

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Virginija Šileikienė

**BRONCHŲ UŽDEGIMO POVEIKIS PLAUČIŲ FUNKCIJAI
SERGANT LĖTINE OBSTRUKCINE PLAUČIŲ LIGA**

Daktaro disertacija

Biomedicinos mokslai, medicina (06 B)

Vilnius, 2013

Disertacija rengta 2008–2012 metais Vilniaus universitete.

Mokslinis vadovas:

Prof. dr. (HP) Edvardas Danila (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai,
medicina – 06B)

TURINYS

TURINYS.....	3
SANTRUMPOS.....	5
I. ĮVADAS.....	6
1. Problemos aktualumas.....	6
2. Tyrimo tikslas.....	9
3. Tyrimo uždaviniai.....	9
4. Mokslinė darbo reikšmė ir naujumas.....	10
5. Ginamieji teiginiai.....	11
II. LITERATŪROS APŽVALGA.....	12
1. Bronchų ir plaučių anatomija.....	12
2. Rūkymas – pagrindinis LOPL rizikos veiksnys.....	13
3. LOPL patogenezė.....	14
4. Kvėpavimo takų uždegimo ypatumai sergant LOPL.....	16
4.1 Pagrindinės uždegimo ląstelės sergant LOPL.....	18
4.1.2 Neutrofilai.....	18
4.1.3 Makrofagai.....	19
4.1.4 T limfocitai.....	20
4.1.5 Eozinofilai ir putliosios ląstelės.....	24
5. Citokinų reikšmė sergant LOPL.....	25
6. Kraujo uždegimo žymenų pokyčiai LOPL paūmėjus.....	26
6.1 C reaktyvusis baltymas.....	27
6.2 Fibrinogenas.....	28
6.3 Prokalcitoninas.....	28
6.4 Neutrofilų nitromėlio tetrazolio mėginys.....	29
7. Plaučių funkcijų tyrimai ir jų reikšmė sergantiesiems LOPL.....	29
7.1 Spirometrija.....	29
7.2 Plaučių talpų tyrimas.....	33
7.3 Dujų difuzijos tyrimas.....	34
8. Krūtinės ląstos kompiuterinės tomografijos svarba LOPL diagnostikai ir gydymui.....	34
III. TYRIMO MEDŽIAGA IR METODAI.....	36
3.1. Tiriamieji asmenys.....	36
3.2. Tyrimo eiga.....	37
3.3. Kraujo uždegimo žymenų tyrimas.....	40
3.4. Kraujo CD4+CD25+ limfocitų tyrimas.....	40

3.5 Kraujo citokinų tyrimas.....	44
3.6. Krūtinės ląstos kompiuterinė tomografija.....	45
3.7. Kvėpavimo funkcijų tyrimai.....	48
3.8 Bronchoskopija.....	48
3.9. Bronchų gleivinės CD25+ ląstelių tyrimas.....	48
3.10. Statistiniai metodai.....	49
IV. REZULTATAI.....	50
4.1 Kraujo citokinai.....	50
4.2 Radiologinių ir funkcinų plaučių pokyčių sąsajos.....	52
4.3 Kraujo uždegimo žymenys LOPL remisijos ir paūmėjimo metu.....	59
4.4 Kraujo T reguliaciniai limfocitai (CD4+CD25+).....	60
4.5 Bronchų gleivinės CD25+ limfocitai.....	62
V. REZULTATŲ APTARIMAS.....	63
VI. IŠVADOS.....	74
VII. PRAKTINĖS REKOMENDACIJOS.....	75
VIII. LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	76
IX. PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS.....	91
X. PRIEDAI.....	93
10.1 Vilniaus regioninio biomedicininio tyrimų etikos komiteto leidimas atlikti biomedicininį tyrimą.....	93
10.2 Asmens, dalyvaujančio klinikiniame tyrime, informavimo forma.....	94
10.3 Informuoto asmens sutikimo forma.....	95

SANTRUMPOS

Santrumpa	Paaškinimas
BAL	bronchoalveolinis lavažas
CD4+	limfocitai helperiai (pagalbininkai)
CD4+CD25+	T reguliaciniai limfocitai
CD8+	citotoksiniai limfocitai
CRB	C reaktyvusis baltymas
DLco	angl. <i>diffusing lung capacity</i> – plaučių difuzinė geba
ENG	eritrocitų nusėdimo greitis
FEV ₁	angl. <i>forced expiratory volume in 1 sec</i> – forsuoto iškvėpimo tūris per pirmąją sekundę
FIV ₁	angl. <i>forced inspiratory volume in 1 sec</i> – forsuoto įkvėpimo tūris per pirmąją sekundę
FVC	angl. <i>forced vital capacity</i> – forsuota gyvybinė plaučių talpa
GM-KSF	granulocitų-makrofagų kolonijas stimuliuojantis faktorius
IC	angl. <i>inspiratory capacity</i> – įkvėpimo talpa
IFN- γ	gama interferonas
IL	interleukinas
KT	kompiuterinė tomografija
LOPL	lėtinė obstrukcinė plaučių liga
LTB4	leukotrienas B4
mRNR	matricinė ribonukleininė rūgštis
MMP	matricinė metaloproteinazė
NFA	neutrofilų fagocitinis aktyvumas
NK	natūralieji kileriai
NMT	neutrofilų nitromėlio tetrazolio testas
PCO ₂	angl. <i>partial pressure of carbon dioxide</i> – kraujo dalinis (parcialinis) anglies dvideginio slėgis
PO ₂	angl. <i>partial pressure of oxygen</i> – kraujo dalinis (parcialinis) deguonies slėgis
SaO ₂	angl. <i>arterial oxygen saturation</i> – arterinio kraujo įsotinimas deguonimi
TGF- β	angl. <i>transforming grow factor</i> – transformuojantis augimo faktorius
TLC	angl. <i>total lung capacity</i> – bendroji plaučių talpa
TNF- α	angl. <i>tumor necrosis factor alpha</i> – navikų nekrozės faktorius alfa
VC	angl. <i>vital capacity</i> – gyvybinė plaučių talpa
VUL	Vilniaus universiteto ligoninė

I. ĮVADAS

1. *Problemos aktualumas*

Lėtinė obstrukcinė plaučių liga – dažna liga, kurios galima išvengti ir kurią būtina gydyti. Jai būdinga nuolatinė kvėpavimo takų obstrukcija, kuri dažniausiai progresuoja ir susijusi su stipresne kvėpavimo takų ir plaučių uždegimine reakcija į įkvėpiamas žalingas daleles ar dujas. Paūmėjimai ir gretutinės ligos pablogina paciento būklę [1].

Tikslus sergamumas lėtine obstrukcine plaučių liga (LOPL) nežinomas, tačiau manoma, kad pasaulyje šia liga serga apie 200 milijonų žmonių (4–6 proc. vyrų ir 1–3 proc. moterų). Pasaulinės sveikatos organizacijos duomenimis, šiuo metu LOPL pasaulyje užima 4-ą vietą tarp dažniausių mirties priežasčių. Kasmet pasaulyje nuo LOPL miršta apie 3 milijonus žmonių. Sergamumas ir mirtingumas nuo LOPL kasmet didėja. Seniau šia liga dažniausiai sirgdavo vyrai, tačiau pastaraisiais dešimtmečiais, pasikeitus rūkymo įpročiams, kai kuriose išsivysčiusiose šalyse LOPL sergančių vyrų ir moterų skaičius susilygino, o kai kuriose, pavyzdžiui, Švedijoje, nuo 2005 m. LOPL serga ir nuo jos miršta daugiau moterų, negu vyrų. Taigi, ekonomiškai išsivysčiusiame pasaulyje LOPL palaipsniui tampa moterų liga [1].

Lėtinė obstrukcinė plaučių liga nuolatos pamažu progresuoja. Tai lemia plaučių funkcijos blogėjimą, ligos simptomų stiprėjimą ir gyvenimo kokybės blogėjimą. Ši klastinga liga dažnai diagnozuojama per vėlai, nes jos pradžia beveik nepastebima.

Kodėl atsiranda, sustiprėja ir persistuoja kvėpavimo takų uždegimas iki šiol tiksliai nežinoma. Tačiau akivaizdu, kad pirminis mechanizmas yra tabako dūmų ir (ar) kitų išorinių veiksnių sukeltas oksidacinis stresas, uždegimo ląstelių, visų pirma makrofagų, neutrofilų ir CD8⁺ T limfocitų priplūdimas į kvėpavimo takus bei plaučių parenchimą ir šių ląstelių aktyvinimas [2, 3]. Uždegimas apima stambiuosius ir smulkiuosius kvėpavimo takus, plaučių

parenchimą bei plaučių kraujagysles. Dėl makrofagų ir neutrofilų išskiriamų proteolizinių fermentų sutrinka proteazių ir antiproteazių pusiausvyra. Susidaro proteolizinių fermentų perteklius plaučiuose. Proteoliziniai fermentai ardo plaučių audinį, skatina atsirasti emfizemą [4]. Dabar jau žinoma, kad pati lėtinė obstrukcinė plaučių liga skatina sisteminį uždegimą. LOPL sergančių ligonių, kurių uždegimo rodikliai (fibrinogeno kiekis kraujyje ir kt.) yra didesni, plaučių funkcija yra gerokai blogesnė. Be to, asmenų, kurių uždegimo rodikliai didėja greičiau, plaučių funkcija blogėja sparčiau [5]. Ligos paūmėjimas sustiprina kvėpavimo takų ir sisteminį uždegimą. Todėl manoma, kad greitesnį plaučių funkcijos blogėjimą ligoniams, kuriems yra dažnesni paūmėjimai lemia stiprėjantis kvėpavimo takų uždegimas. Į sisteminę kraujotaką patekę uždegimo baltymai ir kitos medžiagos sutrikdo kitų organų funkciją, todėl LOPL pažeidžia ne tik plaučius ir kvėpavimo takus. Šiai ligai būdingi sisteminiai organizmo pokyčiai – svorio mažėjimas, griaučių raumenų disfunkcija, didesnė kardiovaskulinių įvykių rizika, depresija, eritemija, kartais anemija, osteoporozė, plautinė hipertenzija ir lėtinė plautinė širdis. Šie pokyčiai atsiranda dėl dusulio sąlygoto nejudrumo, sisteminio uždegimo, audinių hipoksijos ir oksidacinio streso [6]

LOPL, kaip ir daugumai lėtinių ligų, būdinga remisijos ir paūmėjimo fazių kaita. Kiekvienas paūmėjimas, ypač nelaiku ir netinkamai gydomas, ilgam pablogina ligonio būklę ir labai padidina mirties riziką [7, 8]. Todėl ypač svarbu nustatyti paūmėjimo kilmę. Dažniausiai LOPL paūmėjimą skatina kvėpavimo takų infekcija. Tačiau dalis paūmėjimų yra neinfekcinės (imuninės) kilmės. Atskirti paūmėjimo kilmę nėra paprasta, nes ne visuomet galima atlikti invazinius tyrimus, tokius kaip fibrobronchoskopiją ir bronchų aspirato mikrobiologinį tyrimą. Klinikinėje praktikoje LOPL paūmėjimo pobūdžiui nustatyti kartu su klinikiniais simptomais naudojami gerai žinomi aktyvumo rodikliai – leukocitų skaičius kraujyje, C reaktyviojo baltymo koncentracija, eritrocitų nusėdimo greitis, fibrinogenas ir kai kurie kiti. Pastaruoju metu bandoma aptikti žymenų, kurie padėtų

atskirti infekcinę paūmėjimo priežastį nuo neinfekcinės. Daug tikimasi iš kraujo citokinių, kaip potencialių neinvazinių bakterinio LOPL paūmėjimo rodiklių. Tačiau vis dar nepakanka duomenų apie LOPL paūmėjimo laboratorinių žymenų diagnostinę vertę, nes įvairių autorių radiniai šiuo klausimu prieštaringi [9–11].

Klinikinėje praktikoje lėtine obstrukcine plaučių liga sergantys ligoniai iki 2011 metų pabaigos buvo stadijuojami tik pagal vienintelį kvėpavimo funkcijos rodiklį – FEV₁. Pastaraisiais metais toks ligonių suskirstymas kėlė vis daugiau nepasitenkinimo tiek tarp mokslininkų, tiek tarp gydytojų praktikų, nes neatspindėjo LOPL būdingos plaučių pokyčių įvairovės ir blogai koreliavo su ligonių klinikiniais simptomais ir funkcinė būkle [12, 13]. Nors sumažėjusios FEV₁ ir FEV₁/FVC rodiklių reikšmės padeda nustatyti kvėpavimo takų obstrukciją ir klasifikuoti ją pagal sunkumą, tačiau to nepakanka identifikuoti morfologinei obstrukcijos priežastčiai ir susidaryti išsamesnį ligos vaizdą. Sumažėjęs iškvėpiamo oro srautas (obstrukcija) sergant LOPL gali būti sąlygotas įvairių priežasčių – smulkiųjų kvėpavimo takų pažeidimo, emfizemos, bronhektazių, fibrozės ar jų derinių [14, 15]. Norint geriau gydyti LOPL sergančius ligonius, labai svarbu kompleksiškai įvertinti tiek funkcinius, tiek struktūrinius kvėpavimo takų ir plaučių pokyčius. Tai padeda geriau apibūdinti konkretaus paciento ligos fenotipą ir parinkti tinkamiausią gydymą [16]. Klinikinėje praktikoje nevisuomet yra galimybių atlikti daug ir išsamių tyrimų, todėl gali būti svarbu žinoti kvėpavimo funkcijos rodiklių ir plaučių radiologinių pokyčių sąsajas, tikintis, kad atlikus vieną tyrimą (pvz., plaučių funkcijos) būtų galima numanyti ir apie esančius struktūrinius plaučių pokyčius, aptinkamus, pavyzdžiui, atlikus plaučių kompiuterinę tomografiją.

Lėtinis kvėpavimo takų uždegimas sergant LOPL yra centrinis veiksnys, lemiantis visus patologinius ir funkcinius pokyčius bronhuose ir plaučių parenchimoje, kurie savo ruožtu lemia sisteminį uždegimą ir hipoksemiją. Nors uždegimas yra vienas svarbiausių šios ligos veiksnių, uždegimą

slopinančių vaistų (inhaliuojamųjų gliukokortikosteroidų) vieta LOPL gydymo algoritme tiksliai nenustatyta. Vieniems ligoniams jų skyrimas pagerina ligos eigą, gyvenimo kokybę, sulėtina plaučių funkcijos blogėjimą, kitiems neturi teigiamo poveikio, o dar kitiems – didina infekcinių komplikacijų (pneumonijų) ir mirties nuo jos riziką. Ankstesniuose tyrimuose gautų duomenų įvairovė, neatitikimas ir prieštaravimas, išskėlė hipotezę, kad daliai LOPL sergančių ligonių po pirminio žalojančio veiksnio (pvz., tabako rūkymo) stimulo, inicijuojamas autoimuninis atsakas, lemiantis nuolatinį uždegimą [17–19]. Tai yra lėtiniu bronchitu sergantiems ligoniams kvėpavimo uždegimas persistuoja ir lemia ligos progresavimą iki LOPL. Kol kas duomenų, leidžiančių paneigti, ar patvirtinti šią hipotezę nepakanka. Šis tyrimas pradėtas tikintis, kad pavyks rasti ir geriau apibūdinti bronchų uždegimo ir kvėpavimo funkcijos sąsajas įvairių LOPL klinikinių fazių metu.

2. Tyrimo tikslas

Ištirti kvėpavimo takų (bronchų) uždegimo sąsajas su plaučių funkcija.

3. Tyrimo uždaviniai

1. Ištirti asmenų, sergančių LOPL, periferinio kraujo citokinų koncentraciją ligos paūmėjimo ir remisijos metu, tikintis rasti neinvazinį LOPL paūmėjimo žymenį (žymenis), leisiantį atskirti infekcinę paūmėjimo kilmę nuo neinfekcinės.
2. Ištirti radiologinių plaučių pokyčių ir kvėpavimo funkcijos rodiklių sąsajas sergant lėtine obstrukcine plaučių liga.
3. Ištirti, ar apie kvėpavimo takų uždegimo pokyčius sergant LOPL galima spręsti iš klasikinių uždegimo ir bakterijų žymenų pokyčių kraujyje. Įvertinti šių kraujo žymenų priklausomybę nuo LOPL klinikinės fazės.

4. Nustatyti T reguliacinių limfocitų (CD4+CD25+), kaip galimai uždegimą slopinančių ląstelių, kiekį LOPL sergančių ligonių kraujyje ir palyginti su LOPL nesergančių asmenų grupe.
5. Ištirti CD25+ žymenį turinčių ląstelių kiekį LOPL sergančių ligonių bronchų gleivinėje ir palyginti jį su LOPL nesergančių rūkančių ir nerūkančių asmenų kontrolinėmis grupėmis.

4. Mokslinė darbo reikšmė ir naujumas

Nežiūrint didelių pasiekimų tiriant ir gydant LOPL, praktiniame darbe iki šiol išlieka savalaikio ligos paūmėjimo nustatymo problema. Nuolat ieškoma potencialių neinvazinių žymenų, kurie galėtų padėti laiku diagnozuoti LOPL paūmėjimą ir galimai nustatyti jo kilmę (bakterinis ar imuninis). Daug tikimasi iš citokinų, kaip potencialių LOPL paūmėjimo žymenų. Nors pavieniuose darbuose tirta IL-10 ir TNF- α koncentracija LOPL sergančių ligonių kraujyje [144,145], tačiau tyrimų duomenys prieštaringi. Ne taip kaip kiti tyrėjai, mėginome aptikti ryšį tarp ligos paūmėjimo, bakterinės kvėpavimo takų kolonizacijos ir kraujo citokinų koncentracijos, todėl palyginome LOPL sergančius ligonius paūmėjimo ir remisijos metu. Tam tikslui pirmą kartą panaudojome naują metodiką, ištirdami ne ekstraląstelinius, bet viduląstelinius citokinus.

Neradome literatūros duomenų apie NMT ir NFA tyrimų pritaikymą LOPL paūmėjimams nustatyti ar jų kilmei diferencijuoti, nors šie tyrimai yra prieinami mūsų klinikinėje praktikoje. Pirmieji panaudojome šiuos testus sergantiems LOPL ligoniams tirti.

Remdamiesi hipoteze, kad santykinis T reguliacinių ląstelių trūkumas ir dėl to vykstantis nekontroliuojamas autoimuninis uždegimas kai kurių rūkalių organizme galėtų būti viena iš LOPL atsiradimo priežasčių, ištyrėme T reguliacinių ląstelių kiekį LOPL sergančių ligonių kraujyje ir bronchų gleivinėje. Mūsų gauti rezultatai patvirtino šią hipotezę.

5. *Ginamieji teiginiai*

1. LOPL paūmėjimą atspindi kraujo citokinų koncentracijos pokyčiai – padidėjusi IL-10 koncentracija ir sumažėjusi TNF- α koncentracija.
2. Sergančiųjų LOPL suskirstymas į stadijas tik pagal FEV₁ rodiklį nepakankamai atskleidžia plaučių funkcinių ir struktūrinių pokyčių visumą.
3. Kraujo uždegimo aktyvumo žymenų koncentracija priklauso nuo LOPL klinikinės fazės. Kvėpavimo takų uždegimo sustiprėjimą LOPL paūmėjimo metu gerai atspindi klasikiniai kraujo uždegimo aktyvumo žymenys – CRP, ESR, fibrinogenas, leukocitų skaičius bei bronchų aspirato mikrobiologinio tyrimo rezultatai. NMT, NFA ir procalcitoninas neturi diagnostinės vertės kvėpavimo takų uždegimui ir jo paūmėjimui vertinti sergant LOPL.
4. LOPL atsiradimui turi įtakos organizmo imuninės sistemos disfunkcija – CD4⁺CD25⁺ (T reguliacinių) limfocitų trūkumas ir dėl to nepakankamai slopinamas kvėpavimo takų (galimai autoimuninis) uždegimas. Didžiausia šių ląstelių stoka būdinga sergantiems sunkia ir labai sunkia LOPL.

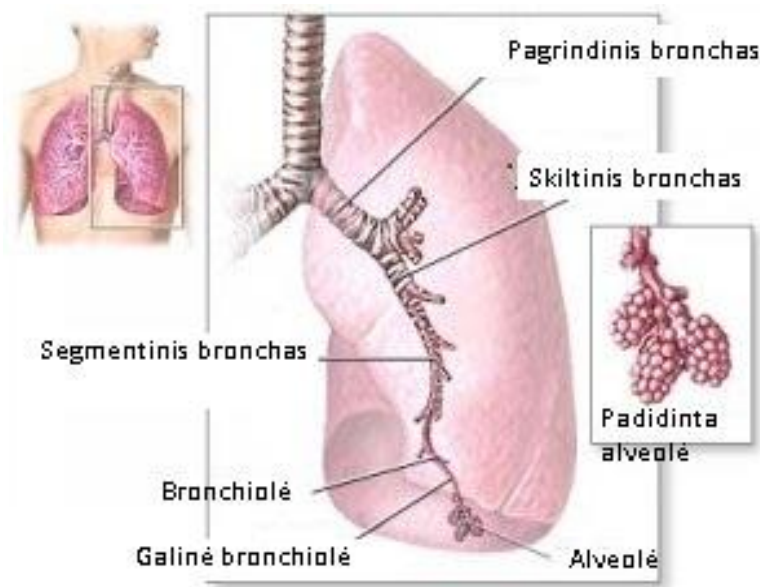
II. LITERATŪROS APŽVALGA

1. Bronchų ir plaučių anatomija

Bronchų medį sudaro trachėja ir bronchai. Trachėjos ilgis yra 10-12 cm, o skerspjūvis – 1,5 – 2,5 cm. Jos karkasą sudaro 15-20 kremzlinių pusžiedžių (kremzlinė dalis), apimančių 70-80 proc. trachėjos skerspjūvio. Pusžiedžių galus jungia jungiamojo audinio membrana (membraninė dalis), esanti trachėjos nugarinėje pusėje. Trachėja skyla į du pagrindinius bronchus (1 pav.). Abu pagrindiniai bronchai ir dešiniojo plaučio tarpinis bronchas yra ekstrapulmoniniai bronchai. Jų karkasą taip pat sudaro kremzliniai pusžiedžiai, kurie apsaugo stambiuosius kvėpavimo takus nuo subliušimo, kai spaudimas krūtinės ląstoje tampa neigiamas. Nuo pagrindinių bronchų atsišakoja penki skiltiniai bronchai (trys dešiniajame plautyje ir du kairiajame plautyje). Skiltiniai bronchai skyla į segmentinius, šie – į subsegmentinius ir t.t. Tai intrapulmoniniai bronchai. Jų kremzlės nesudaro pusžiedžių, o išsidėsto per visą broncho sieną netaisyklingais fragmentais. Iš viso yra 16–28 bronchų generacijos. Jau 12–14 generacijos bronchų sienelėje nebėra kremzlinio audinio. Tai smulkieji kvėpavimo takai – bronchiolės. Jų skerspjūvis yra ne didesnis kaip 2 milimetrai. Kvėpavimo takuose iki galinių bronchiolių dujų apykaita nevyksta. Tai – laidžioji zona, kurios tūris yra apie 150 ml. Galinės bronchiolės, kurių skersmuo yra apie 0,5 – 0,8 mm skyla į kvėpavimo (respiracines) bronchioles, kurių yra apie 220 000. Jos elastingomis jungtimis susijungusios su alveolių elastingomis skaidulomis. Šios jungtys neleidžia iškvėpiant orą bronchiolėms subliūkti. Sergant LOPL dėl nuolatinio uždegimo šios jungtys ilgainiui suyra ir nebepalaiko atvirų kvėpavimo takų iškvėpimo metu. Nuo respiracinių bronchiolių atsišakoja alveoliniai takai, o nuo jų – alveoliniai maišeliai. Respiracinės bronchiolės, alveoliniai takai ir alveolės sudaro kvėpavimo (respiracinę) zoną, kurioje vyksta dujų apykaita tarp alveolėse esančio oro ir kapiliarų kraujo. Jos plotas priklauso nuo kvėpavimo fazės ir

antropometrinių duomenų ir vidutiniškai yra apie 70 m² [100]. Alveolės savo formą išlaiko dėl intersticiniame audinyje esančių elastinių skaidulų, kurios trukdo alveolėms išsiplėsti įkvepiant, mažina jų paviršiaus plotą.

Sergant LOPL patologinis procesas stipriausiai vyksta smulkiuosiuose kvėpavimo takuose (bronchiolėse), iš kur plinta į plaučių parenchimą (alveoles) pažeisdamas ir ardydamas plaučių audinį bei kraujagysles.



1 pav. Apatinių kvėpavimo takų schema: bronchų medis ir plaučiai (pagal ©ADAM Inc.).

2. Rūkymas – pagrindinis LOPL rizikos veiksnys

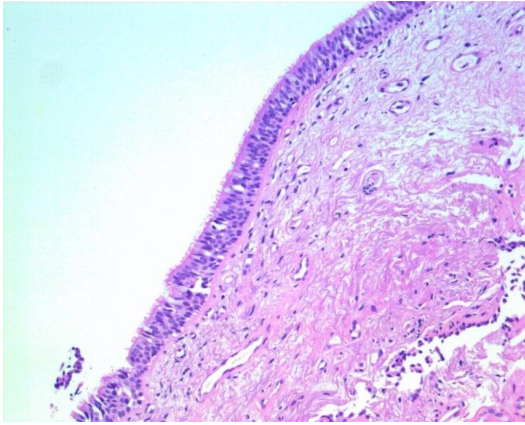
Nors LOPL laikoma polietiologine liga, tačiau esminis ją sukeliantis veiksnys yra tabako rūkymas. Rūkaliai sudaro 80–85% sergančiųjų LOPL, tačiau LOPL suserga tik 15–20 % visų rūkančių asmenų. Nustatytas tiesioginis ryšys tarp rūkymo intensyvumo ir kvėpavimo takų obstrukcijos. Dar 1977 m. Flečeris ir Peto paskelbė savo 8 metų trukmės prospektyviojo tyrimo duomenis, įrodę, kad rūkančių asmenų FEV₁ mažėja dvigubai greičiau (60 ml per metus), palyginti su nerūkančiaisiais (30 ml per metus), o rūkančių ir sergančių LOPL – dar greičiau [101]. Peters vadovaujama

tyrėjų grupė nustatė, kad stambiųjų kvėpavimo takų epitelio metaplazija į plokščiąjį tiesiogiai susijusi su cigarečių rūkymo intensyvumu [102]. Ji buvo rasta net 46 % tirtų rūkalių ir 23 % metusiųjų rūkyti [103]. Rūkymas sukelia padidėjusią kvėpavimo takų uždegimą skatinančių mediatorių (IL-6, IL-1 β , IL-4, IL-8, TNF- α ir kt.) ir užslopina uždegimą slopinančių citokinų (IL-10, IL-18 ir kt.) sekreciją [165]. Priežastys, lemiančios uždegiminės reakcijos į cigarečių dūmus ar kitokius išorinius veiksnius sustiprėjimą, gali būti genetinės, tačiau iki šiol tiksliai nežinomos [104].

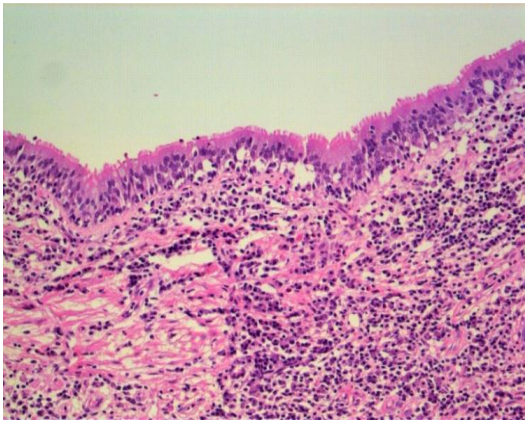
3. LOPL patogenezė

Sergant LOPL pažeidžiami stambieji kvėpavimo takai (bronchai), smulkieji kvėpavimo takai (bronchiolės), plaučių parenchima ir plaučių kraujagyslės. Nuolatinė cigarečių dūmų ar kitų toksinių dujų ar dalelių inhaliacija sukelia natūralios gynybinės reakcijos sustiprėjimą, todėl kvėpavimo takuose susikaupia įvairių uždegimo ląstelių, kurios yra aktyvesnės, negu įprasta. Dėl oksidacinio streso ir proteazių pertekliaus pažeidžiamas stambiųjų bronchų epitelis ir gleivės gaminančios liaukos. Kvėpavimo takuose padidėja gleivių kiekis, sulėtėja mukociliarinis klirensas. Kliniškai tai pasireiškia lėtinio bronchito simptomais – kosuliu ir skrepliavimu [14].

