene and Environmental Protection, Medical School, Democritus University of Thrace  
68100, Alexandroupolis, Greece  
Tel: +306944772364  
E-mail: enena@med.duth.gr

**SUMMARY.** Recent technological innovations have resulted in the introduction of new substances in different manufacturing procedures. Unfortunately, lack of knowledge of the adverse effects of some novel substances has led to the development of interstitial lung disease (ILD) among exposed workers. Exposure to diacetyl can cause bronchiolitis obliterans (“popcorn lung”), while exposure to nylon flock, Acramin-FWN, indium-tin oxide, biomass fuels or nanoparticles is associated with ILD. In addition, hypersensitivity pneumonitis can occur after exposure to additives in animal feed. Finally, new applications of substances already known to be hazardous can result in the occurrence of ILD in exposed workers. *Pneumon 2010, 23(3):297-300.*

## INTRODUCTION

The term ‘occupational interstitial lung disease’ usually refers to a number of pneumoconioses, i.e. interstitial lung disease (ILD) due to exposure to inorganic substances, such as asbestos, in the workplace. The identification of hazardous substances and the understanding of the biological consequences of exposure resulted in a significant reduction of the prevalence of these disorders. The development of new technologies, however, has resulted in the introduction of new substances, or new applications of substances already known to be hazardous<sup>1</sup>. At first, new cases of ILD were often considered to be of idiopathic origin, which emphasizes the importance of seeking information about the occupational and environmental exposure to possibly hazardous substances in the medical history.

This review explores all recent reports of ILD of occupational origin, the occurrence of which was associated with exposure to novel substances

### 1. Bronchiolitis Obliterans due to diacetyl exposure

Diacetyl is a chemical of low molecular weight, used as a food additive to give a flavour of butter. Recent reports have associated diacetyl use with

bronchiolitis obliterans, a condition frequently referred to as "popcorn lung" because the first outbreaks of cases were reported among workers involved in the mixing and packaging of that product.<sup>2</sup> Individuals with other diacetyl exposure scenarios, such as work in confectionery, also appear to be at risk.<sup>3,4</sup>

The prognosis differs significantly from the bronchiolitis obliterans of the "silo-filler's lung", which is reversible and responds well to early treatment with steroids. In contrast, the prognosis in diacetyl-caused bronchiolitis obliterans is much worse, as a more insidious constrictive pattern develops, resulting in a condition that can be life-threatening and may require lung transplantation.

Apart from diacetyl exposure, bronchiolitis obliterans can be caused by an Asian herbal medicine derived from *Sauropus*.<sup>5</sup> In addition, an outbreak of bronchiolitis obliterans was recently reported among small craft boat builders who were using styrene containing "gelcoat" as a coating for fibreglass hulls.<sup>6</sup>

## 2. Flock-associated ILD ('Flock-Workers Lung')

Lymphocytic bronchiolitis of occupational exposure was first reported among manufacturing workers heavily exposed to nylon flock (i.e., very short synthetic nylon fibres used in nonwoven applications)<sup>7</sup>. The first cases to be reported were initially described as desquamative pneumonia<sup>8</sup> and were attributed to an unspecified toxin exposure, rather than to the flock fibres. As subsequent cases emerged, the pathological findings appeared to be better characterized as lymphocytic bronchiolitis and peribronchiolitis, and were linked with exposure to flock.

Workers exposed to flock made of polyethylene, polypropylene, and rayon are also at risk of developing lymphocytic bronchiolitis<sup>9-11</sup>. The predominant risk factors are the short length of the synthetic fibres and the performance of work processes that generate substantial concentrations of airborne fibres.

The latency of flock-workers' ILD ranges between a few months and several years. It usually presents with gradually progressive dyspnoea, dry cough and constitutional symptoms. Some patients also demonstrate work-related symptoms, especially early in the process<sup>7,12</sup>. Pulmonary function tests typically reveal restriction and reduced diffusion. The most common findings on high resolution computed tomography (HRCT) of the chest are diffuse ground glass changes and centrilobular nodules giving an overall appearance very similar to hypersensitivity pneumonitis<sup>13</sup>. Removal from exposure and corticosteroids

comprise the recommended treatment<sup>12-14</sup>.

## 3. Ardystil syndrome

Ardystil syndrome is a severe form of organizing pneumonia that was first described in textile workers exposed to a certain spray paint containing the chemical Acramin-FWN<sup>15,16</sup>. The syndrome latency ranges from one month to one year. Typical symptoms include epistaxis, dyspnoea, cough, and chest pain<sup>17,18</sup>. The prognosis is poor, as the lung disease is often severe and progressive, despite steroid treatment, leading in some cases to death<sup>17</sup>.

## 4. ILD due to indium-tin oxide

Exposure to indium-tin oxide, a metal alloy used in the manufacture of liquid crystal or plasma flat panel display units, has been linked to alveolitis and pulmonary fibrosis among production workers.<sup>19</sup> The first reports of this novel form of pneumoconiosis came from Japan, where the majority of such manufacturing industries is concentrated,<sup>19,20</sup> but additional cases can occur through exposure during the recycling of these devices.

A recent report from Turkey describes the cases of interstitial lung disease among cottage industry workers lining copper pots with tin<sup>21</sup>. Although tin exposure is linked to a "benign" pneumoconiosis, this case cluster had CT findings suggestive of respiratory bronchiolitis-interstitial lung disease (RB-ILD).

The reported latency ranges from one to 5 years. Longer exposure and higher serum indium levels have been linked with more severe disease. HRCT findings include ground glass appearance, centrilobular nodules and emphysema<sup>19,20,22</sup>. Histopathological examination reveals peribronchiolar fibrosis, foreign body giant cells and intraalveolar accumulation of macrophages containing brown particles composed of indium<sup>20,22</sup>.

## 5. ILD due to nanoparticles

There is rising concern over the potential human respiratory health effects of a spectrum of engineered nanomaterials, particularly nanotubules and nanoparticles<sup>23</sup>. The seriousness of this potential new threat has been confirmed by a recent outbreak of severe pulmonary-pleural disease, with histopathologically confirmed, nanoparticle-laden epithelial cells, in factory workers who were heavily exposed to an aerosolized polyacrylate mixture. The histological examination revealed nanoparticles in the epithelial and mesothelial cells and in the pleural fluid<sup>24</sup>.



## 6. ILD due to biomass fuels

It is already known that use of biomass fuels results in the occurrence of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in non-smoking women and lower respiratory tract infections in children<sup>25</sup>. There have also been reports of development of ILD after exposure to burning of biomass fuels, a condition known as "hut lung".<sup>25,26</sup> Bronchoscopy reveals a large number of anthracotic pigments in the airways. These pigments are also found in the interstitial tissue on histopathological examination. The patients develop progressive cough and dyspnoea, and their pulmonary function tests indicate a mixed disorder<sup>27</sup>. The chest X-ray shows reticulonodular or nodular infiltrates with preservation of the lung volume<sup>27</sup>. On HRCT the distribution of the nodules is seen to be centrilobular<sup>28</sup>. In advanced disease, massive lung fibrosis and cor pulmonale develop<sup>26,27</sup>.

## 7. Hypersensitivity pneumonitis after exposure to animal feed

Phytoset, a relatively new additive in animal feed has been reported to be responsible for causing hypersensitivity pneumonitis<sup>29</sup>.

## 8. Novel routes of exposure for established causes of ILD

Numerous substances of which the adverse effects on the respiratory system have been known for a long time continue to have novel applications, resulting in the occurrence of different lung disorders. An example of this is the epidemic of silicosis (which is considered a preventable disease) in Turkey among workers in jeans-manufacturing companies due to the sandblasting procedure that gives a "distressed" look, popular for consumer retailing<sup>30</sup>.

## CONCLUSIONS

Clinical physicians play an important role in diagnosing the abovementioned novel conditions; they should always be aware that the development of ILD may be due to workplace exposure to a hazardous substance. The diagnosis requires a high degree of clinical suspicion, and a detailed occupational and environmental history. Pharmaceutical treatment is similar to that for other forms of ILD, but in this case of occupational exposure the management includes removal from further exposure. What is more important though, is for measures to be taken for primary and secondary disease prevention, in

**Table I.** Recently described interstitial lung diseases of occupational origin

<b>Risk factor</b>	<b>Disease</b>	<b>Occupational exposure</b>
Diacetyl	Bronchiolitis obliterans	Food industry (especially popcorn manufacturing)
Nylon, polyethylene, polypropylene, rayon flock fibres	Lymphocytic bronchiolitis	Synthetic flock manufacturing
Acramin-FWN (synthetic spray paint)	Organizing pneumonia (Ardystil Syndrome)	Textile workers
Indium-tin oxide	Pulmonary fibrosis, alveolitis	Production of flat panel display units
Nanoparticles	Pulmonary fibrosis with pleural effusion	Nanoparticle aerosols
Biomass fuels	Interstitial lung disease	Domestic use for heating, cooking
Phytoset (Additive in animal feed)	Hypersensitivity pneumonitis	Animal breeding
Sand	Silicosis	Blue jeans manufacture

order to stop the occurrence of these diseases among the working population.