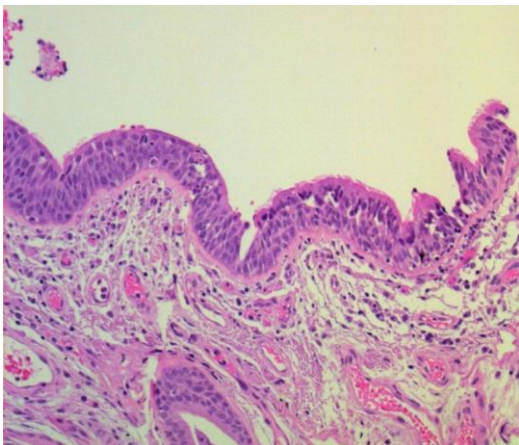
Smulkiųjų kvėpavimo takų epitelis yra labai svarbus LOPL patologinei fiziologijai, nes, uždegimui pažeidus smulkiuosius kvėpavimo takus (bronchioles, kurių skersmuo < 2 mm dydžio) ir jų spindžiui susiaurėjus, pasireiškia kvėpavimo takų obstrukcija, o dėl jos atsirandanda pagrindinis LOPL simptomas – dusulys [105]. Dėl plokščialąstelinės metaplazijos pakitęs smulkiųjų kvėpavimo takų epitelis (2–4 pav.) gamina daugiau IL-1 β , kuris aktyvina fibroblastus, skatindamas TGF- β sekreciją ir peribronchinę fibrozę [106]. Hiperplazavusios taurinės ląstelės gamina daugiau epitelio mucinų (MUC5AC ir MUC5B), todėl atsiranda gleivių hipersekrecija [107]. Tirštas uždegiminis eksudatas užpildo bronchiolių spindį, sustiprindamas obstrukciją.



2 pav. Normali broncho gleivinė. (Dažyta hematoksilinu ir eozinu, padidinta 100 kartų.)



3 pav. Bronchitas. Uždegiminė infiltracija po paviršiniu epiteliu. (Dažyta hematoksilinu ir eozinu, padidinta 100 kartų.)



4 pav. Broncho virpamojo epitelio metaplazija į daugiasluoksnį plokščią. (Dažyta hematoksilinu ir eozinu, padidinta 100 kartų.)

Sekretuodamas specifinius chemoatraktantus smulkiųjų kvėpavimo takų epitelis skatina uždegimo ląstelių – neutrofilų, makrofagų ir T limfocitų priplūdimą [108–110]. Progresuojant peribronchinei fibrozei, atsiranda tempimo bronhektazių. Sutrikus bronchų sekreto evakuacijai, pakitus imuniniam atsakui plaučiuose, kvėpavimo takuose kaupiasi bakterijų. Ligos pradžioje bronchuose dažniausiai persistuoja *Streptococcus pneumoniae* ir *Haemophilus influenzae*, o ligai įsisenėjus – *Haemophilus influenzae*, gaminantis β laktamazes, *Moraxella catarrhalis*, *Pseudomonas aeruginosa* ir kt. [111].

Lėtinis uždegimas pažeidžia ir plaučių parenchimą. Alveolių sienelių destrukcija sukelia emfizemą. Sunyksta jungtys tarp alveolių, destabilizuojasi smulkieji kvėpavimo takai: iškvepiant orą iš plaučių jų sienelės per anksti subliūkšta, ligonis nebegali iškvėpti likusio plaučiuose oro, kuris lieka ir kaupiasi, sukeldamas oro spąstų fenomeną. Dėl to plaučių išsipūtimas (hiperinflacija) didėja, o ventiliacinė plaučių funkcija blogėja, randasi dusulys [15].

Patologiniai struktūriniai pokyčiai atsiranda ir smulkiosiose ($< 500 \mu\text{m}$) plaučių arterijose. Anksčiau buvo manoma, kad juos sukelia hipoksemija ir jie būdingi tik labai sunkia LOPL sergantiems ligoniams, tačiau paaiškėjo, kad lygiųjų raumenų proliferacija, elastino ir kolageno depozicija bei intimos sustorėjimas būdingas ir vidutinio sunkumo LOPL sergančių ligonių ir net nesergančių LOPL rūkalių plaučių kraujagyslėms [112]. Vadinasi, plaučių kraujagyslių pažeidimas yra ankstyvas rūkymo sukeltos plaučių ligos požymis, ilgainiui sukeliantis plautinę hipertenziją [113].

4. Kvėpavimo takų uždegimo ypatumai sergant LOPL

Seniai žinoma, kad LOPL yra lėtinė uždegiminė kvėpavimo takų liga, tačiau iki pastarųjų dešimtmečių daugiausiai dėmesio buvo skiriama sergančiųjų astma kvėpavimo takų uždegimui tirti [20]. Bronchinės astmos gydymas tapo

daug efektyvesnis nustatius šios ligos patogenezę, pradėjus efektyviai slopinti kvėpavimo takų uždegimą.

Priešingai nei astmai, lėtinei obstrukcinei plaučių ligai buvo skiriama mažiau dėmesio. LOPL buvo suprantama kaip būklė, dažniausiai atsirandanti dėl ilgamečio rūkymo. Jos vienintelis efektyvus gydymas buvo ilgalaikė deguonies terapija. Įsivyravo nuomonė, kad pagrindinės kvėpavimo takų uždegimo ląstelės sergant LOPL yra neutrofilai, makrofagai ir CD8⁺ limfocitai [21].

Tačiau pastaraisiais dešimtmečiais prasidėjo LOPL patogenezės tyrimų renesansas. Tiriant kvėpavimo takų uždegimą daugiau dėmesio pradėta skirti ne tik ląstelių tipams, bet ir jų funkcijoms bei tarpusavio sąveikai. Nustatyta, kad uždegimo procese dalyvauja ir kitos imunokompetentinės ir epitelio ląstelės, turinčios įtaką LOPL eigai, kvėpavimo takų remodeliacijai. Atskleidus naujus patogenezės mechanizmus, imta ieškoti naujų uždegimą slopinančių vaistų LOPL gydyti [22].

Ryšys tarp rūkymo ir kvėpavimo takų uždegimo pastebėtas seniai. Šeštajame XX a. dešimtmetyje išanalizavus sirgusių centrilobuline emfizema autopsijų duomenis, buvo nustatyta bronchiolito požymių plaučių parenchimoje [23]. Tolesni tyrimai patvirtino, kad smulkiųjų kvėpavimo takų uždegimas tiesiogiai susijęs su remodeliacija ir parenchimos destrukcija [24, 25]. Aptiktas glaudus ryšys tarp bronchų uždegimo ir emfizemos: stiprėjant uždegimui, emfizema progresuoja. Iškelta hipotezė, kad centrilobulinę emfizemą sukelia uždegimas, plintantis iš smulkiausių kvėpavimo takų (bronchiolių) į alveoles ir suardantis jų struktūrą [26, 27]. Gauta duomenų, kad bronchų uždegimo sunkumas koreliuoja su plaučių funkcijos sutrikimo sunkumu [25, 28].

Uždegimo ląstelių vaidmuo LOPL patogenezėje buvo išaiškintas tiriant laboratorinius gyvūnus, atliekant tyrimus *in vitro*, bei atliekant bronchologinius tyrimus *in vivo*, tiriant indukuotus skreplius ir rezekuotas plaučių dalis. Tuomet nustatyta, kad uždegimui svarbios ląstelės sergant LOPL yra ne tik neutrofilai, makrofagai ir CD8⁺ limfocitai, bet ir CD4⁺ limfocitai, eozinofilai, mastocitai bei natūralieji kileriai [21].

4.1 Pagrindinės uždegimo ląstelės sergant LOPL

4.1.2 Neutrofilai

Neutrofilinis kvėpavimo takų uždegimas yra viena svarbiausių patogenezės grandžių sergant LOPL. Neutrofilai yra imuninės sistemos „priekinės fronto linijos“ kovotojai, aktyvių deguonies radikalų, uždegimo citokinų, antibakterinių peptidų ir enzymų šaltinis [29]. Jų gerokai padaugėja formuojantis bronchų gleivinės metaplazijai ir plaučių audinio destrukcijai. Neutrofilų išskiriamos medžiagos sukelia gleivių hipersekreciją. Neutrofilų elastazė ir aktyvūs deguonies radikalai skatina epitelio mucino mRNR ir baltymų sintezę [30–32]. Nustatyta, kad sergančiųjų LOPL kraujyje ir šlapime yra padidėjusi neutrofilų elastazės metabolitų koncentracija [33], aptikta emfizemos sunkumo priklausomybė nuo elastazės kiekio periferinio kraujo neutrofiluose [34]. Paaiškėjo, kad asmenų, sergančių emfizema periferinio kraujo neutrofilai suskaido daugiau tarpląstelinio jungiamojo audinio baltymų, negu kontrolinių asmenų neutrofilai [35]. Tai rodo, kad uždegimas sergant LOPL yra ne tik kvėpavimo takuose, bet ir sisteminis. Tiriant sergančiųjų LOPL indukuotus skreplius ir bronchoalveolinio lavažo (BAL) skystį rastas padidėjęs neutrofilų skaičius ir jų išskiriamų fermentų koncentracija tiek ligos remisijos, tiek ir paūmėjimų metu. Skrepliuose buvo rasta daugiau neutrofilų ir mažiau makrofagų, negu BAL skystyje. Greičiausiai taip yra dėl to, kad skrepliai atspindi stambesnių kvėpavimo takų pokyčius [36], o BAL skysčio ląstelės – smulkiųjų kvėpavimo takų ir alveolių. Bronchų gleivinės biopsituose, paimtuose LOPL paūmėjimo metu randama daugiau neutrofilų, negu tuose, kurie paimti remisijos metu [37]. Kvėpavimo takų lygiųjų raumenų infiltracija neutrofilais tiesiogiai koreliuoja su kvėpavimo takų obstrukcijos ir oro spastų sunkumu [38]. Taigi, neutrofilai, jų kiekio ir aktyvumo padidėjimas, neabejotinai svarbūs LOPL patogenezei.

4.1.3 Makrofagai

Makrofagai yra dažniausiai nustatomos neparenchiminės plaučių ląstelės, svarbios tiek įgimtam, tiek įgytam imunitetui. Pagrindinė šių ląstelių funkcija yra sunaikinti žalingas ląsteles ar daleles jas praryjant (fagocituojant). Makrofagus aktyvina tiek tiesioginis kontaktas su patogenu, tiek aktyvintų T limfocitų helperių išskiriami citokinai bei kiti imuninės sistemos mediatoriai. Susidūrę su patogenu alveoliniai makrofagai išskiria aktyvius deguonies radikalus, chemotaksio faktorius, uždegiminius citokinus, medžiagas, skatinančias lygiųjų raumenų konstrikciją, skatinančias gleivinės liaukų sekreciją. Makrofagai, išskirdami leukotrieną B₄ (LTB₄) ir interleukiną 1 (IL–1), skatina bronchų hipersekreciją. Jie sekretuoja matricines metalo proteazes (MMP), kurios ardo plaučių parenchimą ir skatina leukocitų migraciją bei kaupimąsi audiniuose. Alveolinių makrofagų aerozolis laboratoriniams gyvūnams sukėlė emfizemą [39]. Eksperimentuojant nustatyta, kad alveolinių makrofagų kultūros, išaugintos iš LOPL sergančių ligonių ląstelių, išskyrė daugiau MMP–1 ir MMP–9, negu sveikų asmenų [40]. Pelėms, kurioms buvo MMP-12 stoka, cigarečių dūmų sukelta plaučių destrukcija progresavo lėčiau [42]. Tai rodo, kad sergant LOPL, matriksinio metalo proteinazių sekrecija ir aktyvumas padidėja, sustiprindami plaučių audinio destrukciją [41]. Tačiau, kita vertus, yra duomenų, kad rūkančių asmenų alveolių makrofagų uždegimą skatinančios savybės sumažėja: sumenksta jų fagocitinis aktyvumas, jie gamina mažiau uždegimo mediatorių ir azoto oksido [133]. Nustatyta, kad didelei daliai (tačiau ne visiems) LOPL sergantiems rūkaliams klasikinį uždegimą skatinantį M1 alveolinių makrofagų fenotipą pakeičia alternatyvus M2 fenotipas, kuriam būdingos uždegimą slopinančios, fibrozę skatinančios savybės [134, 135]. Šis reiškinys galėtų būti vienas iš imuninę sistemą slopinančių ir navikus sukeliančių veiksnių daliai rūkalių. Pastebėta, kad sergant LOPL alveolinių makrofagų gebėjimas fagocituoti bakterijas sutrikęs, todėl šių ligonių kvėpavimo takuose nuolat tarpsta patogeninės bakterijos, sukeldamos ligos paūmėjimus [136,137].

4.1.4 T limfocitai

Sergant LOPL padidėja bendras T limfocitų skaičius, tačiau svarbiausios yra CD8 potipio (citotoksinės) ląstelės. Padidėjęs jų kiekis randamas sergančiųjų LOPL kvėpavimo takų gleivinėje, pogleivyje bei lygiuosiuose kvėpavimo takų raumenyse. Pagrindinė CD8+ ląstelių funkcija yra sunaikinti virusų infekuotas ląsteles, skatinti jų apoptozę [43]. Jos taip pat naikina piktybines bei nepilnavertes, pažeistas ląsteles. Citotoksiniai T limfocitai (Tc) gali diferencijuotis į du fenotipus - Tc1 ir Tc2. Jie sekretuoja skirtingus citokinus: Tc1 – IFN- γ , o Tc2 – IL-4 ir IL-5.

Pastebėta, kad ŽIV infekuotiems rūkaliams, kurių BAL skystyje rastas padidėjęs CD8+ limfocitų skaičius, dažniau pasitaikė emfizema [44]. Tačiau mechanizmas, kuriuo CD8+ limfocitai pažeidžia plaučių parenchimą, nevisiškai aiškus. Manoma, kad jie pažeidžia intersticinį plaučių audinį sekretuodami proteolizines medžiagas, tokias kaip perforinas ir granzimas [58]. Paaiškėjo, kad CD8+ ląstelės, išskirtos iš LOPL sergančiųjų asmenų skreplių, sekretuoja daugiau perforino ir yra citotoksiškai aktyvesnės, negu sveikų asmenų [45]. Manoma, kad CD8+ limfocitai sukelia epitelio ląstelių apoptozę [46]. Šį pažeidimą sustiprina antigenai nespecifinės ląstelės, tokios kaip makrofagai.

Kad T limfocitai galėtų kauptis plaučiuose, jiems turi būti pristatytas antigenas. Kas yra šis antigenas sergant LOPL, tiksliai nežinoma. Yra kelios hipotezės. Pagal vieną jų – T limfocitai reaguoja į kol kas nenustatytą plaučių autoantigeną ir pažeidžia plaučių audinį ir be virusinio stimulo. Autoantigenų susiformavimą skatina rūkymas ir nuolatinis uždegimas. Pagal kitą hipotezę antigeninę stimuliaciją gali sukelti ne autoantigenas, o viduląstelinis patogenas, pvz. adenovirusas [46–48] arba nuolatinė patogeninių bakterijų kolonizacija kvėpavimo takuose [105].

Rūkalių, sergančiųjų LOPL, smulkiųjų kvėpavimo takų sienelėse padaugėja ne tik CD8+, bet ir CD4+ limfocitų. Šios ląstelės dalyvauja uždegime koordinuodamos kitas imuninio atsako ląsteles, atpažindamos antigenus ir

aktyvindamos kitas ląstelinio imuniteto grandis, kad būtų pašalintas patogenas. Jos aktyvina B limfocitus. CD4⁺ limfocitai (dar vadinami helperiais, pagalbininkais–T_H) taip pat yra dviejų fenotipų – T_H1 ir T_H2. T_H1 sekretuoja IL-2 ir IFN- γ . IL-2 didina CD8⁺ limfocitų citotoksiškumą, o IFN- γ aktyvina makrofagus ir skatina viduląstelinį patogenų žūtį. CD4⁺ T_H1 potipio limfocitai slopina hiperjautrumo reakcijas ir aktyvina citotoksinius T limfocitus, o T_H2 ląstelės sekretuoja IL-4, IL-5 ir IL-10, kurie svarbūs antikūnų gamybai ir alerginių reakcijų patogenezėi [114].

Atskiras CD4⁺ ląstelių potipis – reguliaciniai T limfocitai (Treg), anksčiau vadinti supresoriais (slopintojais). Tai specializuota T ląstelių subpopuliacija, kuri slopina imunines reakcijas, palaiko imuninės sistemos homeostazę ir toleranciją saviems antigenams. Šios ląstelės slopina uždegimą sekretuodamos citokinus – IL-10 ir TGF- β [115]. Be to, jos geba slopinti imuninį atsaką ir tiesiogiai kontaktuodamos su antigeną pateikiančiomis ląstelėmis. Treg ląstelės būna kelių tipų. Svarbiausios yra tos, kurios ekspresuoja CD25⁺. T reguliacinės ląstelės CD4⁺CD25⁺ sudaro labai nedidelę dalį (1–3 %) visų CD4⁺ ląstelių [116]. Randamos dvi skirtingos Treg limfocitų populiacijos – natūralieji ir adaptuotieji (angl. *adaptive*). Natūralieji Treg limfocitai gaminami čiobrialiaukėje. Jie cirkuliuoja kraujyje ir būna periferiniuose limfmazgiuose. Pagrindinė jų funkcija yra užtikrinti toleranciją saviems antigenams [117]. Šias ląsteles pirmą kartą 1995 metais aprašė Sakaguchi [118]. Adaptuotosios CD4⁺CD25⁺ ląstelės gaminamos periferijoje iš naivių T ląstelių susidūrus su egzogeniniu antigenu, po kontakto su antigeną pateikusia ląstele. Abi Treg populiacijos yra priklausomos nuo geno Foxp3 (angl. *fork head box P3*), esančio X chromosomoje. [119]. Jo koduojamos medžiagos skatina IL-2 gamybą CD4⁺ ląstelėse. Foxp3 geno mutacija sukelia autoimunines ligas, tokias kaip diabetą, tiroiditą, artritą, psoriazę, sisteminę raudonąją vilkligę, taip pat alergines ir lėtines uždegimines ligas [57,118,119]. Foxp3, didelio laipsnio CD25⁺ ekspresija (CD25^{bright}) ir CD127⁺ (ypač CD127^{dim}) yra T reguliacinių limfocitų žymenys [120].

CD4+CD25+ limfocitų reikšmė LOPL patogenezei tirta tik pavieniuose darbuose. J. Lucy su bendradarbiais [58] nustatė, kad sergančiųjų LOPL ir rūkalių, nesergančių LOPL, BAL skystyje yra daugiau CD4+CD25+ reguliacinių limfocitų, palyginti su sveikais nerūkančiais asmenimis. Aptikta šių ląstelių skaičiaus koreliacija su surūkytų per gyvenimą cigarečių kiekiu. Nors bendras CD4+ ląstelių skaičius nepriklausė nuo rūkymo ir LOPL sunkumo, bet ilgalaikis cigarečių rūkymas įtakojo CD4+ ląstelių fenotipo pokyčius (ilgai rūkant daugėja CD4+CD25+ fenotipo limfocitų, kurie dalyvauja autoimuniniame procese). Iškelta hipotezė, aiškinanti limfocitų subpopuliacijų tarpusavio sąveiką, kad rūkaliams T reguliacinių ląstelių skaičius padidėja tam, kad galėtų kontroliuoti cigarečių dūmų sukeltą (galbūt autoimuninį) uždegimą. Nustatyta, kad rūkaliams, kuriems buvo bronchų obstrukcija, neproporcingai T reguliacinių limfocitų atžvilgiu daugėjo CD8+ limfocitų. Taigi, santykinis CD4+CD25+ reguliacinių ląstelių trūkumas didėjant CD8+ skaičiui gali būti svarbi LOPL patogenezės grandis, lemianti stiprėjantį nekontroliuojamą kvėpavimo takų uždegimą [58]. Lee vadovaujama tyrėjų grupė aptiko mažiau Treg ląstelių bei jų išskiriamo IL–10 tiems LOPL sergantiems rūkaliams, kurių plaučiai buvo pažeisti emfizemos, palyginti su kontroline grupe, kuriai emfizemos nebuvo [121]. Hipotezę, kad CD4+CD25+ limfocitai galbūt slopina rūkymo sukeltą autoimuninį kvėpavimo takų uždegimą iškėlė ir kiti tyrėjai, nustatę didesnę šių ląstelių kiekį rūkalių, kurių plaučių funkcija buvo nesutrikusi, BAL skystyje, palyginti su niekada nerūkusiais asmenimis ir ligoniais, sergančiais vidutinio sunkumo LOPL [122]. Tačiau esama ir priešingų duomenų, kad daugiau CD4+CD25+ ląstelių rasta ir sergantiems LOPL ir sveikiems rūkantiems asmenims, palyginus su sveikais niekada nerūkusiais asmenimis [123]. Tai, kad CD4+CD25+Foxp3 ląstelės slopina uždegimą ir įtakoja imuninį atsaką, paskelbė D'Alessio su bendraautorais. Jie nustatė, kad šios ląstelės sumažino lipopolisacharido instiliacijų į pelių trachėją sukeltą plaučių pažeidimą. CD4+CD25+Foxp3 ląstelių randama ir žmonių, kuriems yra ūminis plaučių pažeidimas, BAL skystyje [124]. Isajevs su bendraautorų kolektyvu ištyrė rūkalių, nesergančių

LOPL, sergančių LOPL ir sveikų asmenų plaučių biopsinę medžiagą. Sergančiųjų LOPL rūkalių grupėje jie aptiko reikšmingai mažesnę CD4+CD25+Foxp3 ląstelių koncentraciją smulkiuosiuose kvėpavimo takuose, palyginus su nesergančiais LOPL ir sveikais asmenimis [125]. Šis radinys koreliavo su bronchų obstrukcijos sunkumu. Kuo buvo mažiau T reg ląstelių, tuo sunkesnė buvo obstrukcija.

Apibendrinant šiuos literatūros duomenis galima iškelti hipotezę, kad santykinis T reguliacinių ląstelių trūkumas ir dėl to vykstantis nekontroliuojamas autoimuninis uždegimas kai kurių rūkalių organizme galėtų būti viena iš LOPL atsiradimo ir progresavimo priežasčių. Kita vertus, pastebėta, kad plaučių vėžiu dažniau suserga būtent ta rūkančiųjų grupė, kuri turi daugiau T reg ląstelių, t.y. labiau užslopintą imuninę sistemą, negu sunkia LOPL sergantieji, kurių imuninės (ar autoimuninės) reakcijos yra audringesnės ir todėl supiktybėjusios ląstelės, galbūt, geriau atpažįstamos ir sunaikinamos [126–128].

Dar viena imuninę sistemą reguliuojančiomis savybėmis pasižyminti T limfocitų populiacija yra CD8+ $\gamma\delta$ T ląstelės. Šių ląstelių buvimą rūkančių asmenų, kuriems nustatyta emfizema, plaučių parenchimoje aprašė Majo su bendraautoriais [129]. Didesnis CD8+ $\gamma\delta$ T limfocitų kiekis aptiktas rūkančių asmenų bronchų liaukose, palyginus su nerūkančiaisiais [130]. Panašiai kaip ir Treg ląstelių, daugiau CD8+ $\gamma\delta$ T ląstelių rasta rūkalių, kurių kvėpavimo funkcija nesutrikusi, plaučiuose, palyginus su sergančiais LOPL [131]. Šių ląstelių funkcija iki šiol nėra visiškai aiški, tačiau manoma, kad jos svarbios epitelio regeneracijai, nes daugiausiai jų (apie 30 % viso limfocitų kiekio) randama žarnyno gleivinėje ir odoje. Tikėtina, kad šios ląstelės atlieka apsauginę funkciją ir tarnauja kaip tiltas, jungiantis įgimtą ir įgytą imuninę sistemas [132].

T limfocitų NK ląstelės (natūralieji kileriai) yra atskira specializuotų citotoksinių limfocitų populiacija, sudaranti apie 5–10 % visų limfocitų. Šios ląstelės sugeba sunaikinti kai kurių klonų, pavyzdžiui, limfinio audinio navikų, ląsteles, be išankstinės imunizacijos ar aktyvinimo. Jų vaidmuo sergant LOPL

nėra plačiai tyrinėtas. Nurodoma, kad padidėjęs NK ląstelių skaičius randamas sergančiųjų LOPL stambiųjų kvėpavimo takų pogrindyje. Tai siejama su pasikartojančia virusine ar bakterine infekcija [49]. Tačiau tyrinėjant alveolių sienelėje esančių limfocitų populiacijas, sergantiesiems emfizema NK ląstelių skaičiaus padidėjimo nepastebėta [46].

4.1.5 Eozinofilai ir putliosios ląstelės

Duomenys apie eozinofilų kaupimąsi sergančiųjų LOPL kvėpavimo takuose yra prieštaringi. Nurodoma, kad ne tik paūmėjimo, bet ir remisijos metu daugiau eozinofilų randama skrepliuose [50], BAL skystyje [51] ir bronchų sienelėje [52]. Tačiau kiti tyrėjai neranda padidėjusio eozinofilų skaičiaus sergančiųjų LOPL kvėpavimo takuose [53], arba randa juos nedegranuliuotus, t.y. neaktyvius [54]. Eozinofilų kaupimosi mechanizmas kitoks, negu sergant astma. Sergant LOPL kvėpavimo takuose yra gerokai mažiau IL–4, IL–5 ir eotaksino, negu sergant astma [52]. Sergantiesiems LOPL eozinofilų priplūdimą į kvėpavimo takus skatina rūkymas. Manoma, kad IL–8, kuris paprastai siejamas su neutrofilų chemotaksu, taip pat skatina ir eozinofilų migraciją į kvėpavimo takus [55]. Ši teiginį patvirtina tai, kad IL–8 koncentracija koreliuoja su BAL skysčio eozinofilinio katijoninio proteino (ECP) koncentracija sergant lėtiniu bronchitu [56].

Nustatyta, kad gydymas kortikosteroidais efektyvesnis tiems sergantiesiems LOPL, kurių skrepliuose ir BAL skystyje yra didesnis eozinofilų kiekis [50]. Tai rodo, kad eozinofilų poveikis kvėpavimo takų uždegimui galėtų būti panašus, kaip ir sergant astma [28]. Vis dėlto, dauguma tyrėjų mano, kad LOPL ir astma – dvi skirtingos ligos: remisijos metu astmininkų, kurių kvėpavimo takų obstrukcija yra negrįžtama, skrepliuose ir BAL skystyje stebima daugiau eozinofilų ir mažiau neutrofilų, negu sergantiesiems LOPL [60]. Sergant LOPL eozinofilų skaičiaus padidėjimas kvėpavimo takuose siejamas su virusine infekcija [138].

Putliųjų ląstelių gebėjimas išskirti daugelį mediatorių sukėlė minčių apie galimą jų vaidmenį LOPL uždegimui. Sekretuodamos fermentus triptazę ir elastazę jos galėtų skatinti neutrofilų telkimąsi kvėpavimo takuose, sukeldamos audinių pažeidimą, o sekretuodamos chimazę galėtų skatinti gleivių sekreciją bronchuose [61]. Keletas tyrimų atskleidė padidėjusį putliųjų ląstelių skaičių sergančiųjų LOPL kvėpavimo takuose [62]. A. Pesci su bendradarbiais nustatė, kad jų degranuliacija bronchų liaukose daug didesnė sergantiesiems lėtiniu bronchitu, negu sveikiems tiriamiesiems [63]. Vis dėlto duomenys apie putliųjų ląstelių reikšmę LOPL uždegimui gana prieštaringi – yra tyrimų, neradusių jų padaugėjimo ligonių kvėpavimo takuose ir plaučių parenchimoje [64].