## REFERENCES

1. Glazer CS, Maier L. Occupational interstitial lung disease. *Eur Respir Monograph* 2009;46:265-286
2. Kanwal R. Bronchiolitis obliterans in workers exposed to flavoring chemicals. *Cur Opin Pulm Med* 2008;14:141-146.
3. McConnell RS, Hartle RW, International Bakers Services, Inc. Health Hazard Evaluation Report (HETA 95-171-1710). Cincinnati, OH: National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH), 1985.
4. Van Rooy FG, Rooyackers JM, Prokop M, et al. Bronchiolitis obliterans syndrome in chemical workers producing diacetyl for food flavorings. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;176:498-504.
5. Oonakahara K, Matsuyama W, Higashimoto I, et al. Outbreak of bronchiolitis obliterans associated with consumption of *Sauropus androgynus* in Japan: alert of food-associated pulmonary disorders from Japan. *Respiration* 2005;72:221.
6. Volkman KK, Merrick JG, Zacaharisen MC. Yacht-maker's lung: a case of hypersensitivity pneumonitis in yacht manufacturing. *Wisc Med J* 2006;105:47-50.
7. Eschenbacher WL, Kreiss K, Loughheed MD, et al. Nylon-flock associated interstitial lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159:2003-2008.
8. Loughheed MD, Roos JO, Waddell WR, et al. Desquamative interstitial pneumonitis and alveolar damage in textile workers: a potential role of mycotoxin. *Chest* 1995;108:1996-2000.
9. Antao VCS, Piacitelli CA, Miller WE, et al. Rayon flock: a new cause of respiratory morbidity in a card processing plant. *Am J Ind Med* 2007;50:274-284.
10. Atis S, Tutluoglu B, Levent E, et al. The respiratory effects of occupational polypropylene flock exposure. *Eur Respir J* 2005;25:110-117.
11. Barroso E., Ibañez MD, Aranda FI, et al. Polyethylene flock-associated interstitial lung disease in a Spanish Female. *Eur Respir J* 2002;20:1610-1612.
12. Kern DG, Kuhn C, Ely EW, et al. Flock workers' lung: broadening the spectrum of clinicopathology, narrowing the spectrum of suspected etiologies. *Chest* 2000;117:251-259.
13. Weiland DA, Lynch DA, Jensen SP, et al. Thin-section CT findings in flock workers lung, a work related interstitial lung disease. *Radiology* 2003;227:222-231.
14. Kern DG, Crausman RS, Durand KT, et al. Flock workers' lung: chronic interstitial lung disease in the nylon flocking industry. *Ann Intern Med* 1998;129:261-272.
15. Moya C, Antó JM, Taylor AJ. Outbreak of organising pneumonia in textile printing sprayers. Collaborative Group for the Study of Toxicity in Textile Aerographic Factories. *Lancet*. 1994;344:498-502.
16. Camus P, Nemery B. A novel cause for bronchiolitis obliterans organizing pneumonia: exposure to paint aerosols in textile workshops. *Eur Respir J* 1998;11:259-262.
17. Romero S, Hernández L, Gil J, Aranda I, Martín C, Sanchez-Payá J. Organizing pneumonia in textile printing workers: a clinical description. *Eur Respir J*. 1998;11:265-271.
18. Solé A, Cordero PJ, Morales P, Martínez ME, Vera F, Moya C. Epidemic outbreak of interstitial lung disease in aerographics textile workers--the "Ardystil syndrome": a first year follow up. *Thorax* 1996;51:94-95.
19. Chonan T, Taguchi O, Omae K. Interstitial pulmonary disorders in indium-processing workers. *Eur Respir J* 2007;29:317-324.
20. Homma T, Ueno T, Sekizawa K et al. Interstitial pneumonia developed in a worker dealing with particles containing indium-tin oxide. *J Occup Health* 2003;45:137-139.
21. Dikensoy O, Kervancioglu R, Ege I, et al. High prevalence of diffuse parenchymal lung diseases among Turkish tanners. *J Occup Health* 2008;50:208-211.
22. Homma S, Miyamoto A, Sakamoto S et al. Pulmonary fibrosis in an individual occupationally exposed to inhaled indium-tin oxide. *Eur Respir J* 2005;25:200-204.
23. Bonner JC. Nanoparticles as a potential cause of pleural and interstitial lung disease. *Proc Am Thor Soc* 2010;7:138-141.
24. Song Y, Li X, Du X. Exposure to nanoparticles is related to pleural effusion, pulmonary fibrosis and granuloma. *Eur Respir J* 2009; 34:559-567.
25. Torres-Duque C, Maldonado D, Perez-Padilla R, et al. Biomass fuels and respiratory diseases: a review of the evidence. *Proc Am Thorac Soc* 2008;5: 577-590.
26. Grobbelaar JP, Bateman ED. Hut lung: a domestically acquired pneumoconiosis of mixed aetiology in rural women. *Thorax* 1991;46: 334-340.
27. Sandoval J, Salas J, Martinez-Guerra ML, et al. Pulmonary arterial hypertension and cor pulmonale associated with chronic domestic woodsmoke inhalation. *Chest* 1993;103:12-20.
28. Gold JA, Jagirdar J, Hay JG, et al. Hut lung. A domestically acquired particulate lung disease *Medicine (Baltimore)* 2000;79: 310-317.
29. Van Heemst RC, Sander I, Rooyackers J, et al. Hypersensitivity pneumonitis caused by occupational exposure to phytase. *Eur Respir J* 2009;33:1507-1509.
30. Alper F, Akgun M, Onbas O, et al. CT findings in silicosis due to denim sandblasting. *Eur Radiol* 2008;18:2739-2744.

# Bullectomy for “bong lung” in an 18 year-old male presenting with spontaneous pneumothorax

**Roger K.A. Allen**

Wesley Medical Centre, Brisbane, QLD,  
Australia

**Key words:**

- “bong lung”
- cannabis
- adolescence
- spontaneous pneumothorax
- apical bullae

**Correspondence to:**

Professor Roger K.A. Allen, MBBS (Hons 1st Qld), FRACP,  
FCCP, PhD (Melb)  
Suite 46, Wesley Medical Centre  
40 Chasely St, Auchenflower,  
Brisbane, QLD 4066  
Australia  
Tel.: +617 37195577  
Fax: +617 37195177  
E-mail: rogerallen@sarcoidosis.com.au

**SUMMARY.** An 18 year-old male who had smoked cannabis for four years presented with a spontaneous pneumothorax and was treated by apical bullectomy. The surgical and histopathological findings were characteristic of “bong lung”. This patient is the youngest reported in the literature and the case highlights the fact that the disease can occur even in adolescents after a few years of smoking cannabis. *Pneumon 2010, 23(3):301-303.*

### HISTORY:

In August 2006, an 18 year-old male was referred for management of spontaneous left pneumothorax which had occurred the previous day, presenting with chest pain and dyspnoea. His general health had been good, apart from an episode of depression at age 14 years for which he had been hospitalized under the care of a psychiatrist and for which he was still taking venlafaxine hydrochloride 450 mg/day. There was no past history of lung disease. However, he had smoked marijuana heavily since the age of 14 years and was consuming, on average, one ounce of marijuana mixed with two ounces of tobacco weekly, or about four to five cones daily.

On examination, he looked well, he weighed 62 kg, his height was 185 cm and there were no physical findings apart from reduced breath sounds in the left apex. He was not Marfanoid.

### RADIOLOGY:

Chest X-ray on 17 August 2006 showed a left pneumothorax. Chest computed tomography (CT) on 21 August 2006 (high resolution non-contrast 16 slice axial spiral scans, 1mm thick axial scans at 10mm intervals slices) showed thin-walled bullae in the left apex, the largest of which was 2.8 x 2.1 cm. Several smaller bullae were present in the right apex. There were

no other abnormalities (Fig. 1).

#### TREATMENT:

On 24 August 2006, he underwent video-assisted thoracoscopy, with apical bullectomy and stapling of the bullae in the left apex, and abrasion pleurodesis (Fig. 2).

#### SURGICAL FINDINGS:

The appearance of the lung differed very little on the outside from what is seen in the usual young pneumothorax patient who is a smoker. However the appearance of the cut edge of the lung parenchyma after the cutting and stapling device had been fired was quite different. The tissue was both thickened and "juicy", and very brown and tarry. The apical blebs or bullae were more prominent than the usual "bubble-wrap" appearance, but this is not pathognomic; it is the appearance of the cut edge which gives the clue to "bong lung".

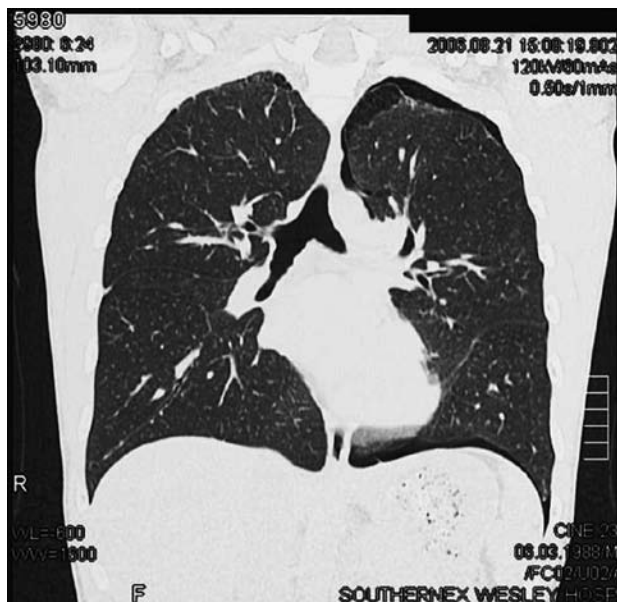
#### PATHOLOGY:

The resected lung showed classical features of "bong lung". There were subpleural blebs/bullae and subpleural

emphysematous changes (Fig. 3), and immediately adjacent, numerous heavily pigmented smokers' macrophages, giving a desquamative interstitial pneumonia (DIP)-like effect (Fig. 4). These changes have been described in "bong lung".<sup>1</sup>

#### DISCUSSION:

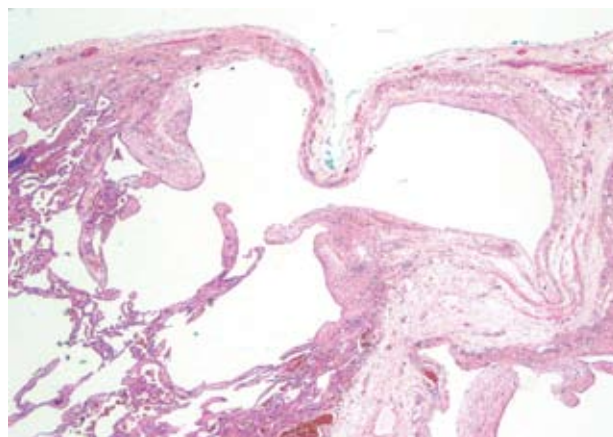
"Bong lung" was first described by Johnson et al in 2000 when they published four cases ranging in age from 27 to 46 years, with smoking of tobacco combined with marihuana common to all cases.<sup>1</sup> All had upper lobe bullae of varying severity, with essentially normal parenchyma



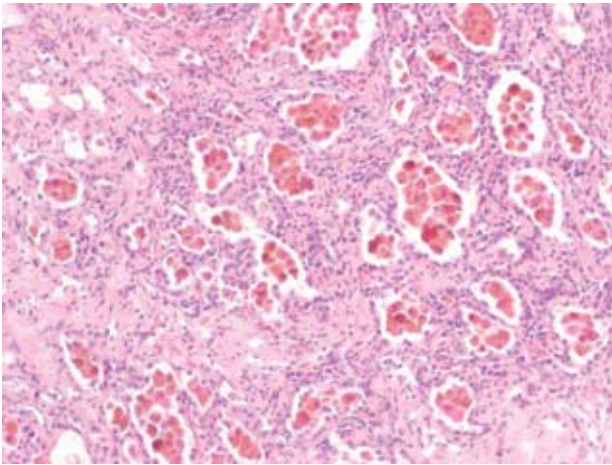
**FIGURE 1.** High resolution CT scan of the thorax, showing apical bullae in the left lung.