5. Citokinių reikšmė sergant LOPL

Citokinai yra tarpląstelinės informacijos perdavimo baltymai, palaikantys ryšį tarp ląstelių, dalyvaujantys imuninio atsako ir uždegimo procesuose. Iki šiol aptikta apie 50 citokinių, tačiau jų vaidmuo sergant lėtinėmis obstrukcinėmis plaučių ligomis vis dar nėra visiškai aiškus. Citokinai skirstomi į uždegimą skatinančius (IL–2, IL–4, IL–6, TNF–į ir kt.) ir uždegimą slopinančius (IL–10, IL–4 ir kt). IL–10 vertinamas kaip reguliacinis priešuždegimiškai veikiantis citokinas, kurį išskiria T limfocitų helperių Th2 potipis, T reguliaciniai limfocitai (CD4+CD25+) ir makrofagai [139, 140]. IL–10 yra įvairių uždegimo baltymų sintezės inhibitorius. Dalyvaudamas uždegiminiame procese, IL–10 slopina antigenų pristatymą, taip mažindamas uždegimo ląstelių priplūdimą į kvėpavimo takus. Jam veikiant kvėpavimo takuose mažėja imunokompetentinių ląstelių, todėl mažėja bronchų reaktyvumas. Nustatyta, kad IL–10 mažina daugelio uždegiminių ląstelių išskiriamų citokinių, iš jų ir TNF–α gamybą. [141]. TNF–α yra ypač galingas uždegimo mediatorius, indukuojantis uždegimą per tiesioginius ir netiesioginius mechanizmus. TNF–α receptorių aktyvinimas sukelia daugelio uždegimo mediatorių (chemokinių, proteazių ir adhezijos molekulių) gamybą ir išsiskyrimą [142]. Nustatyta, kad

TNF- α yra svarbus veiksnys, skatinantis fibroblastų proliferaciją ir kolageno sintezę. Jam veikiant makrofagai gamina metaloproteinazes taip skatindami plaučių emfizemos susiformavimą [143]. IL-10 veikia priešingai. Jis didina metaloproteinazės MMP-9 inhibitoriaus sintezę, apsaugo plaučių audinį nuo žalingo elastazės poveikio, slopina emfizemos vystymąsi. Chung tyrė citokinus (IL-1, IL-8, IL-10 ir TNF- α) sergančiųjų LOPL kraujyje ir, palyginęs su sveikais asmenimis, nustatė, kad ligonių kraujyje visų citokinių yra daugiau [144]. Tačiau sergančiųjų LOPL skrepliuose, palyginus su sveikaisiais, IL-10 buvo nustatyta mažiau [145]. Šis radinys siejasi su tuo, kad sergant LOPL randama mažiau Treg (CD4+CD25+Foxp3) ląstelių, kurios ir gamina IL-10 [58, 121, 125].

6. Kraujo uždegimo žymenų pokyčiai LOPL paūmėjus

LOPL būdingi periodiniai pablogėjimai, kurių metu pasunkėja respiraciniai simptomai (dusulys, kosulys, skrepliavimas), pablogėja kvėpavimo funkcijos rodikliai, fizinio krūvio toleravimas ir gyvenimo kokybė. Sergant sunkia LOPL kiekvienas paūmėjimas gali baigtis ligonio mirtimi [146]. Net paūmėjimui praėjus, kvėpavimo funkcija ir fizinis pajėgumas ilgai negrįžta iki prieš tai buvusio rodiklių lygio. Todėl itin svarbu išvengti paūmėjimų, juos prognozuoti, nustatyti jų kilmę ir laiku paskirti tinkamą gydymą.

Dauguma (50–87 %) LOPL paūmėjimų yra infekcinės (dažniausiai bakterinės) kilmės, o kitą dalį sudaro neinfekciniai paūmėjimai [147, 148]. Dažniausiai bronchų aspirato pasėliuose išauga *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catharhalis*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella*, *Staphylococcus aureus* ir *Pseudomonas aeruginosa* [149]. Paūmėjimą gali sukelti tiek kolonizuojančių bakterijų kiekio padidėjimas, tiek prisidėjusi kitos rūšies bakterinė infekcija [150]. Patogeninių bakterijų radimas remisijos grupės tiriamųjų bronchų aspirate paaiškinamas nuolatine bakterijų kolonizacija sergančiųjų LOPL

kvėpavimo takuose. Pastebėta, kad šiems ligoniams LOPL paūmėja dažniau [151].

LOPL paūmėjimas susijęs ne tik su kvėpavimo takų, bet ir su sisteminio uždegimo sustiprėjimu. Net ligos remisijos metu sergančiųjų LOPL kraujyje randama didesnė, palyginti su sveikais asmenimis, uždegimo žymenų – leukocitų skaičiaus, CRB, fibrinogeno, uždegimą skatinančių citokinų koncentracija [152]. Ligai paūmėjus šių žymenų kiekis gerokai padidėja, o paūmėjimui praėjus vėl sumažėja [153].

6.1 C reaktyvusis baltymas

Ūminio uždegimo proceso metu CRB koncentracija gali padidėti 20–25 kartus ir gerokai daugiau, todėl jis priskiriamas ūminės fazės baltymų grupei. CRB yra ne tik geras uždegimo ir audinių pažeidimo žymuo, bet ir svarbus LOPL patogenezei, nes skatina fagocituojančių ląstelių aktyvumą, aktyvina komplementą, opsonizuoja bakterijas, parazitus, plazmines membranas ir skatina jų šalinimą su fagocitinėmis ląstelėmis [146]. Sustiprėjus uždegimui, esant audinių pažeidimui ar infekcijai padaugėja IL–6, IL–1 ir TNF– α . Šie citokinai skatina CRB sintezę hepatocituose. Aptikta ir ekstrahepatinė šio baltymo sintezė, kuri vyksta neuronuose, monocituose, aterosklerozinėse plokštelėse, limfocituose, įvairiuose pažeistuose audiniuose [164].

LOPL suprantama kaip lėtinė plaučių liga, turinti sistemiškumo bruožų, todėl CRB, kaip sisteminio uždegimo žymens, pokyčiai sergant šia liga tyrinėti įvairiais aspektais. Paaiškėjo, kad didesnė CRB koncentracija susijusi su blogesniais kvėpavimo funkcijos rodikliais [166], padidėjusiu bronchų reaktyvumu [167], greitesniu FEV₁ mažėjimu [168] ir dažnesne šių ligonių hospitalizacija bei didesniu mirštamumu [169]. Prieita išvados, kad gali būti naudinga stebėti CRB dinaminį kitimą gydant LOPL [169]. Didžiausia CRB koncentracija nustatyta pačios sunkiausios (GOLD IV) LOPL stadijos ligoniams [170]. Visa tai patvirtina uždegimo svarbą LOPL patogenezei. *Hurst* vadovaujama tyrėjų grupė nustatė, kad padidėjusi CRB koncentracija, kartu

vertinant ir LOPL paūmėjimo klinikinius simptomus, tokius kaip dusulys, skreplių kiekio padidėjimas ir jų spalvos pokyčiai (pūlingi skrepliai), padeda diagnozuoti ligos paūmėjimą [154].

6.2 Fibrinogenas

Fibrinogenas – ne tik svarbus kraujo krešėjimo grandinės baltymas, bet ir uždegimo proceso dalyvis. Jis taip pat priskiriamas ūmios fazės baltymų grupei. Fibrinogeno du tris kartus padaugėja dėl infekcijos, todėl didėja eritrocitų nusėdimo greitis. Padidėjusi fibrinogeno koncentracija pažeistame audinyje skatina granulocitų migraciją, o šie atremia pagrindinę leukocitų ir pažeistų audinių ląstelių proteazių ataką [155]. *Dahl* nustatė, kad padidėjusi kraujo plazmos fibrinogeno koncentracija susijusi su blogesniais kvėpavimo funkcijos rodikliais ir yra nepriklausomas LOPL paūmėjimo rizikos veiksnys [156].

6.3 Prokalcitoninas

Prokalcitoninas laikomas vienu jautriausių bakterinės infekcijos žymenų. Veikiamos mikroorganizmų toksinų ir uždegimo mediatorių (IL–1, TNF– α , IL–6) jį sintetina parenchiminės ląstelės [157]. Nors PCT informatyvus diagnozuojant sepsį ir sunkią pneumoniją, tačiau jo vertė LOPL paūmėjimui nustatyti yra abejotina [158–160]. Literatūros duomenų apie PCT reikšmę LOPL paūmėjimo diagnostikai yra labai nedaug. *Daniels* su bendraautoriais nustatė CRB pranašumą identifikuojant bakterinį LOPL paūmėjimą ir atsaką į antibakterinį gydymą, palyginus su PCT [158].

6.4 Neutrofilų nitromėlio tetrazolio mėginys

Neutrofilų nitromėlio tetrazolio (NMT) mėginys (angl. *nitroblue tetrazolium (NBT) test*) pradėtas diegti į klinikinę praktiką apie 1968–1971 metus tikintis

geriau diagnozuoti infekciją [161]. Šį tyrimą mėginta naudoti infekcijos gydymui stebėti bei neutrofilų fagocitozės sutrikimui tirti [162]. Light tyrė NMT testo reikšmę diagnozuojant pleuros skysčio susikaupimo priežastis, tačiau nenustatė jo pranašumo, palyginti su įprastais uždegimo aktyvumo rodikliais – leukocitų skaičiumi, ENG ar CRB [163]. Mes neradome literatūros duomenų apie NMT tyrimo reikšmę LOPL paūmėjimams nustatyti ar jų kilmei diferencijuoti.

7. Plaučių funkcijų tyrimai ir jų reikšmė sergantiesiems LOPL

Kvėpavimo organų struktūros pokyčiai sąlygoja plaučių funkcijų sutrikimus, kliniškai dažniausiai pasireiškiančius įvairaus intensyvumo dusuliu, ypač sustiprėjančiu fizinio krūvio metu. Plaučių funkcijos tyrimai svarbūs tiek diagnozuojant LOPL, tiek stebint jos eigą, vertinant gydymo efektyvumą, skiriant pulmoninę reabilitaciją, vertinant plaučių būklę prieš numatomą operaciją.

7.1 Spirometrija

Tai dažniausiai atliekamas plaučių funkcijos tyrimas, atspindintis ventiliacinę plaučių funkciją. Atliekant spirometriją nustatomas iškvėpiamo ir (ar) įkvėpiamo oro kiekis ir greitis. Spirometrijos pradininkas - anglų chirurgas ir fiziologas Džonas Hatčinsonas (*John Hutchinson*), sukūrė „pneumatinį aparatą“, kurį 1844 m. išbandė tirdamas Londono gyventojus [68, 69]. Hatčinsono aparatas buvo sudarytas iš dviejų dalių – „kvėpavimo mašinos“, arba spirometro, kuris matavo plaučių tūrius ir prietaiso, matavusio taip vadinamą „kvėpavimo galią“. Pastarasis priminė gyvsidabrinį termometrą ir atspindėjo kvėpavimo raumenų stiprumą. 1947 m., beveik po šimtmečio, Robertas Tifno (*Tiffeneau*) publikavo duomenis apie forsuito iškvėpimo veiksmą (maksimalų per 1 sekundę iškvėpiamą tūrį po gilaus įkvėpimo) atliekant spirometriją ir pradėjo naudoti FEV1/VC indeksą kvėpavimo takų

obstrukcijai nustatyti [70]. JAV panašius tyrimus atliko Edvardas Gensleris (*Edward Gaensler*). Jis įdiegė į klinikinę praktiką FEV₁/FVC santykį, vėliau pavadintą jo vardu [71]. 1957 m. Britanijos pulmonologų draugija patvirtino vartoti forsuoto iškvėpimo tūrio per 1 sekundę (FEV₁) sąvoką, kuri ir šiandien išlieka viena svarbiausių kvėpavimo fiziologijos tyrimuose [70].

Svarbiausi rodikliai nustatant kvėpavimo takų obstrukciją ir jos sunkumą yra FEV₁/FVC (Genslerio indeksas), FEV₁/VC (Tifno indeksas) ir FEV₁. Svarbiausias bronchų obstrukcijos spirometrinis kriterijus yra FEV₁/FVC ar FEV₁/VC rodiklio vertės sumažėjimas žemiau apatinės normos ribos (ANR), t.y. FEV₁/FVC < ANR ar FEV₁/VC < ANR [73]. Remiantis FEV₁ dydžiu bronchų obstrukcija skirstoma pagal sunkumą [74]. Iki 2011 m. gruodžio LOPL buvo klasifikuojama į stadijas pagal FEV₁ rodiklio dydį, tačiau ši klasifikacija nesutapo su obstrukcijos sunkumo laipsniais [73]. 2011 m. gruodžio pabaigoje paskelbtose Pasaulinės lėtinės obstrukcinės plaučių ligos iniciatyvos (GOLD – angl. *Global Initiative for Chronic Obstructive Pulmonary Disease*) rekomendacijose nebeliko ligonių skirstymo į stadijas pagal FEV₁ rodiklį. Pagal tuos pačius kriterijus pacientai dabar klasifikuojami į keturias GOLD bronchų obstrukcijos sunkumo grupes [1].

FEV₁, FVC ir FEV₁/FVC santykis svarbūs komplikacijų rizikai ir prognozei nustatyti prieš plaučių turį mažinančias operacijas dėl emfizemos. FEV₁ ≤20 proc. yra kontraindikacija šiai operacijai [76].

LOPL būdingas neigiamas bronchų dilatacinis mėginys (inhaliavus 400 mcg salbutamolio FEV₁ ir (ar) FVC rodiklis nepakinta arba pagerėja ≤ 12 % arba 200 ml), tačiau nemažai daliai ligonių jis būna teigiamas [94, 95]. Visiškai išnykstanti bronchų obstrukcija paneigia LOPL diagnozę [1, 73]. Bronchų dilatacinio atsako dydis nėra tiesiogiai susijęs su LOPL progresavimo greičiu, gydymu bronchus plečiančiais vaistais ar gliukokortikosteroidais, paūmėjimų dažniu. FEV₁ rodiklio reikšmė po broncholitiko įkvėpimo blogai koreliuoja su ligonio klinikiniais simptomais, tokiais kaip dusulys, fizinio krūvio tolerancija ir gyvenimo kokybė. Todėl nenuostabu, kad nemažai klinikinių tyrimų, kurie rėmėsi vien tik FEV₁ pokyčiais, neparodė reikšmingo LOPL pagerėjimo nuo

bronchus plečiančių vaistų ar inhaliacinių kortikosteroidų [77]. FEV₁ matavimas nėra pakankamai informatyvus ir ankstyvam LOPL paūmėjimui nustatyti. Tačiau net nedidelis FEV₁ pagerėjimas po broncholitiko gydant LOPL paūmėjimą yra reikšmingas gydymo veiksmingumo rodiklis [98]. FEV₁ geriausiai koreliuoja su mirštamumu: sumažėjus šiam rodikliui mažiau 50 % būtinojo dydžio gerokai padidėja mirštamumas nuo LOPL [77].

Svarbu žinoti, kad bronchus plečiančių vaistų poveikį forsuiotam iškvėpimui maskuoja dėl ekspiracinio bronchiolių kolapso atsirandantys oro spąstai. Nustatyta, kad sergančiųjų LOPL dusulio sumažėjimas po β₂ agonisto inhaliacijos gerai koreliuoja su įkvėpimo rodiklių (FIV₁, IC) padidėjimu [75, 98].

LOPL įtariama remiantis anamneze, nusiskundimais ir fiziniu ligonio ištyrimu, tačiau patvirtinama tik atlikus spirometriją. LOPL diagnozuojama, kai po broncholitiko inhaliacijos FEV₁/FVC išlieka < 70%. LOPL bronchų obstrukcijos sunkumo grupės nustatomos remiantis vieninteliu spirometriniu rodikliu FEV₁ (kai FEV₁/FVC < 70%). Jo vaidmuo sprendžiant ligos kontrolės ir gydymo klausimus, skirtingai nei sergant astma, menkesnis, nes sergant LOPL jis nėra taip greitai kintantis.

Forsuoti kvėpavimo veiksmai nėra fiziologiniai, tačiau juos atliekant geriau išryškėja plaučių ventiliacijos sutrikimai. LOPL sergantiems pacientams sunku atlikti FVC veiksmą, nes reikia daug kartų giliai iškvėpti, o dėl to gali sustiprėti kvėpavimo takų obstrukcija. Pastaruoju metu siūloma alternatyva – forsuito iškvėpimo tūrio per 6 sekundes (FEV₆) matavimas. Gauta duomenų, kad FEV₁/FEV₆ santykis < 73 % tiksliau atspindi obstrukciją, negu Genslerio indeksas [89, 90, 98].

LOPL paprastai serga vyresnio amžiaus žmonės, kurių amžiaus vidurkis yra apie 60 metų, o norminių dydžių žinynai sudaryti naudojant įvairaus amžiaus žmonių duomenis, iš kurių vyresnio amžiaus asmenys sudaro mažumą [91]. Senstant fiziologiškai mažėja FEV₁, o tuo pačiu ir FEV₁/FVC santykis. Amerikos pulmonologų draugijos ir Europos respiratologų draugijos sutarime rekomenduojama kvėpavimo obstrukciją patvirtinti kai FEV₁/FVC santykis

mažesnis už statistiškai nustatytą 5 normos procentilę. Tačiau Globalinė lėtinės obstrukcinės plaučių ligos iniciatyva (GOLD) LOPL diagnozuoti rekomenduoja kai $FEV_1/FVC < 70 \%$. Šis fiksuotas dydis supaprastina diagnostiką, tačiau sukelia bronchų obstrukcijos nustatymo sunkumų, nes neatsižvelgia į natūralius plaučių funkcijos pokyčius, priklausančius nuo amžiaus. Nors vidutinio ūgio ir amžiaus asmenims ši Genslerio rodiklio reikšmė gana tiksliai nurodo obstrukciją, tačiau amžiui ir ūgiui labiau nukrypus nuo vidutinio, duomenys tampa ne tokie tikslūs [94]. E. Hansen su bendradarbiais ištyrė 5906 sveikus nerūkiusius ir 3497 rūkančius 20–79,9 m. amžiaus asmenis ir nustatė, kad kvėpavimo takų obstrukciją vertinant pagal fiksuotą FEV_1/FVC santykį $< 70 \%$, o ne pagal apatinę normos ribą, penktadaliui vyresnio amžiaus tiriamųjų obstrukcija klaidingai diagnozuota, o maždaug pusei jauno amžiaus tiriamųjų - nediagnozuota [92]. Todėl kriterijai, naudojami apibrėžti normalias Genslerio ir Tifno rodiklių ribas turėtų priklausyti nuo paciento amžiaus. Iš esmės, tinkamų norminių dydžių nustatymas yra sunki praktinė problema, nes gali neatspindėti konkrečios populiacijos norminių dydžių. Būtų idealu, jeigu kiekviena funkcinė tyrimų laboratorija turėtų savo tyrimų duomenimis parengtas norminių dydžių lenteles, tačiau praktiškai tai būtų labai sunku įgyvendinti. Todėl laboratorijos pasirenka ir įdiegia kurį nors iš publikuotų norminių dydžių žinynų. Deja, klinikinėje praktikoje tam skiriamas nepakankamas dėmesys. R.O. Crapo [93] nustatė, kad kai kurių funkcinė tyrimų laboratorijų darbuotojai net patys nežino, kokiais norminių dydžių žinynais vadovaujasi.

7.2 Plaučių talpų tyrimas

Plaučių talpos tiriamos atliekant bendrąją kūno pletizmografiją specialioje hermetinėje kabinoje esančiam ligoniui arba naudojant dujų praskiedimo metodus (helio praskiedimo arba azoto iškvėpavimo iš plaučių). Dujų praskiedimo metodų trūkumas tas, kad nustatomos tik ventiliuojamų plaučių sričių talpos, todėl, esant sunkiai bronchų obstrukcijai, buliozinei

emfizemai, jos gali būti nustatytos mažesnės negu iš tikrųjų yra [78, 79]. Kūno pletizmografijos metodu plaučių tūrius ir talpas galima nustatyti tiksliau. Plaučių talpų tyrimas būtinas, kai spirometrijos metu nustatomos sumažėjusios VC ir FVC rodiklių reikšmės, o FEV_1/FVC , FEV_1/VC rodiklių reikšmės nepakitusios arba padidėjusios, įtariama plaučių restrikcija, ekspiracinis bronchiolių kolapsas, diagnozuota ar įtariama intersticinė plaučių liga. Sergantiesiems LOPL būdinga ramybės (statinė) ir krūvio (dinaminė) plaučių hiperinfliacija, didele dalimi atsirandanti dėl lėtinio uždegimo pažeistų plaučių audinio elastinių komponentų sunykimo ir fibrozės [80]. Mažėjant plaučių elastingumui ir paslankumui, įvyksta ekspiracinis bronchiolių kolapsas, atsiranda oro spąstai, dėl kurių plaučiai dar labiau išsipučia, ypač fizinių pastangų metu, mažėja įkvėpimo talpa. Atliekant bendrąją kūno pletizmografiją šį fenomeną galima nustatyti pagal padidėjusias TLC, ypač RV, ir sumažėjusias VC rodiklių reikšmes. Pastebėta, kad net tiems pacientams, kuriems yra negrįžtama bronchų obstrukcija, įkvėpus broncholitiko dusulys sumažėja. Bronchus plečiantis vaistas sumažina plaučių išsipūtimą (hiperinfliaciją), nors FEV_1 rodiklis gali išlikti nepakitęs [81], tačiau labai sumažėja RV [81, 82]. Kadangi atliekant spirometriją TLC ir RV rodikliai nenustatomi, plaučių išsipūtimui ir oro spąstams vertinti plaučių talpų tyrimas būtinas.

7.3 Dujų difuzijos tyrimas

Dujų difuzija plaučiuose vertinama tiriant anglies monoksido (CO) difuziją iš alveolinio oro į plaučių kapiliarinį kraują. Dujų difuzijai tirti sukurta keletas metodų, tačiau dažniausiai taikomas ir geriausiai standartizuotas yra vieno įkvėpimo metodas [99]. Jo metu tiriamasis maksimaliai įkvepia (iki TLC) dujų mišinį, turintį mažą anglies monoksido koncentraciją (apie 0,3%) ir 10 s sulaiko įkvėpimą. Tiriama iškvėpto alveolinio oro CO koncentracija. Apskaičiuojamas CO pernešimo veiksnys

DLco, parodantis, koks CO kiekis difunduoja iš alveolinio oro į plaučių kapiliarinį kraują per 1 min., esant 1 kPa slėgio gradientui.

Nors šis tyrimas dažniausiai atliekamas sergantiems intersticinėmis plaučių ligomis, tačiau sergantiems LOPL juo galima įvertinti emfizemos dydį (dujų difuzija šiuo atveju sumažėja dėl alveolių sienelių destruktijos ir kapiliarinio tinklo redukcijos). Esant sunkiai obstrukcijai dujų difuzija mažėja ir dėl plaučių ventiliacijos ir perfuzijos netolygumo. Ypač svarbu atlikti šį tyrimą prieš ir po reabilitacijos, bei atrenkant pacientus plaučių turį mažinančioms operacijoms. Šis tyrimas reikšmingas ir vertinant LOPL sergančiųjų pooperacinių pulmoninių komplikacijų, riziką.

8. Krūtinės ląstos kompiuterinės tomografijos svarba LOPL diagnostikai ir gydymui

Kvėpavimo takų obstrukcija sergant LOPL randasi tiek dėl plaučių parenchimos destruktijos (emfizemos), tiek dėl kvėpavimo takų pažeidimo bei, galimai, kitų veiksnių. Kiekvienam ligoniui būdingas savitas plaučių ir kvėpavimo takų morfologinių pažeidimų derinys (fenotipas). Svarbu ir naudinga nustatyti LOPL fenotipą, nes tai padeda anksti diagnozuoti šią ligą ir individualizuoti gydymą. Krūtinės ląstos kompiuterinė tomografija yra vienas svarbiausių tyrimų, naudojamų plaučių ligų diagnostikai. Ji padeda įvertinti plaučių audinio ir kvėpavimo takų struktūrą (nustatyti emfizemą, fibrozę, pūsles, bronhektazes). Radiologiškai emfizema gali būti skirstoma į centrilobulinę, panlobulinę, buliozinę ir paraseptalinę [171]. Emfizemos pažeisto plaučių audinio plotą padeda įvertinti kiekybinė kompiuterinė tomografija (angl. *quantitative computed tomography*) [180, 183, 186]. Šį metodą pirmą kartą 1984 metais su bendraautorais aprašė Hayhurst. Šie tyrėjai nustatė, kad pacientų, kuriems emfizema buvo patvirtinta histologiškai, Haunsfildo vienetų (HU) dažnio pasiskirstymo kreivės gerokai skyrėsi nuo tų pacientų, kuriems emfizemos nebuvo [206]. Po ketverių metų buvo įdiegtas radiologinis emfizemos

kiekybinio įvertinimo metodas, pavadintas „tankio kauke“ (angl. „density mask“), kuris nustatė fiksuotą tūrinio vaizdo elementų slenkstį [207]. Emfizemos sunkumas dažniausiai vertinamas pagal žemiausio tankio ploto (t.y. – 950 HU) procentinę išraišką, palyginus su visu plaučių plotu [180]. Nors smulkiųjų kvėpavimo takų (< 2 mm skersmens bronchiolių) naudojant krūtinės ląstos KT tiesiogiai vizualizuoti negalima, tačiau netiesiogiai jų būklę galima įvertinti pagal oro spąstų fenomeno buvimą skenuojant plaučius iškvėpimo fazės metu [185]. Kiekybiškai įvertinti oro spąstų buvimą ligoniams sergantiems LOPL yra gana sudėtinga, nes oras, likęs plaučiuose dėl oro spąstų, turėtų būti atskirtas nuo oro, likusio emfizeminėse ertmėse. Be to, oro spąstų fenomenas yra nespecifinis, kadangi jis nustatomas ir kai kuriems rūkantiems asmenims, kuriems nėra bronchų obstrukcijos, o kartais, net sveikiems asmenims [208]. Oro spąstai yra *in vivo* fenomenas, todėl jo negalima patikrinti atliekant morfologinius tyrimus.

Tobulėjant kompiuterinės tomografijos technologijoms, radiologiškai tapo įmanoma įvertinti nemažai stambiųjų bronchų parametrų, tokių kaip sienelės storis, spindžio plotas, broncho perimetras ir kt. [184, 209].

Taigi, kompiuterinė plaučių tomografija yra vertingas tyrimo metodas, padedantis įvertinti struktūrinius LOPL komponentus – emfizemą, stambiuosius bei smulkiuosius kvėpavimo takus. Jis padeda nustatyti konkretaus ligonio LOPL fenotipą, yra svarbus ankstyvai LOPL diagnostikai ir tampa vis svarbesnis moksliniams LOPL tyrimams.

III. TYRIMO MEDŽIAGA IR METODAI

3.1 Tiriamieji asmenys

Vilniaus regioninis biomedicininis tyrimų etikos komitetas 2009-02-10 išdavė leidimą (Nr. 1/013) atlikti šį perspektyvinį tyrimą (priedas 10.1).

Tiriamoji medžiaga rinkta nuo 2009 metų vasario iki 2012 metų balandžio mėnesio VšĮ Vilniaus universiteto ligoninės Santariškių klinikų Pulmonologijos ir alergologijos centre. Informavimo forma ir informuoto asmens sutikimo forma pateiktos 10.2 ir 10.3 prieduose. Į tyrimą įtraukti 99 asmenys: iš jų 73 sergantys visų stadijų LOPL (1 lentelė.) ir 26 sveiki (kontrolinė grupė).

1 lentelė. Spirometrinė LOPL sunkumo klasifikacija (pagal [1, 73]).

Stadija	Spirometrijos rodiklių reikšmė
I. Lengva LOPL	• $FEV_1/FVC < 0,7$ • $FEV_1 \geq 80$ proc. b.d.
II. Vidutinio sunkumo LOPL	• $FEV_1/FVC < 0,7$ • $50 \text{ proc.} \leq FEV_1 < 80 \text{ proc. b.d.}$
III. Sunki LOPL	• $FEV_1/FVC < 0,7$ • $30 \text{ proc.} \leq FEV_1 < 50 \text{ proc. b.d.}$
IV. Labai sunki LOPL	• $FEV_1/FVC < 0,7$ • $FEV_1 < 30 \text{ proc. b.d.}$ arba $FEV_1 < 50 \text{ proc. b.d.}$, kai yra kvėpavimo nepakankamumo požymių

Pastaba. b.d. – būtinąjo dydžio. Kvėpavimo nepakankamumas diagnozuojamas, kai arterinio kraujo $PaO_2 < 60 \text{ mm Hg}$ (8,0 kPa) kartu su arterinio kraujo $PaCO_2 > 50 \text{ mm Hg}$ (6,7 kPa) ar be jo.

Įtraukimo į tyrimą kriterijai:

- Vyresni kaip 18 m. vyrai ir moterys, sergantys lėtine obstrukcine plaučių liga (visos stadijos) bei sąlyginai sveiki asmenys (kontrolinė grupė).
- Asmenys suprantantys tyrimo esmę ir pasirašę informuoto asmens sutikimo formą.