**FIGURE 2.** Video-thoracoscopy showing apical bullae in the left lung.



**FIGURE 3.** Histological section (x 20, H & E stain) showing subpleural bullae.



**FIGURE 4.** Histological section (x 100, H & E stain) showing desquamative interstitial pneumonia (DIP)-like reaction with massive intra-alveolar accumulation of heavily pigmented macrophages ("smoker's macrophages") and associated interstitial scarring.

below and were much more extensive than in the case reported here. The duration of marihuana smoking was considerably longer although not necessarily heavier than in the present case, and one had suffered a spontaneous pneumothorax. Of note was the finding that the amount of tobacco smoked was much less than would normally cause bullous lung disease. The authors concluded that "Bong lung should be considered as one of the many causes of spontaneous pneumothorax especially in young males. When a smoking history is taken, this should specifically include the smoking of marihuana".

The following histological features are strongly supportive of a diagnosis of use of cannabis (and other illicit drugs including "crack" cocaine): a DIP-like pattern in histological sections of apical lung specimens from resection for pneumothorax, characterized by massive accumulation of heavily pigmented macrophages (in excess of that seen with even heavy tobacco smokers), combined with the presence of pulmonary apical cystic disease.<sup>2</sup> What distinguishes DIP from "bong lung" is the combination of prominent interstitial scarring and bullous

disease in the latter. In addition, in patients with "bong lung", there is no radiological evidence of interstitial lung disease. The other disease to be considered in the histological differential diagnosis is respiratory bronchiolitis-interstitial lung disease (RB-ILD). In contrast to this disease, "bong lung" macrophages contain a coarse brown pigment and are not exclusively centred on the respiratory bronchioles.

Marihuana smoking is associated with deeper inhalation and longer holding of the breath than occurs with tobacco smoking and which may be sufficient to cause barotrauma.<sup>1</sup> This patient is the youngest reported in the literature and the case highlights, yet again, the fact that marihuana smoking is not an innocuous habit.<sup>3,4</sup> The potential for cannabis to cause such severe lung damage in a relatively short time in young smokers should be emphasized in public health initiatives aimed at reducing the acceptance of cannabis smoking by the public, particularly the young.

## ACKNOWLEDGEMENTS

I wish to thank Dr Debbie Norris, Histopathologist, Queensland Medical Laboratories for her advice on the histological features of this condition and for the photomicrographs, and Dr Peter M. Wragg, Thoracic and Vascular Surgeon, Wesley Medical Centre for his comments on the surgical findings and for the photographs taken at thoracoscopy.

## REFERENCES

1. Johnson MK, Smith RP, Morrison D, Laszlo G, White RJ. Large bullae in marihuana smokers. *Thorax* 2000; 55: 340-342.
2. Gill A. Bong Lung: Regular smokers of cannabis show relatively distinctive histologic changes that predispose to pneumothorax. *Am J Surg Path* 2005; 29(7): 980-982.
3. Urban T. Manifestations Respiratoires liées à l' inhalation de fumée de cannabis. *Rev Mal Respir* 2008; 25:1338-40.
4. Taylor DR, Hall W. Respiratory health effects of cannabis: Position statement of The Thoracic Society of Australia and New Zealand. *Int Med J* 2003; 33: 310-313.

# Το σανατόριο της Αγίας Ελεούσας: Ένας σημαντικός σταθμός στην ιστορία της Πνευμονολογίας στο νησί της Ρόδου

**Ανδριάνα Ι. Παπαϊωάννου<sup>1</sup>,  
Κωνσταντίνος Θ. Κωστίκας<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Ειδικευόμενη Πνευμονολόγος, Γ'  
Πνευμονολογική Κλινική, Σισμανόγλειο  
Νοσοκομείο

<sup>2</sup>Πνευμονολόγος, Συντακτική Επιτροπή  
«Πνεύμων»

Το Σανατόριο της Αγίας Ελεούσας (Εικόνα 1) ήταν το κύριο νοσηλευτικό ίδρυμα για τη νοσηλεία ασθενών με φυματίωση στα Δωδεκάνησα για 23 χρόνια (1947-1970). Ξεκίνησε τη λειτουργία του τον Αύγουστο του 1947, στα Ιταλικά κτίρια του οικισμού υλοτόμων Campo Chiaro, με αρχική δύναμη 80 κλινών και απασχολούμενο προσωπικό 54 άτομα. Παρά το γεγονός ότι, από κλιματολογικής άποψης, η τοποθεσία δεν ήταν ιδανική, καθώς η περιοχή βάλλεται από ισχυρούς και ψυχρούς ανέμους, το μέρος επιλέχθηκε κυρίως λόγω της αναγκαιότητας για απομόνωση των ασθενών με φυματίωση.

Οι πρώτοι ασθενείς του σανατορίου ήταν πάσχοντες από φυματίωση, οι οποίοι μέχρι τότε νοσηλεύονταν στο Νοσοκομείο "Θέρμαι" στο κέντρο της πόλης της Ρόδου και στη Βίλλα Πασά στο χωριό Κρεμαστή. Κεντρικό πρόσωπο στην πορεία του σανατορίου ήταν ο ιατρός Πνευμονολόγος-Φυματιολόγος Εμμανουήλ Γ. Κωσταρίδης (Εικόνα 2), ο οποίος διετέλεσε Επιστημονικός Διευθυντής του ιδρύματος κατά το μεγαλύτερο διάστημα των 23 ετών της λειτουργίας του. Ο ίδιος διετέλεσε Διοικητικός Διευθυντής για περισσότερα από 15 χρόνια, ενώ για μεγάλο διάστημα ήταν ο μοναδικός ιατρός του σανατορίου.

Η κύρια δυσκολία στη λειτουργία του Σανατορίου ήταν η μεγάλη απόσταση από την πόλη της Ρόδου, γεγονός που καθιστούσε πολύ δύσκολο τόσο τον ανεφοδιασμό του, όσο και την προσέλκυση εξειδικευμένου προσωπικού. Ο Δρ. Κωσταρίδης αγωνίστηκε ακούραστα προσπαθώντας να βρει λύσεις τόσο στα αντικειμενικά προβλήματα που σχετίζονταν με την απόσταση και την έλλειψη εργαστηριακής υποδομής στο σανατόριο όσο και σε ποικίλα γραφειοκρατικά προβλήματα<sup>1</sup>.

## Η ΦΡΟΝΤΙΔΑ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΦΥΜΑΤΙΩΣΗ

Τα περισσότερα χρόνια η παρακολούθηση των ασθενών στο Σανατόριο γινόταν από 2 φυματιολόγους ιατρούς, το Διευθυντή και έναν Επιμελητή. Το ίδρυμα διέθετε ένα μικρό μικροβιολογικό εργαστήριο στο οποίο εκτελούνταν βασικές εξετάσεις (εξέταση πτυέλων για ανεύρεση βακίλου του Koch, ΤΚΕ, γενική εξέταση ούρων), ενώ οι υπόλοιπες εξετάσεις πραγματοποιούνταν στο Γενικό Νοσοκομείο Ρόδου. Έλεγχος της ευαισθησίας του

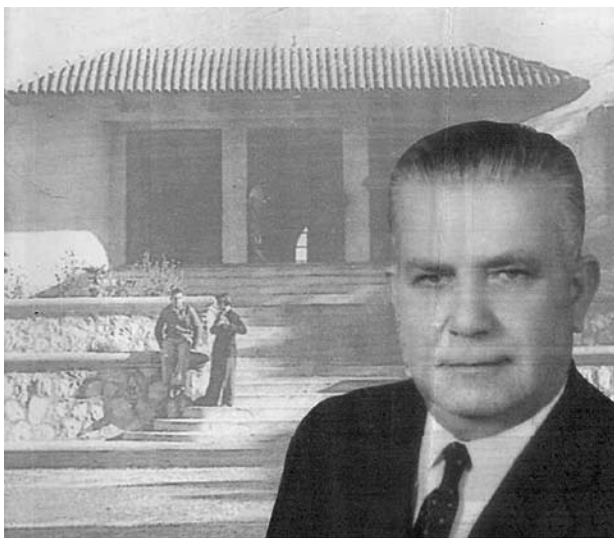
### Αλληλογραφία:

Ανδριάνα Ι Παπαϊωάννου  
Γ' Πνευμονολογική Κλινική Γ.Ν. «Σισμανόγλειο»,  
Σισμανογλείου 1, 15126, Μαρούσι Αθήνα  
Τηλ: +30 210 8039422  
E-mail: andriana78@vodafone.net.gr





**EIKONA 1.** Το κεντρικό κτίριο του Σανατορίου όπως διασώζεται σήμερα.



**EIKONA 2.** Ο Πνευμονολόγος-Φυματιολόγος Εμμανουήλ Γ. Κωσταρίδης.

βακίλου στα αντιφυματικά φάρμακα άρχισε να πραγματοποιείται το 1964 σε δείγματα που αποστέλλονταν στο Νοσοκομείο "Σωτηρία". Το Σανατόριο διέθετε επίσης

ακτινολογικό εργαστήριο για απλές ακτινογραφίες και ακτινοσκοπήσεις.<sup>1</sup>

Η θεραπεία των ασθενών τα πρώτα χρόνια της λειτουργίας του Σανατορίου περιλάμβανε τη χορήγηση των τότε διαθέσιμων αντιφυματικών φαρμάκων (στρεπτομυκίνη, PAS), καθώς και αεροθεραπεία, ασβεστοθεραπεία, και "γενική τονωτική", ενώ σημαντική θεραπευτική παρέμβαση αποτελούσε η "συμπτυξιοθεραπεία" με εφαρμογή τεχνητού πνευμοθώρακα<sup>2</sup>. Για μεγάλες θωρακοχειρουργικές επεμβάσεις (π.χ. θωρακοπλαστική) οι ασθενείς μεταφέρονταν στο Νοσοκομείο «Σωτηρία»<sup>3</sup>, ενώ μικρότερες επεμβάσεις - όπως συμφυσιολύσεις - πραγματοποιούνταν θωρακοσκοπικά στο ίδρυμα.

Το Σανατόριο υπήρξε από τα πρώτα ιδρύματα της χώρας όπου χρησιμοποιήθηκε το «νέο» φάρμακο εκείνης της εποχής, η ισονιαζίδη. Ο Δρ. Κωσταρίδης, έχοντας έντονο το αίσθημα της ευθύνης στον ασθενή αλλά και της επιστημονικής αναζήτησης, αντιμετώπισε τη χορήγηση του νέου φαρμάκου με ιδιαίτερη προσοχή. Ο ίδιος αναφέρει στα κείμενά του ότι «...για την εφαρμογή αυτού του νέου φαρμάκου χρειαζόταν συνεχής παρακολούθηση των ασθενών, κλινική, ακτινολογική και εργαστηριακή,

δεδομένου ότι επρόκειτο περί φαρμάκου του οποίου δεν ήταν ακόμη γνωστές οι ενέργειες και οι παρενέργειες». Για το λόγο αυτό, η ισονιαζίδη χορηγήθηκε αρχικά σε 3 από τους βαρύτερα πάσχοντες ασθενείς του Σανατορίου, υπό στενή παρακολούθηση<sup>1</sup>.

Τα πλεονεκτήματα της θεραπείας με 3 ή περισσότερα αντιφυματικά φάρμακα είχαν ήδη αρχίσει να γίνονται γνωστά και ο Εμμ. Κωσταρίδης παρατήρησε από νωρίς ότι οι θεραπευτικές αποτυχίες ήταν περισσότερες σε ασθενείς οι οποίοι είχαν προηγουμένως υποβληθεί σε πλημμελή θεραπεία, ένα συχνό φαινόμενο την εποχή εκείνη<sup>4,5</sup>. Σύμφωνα με μαρτυρίες των ασθενών και των συναδέλφων του, αντιμετώπιζε τον άνθρωπο σαν ολότητα ψυχική και οργανική, ενώ αναγνώριζε τα κοινωνικά και οικονομικά προβλήματα που προκαλούσε η νόσος στους ασθενείς και προσπαθούσε να τους βοηθήσει με τον καλύτερο δυνατό τρόπο, προστατεύοντας παράλληλα το κοινωνικό σύνολο<sup>1</sup>.

## Η ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΕΞΩΤΕΡΙΚΟΥ ΑΝΤΙΦΥΜΑΤΙΚΟΥ ΙΑΤΡΕΙΟΥ

Στο σανατόριο λειτουργούσε 3 φορές την εβδομάδα εξωτερικό Αντιφυματικό Ιατρείο, ενώ άλλες 3 φορές το ιατρείο αυτό πραγματοποιούταν στο Γενικό Νοσοκομείο Ρόδου. Σκοπός του ιατρείου αυτού ήταν η κλινική, εργαστηριακή και ακτινολογική παρακολούθηση των ασθενών που έπαιρναν εξιτήριο από το Σανατόριο, η διασφάλιση της συνέχισης της αγωγής, η εξέταση του περιβάλλοντος των ασθενών και η χορήγηση χημειοπροφύλαξης, καθώς και η ενημέρωση των πολιτών του νησιού για τη νόσο. Το προσωπικό του Ιατρείου κατέβαλλε κάθε δυνατή προσπάθεια για την επιτυχία του αντιφυματικού αγώνα στην περιοχή, επεκτείνοντας τη δράση του και εκτός των τειχών των νοσηλευτικών ιδρυμάτων, με επισκέψεις στα σχολεία του νησιού για την πραγματοποίηση φυματινο-αντίδρασης Mantoux και την εφαρμογή αντιφυματικού εμβολιασμού<sup>1</sup>.

## ΣΥΝΕΧΗΣ ΑΓΩΝΑΣ ΚΑΤΑ ΤΗΣ ΦΥΜΑΤΙΩΣΗΣ

Παρά την επιτυχία των νέων αντιφυματικών φαρμάκων, ο Εμμανουήλ Κωσταρίδης προέβλεψε με μεγάλη διορατικότητα την ανάπτυξη ανθεκτικών στελεχών του μυκοβακτηριδίου, συνδέοντας το γεγονός αυτό με την επιπόλαιη αντιμετώπιση της νόσου, γεγονός που είναι πλέον αποδεδειγμένο στις μέρες μας<sup>5</sup>. Χαρακτηριστικά δήλωνε ότι η φυματίωση είναι ένας μεγάλος εχθρός ο οποίος «αρχίζει μετά τα πλήγματα να συνέρχεται και να ετοιμάζει την αντεπίθεσή του, με το να γίνεται, έστω ακόμη κάπως δειλά, ανθεκτικός»<sup>6</sup>. Το 1964 το σύνθημα του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας ήταν «Ουδεμία ανάπαυλα στον αγώνα κατά της φυματίωσης» και το σύνθημα αυτό χρησιμοποίησε και ο ίδιος προκειμένου να ενημερώσει την κοινή γνώμη της Ρόδου με διαλέξεις και ομιλίες με θέμα τον αντιφυματικό αγώνα<sup>1</sup>.

Το σανατόριο έκλεισε τον Αύγουστο του 1970, ενώ το αντιφυματικό ιατρείο λειτούργησε μέχρι το Δεκέμβριο του 1971, οπότε σταμάτησε τη λειτουργία του με τη λήξη της θητείας του Διευθυντού ιατρού. Έχοντας συνολικά νοσηλεύσει 1.581 ασθενείς από διάφορα μέρη της Ελλάδας και έχοντας συμβάλει ουσιαστικά στον αγώνα για την ενημέρωση του κοινωνικού συνόλου ενάντια στη φυματίωση, το σανατόριο της Αγίας Ελεούσας αποτελεί ένα σημαντικό σταθμό στην ιστορία της Πνευμονολογίας στη Δωδεκάνησο.

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε την οικογένεια του ιατρού Εμμανουήλ Κωσταρίδη και ιδιαίτερα τον υιό του, κ. Γεώργιο Κωσταρίδη, για την παραχώρηση υλικού και πληροφοριών που μας βοήθησαν ουσιαστικά στη συγγραφή του παραπάνω κείμενου. Ευχαριστούμε, επίσης, τον κ. Ησαΐα Παπαϊωάννου ο οποίος μας διέθεσε τις σύγχρονες φωτογραφίες του Σανατορίου.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(Βλέπε αγγλικό κείμενο)

# The sanatorium of Saint Eleousa: An important part of the history of Respiratory Medicine on the island of Rhodes

Andriana I. Papaioannou<sup>1</sup>,  
Konstantinos T. Kostikas<sup>2</sup>

<sup>1</sup>SpR in Pneumology Medicine, 3rd  
Pneumology Medicine Department  
Sismanogleion General Hospital, Athens  
<sup>2</sup>Pneumology Physician, Editorial Board  
“PNEUMON”

## INTRODUCTION

The Sanatorium of Saint Eleousa was the main institution for the in-hospital care of patients with tuberculosis in the Dodecanese for 23 years (1947-1970). It started functioning in August 1947 in the Italian buildings of Campo Chiaro and initially had a capacity of 80 patients and 54 staff members. Although the village of Saint Eleousa was not ideal from a climatic point of view, since the area is exposed to strong cold winds, the selection of this site was determined by the need for quarantine of patients with tuberculosis.

The first patients of the sanatorium were patients with tuberculosis who until that time had been hospitalized in the “Thermai” Hospital in the centre of the town of Rhodes, or in a small hospital called “Villa Passa” in the village of Kremasti. The central personality in the history of the sanatorium was the respiratory physician Emmanuel G. Kostaridis (Figure 2), who was the scientific director of the institute for the greater part of the 23 years of its operation. He was also the administrative director for more than 15 years and for a long period of time he was the only physician working in the sanatorium.

The main operational difficulty of the sanatorium was its long distance from the town of Rhodes, which caused problems for both the replenishment of supplies and the recruitment of specialized staff. Dr Kostaridis worked untiringly to solve the problems of the institution, trying to provide solutions for not only the practical difficulties related to the long distance from the town and the lack of basic laboratory support, but also the multiple bureaucratic obstacles<sup>1</sup>.

## THE MANAGEMENT OF PATIENTS WITH TUBERCULOSIS

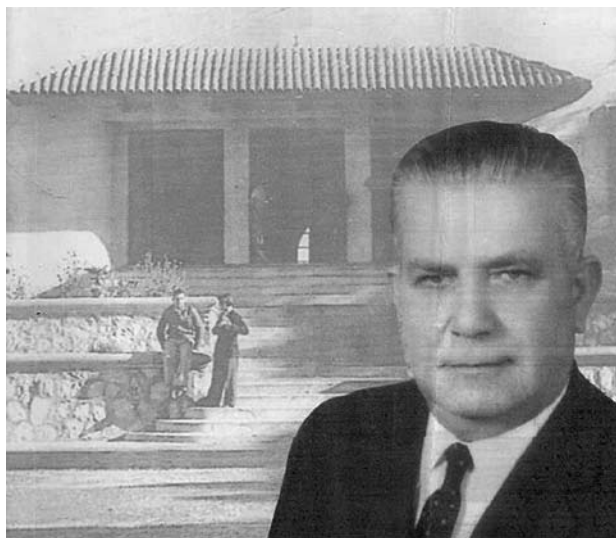
Two doctors with a special interest and special training in tuberculosis, the director and a consultant, were responsible for the management of care of the patients in the Sanatorium. The institute had a small laboratory in which basic examinations were performed (sputum stain for Koch’s bacillus, EST, urine examination), while the rest of the laboratory tests required

### Correspondence to:

Andriana I Papaioannou  
3rd Pneumology Medicine Department, Sismanogleion  
General Hospital  
1 Sismanogleiou Str., Marousi 15126, Athens Greece  
Tel.: +30 210 8039422  
E-mail: andriana78@vodafone.net.gr



**FIGURE 1.** The main building of the Sanatorium of Saint Eleousa the way it stands at the present time.



**FIGURE 2.** Dr Emanuel G Kostaridis, Respiratory Physician.

were performed in the General Hospital of Rhodes. Tests on the sensitivity of the Tb bacillus to antituberculous drugs was started in 1964, on specimens that were sent to the "Sotiria" Hospital in Athens. The sanatorium of Saint

Eleousa had also a Radiological Department where simple chest X-rays and fluoroscopy could be performed<sup>1</sup>.

The management of patients during the first years of operation of the sanatorium included administration of the drugs that were available at that time (i.e., streptomycin and PAS), an abundance of fresh air, bed rest, and a well-balanced diet rich in vitamins and minerals. In those early days a surgical procedure with the application of iatrogenic pneumothorax was a very important aspect of the management of patients with tuberculosis<sup>2</sup>. For major thoracic surgical procedures (e.g. thoracoplasty) patients were transported to the "Sotiria" Hospital in Athens<sup>3</sup>, but minor procedures, such as symphysiolysis, were performed thoracoscopically in the Sanatorium of Saint Eleousa.