Neįtraukimo į tyrimą kriterijai:

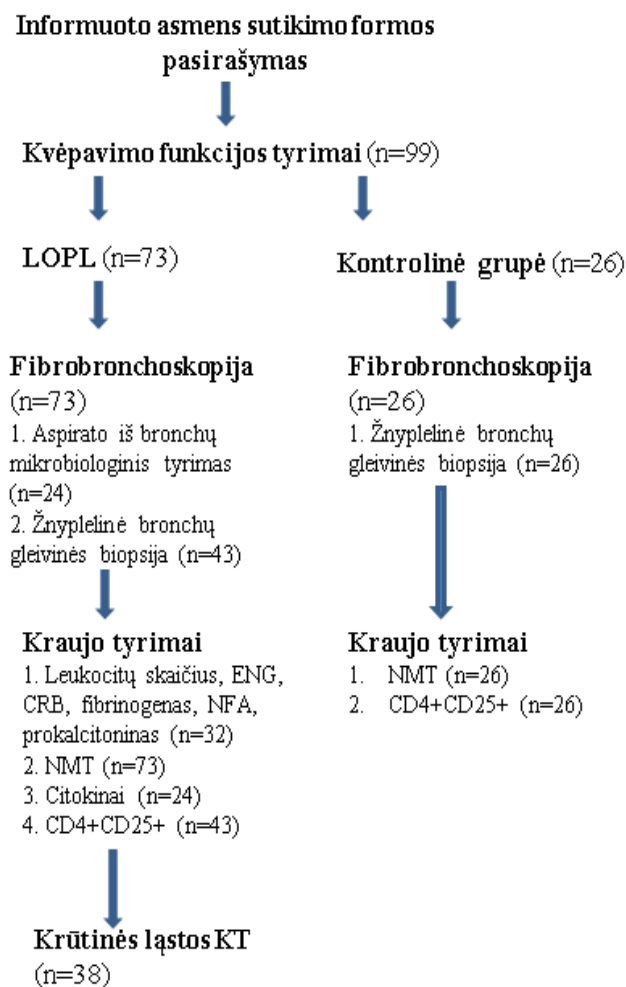
- Gretutinė liga, galinti iškreipti tyrimo rezultatus – sisteminė jungiamojo audinio liga, sisteminis vaskulitas, kitos žinomos autoimuninės ligos, bet kurio organo buvęs ar esamas navikas, bet kurios gretutinės ligos

(pvz., kepenų, inkstų), galinčios turėti įtakos tyrimo rezultatams, paūmėjimas.

- Bronchinė astma.
- Alerginis rinitas
- Pneumonija
- Alkoholizmas, narkomanija.
- Pažeidžiami asmenys (pavaldūs, protinę negalią turintys asmenys).
- Sisteminių gliukokortikosteroidų, citostatikų vartojimas.

3.2 Tyrimo eiga

Tiriamieji tirti pakopine metodika (5 pav.):



5 pav. Tyrimo eiga.

1. Visiems tiriamiesiems (n=99) išsamiai ištirta kvėpavimo funkcija (atlikta spirometrija su bronchus plečiančiu mėginiu, pletizmografija, dujų difuzijos tyrimas).
2. Visiems tiriamiesiems (n=99) atliktos bronchoskopijos: Iš jų – 24 sergantiems LOPL ligoniams paimta medžiaga iš bronchų mikrobiologiniam pasėliui. 69 asmenims (43 ligoniams ir 26 sveikiems kontrolinės grupės tiriamiesiems) bronchoskopijos metu paimtos bronchų gleivinės biopsijos. Vienam LOPL sergančiam ligoniui atlikus bronchoskopiją buvo rastas endobronchinis navikas ir patvirtinta plaučių vėžio diagnozė. Šis pacientas nukreiptas chirurginiam gydymui ir toliau mūsų tyrime nedalyvavo.
3. 32 ligoniams paimtas kraujas uždegimo aktyvumo rodikliams (leukocitų skaičiui, CRP, ENG, fibrinogenui, NFA ir procalcitoninui) nustatyti. Kraujo NMT rodiklis ištirtas visiems 73 LOPL grupės ir 26 sveikiems asmenims.
4. 43 ligoniams ir 26 sveikiems (kontrolinės grupės) asmenims paimtas kraujo mėginys CD4+CD25+ (Treg) ląstelėms nustatyti.
5. 24 sergantiems LOPL asmenims paimtas kraujas citokinų koncentracijai ištirti
6. 38 ligoniams atliktos krūtinės ląstos kompiuterinės tomografijos.

Kraujo bei aspirato iš bronchų tyrimai atlikti VšĮ VUL Santariškių klinikų Laboratorinės medicinos centro klinikinėje, biochemijos, mikrobiologijos ir imunologijos laboratorijose. Imunologinius tyrimus vertino medicinos biologė dr. Laimutė Jurgauskienė. Krūtinės ląstos kompiuterinės tomografijos atliktos VšĮ VUL Santariškių klinikų Radiologijos centre. Tyrimus vertino gydytojai radiologai dr. Mindaugas Matačiūnas ir gyd. Ingrida Zeleckienė. Bronchoskopijos ir kvėpavimo funkcijos tyrimai padaryti VšĮ VUL Santariškių klinikų Pulmonologijos ir alergologijos centro Intervencinės pulmonologijos ir kvėpavimo funkcinės diagnostikos skyriuje. Visus kvėpavimo funkcijos tyrimus ir bronchoskopijas bei biopsijas atliko disertantė. Histologinis ir imunohistocheminis biopatų tyrimas atliktas Valstybiniame patologijos centre. Tyrimus vertino doc. dr. Edvardas Žurauskas ir dr. Aida Laurinavičienė.

Statistinę duomenų analizę ir tyrimo planavimą padėjo atlikti Vilniaus Gedimino technikos universiteto Matematinės statistikos katedros vedėja doc. dr. Jolita Norkūnienė.

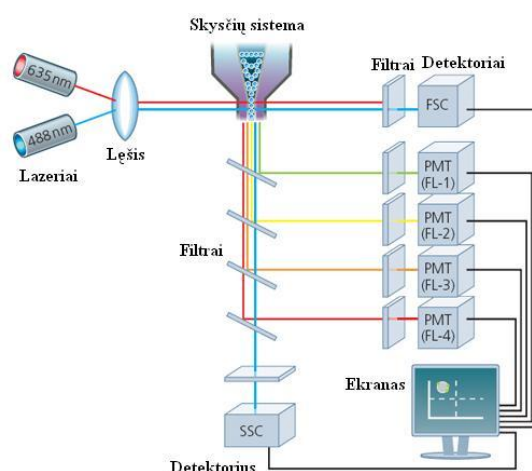
3.3 Kraujo uždegimo žymenų tyrimas

LOPL paūmėjimo ir remisijos laikotarpiu tirti šie kraujo rodikliai:

- leukocitų skaičius, eritrocitų nusėdimo greitis (ENG), hemoglobino (Hb) koncentracija – nustatyti hematologiniais analizatoriais *Sysmex XE-5000* ir *Coulter LH-780*;
- C reaktyviojo baltymo (CRB) koncentracija kraujo serume įvertinta naudojant automatinį analizatorių *Architect ci-8200*, reagentai *Abbott*, JAV;
- fibrinogeno koncentracija kraujo plazmoje nustatyta analizatoriumi *Stago Compact*, reagentai *Stago*, Vokietija;
- prokalcitonino koncentracija kraujo plazmoje išmatuota analizatoriumi *Advia Centaur CP*, reagentai *Siemens*, Vokietija;
- neutrofilų nitromėlio tetrazolio (NMT) mėginys: metodika skirta neutrofilų funkcijai įvertinti naudojant nitromėlio tetrazolį, kuris neutrofilų deguonies metabolizmo produktų paveiktas redukuojasi ir išskrinta citoplazmoje juodomis formazano nuosėdomis, vertinama šviesiniu mikroskopu;
- neutrofilų fagocitinis aktyvumas (NFA) – neutrofilai inkubuoti su polistireno latekso dalelėmis; fagocitozė vertinta šviesiniu mikroskopu.

3.4 Kraujo CD4+CD25+ limfocitų tyrimas

Tyrimui naudoti Becton Dickinson Simultest™ monokloniniai antikūnai (CD45/CD14, CD3/CD8, CD4/CD25, CD8/CD25, kt.) žymėti dviejų spalvų fluorochromais: fluoresceinoizotiocianatu (FITC) ir fikoeritrinu (PE). Simultest LeucoGATE (CD45/CD14) monokloninis antikūnas naudotas limfocitų analizės regionui nustatyti, o Simultest Control $\gamma 1/\gamma 2a$ (IgG1 FITC/IgG2a PE) monokloninis antikūnas – fluorescencijos ribai tarp teigiamai ir neigiamai nusidažiusių ląstelių bei galimam nespecifiniam švytėjimui atmesti mėginyje. Bandiniai analizuoti srautinės tėkmės citometru FACSCalibur (Becton Dickinson).



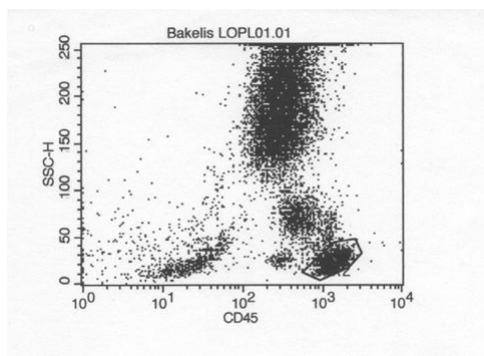
6 pav. Tėkmės citometro veikimo principas.

Tėkmės citometro veikimo principas pagrįstas šviesos sklaidos, šviesos žadinimo ir fluorochromo molekulių šviesos išskyrimo principu, kurių dėka gaunami įvairūs duomenys apie daleles ir ląsteles, kurių skersmuo svyruoja nuo 0,5 μm iki 40 μm . Paruoštas mėginys patenka į skysčių sistemą, kur ląstelės hidrodinamiškai spaudžiamos, fokusuojamos į vieną paskui kitą einančias ląsteles. Po to ląstelės yra apšviečiamos lazeriu. Ląstelių ir dalelių išsklaidytą ir išskirtą šviesą optiniai detektoriai paverčia elektros impulsais. Kolimuotos ląstelių šviesos (lygiagrečios šviesos srautas) ir šviesos šaltinio

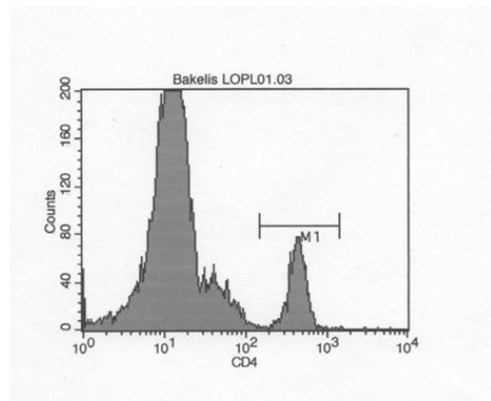
susikirtimo taške šviesa surenkama lęšiais ir siunčiama į įvairius detektorius per atitinkamus optinius filtrus (6 pav.). Šviesos elektriniai impulsai, užfiksuoti PMT, vėliau yra tvarkomi linijinių ir logaritminių stiprintuvų. Logaritminis stiprinimas numatytas ląstelės fluorescencijos matavimui. Tokiu būdu plečiama silpnų signalų skalė ir suspaudžiama „stiprių“ arba specifinių fluorescencijų skalė. Po to, kai skirtingi signalai arba impulsai yra sustiprinami, jie yra tvarkomi analoginių signalų konverteriu (ADC). Tokiu būdu duomenys gali būti pateikiami grafiškai. Tėkmės citometrijos duomenų rezultatai yra saugomi kompiuterinėse rinkmenose taikant FCS 2.0 arba 3.0 standartus.

2 lentelė. Kraujo mėginių paruošimo tēmės citometrijai protokolas.

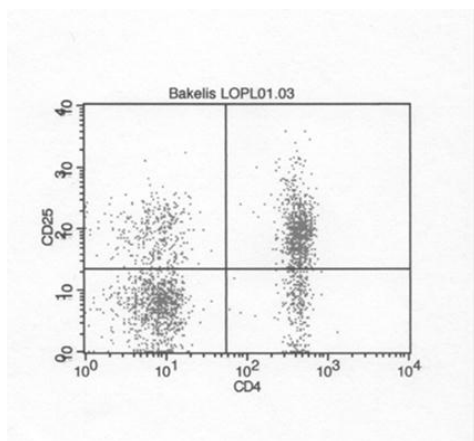
Eil. Nr.	Etapo aprašymas
1.	Pažymime reikiamą skaičių vienkartinį polipropileno 12 x 75 mm Falcon® mėgintuvėlių užrašydami tiriamojo kodą bei pažymėdami monokloninį antikūną, kuris bus pipetuojamas į atitinkamą mėgintuvėlį.
2.	Į pažymėtus mėgintuvėlius keičiant antgalius pipetuojama po 20 gl atitinkamo monokloninio antikūno.
3.	Pipetuojama po 100 gl gerai sumaišyto nesukrešėjusio kraujo. Kraujas pipetuojamas į mėgintuvėlio dugną, jo negali likti ant mėgintuvėlio sienelių – jis nekontaktuos su reagentu ir iškreips tyrimo rezultatus. Monokloninis antikūnas ir kraujas sumaišomi pustykle 3 sek.
4.	Inkubuojama tamsoje, kambario temperatūroje 15 – 30 minučių. Saugoma nuo tiesioginės šviesos.
5.	Eritrocitams lizuoti pipete pilama po 2 ml kambario temperatūros darbinio lizuojančio tirpalo į kiekvieną mėgintuvėlį, sumaišoma purtykle.
6.	Inkubuojama tamsoje kambario temperatūroje 10– 12 minučių (ilgiau inkubuoti negalima!! Ilgiau inkubuojant gali būti pažeista leukocitų membrana).
7.	Po inkubacijos mėgintuvėlis centrifuguojamas $g = 300$ greičiu kambario temperatūroje 5 minutes.
8.	Supernatantas nupilamas arba nusiurbiamas paliekant apie 50 gl nuosėdų dugne. Nuosėdos sukratomos, kad būtų išvengta ląstelių sukibimo.
9.	Pipete užpilama po 2 ml PBS su 0,1% natrio azido, sumaišoma pustykle 3 sek. Centrifuguojama $g = 200$ greičiu kambario temperatūroje 5 minutes.
10.	Supernatantas nupilamas paliekant apie 50 gl nuosėdų dugne. Nuosėdos sukratomos, kad būtų išvengta ląstelių sukibimo.
11.	Pipete užpilama 500 gl 1% paraformadehido tirpalo. Sumaišoma purtykle 3 sek.
12.	Mėginys paruoštas vertinimui. Iki vertinimo uždengti mėgintuvėliai laikomi $2^{\circ} - 8^{\circ}\text{C}$ temperatūroje tamsoje. Fiksuotos ląstelės stabilios 24 valandas. Prieš vertinant mėginys sumaišomas pustykle.



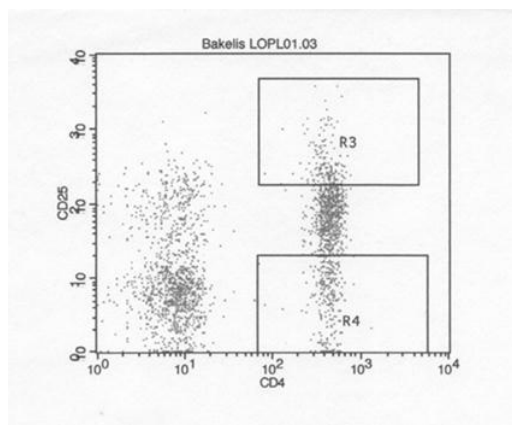
A



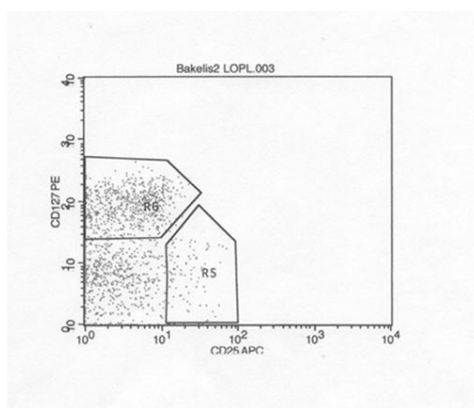
B



C



D

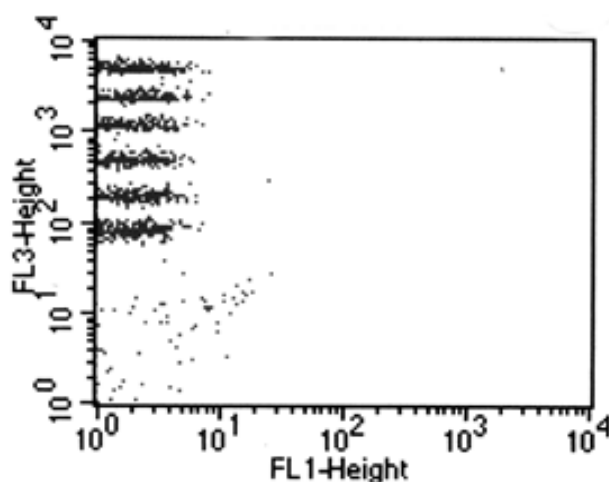


E

7 pav. Treg ląstelių atpažinimas. Kraujo ląstelių taškinėje histogramoje identifikuojamas limfocitų debesėlis R2 (A). Iš limfocitų debesėlio R2 atskiriami CD3+CD4+ (T helperiai) M1 (B). Iš M1 debesėlio atskiriami CD25 žymenį turintys limfocitai (C), o iš jų – CD127^{dim} žymenį turintieji limfocitai - CD4+CD25+^{bright} (D, E).

3.5 Kraujo citokinų tyrimas

Norėdami nustatyti trumpą skilimo pusperiodį turinčių medžiagų, Th1 ir Th2 ląstelių citokinų – interleukinų (IL) IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, navikų nekrozės faktoriaus alfa (TNF- α) ir interferono gama (IFN- γ) kiekį periferiniame kraujyje, vakuuminę mėgintuvėlį su krauju iš karto dėjome į talpą su ledu. Laboratorijoje centrifuguojant buvo atskiriamas serumas, kuris buvo užšaldomas -80°C temperatūroje ir laikomas iki tyrimo. Citokinų tyrimui naudotas CBA human Th1/Th2 Cytokine Kit II rinkinys, Becton Dickinson. Vienu metu kiekybiškai vertintos kelios to paties mėginio analitės. Kiekvieno citokino nustatymui naudotos skirtingo fluorescencijos intensyvumo aktyvuotos mikrosferos (~650 nm/FL3), dengtos specifiniais monokloniniais antikūnais. Prieš kiekvieną tyrimą buvo paruošti atitinkamų skiedimų (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128 1:256) standartai ir neigiama kontrolė (8 pav.).



8 pav. Citokinų izotipinės kontrolės taškinė diagrama.

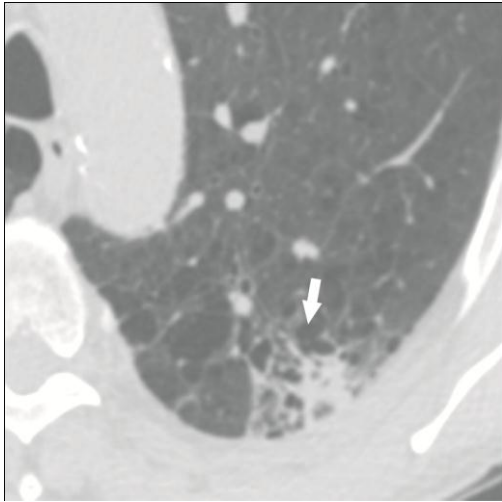
Į kiekvieno ligonio mėgintuvėlį su serumu dėta po 10 μ l tiriamų citokinų monokloninio antikūno, paskui dažyta detekcijos reagentu. Po inkubacijų plauta rinkinyje esančiu buferiniu tirpalu. Prieš kiekvieną citokinų analizę ruošti tėkmės citometro kalibravimo rutuliukai aparato kalibravimui. Mėginiai tą

pačią dieną analizuoti tėkmės citometru FACS Calibur (*Becton Dickinson*, JAV), naudojant FCAP ArrayTM programinę įrangą.

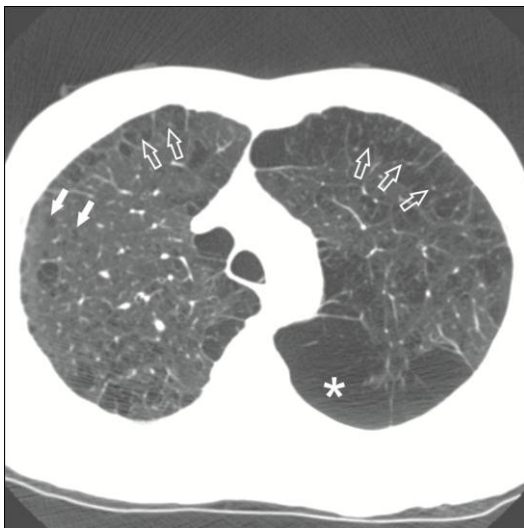
3.6 Krūtinės ląstos kompiuterinė tomografija

Krūtinės ląstos kompiuterinės tomografijos (KT) tyrimai atlikti 64 pjūvių kompiuteriniu tomografu GE VCT (GE Healthcare, Milwaukee, Wisconsin, JAV). Pacientui maksimaliai įkvėpus ir 10 sekundžių sulaikius kvėpavimą skenuota nuo raktikaulių iki diafragmos kaudokranialine kryptimi spiraliniais 1,25 mm pjūviais. Tyrimui naudotas mažų dozių KT protokolas (vamzdžio įtampa 120 kVp arba mažesnė, o vamzdžio srovės stiprumas < 80 mA). Įvertinti struktūriniai plaučių pokyčiai – emfizemos, pūslių, bronhektazių ir pneumofibrozės buvimas. Pokyčiai kiekybiškai įvertinti pagal pažeistų plaučių skilčių skaičių.

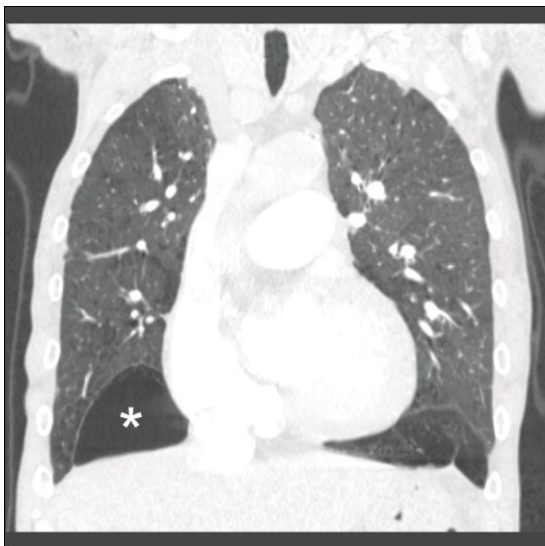
Plaučių audinio fibrozės kriterijumi pasirinktas korio vaizdas plaučių audinio rašte, kurį sudaro 3–10 mm diametro cistų grupės (9 pav.). Bronchų ir kraujagyslių rašto deformacija, tarpuskiltelinės linijos ir trakcinės (tempimo) bronhektazės taip pat vertintos kaip plaučių fibrozės požymiai. Emfizema nustatyta esant neryškių ribų sumažėjusio tankio plaučių audinio plotams (10 pav.). Pūsle įvertinta apvali 10 mm ar didesnė plonasienė oro tankio struktūra (11 pav.). Bronhektaze laikytas bronchas, didesnio skersmens už jį lydinčios arterijos spindį (pvz., „žiedo su akute“ požymis skersiniame pjūvyje) (12 pav.), nepakankamas broncho siaurėjimas periferijos kryptimi ir gerai matoma broncho struktūra mažesniu nei 10 mm atstumu nuo pleuros [171]. Kompiuterines tomogramas nepriklausomai vienas nuo kito vertino du radiologai, neturėdami kitų duomenų apie tiriamuosius. Tais atvejais, kai radiologų vertinimo rezultatai nesutapdavo (pasitaikė 11% atvejų), galutinai vertinta pagal mažesnę pažeidimo apimtį.



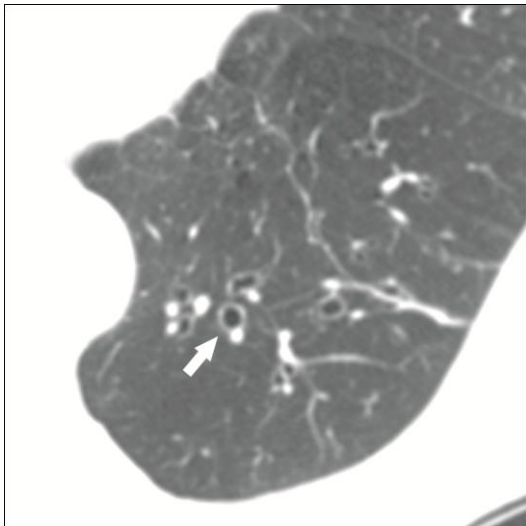
9 pav. Plaučių fibrozė. 3–10 mm diametro subpleurinės cistos, plaučių audinio juostelės ir netolygiai išsiplėtusių kvėpavimo takų aiškiomis ribomis grupelės (tinklelio, korio pobūdžio plaučių audinio raštas).



10 pav. Emfizema. Centrilobulinės (pažymėta pilnavidurėmis rodyklėmis) ir paraseptalinės (pažymėta tuščiavidurėmis rodyklėmis) emfizemos požymiai. Pūslė (pažymėta žvaigždute) kairio plaučio viršutinėje skiltyje



11 pav. Pūslė. Didesnė negu 10 mm plonasienė oro tankio struktūra (pažymėta žvaigždute).



12 pav. Bronhektazės. Bronchai yra didesnio diametro negu jį lydinčios arterijos spindis („žiedo su akute“ požymis).

3.7 Kvėpavimo funkcijų tyrimai

Visiems ligoniams atlikta spirometrija, išmatuotos plaučių talpos (viso kūno pletizmografijos metodu), ištirta dujų difuzijos geba (vieno įkvėpimo metodu). Kvėpavimo funkcijos tyrimai atlikti aparatu Vmax Encore (*Viasys® Healthcare*, JAV). Tyrimų duomenys vertinti pagal Europos ir Amerikos pulmonologų draugijų (ERS ir ATS) 2005 m. sutarimo kriterijus [74]. Obstrukcija nustatyta esant FEV_1/FVC santykiui žemesniam už apatinę normos ribą. Obstrukcijos sunkumas vertintas pagal FEV_1 rodiklio vertę. Plaučių išsipūtimas (hiperinfliacija) nustatytas esant padidėjusiai bendrajai plaučių talpai (TLC), oro spąstai – padidėjus liekamajam tūriui (RV). Dujų difuzijos sutrikimą atspindėjo mažesnis už apatinę normos ribą anglies monoksidą pernešančio faktoriaus (DL_{CO}) rodiklis.

3.8 Bronchoskopija

Bronchoskopijos atliktos Olympus ir Pentax (Japonija) firmų fibrobronchoskopais. Tyrimas darytas tiriamajam sėdint. Tiriamieji buvo premedikuoti 0,1 % 1,0 ml atropino sulfato į poodį. Nosis ir ryklė anestezuotos 10 % lidokaino purškiamu tirpalu į kiekvieną šnervę ir ryklę. Trachėja ir bronchai anestezuoti 2% 20 ml lidokaino tirpalu. Bronchoskopijos metu buvo išsiurbiamas bronchų sekretas mikrobiologiniam pasėliui ir žnyplėmis iš subsegmentinių dešiniojo plaučio apatinės skilties bronchų keturų paimta gleivinės biopsija (6 gabaliukai).

3.9 Bronchų gleivinės CD25+ ląstelių tyrimas

Tirti 10 procentų buferinio formalino tirpale fiksuoti, parafinu impregnuoti histologiniai audiniai. Histocheminei, imunohistocheminei (IHC) analizei atlikti atpjauti 3 mikronų storio pjūviai. Hematoksilinu ir eozinu (H/E) dažyti mikropreparatai skenuoti 20 x padidiniu Aperio *Scan Scope GL* skeneriu

(Aperio Technologies, Vista, CA, JAV). Skenuotame viso pjūvio audinio vaizde patologas pažymėjo tiriamas audinio vietas.

Darbe tirtų biologinių žymenų baltymų raiška parafininiuose pjūviuose analizuota IHC tyrimo metodu naudojant *Ventana BenchMark XT* dažymo automatą (*Ventana Medical Systems, Tucson, Arizona, JAV*). Parafininiai pjūviai po deparafinavimo ksilenu ir dehidratavimo etilo alkoholiu perkelti į *Ventanos* plovimo tirpalą. Antigenų epitopams atstatyti naudotas *Ventanos* ląstelių kondicionavimo tirpalas (pH 8,5) 100°C temperatūroje 36 min. Vėliau pjūviai 16 min inkubuoti monokloniniais antikūnais 37°C temperatūroje, naudojant *Ventana Ultraview DAB* detekcijos sistemą. IHC reakcijos pabaigoje pjūviai kontrastuoti *Mayer's* hematoksilinu, uždėti dengiamaisiais stikleliais. Teigiamai IHC testo kontrolei naudoti viso pjūvio krūties naviko mėginiai, neigiama kontrolė atlikta tuose pačiuose pjūviuose, praleidus IHC reakcijoje vykdomo pirminio antikūno uždėjimo etapą. Skaitmeniniai vaizdai skenuoti *Aperio ScanScope GL* objektinių stiklelių skeneriu (*Aperio Technologies, Vista, CA, JAV*) padidinus vaizdą 20 kartų.