The sanatorium was one of the first of the therapeutic institutions in Greece where isoniazid, the "new" drug for that time, was used. Dr Kostaridis, having a great sense of responsibility towards his patients, along with an instinct for scientific research, handled the administration of this new drug with great caution. In his manuscripts he notes "...for the administration of that new drug we needed to observe the patients very closely and perform serial clini-

cal radiological and laboratory tests because the adverse events of that drug were not yet known". This was the reason why isoniazid was given initially to 3 patients in the sanatorium with the most advanced disease, under close observation<sup>1</sup>.

Dr Kostaridis recognized early on the advantages of the simultaneous administration of 3 or more drugs and he observed that treatment failure was more common in patients who had previously been treated with inadequate dosage and/or an interrupted therapeutic regime, something common in those days<sup>4,5</sup>. According to the testimonies of his patients and colleagues, he treated each patient holistically, as a mental and physical entity. He was able to identify the social and economic problems that the disease caused to the patients and he did his best to support them, aiming at the same time at the protection of the community<sup>1</sup>.

### THE OUTPATIENT ANTITUBERCULOSIS CLINIC

An outpatient antituberculosis clinic was held 3 times weekly in the Sanatorium of Saint Eleousa and a further 3 times weekly at the General Hospital of Rhodes. The main aim of this clinic was the clinical, laboratory and radiological follow-up of patients who had been discharged from the sanatorium, verification of the continuation of treatment, administration of chemoprophylaxis to close contacts of the patients and education of the community of the island about tuberculosis. The staff of the clinic was working constantly for the success of the battle against tuberculosis on the island of Rhodes. Ultimately, the outpatient antituberculosis clinic broadened its activity outside the hospital and started visiting schools in the town of Rhodes and the villages on the island, performing tuberculin skin testing of the children and vaccination against tuberculosis<sup>1</sup>.

### THE CONTINUOUS BATTLE AGAINST TUBERCULOSIS

Despite the initial impressive effectiveness of the new drugs against tuberculosis, Dr Kostaridis predicted the development of bacilli resistant to medication, linking the emergence of resistance to the incorrect and inadequate administration of drug treatment, a phenomenon that has

been confirmed nowadays<sup>5</sup>. He stated that tuberculosis is a powerful enemy which "starts recovering after the first wounds that are achieved and prepares its counterstrike by becoming resistant to treatment"<sup>6</sup>. In 1964 the keynote address of the World Health Organization was "No reprieve in the fight against tuberculosis". Dr Kostaridis always used these precise words in his attempts to keep the Rhodian community well informed with his speeches about the war against tuberculosis<sup>1</sup>.

The Sanatorium of Saint Eleousa was closed in August 1970, but the outpatient antituberculosis clinic continued functioning until the December of 1971, when its operation was terminated after the retirement of its director. Having hospitalized 1,581 patients in total from various different regions of Greece, and having informed and educated the community about the prevention and therapy of tuberculosis, the Sanatorium of Saint Eleousa represents an important part of the history of respiratory medicine in the Dodecanese.

### ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank the family of Dr Emmanuel Kostaridis and especially his son, Mr. George Kostaridis, for providing invaluable information for the writing of this manuscript. We would also like to thank Mr. Esaias Papaioannou for providing us with the contemporary photographs of the Sanatorium of Saint Eleousa.

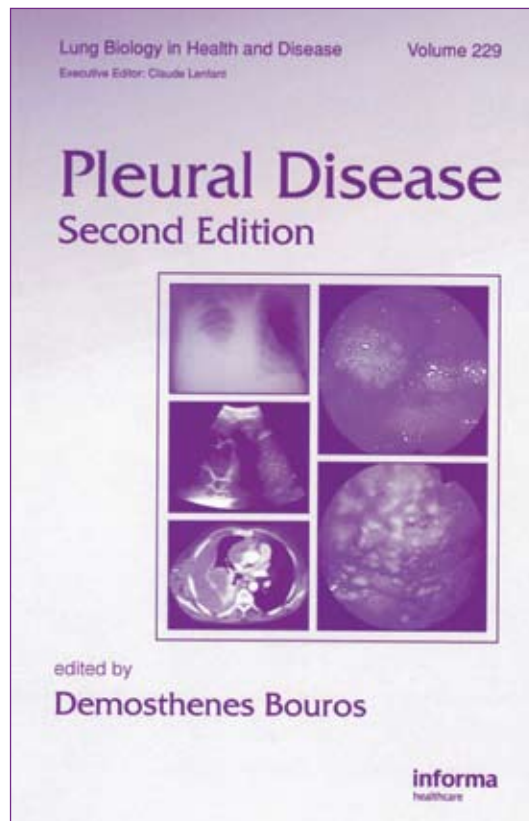
### REFERENCES

- 1 Kostaridis EG, ed. The Sanatorium of Saint Eleousa. Rhodes, 2005.
- 2 Benedek TG. The history of gold therapy for tuberculosis. *J Hist Med Allied Sci* 2004; 59:50-89.
- 3 Stavrakis G, ed. 1902-2002 One Century of "Sotiria". Athens, 2002.
- 4 Lerner BH. New York City's tuberculosis control efforts: the historical limitations of the "war on consumption". *Am J Public Health* 1993; 83:758-766.
- 5 Lerner BH. From careless consumptives to recalcitrant patients: the historical construction of noncompliance. *Soc Sci Med* 1997; 45:1423-1431.
- 6 Rayan F. The Forgotten Plague: How the Battle Against Tuberculosis Was Won - And Lost. New York: Little, Brown and Company, 1993.

# Δημοσθένης Μπούρος - "Pleural Disease"

Κωνσταντίνος Θ. Κωστίκας,  
MD, PhD, FCCP

Πνευμονολόγος, Καρδίτσα  
Συντακτική Επιτροπή Περιοδικού "Πνεύμων"



## Demosthenes Bouros editor

(Lung Biology in Health and Disease series, volume 229, Claude Lenfant, executive editor) New York 2010 Informa Healthcare; 2nd edition. Σκληρό εξώφυλλο, 816 σελίδες.

Η 2<sup>η</sup> Έκδοση του βιβλίου *Pleural Disease*, με υπεύθυνο έκδοσης τον Καθηγητή κ. Δημοσθένη Μπούρο από το Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο της Θράκης, που έρχεται για να μας προσφέρει σύγχρονες πληροφορίες πάνω στο ευρύ πεδίο των παθήσεων του υπεζωκότα, αποτελεί τη συνέχεια της πολύ επιτυχημένης 1<sup>ης</sup> έκδοσης πριν από 6 έτη. Το γνωστικό αντικείμενο που καλύπτεται από αυτό το βιβλίο ενσωματώνει μερικά από τα πιο συχνά κλινικά προβλήματα στην άσκηση της σύγχρονης κλινικής Πνευμονολογίας. Είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον το γεγονός ότι μια αναζήτηση στο PubMed στις αρχές του Ιουλίου του 2010 στο θέμα "pleural disease" ανέδειξε περισσότερες

## Αλληλογραφία:

Κωνσταντίνος Θ. Κωστίκας  
e-mail: ktk@otenet.gr



από 50.000 δημοσιεύσεις, που μειώθηκαν σε έναν αριθμό μόλις κάτω από τις 30.000 όταν χρησιμοποιήθηκαν οι περιορισμοί "human" και "English". Το βιβλίο περιλαμβάνει 45 κεφάλαια στις 816 σελίδες του, που καλύπτουν όλα τα θέματα των παθήσεων του υπεζωκότα που μπορεί να ενδιαφέρουν κάθε Πνευμονολόγο, αλλά και ιατρούς πολλών άλλων ειδικοτήτων, όπως οι Παθολόγοι, οι Καρδιολόγοι, οι Ογκολόγοι, οι Ακτινολόγοι, οι Εντατικολόγοι, οι Θωρακοχειρουργοί και οι Παιδίατροι. Επιπρόσθετα, δεδομένου ότι καλύπτει ολόκληρο σχεδόν το φάσμα των παθήσεων του υπεζωκότα, μπορεί να φανεί χρήσιμο σε ερευνητές, καθώς και σε ειδικευόμενους ή φοιτητές.

Το βιβλίο ακολουθεί μια σαφή και λογική αλληλουχία στη δομή του. Αρχίζει με τις βασικές έννοιες που μπορεί να είναι χρήσιμες για την κατανόηση των βασικών μηχανισμών του υπεζωκότα σε φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις και συνεχίζεται με τις απεικονιστικές μεθόδους, με ιδιαίτερη έμφαση στο ταχέως εξελισσόμενο αντικείμενο της υπερηχοτομογραφίας του υπεζωκότα. Ακολουθούν οι βασικές διαγνωστικές και ελάχιστα επεμβατικές τεχνικές, που περιλαμβάνουν πολύ ενδιαφέροντα κεφάλαια πάνω στην επεμβατική ακτινολογία και τη μη χειρουργική θωρακοσκόπηση (medical thoracoscopy), τόσο από τη διαγνωστική όσο και από τη θεραπευτική σκοπιά. Τα επόμενα κεφάλαια αποτελούν τις βασικές γνώσεις για κάθε κλινικό ιατρό που ασχολείται με υπεζωκοτικές παθήσεις, με ιδιαίτερα σημαντικό εκείνο που έγραψε ο Richard Light για την "αντιμετώπιση της αδιάνγνωστης εμμένουσας υπεζωκοτικής συλλογής". Ένα σημαντικό μέρος του βιβλίου ασχολείται με τις λοιμώδεις και κακοήθεις υπεζωκοτικές συλλογές, αναλύοντας όλες τις σύγχρονες μεθόδους για τη διάγνωση και αντιμετώπισή τους. Οι Θωρακοχειρουργοί και οι Πνευμονολόγοι θα βρουν πολύ χρήσιμα τα κεφάλαια για τις μετεγχειρητικές υπεζωκοτικές συλλογές, τη χειρουργική αντιμετώπιση του εμπυήματος και της εξωπνευμονικής πνευμονεκτομής για διάχυτο κακόηθες μεσοθηλίωμα αρχικού σταδίου, που πραγματεύονται σπάνια αλλά δύσκολα προβλήματα στην καθημερινή κλινική πράξη. Άλλες πνευμονικές παθήσεις που επιπλέκονται από παθήσεις του υπεζωκότα, όπως οι διάμεσες πνευμονοπάθειες και η πνευμονική εμβολή, έχουν καλυφθεί λεπτομερώς. Έχουν καλυφθεί επίσης όλες οι σύγχρονες διαγνωστικές δοκιμασίες, αλλά και οι νεότερες χειρουργικές και μη χειρουργικές τεχνικές για τη διάγνωση των υπεζωκοτικών παθήσεων, όπως η μη χειρουργική θωρακοσκόπηση, το υπεζωκοτικό έκπλυμα, η ενδοϋπεζωκοτική χρήση ινωδολυτικών ουσιών, η

εισαγωγή μικρού εύρους καθετήρων υπό απεικονιστική καθοδήγηση, η πλευροπεριτοναϊκή παροχέτευση και η υποβοηθούμενη από βίντεο θωρακοσκοπική χειρουργική (video-assisted thoracoscopic surgery, VATS).

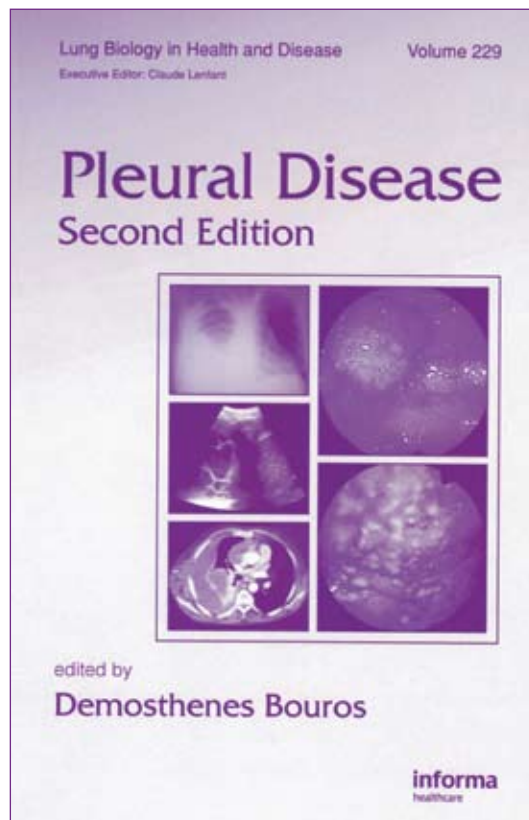
Πολλά από τα κεφάλαια είναι χρήσιμα για τους Γενικούς Ιατρούς αλλά και για τους Εντατικολόγους, καθώς έχουν καλυφθεί πρακτικά όλα τα αίτια εξωπνευμονικών αιτιών υπεζωκοτικής συλλογής με μια καλά δομημένη ταξινόμηση, που περιλαμβάνει τις υπεζωκοτικές συλλογές σε αιματολογικές, καρδιολογικές, γυναικολογικές και γαστρεντερικές παθήσεις. Εξετάζονται επίσης οι υπεζωκοτικές παθήσεις σε ασθενείς με HIV λοίμωξη, ένα συχνό πρόβλημα σε πολλά μέρη του κόσμου στις μέρες μας, καθώς και οι υπεζωκοτικές συλλογές σε ασθενείς νοσηλευόμενους σε ΜΕΘ και σε μεταμοσχευμένους ασθενείς. Οι Παιδίατροι θα αναζητήσουν απαντήσεις για τους ασθενείς τους στο Κεφάλαιο 39 που αναφέρεται στις υπεζωκοτικές παθήσεις στα παιδιά. Τα κλινικά προβλήματα του πνευμοθώρακα, του αιμοθώρακα και του χυλοθώρακα εξετάζονται εκτεταμένα στα αντίστοιχα κεφάλαια, ενώ το βιβλίο ολοκληρώνεται με δύο κεφάλαια από ιατρογενείς υπεζωκοτικές παθήσεις: εκείνες που προκαλούνται από ακτινοβολία και τις υπόλοιπες ιατρογενείς και σπάνιες παθήσεις, ώστε να μας υπενθυμίσουν τη βασική αρχή του "ωφέλειν ή μη βλάπτειν". Τέλος, θα ήταν άδικο να μην τονίσει κανείς τα διαρκή εναύσματα που παρέχει το βιβλίο αυτό στους ερευνητές με ιδιαίτερο ενδιαφέρον στις παθήσεις του υπεζωκότα, καθώς παρέχει πληροφορίες για βιολογικούς δείκτες και θέματα μοριακής βιολογίας με χαρακτηριστικότερο το Κεφάλαιο 12 ("Translational Research in Pleural Disease").

Έχοντας κατορθώσει να συλλέξει μια συγγραφική ομάδα διεθνώς αναγνωρισμένων ειδικών που παρέχουν τη διορατική τους άποψη, το βιβλίο αυτό αποτελεί μια από τις πιο περιεκτικές συλλογές πληροφορίας πάνω στις υπεζωκοτικές παθήσεις στις μέρες μας. Η παρούσα *Δεύτερη Έκδοση* του βιβλίου είναι ανανεωμένη και πλήρως ενημερωμένη, ώστε να συμπεριλάβει τις τελευταίες επιστημονικές και τεχνολογικές εξελίξεις στη διάγνωση και θεραπεία των υπεζωκοτικών παθήσεων και θα αποτελέσει ένα πολύτιμο βοήθημα για τον κλινικό και τον ερευνητή για τα επόμενα χρόνια (πιθανότατα μέχρι μια *Τρίτη* έκδοσή του). Το γεγονός ότι αυτή η πρωτοβουλία ξεκίνησε από την περιφέρεια της Ελλάδας για να καταλήξει στο κέντρο των εξελίξεων της σύγχρονης Πνευμονολογίας, απλά μας κάνει ακόμη περισσότερο υπερήφανους.

# Demosthenes Bouros - "Pleural Disease"

**Konstantinos Kostikas, MD, PhD, FCCP**

Pneumology Physician, Karditsa 43100,  
Greece,  
Editorial Board PNEUMON



**Pleural Disease.** Demosthenes Bouros, editor. (Lung Biology in Health and Disease series, volume 229, Claude Lenfant, executive editor.) New York 2010 Informa Healthcare; 2nd edition. Hard cover, illustrated, 816 pages.

***Pleural Disease 2<sup>nd</sup> Edition***, edited by Professor Demosthenes Bouros of the Democritus University of Thrace, provides updated information in the wide area of pleural disease, as a continuum to the successful 1<sup>st</sup> edition of six years ago. The area covered by this book incorporates some of the most common problems in respiratory clinical practice and some of the most intriguing research aspects in modern respiratory medicine. It is of interest that a PubMed search in early July 2010 revealed more than 50,000 items on "pleural disease" that were reduced only to a little under 30,000 items when the limits "human" and "English" were used. This 816-page book that includes 45 chapters covering all aspects of pleural disease

**Correspondence to:**  
Konstantinos Kostikas  
e-mail: ktk@otenet.gr

will be of great interest to every respiratory physician, but also to various other medical specialists, including general internists, cardiologists, oncologists, radiologists, intensivists, thoracic surgeons and paediatricians. As it covers practically all the aspects of pleural disease, it can also be useful to researchers and young physicians and students in training.

This book follows a clear and logical sequence in its structure. It starts with the basics that may be necessary for the understanding of the underlying mechanisms of the pleura in health and disease (physiology and pathophysiology of the pleura) and moves on to the imaging modalities, including the rapidly evolving area of ultrasonography of the pleura. The basic diagnostic and minimally interventional procedures follow, including very interesting chapters on interventional radiology of pleural disease and medical thoracoscopy (covered from both the diagnostic and the therapeutic point of view). The chapters that follow provide the basics for any clinician who is involved in the management of pleural disease, including the evaluation of the most common types of effusions, with notably a chapter on "Management of the Undiagnosed Persistent Pleural Effusion" by Richard Light. A significant section of the book deals with the infectious and the malignant pleural effusions, including all the contemporary modalities for interventional management. Thoracic surgeons and respiratory physicians will find attractive the chapters on "Post Surgical Pleural Infection", "Surgical Management of Empyema", and "Extrapleural Pneumonectomy for Early-Stage Diffuse Malignant Mesothelioma", which deal with uncommon but difficult problems in everyday practice. Other pulmonary disorders that are complicated by pleural disease have also been covered in detail, including interstitial lung disease and pulmonary embolism. All the modern diagnostic tests along with new surgical and non-surgical techniques for identifying and diagnosing pleural diseases have been covered, including medical thoracoscopy, pleural lavage, intrapleural use of fibrinolytics, image-guided insertion of small bore catheters, pleuroperitoneal shunt, and

video-assisted thoracoscopic surgery (VATS).

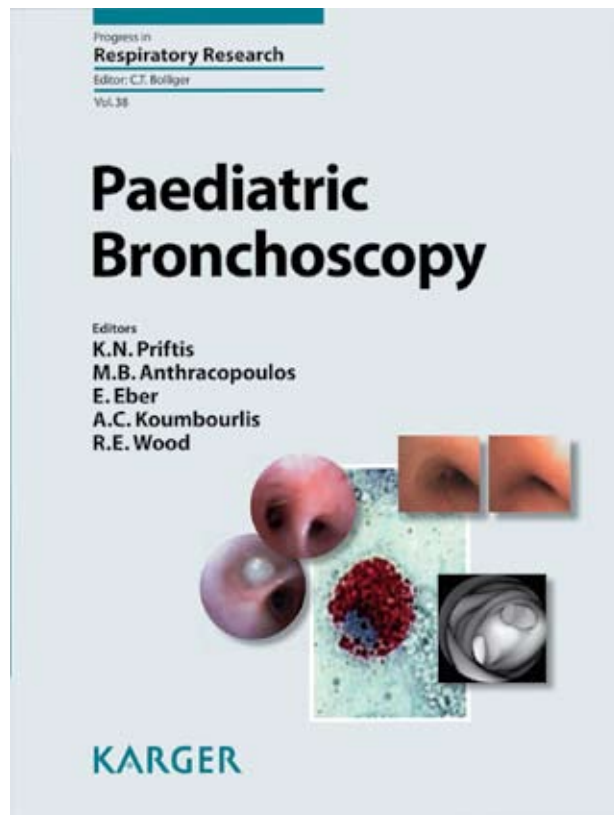
Several chapters are particularly useful for general practitioners and internists, as practically all areas of extrapulmonary causes of pleural effusion have been covered, with a well-defined classification, including pleural effusions in haematological, cardiac, gynaecological and gastrointestinal diseases. Pleural disease in HIV patients, a common medical problem in several parts of the world at the present time has also been covered, as well as pleural effusions in critically ill patients in the ICU and in recipients of organ transplantation. Paediatricians will find answers for their challenges in clinical practice in Chapter 39 on "Pleural Effusions in Children". The clinical problems of Pneumothorax, Haemothorax and Chylothorax-pseudochylothorax have been extensively reviewed in the corresponding chapters and the book is completed by two chapters dealing with iatrogenic pleural diseases, namely those caused by radiotherapy and the rest of the iatrogenic and rare effusions, just in time to remind us of the essential principle of "primum non nocere" ("first do no harm"). Last but not least, it would be amiss not to stress the continuous hints that this book provides to the researcher with special interest in pleural disease, providing information on biomarkers, proteomics, and molecular biology, and even dealing with "Translational Research in Pleural Disease" in Chapter 12.