3.10. Statistiniai metodai

Atlikdami statistinius skaičiavimus naudojome SPSS 17.0 statistinį paketą. Tiriamųjų dydžių normalumui patikrinti naudojome χ^2 kriterijų. Skirtumą tarp normaliai pasiskirsčiusių dydžių vertinome pagal Stjudento kriterijų, kitiems dydžiams taikėme neparametrinį Mann-Witney U testą. Ryšio tarp kintamųjų stiprumui įvertinti naudojome Pirsono (*Pearson*) koreliacijos koeficientą (r). Koreliacijos stiprumas vertintas pagal koreliacijos koeficiento reikšmių skalę (3 lentelė). Dvireikšmio kintamojo priklausomybei nuo kitų kintamųjų vertinimui taikėme logistinės regresijos modelį. Duomenis laikėme statistiškai patikimais, kai $p < 0,05$. Juos pateikėme vidurkio ir standartinio nuokrypio išraiška.

3 lentelė. Koreliacijos koeficiento reikšmių skalė.

Labai stipri	Stipri	Vidutinė	Silpna	Labai silpna	Nėra ryšio	Labai silpna	Silpna	Vidutinė	Stipri	Labai stipri
-1	Nuo -1 iki -0,7	Nuo -0,7 iki 0,5	Nuo -0,5 iki -0,2	Nuo -0,2 iki 0	0	Nuo 0 iki 0,2	Nuo 0,2 iki 0,5	Nuo 0,5 iki 0,7	Nuo 0,7 iki 1	+1

4. REZULTATAI

4.1 Kraujo citokinai

Citokinių koncentracija kraujyje ištirta 24 ligoniams (4 lent., 13 pav.). Daugumos citokinių koncentracijų skirtumo paūmėjimo ir remisijos fazių metu nebuvo (5 lent.). Nustatėme, kad LOPL paūmėjimo metu periferiniame kraujyje rasta statistiškai patikimai didesnė IL–10 koncentracija, palyginus su remisijoje esančiais pacientais.

Daugumai paūmėjimo grupės ligonių (71,4 %) aspirate iš bronchų išaugo patogeninės bakterijos (*Streptococcus pneumoniae* 35,3 %, *Moraxella catharhalis* 23,6 %, *Haemophilus influenzae* 17,6 %, *Klebsiella* 11,7 %, *Pseudomonas aeruginosa* 5,9 % ir kt.). Taigi, didžiajai daliai mūsų tirtų ligonių LOPL paūmėjimas buvo bakterinės kilmės. Remisijos grupėje teigiamas bakteriologinis pasėlis sudarė tik 20 %.

Pagal aspirato iš bronchų bakteriologinio pasėlio duomenis paūmėjimo ir remisijos grupes dar suskirsčius į bakterinio ir nebakterinio paūmėjimo ir remisijos pogrupius, nebakterinio paūmėjimo pogrupyje nustatyta statistiškai patikimai didesnė TNF– α koncentracija ($4,67 \pm 2,38$ pg/ml), palyginti su bakterinio paūmėjimo pogrupiu ($1,88 \pm 2,49$ pg/ml, $p = 0,03$).

Visus tiriamuosius, nepriklausomai nuo paūmėjimo ar remisijos fazės, suskirsčius į dvi grupes pagal bakterijų augimą aspirate iš bronchų (į tuos, kurių bronchų aspirate bakterijos neaptiktos ir tuos, kurių aspirate bakterijos

aptiktos), didesnę IL–10 koncentraciją nustatėme tos grupės ligoniams, kuriems buvo teigiamas bakteriologinis pasėlis ($11,66 \pm 6,27$ pg/ml, palyginus su $8,32 \pm 1,29$ pg/ml), tačiau šis skirtumas nebuvo statistiškai patikimas. Tačiau grupėje, kurios ligoniams bakterijų bronchų aspirate nebuvo aptikta, TNF– α koncentracija kraujyje buvo patikimai didesnė negu tiriamųjų, kurių bronchų aspirate bakterijų rasta ($5,18 \pm 2,58$ pg/ml, palyginus su $2,4 \pm 1,14$ pg/ml, $p < 0,01$).

Statistiškai patikimų reikšmingų koreliacijų tarp kraujo citokinų ir kitų kraujo uždegimo rodiklių nenustatėme.

4 lentelė. Tiriamųjų demografiniai duomenys

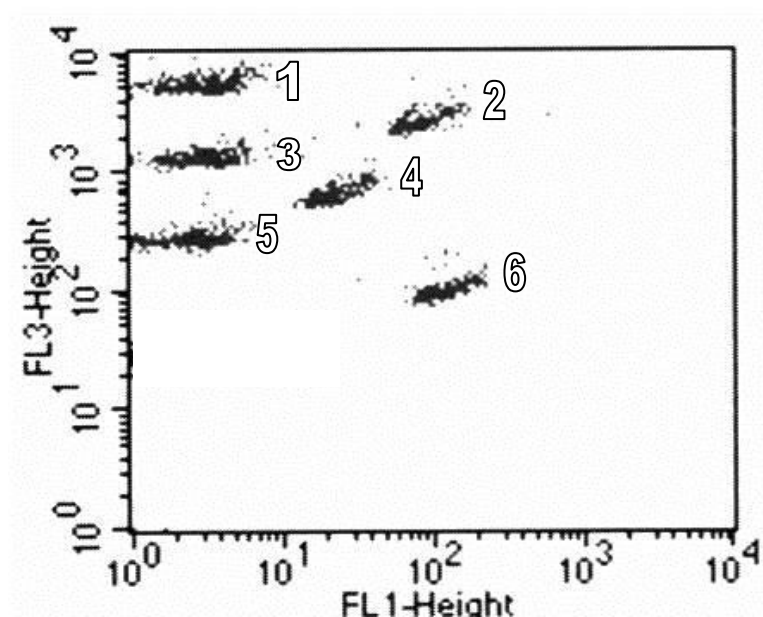
Rodiklis	Remisija (n=10)	Paūmėjimas (n=14)	p reikšmė
Lytis (v/m)	10/0	13/1	0,06
Amžius (metais)	61 ± 16	68 ± 6	0,13
Rūkymo stažas (pakm.)	16 ± 9 ,	35 ± 14	0,002
FEV ₁ (% bd)	47 ± 12	41 ± 12	0,009
Kraujo leukocitai ($\times 10^9$ l)	$7,6 \pm 0,9$	$13,2 \pm 2,3$	0,002
CRB (mg/dl)	7 ± 6	43 ± 22	0,007
Fibrinogenas (g/l)	$4 \pm 0,8$	$5 \pm 0,6$	0,006
Išskirtas infekcijos sukėlėjas	2	10	0,004

Pastaba: duomenys pateikti vidurkio ir standartinio nuokrypio išraiška, jei nenurodyta kitaip, v – vyrai, m – moterys, pakmetis – metų skaičius, surūkant 1 pakelį (20 cig.) per dieną, bd – būtinojo dydžio, FEV₁ – forsuoto iškvėpimo tūris per pirmąją sekundę, CRB – C reaktyvusis baltymas.

5 lentelė. Kraujo citokinų koncentracija LOPL remisijos ir paūmėjimo metu

Citokinai	Remisija (n=10)	Paūmėjimas (n=14)	p reikšmė
IL-2, pg/ml	12,5±3,9	9,1±5,3	0,101
IL-4, pg/ml	4,2±1,1	3,7±1,6	0,319
IL-6, pg/ml	6,6±1,8	8,2±5,9	0,48
IL-10, pg/ml	6,9±1,6	20,0±9,3	0,024
TNF- α , pg/ml	3,8±1,9	2,4±2,1	0,08
IFN- γ pg/ml	3,1±0,2	2,8±1,0	0,304

Pastaba: duomenys pateikti vidurkio ir standartinio nuokrypio išraiška.



13 pav. Citokinų debesėliai taškinėje diagramoje. 1 – IL-2, 2 – IL-4, 3 – IL-6, 4 – IL-10, 5 – TNF- α , 6 – IFN- γ .

4.2. Radiologinių ir funkcinų plaučių pokyčių sąsajos

Šiame tyrime dalyvavo 38 LOPL sergantys asmenys, kurie buvo suskirti į 2 grupes pagal ligos sunkumą (I grupę sudarė sunkia ir labai sunkia LOPL, o II grupę – vidutinio sunkumo ir lengva LOPL sergantieji ligoniai). Tiriamųjų demografiniai ir kvėpavimo funkcijos duomenys pateikti 6 ir 7 lentelėse.

6 lentelė. Tiriamųjų demografiniai rodikliai

Rodiklis	Visi tiriamieji	LOPL sunki/l.sunki	LOPL lengva/vidutinė
Tiriamųjų skaičius	38	18	20
Vyrai/moterys	34/4	15/3	19/1
Amžius, metais	66,9±11,5	65,4±12,0	68,4±11,3
Rūkymo stažas, pakmečiais	34,1±15,5	32,1±16,9	36,0±14,4
Ligos trukmė, metais	12,1±5,2	13,9±7,5	10,0±4,1

Pastaba. Vienas pakmetis – kai asmuo rūko po 20 cigarečių per parą ištisus metus. Duomenys pateikti vidurkio ir standartinio nuokrypio išraiška.

7 lentelė. Tiriamųjų kvėpavimo funkcijos rodikliai

Rodiklis	Visi (n=38)	LOPL sunki/l.sunki (n=18)	LOPL lengva/vidutinė (n=20)
FEV ₁ , % b.d.	50,4±13,9	39,3±7,9*	60,3±10,0*
FVC, % b.d.	90,2±21,6	82,1±22,2*	97,4±18,6*
FEV ₁ /FVC, %	44,2±9,7	39,1±8,6*	48,7±8,3*
TLC, % b.d.	118,7±24,2	123,2±29,3	114,8±18,9
VC, % b.d.	90,6±20,2	84,9±21,6	95,3±18,2
RV, % b.d.	174,3±61,1	193,9±77,2	157,5±37,6
DLco, % b.d.	65,2±21,4	52,8±19,9*	74,5±17,7*
pO ₂ (mm Hg)	57,6±11,6	55,7±14,6	60,7±6,4
pCO ₂ (mm Hg)	39,1±5,9	40,9±7,0	37,1±4,2
sO ₂ , %	89,5±7,0	87,4±9,2	92,1±2,3

Pastaba: * p<0,05 palyginus I ir II grupes, b.d. – būtinio dydžio, mm Hg – milimetrais gyvsidabrio stulpelio. Duomenys pateikti vidurkio ir standartinio nuokrypio išraiška.

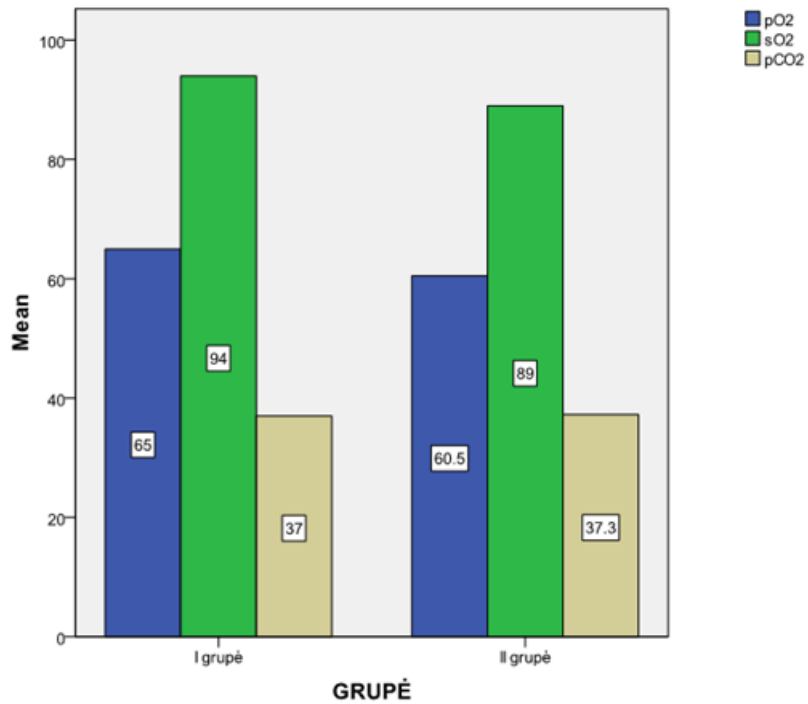
Statistiškai reikšmingo skirtumo pagal KT vaizduose rastus pokyčius tarp lengvesnės ir sunkesnės GOLD bronchų obstrukcijos sunkumo stadijos grupių ligonių nebuvo (8 lentelė).

8 lentelė. Tiriamųjų struktūriniai plaučių pokyčiai

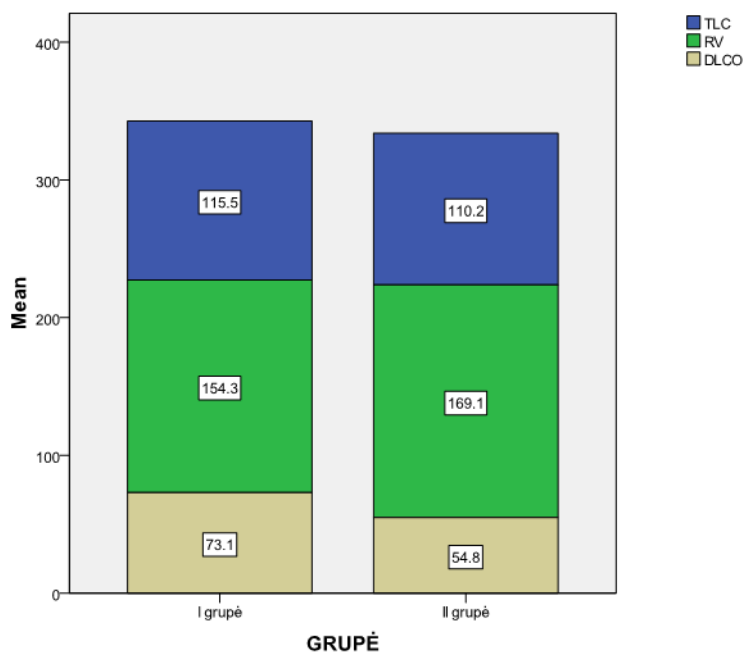
Rodiklis	Visi (n=38)	LOPL sunki/l.sunki (n=18)	LOPL lengva/vidut. (n=20)
Emfizema	4,2±1,5	3,9±1,7	4,6±1,2
Pūslės	0,9±1,3	0,7±1,4	1,1±1,2
Fibrozę	3,3±1,3	3,3±1,4	3,2±1,3
Bronhektazės	3,0±1,7	3,2±1,6	2,7±1,8

Pastaba: duomenys pateikti plaučių skilčių skaičiumi. Statistiškai reikšmingo skirtumo tarp grupių nebuvo

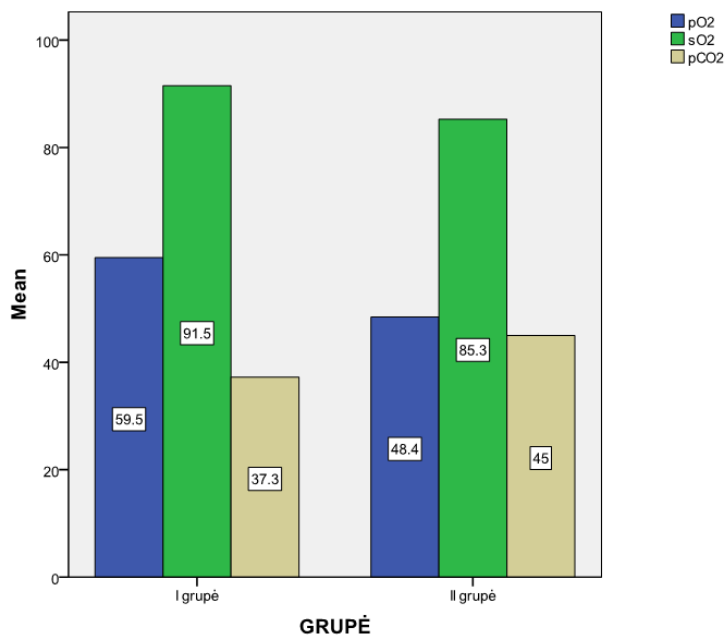
Taip pat nebuvo statistiškai reikšmingo plaučių talpų, kraujo dujų bei dujų difuzijos rodiklių skirtumo tarp grupių ligos remisijos metu (13, 14 pav.). Tačiau sunkesnės bronchų obstrukcijos sunkumo stadijos grupės ligonių, kuriems buvo LOPL paūmėjimas, TLC, RV, kapiliarinio kraujo pCO₂ rodikliai buvo gerokai didesni, o DLCO, pO₂, sO₂ – mažesni, palyginus su lengvesnės stadijos (I grupės) ligoniais ($p<0,05$) (15, 16, 17 pav.).



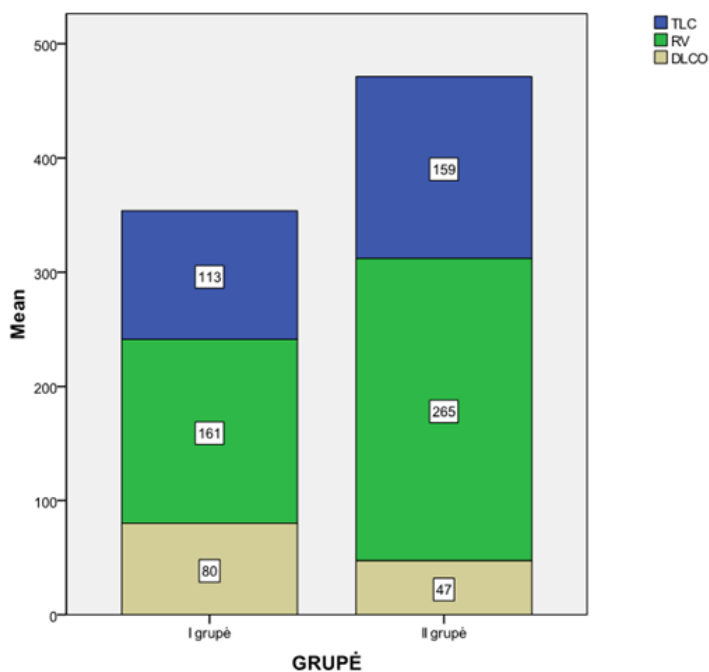
13 pav. Kraujo dujų rodikliai remisijos metu. Lengvesnės ir sunkesnės bronchų obstrukcijos sunkumo stadijos ligonių rodikliai reikšmingai nesiskyrė.



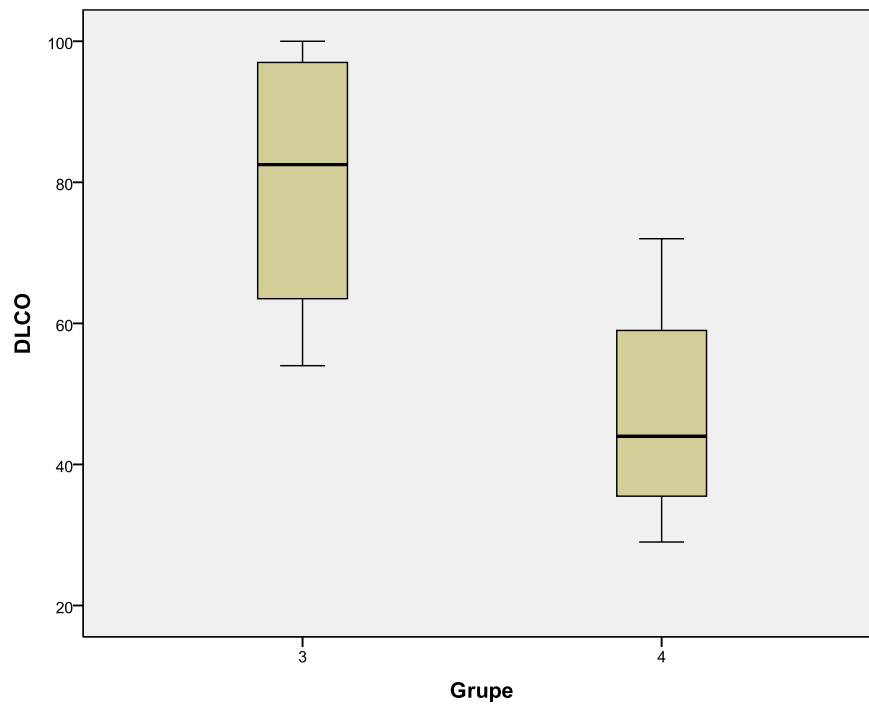
14 pav. Plaučių tūriai ir dujų difuzijos geba remisijos metu. Sunkesnė ir lengvesnės bronchų obstrukcijos sunkumo stadijos ligonių plaučių tūriai ir dujų difuzija per alveolių kapiliarinę membraną remisijos metu reikšmingai nesiskyrė.



15 pav. Kraujo dujų rodikliai paūmėjimo metu. Ligai paūmėjus sunkesnės bronchų obstrukcijos sunkumo stadijos ligonių kraujo oksigenacijos rodikliai buvo gerokai blogesni, o pCO₂ – didesnis negu lengvesnės stadijos ligonių.

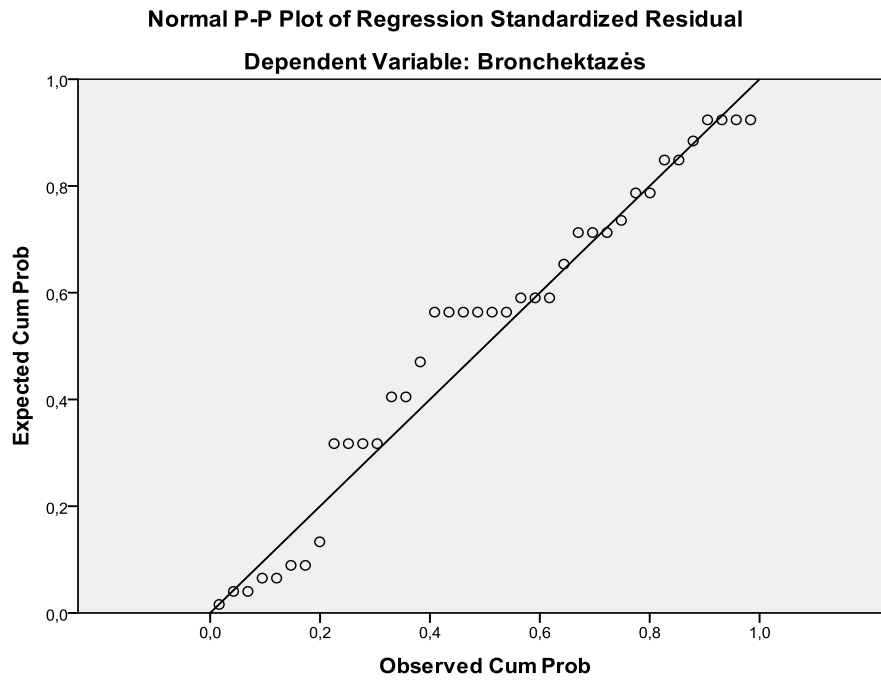


16 pav. Plaučių tūriai ir dujų difuzijos geba paūmėjimo metu. Ligai paūmėjus sunkesnės bronchų obstrukcijos sunkumo stadijos ligonių grupėje nustatytas gerokai didesnis liekamasis plaučių tūris, didesnis plaučių išsipūtimas (t.y. didesni oro spąstai) bei mažesnė dujų difuzijos geba negu lengvesnės bronchų obstrukcijos sunkumo stadijos ligonių grupėje.

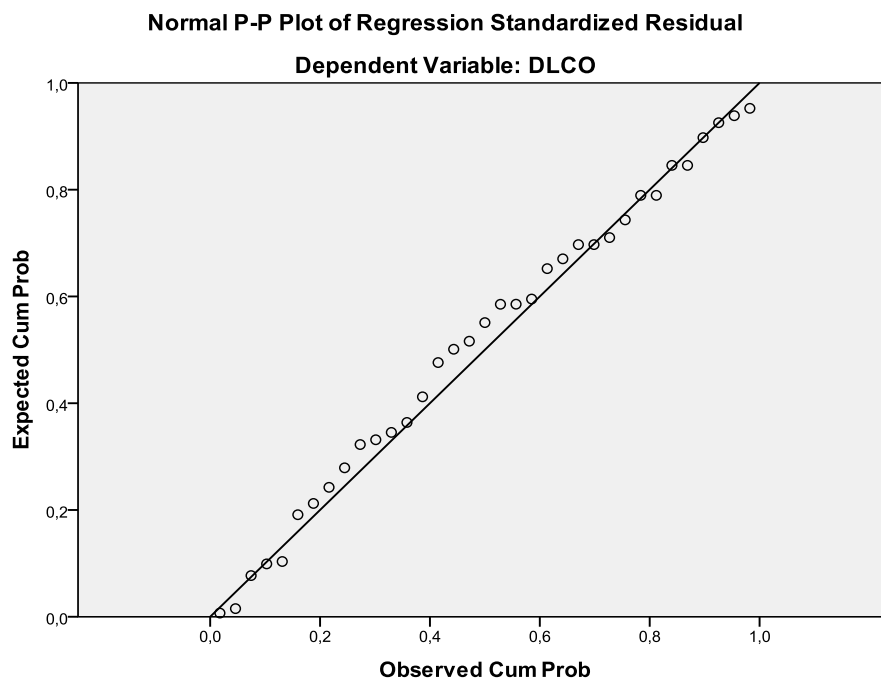


17 pav. Dujų difuzijos geba paūmėjimo metu. Ligai paūmėjus sunkesnės bronchų obstrukcijos sunkumo stadijos ligonių grupėje dujų difuzijos geba buvo gerokai mažesnė negu lengvesnės bronchų obstrukcijos sunkumo stadijos ligonių.

Nustatėme, kad bronhektazių ir emfizemos buvimas teigiamai koreliavo su paūmėjimų dažniu ($r=0,4$, $p=0,014$, 18 pav.), o pneumofibrozę – su bronhektazių buvimu ($r=0,4$, $p=0,014$). DL_{co} rodiklio vertė neigiamai koreliavo su plaučių fibrozės apimtimi (19 pav.) ir ligos paūmėjimų dažniu ($r = -0,4$, $p=0,02$). Be to, nustatėme neigiamą TLC ir RV rodiklių koreliaciją su pO_2 ir sO_2 ($r = -0,4$, $p = 0,009$) bei teigiamą – su pCO_2 ($r = 0,4$, $p = 0,027$) rodikliais.



18 pav. Tiesinė bronhektazių ir LOPL paūmėjimų dažnio priklausomybė.



19 pav. Tiesinė dujų difuzijos ir plaučių fibrozės priklausomybė.

4.3 Kraujo uždegimo žymenys LOPL remisijos ir paūmėjimo metu

I šį tyrimą iš viso buvo įtraukti 73 ligoniai (9 lent.). Daugumai paūmėjimo grupės ligonių (71,4 %) bronchų aspirate išaugo patogeninės bakterijos: *Streptococcus pneumoniae* 35,3 %, *Moraxella catharhalis* 23,6 %, *Haemophilus influenzae* 17,6 %, *Klebsiella* 11,7 %, *Staphylococcus aureus* ir *Pseudomonas aeruginosa* po 5 % (pastaba: 20% tiriamųjų buvo išskirtas daugiau negu vienas infekcijos sukėlėjas). Taigi, didžiajai daliai mūsų tiriamųjų LOPL paūmėjimas buvo bakterinės kilmės. Tačiau 20 % remisijos grupės pacientų taip pat išaugo bakterijos. Nustatėme, kad CRB, fibrinogeno koncentracija, leukocitų skaičius ir ENG sergančiųjų LOPL kraujyje reikšmingai skyrėsi ligos paūmėjimo ir remisijos metu (10 lent.).

9 lentelė. Tiriamųjų demografiniai duomenys

Rodiklis	Remisija (n=55)	Paūmėjimas (n=18)	p reikšmė
Lytis (v/m)	52/3	16/2	0,37
Amžius (metais)	62,9±13,6	67,4±12,5	0,22
Rūkymo stažas (pakmečiais)	30,9±16,4	33,05±14,7	0,62
FEV1 (% bd)	52,9±16,4	44,7±16,7	0,08

Pastaba: duomenys pateikti vidurkio ir standartinio nuokrypio išraiška, jei nenurodyta kitaip, v – vyrai, m – moterys, pakmetis – metų skaičius, surūkant 1 pakelį (20 cig.) per dieną, bd – būtinąjo dydžio, FEV₁ – forsuoto iškvėpimo tūris per pirmąją sekundę.