Involving an internationally recognized panel of experts each of whom provides a particular insightful view, this book represents one of the most comprehensive collections of information on pleural disease of our day. Updated to reflect the latest scientific advances and technologies in the diagnosis and treatment of pleural diseases, this **Second Edition of Pleural Disease** will be an invaluable tool in the hands of both the clinician and the researcher for the next few years to come (probably until its **Third** edition). The fact that this initiative comes from the periphery of Greece to target the centre of developments in a wide area of modern Respiratory Medicine is truly a cause for pride.

# K.N. Priftis, M.B. Anthracopoulos, E. Eber, A.C. Koumbourlis, R.E. Wood "Paediatric Bronchoscopy"

Σ.Η. Κωνσταντόπουλος,

Καθηγητής Πνευμονολογίας, Ιατρικής Σχολής  
Πανεπιστημίου Ιωαννίνων



**K.N. Priftis, M.B. Anthracopoulos, E. Eber, A.C. Koumbourlis, R.E. Wood**

Τους ζηλεύω!

Όταν πριν από 30+ χρόνια γύρναγα από τη Φιλαδέλφεια με ένα εύκαμπτο βρογχοσκόπιο στις αποσκευές μου, γνώριζα καλά ότι έφερνα μαζί μου ένα θησαυρό, ένα πολύτιμο εργαλείο όπου θα ξεχωρίζει τον Πνευμονολόγο και θα τον έκανε απαραίτητο και σεβαστό στις άλλες «όμορες» ειδικότητες.

Δεν φανταζόμουν όμως ότι θα έβλεπα κάποτε Έλληνες Πνευμονολόγους

(έστω «Παιδο-πνευμονολόγους») εκδότες ενός παγκόσμιας εμβέλειας, εγκυρότατου βιβλίου για βρογχοσκόπηση.

Ο 38<sup>ος</sup> τόμος λοιπόν της σειράς Progress in Respiratory Research του Εκδοτικού Οίκου Karger με τίτλο «Paediatric Bronchoscopy» έχει ως εκδότες τους κ.κ. Κ. Πρίφτη, Μ.Α. Ανθρακόπουλο, Ε. Eber, Α.Γ. Κουμπουρλή και R.E. Wood δηλαδή κυρίαρχο Ελληνικό χρώμα. Για να συνειδητοποιήσετε καλύτερα το μέγεθος της Ελληνικής αυτής επιτυχίας αναφέρω ότι στον προ-προηγούμενο τόμο για «Παθήσεις διαμέσου πνευμονικού ιστού» εκδότες ήταν ο κ. U. Costabel και ο R. DuBois. Ο τόμος, λένε με σεμνότητα οι εκδότες δεν είναι «textbook» είναι περισσότερο μια «state of the art review». Είναι και τα δύο, και πλήρες βιβλίο αναφορά (textbook) και απόλυτα ενημερωμένο με βιβλιογραφία έως και το 2009.

Περιέχει ένα ευρύτατο φάσμα θεμάτων, από πρακτικά (π.χ. απαραίτητο εξοπλισμό, αναισθησία) έως θέματα καθημερινής κλινικής πράξης (χρήση βρογχοσκοπίου για BAL, χρήση σε ποικίλες κλινικές οντότητες όπως άσθμα, ατελεκτασία, σύνδρομο μέσου λοβού αλλά και πιο εξεζητημένα όπως μεταμοσχεύσεις πνεύμονα, χρήση σε παιδιατρική ΜΕΘ, κ.α.).

Μεγάλο ενδιαφέρον βρήκα στα κεφάλαια που συγκρίνουν/συσχετίζουν τη βρογχοσκόπηση με εύκαμπτο βρογχοσκόπιο με «αντίπαλες» τεχνικές όπως αυτή με άκαμπτο βρογχοσκόπιο ή την εικονική (virtual) βρογχοσκόπηση, δείχνοντας καθαρά ότι δεν πρόκειται για «αντίπαλες» αλλά για αλληλοσυμπληρούμενες τεχνικές. Να ένα πρώτο «δίδαγμα»: ταυτόχρονη χρήση άκαμπτου-εύκαμπτου από παιδοπνευμονολόγο και ΩΡΛ ιατρό συγχρόνως. Άλλωστε ο εκ των «γκουρού» της παιδιατρικής βρογχοσκόπησης και senior editor του τόμου R.F. Wood (Cincinnati, USA) αναφέρεται ως Καθηγητής Παιδιατρικής και ΩΡΛ και αναφέρεται στη μακροχρόνια συνεργασία του (ως παιδοπνευμονολόγος) με τον ΩΡΛ R. Cotton Ακριβώς όπως στην Ελλάδα δηλαδή . . .

Ο R.F. Wood έχει γράψει ένα από τα δύο κεφάλαια

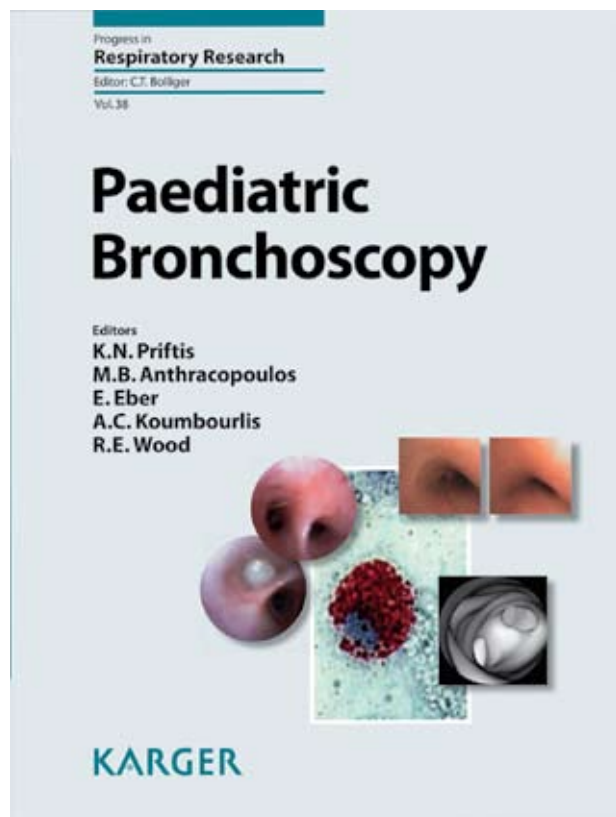
«θησαυρούς» του τόμου, τον επίλογο «A four-decade perspective on paediatric bronchoscopy – Where have we come from, and where are we going?». Το άλλο είναι η εισαγωγή από τον άλλο «γκουρού», τον Α. Bush (Brompton H. London, U.K.). Στα δύο αυτά κεφάλαια δίνεται μια συνολική εικόνα της σημερινής θέσης του εύκαμπτου βρογχοσκοπίου στα παιδιά αλλά και η αγωνία για την ανάπτυξη των τεχνικών τα πρώτα χρόνια και ο ενθουσιασμός για το βέβαιο λαμπρό μέλλον της. Όπως θα γράφαμε δηλ. εμείς οι Πνευμονολόγοι/Βρογχοσκόποι πριν 10-20 χρόνια.

Γί' αυτό, ο τόμος δεν απευθύνεται μόνο σε Παιδοπνευμονολόγους/βρογχοσκόπους. Απευθύνεται κατ' αρχήν σε όλους τους Παιδιάτρους που έχουν κάποια αγωνία να πάνε ένα βήμα πιο μπροστά στη φροντίδα του άρρωστου παιδιού. Γιατί πρέπει να γνωρίζουν τις μεγάλες δυνατότητες αυτής της τεχνικής κάτι που θα βοηθήσει και στην ανάπτυξη της Παιδοπνευμονολογίας. Απευθύνεται όμως επίσης στους Πνευμονολόγους, τουλάχιστον αυτούς που ασχολούνται με βρογχοσκόπηση και δόξα τω θεώ είναι σήμερα (ύστερα από 30 χρόνια δράση ημών των αρχαιοτέρων) παρά πολλοί. Διότι οι Πνευμονολόγοι/βρογχοσκόποι θα βρουν πολύ ενδιαφέρον στις διαφορές και ομοιότητες της χρήσης του εύκαμπτου σε παιδιά και σε ενήλικες και θα πάρουν νέες ιδέες. Ίσως σκεφθούν π.χ. να συνεργαστούν με άλλες ειδικότητες που κάνουν βρογχοσκοπήσεις (π.χ. ΩΡΛ/άκαμπτο, ακτινολόγο/εικονική βρογχοσκόπηση). Και για έναν ακόμη («εγωϊστικό-υστερόβουλο») λόγο. Διότι μέχρι να υπάρξουν αρκετοί Παιδοπνευμονολόγοι/βρογχοσκόποι σε όλα τα μεγάλα Νοσοκομεία, εμείς οι Πνευμονολόγοι μπορούμε, αν κατέχουμε καλά τη βρογχοσκόπηση να καλύψουμε το κενό, τουλάχιστον στα μεγάλα παιδιά. Έχω προσωπικά βγάλει αρκετές φορές ξηρούς καρπούς και καπάκια Bic από μεγάλο βρόγχο μεγάλου παιδιού ενώ το αεροπλάνο για διακομιδή από τα Γιάννενα στην Αθήνα περίμενε στο αεροδρόμιο . . .

# K.N. Priftis, M.B. Anthracopoulos, E. Eber, A.C. Koumbourlis, R.E. Wood - "Paediatric Bronchoscopy"

**S.H. Konstantopoulos**

Professor, Respiratory Medicine, University of Ioannina Medical School



**K.N. Priftis, M.B. Anthracopoulos, E. Eber, A.C. Koumbourlis, R.E. Wood**

I envy them!