Procalcitonino koncentracijos padidėjimo kraujyje LOPL paūmėjimo metu nenustatėme. Nei neutrofilų NMT mėginys, nei NFA rodiklis reikšmingai nepadidėjo LOPL paūmėjimo metu, tačiau viršijo normos ribas (neutrofilų NMT mėginio norminė vertė 15–25%, o NFA 20–25%). NBT ir NFA reikšmių skirtumo tarp sergančiųjų LOPL ir sveikų asmenų taip pat nebuvo, nors šie abu žymenys gerai koreliavo tarpusavyje. Nustatyta tiesioginė CRB rodiklio koreliacija su kitu ūminės fazės baltymu fibrinogenu ($r = 0,8$, $p < 0,01$), ENG ($r = 0,6$, $p < 0,01$), leukocitų skaičiumi ($r = 0,7$, $p < 0,01$) ir bakterijų buvimu bronchų aspirate ($r = 0,6$, $p < 0,01$), kaip ir tikėtasi – tiesioginė fibrinogeno

koreliacija su ENG ($r = 0,5$, $p < 0,05$), leukocitų skaičiumi ($r = 0,4$, $p < 0,05$) ir bakterijų buvimu bronchų aspirate ($r = 0,4$, $p < 0,05$).

10 lentelė. Kraujo uždegimo žymenys LOPL remisijos ir paūmėjimo metu

Rodiklis	Remisija	Paūmėjimas	p reikšmė
CRB (mg/l) (n = 32)	1,95±1,4	36,0±42,5	0,01
Fibrinogenas (g/l) (n = 32)	3,5±0,45	4,8±1,35	0,005
Leukocitų skaičius ($10^9/l$) (n = 32)	7,0±1,65	11,2±3,9	0,002
ENG (mm/h) (n = 32)	20,6±10,8	48,4±32,9	0,04
NMT (%) (n = 73)	35,7±17,5	36,2±17,7	0,92
NFA (%) (n = 32)	34,9±19,6	25,2±23,9	0,25

Pastaba: duomenys pateikti vidurkio ir standartinio nuokrypio išraiška. CRB – C reaktyvusis baltymas, ENG – eritrocitų nusėdimo greitis, NMT – neutrofilų nitromėlio tetrazolio mėginys, NFA – neutrofilų fagocitinis aktyvumas

4.4. Kraujo T reguliaciniai limfocitai (CD4+CD25+)

69 asmenims ištirtas kraujo CD4+CD25+ ląstelių skaičius. Iš jų – 43 sergantiems LOPL ir 26 LOPL nesergantiems asmenims. Sergantieji LOPL pagal ligos sunkumą buvo suskirstyti į 2 grupes – lengvos ir vidutinio sunkumo LOPL ir sunkios bei labai sunkios LOPL. Kontrolinė grupė buvo sudaryta iš rūkančių ir nerūkančių asmenų. Tyrimo rezultatai pateikti 11–13 lentelėse.

11 lentelė. Visų tiriamųjų grupių CD4+CD25+ ir T reg ląstelių skaičius

Tiriamųjų grupė	CD4+CD25+*	CD4+CD25+ ^{bright} (Treg)
LOPL (GOLD I–II) n=22	575±330	59±32
LOPL (GOLD III–IV) n=21	376±235	47±26
Kontrolė (rūkantys) n=14	610±217	75±27
Kontrolė (nerūkantys) n=12	392±157	59±29

Pastaba: ląstelių kiekis nurodytas absoliučiais skaičiais ml^{-3} . Duomenys pateikti vidurkio ir standartinio nuokrypio išraiška.

Palyginus LOPL ir kontrolinę grupes bendrai statistiškai reikšmingo nei bendro CD4+CD25+ ląstelių nei CD4+CD25+^{bright}(Treg) skirtumo tarp

grupių nenustatyta. Tačiau sergančiųjų sunkia ir labai sunkia LOPL grupėje aptiktas reikšmingai mažesnis šių ląstelių skaičius, palyginti su rūkančiais, tačiau nesergančiais LOPL asmenimis (12 lentelė).

Statistiškai patikimas skirtumas nustatytas ir tarp rūkančių bei nerūkančių kontrolinės grupės asmenų: rūkančiųjų kraujyje nustatyta gerokai daugiau CD4+CD25+ limfocitų, negu nerūkančiųjų (13 lentelė).

12 lentelė. Kraujo CD4+CD25+ ir CD4+CD25+^{bright} ląstelių skaičiaus palyginimas sunkios ir labai sunkios LOPL bei kontrolinėje rūkančių asmenų grupėse

Ląstelių tipas	LOPL (GOLD III-IV) (n=21)	Kontrolė (rūkantys) (n=14)	p reikšmė
CD4+CD25+	376±235	610±217	0,01
CD4+CD25+ ^{bright}	47±26	75±27	0,03

Pastaba: Ląstelių kiekis pateiktas absoliučiais skaičiais ml³. Duomenys pateikti vidurkio ir standartinio nuokrypio išraiška.

13 lentelė. Abiejų kontrolinių grupių kraujo CD4+CD25+ ir CD4+CD25+^{bright} ląstelių skaičiaus palyginimas

Ląstelių tipas	Kontrolė (nerūkantys) (n=12)	Kontrolė (rūkantys) (n=14)	p reikšmė
CD4+CD25+	392±157	610±217	0,02
CD4+CD25+ ^{bright}	42±19	59±29	0,007

Pastaba: Ląstelių kiekis pateiktas absoliučiais skaičiais ml³. Duomenys pateikti vidurkio ir standartinio nuokrypio išraiška.

Reikšmingų koreliacijų tarp kvėpavimo funkcijos rodiklių ir kraujo CD4+CD25+ ląstelių nenustatyta.

4.5 Bronchų gleivinės CD25+ limfocitai

Bronchų gleivinės biopsijos tirtos tiems patiems 69 tiriamiesiems, kuriems buvo ištirtas kraujo CD4+CD25+ ląstelių kiekis. Palygintos tos pačios keturios tiriamųjų grupės: lengva ir vidutinio sunkumo LOPL, sunki ir labai sunki LOPL, rūkantys bei nerūkantys sveiki asmenys (14 lentelė). Rastas patikimas skirtumas tarp LOPL ir kontrolinės grupės tiriamųjų – LOPL sergančių tiriamųjų grupėje CD25+ ląstelių buvo gerokai mažiau (15 lentelė).

14 lentelė. Bronchų gleivinės biopsijos CD25+ ląstelių tyrimo duomenys

Tiriamųjų grupė	CD25+
LOPL (GOLD I-II) n=22	112±53
LOPL (GOLD III-IV) n=21	88±39
Kontrolė (rūkantys) n=14	130±62
Kontrolė (nerūkantys) n=12	132±57

Pastaba: CD25+ ląstelių kiekis nurodytas absoliučiais skaičiais mm². Duomenys pateikti vidurkio ir standartinio nuokrypio išraiška. Statistiškai patikimo skirtumo tarp abiejų LOPL ir abiejų kontrolinių grupių tiriamųjų nebuvo.

15 lentelė. CD25+ ląstelių skaičius LOPL ir kontrolinėje grupėje

Ląstelių tipas	LOPL (n=43)	Kontrolė (n=26)	p reikšmė
CD25+	100,9±50,4	131,4±64,1	0,04

Pastaba: ląstelių kiekis nurodytas absoliučiais skaičiais mm². Duomenys pateikiami vidurkio ir standartinio nuokrypio išraiška.

5. REZULTATŲ APTARIMAS

LOPL labiausiai pažeidžia smulkiuosius kvėpavimo takus, todėl pirminė mūsų idėja buvo kartu su kitais tyrimais ištirti citokinus bronchoalveoliniame lavaže (BAL). Tačiau, pradėjus tyrimą ir bandant paimti BAL skysčio mėginius, praktiškai įsitikinome, kad dėl toli pažengusių struktūrinių plaučių pokyčių ir emfizemos, BAL skysčio grįžtamumas sergantiesiems LOPL yra labai menkas ir nepakankamas kokybiškam imunologiniam ištyrimui. Manome, kad taip buvo dėl to, kad daugumos mūsų tiriamųjų liga buvo sunkios stadijos. Nors paskelbta tyrimų, kurių metu tirtas LOPL sergančių ligonių BAL skystis, tačiau įsigilinus į tyrimų metodiką paaiškėjo, kad siekdami gauti pakankamą BAL skysčio kiekį, tyrėjai dažnai modifikuoja metodiką, instiliuodami į plaučius kelis kartus didesnę fiziologinio tirpalo kiekį negu įprastai, o tai žalinga pacientams, nes padidėja pneumonijų rizika, tyrimas sukelia didesnę diskomfortą pacientui. Kai kurie tyrėjai atvirai pripažįsta, jog BAL skysčio paėmimas iš LOPL sergančių pacientų yra problematiškas. Pavyzdžiui, Lapperre su bendradarbiais, tyrusi 51 sergančiojo LOPL bronchų biopsijas ir BAL skystį, savo publikacijoje nurodo, kad BAL tyrimus nutraukė ištyrusi tik pusę visų pacientų. Tai buvo padaryta dėl etinių sumetimų, kadangi keturiems pacientams įvyko sunkių komplikacijų (karščiavimas, pneumonija, pleurinis skausmas, miokardo išemija) [201]. Atsižvelgdami į pagrindinį medicinos principą – nepakenkti ligoniui ir turėdami omenyje tai, kad šis metodas nebus pritaikytas klinikinėje praktikoje, šios tyrimo dalies nebetęsėme.

Mūsų tyrimas parodė, kad citokinų kiekis kraujyje priklauso nuo LOPL klinikinės fazės. Ištyrę ligonių, sergančių LOPL, kraujo citokinus ligos remisijos ir paūmėjimo metu, nustatėme patikimai didesnę IL–10 koncentraciją ligai paūmėjus. Mūsų tyrimo rezultatai taip pat parodė kraujo IL–10 didėjimo tendenciją dėl infekcinės LOPL paūmėjimo priežasties. Šie radiniai atitinka teorinius duomenis, nes IL–10 laikomas reguliuojamąjį poveikį uždegimui turinčiu ir uždegimą slopinančiu citokinu [139, 140]. Nustatėme, kad

paūmėjimo metu, kuomet tiek kvėpavimo takuose, tiek ir kraujyje suaktyvėja uždegimas, daugiau išskiriama ir uždegimą slopinančio IL–10, kuris sumažina žalingą įvairių uždegimo medžiagų poveikį kvėpavimo takams ir visam organizmui.

Kiti autoriai, tyrę citokinus (IL–1, IL–8, IL–10 ir TNF– α) sergančiųjų LOPL kraujyje ir palyginę su sveikais asmenimis nustatė, kad ligonių kraujyje visų citokinių yra daugiau [144]. Tačiau sergančiųjų LOPL skrepliuose, palyginus su sveikaisiais, IL–10 buvo nustatyta mažiau [145]. Vadinas, viena iš persistuojančio kvėpavimo takų uždegimo priežasčių gali būti slopinančių uždegimą mediatorių, tokių kaip IL–10, stoka. Lietuvių autoriai tyrinėjo IL–10 kiekį sergantiems alerginėmis ligomis. Pumputienė su autorių kolektyvu ištyrusi grupę vaikų, sergančių alerginiu rinitu, nenustatė statistiškai patikimo IL–10 koncentracijos skirtumo paūmėjimo fazėje, palyginti su remisija [172]. Skirtingai negu kiti tyrėjai, mėginome aptikti ryšį tarp ligos paūmėjimo, bakterinės kvėpavimo takų kolonizacijos ir kraujo citokinių koncentracijos, todėl palyginome LOPL sergančius ligonius paūmėjimo ir remisijos fazių metu. Tiriamųjų grupės skyrėsi pagal keletą rodiklių: rūkymo stažas buvo mažesnis remisijos grupėje, o didesnis leukocitų skaičius kraujyje bei didesnė CRB ir fibrinogeno koncentracija buvo paūmėjimo grupėje. Paūmėjimo grupėje žymiai dažniau buvo rasta patogeninių bakterijų bronchų aspirate.

Nustatę, kad LOPL paūmėjus IL–10 yra daugiau, iškėlėme prielaidą, kad šio citokino koncentracija didėja dėl bakterinės paūmėjimo kilmės, t.y. dėl bakterijų buvimo bronchuose. Pagal aspirato iš bronchų bakteriologinio pasėlio duomenis paūmėjimo grupę dar suskirsčius į bakterinio ir nebakterinio paūmėjimo pogrupius, bakterinio paūmėjimo grupėje aptikome didesnę IL–10 koncentraciją ir mažesnę TNF– α koncentraciją kraujyje negu neinfekcinės kilmės paūmėjimo grupėje. Tai siejasi su kitu mūsų radiniu, kad, nepriklausomai nuo LOPL klinikinės fazės, asmenims, kurių kvėpavimo takuose buvo aptikta bakterijų, TNF– α kiekis kraujyje buvo mažesnis, negu ligonių, kurių kvėpavimo takuose bakterijų nebuvo.

Ieškodami ryšio tarp IL–10 koncentracijos padidėjimo ir bakterinės kvėpavimo takų kolonizacijos, visus tiriamuosius suskirstėme į dvi grupes pagal bakterijų buvimą aspirate iš bronchų, nepriklausomai nuo paūmėjimo ar remisijos fazės. IL–10 koncentracija buvo didesnė teigiamo bakteriologinio pasėlio grupėje, nors šis skirtumas statistiškai nebuvo patikimas. Taigi, mūsų spėjimas iš dalies pasitvirtino. Tačiau vis dar lieka neatsakytų klausimų dėl kraujo citokinų sąsajų su kvėpavimo takų bakterijomis. Gera žinoma, kad net ligos remisijos metu, nemažai daliai LOPL sergančių ligonių kvėpavimo takuose nuolat ar epizodiškai aptinkama bakterijų [173]. Todėl būtina tęsti citokinų tyrinėjimus apimant gerokai didesnį pacientų skaičių, nes yra tikslinga ištirti kraujo citokinų kiekį LOPL remisijos metu asmenims, kurių bronchuose aptinkama bakterijų ir palyginti su asmenimis, kurių bronchuose bakterijų nėra.

Mūsų tyrimas patvirtino eksperimentinių tyrimų duomenis ir mokslines prielaidas, kad IL–10 mažina TNF– α gamybą. Lėtinės obstrukcinės plaučių ligos paūmėjimo grupėje TNF– α kiekis kraujyje buvo mažesnis negu remisijos grupėje. Suskirsčius ligonius į grupes pagal bakterijų buvimą ir nebuvimą bronchuose, gauta statistiškai patikimai mažesnė TNF– α koncentracija teigiamo bakteriologinio pasėlio grupėje, t.y. toje grupėje, kurioje IL–10 buvo daugiau. Ši tendencija išliko ir tiriant ligonius bakterinio ir nebakterinio paūmėjimo grupėse: pacientams, kuriems ligai paūmėjus buvo rasta bakterijų bronchuose, TNF– α kraujyje buvo statistiškai patikimai mažiau. Šie radiniai patvirtina teiginį, kad IL–10 yra galingas uždegimą slopinantis citokinas, stipriai mažinantis uždegimą skatinančio mediatoriaus TNF– α sintezę.

Mūsų aptikta tendencija, kad IL–10 koncentracija didėja bakterinio paūmėjimo metu siejasi su R. Martinez vadovaujamo autorių kolektyvo tyrimo rezultatais [174]. Ištyrę sergančiuosius visuomenėje įgyta pneumonija jie nustatė, kad didesnė IL–6 ir IL–10 koncentracija kraujyje tiesiogiai susijusi su blogesne išgyvenamumo prognoze. Tyrejai nustatė šių citokinų koncentracijos padidėjimo ryšį su pneumonijos komplikacijomis – bakteriemija ir parapneumoniniu pleuritu. Panašūs rezultatai gauti ir tiriant segančiuosius

sepsiu ir septiniu šoku. Padidėjusi IL–10 koncentracija kraujyje siejosi su didesniu ligonių mirštamumu [175]. Manome, kad padidėjusi IL-10 koncentracija kraujyje ir LOPL sergantiesiems asmenims galėtų reikšti bakterinį paūmėjimą. Teigti, kad tai yra blogesnės prognozės rodiklis duomenų kol kas nepakanka.

Ištyrę LOPL sergančių asmenų funkcinių ir radiologinių pokyčių sąsajas nustatėme, kad reikšmingo skirtumo pagal radiologinius pokyčius tarp sunkesnės ir lengvesnės funkcinės stadijos ligonių grupių nebuvo. Taigi, prielaidos, kad didesni plaučių struktūriniai pokyčiai būtinai atitinka blogesnę kvėpavimo funkciją, mūsų tyrimas nepatvirtino. Vadinasi, emfizema, fibrozė, pūslės, bronhektazės gali būti tiek sunkesnės, tiek ir lengvesnės funkcinės stadijos ligoniams. Šis mūsų pastebėjimas siejasi su kitų tyrėjų darbais [176, 177], kurie nustatė, kad emfizemos sunkumas labai varijuoja netgi tarp tos pačios LOPL stadijos ligonių. Pasirodo, kad daliai pacientų, kuriems yra vidutinio sunkumo ar sunki kvėpavimo takų obstrukcija, taigi, ir LOPL yra vidutinės ar sunkios stadijos, emfizemos požymių beveik nerandama, o kai kuriems ligoniams, kurių plaučiai stipriai pažeisti emfizemos, kvėpavimo funkcijos rodikliai yra beveik normalūs. Mūsų darbo rezultatai patvirtino teiginį, kad LOPL suskirstymas tik pagal FEV₁ rodiklį nepakankami atspindi plaučių pokyčių įvairovę, o diagnozė „LOPL, lengva stadija“, dar nereiškia, kad pacientui, kurio FEV₁ > 80 proc. būtiną dydžio, nėra plaučių audinio destruktijos, pasireiškiančios, pavyzdžiui, buliozine emfizema. Krūtinės ląstos kompiuterinė tomografija pastaraisiais metais tampa vis svarbesnė tiriant sergančiuosius LOPL. Įrodyta, kad KT svarbi ankstyvajai emfizemos diagnostikai [178, 179], atrenkant kandidatus plaučių turį mažinančioms operacijoms [180], ligos eigai stebėti [181] ir prognozuoti [182]. Netgi lengvos spirometrinės stadijos ligoniams labai naudinga atlikti krūtinės ląstos kompiuterinę tomografiją, nes ji padeda įvertinti plaučių struktūrą. Remdamiesi plaučių KT tyrimo rezultatais galime susidaryti išsamesnį konkretaus paciento ligos vaizdą bei paskirti individualų ir optimalų gydymą.

Galbūt ateityje, tobulėjant vaizdinimo technologijoms, KT taps vienu iš svarbiausių tyrimų diagnozuojant, monitoruojant ir gydant LOPL [183-190].

Ištyrus mūsų pacientų kvėpavimo funkcijos rodiklius paaiškėjo, kad ligos remisijos metu tarp sunkesnės ir lengvesnės grupių ligonių skyrėsi tik FEV₁ ir FVC rodiklių vertės, t.y. tie rodikliai, pagal kuriuos ligoniai ir skirstomi į stadijas. Mūsų tyrimas paneigė loginę prielaidą, kad lengvos funkcinės stadijos ligonių plaučių tūriai ir dujų difuzija sutrikę mažiau, negu sunkesnės funkcinės stadijos ligonių. Reikšmingų plaučių tūrių ir dujų difuzijos rodiklių skirtumų tarp grupių nustatėme tik ligos paūmėjimo metu. Vadinasi, ligai paūmėjus, sunkesnės funkcinės stadijos ligonių plaučiai dėl oro spastų išsipučia labiau, o dujų difuzija per alveolių kapiliarinę membraną sutrinka stipriau. Todėl jiems gerokai stipriau pasireiškia hipoksemija ir hiperkapnija. Tai leidžia daryti prielaidą, kad blogesnės funkcinės būklės ligonių LOPL paūmėjimas bus sunkesnis negu pacientų, kurių plaučių funkcija sutrikusi nestipriai.

Nustatėme, kad bronhektazių ir emfizemos buvimas teigiamai koreliavo su paūmėjimų dažniu. Šį radinį galima būtų paaiškinti tuo, kad esant bronhektazėms, bronhuose nuolat tarpsta (kolonizuoja) patogeninės bakterijos. Dėl įvairių nepalankių aplinkos veiksnių, nusilpusio imuniteto ar netinkamo gydymo jos dažnai suaktyvėja, sukeldamos bakterinį LOPL paūmėjimą. Teigiamą emfizemos koreliaciją su paūmėjimu dažniu nustatė ir kiti tyrėjai [191], o *Haruna* su bendraautoriais aptiko tiesioginę KT randamų emfizeminių pokyčių koreliaciją su didesniu ligonių mirštamumu [192].

Taip pat nustatėme teigiamą plaučių fibrozės ir bronhektazių buvimo plaučiuose koreliaciją. Suprantama, jog progresuojant fibrozei ilgainiui atsiranda tempimo bronhektazių. Aptikę teigiamą tiesinę koreliaciją tarp fibrozės ir dujų difuzijos rodiklio DLco, įrodėme, kad didesnė fibrozė siejasi su blogesniais dujų difuzijos rodikliais. Todėl, nustačius sumažėjusį dujų difuzijos rodiklį, galime tikėtis, jog radiologinio tyrimo metu bus randama plaučių fibrozė. Mūsų tyrimo duomenys patvirtino plaučių tūrių sąsają su kraujo dujų

rodikliais. Įrodėme, kad esant didesnei plaučių hiperinfliacijai, hipoksemija būna sunkesnė, o CO₂ koncentracija didesnė.

Mūsų radiologinių ir funkcinų plaučių pokyčių ryšio tyrimas turi ir trūkumų. Bendras tiriamųjų skaičius nebuvo didelis, todėl pacientai nebuvo suskirstyti į keturias GOLD bronchų obstrukcijos sunkumo grupes. Tačiau manome, kad mūsų tiriamųjų suskirstymas į lengvesnės (į kurią buvo įtraukti I ir II GOLD bronchų obstrukcijos sunkumo grupių ligoniai) ir sunkesnės (į kurią buvo įtraukti III ir IV GOLD bronchų obstrukcijos sunkumo grupių ligoniai) bronchų obstrukcijos grupes yra pakankamai racionalus praktiniu požiūriu. Kiti tyrėjai [193] nustatė, kad LOPL sergančių ligonių skirstymas į stadijas pagal FEV₁ rodiklių vertes neatspindi svarbiausių su sveikatos būkle susijusių parametru, tokių kaip klinikiniai simptomai, plaučių išsipūtimas, fizinis pajėgumas, pasitenkinimas sveikata. Patikimo šių parametru skirtumo tarp gretimų GOLD stadijų ligonių nebuvo. Todėl manome, kad mūsų pasirinktas ligonių paskirstymo būdas šiame tyrime yra priimtinas.

Nustatėme, kad kraujo uždegimo aktyvumo žymenų koncentracija priklauso nuo LOPL klinikinės fazės. Ištyrę ligonių, sergančių LOPL kraujo aktyvumo rodiklius ligos remisijos ir paūmėjimo metu, nustatėme patikimai didesnę CRB, fibrinogeno koncentraciją bei didesnę leukocitų skaičių ir ENG ligai paūmėjus.

Literatūros duomenimis, didžioji dalis (50–87 %) LOPL paūmėjimų yra infekcinės (dažniausiai bakterinės) kilmės, o kitą dalį sudaro neinfekciniai paūmėjimai [194, 195]. Mūsų tyrimas patvirtino šį teiginį. 71,4 % mūsų paūmėjimo grupės tiriamųjų bronchų aspirate išaugo patogeninės bakterijos. Bakterijų sudėtis nesiskyrė nuo kitų tyrėjų duomenų [196]. Dažniausiai bronchų aspirato pasėliuose išaugo *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catharhalis*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella*, *Staphylococcus aureus* ir *Pseudomonas aeruginosa*. Paūmėjimą gali sukelti tiek kolonizuojančių bakterijų kiekio padidėjimas, tiek prisidėjusi kitos rūšies bakterinė infekcija

[197]. Patogeninių bakterijų radimas remisijos grupės tiriamųjų bronchų aspirate paaiškinamas nuolatine bakterijų kolonizacija sergančiųjų LOPL kvėpavimo takuose. Pastebėta, kad šiems ligoniams LOPL paūmėja dažniau. Taigi, mūsų tiriamųjų grupę sudarė tipiški lėtine obstrukcine plaučių liga sergantys asmenys.

LOPL paūmėjimas susijęs ne tik su kvėpavimo takų, bet ir su sisteminio uždegimo sustiprėjimu. Net ligos remisijos metu sergančiųjų LOPL kraujyje randama didesnė, palyginti su sveikais asmenimis, uždegimo žymenų (leukocitų skaičiaus, CRB, fibrinogeno, uždegimą skatinančių citokinų) koncentracija [198]. Ligai paūmėjus, šių žymenų kiekis gerokai padidėja, o paūmėjimui praėjus vėl sumažėja [199]. LOPL uždegimo sistemiškumą patvirtino ir mūsų duomenys, nes ligos paūmėjimo metu nustatėme didesnę CRB ir fibrinogeno koncentraciją kraujyje, didesnius ENG ir leukocitozę. Mūsų tyrimas iš esmės patvirtino Hurst su bendraautoriais išvadą, kad padidėjusi CRB koncentracija, kartu vertinant ir LOPL paūmėjimo klinikinius simptomus, tokius kaip dusulys, skreplių kiekio padidėjimas ir jų spalvos pokyčiai (pūlingi skrepliai) padeda diagnozuoti ligos paūmėjimą [200].

Akivaizdu, kad CRB ir fibrinogenas yra vertingi LOPL paūmėjimui diagnozuoti. Nustatėme tiesioginę CRB ir fibrinogeno koreliaciją, todėl manome, kad kasdienėje klinikinėje praktikoje, kuomet nėra galimybių atlikti daug laboratorinių tyrimų, šie žymenys galėtų pakeisti vienas kitą. Pritaikius logistinės regresijos modelį paaiškėjo, kad labiausiai tinkamas rodiklis LOPL paūmėjimui diagnozuoti (vertinant leukocitų skaičių, CRB, fibrinogeną ir ENG) yra leukocitų skaičius.

Žinodami, kad procalcitoninas laikomas vienu jautriausių bakterinės infekcijos žymenų, o LOPL paūmėjimą dažniausiai sukelia paūmėjusi ar naujai prisidėjusi bakterinė infekcija, iškėlėme prielaidą, kad, galbūt, esant bakteriniam LOPL paūmėjimui aptiksime didesnę procalcitonino koncentraciją. Ši prielaida nepasitvirtino: nenustatėme procalcitonino

koncentracijos padidėjimo savo tiriamiesiems LOPL paūmėjimo metu, išskyrus vieną ligonį, kuris sunkauso LOPL paūmėjimo metu susirgo dar ir plaučių uždegimu. Šis mūsų radinys leidžia manyti, kad netgi esant nekomplikuotam bakteriniam LOPL paūmėjimui, infekcija neturi tiesioginio sisteminio poveikio. Tačiau kaip parodė mūsų citokinų tyrimas, taip pat tikėtina, kad didesnės įtakos turi kiti imuniniai, pavyzdžiui citokinų sąlygoti, mechanizmai. Vis dėlto, tenka pripažinti, kad uždegimas sergant LOPL yra sudėtingas, vis dar nepakankamai ištirtas ir suprastas procesas.

Remdamiesi prielaida, kad didžioji LOPL paūmėjimų dalis yra bakterinės kilmės, o duomenų apie neutrofilų nitromelio tetrazolio (NMT) mėginio ir neutrofilų fagocitinio aktyvumo (NFA) tyrimų pritaikymą diagnozuojant LOPL paūmėjimą literatūroje neradome, nusprendėme ištirti, ar NMT mėginio rezultatai skiriasi LOPL remisijos, paūmėjimo ir sveikų tiriamųjų grupėse. Deja, rezultatai nepatvirtino mūsų lūkesčių. Nors tiriamųjų skaičius buvo pakankamas, o NMT ir NFA koreliavo tarpusavyje, reikšmingo NMT ir NFA mėginių rezultatų skirtumo tarp tiriamųjų grupių nenustatėme. Taigi, NMT ir NFA tyrimai netinka LOPL paūmėjimui diagnozuoti. Light, tyręs pleuros ertmės skysčio susikaupimo priežastis, taip pat neaptiko NMT pranašumo prieš įprastus uždegimo aktyvumo rodiklius, tokius kaip leukocitų skaičius, ENG ar CRB [163].

Seniai žinoma, kad cigarečių rūkymas yra pats svarbiausias LOPL etiologinis veiksnys. Tačiau iki šiol svarbiausias klausimas tiriant LOPL patogenezę yra šis: kodėl tik nedidelė dalis (apie 15-20%) rūkančių asmenų susergera LOPL? Kokie mechanizmai padeda didžiajai daliai rūkalių išvengti šios sunkios ligos? Pastaraisiais metais tiriamos kelios LOPL patogenezės hipotezės [117, 128]. Vis labiau linkstama prie autoimuninio proceso [17,19]. Manoma, kad LOPL, kaip ir visų autoimuninių ligų atsiradimui, svarbi organizmo tolerancija antigenams (ypač – autoantigenams): kuo ji didesnė, tuo mažiau galimybių rasti uždegimui [128]. Labiausiai žinomas mechanizmas, reguliuojantis įgyto

imuniteto atsaką, yra susijęs su CD4+CD25+FOXP3+ (T reguliacinėmis) ląstelėmis [18, 116-125].

Remdamiesi hipoteze, kad santykinis T reguliacinių ląstelių trūkumas ir dėl to vykstantis nekontroliuojamas autoimuninis uždegimas kai kurių rūkalių organizme galėtų būti viena iš LOPL atsiradimo priežasčių, ištyrėme T reguliacinių ląstelių kiekį LOPL sergančių ligonių kraujyje. Gauti rezultatai mūsų nenuvylė: nors palyginę LOPL ir kontrolinę grupes bendrai statistiškai reikšmingo CD4+CD25+ ląstelių skirtumo tarp grupių nenustėme, tačiau sergančiųjų sunkia ir labai sunkia LOPL grupėje aptiktas reikšmingai mažesnis CD4+CD25+ ląstelių skaičius, palyginti su rūkančiais, tačiau nesergančiais LOPL asmenimis. Šis mūsų radinys atitiko teorinę prielaidą, kad, trūkstant T reguliacinių ląstelių, LOPL eiga yra sunkesnė, nes nepakankamai slopinamas uždegimas. Statistiškai patikimas skirtumas nustatytas ir tarp rūkančių bei nerūkančių kontrolinės grupės asmenų. Kaip ir tikėtasi, rūkančiųjų kraujyje aptikta gerokai daugiau CD4+CD25+ limfocitų, negu nerūkančiųjų. Šis radinys sutampa su kitų tyrėjų duomenimis, kurie taip pat aptiko šių ląstelių kiekio padidėjimą LOPL nesergančių rūkalių organizme [122,125]. Didesnis CD4+CD25+ limfocitų kiekis rūkančių asmenų organizme, palyginti su nerūkančių, paaiškinamas tuo, kad cigarečių dūmų sukeltą kvėpavimo takų uždegimą organizmo imuninė sistema slopina gamindama daugiau slopinančių ląstelių, tokių kaip CD4+CD25+ limfocitai. Jei T reguliacinių limfocitų kiekis nepakankamas, uždegimas persistuoja ilgai ir transformuodamasis į LOPL. Kaip jau minėjome, uždegimas sergant LOPL vis dar nepakankamai ištirtas ir suprastas procesas, kadangi yra ir priešingų mūsų tyrimo rezultatams duomenų. Paats su bendraautoriais nenustatė kraujo CD4+CD25+FoxP3 ląstelių kiekio skirtumo tarp sergančių LOPL ir sveikų asmenų grupių [202]. Tačiau, taip pat kaip ir mes, šie autoriai nerado T reg ląstelių koreliacijos su kvėpavimo funkcijos rodikliais.

Nors įrodyta, kad LOPL pažeidžia tiek stambiuosius tiek ir smulkiuosius kvėpavimo takus, plaučių parenchimą ir plaučių kraujagysles, vis dėlto

labiausiai pažeidžiami smulkiausi kvėpavimo takai – bronchiolės [80,105]. Smulkiuosius kvėpavimo takus ir plaučių parenchimą tirti sudėtinga, nes reikalingi invaziniai tyrimai: bronchoskopija, atliekant BAL arba endobronchinę ar plaučių audinio biopsiją. Plaučių audinio biopsija (paimta ne plaučių operacijos metu) vykdant mokslinius tyrimus atliekama itin retai ir rekomenduojama tik išimtiniais atvejais [203, 204]. Kadangi savo tyrimo pradžioje įsitikinome, kad sergančiųjų LOPL BAL skysčio grįžtamumas yra nepatenkinamas, norėdami ištirti kvėpavimo takų uždegimą pasirinkome tirti bronchų gleivinės biopsijas. Ištyrėme 69 asmenis. Palyginti su kitų autorių darbais mūsų tiriamųjų skaičius buvo panašus. Pavyzdžiui, Lapperre vadovaujami tyrėjai, neutrofilų skaičių sergančių LOPL asmenų bronchų biopsijose ištyrė 51 asmeniui [201], o Gossman kolektyvas nustatė padidėjusį B limfocitų kiekį 114 LOPL sergančių asmenų bronchų gleivinėje.[205]. Literatūroje radome tik vieną darbą, kuriame buvo tirtos Treg ląstelės sergančiųjų LOPL bronchų ir plaučių biopsinėje medžiagoje. Tai Isajevs vadovaujamo kolektyvo darbas, kuriame tirta FoxP3 ląstelių ekspresija sergančiųjų LOPL smulkiuosiuose ir stambiuosiuose kvėpavimo takuose [125]. Šių tyrėjų duomenys buvo dvejopi: jie nustatė didesnę FoxP3 ekspresuojančių ląstelių skaičių sergančių LOPL stambiuosiuose, tačiau sumažėjusį – smulkiuosiuose kvėpavimo takuose, palyginti su sveikais rūkančiais ir nerūkančiais asmenimis. Kitaip negu mūsų tyrimo, šio tyrimo visi LOPL grupės tiriamieji sirgo ir plaučių vėžiu. Dėl to jie buvo operuoti, biopsijai panaudotos rezekuotos plaučių dalys, o tyrimo rezultatus galėjo įtakoti navikinis procesas.

Bronchų gleivinės biopsinėje medžiagoje nustatėme reikšmingai mažesnę ląstelių, turinčių CD25+ žymenį skaičių LOPL grupėje, palyginti su kontroline grupe. Šis mūsų radinys tiesiogiai siejasi su kraujo Treg ląstelių skaičiumi ir patvirtina teorinę prielaidą, kad LOPL suserga tie rūkantys asmenys, kurių kraujyje ir kvėpavimo takuose trūksta imuninės ir uždegimo reakcijas slopinančių T reguliacinių (CD4+CD25+) limfocitų.

Taigi, savo tyrime stengėmės pažvelgti į LOPL kompleksiskai, tikėdamiesi prisidėti tiek prie šios ligos patogenezės tyrimų, tiek siekdami atrasti naudingų praktinių rekomendacijų, kurios padėtų gydytojams kasdieniame klinikiniam darbe. Mūsų darbas parodė, kad kraujo uždegimo žymenų (CRB, ENG, fibrinogeno, leukocitų skaičiaus) bei bronchų aspirato mikrobiologinio tyrimo rezultatai priklauso nuo LOPL klinikinės fazės. Šie klasikiniai uždegimo aktyvumo žymenys gerai atspindi kvėpavimo takų uždegimo sustiprėjimą LOPL paūmėjimo metu. Deja, NMT, NFA ir procalcitoninas, mūsų tyrimo duomenimis, neturi diagnostinės vertės kvėpavimo takų uždegimui ir jo paūmėjimui vertinti sergant LOPL. Ištyrę citokinų koncentraciją sergančiųjų LOPL kraujyje nustatėme, kad ligos paūmėjimo metu padidėja IL-10 ir sumažėja TNF- α koncentracija. Vadinasi, šie citokinai, galėtų būti vertingi laboratoriniai LOPL klinikinės fazės žymenys. Nustatę, kad emfizema, fibrozė, pūslės, bronhektazės gali būti tiek sunkesnės, tiek ir lengvesnės funkcinės stadijos ligoniams, mes nepatvirtinome prielaidos, kad didesni plaučių struktūriniai pokyčiai būtinai atitinka blogesnę kvėpavimo funkciją. Ištyrę ligonių kvėpavimo funkcijos rodiklius reikšmingų plaučių tūrių ir dujų difuzijos rodiklių skirtumų tarp grupių nustatėme tik ligos paūmėjimo metu. Tai leidžia daryti prielaidą, kad blogesnės funkcinės būklės ligonių LOPL paūmėjimas bus sunkesnis, negu pacientų, kurių plaučių funkcija sutrikusi nestipriai. Įrodėme, kad didesnė plaučių fibrozė siejasi su blogesniais dujų difuzijos rodikliais bei patvirtinome plaučių tūrių sąsają su su kraujo dujų rodikliais. Ištyrę Treg ląstelių kiekį LOPL sergančių ir kontrolinių tiriamųjų kraujyje bei bronchų gleivinės biopsinėje medžiagoje, patvirtinome hipotezę, kad LOPL suserga tie rūkantys asmenys, kurių kraujyje ir kvėpavimo takuose trūksta imuninės ir uždegimo reakcijas slopinančių T reguliacinių limfocitų.

6. IŠVADOS

1. Kraujo uždegimo aktyvumo žymenų koncentracija priklauso nuo LOPL klinikinės fazės. Kvėpavimo takų uždegimo sustiprėjimą LOPL paūmėjimo metu gerai atspindi klasikiniai kraujo uždegimo aktyvumo žymenys – CRB, ENG, fibrinogenas, leukocitų skaičius bei bronchų aspirato mikrobiologinio tyrimo rezultatai. NMT, NFA ir prokalцитoninas neturi diagnostinės vertės kvėpavimo takų uždegimui ir jo paūmėjimui vertinti sergant LOPL.
2. LOPL paūmėjimą atspindi kraujo citokinų koncentracijos pokyčiai – padidėjusi IL-10 koncentracija ir sumažėjusi TNF- α koncentracija. Labai tikėtina, kad šie citokinai galėtų būti vertingi laboratoriniai LOPL klinikinės fazės žymenys, taip pat padedantys atskirti bakterinį LOPL paūmėjimą nuo nebakterinio.
3. Sergančiųjų LOPL suskirstymas į stadijas tik pagal FEV₁ rodiklį nepakankamai atskleidžia plaučių funkcinių ir struktūrinių pokyčių visumą. Radiologinių ir plaučių funkcijos pokyčių sąsaja nėra vienareikšmė. Blogėjantis dujų difuzijos rodiklis atspindi atsiradusią plaučių fibrozę sergant LOPL. Dažnesni LOPL paūmėjimai susiję su sunkesniais struktūriniais plaučių pokyčiais – bronhektazėmis ir emfizema. Ligoniams, kurių funkcinė būklė esant remisijai yra sunkesnė (GOLD III ir IV bronchų obstrukcijos sunkumo grupės), paūmėjimo metu kvėpavimo sistemos funkcinė būklė sutrinka gerokai labiau negu lengvesnės funkcinės stadijos ligoniams.
4. LOPL atsiradimui turi įtakos organizmo imuninės sistemos disfunkcija – CD4+CD25+ (T reguliacinių) limfocitų trūkumas ir dėl to nepakankamai slopinamas kvėpavimo takų (galimai autoimuninis) uždegimas.

7. PRAKTINĖS REKOMENDACIJOS

1. Pablogėjus sergančiojo LOPL paciento būklei rekomenduojama tirti kraujo leukocitų skaičių, CRP, ENG ir fibrinogeną, nes šių rodiklių koncentracijos padidėjimas patikimai rodo LOPL paūmėjimą.
2. Neaiškiais atvejais, norint atskirti LOPL paūmėjimą nuo remisijos naudinga atlikti kraujo citokinų – IL–10 ir TNF– α tyrimą, nes LOPL paūmėjimo metu padidėja IL–10 ir sumažėja TNF– α koncentracija.
3. Nors išsamus plaučių funkcijos tyrimas iš dalies atspindi struktūrinius plaučių pokyčius, gaunama informacija nėra pakankama juos tinkamai įvertinti, todėl sergantiesiems LOPL rekomenduojama nors kartą atlikti krūtinės ląstos kompiuterinę tomografiją. Šis tyrimas labai naudingas plaučių parenchimos pažeidimo sunkumui vertinti, ligos fenotipui nustatyti ir optimaliam gydymui parinkti.

8. LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Rodrigues-Roisin R, Vestbo J. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease (revised 2011). Global Initiative for Chronic Obstructive Pulmonary Disease, 2011.
2. Huertas A, Palange P. COPD: a multifactorial systemic disease. *Ther Adv Respir Dis* 2011; 5(3): 217-224.
3. Sinden NJ, Stockley RA. Systemic inflammation and comorbidity in COPD: a result of „overspill“ of inflammatory mediators from the lungs? Review of the evidence. *Thorax* 2010; 65: 930-936.
4. Wouters E.F.M. Local and systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 2005; 2: 26-33.
5. Donaldson G.C., Seemungal T.A.R., Patel I.S. et al. Airway and systemic inflammation and decline in lung function in patients with COPD. *Chest* 2005; 128: 1995-2004.
6. Agustí AGN. Systemic Effects of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Proc Am Thorac Soc* 2005; 2: 367-370.
7. Anzueto A. Impact of exacerbations on COPD. *Eur Respir Rev* 2010;19:116, 113-118.
8. Roede BM, Bresser P, Prins JM, Schellevis F, Verheij TJM, Bindels PJE. Reduced risk of next exacerbation and mortality associated with antibiotic use in COPD. *Eur Respir J* 2009; 33: 282-288.
9. Takanashi S, Hasegawa Y, Kanehira Y, Yamamoto K, Fujimoto K. Interleukin-10 level in sputum is reduced in bronchial asthma, COPD and in smokers. *Eur Respir J* 1999; 14:309-314.
10. Barcelo B, Pons J, Fuster A, Sauleda J, Noguera A et.al. Intracellular cytokine profile of T lymphocytes in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Exp Immunol* 2006; 145:474-479.
11. Kim V, Rogers TJ, Criner GJ. New Concepts in the Pathobiology of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Proc Am Thorac Soc* 2008; 5: 478-485.
12. Reilly JJ. COPD and Declining FEV₁ – Time to Divide and Conquer? *N Engl J Med* 2008; 359:15.
13. Aymerich JG, Gomez FP, Benet M, Farrero E, Basagana X et al. Identification and prospective validation of clinically relevant chronic obstructive pulmonary disease (COPD) subtypes. *Thorax* 2011; 66:430-437.
14. Hogg JC. Lung structure and function in COPD. *Int J Tuberc Lung Dis* 2008; 12(5): 467-479.

15. Burgel PR, Bourdin A, Chanez P, Chabot F, Chaouat A et al. Update on the roles of distal airways in COPD. *Eur Respir Rev* 2011; 20:119, 7-22.
16. Martinez FJ, Donohue JF, Rennard SI. The future of chronic obstructive pulmonary disease treatment – difficulties of and barriers to drug development. *Lancet* 2011; 378: 1027-37.
17. Birring SS, Pavord ID. COPD: an autoimmune disease? *Eur respir J* 2011; 38:484.
18. Baraldo S, Saetta M. To reg or not to reg: that is the question in COPD. *Eur Respir J* 2008; 31: 486-488.
19. Goswami S, Barranco W, Lee SH, Grudo A, Corry DB, Kheradmand F. An autoimmune basis in the disease pathogenesis of COPD/Emphysema. *J Immunol* 2007; 178: 235-236.
20. Petty TL. COPD in perspective. *Chest* 2002;121:116S-120S.
21. O'Donnell R, Breen D, Wilson S, Djukanovic R. Inflammatory cells in the airways in COPD. *Thorax* 2006;61: 448-454.
22. van der Vaart H, Koeter GH, Pastma DS, et al. First study of infliximab treatment in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172:465-9.
23. Leopold JG, Gough J. The centrilobular form of hypertrophic emphysema and its relation to chronic bronchitis. *Thorax* 1957; 12:219-35.
24. Cosio M, Ghezzo H, Hogg JC, et al. The relations between structural changes in small airways and pulmonary function tests. *N Engl J Med* 1978;298: 1277-81.
25. Wright JL, Lawson LM, Pare PD, et al. The detection of small airways disease. *Am Rev Respir Dis* 1984; 129: 989-94.
26. Saetta M, Finkelstein R, Cosio MG. Morphological and cellular basis for airflow limitation in smokers. *Eur Respir J* 1994; 7: 1505-15.
27. Remy-Jardin M, Remy J, Gosselin B, et al. Lung parenchymal changes secondary to cigarette smoking: pathologic-CT correlations. *Radiology* 1993; 186: 643-51.
28. Morrison NJ, Abboud RT, Ramadan F, et al. Comparison of single breath carbon monoxide diffusing capacity and pressure-volume curves in detecting emphysema. *Am Rev Respir Dis* 1989; 139:1179-87.
29. Hiemstra PS, van Wetering S, Stolk J. Neutrophil serine proteinases and defensins in chronic obstructive pulmonary disease: effects on pulmonary epithelium. *Eur respir J* 1998;12:1200-8.
30. Takeyama K, Dabbagh K, Jeong Shim J, et al. Oxidative stress causes mucin synthesis via transactivation of epidermal growth factor receptor: role of neutrophils. *Immunol* 2000; 164: 1546-52.

31. Voynow JA, Young LR, Wang Y, et al. Neutrophil elastase increases MUC5AC mRNA and protein expression in respiratory epithelial cells. *Am J Physiol* 1999; 276: L835-43.
32. Fisher B, Voynow J. Neutrophil elastase induces MUC5AC messenger RNA expression by an oxidant-dependent mechanism. *Chest* 2000; 117(5 Suppl1):317-20S.
33. Gottlieb DJ, Stone PJ, Sparrow D, et al. Urinary desmosine excretion in smokers with and without rapid decline of lung function: the Normative Aging Study. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154:1290-5.
34. Galdston M, Melnick EL, Goldring RM et al. Interactions of neutrophil elastase, serum trypsin inhibitory activity, and smoking history as risk factors of chronic obstructive pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis* 1977; 116: 837-46.
35. Burnett D, Chamba A, Hill SL, et al. Neutrophils from subjects with chronic obstructive lung disease show enhanced chemotaxis and extracellular proteolysis. *Lancet* 1987; 2: 1043-6.
36. Drost EM, Skwarski KM, Saulea J, et al. Oxidative stress and airway inflammation in severe exacerbations of COPD. *Thorax* 2005; 60:293-300.
37. Qiu Y, Zhu J, Bandi V, et al. Biopsy neutrophilia, neutrophil chemokine and receptor gene expression in severe exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Crit Care Med* 2003; 168:968-75.
38. Berger P, Laurent F, Begueret H et al. Structure and function of small airways in smokers: relationship between air trapping at CT and airway inflammation. *Radiology* 2003; 228:85-94.
39. Snider GL, Lucey EC, Stone PJ. Animal models of emphysema. *Am Rev Respir Dis* 1986; 133:149-69.
40. Finlay GA, O'Driscoll LR, Russell KJ, et al. Matrix metalloproteinase expression and production by alveolar macrophages in emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156:240-7.
41. Segura-Valdez L, Pardo A, Gaxiola M, et al. Upregulation of gelatinases A and B, collagenases 1 and 2, and increased parenchymal cell death in COPD. *Chest* 2000;117:684-94.
42. Shapiro SD. The macrophage in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:S29-32.
43. Kagi D, Vignaux F, Ledermann B, et al. Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science* 1994;265:528-30.
44. Diaz PT, King MA, Pacht ER, et al. Increased susceptibility to pulmonary emphysema among HIV-seropositive smokers. *Ann Intern Med* 2000;132:369-72.

45. Chrysafakis G, Tzanakis N, Kyriakoy D, et al. Perforin expression and cytotoxic activity of sputum CD8⁺ lymphocytes in patients with COPD. *Chest* 2004; 125:71-6.
46. Majo J, Ghezzi H, Cosio MG. Lymphocyte population and apoptosis in the lungs of smokers and their relation to emphysema. *Eur Respir J* 2001;17:946-53.
47. Enelow RI, Mohammed AZ, Stoler MH, et al. Structural and functional consequences of alveolar cell recognition by CD8⁺ T lymphocytes in experimental lung disease. *J Clin Invest* 1998;102:1653-61.
48. Retamales I, Elliot WM, Meshi B, et al. Amplification of inflammation in emphysema and its association with latent adenoviral infection. *J Respir Crit Care Med* 2001; 164:469-73.
49. Di Stefano A, Capelli A, Lusuadi M, et al. Severity of airflow limitation is associated with severity of airway inflammation in smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158:1277-85.
50. Fujimoto K, Kubo K, Yamamoto H et al. Eosinophilic inflammation in the airway is related to glucocorticoid reversibility in patients with pulmonary emphysema. *Chest* 1999;115:697-702.
51. Linden M, Rasmussen JB, Piitulainen E, et al. Airway inflammation in smokers with nonobstructive and obstructive chronic bronchitis. *Am Rev Respir Dis* 1993;148:1226-32.
52. Panzner P, Lafitte JJ, Tsicopoulos A, et al. Marked up-regulation of T lymphocytes and expression of interleukin-9 in bronchial biopsies from patients with chronic bronchitis with obstruction. *Chest* 2003;124:1909-15.
53. Peleman RA, Rytila PH, Kips JC, et al. The cellular composition of induced sputum in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 1999;13:839-43.
54. Lacoste JY, Bousquet J, Chané P, et al. Eosinophilic and neutrophilic inflammation in asthma, chronic bronchitis, and chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol* 1993;92:537-48.
55. Warringa RA, Schweiser RC, Maikoe T et al. Modulation of eosinophil chemotaxis by interleukin-5. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1992;7:631-6.
56. Riise GC, Ahlstedt S, Larsson S, et al. Bronchial inflammation in chronic bronchitis assessed by measurement of cell products in bronchial lavage fluid. *Thorax* 1995;50:360-5.
57. Möttönen M, Hekkinen J, Mustonen L, et al. CD4⁺CD25⁺ T cells with the phenotypic and functional characteristics of regulatory T cells are enriched in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol* 2005; 140:360-367.
58. Lucy J, Smyth C, Starkey C et al. CD4-Regulatory Cells in COPD Patients. *Chest* 2007; 132:156-163.

59. Vernooij JHJ, Möller GM, Suylen RJ, et al. Increased Granzyme A Expression in Type II Pneumocytes of Patients with Severe Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Amer Jour Respir Crit Care Medicine* 2007; 175: 464-472.
60. Fabbri LM, Ramagnoli 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.
61. Sommerhoff CP, Caughey GH, Finkbeiner WE, et al. Mast cell chymase. A potent secretagogue for airway gland serous cells. *J Immunol* 1989;142:2450-6.
62. Grashoff WF, Sont JK, Sterk PJ, et al. Chronic obstructive pulmonary disease: role of bronchiolar mast cells and macrophages. *Am J Pathol* 1997;151:1785-90.
63. Pesci A, Rossi GA, Bertorelli G, et al. Mast cells in the airway lumen and bronchial mucosa of patients with chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149:1311-6.
64. Saetta M, Turato G, Facchini FM, et al. Inflammatory cells in the bronchial glands of smokers with chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:1633-9.
65. Hurst JR, Wilkinson TMA, Perera WR, et al. Relationships among bacteria, upper airway, lower airway, and systemic inflammation in COPD. *Chest* 2005;127:1219-26.
66. Rennard SI, Daughton D, Fujita J, et al. Short-term smoking reduction is associated with reduction in measures of lower respiratory tract inflammation in heavy smokers. *Eur Respir J* 1990;3:752-9.
67. Jarjour N, Peters SP, Djukanovid R, Calhoun WS. Investigative use of bronchoscopy in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:692-697.
68. Petty TL. John Hutchinson's Mysterious Machine Revisited. *Chest*. 2002; 121:219S-223S.
69. Braun L. Spirometry, Measurement, and Race in the Nineteenth Century. *Jnl of the History of Med. And Allied Sci*. 2005 60(2):135-169.
70. Yernault JC. The birth and development of the forced expiratory manoeuvre: a tribute to Robert Tiffeneau (1910-1961). *Eur Respir J*. 1997; 10:2704-2710.
71. Gaensler EA. Some Problems of Bronchspirometry Analysis of 1,000 Procedures. *Chest*. 1953;24:390-406.
72. Malakauskas K., Sakalauskas R. Funkcinė kvėpavimo diagnostika. (Mokomoji knyga). Kauno medicinos universiteto leidykla. 2000.
73. Nargėla RV, Bagdonas A, Danila E, Malakauskas K, Sakalauskas R, Šatkauskas B, Zablockis R. Lėtinės obstrukcinės plaučių ligos diagnostika ir gydymas (Lietuvos pulmonologų sutarimas). 2007.

74. Pellegrino R, Viegi G, Brusasco V, Crapo RO, Burgos F, Casaburi R et al. Interpretative strategies for lung function tests. *Eur Respir J*. 2005; 26: 948-968.
75. Taube C, Lehnigk B, Paasch K, Kirsten DK, Jorres RA, Magnussen H. Factor Analysis of Changes in Dyspnea and Lung Function Parameters after Bronchodilation in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000; 162: 216-220.
76. Criner GJ, Sternberg AL. A Clinician's Guide to the Use of Lung Volume Reduction Surgery. *Proc Am Thorac Soc*. 2008; Vol 5. 461-467.
77. Celli BR. The importance of Spirometry in COPD and Astma. *Chest*. 2000;117:15S-19S.
78. Claiton N. Review Series: Lung function made easy: Assesing lung size. *Chron Respir Dis*. 2007;4;151.
79. Wanger J, Clausen JL, Coates A, Pedersen OF, Brusasco V, Burgos F, Casaburi R et al. Standartisation of the measurement of lung volumes. *Eur Respir J*. 2005; 26:511-522.
80. Hogg JC, Timens W. The Pathology of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2009;4:435-59.
81. O'Donnel DE, Forkert L, Webb KA. Evaluation of bronchodilator responses in patients with "irreversible" emphysema. *Eur Respir J*. 2001;18(6):914-20.
82. Balestra AM, Bingisser RB, Chhajed PN, Tamm M, Leuppi FD. Bronchodilator response in residual volume in irreversible airway obstruction. *Swiss Med Wkly*. 2008;138(17-18):251-255.
83. O'Donnell DE, Ofir D, Laveneziana P. Patterns of cardiopulmonary response to exercise in lung diseases. *Eur Respir Mon*. 2007, 40, 69-92.
84. Calverley PMA. Exercise and dyspnoea in COPD. *Eur Respir Rev*. 2006; 15: 100, 72-79.
85. Weisman M, Casaburi R, Johnson B, Zeballos J et al. ATS/ACCP Statement on Cardiopulmonary exercise Testing. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003; 167:211-277.
86. Man WD, Soliman MG, Gearing J, et al. Symptoms and quadriceps fatigability after walking and cycling in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003; 168:562-567.
87. Pepin V, Saey D, Whittom F, LeBlanc P, Maltais F. Walking versus cycling: sensitivity to bronchodilation in obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005; 172:1517-1522.

88. O'Donnell DE, Revill SM, Webb KA. Dynamic hyperinflation and exercise intolerance in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001; 164:770-777.
89. Vandevorde J, Verbanck S, Schuermans D, Kartounian J, Vincken W. Obstructive and restrictive spirometric patterns: fixed cut-offs for FEV1/FEV6 and FEV6. *Eur Respir J*. 2006; 27:378-383.
90. Bellia V, Sorino C, Catalano F, Augugliaro G, Scichilone N, Pistelli R, Pedone C, Antonelli-Incalzi R. Validation of FEV6 in the elderly: correlates of performance and repeatability. *Thorax*. 2008; 63:60-66.
91. Garcia-Rio F, Pino JM, Dorgham A, Alonso A, Villamor. Spirometric reference equations for European females and males aged 65-85 yrs. *Eur Respir J*. 2004; 24: 397-405.
92. Hansen JE, Wasserman K. Spirometric Criteria for Airway obstruction. Use Percentage of FEV1/FVC Ratio Below the Fifth Percentile, Not < 70 %. *Chest*. 2007; 131:349-355.
93. Crapo RO. The role of reference values in interpreting lung function tests. *Eur Respir J*. 2004; 24: 341-342.
94. Calverley PMA, Burge PS, Spencer S, Anderson JA, Jones PW. Bronchodilator reversibility testing in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*. 2003; 58; 659-664.
95. Tashkin DP, Celli B, Decramer M, Liu D, Burkhart D, Cassino C, Kesten S. Bronchodilator responsiveness in patients with COPD. *Eur Respir J*. 2008; 31: 742-750.
96. Cote CG, Pinto-Plata V, Kasprzyk K, Dordelly LJ, Celli BR. The 6 min Walk Distance, Peak Oxygen Uptake, and Mortality In COPD. *Chest*. 2007; 132: 1778-1785.
97. Palange P, Antonucci R, Valli G. Exercise testing in the prognostic evaluation of patients with lung and heart diseases. *Eur Respir Mon*. 2007; 40, 195-207.
98. Cazzola M, MacNee W, Martinez FJ, et al. Outcomes for COPD pharmacological trials: from lung function to biomarkers. *Eur Respir J*. 2008; 31:416-468.
99. MacIntyre N, Crapo RO, Viegi G et. al. Standardisation of the single-breath determination of carbon monoxide uptake in the lung. *Eur Respir J* 2005; 26: 720-735.
100. Hyde DM, Hamid Q, Irvin CG. Anatomy, pathology, and physiology of the tracheobronchial tree: emphasis on the distal airways. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 124:72-77.