A little over 30 years ago, returning from Philadelphia with a flexible bronchoscope in my luggage, I was fully aware that I was carrying a treasure, a valuable tool that would distinguish pulmonology as an essential and respected medical specialty. Little did I know, however, that one day I would witness Greek pulmonologists (or paediatric pulmonologists) edit-



ing a medical book with international acceptance and validity about bronchoscopy.

The 38<sup>th</sup> volume in the series "Progress in Respiratory Research", entitled 'Paediatric Bronchoscopy', Karger Publishers, is edited by K. N. Priftis, M. B. Anthracopoulos, E. Eber, A. C. Koumbourlis and R. E. Wood. The predominating Greek contribution is considered a great success for Greek pulmonology, taking into account that a previous volume "Interstitial lung disease" was edited by U. Costabel and R. DuBois. This volume has been modestly described by its editors as a state of the art review, rather than a textbook. However, it serves as both a reference book (or textbook) and a full updated review of the current literature up until 2009.

Its subject matter ranges widely from practical issues, such as the necessary equipment and anaesthesia, to everyday clinical practice, including use of the bronchoscope for bronchoalveolar lavage (BAL), and for investigation of various clinical entities, such as asthma, atelectasis and middle lobe syndrome, as well as in other specialized circumstances, such as lung transplantations, in paediatric intensive care, etc.

I was particularly intrigued by the chapters comparing bronchoscopy with a flexible bronchoscope with other "competing" techniques, such as the rigid bronchoscope or virtual bronchoscopy, which clearly demonstrate that these techniques are not opposing, but complementary. These chapters contain a novel "wisdom", which is the simultaneous use of flexible and rigid bronchoscopes by a paediatric pulmonologist and an ear, nose and throat (ENT) specialist. In support of this novelty, the "guru" of paediatric bronchoscopy and senior editor of the volume, R.F. Wood (Cincinnati, USA) refers to himself as professor of both paediatrics and ENT and describes his long-lasting collaboration (as a paediatric pulmonologist) with the ENT specialist R. Cotton. Just consider what happens in Greece...

Professor Wood has written one of the two most impressive chapters of this volume, the final chapter "A four-decade perspective on paediatric bronchoscopy – Where have we come from, and where are we going?", while the other is the preface written by that other "guru", A. Bush (Brompton Hospital, London, U.K.). These two chapters provide a complete overview of the current use of the flexible bronchoscope in children, and describe the initial concerns after the first years of its application, and the ensuing enthusiasm about its bright future. This is exactly what we would record 10-20 years ago as pulmonologists specializing in bronchoscopy.

This volume is addressed not only to paediatric pulmonologists and bronchoscopy specialists, but also to paediatricians dedicated to improving the care of their young patients, as through this volume they can become acquainted with the vast potential of this technique and contribute to the advance of paediatric pulmonology. Moreover, this book is relevant for all pulmonologists specializing in bronchoscopy, of whom there are now significant numbers, after 30 years of effort. They will be able to study the similarities and differences between the use of rigid and flexible bronchoscope in children and adults, which may possibly lead to the implementation of new ideas. As an example, they could initiate collaboration with other medical specialists who perform bronchoscopy (e.g., rigid bronchoscopy in ENT, virtual bronchoscopy in radiology). I consider this volume to be of great value for one more, rather selfish, reason. Until there are adequate numbers of paediatric pulmonologists/ bronchoscopy specialists in all the major hospitals in Greece, we will continue called upon as pulmonologists to fill the gap and perform bronchoscopy on older children. I myself have pulled nuts and pen caps out of a child's bronchus on many occasions, while a plane was waiting at the airport to transport the patient from Ioannina to Athens...

# INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

**PNEUMON** is a peer reviewed, bilingual (Greek and English) journal published quarterly as the official scientific journal of the Hellenic Thoracic Society and the Hellenic Bronchologic Society. The Journal publishes original papers of international interest on laboratory and clinical research that are pertinent to lung biology and disease. Clinical and experimental work dealing with the whole field of pneumonology, including allied health, cell and molecular biology, epidemiology, immunology, pathology, pharmacology, physiology, intensive and critical care, paediatric respiratory medicine and thoracic surgery will be published. All manuscripts and correspondence are submitted **by e-mail** to the address: [pneumon@hts.org.gr](mailto:pneumon@hts.org.gr) with a cover letter including the title of the paper, a statement that neither the article nor any part of its essential substance has been or will be published or submitted elsewhere that all authors have read and approved the text of the article and that, if considered for publication, they transfer the copyright to Journal.

Articles published in PNEUMON address topics related to pneumonology and critical care medicine in the following categories: 1) Editorials (usually after invitation, 2-4 pages), 2) Reviews (20-30 pages), 3) Basic and clinical research studies (20-25 pages), 4) Case reports (5-8 pages), 5) Special articles (8-10 pages), 6) Correspondence (no more than 500 words and 5 references).

Editorials, reviews and special articles are published following invitation by the Editorial Board. The Editorial Board reserves the right of publishing other types of papers as well. Papers submitted for publication will not be returned, irrespective of whether they are published or not. Published papers are a literary property of both the authors and the journal and their publication, in part or in whole, without written permission of the Editorial Board is prohibited.

## Cover letter

Corresponding authors must provide a cover letter which includes statements concerning: (a) that the work has been seen and approved by all co-authors, (b) how the work is clinically relevant, and how it adds to existing research, (c) whether papers closely related to the submitted manuscript have been published or submitted for publication elsewhere and if so, the authors should provide details. Failure to provide a cover letter addressing each of the points above will result in the paper being returned to the author. The cover letter must be presented as a separate submission item.

Manuscripts containing original material are accepted for consideration if neither the article nor any part of its essential substance has been or will be published or submitted elsewhere. Copies of any closely re-

lated manuscripts must be submitted along with the manuscript. PNEUMON discourages the submission of more than one article dealing with related aspects of the same study. Authors should follow the "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals," published by the International Committee of Medical Journal Editors at <http://www.icmje.org>, and the Helsinki declaration (<http://www.wma.net/e/policy/b3.htm>).

Credit for **authorship** requires substantial contribution to (a) the concept and design or analysis and interpretation of the data, and (b) the drafting of the article or critical revision for important intellectual content.

Any change in authorship after submission must be approved in writing by all authors. All text, references, figure legends, and tables should be in one double-spaced electronic document (WORD doc or PDF).

**Title page.** The title page must contain the following information: a) the title (more than 10 words). If it is necessary the title can include a sub-title b) the full name, institutions, city and country for all co-authors c) up to 5 keywords or phrases suitable to use in an index d) the name, postal address, e-mail, telephone, and fax numbers of the corresponding author e) possible financial resources f) the current title g) the total number of words.

**Abstract.** An structured abstract should be provided of not more than 250 words. It should consist of four paragraphs, labelled Background, Methods, Results, and Conclusions. They should briefly describe, respectively, the problem being addressed in the study, how the study was performed, the most important results, and what the authors conclude from the results. Up to 5 key words should be added taken, from those recommended by the US National Library of Medicine's Medical Subject Headings (MeSH) browser list at <http://www.nlm.nih.gov/mesh/meshhome.html>.

**Text.** The paper should include the following sections:

### *Introduction*

The rationale for the study should be summarised and relevant background material outlined. The Introduction should not contain either findings or conclusions.

### *Methods*

Methods should be described in adequate detail to assure the reader as to how the results were obtained. The location (city, state, country) of a manufacturer listed in the text should be provided. Units should conform to SI conventions. Generic names of drugs should be used instead of trade names. Statistical methods should be meticulously described and referenced.

### *Results*

Results should be presented in a logical order in the text, tables and figures. The authors should avoid repetitive presentation of the same data in different forms, especially between the text and tables and figures. The Results should not include material appropriate to the Discussion.

#### Discussion

The discussion should start by presenting the new and most interesting data of the work in relation to any hypotheses made in the Introduction. Any unexpected or contradictory results should be explained or defended, for example, evaluation of methodology and the relationship of new information to the existing knowledge in the topic. Speculation should be kept to a minimum. The results must not be simply reiterated. New research data should not appear in the Discussion. No specific refer once to figures and tables is made in the Discussion.

#### Acknowledgements

Acknowledge the persons who made a true contribution and who endorse the data and conclusions. Acknowledge any funding sources.

#### References

Only published works may be cited as references; manuscripts accepted but not yet published may be cited designating the accepting journal, followed by (in press), and providing copies of the in-press articles for reviewer inspection. References should be cited in the text with superscript numerals in the order that references are first cited. On the reference page, cited works in numerical order should be made of, in the Journal's style for references, abbreviating journal names as in *Index Medicus* (see: <http://www.nlm.nih.gov>) and listing all authors when there are six or fewer; when there are seven or more, list the first three, followed by "et al." The following are sample references:

● *Standard journal article*: Bouros D, Antoniou KM, Light RW. Intrapleural streptokinase for pleural infection. *BMJ* 2006; 332:133-4.

● *Books and other monographs*: Siafakas NM, Anthonisen N, Georgopoulos D. Acute exacerbations of COPD. Marcel Dekker, New York, 2004

● *Chapter in a book*: Kyriakou D, Alexandrakis M, Bouros D. Pleural effusions in blood diseases. *In*: Bouros D. (editor). *Pleural Disease*. Marcel Dekker, New York, 2004, pp. 621-638.

Numbered references to personal communications, unpublished data, or manuscripts either "in preparation" or "submitted for publication" are unacceptable. If essential, such material can be incorporated at the appropriate place in the text.

**Tables.** Double-space tables (including any footnotes) should be presented on separate pages providing a title for each.

**Figures.** Figures may be inserted in the text file or in a separate file (JPEG, TIFF, EPS). Legends for all figures should be included in the file with the text and should not appear on the figures. If photographs of patients are used, either they should not be identifiable or the photographs should be accompanied by written permission to use them.

**Permission.** The manuscript must be accompanied by copies of permission to reproduce previously published material (figures or tables); to use illustrations of, or report sensitive personal information about, identifiable persons; and to name persons in the Acknowledgments section.

Manuscripts concerning research supported in whole or in part by tobacco companies and associated institutes and organisations will not be considered for publication.

#### **SUBMISSION:**

Editor-in-Chief:

Professor Demosthenes Bouros MD, FCCP

**PNEUMON** Journal, Hospital for Diseases of the Chest "SOTIRIA",

152 Messogeion Ave, 11527, Athens, GREECE

Tel/Fax: +30-210-74.87.723

[www.pneumon.org](http://www.pneumon.org)

[www.hts.org.gr](http://www.hts.org.gr)

e-mail: [pneumon@hts.org.gr](mailto:pneumon@hts.org.gr)