101. Fletcher C, Peto R. The natural history of chronic airflow obstruction. *BMJ* 1977; 1: 1645-1658.
102. Peters EJ, Morice R, Benner SE, et al. Squamous metaplasia of the bronchial mucosa and its relationship to smoking. *Chest* 1993; 103: 1429-1432.
103. Laperre TS, Sont JK, van Schadewijk A, et al. Smoking cessation and bronchial epithelial remodeling in COPD: a cross sectional study. *Respir Res* 2007; 8: 85.
104. MacNee W. Pathogenesis of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Proc Am Thorac Soc* 2005; 2: 258-266.
105. Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, et al. The nature of small airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2004; 350: 2645-2653.
106. Araya J, Cambier S, Markovics JA, et al. Squamous metaplasia amplifies pathologic epithelial-mesenchymal interactions in COPD patients. *J Clin Invest* 2007; 117: 3551-3562.
107. Caramori G, Di Gregorio C, Carlstedt I, et al. Mucin expression in peripheral airways of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Histopathology* 2004; 45: 477-484.
108. De Boer WI, Sont JK, van Schadewijk A et al. Monocyte chemoattractant protein 1, interleukin 8, and chronic airways inflammation in COPD. *J Pathol* 2000; 190: 619-626.
109. Fuke S, Betsuyaku T, Nasuhara Y, et al. Chemokines in bronchiolar epithelium in the development of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004; 31:405-412.
110. Saetta M, Mariani M, Panina-Bordignon P, et al. Increased expression of the chemokine receptor CXCR3 and its ligand CXCL10 in peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease.. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165: 1404-1409.
111. Marin A, Monso E, Garcia-Nunez, Sauleda J, Noguera A, et al. Variability and effects of bronchial colonisation in patients with moderate COPD. *Eur Respir J* 2010; 35: 295-302.
112. Santos S, Peinado VI, Ramirez J, et al. Characterisation of pulmonary vascular remodeling in smokers and patients with mild COPD. *Eur Respir J* 2002; 19: 632-638.
113. Barbera JA, Peinado VI, Santos S. Pulmonary hypertension in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2003; 21:892-905.
114. Janeway CT, Walport M, Shlomchik MJ. Immunobiology, the immune system in health and disease: Garland Publishing, 2005.
115. Liu H, Hu B, Xu D, et al. CD4+CD25+ regulatory T cells cure murine colitis: the role of IL-10, TGF-beta, and CTLA4. *J Immunol* 2003; 171: 5012-5017.

116. DeJaco C, Duftner C, Grubeck-Loebenstein B, et al. Imbalance of regulatory T cells in human autoimmune diseases. *Immunology* 2006; 117: 289-300.
117. Brusselle GG, Joos GF, Bracke KR. New insights into the immunology of chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet* 2011; 347: 1015-1026.
118. Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 2005; 6: 345-352.
119. Tang Q, Bluestone JA. The Foxp3+ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. *Nat Immunol* 2008; 9: 239-244.
120. Banham AH. Cell surface IL-7 receptor expression facilitates the purification of FOXP(+) regulatory T cells. *Trends Immunol* 2006; 27: 541-544.
121. Lee SH, Goswami S, Grudo A, et al. Antielastin autoimmunity in tobacco smoking-induced emphysema. *Nat Med* 2007; 13: 567-569.
122. Barcelo B, Pons J, Ferrer JM, Sauleda J, Fuster A, Augusti AG. Phenotypic characterisation of T-lymphocytes in COPD: abnormal CD4+CD25+ regulatory T-lymphocyte response to tobacco smoking. *Eur Respir J* 2008; 31: 555-562.
123. Smyth LJ, Starkey C, Vestbo J, Singh D. CD4-regulatory cells in COPD patients. *Chest* 2007; 132: 156-163.
124. D'Alessio FR, Tsushima K, Aggarwal NR, et al. CD4+CD25+Foxp3+ Tregs resolve experimental lung injury in mice and are present in humans with acute lung injury. *J Clin Invest* 2009; 119: 2898-2913.
125. Isajevs S, Taivans I, Strazda G, Kopeika U, Bukovskis M et al. Decreased FOXP3 expression in small airways of smokers with COPD. *Eur Respir J* 2009; 33: 61-67.
126. Torres JP, Marin JM, Casanova C et al. Lung cancer in patients with COPD: incidence and predicting factors. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 184: 913-919.
127. Hemminki K, Liu X, Ji J, et al. Subsequent COPD and lung cancer in patients with autoimmune disease. *Eur Respir J* 2011;37: 463-464.
128. Cosio MG, Saetta M. Evasion of COPD in smokers: at what price? *Eur Respir J* 2012; 39: 1298-1303.
129. Majo J, Ghezzi H, Cosio MG. Lymphocyte population and apoptosis in the lungs of smokers and their relation to emphysema. *Eur respir J* 2001; 17: 946-953.
130. Richmond I, Pritchard GE, Ashcroft T, et al. Distribution of gamma delta T-cells in the bronchial tree of smokers and non-smokers. *J Clin Pathol* 1993; 46: 926-930.
131. Pons J, Sauleda J, Ferrer JM, et al. Blunted $\gamma\delta$ T – lymphocyte response in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2005; 25: 441-446.

132. Holtmeier W, Kabelitz D. Gammadelta T cells link innate and adaptive immune responses. *Chem Immunol Allergy* 2005; 86: 151-183.
133. Biswas SK, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol* 2010; 11: 889-896.
134. Shaykhiev R, Krause A, Salit J, et al. Smoking-dependent reprogramming of alveolar macrophage polarization: implication for pathogenesis of COPD. *J Immunol* 2009; 183: 2867-2883.
135. Woodruff P. A distinctive alveolar macrophage activation state induced by cigarette smoking. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172: 1383-1392.
136. Taylor AE, Finney-Hayward TK, Quint JK, et al. Defective macrophage phagocytosis of bacteria in COPD. *Eur Respir J* 2010; 35: 1039-1047.
137. Rosell A, Monso E, Soler N, et al. Microbiologic determinants of exacerbation in chronic obstructive pulmonary disease. *Arch Intern Med* 2005; 165: 891-897.
138. Murphy TF, Brauer AL, Grant BJB, Sethi S. *Moraxella catarrhalis* in chronic obstructive pulmonary disease: burden of disease and immune response. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172: 195-199.
139. Barnes P. The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J. Clin. Invest.* 2008; 118:3546-3556.
140. Chung KF, Adcock I.M. Multifaced mechanisms in COPD: inflammation, immunity, and tissue repair and destruction. *Eur Respir J* 2008; 31: 1334-1356.
141. Garantziotis S, Brass DM, Savov J, Hollingsworth JW, McElvania-TeKippe E et al. Leukocyte-Derived IL-10 Reduces Subepithelial Fibrosis Associated with Chronically Inhaled Endotoxin. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006; 35: 662-667.
142. Kim V, Rogers TJ, Criner GJ. New Concepts in the Pathobiology of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Proc Am Thorac Soc* 2008; 5: 478-485.
143. Churg A, Wang RD, Tai H, Wang X, Xie C, Wright JL. Tumor necrosis factor- α drives 70 % of cigarette smoke-induced emphysema in the mouse. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170:492-498.
144. Chung KF. Cytokines in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2001; 18:50-59.
145. Takanashi S, Hasegawa Y, Kanehira Y, Yamamoto K, Fujimoto K. Interleukin-10 level in sputum is reduced in bronchial asthma, COPD and in smokers. *Eur Respir J* 1999; 14:309-314.
146. Wouters EFM, Groenewegen KH, Dentener MA, Vernooy JHJ. Systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. The role of exacerbations. *Proc Am Thorac Soc* 2007; 4: 626-34.

147. Sethi S, Murphy TF. Infection in the Pathogenesis and course of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2008; 359: 2355–65.
148. Kherad O, Kaiser L, Bridevaux PO, Sarasin F, Thomas Y, Janssens JP, Rutschmann OT. Upper-respiratory viral infection, biomarkers, and COPD exacerbations. *Chest* 2010; 138: 896–904.
149. Sykes A, Mallia P, Johnston SL. Diagnosis of pathogens in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2007; 4: 642–6.
150. Sethi S, Wrona C, Escberger K, Lobbins P, Cai X, Murphy TF. Inflammatory profile of new bacterial strain exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 177: 491–7.
151. Sethi S, Murphy TF. Infection in the Pathogenesis and Course of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *N Engl J Med* 2008; 359: 2355-2365.
152. Lacoma A, Prat C, Andreo F, Dominguez J. Biomarkers in the management of COPD. *Eur Respir Rev* 2009; 18: 112, 96–104.
153. Franciosi LG, Page CP, Celli BR, Cazzola M, Walker MJ, Danhof M, et al. Markers of exacerbation severity in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res* 2006; 7: 74.
154. Hurst RJ, Donaldson GC, Perera WR, Wilkinson TMA, Bilello JA, Hagan GW et al. Use of plasma biomarkers at exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 174: 867–74.
155. Kučinskienė ZA. Klinikinės biochemijos ir laboratorinės diagnostikos pagrindai. VU leidykla, 2008.
156. Dahl M, Tybjaerg-Hansen A, Vestbo J, Lange P, Nordestgaard BG.. Elevated plasma fibrinogen associated with reduced pulmonary function and increased risk of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: 1008–11.
157. Schuetz P, Amin DN, Greenwald JL. Role of procalcitonin in managing adult patients with respiratory tract infections. *Chest* 2012; 141: 1063–73.
158. Daniels JMA, Schoorl M, Snijders D, Knol DL, Lutter R, Jansen HM, Boersma WG. Procalcitonin vs C-reactive protein as predictive markers of response to antibiotic therapy in acute exacerbations of COPD. *Chest* 2010; 138: 1108–15.
159. Loebinger MR, Shoemark A, Berry M, Kemp M, Wilson R. Procalcitonin in stable and unstable patients with bronchiectasis. *Chronic Respiratory Disease* 2008; 5: 155–60.
160. Stolz D, Christ-Crain M, Morgenthaler NG, Leuppi J, Miedinger D, et al. Copeptin, C – reactive protein, and procalcitonin as prognostic biomarkers in acute exacerbation of COPD. *Chest* 2007; 131:1058–67.

161. Park BH, Fikrig SM, Smithwick EM. Infection and nitroblue tetrazolium reduction by neutrophils. *Lancet* 1968; 2: 532–4.
162. Freeman R, King B, Kite P. Serial nitroblue tatrazolium tests in the management of infection. *J Clin Path* 1973; 26: 57–9.
163. Light RW, George RB. Nitroblue tetrazolium test in the diagnosis of pleural effusions. *Chest* 1981; 80: 39–43.
164. Black S, Kuchner I, Samols D. C-reactive protein. *J Biol Chem* 2004; 279(47): 48487-90.
165. Barnes PJ, Shapiro SD, Pauwels RA. Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. *Eur Respir J* 2003; 22(4): 672-688.
166. de Torres JP, Cordoba-Lanus E, Lopez-Aguilar C, Muros de Fuentes M, Montejo de Garcini A et al. C-reactive protein levels and clinically important predictive outcomes in stable COPD patients. *Eur Respir J* 2006; 27(5): 902-907.
167. Kony S, Zureik M, Driss F, Neukirch C, Leynaert B, Neukirch F. Association of bronchial hyperresponsiveness and lung function with C-reactive protein (CRP): a population based study. *Thorax* 2004; 59(10): 892-896.
168. Man SF, Connett JE, Anthonisen NR, Wise RA, Tashkin DP, Sin DD. C-reactive protein and mortality in mild to moderate chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 2006; 61(10): 849-853.
169. Dahl M, Vestbo J, Lange P, Bojesen SE, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG. C-reactive protein as a predictor of prognosis in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 175(3): 250-255.
170. Folchini F, Nonato NL, Feofiloff E, D'Almeida V, Nascimento O, Jardim JR. Association of oxidative stress markers and C-reactive protein with multidimensional indexes in COPD. *Chronic Respiratory Disease* 2011; 8: 101-108.
171. Hansell DM, Bankier AA, MacMahon H, McLoud TC, Müller NL, Remy J. Fleischner Society: Glossary of terms for Thoracic Imaging. *Radiology* 2008; 246:697-722.
172. Pumputienė I, Ėmužytė R, Šiaurys A, Tamošiūnas V. CD4+CD25+ T reguliacinių ląstelių kiekio periferiniame kraujyje kitimo ypatumai vaikų alerginio rinito paūmėjimo ir remisijos metu. *Vaikų pulmonologija ir alergologija* 2009; XII, 1: 4076-4085.
173. Churg A, Wang RD, Tai H, Wang X, Xie C, Wright JL. Tumor necrosis factor- α drives 70 % of cigarette smoke-induced emphysema in the mouse. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170:492-498.

174. Martinez R, Menendez R, Reyes S, Polverino E, Cilloniz C et al. Factors associated with inflammatory cytokine patterns in community-acquired pneumonia. *Eur Respir J* 2011; 37: 393-399.
175. Wu HP, Chen CK, Chung K. Serial cytokine levels in patients with severe sepsis. *Inflamm Res* 2009; 58:385-389.
176. Kitaguchi Y, Fujimoto K, Kubo K, Honda T. Characteristics of COPD phenotypes classified according to the findings of HRCT. *Resp Med* 2006;100:1742-1752
177. Makita H, Nasuhara Y, Nagai K, Ito Y, Hasegawa M et.al. The Hokkaido COPD Cohort Study Group. Characterisation of phenotypes based on severity of emphysema in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 2007; 62:932-937.
178. Hoesein FAAM, Hoop B, Zanen P, Gietema H, Kruitwagen CLJJ et al. CT-quantified emphysema in male heavy smokers: association with lung function decline. *Thorax* 2011;66: 782-787.
179. Nakano Y, Muro S, Sakai H, Hirai T, Chin K et al. Computed Tomographic Measurements of Airway Dimensions and Emphysema in Smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 1102-1108.
180. Mets OM, de Jong PA, vanGinneken B, Gietema HA, Lammers JWJ. Quantitative Computed Tomography in COPD: Possibilities and Limitations. *Lung* DOI 10.1007/s00408-011-9353-9.
181. Han MK, Kazerooni EA, Lynch DA, Liu LX, Murray S et al. Chronic Obstructive Pulmonary Disease Exacerbations in the COPDGene Study: Associated Radiologic Phenotypes. *Radiology* 2011; 261: 274-282.
182. Haruna A, Muro S, Nakano Y, Ohara T, Hoshino Y. CT Scan Findings of Emphysema Predict Mortality in COPD. *Chest* 2010; 138: 635-640.
183. Kim WJ, Silverman EK, Hoffman E, Criner GJ, Mosenifar Z et al. CT Metrics of Airway Disease and Emphysema in Severe COPD. *Chest* 2009; 136: 396-404.
184. Washko GR, Dransfield MT, Estepar RSJ, Diaz A, Matsuoka S et al. Airway wall attenuation: a biomarker of airway disease in subjects with COPD. *J Appl Physiol* 2009; 107: 185-191.
185. Matsuoka S, Kurihara Y, Yaginashi K, Hoshino M, Watanabe N, Nakajima Y. Quantitative Assesment of Air Trapping in Chronic Obstructive Pulmonary Disease Using Inspiratory and Expiratory Volumetric MDCT. *AJR* 2008; 190:762-769.

186. Matsuoka S, Yamashiro T, Washko G R, Kurihara Y, Nakajima Y, Hatabu H. Quantitative CT Assessment of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *RadioGraphics* 2010; 30:55-65.
187. Sin DD, Leipsic J, Man SFP. CT in COPD: just a pretty picture or really worth a thousand words (or dollars)? *Thorax* 2011; 66:741-742.
188. Zaporozhan J, Ley S, Eberhargt R, Weunheimer O, Iliushenko S et.al. Pairwised Inspiratory/Expiratory Volumetric Thin-Slice CT Scan for Emphysema Analysis: Comparison of Different Quantitative Evaluations and Pulmonary Function Test. *Chest* 2005; 128: 3212-3220.
189. Camiciottoli G, Bartolucci M, Maluccio NM, Moroni C, Mascalchi M et al. Spirometrically Gated High-Resolution CT Findings in COPD: Lung Attenuation vs Lung Function and Dyspnea Severity. *Chest* 2006; 129: 558-564.
190. Mets OM, Murphy K, Zanen P, Gietema HA, Lammers JW et al. The relationship between lung function impairment and quantitative computed tomography in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Radiol* 2012; 22(1): 120-128.
191. Han MK, Kazerooni EA, Lynch DA, Liu LX, Murray S et al. Chronic Obstructive Pulmonary Disease Exacerbations in the COPDGene Study: Associated Radiologic Phenotypes. *Radiology* 2011; 261: 274-282.
192. Haruna A, Muro S, Nakano Y, Ohara T, Hoshino Y. CT Scan Findings of Emphysema Predict Mortality in COPD. *Chest* 2010; 138: 635-640.
193. Verhage TL, Heijdra YF, Molema J, Daudey L, Dekhuijzen PNR, Vercoulen JH. Adequate Patient Characterization in COPD: Reasons to Go Beyond GOLD Classification. *Open Respir Med J* 2009; 3: 1-9.
194. Sethi S, Murphy TF. Infection in the Pathogenesis and course of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2008; 359: 2355–2365.
195. Kherad O, Kaiser L, Bridevaux PO, Sarasin F, Thomas Y, Janssens JP, Rutschmann OT. Upper-respiratory viral infection, biomarkers, and COPD exacerbations. *Chest* 2010; 138: 896–904.
196. Sykes A, Mallia P, Johnston SL. Diagnosis of pathogens in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2007; 4: 642–646.
197. Sethi S, Wrona C, Escberger K, Lobbins P, Cai X, Murphy TF. Inflammatory profile of new bacterial strain exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 177: 491–497.

198. Lacoma A, Prat C, Andreo F, Dominguez J. Biomarkers in the management of COPD. *Eur Respir Rev* 2009; 18: 112, 96–104.
199. Franciosi LG, Page CP, Celli BR, Cazzola M, Walker MJ, Danhof M et al. Markers of exacerbation severity in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res* 2006; 7:74.
200. Hurst RJ, Donaldson GC, Perera WR, et al. Use of plasma biomarkers at exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 174: 867–874.
201. Lapperre TS, Willems LNA, Timens W, Rabe KF, Hiemstra PS, Postma DS, et al. Small airways dysfunction and neutrophilic inflammation in bronchial biopsies and BAL in COPD. *Chest* 2007; 131: 53-59.
202. Paats MS, Bergen IM, Hoogsteden HC, van der Eerden MM, Hendriks RW. Systemic CD4+ and CD8+ T-cell cytokine profiles correlate with GOLD stage in stable COPD. *Eur Respir J* 2012; 40: 330-337.
203. Jeffery P, Halgate S, Wenzel S. Methods for the assessment of endobronchial biopsies in clinical research. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168: S1-S17.
204. Hamid Q. How can we improve our assessment of inflammation in clinical studies of COPD that use bronchial biopsies? *Eur Respir J* 2006; 27: 248-249.
205. Gosman MME, Willemse BWM, Jansen DF, Lapperre TS, van Schadewijk A, Hiemstra P et al. Increased number of B-cells in bronchial biopsies in COPD. *Eur Respir J* 2006; 27: 60-64.
206. Hayhurst MD, MacNee W, Flenley DC, Wright D, McLean A, Lamb D et al. Diagnosis of pulmonary emphysema by computerised tomography. *Lancet* 1984; 2(8398): 320-322.
207. Muller NL, Staples CA, Miller RR, Abboud RT. „Density mask“: an objective method to quantitate emphysema using computed tomography. *Chest* 1988; 94(4): 782-787.
208. Tanaka N, Matsumoto T, Miura G, Emoto T, Matsunaga N, Ueda K, Lynch DA. Air trapping at CT: high prevalence in asymptomatic subjects with normal pulmonary function. *Radiology* 2003; 227(3): 776-785.
209. Coxson HO, Mayo J, Lam S, Santyr G, Parraga G, Sin DD. New and current clinical imaging techniques to study chronic obstructive pulmonary disease. *Am Respir Crit Care Med* 2009; 180(7): 588-597.

9. PUBLIKACIJŲ DISERTACIJOS TEMA SĄRAŠAS

1. Šileikienė V, Nargėla R, Danila E. Plaučių funkcijos tyrimų reikšmė sergantiesiems lėtine obstrukcine plaučių liga. Sveikatos mokslai. 2009; 1(61): 2201–2205.
2. Šileikienė V, Nargėla R, Danila E. Kvėpavimo takų uždegimo ypatumai sergant lėtine obstrukcine plaučių liga. Vaikų pulmonologija ir alergologija 2009; 12(1): (4162–4170).
3. Šileikienė V, Danila E. Lėtinės obstrukcinės plaučių ligos fenotipai: klinikinių atvejų apžvalga. Medicinos teorija ir praktika 2010; 16(3): 297–302.
4. Šileikienė V, Jurgauskienė L, Malickaitė R, Danila E. Kraujo citokinų koncentracijos pokyčių priklausomybė nuo lėtinės obstrukcinės plaučių ligos klinikinės fazės. Laboratorinė medicina. 2011; 13, Nr.1 (49): 26–30.
5. Šileikienė V, Zeleckienė I, Norkūnienė J, Matačiūnas M, Danila E. Radiologinių ir funkcinių plaučių pokyčių ryšys sergant lėtine obstrukcine plaučių liga. Vaikų pulmonologija ir alergologija 2012; 15(1): 4932–4940.
6. Šileikienė V, Norkūnienė J, Bagdonaitė L, Danila E. Kraujo uždegimo žymenų pokyčiai sergant lėtine obstrukcine plaučių liga. Laboratorinė medicina 2012, 14, Nr.2(54): 75–79.
7. Šileikienė V, Zeleckienė I, Matačiūnas M, Norkūnienė J, Danila E. The relationship between radiologic findings and lung function impairment in chronic obstructive pulmonary disease. Eur Respir J 2012; 40 (Suppl. 56): 414s.

Pranešimai disertacijos tema (darbo aprobacija – rezultatų sklaida)

1. Šileikienė V. Fizinio krūvio tyrimų reikšmė sergantiesiems obstrukcinėmis plaučių ligomis. Lietuvos pulmonologų draugijos konferencija, 2010 06 04.
2. Šileikienė V, Jurgauskienė L, Malickaitė R, Danila E. Kraujo citokinų koncentracijos pokyčių priklausomybė nuo lėtinės obstrukcinės plaučių ligos klinikinės fazės. Konferencijos „Pulmonologija, alergologija ir klinikinė imunologija – 2011“ mokslinių pranešimų konkursas, Kaunas. 2011 04 27.
3. Šileikienė V, Zeleckienė I, Matačiūnas M, Norkūnienė J, Danila E. The relationship between radiologic findings and lung function impairment in chronic obstructive pulmonary disease. European respiratory society annual congress, Viena 2012 09 03 (P2299).

10. PRIEDAI

10.1 Leidimas atlikti biomedicininį tyrimą



VILNIAUS UNIVERSITETAS
MEDICINOS FAKULTETAS

Kodas 211950810, M.K.Čiurlionio 21/27, 03101, Vilnius Tel.(85)2398701, 2398700, faks.2398705, El.p. mf@mf.vu.lt

VILNIAUS REGIONINIS BIOMEDICININIŲ TYRIMŲ ETIKOS KOMITETAS
M.K.Čiurlionio 21/27, 03101, Vilnius, Tel./ faks. (8-5).2686998, el.pastas bioetika@mf.vu.lt

LEIDIMAS ATLIKTI BIOMEDICININĮ TYRIMĄ

2009-02-10 Nr.1/013

Biomedicininio tyrimo pavadinimas: Bronchų uždegimo poveikis plaučių funkcijai sergant lėtine obstrukcine plaučių liga	
Protokolo Nr:	-
Versijos Nr:	2
Data:	2009.02.06
Asmens informavimo ir informuoto asmens sutikimo forma lietuvių kalba:	
Versijos Nr:	2
Data:	2009.02.06
Klausimynas lietuvių kalba:	
Versijos Nr:	-
Data:	-
Pagrindinis tyrėjas:	Virginija Šileikienė
Biomedicininio tyrimo vieta:	
Istaigos pavadinimas:	VšĮ Vilniaus Universiteto ligoninės Santariškių klinikos
Istaigos adresas:	Santariškių g. 2, Vilnius

Leidimas išduotas Vilniaus Regioninio biomedicininių tyrimų etikos komiteto posėdžio, vykusio 2009 m. sausio mėn. 12 d., sprendimu (protokolo Nr. VR 2009/1).

Vilniaus regioninio biomedicininių tyrimų etikos komiteto ekspertų grupės nariai			
Nr.	Vardas, pavardė	veiklos sritis	dalyvavo posėdyje
1	doc. dr. Laimutė Jakavonytė	filosofija	taip
2	doc. dr. Kęstutis Žagminas	epidemiologija	taip
3	dr. Gytis Andrulionis	teisė	ne
4	dr. Marija Veniūtė	visuomenės sveikata	taip
5	doc. dr. Jolanta Gulbinovič	medicina	taip
6	doc. dr. Vytautė Pečiulienė	medicina, odontologija	ne
7	Laura Malinauskienė	medicina	ne
8	dr. Gražina Pastavkaitė	klinikinė psichologija	ne
9	Ugnė Šakūnienė	pacientų teisės	taip

Pirmininkas



Gytis Andrulionis

10.2 ASMENS, DALYVAUJANČIO KLINIKINIAME TYRIME, INFORMAVIMO FORMA

Gerbiamasis/Gerbiamoji,

Kviečiame Jus dalyvauti prospektyviniame atsitiktinių imčių klinikiniame tyrime “Bronchų uždegimo poveikis kvėpavimo funkcijai sergant lėtine obstrukcine plaučių liga”. Svarbiausias klinikinio tyrimo tikslas – ištirti kvėpavimo takų (bronchų) uždegimo poveikį plaučių funkcijai.

Klinikinė studija vykdoma Vilniaus Universiteto ligoninės Santariškių klinikų Pulmonologijos ir alergologijos centre. Tyrime gali dalyvauti asmenys nuo 18 iki 75 metų, kuriems yra nustatyta lėtinė obstrukcinė plaučių liga (LOPL) ir asmenys sergantys lėtiniu bronchitu. Tyrime dalyvaujantys asmenys bus suskirstyti į dvi grupes: pirmojoje - sergantieji LOPL, antrojoje – sergantys lėtiniu bronchitu (kontrolinė grupė).

Skirtingai nuo įprastinio tyrimo, jums bus atliktas papildomas kraujo tyrimas (to paties dūrio, kai bus imama kraujo įprastiniams tyrimams, metu) autoimuniniam atsakui ištirti. Taip pat skirtingai nuo įprastinio tyrimo, bus tiriama bronchų gleivinė ir nustatomas autoimuninio atsakas. Į kurią grupę bepakliūtumėte, Jums yra garantuojamas kokybiškas ištyrimas. Jeigu Jūs vartojate vaistus LOPL ar lėtiniam bronchitui gydyti, tyrimo metu galėsite ir toliau juos vartoti. Dalyvavimas tyrime jums bus naudingas tuo, kad jūsų plaučių būklė bus visapusiškai ištirta.

Jeigu Jums iškiltų neaiškumų, bet kada galite kreiptis į gydytoją Virginiją Šileikienę Vilniaus Universiteto ligoninės Santariškių klinikų Pulmonologijos ir alergologijos centre ar tel.: 2365227, 2365228, mob. 861291312. Informacija apie Jūsų tyrimų duomenis yra konfidenciali ir prieinama tik tyrėjui. Kompensacija už Jūsų dalyvavimą tyrime nėra numatyta.

Leidimas vykdyti šį klinikinį tyrimą yra išduotas Lietuvos bioetikos komitete, telefonas (8 5) 2398743.

Informavusio gydytojo vardas ir pavardė, parašas
Data

Asmens vardas ir pavardė, parašas
Data

10.3 INFORMUOTO ASMENS SUTIKIMO FORMA

Aš,
esu supažindintas(a) su klinikinio tyrimo “Bronchų uždegimo poveikis plaučių funkcijai sergant lėtine obstrukcine plaučių liga” tikslais, numatomais tyrimais bei nauda tiek man, tiek kitiems pacientams. Aš savanoriškai sutinku dalyvauti šiame tyrime. Sutinku, kad man būtų atliekami kraujo, plaučių funkcijos tyrimai, bei fibrobronchoskopija su bronchų gleivinės biopsija ir bronchoalveoliniu lavažu. Esu supažindintas su tyrimų, kurie man bus atlikti metodika, atlikimo technika, galimomis komplikacijomis ir atlikimo tvarka. Neprieštarauju, kad pagrindinis tyrėjas galėtų susipažinti su medicinos dokumentuose esančia konkrečia informacija apie mano sveikatos būklę. Tyrime dalyvauju, nereikalaudamas apmokėjimo ir pasilieku sau teisę bet kada atsisakyti tolimesnio dalyvavimo tyrime.

Tyrimui pritarta Vilniaus Regioninio biomedicininių tyrimų etikos komiteto, M.K. Čiurlionio 21/27, Vilnius, tel. 2398743.

Data

Asmens parašas

Data

Tyrėjo parašas